CH 649 383 A5

(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) CH 649 383 A5

(51) Int. Cl.[4]: G 01 D 21/02
G 01 N 13/00
G 01 N 21/00

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) PATENTSCHRIFT A5

(21) Gesuchsnummer: 239/81

(22) Anmeldungsdatum: 15.01.1981

(24) Patent erteilt: 15.05.1985

(45) Patentschrift veröffentlicht: 15.05.1985

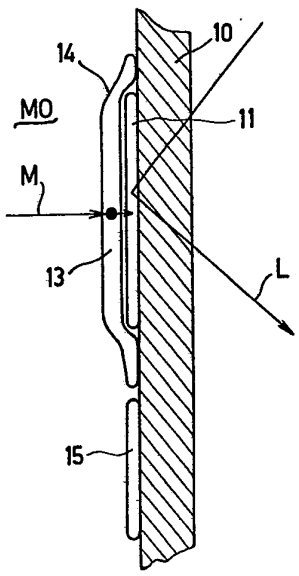
(73) Inhaber:
Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V., Göttingen (DE)

(72) Erfinder:
Lübbers, Dietrich Werner, Prof. Dr., Dortmund (DE)
Völkl, Klaus-Peter, Dipl.-Chem., Lüdinghausen (DE)
Opitz, Norbert, Dr., Dortmund-Lichtendorf (DE)

(74) Vertreter:
Hepatex-Ryffel AG, Zürich

(54) Vorrichtung zur Messung von Konzentrationen von Stoffteilchen.

(57) Die Vorrichtung besitzt einen aus einer Indikatorsubstanz und einer die Indikatorsubstanz umschliessenden Membran bestehenden Indikatorraum (11) zur Messung von Konzentrationen von Stoffteilchen vermittels einer optischen, eine Lichtquelle, einen Lichtempfänger und ein Anzeigegerät enthaltenden Lichtmesseinrichtung. Dem Indikatorraum (11) ist ein mindestens ein Reagens enthaltender, durch eine Membran (14) abgeschlossener Reaktionsraum (13) für die zu messenden Stoffteilchen vorgeschaltet, um einen vom Indikatorraum unabhängigen Reaktionsraum zu haben.



PATENTANSPRÜCHE

1. Vorrichtung zur Messung von Konzentrationen von Stoffteilchen vermittels einer optischen, eine Lichtquelle, einen Lichtempfänger und ein Anzeigegerät enthaltenden Lichtmesseinrichtung, mit einem aus einer Indikatorsubstanz und einer die Indikatorsubstanz umschliessenden Membran bestehenden Indikatorraum (11; 21; 31; 41; 51; 81), der eine Optode bildet, dadurch gekennzeichnet, dass dem Indikatorraum (11; 21; 31; 41; 51; 81) ein mindestens ein Reagens enthaltender, durch eine Membran (14; 24) abgeschlossener Reaktionsraum (13; 23; 33; 43; 53; 73; 83) für die zu messenden Stoffteilchen (M) vorgeschaltet ist.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsrate für die zu messenden Teilchen (M) gering ist.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsrate für die zu messenden Teilchen (M) gross ist.

4. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Permeationswiderstand der den Reaktionsraum (13; 23; 33; 43; 53; 73; 83) abschliessenden Membran (14; 24) gross ist.

5. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration des Reagens im Reaktionsraum (13; 23; 33; 43; 53; 73; 83) gering ist.

6. Vorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Permeationswiderstand der den Reaktionsraum (13; 23; 33; 43; 53; 73; 83) abschliessenden Membran (14; 24) gering ist.

7. Vorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration des Reagens im Reaktionsraum (13; 23; 33; 43; 53; 73; 83) hoch ist.

8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich eine oder mehrere Kontrolloptoden (15; 25; 35; 55; 65; 75) enthält.

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Optode bzw. Optoden Sichtöffnungen und/oder Permeationsöffnungen (37) aufweisen.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Reagens ein biologisches System ist.

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Reaktions raum (13; 23; 33; 43; 53; 73; 83) als eine mit einer Membran (14; 24) abgedeckte Folie ausgebildet ist, an die das Reagens fixiert ist.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Reaktionsraum (13; 23; 33; 43; 53; 73; 83) eine hydrophobe, das Reagens enthaltende Schicht ist.

13. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Indikatorraum (81) als Mikrooptode oder als Nanooptode ausgebildet ist (Fig. 8).

14. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die den Reaktionsraum (13; 23; 33; 43; 53; 73; 83) abschliessende Membran (14; 24) Mittel zum selektiven Transport von zu messenden Teilchen (M) aufweist.

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Optode bzw. Optoden und der Reaktionsraum auf dem Ende eines Lichtleiters (68, 69; 78) angeordnet sind.

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass im Reaktionsraum (13; 23; 33; 43; 53; 73; 83) wenigstens ein zusätzliches Reagens angeordnet ist, das mit wenigstens einer störenden Teilchenart reagiert, um diese aus dem Reaktionsraum zu entfernen.

17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass im Reaktionsraum (13; 23; 33; 43; 53; 73; 83) wenigstens ein zusätzliches Reagens angeordnet ist, das die Konzentration der zu messenden Teilchen im Reaktionsraum verändert.

18. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass dem Reaktionsraum (23) wenigstens ein weiterer Reaktionsraum (22) vorgeschaltet ist (Fig. 2).

19. Vorrichtung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass optische Mittel (24) zwischen die Reaktionsräume (22, 23) geschaltet sind.

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Optode bzw. Optoden und/oder die Reaktionsräume (33) gefenstert sind.

21. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Reaktionsraum (60) ringförmig ist (Fig. 6).

22. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Reaktionsräume (73, 73', 73'') nebeneinander angeordnet sind, um eine mehrflächige Reaktionsoptode zu bilden.

23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass der Reaktionsraum (43; 60; 73) die Optode (41; 65; 75) teilweise überdeckt.

24. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Reaktionsraum (53) Zuleitungen (58, 59) aufweist.

25. Vorrichtung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass Optoden oder Reaktionsräume als optische Mittel ausgebildet sind.

26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass der Reaktionsraum ein solches Reagens oder solche Reagenzien enthält, dass die Reaktion kontinuierlich abläuft.

27. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass weitere Mittel unterschiedlicher Selektivität zum Transport von mehreren, an der Reaktion beteiligten Teilchenarten vorgesehen sind.

28. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet dass die Folie und die die Folie abdeckende Membran einstückig ausgebildet sind.

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Messung von Konzentrationen von Stoffteilchen vermittels einer optischen, eine Lichtquelle, einen Lichtempfänger und ein Anzeigegerät enthaltenden Lichtmesseinrichtung, mit einem aus einer Indikatorsubstanz und einer die Indikatorsubstanz umschliessenden Membran bestehenden Indikatorraum, der eine Optode bildet.

Es ist bereits vorgeschlagen worden, Vorrichtungen dieser Art mehrstufig wirkend auszubilden und mit den zu messenden Stoffteilchen reagierende Substanzen dem Indikatorraum beizugeben.

Die Aufgabe der Erfindung besteht nun darin, eine möglichst weitgehende Trennung von Reagentien und Indikator zu verwirklichen, da damit besondere Vorteile erzielbar sind und weitere Anwendungen der Vorrichtung möglich werden.

Zur Lösung dieser Aufgabe wird nach der Erfindung dem Indikatorraum ein mindestens ein Reagens enthaltender, durch eine Membran abgeschlossener Reaktionsraum für die zu messenden Stoffteilchen vorgeschaltet.

Dieser Reaktionsraum, der, wie der Indikatorraum selbst, das Reagens durch eine Membran gegen das Messobjekt absperrt, wobei die Membran durch Permeation von den zu messenden Teilchen überwunden wird, gestattet die Trennung von Messobjekt, Indikatorsubstanz, Reagens und Reaktionsprodukten.

Die erfindungsgemässe Vorrichtung lässt sich deshalb dort mit grossem Vorteil anwenden, wo eine bestimmte Teilchenart nicht direkt messbar ist, wo es aber Reaktionen gibt,

die aus den zu messenden Teilchen solche Teilchen erzeugen, die messbar sind. Wird ein solches Reaktionssystem im Reaktionsraum angeordnet, wird dort aus den zu messenden Teilchen die messbare Teilchenart entstehen.

Durch die Einschliessung des Reaktionssystems in den abgeschlossenen Reaktionsraum lassen sich jetzt eine grosse Anzahl von Reaktionen anwenden, die sonst nicht frei im Messobjekt auftreten dürfen, z.B. weil toxische oder katalytische Substanzen auftreten, die aber eine Replacierung der einen (zu messenden) durch die andere (messbare) Teilchenart gestatten.

Durch diese messtechnische Replacierung von einer Teilchenart durch eine andere werden in der Regel weder stoffliche Störungen noch Störungen auf die optische Messung ausgeübt, andererseits sind fast unbeschränkt viele Teilchenarten, selbst unter physiologischen Bedingungen, messtechnisch erfassbar geworden. Ein besonderer Vorteil besteht darin, dass nicht nur einmalige Messungen (im sogenannten Endstopp-Verfahren, bei dem die Reaktion bis zum Aufbruch des Reagens abläuft), sondern auch kontinuierliche Messungen im Fliessgleichgewicht möglich sind, weil das Reaktionssystem ohne Rücksicht auf das Messobjekt so ausgebildet werden kann.

Gerade die Stetigkeit der Messung erlaubt die Verwendung der Anordnung zur Prozessüberwachung, insbesondere auch dort, wo es bisher keine Methoden zur direkten Konzentrationsmessung gab. Beispielsweise ist die Überwachung der Alkoholerzeugung im industriellen Prozess oder die Überwachung von Glucose im biologischen Prozess bisher nicht direkt möglich gewesen.

Aufgrund der starken Störanfälligkeit biologischer Objekte durch Konzentrationsänderungen der in diesen wirkenden Stoffe ist die Vorrichtung nach der Erfindung insbesondere auch hier mit Vorteil anwendbar.

Da der Reaktionsraum immer zusammen mit mindestens der die Reaktion messenden Messoptode verwendet wird, ist es zweckmässig, diese Kombination als «Reaktionsoptode» zu bezeichnen.

Durch besondere Ausbildungen des Reaktionsraumes ist es möglich, unterschiedliche Messprobleme zu lösen. Hierbei kann die Vorrichtung an das jeweils vorliegende Messobjekt angepasst werden: Ist die Reaktionsrate für die zu messenden Teilchen im Reaktionsraum gering, dann wird das im Messobjekt etwa vorliegende Fliessgleichgewicht durch den Reaktionsraum nicht gestört, die Messung zeigt den jeweils aktuellen Zustand an, beispielsweise die aktuelle Sauerstoffkonzentration.

Ist andererseits die Reaktionsrate für die zu messenden Teilchen gross, dann entsteht eine deutliche Senke für die zu messenden Teilchen, so dass beispielsweise aus der Messung des Senkenprofils die Grösse des Teilchenstromes bestimmt werden kann.

Die Grösse der Reaktionsrate lässt sich leicht durch Wahl des jeweils optimalen Permeationswiderstandes (Membrandicke, Membranart) und der optimalen Konzentration des Reagens auf ein gemessenes Gewebe oder sonstige Biosysteme einstellen. Ist beispielsweise der Permeationswiderstand der Membran gering – bei dünnen oder grossporigen Membranen oder solchen mit grosser spezifischer Oberfläche – oder ist die Konzentration des Reaktions gross oder aber beide Eigenschaften liegen vor, dann ist auch die Reaktionsrate gross. Soll die Reaktionsrate klein sein, dann sind Membranen mit grossem Permeationswiderstand und Reagentien in kleinen Konzentrationen zu wählen. Was im einzelnen von Vorteil ist, kann jeweils nur im Hinblick auf die Eigenschaften des Messobjektes festgelegt werden. Die Ausführung ist dem Fachmann wohlbekannt.

Vorzugsweise kann die Vorrichtung zusätzlich eine oder mehrere Kontrolloptoden enthalten. Häufig ist es nämlich von Interesse, wenn gleichzeitig die zu messenden Teilchen im Reaktionsraum bestimmt und weitere, für die Messung wichtige Parameter innerhalb oder ausserhalb des Reaktionsraumes überwacht werden.

Beispielsweise ist häufig die Temperatur oder der Binnendruck oder die Konzentration der zu messenden oder anderer Teilchen für einen biologischen Ablauf von Bedeutung. Die Überwachung dieser Parameter durch Optoden ist deshalb sehr vorteilhaft, weil diese die störungsfreie optische Messung ermöglichen.

Um zu vermeiden, dass für diese optische Messung störende Abschattungen auftreten, oder dass der Permeationsstrom gestört wird, können die Optoden oder der Reaktionsraum Sichtöffnungen und/oder Permeationsöffnungen aufweisen.

Eine besonders starke Anwendungserweiterung ist möglich, wenn das Reagens ein biologisches System ist. Solche Systeme – beispielsweise Enzyme, Enzymketten, Zellextrakte, Zellpartikel, Zellen, Viren, Bakterien, Pilze, Mikroorganismen oder Antikörper – haben häufig eine hohe Spezifität für Stoffteilchen oder andere chemische oder physikalische Parameter, so dass hierdurch eine hohe Messelektivität erreichbar ist. Die Präparation solcher Reaktionsoptoden kann ohne grosse Schwierigkeiten erfolgen.

Um die Messzeitkonstanten möglichst gering zu halten, kann der Reaktionsraum zweckmässig möglichst dünn gemacht werden, beispielsweise kann der Reaktionsraum als Folie ausgebildet sein, an die das Reagens fixiert ist. Methoden zur Fixierung sind in der Technik bekannt. Falls die Fixierung eines Reagens an eine Folie nicht möglich ist, können auch hydrophobe Schichten, die das Reagens festhalten, auf eine Optode aufgebracht werden. Die Optode dient dabei also als Träger für solche nicht eigenstabile Schichten.

In einer anderen Ausführungsform kann der Indikatorraum als Nano- oder Mikrooptode (Durchmesser < 10 µm) ausgebildet sein. Solche Kleinstoptoden lassen sich physikochemisch gut herstellen und können zur Lösung einer Reihe von Messproblemen herangezogen werden. Meist werden die Kleinstoptoden den Trägerflüssigkeiten – etwa Blut – oder dem Gewebe zugegeben und dort selbst auch ausgemessen. Zweckmässig kann in diesem Fall der Reaktionsraum aus einer die Optode einschliessenden Membran bestehen, weil in flüssigkeitsgefüllten Reaktionsräumen mit eingeschlossenen Kleinstoptoden die Symmetrie nicht gut eingehalten werden kann, andererseits die Dicke des Reaktionsraumes das Signal mitbestimmt.

Für den Fall, dass im Reaktionsraum die Messung störende Teilchen bei einer der dort ablaufenden Reaktionen entstehen, können vorteilhaft weitere Reagentien im Reaktionsraum angeordnet werden, die solche störenden Teilchen aus dem Reaktionsraum entfernen. Solche Reagentien können chemischer oder physikalischer Art sein.

Andererseits können auch weitere Reagentien vorgesehen sein, die die Konzentration der zu messenden Teilchen im Reaktionsraum verändern. Dadurch kann das Signal der Lichtmesseinrichtung in Einzelfällen beträchtlich erhöht werden.

Dem Reaktionsraum können ferner noch zusätzliche Reaktionsräume vorgeschaltet sein. Dadurch wird es möglich, mehrstufige Reaktionen durchzuführen, bei denen die Reaktionspartner untereinander nicht kompatibel sind, die Reaktionsprodukte auf dem Permeationswege in die jeweils benachbarten Reaktionsräume aber eindringen und weiterreagieren können.

Sollen die Reaktionen selbst überwacht werden, können zweckmässig dort Thermoelemente, Messelektroden oder dergleichen oder auch Kontrolloptoden angeordnet sein und

es können auch Filter zur optischen Signaltrennung zwischen Reaktionsräumen und/oder Optoden geschaltet sein.

Optoden oder Reaktionsräume können dazu zusätzlich gefenstert sein, so dass Licht verschiedener Wellenlänge zur Analyse der Optoden nebeneinander verwendet werden kann, und sie können selbst als optische Filter ausgebildet sein.

Besonders günstige Bauformen für Reaktionsräume sind ringförmige Anordnungen, mehrflächige Anordnungen, Anordnungen auf Lichtleitern, insbesondere auf aufgespaltenen Lichtleitern, wenn der Reaktionsraum und die Messoptode auf einem, eine Kontrolloptode auf einem zweiten Lichtleiterende angeordnet ist.

In den Zeichnungen, anhand derer Ausführungsbeispiele der Erfindung erläutert werden, zeigen:

Fig. 1 eine erste Ausführungsform der Vorrichtung nach der Erfindung und

Fig. 1A in grösserem Massstab einen Ausschnitt aus Fig. 1,

Fig. 2 eine mehrstufige Vorrichtung,

Fig. 3 einen Ausschnitt einer gefensterten Reaktionsoptode,

Fig. 4 eine freie Reaktionsoptode und

Fig. 4A eine graphische Darstellung von Konzentrationen, die mit Reaktionsoptoden gemäss Fig. 4 gemessen werden,

Fig. 5 eine Reaktionsoptode mit Zuleitungen,

Fig. 5A eine graphische Darstellung von Teilchenkonzentrationen in der Reaktionsoptode von Fig. 5,

Fig. 5B graphisch ein Kennlinienfeld für die Reaktionsoptode von Fig. 5,

Fig. 6 Reaktionsoptoden auf Lichtleitern,

Fig. 7 eine mehrflächige Reaktionsoptode und

Fig. 8 eine Mikro- bzw. Nanooptode.

In Fig. 1 ist eine Messoptode 11 auf einer Glasplatte 10 angeordnet und von einem Reaktionsraum 13 überdeckt und abgeschlossen. Ausserhalb des Reaktionsraumes ist eine Kontrolloptode 15 angeordnet. Ein Teilchenstrom M von zu messenden Teilchen tritt aus dem Messobjekt MO durch die Membran 14 des Reaktionsraumes 13 in den Reaktionsraum ein, reagiert dort, und das Reaktionsprodukt tritt über die rückwärtige Membran des Reaktionsraumes durch die Membran der Optode 11 in den Indikatorraum ein und ändert die optischen Eigenschaften der Indikatorsubstanz, wobei diese Änderung durch einen Lichtstrahl L der (nicht gezeichneten) Lichtmesseinrichtung gemessen wird. Der Betrieb der Vorrichtung, die sich auf alle permeationsfähigen Teilchenarten anwenden lässt, bei denen durch Reaktionen charakteristische Teilchenarten entstehen oder verschwinden, wird in einem ersten Beispiel anhand des Systems Glucose-Glucoseoxydase erläutert.

Für Glucose selbst gibt es zur Zeit keinen optischen Indikator, der eine direkte optische Konzentrationsmessung ermöglicht. Da Glucose aber mit Sauerstoff umgesetzt werden kann, ist die Bestimmung der Glucosekonzentration über die Messung der Sauerstoffkonzentration möglich. Die Glucose wird also für die Messung durch Sauerstoff replaciert. Sauerstoff selbst kann mit Fluoreszenzoptoden bestimmt werden. Mit der Glucoseoxydase GOD und dem Koenzym FAD ergeben sich die folgenden Reaktionsgleichungen:

$$\text{Glucose} + \text{FAD} \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Gluconsäure-}\delta\text{-Lacton} + \text{FADH}_2$$
$$\text{O}_2 + \text{FADH}_2 \longrightarrow \text{FAD} + \text{H}_2\text{O}_2$$

$$\text{Glucose} + \text{O}_2 \xrightarrow[\text{Catalase}]{\text{GOD}} \text{Gluconsäure-}\delta\text{-Lacton} + \text{H}_2\text{O}_2$$
$$\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + {}^1/_2\,\text{O}_2$$

Zu Fig. 1A, einer Vergrösserung im Ausschnitt aus Fig. 1, ergibt sich dabei die folgende Zuordnung:

M = Strom der zu messenden Teilchen

P = sämtliche Reaktionspartner

G = von der O_2-Optode 11 gemessene Teilchen

Der Teilchenstrom der zu messenden Teilchen M kommt zur Reaktion P mit dem im Reaktionsraum 13 angeordneten Reagens R, bestehend aus GOD + FAD + $FADH_2$ + H_2O_2 und Catalase. Der Sauerstoff G wird gemessen und ist – gegenüber der Sauerstoffkonzentration im Messobjekt MO – um $^1/_2\,O_2$ pro Glucosemolekül verringert.

Das Messobjekt MO ist also, da alle Reaktionspartner ohnehin bei der Glucoseveratmung entstehen würden, hinsichtlich der Teilchenarten ungestört, jedoch ist eine charakteristische Menge Sauerstoff am Ort des Reaktionsraumes 13 verbraucht, was durch die Optode 11 verlustlos bestimmbar ist. Damit ist eine kontinuierliche, verlustlose Messung unter physiologischen Bedingungen möglich.

Voraussetzung dieser Messung ist die Kenntnis der Sauerstoffkonzentration im Messobjekt MO, die durch die Kontrolloptode 15 gemessen wird: Wie die Gleichungen zeigen, ist die Sauerstoffdifferenz ein Mass für die verbrauchte Glucose. Messtechnisch wird ein möglichst grosser Gradient im Reaktionsraum 13 angestrebt. Die Intensitätsgleichungen für dieses System lauten wie folgt:

Für die Fluoreszenzlichtanalyse von Sauerstoff mit beispielsweise Pyrenbuttersäure als Indikator (nach VAUGHAN und WEBER) gilt nach STERN und VOLMER

$$\frac{I_o'}{I'} = 1 + K'\,[O_2]$$

mit

I_o' = rel. Fluoreszenzintensität ohne Sauerstoff

I' = rel. Fluoreszenzintensität bei der jeweiligen Sauerstoffkonzentration

$[O_2]$ = Sauerstoffkonzentration

K' = Faktor, proportional der Quenchkonstante

Daraus lässt sich die Sauerstoffkonzentration bestimmen zu

$$[O_2] = \frac{\frac{I_o'}{I'} - 1}{K'} = \frac{I_o' - I'}{I'K'}$$

Diese Gleichungen gelten für die Kontrolloptode 15.

Für die Reaktionsoptode mit dem Reaktionssystem P gilt:

$$\frac{I_o}{I} = 1 + K\,[O_2] - K^*\,[O_2]$$

wobei K die Quenchkonstante für die Messoptode 11 und K* eine Reaktionskonstante für das stoffliche Reaktionssystem darstellen.

Damit ergibt sich

$$\frac{I_o}{I} = 1 + K\left[\frac{I_o' - I'}{I'K'}\right] - K^*\,[\text{Glucose}]$$

Daraus entsteht für die Glucosekonzentration:

$$-[\text{Glucose}] = \left\{\frac{I_o}{I} - 1 - K\frac{(I_o' - I')}{I'K'}\right\} /K^*$$

$$[\text{Glucose}] = \left\{1 + K\frac{(I_o' - I')}{I'K'} - \frac{I_o}{I}\right\} /K^* \quad (1)$$

Dabei entsprechen die gestrichenen Grössen der Optode 15, die ungestrichenen Grössen der Optode 11, die mit Stern versehene Grösse dem Reaktionssystem im Reaktionsraum. Die Konstanten K, K', K* sind experimentell bestimmbar.

Als Reagentien können nicht nur anorganische oder organische, wie in dem oben beschriebenen Beispiele, verwendet werden, sondern der Reaktionsraum kann auch mit biologischen Systemen gefüllt sein. Solche Systeme, wie beispielsweise lebende Zellen, Zellpartikel, Pilze, Bakterien, Viren, Antikörper und dergleichen, haben meist eine hohe Reaktionsselektivität, nehmen also aus einem Partikelgemisch nur eine bestimmte Art heraus, ohne andere Partikelarten anzugreifen. Dadurch kann auch ohne vorausgegangene Präparation, vor allem aber in lebendem Gewebe unter physiologischen Bedingungen, gemessen werden.

Eine weitere Erhöhung der Selektivität lässt sich durch mit Carriern versehene Membranen erreichen. Solche Membranen weisen einen für eine bestimmte Teilchenart geeigneten Carrier – beispielsweise Valinomycin zum Transport von K^+-Ionen – auf. Dadurch kann die den Reaktionsraum abschliessende Membran für andere Teilchen als die zu messenden, hier K^+-Ionen, sehr viel weniger durchlässig gemacht werden, und eine hohe Selektivität des Reaktionsraumes für K^+-Ionen ist die Folge.

Sind mehrere Teilchenarten zum Ablauf einer Reaktion erforderlich, wie beispielsweise bei der Umsetzung von Glucose die Glucose und der Sauerstoff, kann es von Vorteil sein, wenn selektive Durchlässigkeiten erzeugt werden, die für jedes der Teilchen für sich spezifisch sind. Dazu können jeweils in bekannter Weise der Vernetzungsgrad der Membransubstanz, deren Löslichkeit für die betreffende Teilchenart, die Porengrösse der Membran und die Aufladung der Membranporen durch elektrische Ladungen an das zu transportierende Teilchen angepasst werden. Die Porengrösse der Membran ist durch mechanische Streckung oder chemische Ätzung veränderbar.

Reaktionssysteme wie das oben beschriebene aus Glucose-Glucoseoxydase können als «einstufig» bezeichnet werden. Ein anderes einstufiges System ist die Messung von CO_2 durch Protonen nach der folgenden Gleichung:

$$H_2O + CO_2 \rightleftarrows [H_2CO_3] \rightleftarrows [H^+] + [HCO_3^-]$$

Hier würde sich für Fig. 1A die folgende Zuordnung ergeben:

$M = CO_2$
$P = H_2CO_3, H_3^+, HCO_3^-$
$G = H^+$, von H^+-Optode 11 gemessen

In einem weiteren einstufigen Reaktionssystem zur Messung von Alkohol kann Alkohol durch Sauerstoff replaciert werden. Unter Verwendung von Alkoholdehydrogenase ergibt sich.

$$CH_3{-}CH_2{-}OH + NAD \xrightleftharpoons{\text{Alkoholdehydrogenase}} CH_3{-}C(=O){-}H + NADH_2$$

$$NADH_2 + O_2 \xrightleftharpoons{\text{NADH-Oxydase}} NAD + H_2O_2$$

$$H_2O_2 \xrightleftharpoons{\text{Catalase}} H_2O + {}^1/_2\,O_2$$

Es besteht also zu Fig. 1A die Zuordnung
$M = C_2H_5OH$
$P = C_2H_5OH$, NAD, C_2H_4O, $NADH_2$, Alkoholdehydrogenase, NADH-Oxydase, H_2O_2, O_2, Catalase

$G = O_2$, von O_2-Optode 11 gemessen
und es wird ein um $^1/_2\,O_2$ pro Glucosemolekül verringerter Sauerstoffstrom gemessen.

Diese Reaktion käme nach einiger Zeit zum Stillstand, weil der entstehende Aldehyd die Alkoholdehydrogenase angreift. Die Konzentrationsbestimmung könnte also nur aus der Steigung der Intensitätsfunktion bestimmt werden (was als «Endstopp»-Verfahren bekannt ist). Soll jedoch im Fliessgleichgewicht (steady state) gemessen werden, kann durch Zugabe von Aldehyddehydrogenase eine zur Transformation parallele Reaktion nach der folgenden Gleichung eingeleitet werden:

$$CH_3{-}C(=O){-}H + {}^1/_2\,O_2 \xrightarrow[(NAD)]{\text{Aldehyddehydrogenase}} CH_3{-}C(=O){-}OH$$

Die Essigsäure diffundiert in das Messobjekt zurück. Ausserdem wird die Konzentration von O_2 verringert, und dadurch steigt das Messignal.

Für den Fall, dass das Messignal sehr schwach ist, kann die Konzentration im Reaktionsraum dadurch erhöht werden, dass dort Substanzen mit erhöhter Löslichkeit für die zu messenden Teilchen angeordnet sind. Soll beispielsweise eine schwache Sauerstoffkonzentration gemessen werden, kann der Reaktionsraum mit Fluorocarbonen gefüllt sein, die die Konzentration um bis zu zwei Grössenordnungen im Reaktionsraum gegenüber dem Messobjekt erhöhen können. Auch Öl hat eine höhere Löslichkeit für Sauerstoff als Wasser und kann deshalb entsprechend verwendet werden.

Es sind jedoch nicht nur parallel laufende Reaktionen im gleichen Reaktionsraum – im Beispiel zur Entfernung störender Teilchen eingesetzt – verwendbar, sondern auch seriell ablaufende Reaktionen. Dazu müssen mehrere Reaktionsräume hintereinandergeschaltet und durch permeierbare Membranen getrennt werden. Dadurch können Wechselwirkungen

der Reagentien oder Störungen der Teilchen vermieden werden.

In Fig. 2, einem vergrösserten Ausschnitt einer Anordnung mit hintereinandergeschalteten Reaktionsräumen 22, 23, die durch Membranen 26, 24, 27 abgeschlossen bzw. voneinander getrennt sind, tritt ein Strom von zu messenden Teilchen M in den ersten Reaktionsraum 22 ein. Zusammen mit einem Reagens oder Reagentiensystem R' läuft eine Reaktion P' ab, aus der eine Teilchenart G' abgespalten wird, die nach Permeation der Membran 24 in den Reaktionsraum 23 gelangt. Hier tritt sie mit dem Reagens R zu einer Reaktion P zusammen, aus der eine Teilchenart G entsteht, die durch die Optode 21 gemessen wird. Ein Beispiel für ein solches System ist die Umwandlung von Plasmacholesterin unter Sauerstoffverbrauch:

Fettsäure-cholesterinester	Cholesterinesterase ⟶	Cholesterin + Fettsäure
Cholesterin + FAD	Cholesterinoxydase ⟶	Ox. Cholesterin + $FADH_2$
$FADH_2 + O_2$	Cholesterinoxydase ⟶	$FAD + H_2O_2$
H_2O_2	Catalase ⟶	$H_2O + {}^1/_2 O_2$

Als Zuordnung ergibt sich also zu Fig. 2:

M = Plasmacholesterin (= Fettsäurecholesterinester)

P' = Fettsäurecholesterinester, Cholesterin, Cholesterinesterase, Fettsäure

G' = freies Cholesterin

R' = Cholesterinesterase

R = Cholesterinoxydase

P = Cholesterin, FAD, $FADH_2$, O_2, H_2O_2, Catalase, oxydiertes Cholesterin

G = Sauerstoff, von O_2-Optode gemessen, um $^1/_2$ O_2 gegenüber dem Messobjekt verringert.

Es können jedoch auch noch weitere Reaktionsräume zu einer Kolonne zusammengeschaltet werden, wenn die Replacierung von einem zu messenden Teilchen durch ein messbares Teilchen dies erfordert.

Ein dreistufiges System nach dem folgenden Beispiel gestattet die Umwandlung von Stärke als zu messende Teilchenart in Sauerstoff als messbare Teilchenart:

Stärke	α-Amylase ⟶	Dextrin
Dextrin	Glucoamylase ⟶	Glucose
Glucose	Glucoseoxydase ⟶	Gluconsäure

Auch hierbei ergibt sich ein Sauerstoffverbrauch von $^1/_2$ O_2 pro Molekül entstehender Glucose, der durch die Messoptode und die zugeordnete Kontrolloptode bestimmt wird.

Als Zuordnung zu Fig. 2 ergibt sich in verkürzter Form:

M = Stärke

R' = α-Amylase

G' = Dextrin

R = Glucoamylase

G = Glucose

Daraus ergibt sich im – nicht gezeichneten – dritten Reaktionsraum mit Glucoseoxydase als Reagens ein Sauerstoffverbrauch, der wiederum mit einer O_2-Optode entsprechend Fig. 1A gemessen werden kann.

Wenn die verschiedenen Reaktionsräume mit verschiedenfarbigen Indikatoren überwacht werden, können anstelle der Membranen 24, 27 . . . optische Mittel, wie Filter, Spiegel und gegebenenfalls weitere Kontrolloptoden 25 vorgesehen sein. Werden dabei reflektierende Schichten verwendet, ist es von Vorteil, wenn die Optoden oder die Reaktionsräume gefenstert sind.

Eine Anordnung dieser Art zeigt Fig. 3. Messlicht L einer ersten Farbe analysiert eine erste Optode 35, die mit Fenstern 37 zur Durchsicht und zum Kontakt der zu messenden Teilchen mit dem Reaktionsraum 33 versehen ist. Zweckmässig ist die Optode 35 auf der an den Reaktionsraum 33 angrenzenden Rückseite mit einer reflektierenden und die Permeation hindernden Metallschicht versehen. Die Optode 35 ist also geeignet, den vorderen Raum, das Messobjekt, zu überwachen. Messlicht L' einer zweiten Farbe, die an eine zweite Optode 31 angepasst ist, durchstrahlt die Öffnungen 37 und den Reaktionsraum 33 und wird ebenfalls an einer metallischen Schicht auf der Rückseite der Optode 31 reflektiert. Die Trennung der Lichtkomponenten bereitet keine Schwierigkeiten, so dass der Reaktionsraum, dass Messobjekt und bei Bedarf durch eine im Reaktionsraum 33 angeordnete weitere Kontrolloptode 35' die Temperatur oder andere Parameter überwachbar sind.

Zu Zwecken der Implantation können Anordnungen nach Fig. 4 Verwendung finden. Hier ist die Optode 41 nur teilweise vom Reaktionsraum 43 überdeckt. Der Teil 48 aus Reaktionsraum und Optode ist die Reaktionsoptode, der Teil 49 die Kontrolloptode.

Mit solchen freien Reaktions- und Kontrolloptoden können beispielsweise Diffusionsprofile nach Fig. 4A ausgemessen werden: Wird durch niedrige Konzentration in der Reaktionsoptode und hohen Permeationswiderstand der Membran die Reaktionsrate klein gehalten, kann an den Orten S1, S2 eines (ausgedehnten) Messobjektes MO die Konzentration von Teilchen optisch vermessen werden, ohne dass Störungen der Teilchenkonzentration auftreten. Ist am Ort S3 eine Reaktionsoptode mit hoher Reaktionsrate angeordnet, die mit einer Membran von geringem Permeationswiderstand und hoher Konzentration des Reagens versehen ist, dann stellt diese Reaktionsoptode eine merkliche Senke für die zu messenden Teilchen dar und es stellt sich ein bestimmtes Diffusionsprofil C_x ein, das somit ausgemessen und daraus beispielsweise die Grösse des Diffusionsstromes bestimmt werden kann.

Fig. 5 zeigt einen von Optoden 51 und 55 eingeschlossenen Reaktionsraum 53, der mit Zuleitungen 58, 59 versehen ist. Damit lassen sich entweder Enzymaktivitäten im Nullverfahren oder direkt bestimmen: Die Konzentration eines Stromes von zu messenden Teilchen wird unter den üblichen Diffusionsbedingungen über den Reaktionsraum hin abnehmen und bildet eine cosh-Funktion $C_K = f(S)$, Fig. 5A, für kleine Konzentrationen etwa die Kurve A, für grosse Konzentrationen etwa die Kurve B. Die Optoden messen diese Konzentrationen entweder unmittelbar, und daraus lässt sich die Differenz ΔC der Konzentrationen direkt messen, oder die Konzentrationen des durchfliessenden Reagens wird solange geändert, bis beide Optoden eine vorbestimmte, etwa leicht messbare Differenz zeigen. Damit lässt sich ein günstiger Arbeitspunkt im Kennlinienfeld, Fig. 5B, bestimmen, das aus der Gleichung (1) entsteht, wenn die Konzentration C des Reagens als Parameter verändert wird.

Sollen etwa Diffusionsprofile in Flüssigkeiten ausgemessen werden, ist es vorteilhaft, wenn die Reaktionsoptoden auf Lichtleiterenden angeordnet werden. In Fig. 6 ist ein Lichtleiter 67 in zwei Enden 68, 69 aufgespalten. Eine kreisförmige Optode ist von einem ringförmigen Reaktionsraum überdeckt. Dadurch entsteht eine ringförmige Reaktionsoptode 60 mit einer kreisförmigen Kontrolloptode 65 oder eine ringförmige Kontrolloptode 65' mit einer kreisförmigen Reaktionsoptode 60'.

In Fig. 7 sind mehrere Reaktionsoptoden mehrflächig nebeneinander angeordnet. Ist 78 das Lichtleiterende und ist 75 die Kontrolloptode, kann durch Überdeckung mit Reaktionsräumen 73, 73' und 73'' eine mehrflächige Reaktionsoptode gebildet werden, mit der verschiedene Teilchenfraktionen überwachbar sind.

Wenn kleine Messzeitkonstanten erreicht werden sollen, werden zweckmässigerweise dünne Folien als Reaktionsräume vorgesehen, an die die Reagentien fixiert sind, und diese mit Membranen abgedeckt. Besonders kleine Einstellzeiten sind erreichbar, wenn der Reaktionsraum und die Folie einstückig ausgebildet sind. Dazu kann zum Beispiel die Folienoberfläche durch eine chemische Reaktion in eine membranartige Schicht umgewandelt und so der Reaktionsraum, die Folie, abgedichtet werden.

Mikrooptoden, beziehungsweise Nanooptoden, die mittels bekannter physikochemischer Verfahren herstellbar sind, erhalten durch Umschliessung einen Reaktionsraum. Sie bestehen, wie in Fig. 8 dargestellt, aus einem Indikatorraum 81 mit einer Indikatorsubstanz I, der von einem Reaktionsraum 83 umgeben und von einer Membran 84 umschlossen ist. Oft ist es zweckmässig, die Membran 87 des Indikatorraumes und die Membran 84 des Reaktionsraumes zusammenfallen zu lassen und das Reagens in dieser Folie einzuschliessen. Der Zutritt erfolgt durch Permeation der zu messenden Teilchen in die Membran und der in der Membran entstandenen Teilchen in den Indikatorraum 81.

Fig. 1

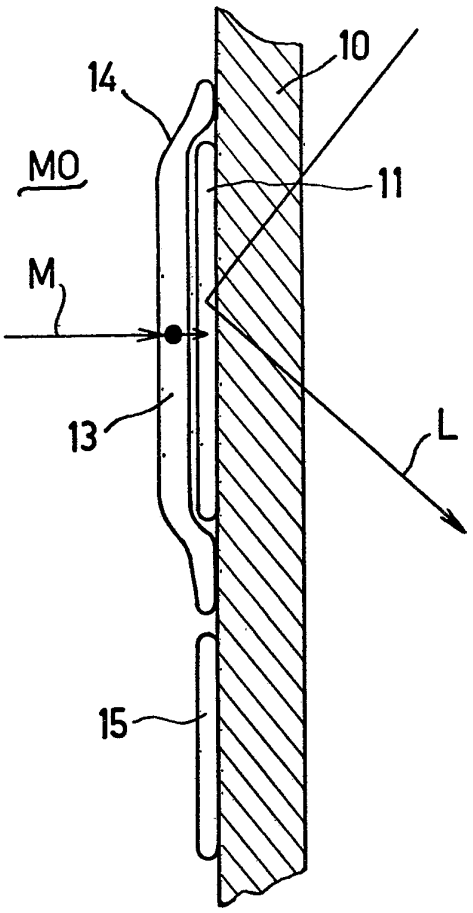


Fig. 1A

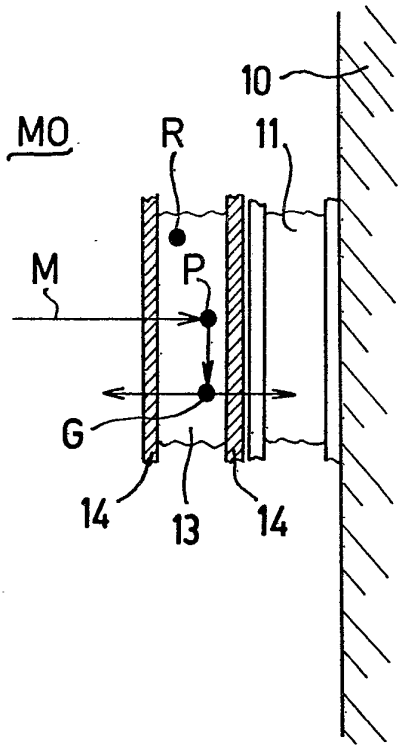


Fig. 2

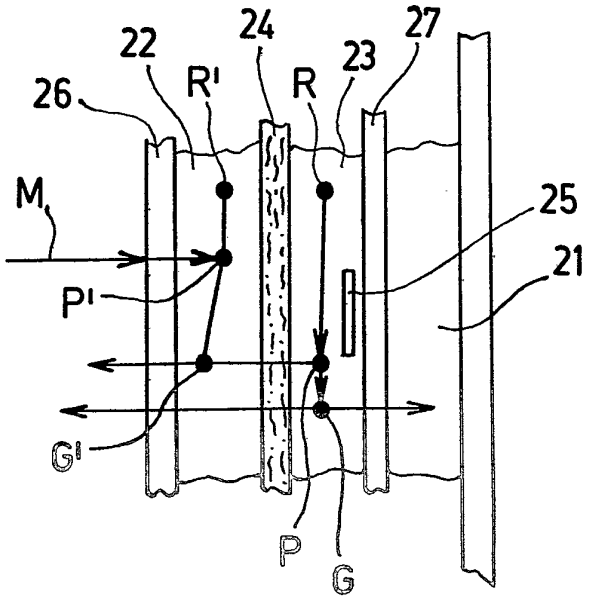


Fig. 3

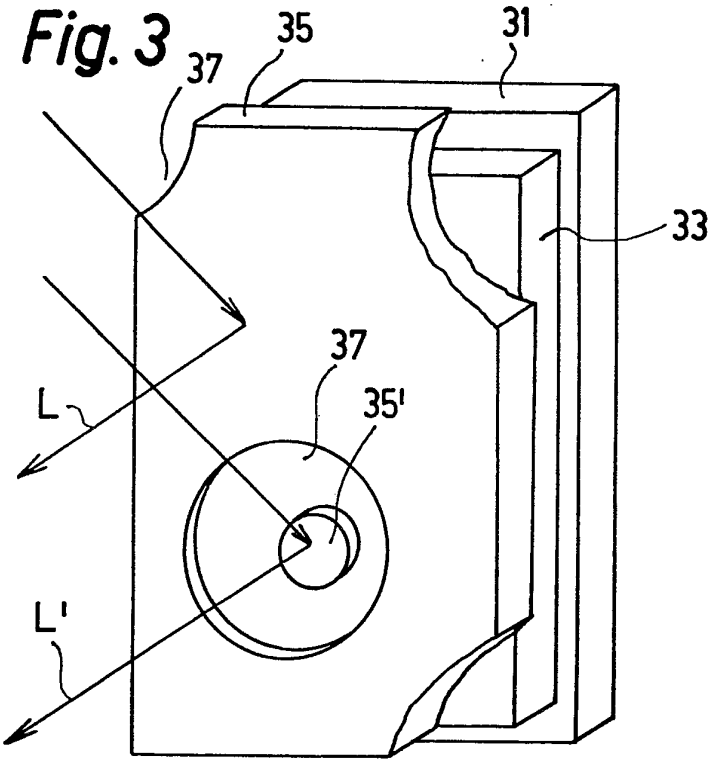


Fig. 5

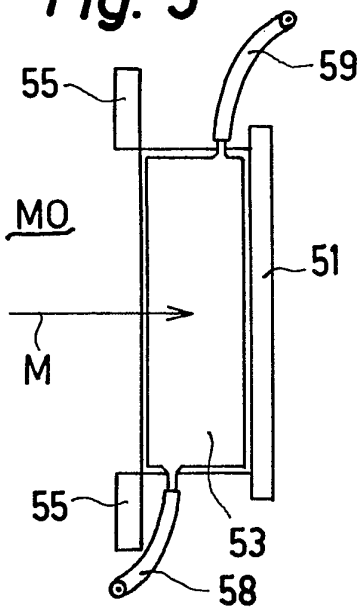


Fig. 5A

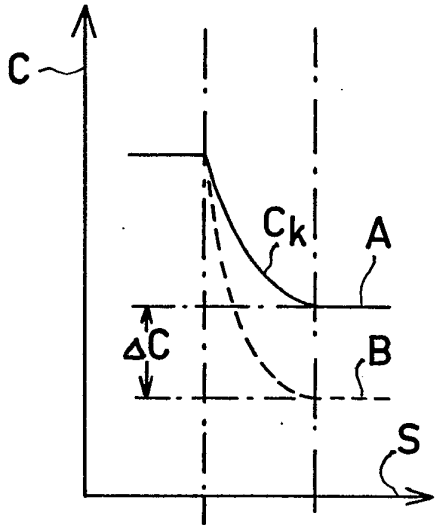


Fig. 4

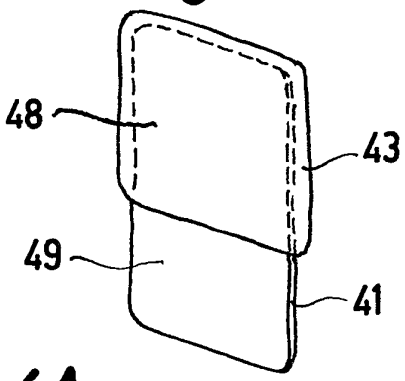


Fig. 4A

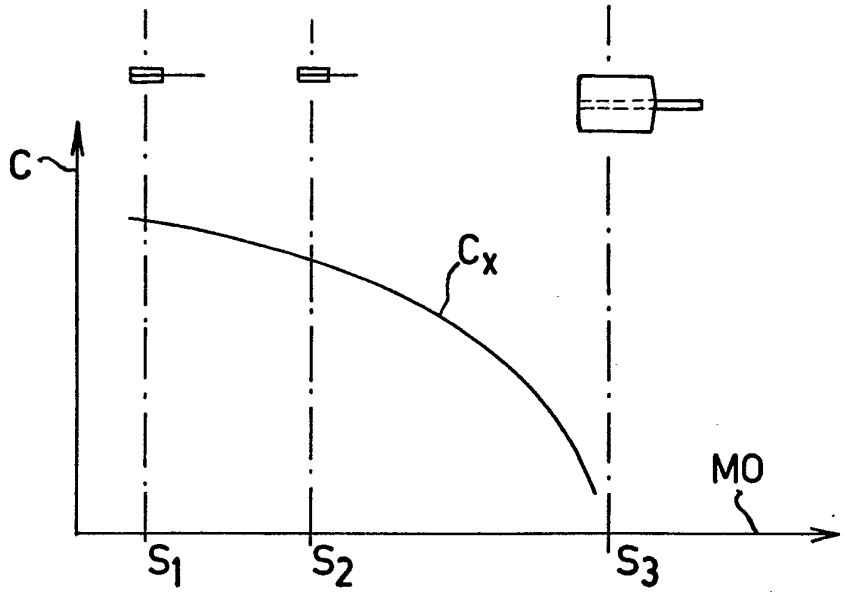


Fig. 5B

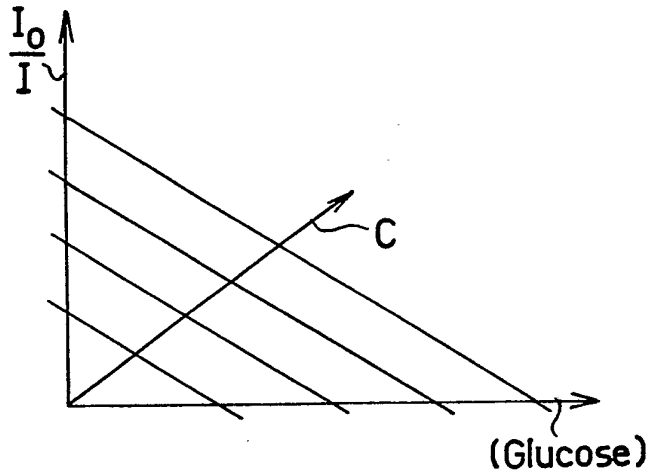


Fig. 6

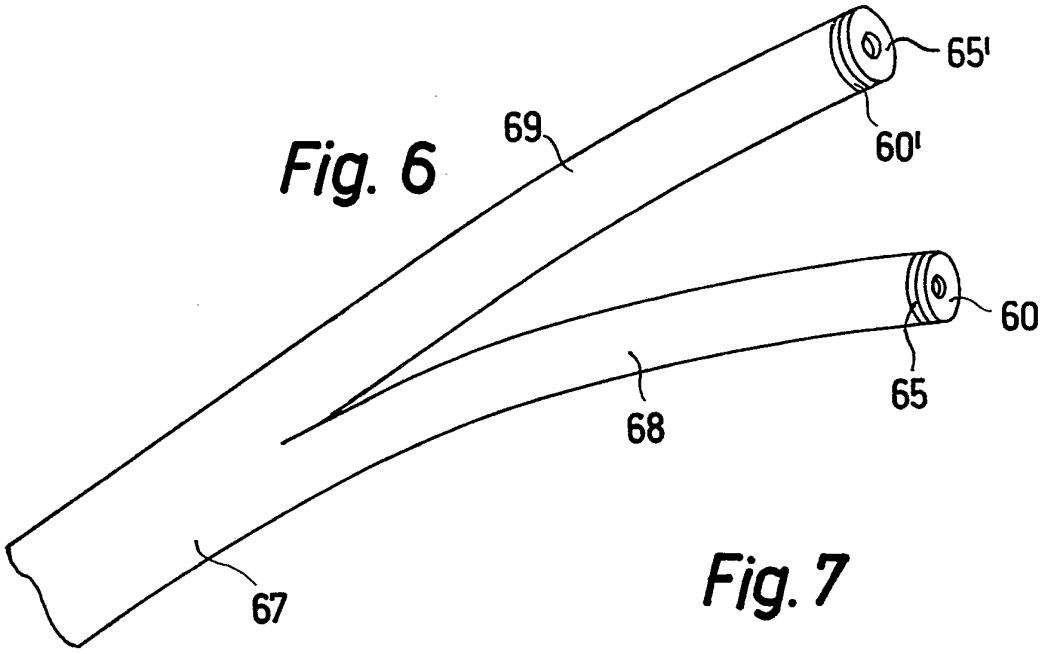


Fig. 7

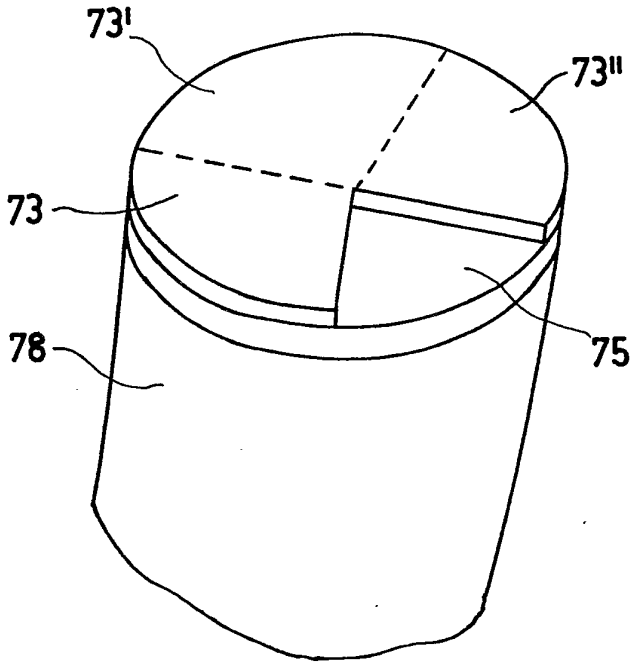


Fig. 8

