



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 247 285 A1

4(51) G 01 N 33/68
G 01 N 27/48
C 12 Q 1/26
C 12 N 11/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N / 287 568 4

(22) 05.03.86

(44) 01.07.87

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Weigelt, Dietmar, Dipl.-Chem.; Schubert, Florian, Dr. rer. nat. Dipl.-Ing.; Scheller, Frieder, Prof. Dr. rer. nat. habil. Dipl.-Chem., DD

(54) Enzymelektrode und Verfahren zur Bestimmung von nebeneinander vorliegendem Lactat, Pyruvat und Alaninaminotransferase

(57) Die Erfindung betrifft eine Enzymelektrode und ein Verfahren zur Bestimmung von nebeneinander vorliegendem Lactat, Pyruvat und Alaninaminotransferase. Ziel ist es, mit geringem Reagenzienaufwand, in schneller Folge und ohne zeitaufwendige Zwischenschritte die Konzentration bzw. die Aktivität der genannten Substanzen zu bestimmen. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine quantitative enzymelektrochemische Bestimmung der nebeneinander vorliegenden Substanzen nacheinander in ein und derselben Meßlösung zu ermöglichen. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe mit einer Enzymelektrode, die Lactatmonooxygenase und Lactatdehydrogenase fixiert aufweist, und einem Verfahren gelöst, das durch Zugabe von NADH und Alanin und/oder α -Ketoglutarat zur Meßlösung gekennzeichnet ist. Die Erfindung wird in der medizinischen Labordiagnostik, in der Lebensmittel- und mikrobiologischen Industrie angewendet.

Erfindungsanspruch:

1. Enzymelektrode, **gekennzeichnet dadurch**, daß auf der Oberfläche der Meßelektrode Lactatmonooxygenase und Lactatdehydrogenase aufgebracht sind.
2. Verfahren zur Bestimmung von nebeneinander vorliegendem Lactat, Pyruvat und Alaninaminotransferase mit einer Enzymelektrode nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß nach der Lactat-Bestimmung der Meßlösung NADH und nach der Pyruvat-Bestimmung Alanin und/oder α -Ketoglutarat zugesetzt wird.
3. Verfahren nach Punkt 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß die NADH-Konzentration zwischen 0,05 und 3 mmol/l liegt.
4. Verfahren nach Punkt 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Alanin- bzw. α -Ketoglutaratkonzentration zwischen 50 und 400 mmol/l bzw. zwischen 4 und 40 mmol/l liegt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine Enzymelektrode und ein Verfahren zur Bestimmung der Konzentrationen von Lactat und Pyruvat und damit auch des Lactat-Pyruvat-Verhältnisses sowie der Alaninaminotransferaseaktivität. Die Enzymelektrode und das Verfahren sind in der medizinischen Labordiagnostik, aber auch zur Lactat- und Pyruvatmessung in der Lebensmittel- und mikrobiologischen Industrie geeignet.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Lactat und Pyruvat werden üblicherweise durch Reaktion mit NAD^+ bzw. NADH in Anwesenheit von Lactatdehydrogenase (LDH) spektralphotometrisch bestimmt. Analog wird Alaninaminotransferase (ALT) nach Vorinkubation mit ihren Substraten Alanin und α -Ketoglutarat über das entstehende Pyruvat gemessen. Diese Methoden erfordern lange Inkubationszeiten und sind durch einen hohen Verbrauch an teuren Reagenzien gekennzeichnet, da diese nach der Messung verworfen werden müssen. Weiterhin ist zur Bestimmung jeder der drei Substanzen ein gesonderter Reaktionsansatz erforderlich.

Für die Messung jeder einzelnen der drei Substanzen sind aus der Literatur Enzymelektroden bekannt (z. B. Mascini et al., Anal. Chim. Acta 157 [1984] 45; F. Mizutani et al., Anal. Chim. Acta 118 [1980] 65; K. Kihara et al., Anal. Chem. 56 [1984] 1876). Weiterhin wurden Elektroden zur wahlweisen Bestimmung von Pyruvat oder ALT (M. Notsuki et al., Proc. Int. Meeting Chemical Sensors, Tokyo 1983, 654) sowie von Lactat, Pyruvat oder ALT (DD-WP 222 896) beschrieben. Diese Elektroden eignen sich nicht zur Bestimmung der nebeneinander vorliegenden Substanzen. Eine Bestimmung wäre auch hier nur mit erhöhtem Zeit- und Reagenzienaufwand möglich.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, mit geringem Reagenzienaufwand, in schneller Abfolge und ohne zeitaufwendige Zwischenschritte die Konzentrationen von Lactat und Pyruvat sowie die Aktivität von ALT zu bestimmen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, beim Vorliegen eines Gemisches von Lactat, Pyruvat und ALT eine quantitative, enzymelektrochemische Bestimmung der nebeneinander vorliegenden Substanzen nacheinander in ein und derselben Meßlösung zu ermöglichen, ohne dabei einen Elektroden- und/oder Meßlösungswechsel vornehmen zu müssen. Die erfindungsgemäße Lösung der Aufgabe wird mit einer Enzymelektrode erreicht, die auf der Oberfläche der Elektrode Lactatmonooxygenase (LMO) und Lactatdehydrogenase (LDH) fixiert aufweist. Die Fixierung der genannten Enzyme erfolgt nach an sich bekannten Methoden mit oder ohne Verwendung von Membranen.

Das erfindungsgemäße Verfahren besteht darin, daß zu definierten Zeitpunkten der Meßlösung, die mit der Enzymelektrode in Kontakt steht, zuerst NADH, dann Alanin und/oder α -Ketoglutarat zugesetzt werden.

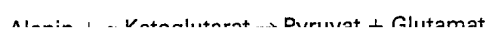
Die Erfindung soll im weiteren für den Fall der Anwendung einer O_2 -Elektrode noch näher erläutert werden. Taucht die erfindungsgemäße Enzymelektrode in eine gepufferte Meßlösung und wird dieser Lösung eine Lactat-, Pyruvat- und ALT-haltige Probe zugesetzt, so ergibt sich zunächst aufgrund der durch das Enzym LMO katalysierten Reaktion



ein durch die Elektrode angezeigter, dem O_2 -Verbrauch entsprechender Stromabfall, der von der Lactatkonzentration abhängt und zu einem neuen stationären Strom führt. Wird nun erfindungsgemäß der Meßlösung NADH zugesetzt, so kommt es durch die LDH-katalysierte Reaktion



zu einem erhöhten Anfall von Lactat in der Enzymschicht. Damit steigt der O_2 -Verbrauch in der Schicht, und ein dementsprechender Stromabfall, der von der Pyruvatkonzentration abhängt, wird durch die Elektrode angezeigt. Zur Bestimmung von ALT wird der Meßlösung nach Erreichen eines neuen stationären Stromes erfindungsgemäß Alanin und α -Ketoglutarat (möglicherweise auch nur eine der beiden Substanzen — die andere kann bereits Bestandteil der Meßlösung sein) zugesetzt. Die in der Probe vorhandene ALT wandelt diese Substrate gemäß



(3)

um. Die Bildungsgeschwindigkeit des Pyruvats wird mittels Reaktion (2) wie oben beschrieben angezeigt. Sie ist ein Maß für die zu bestimmende ALT-Aktivität.

Außer den beschriebenen absoluten Stromänderungen kann auch die erste Ableitung der Strom-Zeit-Kurven als Meßsignal verwendet werden. Dadurch wird die Meßzeit weiter verringert, und man erhält für die Lactat- und Pyruvatbestimmung jeweils einen Peak, für die ALT-Bestimmung ein Plateau der di/dt -t-Kurve.

Außer einer O_2 -Elektrode kann erfindungsgemäß auch eine potentiometrische Elektrode, z. B. eine CO_2 -Elektrode verwendet werden.

Neben der beschriebenen sukzessiven Bestimmung der drei Parameter kann die erfindungsgemäße Lösung selbstverständlich auch zur sukzessiven Bestimmung von Lactat und Pyruvat, von Lactat und ALT oder von Pyruvat und ALT oder zur wahlweisen Bestimmung einer der drei Parameter verwendet werden.

Die Vorzüge der Erfindung im Vergleich zum Stand der Technik sind ihre sich aus der Möglichkeit der sukzessiven Bestimmung in nur einem Meßzyklus ergebende Schnelligkeit und Sparsamkeit.

Ausführungsbeispiele

1. Beispiel

Bestimmung von Lactat, Pyruvat und ALT

In einer Gelatinemembran werden LMO (10 U/cm^2) und LDH (55 U/cm) immobilisiert. Ein $5 \times 5\text{ mm}$ großes Membranstück wird auf der Polyethylenfolie einer an einen Polarographen mit Schreiber angeschlossenen, auf $-0,6\text{ V}$ polarisierten Pt-Ag/AgCl-Elektrode mittels einer Dialysemembran und eines O-Ringes fixiert. Die so präparierte Enzymelektrode taucht in 2 ml , auf 25°C thermostatierten und gerührten $0,05\text{ M}$ Phosphatpuffer, $\text{pH } 7,5$, der 250 mM Alanin enthält.

Wenn sich ein stationärer Grundstrom eingestellt hat, werden $50\text{ }\mu\text{l}$ wäßrige Lactatlösung zugegeben. Der Strom fällt bis zu einem neuen stationären Wert. Die Meßzelle wird entleert, gespült und für die nächste Messung gefüllt. Auf diese Weise werden Lactat-Standardlösungen von 1 mM , 5 mM , 10 mM und 20 mM gemessen, und aus den jeweiligen Differenzen der stationären Stromendwerte und des Grundstromes wird eine Eichkurve für Lactat erstellt.

Zur Aufnahme einer Eichkurve für Pyruvat wird die Empfindlichkeit des Polarographen erhöht. In die Meßlösung werden $50\text{ }\mu\text{l}$ wäßrige Pyruvatlösung gegeben. Dann werden $20\text{ }\mu\text{l}$ einer 50 mM wäßrigen NADH-Lösung zugegeben. Wie oben setzt ein Stromabfall ein, dessen Endwert als Meßwert verwendet wird. So werden Pyruvat-Standardlösungen von $20\text{ }\mu\text{M}$, $50\text{ }\mu\text{M}$, $100\text{ }\mu\text{M}$, $200\text{ }\mu\text{M}$, $500\text{ }\mu\text{M}$ vermessen und in einer Eichkurve gegen die Stromdifferenzen aufgetragen.

Zur Aufnahme einer Eichkurve für ALT werden $50\text{ }\mu\text{l}$ einer ALT-haltigen Lösung und $20\text{ }\mu\text{l}$ der 50 mM NADH-Lösung in die Meßzelle gegeben. Ist der Strom stationär, werden $20\text{ }\mu\text{l}$ $1,5\text{ M}$ α -Ketoglutarat zugegeben. Wiederum setzt ein Stromabfall ein. Nunmehr dient die Stromänderung mit der Zeit als Meßsignal. Auf diese Weise werden ALT-Standardlösungen mit Aktivitäten von $0,2\text{ }\mu\text{mol/s} \cdot \text{l}$, $1\text{ }\mu\text{mol/s} \cdot \text{l}$, $10\text{ }\mu\text{mol/s} \cdot \text{l}$, $50\text{ }\mu\text{mol/s} \cdot \text{l}$, $200\text{ }\mu\text{mol/s} \cdot \text{l}$ gemessen und in einer Eichkurve gegen die Stromänderungen mit der Zeit aufgetragen.

Zur Bestimmung in einer Serumprobe werden $50\text{ }\mu\text{l}$ Serum in die Meßlösung gegeben. Hat sich der der Lactatkonzentration entsprechende stationäre Strom eingestellt, wird wie oben NADH zugegeben. Hat sich wiederum ein neuer stationärer Strom eingestellt, wird wie oben α -Ketoglutarat zugegeben. Aus dem einsetzenden Stromabfall und den beiden stationären Stromdifferenzen können mittels der Eichkurven die Gehalte des Serums an Lactat, Pyruvat und ALT bestimmt werden.

2. Beispiel

Bestimmung des Lactat/Pyruvat-Verhältnisses

Eine Enzymelektrode wird wie in Beispiel 1 präpariert und in ein Glukometer GKM02 eingesetzt. Das Potential wird auf $-0,6\text{ V}$ eingestellt. Wie in Beispiel 1 wird eine Eichung für Lactat und Pyruvat durchgeführt. Als Meßsignal dient jedoch nicht die stationäre Stromänderung, sondern das am Glukometer angezeigte Maximum der 1. Ableitung der Strom-Zeit-Kurve. $50\text{ }\mu\text{l}$ einer Serumprobe werden in die Meßzelle gegeben. Am Glukometer erfolgt die digitale Anzeige des Lactatgehalts. Dann wird die Empfindlichkeit des Glukometers auf den bei der Aufnahme der Pyruvat-Eichung ermittelten Wert eingestellt. $20\text{ }\mu\text{l}$ 50 mM NADH werden zugegeben, und es erfolgt die Anzeige der Pyruvatkonzentration. Aus beiden Werten kann rechnerisch das Lactat/Pyruvat-Verhältnis ermittelt werden.