



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: **AT 392 847 B**

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 170/89

(51) Int.Cl.⁵ : **G01N 27/30**

(22) Anmeldetag: 27. 1.1989

(42) Beginn der Patentdauer: 15.11.1990

(45) Ausgabetag: 25. 6.1991

(56) Entgegenhaltungen:

EP-A1 0136362 US-PS4579642

(73) Patentinhaber:

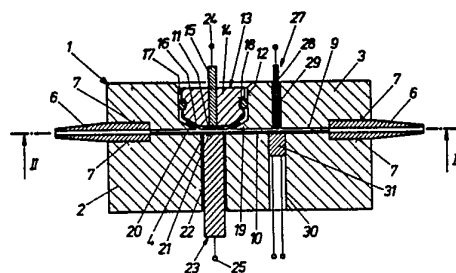
AVL GESELLSCHAFT FÜR VERBRENNUNGSKRAFTMASCHINEN
UND MESSTECHNIK MBH. PROF.DR.DR.H.C. HANS LIST
A-8020 GRAZ, STEIERMARK (AT).

(72) Erfinder:

MARSONER HERMANN DIPL.ING. DR.
STEINBERG, STEIERMARK (AT).
LIST HELMUT DIPL.ING.
GRAZ, STEIERMARK (AT).
KONTSCHIEDER HEINZ DIPL.ING.
GRAZ, STEIERMARK (AT).
SKRABAL FALKO DR.
GRAZ, STEIERMARK (AT).

(54) SENSORELEKTRODENANORDNUNG

(57) Zur Realisierung einer strömungsgünstigen, kleinvolumigen Durchflußmeßzelle einer Sensorelektrodenanordnung zur Bestimmung einer Substratkonzentration in einem Probenmedium mit einer membranbedeckten Enzymelektrode und einer Referenzelektrode, welche mit der Meßzelle in Kontakt stehen, wird vorgeschlagen, daß die Referenzelektrode (23) außerhalb der Membranabdeckung der Enzymelektrode (13) angeordnet ist und daß die maximale Ausdehnung des Meßkanals (4) normal zur Strömungsrichtung des Probenmediums im wesentlichen der maximalen Ausdehnung (26) der sensitiven Schicht (11) normal zur Strömungsrichtung entspricht.

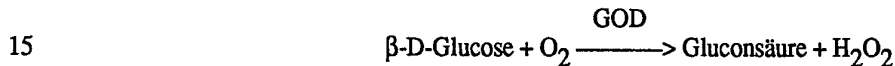


AT 392 847 B

Die Erfindung betrifft eine Sensorelektrodenanordnung in einer Durchflußmeßzelle zur Bestimmung einer Substratkonzentration eines einen Meßkanal durchfließenden Probenmediums mit einer membranbedeckten, amperometrischen Enzymelektrode mit einer sensitiven Schicht und einer Referenzelektrode, welche mit dem Probenmedium in Kontakt stehen.

5 In vielen Bereichen der Medizin oder auch der Biotechnik kommt der exakten Bestimmung einer bestimmten Substratkonzentration in einem Probenmedium, beispielsweise der Glucosekonzentration in einer Perfusionslösung, große Bedeutung zu. Häufig werden dazu elektrochemische Sensoren verwendet, wobei an Hand der Bestimmung der β -D-Glucose das Meßprinzip dieser Elektroden erläutert werden soll.

10 Nach gängiger Praxis sind amperometrische Verfahren mit konstanter Polarisationsspannung U_p zur Substratbestimmung besonders gut geeignet. Bei diesem Verfahren wird innerhalb einer Membran, in welcher das Enzym Glucoseoxidase (GOD) immobilisiert ist, die β -D-Glucose entsprechend folgender chemischen Reaktionsgleichung umgewandelt:



Das dadurch gebildete Wasserstoffperoxid kann durch anodische Oxidation an einer Platinelektrode detektiert werden:



Die Größe des Sensorstromes ist von der Glucose-Konzentration der Probenlösung abhängig.

25 Die praktische Anwendung der amperometrischen Glucosebestimmung mit Hilfe von Enzymsensoren setzt nicht nur bestimmte chemische, sondern auch geometrische Randbedingungen voraus. Es muß zum Beispiel die Ausbildung der Anodenoberfläche hinreichend groß sein, damit eine ausreichende Sensorempfindlichkeit erreicht wird. Die Forderung nach einer großen Elektrodenoberfläche wird auch an die Referenzelektrode gestellt, über die der Stromkreis geschlossen wird. Eine großflächige, nichtpolarisierbare Referenzelektrode gestattet die ungehinderte Ableitung des Sensorstromes.

30 So ist beispielsweise aus der EP-A 0 048 090 eine Sensorelektrodenanordnung der eingangsgenannten Art bekanntgeworden, welche eine Durchflußmeßzelle aufweist, deren eine Seite von einer elektrochemischen Dünnschichtzelle bedeckt wird. Diese Zelle weist zwischen einer inneren und einer äußeren Membran eine Enzymschicht auf, wobei die innere Membran dicht an einer Halterung anliegt, welche in konzentrischer Anordnung eine Platinanode und eine Ag/AgCl-Referenzelektrode aufweist. Die Dünnschichtzelle wird mittels eines O-Ringes an der Halterung befestigt. Die äußere Membran dieser Dünnschichtzelle steht mit der in die Meßzelle eingebrachten Probe in Kontakt, wobei innerhalb von kurzer Zeit das zu messende Substrat und Sauerstoff in das innere der Dünnschichtzelle eindiffundieren und mit dem Enzym der Enzymschicht reagieren. Dabei wird Wasserstoffperoxid produziert, welches durch die innere Membran diffundiert und an der Platinanode die entsprechende Meßreaktion auslöst.

40 Es sind auch Elektrodenanordnungen bekannt, bei welchen das jeweilige Enzym direkt auf der Platinanode immobilisiert ist, wobei die eigentliche Enzymelektrode von einer kreisringförmigen Referenzelektrode umgeben und die gesamte Elektrodenanordnung von einer Kautschuk-Membran abgedeckt wird.

Nachteilig bei den bekannten Ausführungen ist, daß sie zum Teil kompliziert aufgebaut sind und relativ großvolumige, strömungsungünstige Probenkammern aufweisen, deren Abmessung direkt mit dem Durchmesser der Elektrodenanordnung zusammenhängt.

45 Aufgabe der Erfindung ist es, eine Sensorelektrodenanordnung der eingangs genannten Art dahingehend weiter zu bilden, daß bei Aufrechterhaltung der Meßempfindlichkeit eine strömungsgünstige, kleinvolumige Durchflußmeßzelle realisiert werden kann, wobei die Gesamtanordnung möglichst einfach herstellbar sein soll.

50 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die Referenzelektrode außerhalb der Membranabdeckung der Enzymelektrode angeordnet ist und daß die maximale Ausdehnung des Meßkanals normal zur Strömungsrichtung des Probenmediums im wesentlichen der maximalen Ausdehnung der sensitiven Schicht normal zur Strömungsrichtung entspricht. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß mit membranfreien Referenzelektroden, welche beispielsweise in Strömungsrichtung des Probenmediums vor oder nach der eigentlichen Enzymelektrode angeordnet sind, ausgezeichnete Meßergebnisse erzielbar sind, wobei vorteilhafterweise sehr kompakte, strömungsgünstige Durchflußmeßzellen möglich sind, deren Breite im wesentlichen durch die maximale Ausdehnung der eigentlichen Enzymelektrode normal zur Strömungsrichtung bestimmt wird. Durch die strömungsgünstige Ausbildung wird die Ablagerung von Probenbestandteilen in der Meßzelle minimiert und eine allfällige Reinigung erleichtert.

60 Eine besonders vorteilhafte Weiterbildung der Erfindung, durch welche das Meßzellenvolumen weiter verkleinert werden kann, sieht vor, daß der Meßkanal einen rechteckigen Querschnitt mit zwei gegenüberliegenden Deckflächen aufweist, daß in einer der Deckflächen die sensitive Schicht der Enzymelektrode und in der anderen

Deckfläche die membranfreie Referenzelektrode, vorzugsweise eine Ag-Elektrode, liegt. Ein weiterer Vorteil bei extern angeordneten membranfreien Referenzelektroden besteht darin, daß in Sensorelektrodenanordnungen, welche austauschbare Elektroden aufweisen, nur die eigentliche Enzymelektrode ausgetauscht werden muß, wobei die separate, praktisch wartungsfreie Referenzelektrode in der Sensorelektrodenanordnung verbleiben kann.

5 In vielen Meßsituationen muß neben der Substratkonzentration noch ein weiterer Parameter der Probenflüssigkeit bestimmt werden, beispielsweise deren elektrische Leitfähigkeit bzw. Impedanz, wobei im Sinne einer kompakten Ausführung der Sensoranordnung erfindungsgemäß vorgeschlagen wird, daß eine dritte Elektrode zur Impedanzmessung vorgesehen ist, die vorzugsweise in der der Referenzelektrode gegenüberliegenden Deckfläche des Meßkanals angeordnet ist und wobei die zugehörige Gegenelektrode von der Referenzelektrode gebildet wird. Während die Enzymelektrode und auch die Referenzelektrode wie eingangs ausgeführt relativ großflächig ausgebildet sein sollten, reicht es für die dritte Elektrode einen dünnen Metallstift, vorzugsweise einen Silberdraht, vorzusehen, welcher in die Durchflußmeßzelle eintaucht. Aus Platzgründen empfiehlt sich beispielsweise eine - in Strömungsrichtung gesehene - Anbringung vor den sich gegenüberstehenden Enzym- und Referenzelektroden.

15 Eine Sensorelektrodenanordnung, in welcher neben der Substratkonzentration auch die Leitfähigkeit bzw. Impedanz gemessen wird, kommt vor allem dann zur Anwendung, wenn Perfusionslösungen gemessen werden, die mit dem Gewebe eines Organismus in Kontakt gebracht wurden, wobei nur eine teilweise Equilibration der Perfusionslösung mit dem im Gewebe vorliegenden zu messenden Substrat zustande kommt. Das Ausmaß der Equilibration ist dann durch die sich ändernde Leitfähigkeit der Perfusionslösung bestimmbar, wodurch die eigentliche Substratkonzentration auch bei nur teilweiser Equilibration errechnet werden kann.

20 Es ist auch möglich, daß die dritte Elektrode der Elektrodenanordnung zur Impedanzmessung durch die Anode der Enzymelektrode gebildet ist. Für den Meßbetrieb ergeben sich dann prinzipiell zwei mögliche Vorgangsweisen. Entweder wird die Enzymkonzentration und die Impedanz alternierend gemessen, oder der Polarisationsspannung für die Enzymmessung wird eine Wechselspannung für die Impedanzmessung überlagert, wobei die beiden Signale dann elektronisch getrennt und ausgewertet werden.

25 Gerade bei Impedanzmessungen, aber auch im Hinblick auf die temperaturabhängigen Reaktionen im Enzymsensor ist es meist wichtig, eine Information über die Temperatur des Probenmediums zu erhalten. Eine für die Herstellung besonders einfache Weiterbildung der Erfindung ist in diesem Zusammenhang dadurch gegeben, daß in einer der dritten Elektrode koaxial gegenüberliegenden Bohrung im Gehäuse der Durchflußmeßzelle ein Temperatursensor, vorzugsweise ein NTC-Widerstand angeordnet ist. Es entsteht somit eine äußerst kompakte Elektrodenanordnung zur kontinuierlichen Bestimmung der Substratkonzentration, der Impedanz und der Temperatur eines Probenmediums.

Schließlich ist erfindungsgemäß vorgesehen, daß die Enzymelektrode als Glucosesensor ausgebildet ist. Das Enzym Glucoseoxidase kann dabei in an sich bekannter Art direkt auf der Platinanode oder in einer Träermembran immobilisiert sein.

35 Die Erfindung wird nun anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine Sensorelektrodenanordnung nach der Erfindung geschnitten nach der Linie (I-I) in Fig. 2, Fig. 2 einen Schnitt nach der Linie (II-II) in Fig. 1, sowie Fig. 3 eine Ausführungsvariante in einer Fig. 2 entsprechenden Schnittdarstellung.

40 Die in Fig. 1 dargestellte Sensorelektrodenanordnung weist ein zweigeteiltes Gehäuse (1) auf, dessen Unterteil (2) und Oberteil (3) in der Ebene der als Durchflußmeßzelle (4) ausgeführten Meßkammer zusammengeklebt sind. Die Meßzelle (4) läuft - wie aus Fig. 2 ersichtlich - sowohl zufluß- als auch abflußseitig in Kapillarbohrungen (5) aus, welche an Anschlußelemente (6) anschließen, die in Ausnehmungen (7) des Unterteils (2) und Oberteils (3) gehalten sind und beim Zusammenkleben beider Gehäuseteile eingeklebt werden.

45 Die Durchflußrichtung des Probenmediums ist durch Pfeile (8) angedeutet.

Die Durchflußmeßzelle (4) weist zwei gegenüberliegende Deckflächen (9) und (10) auf, wobei in einer (9) die sensitive Schicht (11) der in einer Öffnung (12) des Oberteils (3) angeordneten Enzymelektrode (13) liegt.

50 Die Enzymelektrode (13) weist eine Halterung (14) auf, die zentrisch von einer Platinanode (15) durchsetzt wird. Meßzellenseitig wird das Ende der Platinanode (15) von der sensitiven Schicht (11) bzw. einer Enzymmembran kontaktiert, welche ihrerseits von einer äußeren Membran (16) abgedeckt ist. Die Membran (16) wird durch einen O-Ring (17), welcher in eine Ringnut (18) der Halterung (14) einrastet, gehalten. Der O-Ring (17) sorgt gleichzeitig für einen reibschlüssigen Sitz der Enzymelektrode (13) in der Öffnung (12) des Gehäuses (1). Meßzellenseitig ist ein an einem Absatz (19) der Öffnung (12) anliegendes Dichtelement (20) vorgesehen, durch welches die Enzymelektrode gegen den Oberteil (3) des Gehäuses abdichtet wird.

55 In der der Enzymelektrode (13) gegenüberliegenden Deckfläche (10) der Durchflußmeßzelle (4) befindet sich die Stirnfläche (21) der in einer Bohrung (22) des Unterteils (2) angeordneten Referenzelektrode (23). Die elektrischen Anschlüsse der Enzymelektrode (13) bzw. der Referenzelektrode (23) sind mit Bezugszeichen (24) bzw. (25) bezeichnet.

60 Durch die externe Anbringung der Referenzelektrode (23) ist es möglich, die Meßzelle (4) kleinvolumig und strömungsgünstig auszubilden, wobei die maximale Ausdehnung der Meßzelle (4) normal zur Strömungsrichtung des Probenmediums im wesentlichen der maximalen Ausdehnung (26) der sensitiven Schicht (11) der Enzymelektrode (13) entspricht.

Beide Meßzellenteile können als Spritzgußteil aus einem elektrisch isolierendem Material, beispielsweise aus Plexiglas ausgeführt sein; es ist jedoch auch möglich, die für die einzelnen Elektroden notwendigen Bohrungen bzw. Öffnungen mit entsprechenden Bohr- und Fräswerkzeugen herzustellen.

Der Equilibrierungsgrad von Perfusionslösungen kann dadurch bestimmt werden, daß die elektrische Impedanz zwischen zwei Metallelektroden die mit der Perfusionslösung in Kontakt stehen, gemessen wird. Durch die freiliegende externe Anordnung der Referenzelektrode (23) kann diese als Gegenelektrode einer Elektrodenanordnung (27) für die Impedanzmessung verwendet werden. Die zugehörige dritte Elektrode (28), angeordnet in einer Bohrung (29) des Oberteils (3), endet in der der Referenzelektrode (23) gegenüberliegenden Deckfläche (9) der Meßzelle (4).

Es ist jedoch auch möglich, die dritte Elektrode (28) zur Impedanzmessung durch die Anode (15) der Enzymelektrode (13) zu realisieren, wodurch die Sensorelektrodenanordnung weiter vereinfacht wird.

Des weiteren ist in einer der dritten Elektrode (28) koaxial gegenüberliegenden Bohrung (30) im Gehäuse (1) der Durchflußmeßzelle (4) ein Temperatursensor (31) angeordnet. Dazu wird vorzugsweise ein angeschliffener NTC-Widerstand verwendet. Somit kann mit dieser miniaturisierten Durchflußmeßzelle gleichzeitig die Substratkonzentration, der Equilibrierungsgrad und die Temperatur einer Probe bestimmt werden. Das Meßzellenvolumen beträgt beispielsweise nur 15 µl.

Fig. 3 zeigt, daß es in einer Ausführungsvariante der Erfindung auch möglich ist, die Enzymelektrode (13) und die membranfreie Referenzelektrode (23) in einer Deckfläche der Meßzelle (4) anzuordnen. Auch hier entsteht eine strömungsgünstige Meßzelle deren maximale Breite im wesentlichen der maximalen Ausdehnung (26) der sensitiven Schicht (11) der Enzymelektrode (13) entspricht.

PATENTANSPRÜCHE

1. Sensorelektrodenanordnung in einer Durchflußmeßzelle zur Bestimmung einer Substratkonzentration eines einen Meßkanal durchfließenden Probenmediums mit einer membranbedeckten, amperometrischen Enzymelektrode mit einer sensitiven Schicht und einer Referenzelektrode, welche mit dem Probenmedium in Kontakt stehen, dadurch gekennzeichnet, daß die Referenzelektrode (23) außerhalb der Membranabdeckung der Enzymelektrode (13) angeordnet ist und daß die maximale Ausdehnung des Meßkanals (4) normal zur Strömungsrichtung des Probenmediums im wesentlichen der maximalen Ausdehnung (26) der sensitiven Schicht (11) normal zur Strömungsrichtung entspricht.
2. Sensorelektrodenanordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Meßkanal (4) einen rechteckigen Querschnitt mit zwei gegenüberliegenden Deckflächen (9, 10) aufweist, daß in einer der Deckflächen (9) die sensitive Schicht (11) der Enzymelektrode (13) und in der anderen Deckfläche (10) die membranfreie Referenzelektrode (23), vorzugsweise eine Ag-Elektrode, liegt.
3. Sensorelektrodenanordnung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine dritte Elektrode (28) zur Impedanzmessung vorgesehen ist, die vorzugsweise in der der Referenzelektrode (23) gegenüberliegenden Deckfläche (9) des Meßkanals (4) angeordnet ist und wobei die zugehörige Gegenelektrode von der Referenzelektrode (23) gebildet wird.
4. Sensorelektrodenanordnung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß in einer der dritten Elektrode (28) koaxial gegenüberliegenden Bohrung (30) im Gehäuse der Durchflußmeßzelle (4) ein Temperatursensor (31), vorzugsweise ein NTC-Widerstand angeordnet ist.
5. Sensorelektrodenanordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzymelektrode (13) als Glucosesensor ausgebildet ist.

Hiezu 1 Blatt Zeichnung

