

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Patent
aufrechterhalten nach
§ 12 Abs. 3 ErstrG

(12) **PATENTSCHRIFT**
(11) **DD 279 262** **B5**

(51) Int. Cl.⁶: C 12 M 1/40
C 12 M 1/34
C 12 Q 1/46

DEUTSCHES PATENTAMT

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Aufrechterhaltung kann Einspruch eingelegt werden

(21) Aktenzeichen:	(22) Anmeldetag:	(44) Veröff.-tag der DD-Patentschrift:	(45) Veröff.-tag der Aufrechterhaltung:
DD C 12 M / 3247 38	02.01.89	30.05.90	23.03.95

(30) Unionspriorität:

(72) Erfinder: Klimes, Norbert, 13187 Berlin, DE; Riedel, Klaus, Dipl.-Biol. Dr. rer. nat., 13125 Berlin, DE; Fahrenbruch, Bernd, 10367 Berlin, DE; Gruss, Rudolf, Dipl.-Chem., 39281 Burg, DE; Wollenberger, Ulla, Dipl.-Biophys. Dr. rer. nat., 13187 Berlin, DE; Ott, Peter, Dipl.-Ing. Dr.-Ing., 01468 Moritzburg, DE; Lange, Klaus-Peter, Dipl.-Biol. Dr. rer. nat., 01307 Dresden, DE; Scheller, Frieder, Prof. Dipl.-Chem. Dr. rer. nat. habil., 16341 Zepernick, DE

(73) Patentinhaber: Land Berlin, vertreten durch den Senator für Wissenschaft und Forschung des Landes Berlin, Bretschneiderstr. 5, 14057 Berlin, DE; Ott, Peter, Dipl.-Ing. Dr.-Ing., 01468 Moritzburg, DE; Lange, Klaus-Peter, Dipl.-Biol. Dr. rer. nat., 01307 Dresden, DE

(74) Vertreter: Hofmann, Klaus, Dipl.-Ing., Pat.-Anw., 01277 Dresden

(54) **Meßanordnung zur Sofortbestimmung von Gasen und/oder flüssigen Substanzen, die für ihren Nachweis Luftsauerstoff oder Gase benötigen, mittels Biosensoren**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
Nichts ermittelt

Patentanspruch:

1. Meßanordnung zur Sofortbestimmung von Gasen, leicht flüchtigen und/oder flüssigen Substanzen, die für ihren Nachweis Luftsauerstoff oder Gas benötigen, mittels Biosensoren in einem Durchflußsystem, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Mischkammer (7) mit einer Substanzpumpe (3) und einer Gaspumpe (4) gekoppelt ist, der Mischkammer (7) ein mit Temperaturfühler (9) versehenes temperiertes gewendeltes Austauscherrohr (8) mit hydrophober Innenfläche nachgeschaltet ist, welches in eine Meßzelle (10), die den Biosensor (11) enthält, mündet.
2. Meßanordnung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Austauscherrohr (8) eine Länge von ≤ 1000 mm, einen Innendurchmesser ≤ 1 mm hat und mit einem Durchmesser von ≤ 50 mm gewandelt ist.
3. Meßanordnung nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Austauscherrohr (8) um die Meßzelle (10) gewickelt ist.
4. Meßanordnung nach Anspruch 1, 2 und 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß Austauscherrohr (8) aus Polytetrafluoräthylen besteht.
5. Meßanordnung nach Anspruch 1, 2 und 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß um das Austauscherrohr (8) ein Heizwendel gewickelt ist.
6. Meßanordnung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Substanzpumpe (3) und die Gaspumpe (4) eine Zwangskopplung (6) aufweisen.
7. Meßanordnung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Mischkammer (7) zusätzlich eine Verdünnungspumpe (5) zugeordnet ist.
8. Meßanordnung nach Anspruch 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Meßzelle (10) neben dem Biosensor (11) eine Sauerstoffreferenzelektrode (13) enthält.
9. Meßanordnung nach Anspruch 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Biosensor ein Enzymsensor ist.
10. Meßanordnung nach Anspruch 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Biosensor ein mikrobiologischer Sensor ist.
11. Meßanordnung nach Anspruch 1 und 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Meßanordnung zur Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffverbrauchs eingesetzt wird.
12. Meßanordnung nach Anspruch 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Bestimmung toxischer Substanzen in Luft, Aerosolen und wäßrigen Lösungen Luft als Trägermedium dient in Verbindung mit einem Biosensor auf der Basis immobilisierter Cholinesterase und einer Thioverbindung anzeigenden Elektrode.
13. Meßanordnung nach Anspruch 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß mehrere Meßzellen mit jeweils verschiedenen Biosensoren zur Bestimmung verschiedener Substrate in einer Probe in Reihe angeordnet sind.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung ist anwendbar im Umweltschutz, in der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik, der Toxikologie, der Lebensmittelindustrie und Biotechnologie. Sie ist insbesondere geeignet zur Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffverbrauchs (BSB) und von Substanzen, für deren Nachweis Sauerstoff benötigt wird einschließlich der Bestimmung von Enzymaktivitäten sowie zur Bestimmung von gasförmigen bzw. flüchtigen Substanzen und toxischen Stoffen in der Luft, Aerosolen und wäßrigen Lösungen.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik:

Zur Bestimmung von Gasen (z. B. NH_3) sowie von flüchtigen Substanzen (z. B. Alkohol) werden Biosensoren eingesetzt, die an Stelle einer Dialysemembran eine gasdurchlässige Membran aufweisen, so daß nur die gasförmigen Bestandteile der Meßflüssigkeit in die biokatalytische Schicht des Biosensors gelangen können (Karube, I and Suzuki, S. Joh. Select. Elec. Rev. 6, 15-59 [1984]; Karube et al. Enzyme Engineering [Ed. Weertall, M. M. and Royer, G. P.] 5, 563 [1980]; JP 54128393). Darüber hinaus sind Meßsysteme für Biosensoren auf der Basis amperometrischer Sauerstoffelektroden bekannt, die nach dem Durchflußprinzip arbeiten, z. B. zur Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB) (Hikuma et al. Europ. J. Appl. Microbiol. 8, 289 [1979]; GP 1586291). Dieses Meßsystem ist dadurch charakterisiert, daß ein Luft-Flüssigkeits-Strom am Sensor vorbeigeführt wird, der etwa die 100-200fache Luftmenge im Vergleich zur Flüssigkeit enthält. Mit dieser bekannten Anordnung sind keine Meßzeiten unter 8-18 min erreichbar und keine schnellen (kinetischen) Messungen möglich. Deshalb ist diese Apparatur nur für relativ langsame Endpunktbestimmungen einsetzbar. Die Vorteile der im DD-Patent 253045A 1 beschriebenen Sofortbestimmung können nicht genutzt werden. Es sind keine Gase meßbar, und außerdem sind die Messungen mit Fehlern behaftet infolge großer Schwankungen der Null-Linie des Grundstromes.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein kontinuierlich arbeitendes (Durchfluß-) Biosensorsystem zu entwickeln, das eine Sofortbestimmung sowohl von Gasen bzw. der Beeinflussung von Reaktionen durch Gase als auch die Bestimmung von Substanzen, für deren Nachweis Sauerstoff benötigt wird, wie z. B. BSB, nach dem kinetischen Meßprinzip ermöglicht.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, mittels einer Geräteanordnung im Durchflußsystem Gase bzw. flüchtige Substanzen sowie die Beeinflussung von Enzymen durch Gase und von Substanzen, die für ihren Nachweis Sauerstoff benötigen, sofort zu bestimmen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß eine Mischkammer (7) mit einer Substanzpumpe (3) und einer Gaspumpe (4) gekoppelt ist und der Mischkammer (7) ein temperiertes Austauscherrohr (8) mit hydrophober Innenfläche nachgeschaltet ist. Das Austauscherrohr (8) mündet unmittelbar in eine Meßzelle (10), die den Biosensor (11) enthält. Die Mischkammer (7) in Verbindung mit dem Austauscherrohr (8) dient dazu, eine gleichmäßige und konstante Luft-Flüssigkeits-Suspension aus einem Teil Flüssigkeit und etwa hundert bis fünfhundert Teilen Luft bzw. Gas zu erzeugen und zentral auf den Biosensor (11) in der Meßzelle (10) zu sprühen. Dadurch wird eine vollständige Sättigung der Probenflüssigkeit mit Luft oder Gas erreicht. Erfindungsgemäß weist das Austauscherrohr (8) eine Länge von ≤ 1000 mm und einen Innendurchmesser von ≤ 1 mm auf und ist mit einem Durchmesser von ≤ 50 mm gewandelt. Mit dieser Art der Dimensionierung des Austauscherrohres (8) wird gewährleistet, daß bei einer hohen Fließgeschwindigkeit ein optimaler Gas-Flüssigkeitsaustausch erreicht wird. Gleichzeitig ermöglicht die hydrophobe Innenfläche und die wandelförmige Ausführung des Austauscherrohres (8) einen verschleppungsarmen Transport der Proben und eine optimale Reinigung von der Probelösung. Vorzugsweise wird eine hydrophobe Innenfläche durch Einsatz von Polytetrafluoräthylen erreicht.

Eine optimale Temperierung des Austauscherrohres (8) und der Meßzelle (10) wird ermöglicht durch Umwickeln des Austauscherrohres (8) mit einer Heizwendel bei gleichzeitigem Umwickeln der Meßzelle (10). Zwei Temperaturfühler (9) an der Heizwendel sorgen für eine konstante Temperierung des Flüssigkeits-Gas-Gemisches.

Ein konstantes Flüssigkeits-Gas-Verhältnis hoher Präzision wird durch ein zwangsgekoppeltes System (6) von Substanz- (3) und Gaspumpe (4) realisiert.

Um höher konzentrierte Proben vorverdünnen zu können, ist der Mischkammer (7) eine im Mischverhältnis variable Verdünnungspumpe (5) zugeordnet.

Die Meßzelle (10) enthält je nach zu bestimmender Substanz einen Enzym- oder mikrobiellen Sensor.

Mit der erfindungsgemäßen Meßanordnung werden Ansprechzeiten von 15–30 s bei einer hohen Nullstabilität des Grundstromes der Elektrode und einer hohen Präzision sowie hoher Langzeitstabilität erreicht, was über eine Auswerteeinheit (12) erfaßt wird.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung wird nachfolgend an Beispielen näher erläutert. Die zugehörige Abbildung 1 zeigt den prinzipiellen Aufbau der erfindungsgemäßen Meßanordnung.

Beispiel 1: Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB):

Zur BSB-Bestimmung wird eine in der Abbildung wiedergegebene Apparatur benutzt, wobei ein Biosensor mit *Trichosporon cutaneum* eingesetzt wird. Durch die Meßzelle (10) werden pro min etwa 1,5 ml 0,1 mol Phosphatpuffer mit der Substanzpumpe (3) und 250 ml Luft mit der Gaspumpe (4) gepumpt, wobei das Luft-Flüssigkeits-Gemisch nach Einsprühen der Flüssigkeit in den Luftstrom in der Mischkammer (7) durch das Austauscherrohr (8) mit einem Durchmesser von 0,5 mm und einer Länge von 500 mm, das mit einer Heizwendel umwickelt und darüber hinaus um die Meßzelle (10) gewickelt ist, zentral auf die Membran des mikrobiologischen Sensors (11) gesprüht wird. Die Messung wird bei 30°C durchgeführt.

Zur Dosierung der Proben wird der Pufferstrom durch den Probestrom mittels Umschalten von Ventil 1 (1) ersetzt. Als Meßsignal dient das Maximum der Stromänderung (kinetische Messung), welches einer Auswerteeinheit (12) zugeführt wird, wobei die Probendosierung nach Erreichen des Maximums der Stromänderung beendet wird. Die Probendosierung und die Messung dauern durchschnittlich 15 bis 30 s. Nach Erreichen des Grundstromes wird die nächste Probe automatisch dosiert. Der Meßbereich (Linearitätsbereich) beträgt nach Kalibrierung mit Glucose-Glutaminsäure-Standardlösung (150 mg/l Glucose und 150 mg/l Glutaminsäure entsprechen 220 mg/l BSB) 1 bis 100 mg/l BSB. Bei 22 mg/l BSB wurde ein Variationskoeffizient von 3% ermittelt. Die Untersuchung eines peptidhaltigen Modellabwassers erbrachte bei einer Verdünnung von 1:25 einen Meßwert von 75 mg/l (= 1500 mg/l der Probe) im Vergleich zum BSB₅ mit 1800.

Beispiel 2: Bestimmung des BSB bei automatischer Verdünnung

Die BSB-Bestimmung wird wie im Beispiel 1 beschrieben mit einer Durchflußapparatur, die zusätzlich eine Pumpe (Verdünnungspumpe (5)) zum Verdünnen der Abwasserprobe enthält. Diese Verdünnungspumpe (5) erlaubt eine Verdünnung der Abwasserprobe im Verhältnis 1:25, so daß eine Vorverdünnung der Probe entfällt. Die Beispiel im 1 eingesetzte Probe erbrachte direkt einen BSB-Wert von 1550 mg/l.

Beispiel 3: Bestimmung von flüchtigen Alkohol

Zur Bestimmung von Ethanol wird ein *Trichosporon cutaneum*-Sensor eingesetzt. Mittels Gaspumpe (4) über Ventil 2 (2) wird ein Luft- bzw. als Probe ein Luft-Ethanolgemisch mit 250 ml/min angesaugt und mit 1,5 ml Puffer, der mit der Substanzpumpe (3) gefördert wird in die Mischkammer (7) gebracht und durch das Austauscherrohr (8) gemischt und die Meßzelle (10) mit dem Biosensor (11) und einer Referenzsauerstoffelektrode (13) zugeführt. Das als Probe mit Luft angesaugte dampfförmige Ethanol

bewirkt auch eine Verminderung der Sauerstoffmenge des angesaugten Gasgemisches, die mit der Referenzelektrode erfaßt wird. Eine Ethanolprobe führt zu einer Reduzierung des Stromes der Referenzelektrode und des Biosensors, gemessen als Stromänderung pro min. Die gemessenen Signale, die einer Auswerteeinheit (12) zugeführt werden, betragen bei dem Biosensor 250 nA/min und bei der Referenzelektrode 50 nA/min. Die Differenz von 200 nA/min repräsentiert den Ethanolwert. Eine Kalibrierung des Biosensors mit definierten Ethanolösungen wird mittels Probestrom über die Substrpumpe (3) vorgenommen. Der ermittelte Ethanolwert der gasförmigen Probe entspricht 1 mmol Ethanol.

Beispiel 4: Bestimmung von Glukose

Zur Bestimmung von Glukose wird ein Biosensor mit Glukoseoxydase eingesetzt. Die Meßbedingungen und die Meßprozedur entsprechen dem Beispiel 1. Der Variationskoeffizient bei 12 mMol Glukose wurde zu 2% ermittelt.

Beispiel 5: Bestimmung von Glutamat in Lösungen schwankenden Sauerstoffgehalts

Die in der Abbildung dargestellte Apparatur wird in Verbindung mit einem L-Glutamatsensor auf der Basis von Polyurethan immobilisierter Glutamatoxydase und einer Sauerstoffelektrode eingesetzt. Durch die Meßzelle (10) werden pro min 0,7 ml 0,1 mol Phosphatpuffer nach Sörensen pH 7,2 und 250 ml Luft gepumpt, wobei das Luft-Flüssigkeits-Gemisch durch das Austauschrohr (8) mit einem Durchmesser von 0,5 mm und einer Länge von 500 mm, das wie im Beispiel 1 beschrieben temperiert wird. Zur Dosierung der Proben wird der Pufferstrom für 10–15 s durch den Probestrom mittels umschalten von Ventil 1 (1) ersetzt. Bei Erreichen der Meßkammer wird das im Luft-Flüssigkeits-Gemisch enthaltene Glutamat, das zu einer Stromänderung der Enzymelektrode führt, nach Kalibrierung mit Glutamat bekannter Konzentration, unabhängig vom Sauerstoffgehalt der Probe bestimmt.

Beispiel 6: Bestimmung von Transaminasen

Das im Beispiel 5 beschriebene Meßprinzip mit der im Beispiel 1 dargestellten Apparatur dient als Meßsystem zur Bestimmung von Transaminasen. Temperierte vorinkubierte Lösungen enthalten 10 mMol alpha-Ketoglutarat und 240 mMol L-Alanin bzw. 120 mMol L-Aspartat bei pH 7,4 bzw. 7,8 zur Bestimmung von Alanin- bzw. Aspartataminotransferase in Serumproben. Die Vorinkubationslösungen werden je 10:1 mit Serumproben versetzt. Nach definierten Zeitintervallen wird die Vorinkubationslösung dem Probestrom der Durchflußmeßanordnung zugeführt. Das in der Vorinkubation gebildete Glutamat wird ohne Störung durch L-Alanin und L-Aspartat bestimmt. Über eine Eichkurve mit Glutamat und unter Berücksichtigung der Zeitdifferenz der Probenahme aus der Vorinkubationslösung ist die Aktivität der Transaminasen bestimmbar.

Beispiel 7: Erfassung toxischer Produkte in Luft, Aerosolen und in wäßrigen Lösungen

Durch Nutzung eines Biosensors auf der Basis immobilisierter Cholinesterase werden mit der in der Abbildung beschriebenen Apparatur toxische Stoffe, wie Organophosphate, Carbamate als auch reversible Inhibitoren o.g. Enzyme nachgewiesen bzw. bestimmt. Hierzu wird entsprechend Anwendungsbeispiel 3 verfahren, indem Luft, Aerosole bzw. wäßrige Lösungen in definierter Menge über die Gaspumpe (4) zur Pufferlösung eingesaugt wird. Über die Substanzpumpe (3) wird in definierten Zeitabständen Substrat (Thiocholinester) gesaugt. Bei der Substratzugabe entsteht ein Signal, das bei Vorhandensein von Inhibitoren in Abhängigkeit von ihrer Konzentration und Einwirkungszeit abnimmt. Die Kalibrierung der Apparatur erfolgt in definierten Zeitabständen mit einer Bezugslösung aus Butyrylthiocholinimid. Bei dem Anwendungsbeispiel wird für die Bestimmung kein Sauerstoff benötigt, die Luft dient nur als Träger der zu vermessenden Substanzen.

Beispiel 8: Simultane Bestimmung von Glukose und Glutaminsäure in einer Probe

Zur gleichzeitigen Bestimmung von Glukose und Glutaminsäure in einer Probe werden zwei Meßzellen in Reihe geschaltet, wobei die eine Meßzelle einen Biosensor mit Glukoseoxydase zur Bestimmung der Glukose und die andere Meßzelle einen Glutamatoxydase-Biosensor zur Bestimmung der Glutaminsäure enthalten. Die Meßbedingungen entsprechen den in den Beispielen 4 und 5 beschriebenen.

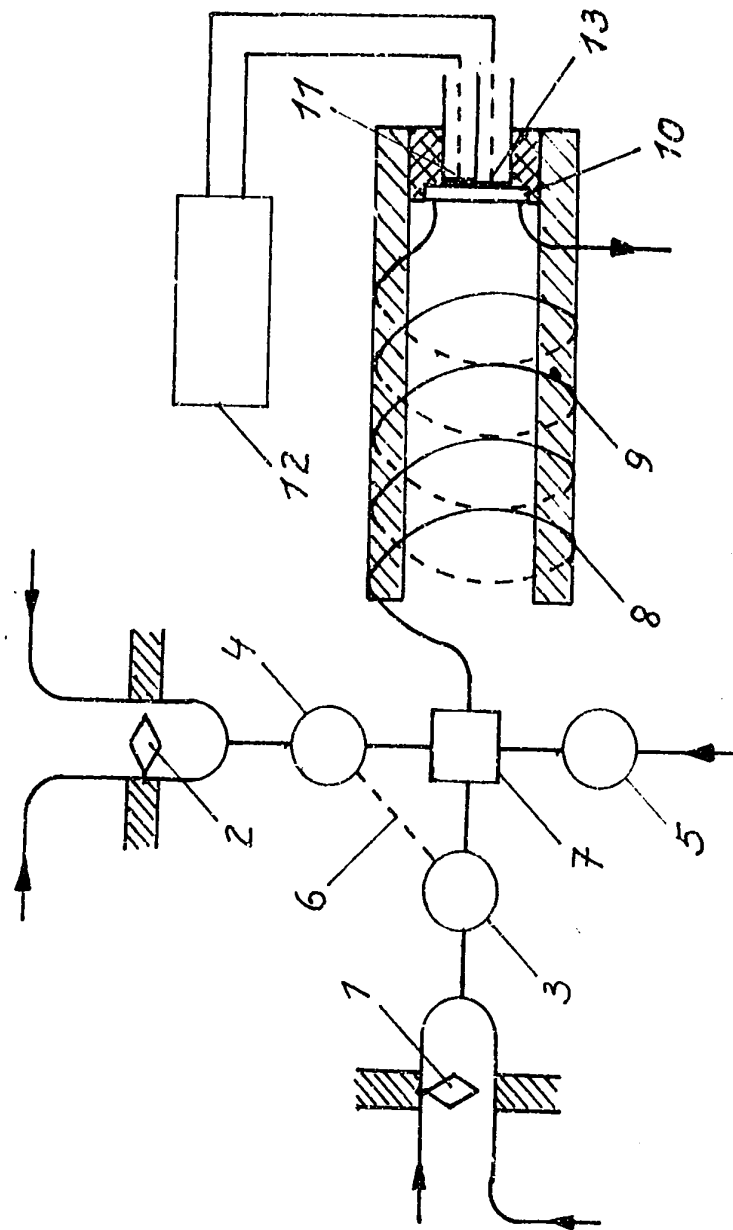


Fig. 1