



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **241 132 A1**

4(51) **G 01 N 27/30**
G 01 N 27/48
G 01 N 33/487

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N / 280 919 3

(22) 24.09.85

(44) 26.11.86

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

(72) Scheller, Frieder, Prof. Dr. rer. nat. habil. Dipl.-Chem.; Pfeiffer, Dorothea, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol., DD

(54) Enzymelektrode und Verfahren zur Bestimmung mehrerer Substanzen in Gemischen

(57) Die Erfindung betrifft eine Enzymelektrode und ein Verfahren zur Bestimmung von mehreren Substanzen in Gemischen. Ziel der Erfindung ist, mit einer einzigen Enzymelektrode die Bestimmung mehrerer Substanzen ohne Wechsel der Enzymmembran zu ermöglichen. Die erfindungsgemäße Enzymelektrode ist dadurch gekennzeichnet, daß für jede zu messende Substanz ein Enzym in der Enzymschicht vorliegt. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die medizinische Diagnostik.

Erfindungsanspruch:

1. Enzymelektrode zur simultanen oder sukzessiven Bestimmung mehrerer Substanzen, bei deren Umsetzung unterschiedliche elektrodenaktive Reaktionspartner beteiligt sind, in Gemischen, z. B. Glukose, Harnsäure, Laktat und Ethanol, bestehend aus einer Indikatorelektrode und einer Enzymschicht, **gekennzeichnet dadurch**, daß für jede zu messende Substanz ein Enzym in der Enzymschicht vorliegt.
2. Verfahren zur Bestimmung mehrerer Substanzen in Gemischen mit einer Enzymelektrode gemäß Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kosubstrate und/oder Mediatoren für die Enzyme der jeweils zu bestimmenden Substanz der Meßlösung zugesetzt werden.
3. Verfahren nach Punkt 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur simultanen Bestimmung mehrerer Substanzen Strom-Potential-Kurven gemessen werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf eine Enzymelektrode und ein Verfahren zur Bestimmung mehrerer Substanzen in Gemischen. Sie eignet sich besonders zur Messung von Glukose, Harnsäure, Laktat und Ethanol in physiologischen Flüssigkeiten. Die Enzymelektrode und das Verfahren werden in der medizinischen Diagnostik eingesetzt.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Mono-Enzymelektroden sind prinzipiell nur zur Messung des Substrats des jeweiligen Enzyms verwendbar. Bei der Umsetzung vieler Substanzen wird kein elektrodenaktives Produkt gebildet. Hier muß eine weitere Enzymreaktion zur Umsetzung des Produktes des ersten Enzyms angekoppelt werden. Bei diesen Enzymsequenzelektroden wird das Substrat jedes Enzyms angezeigt, was zu Störungen bei Substanzgemischen führt (Scheller et al. Biosensors **1**, 135 [1985]). Zur Ausschaltung dieser Störungen wurde eine zusätzliche Antiinterferenzschicht vor die Enzymsequenzschicht angeordnet (DD 211 460). Für die Messung verschiedener Substanzen ist es notwendig, die jeweiligen Mono-Enzymelektroden nacheinander einzusetzen, oder es werden Anordnungen mit mehreren Enzymelektroden zur gleichzeitigen Messung eingesetzt (D. Pfeiffer et al. Anal. Lett. **13**, 1179 [1980]). Diese Anordnungen sind aufwendig, da sie für jede Enzymelektrode ein einzelnes Meßgerät erfordern bzw. mit einem Meßgerät nur die sukzessive Messung nach jeweiligem Membranwechsel ermöglichen.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, mit einer einzigen Enzymelektrode die Bestimmung mehrerer Substanzen ohne Wechsel der Enzymmembran zu ermöglichen. Damit sollen eine Zeiteinsparung sowie Vereinfachung des apparativen Aufwandes erzielt werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, eine Enzymelektrode und ein Verfahren zur simultanen oder sukzessiven Bestimmung mehrerer Substrate in Gemischen zu entwickeln.

Gekennzeichnet ist die Enzymelektrode dadurch, daß die Enzymmembran für die Umsetzung jedes zu bestimmenden Substrates ein Enzym enthält, das die Bildung eines elektrodenaktiven Produktes katalysiert. Die elektrodenaktiven Partner der einzelnen Enzymreaktionen sind unterschiedlich, so daß durch Wahl des Elektrodenpotentials die einzelne Bestimmung jedes Substrates möglich ist.

Für die simultane Bestimmung mehrerer Substanzen werden Strom-Potential-Kurven gemessen und die Konzentrationen der einzelnen Substanzen aus den Stromänderungen im Potentialbereich des jeweiligen elektrodenaktiven Partners bestimmt. Als elektrodenaktive Reaktionspartner dienen O_2 , H_2O_2 , $NAD(P)^+$, $NAD(P)H$ oder künstliche Elektrodenakzeptoren, z. B. Benzochinon, Methylenblau, Ferrizyanid und Methylviologen.

Für die sukzessive Bestimmung mehrerer Substanzen wird jeweils beim Potential der elektrodenaktiven Komponente gearbeitet, und die Meßlösung enthält die entsprechenden Kofaktoren und Mediatoren.

Die Erfindung, die zu einer Zeiteinsparung und zu einer Vereinfachung des apparativen Aufwands vor allem in der medizinischen Diagnostik führt, soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Simultane Bestimmung von Glukose und Harnsäure

Die Enzymmembran der Indikatorelektrode enthält 1 mg Glukoseoxidase und 1 mg Urikase pro cm^2 . Diese Enzyme sind in üblicher Weise in Gelatine eingebettet ($2\text{ mg}/cm^2$). Ein kreisrundes Stück von $3\text{ mm } \varnothing$ befindet sich zwischen 2 Zelluloseacetatmembranen (Dicke $10\text{ }\mu\text{m}$) unmittelbar vor der Pt-Indikatorelektrode ($\varnothing 0,5\text{ mm}$) einer modifizierten Sauerstoffelektrode. Diese Enzymelektrode ist in eine temperierte Meßzelle mit Magnetrührer (Volumen 3 ml) eingesetzt und an einem Polarographen angeschlossen. In der Meßzelle befinden sich 1 mmol/l Benzochinon in $0,1\text{ M}$ Phosphatpuffer $pH 7,5$. Nach Einstellen des Stromgrundwertes wird mit dem Polarographen die Strom-Potential-Kurve zwischen 0 und $+600\text{ mV}$

aufgenommen. Zur Aufnahme der Bezugskurve werden dreimal nacheinander jeweils $20\ \mu\text{l}$ einer $6\ \text{mmol/l}$ Glukosebezugslösung und $20\ \mu\text{l}$ einer $100\ \mu\text{mol/l}$ Harnsäurelösung in die Lösung der Meßzelle gegeben und die Strom-Potential-Kurven gemessen. Die Bezugskurve für Glukose ergibt sich aus den Stromanstiegen bei $+100\ \text{mV}$ (auf Grund der Hydrochinonoxidation), die entsprechende Kurve für Harnsäure wird aus dem Stromanstieg der H_2O_2 -Oxidation bei $+600\ \text{mV}$ bestimmt. Zur simultanen Bestimmung von Glukose und Harnsäure in Serumproben wird analog zur Messung von Bezugslösungen eine Probe von $20\ \mu\text{l}$ in die Meßzelle gegeben, die Strom-Spannungskurve registriert und die entsprechenden Konzentrationen mittels der Bezugskurven aus den Stromanstiegen ermittelt.

Beispiel 2

Sukzessive Messung von Ethanol und Pyruvat

Die Enzymmembran enthält pro cm^2 $1\ \text{mg}$ Alkoholoxidase und $0,5\ \text{mg}$ Laktatdehydrogenase. Die Enzymelektrode ist, wie in Beispiel 1 beschrieben, an einem Polarographen angeschlossen und befindet sich in einer Meßzelle, die $1,5\ \text{ml}$ $0,1\ \text{M}$ Phosphatpuffer $\text{pH } 6$ enthält.

Zur Aufnahme der Bezugskurve von Ethanol wird die Enzymelektrode auf $+600\ \text{mV}$ polarisiert. Nach Einstellung eines konstanten Grundwertes werden dreimal $20\ \mu\text{l}$ einer $1\ \text{mmol/l}$ Ethanollösung in die Meßzelle gegeben und die Stromanstiege ausgewertet. Für die Messung von Pyruvat wird der Vorlagelösung $1\ \text{mM}$ NADH — der reduzierte Kofaktor der Laktatdehydrogenase — zugesetzt. Das Potential wird auf $+900\ \text{mV}$ eingestellt und die Stromzunahme nach Zugabe von jeweils $20\ \mu\text{l}$ $1\ \text{mmol/l}$ Pyruvatlösung ausgewertet.

Zur Bestimmung der Ethanolkonzentration in Fermentationslösungen werden wie bei der Aufnahme der Bezugskurve Proben von jeweils $20\ \mu\text{l}$ in die Meßzelle gegeben und die Stromanstiege bei $+600\ \text{mV}$ über die Bezugskurve in Ethanolkonzentrationen umgerechnet.

Analog dazu wird zur Messung von Pyruvat der Stromanstieg bei $+900\ \text{mV}$ über die Bezugskurve ausgewertet. Damit ist es möglich, ohne Wechsel der Enzymelektrode verschiedene Substanzen zu bestimmen.