



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 662 890 A5

⑤① Int. Cl. 4: G 01 N 27/28
C 12 Q 1/58

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

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

②① Gesuchsnummer:	5375/83	⑦③ Inhaber:	Hitachi, Ltd, Chiyoda-ku/Tokyo (JP)
②② Anmeldungsdatum:	03.10.1983		
③① Priorität(en):	04.10.1982 JP 57-173226	⑦② Erfinder:	Tokinaga, Daizo, Hachioji-shi (JP) Kobayashi, Teruaki, Hachioji-shi (JP) Katori, Akiko, Koganei-shi (JP) Karasawa, Yoshiharu, Tokyo (JP)
②④ Patent erteilt:	30.10.1987		
④⑤ Patentschrift veröffentlicht:	30.10.1987	⑦④ Vertreter:	Dr. Troesch AG Patentanwaltsbüro, Zürich

⑤④ **Harnstoffelektrode mit einer immobilisierte Urease enthaltenden Membran und Verfahren zur Herstellung der Membran.**

⑤⑦ Eine Harnstoffelektrode mit einer immobilisierte Urease enthaltenden Membran, die eingeführte Aminogruppen besitzt, und einer Elektrode zur quantitativen Bestimmung von Ammoniumionen. Die Herstellung der Membran erfolgt durch Eintauchen einer immobilisierte Urease enthaltenden Membran in eine wässrige Lösung von Äthylendiamin oder Polylysin. Die Harnstoffelektrode besitzt eine kürzere Messzeit bei erhöhter Elektrodenleistung.

PATENTANSPRÜCHE

1. Harnstoffelektrode mit einer immobilisierte Urease enthaltenden Membran und einer Elektrode zur quantitativen Bestimmung von Ammoniumionen, dadurch gekennzeichnet, dass die immobilisierte Urease enthaltende Membran eingeführte Aminogruppen besitzt.

2. Harnstoffelektrode nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die immobilisierte Urease enthaltende Membran mindestens 10^{18} Aminogruppen/ml Membranzvolumen besitzt.

3. Verfahren zur Herstellung einer immobilisierte Urease enthaltenden Membran, die nach Einführung von Aminogruppen zur Verwendung in einer Harnstoffelektrode nach einem der Ansprüche 1 oder 2 bestimmt ist, dadurch gekennzeichnet, dass Urease mittels Glutaraldehyd immobilisiert wird.

4. Verfahren zur Herstellung der immobilisierte Urease und Aminogruppen enthaltenden Membran zur Verwendung in einer Harnstoffelektrode nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man eine immobilisierte Urease enthaltende Membran in eine wässrige Lösung einer Verbindung eintaucht, die mindestens zwei Aminogruppen pro Molekül besitzt.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung mit einem Molekulargewicht von nicht über 3000 verwendet.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man Äthylendiamin oder Polylysin verwendet.

Die Erfindung betrifft eine Harnstoffelektrode mit einer immobilisierte Urease enthaltenden Membran und einer Elektrode zur quantitativen Bestimmung von Ammoniumionen sowie ein Verfahren zur Herstellung der Membran.

Enzymelektroden mit einem immobilisierten Enzym, die eine hohe Reaktionsspezifität für ein Substrat (Untersuchungsprobe) besitzen und mit einer Ionenelektrode kombiniert sind, wurden vor etwa zehn Jahren entwickelt [G.G. Guilbault in Handbook of Enzymatic Method of Analysis, Marcel Dekker, New York (1976)]. Einige dieser Elektroden werden seit kurzem praktisch verwendet, wobei hier Harnstoffelektroden zur Bestimmung von Harnstoff in Untersuchungsproben zu nennen sind. Eine dieser Harnstoffelektroden verwendet Urease als Enzym und besitzt eine Struktur derart, dass eine immobilisierte Urease enthaltende Membran nahe einer für Ammoniumionen selektiven Elektrode vorgesehen ist. Elektroden dieser Art benötigen jedoch eine lange Zeitspanne zur Messung einer Untersuchungsprobe, was ein gewisses Problem darstellt.

Eine Aufgabe der Erfindung besteht somit darin, eine Harnstoffelektrode der genannten Art zur Verfügung zu stellen, mit der die Untersuchung einer Probe in kürzerer Zeit erfolgen kann.

Mit anderen Worten betrifft die Erfindung eine Enzymelektrode zur Bestimmung von gelöstem Harnstoff und insbesondere eine Enzymelektrode, die zur schnellen quantitativen Harnstoffbestimmung geeignet ist, sowie ein Verfahren zur Herstellung der Membran.

Die Erfindung betrifft somit eine Harnstoffelektrode gemäss Patentanspruch 1 sowie Verfahren Herstellung der Membran gemäss Patentansprüchen 3 oder 4. Vorteilhafte Ausführungsformen sind in abhängigen Ansprüchen festgelegt.

Der Aufbau einer herkömmlichen Harnstoffelektrode ist schematisch in Fig. 1 dargestellt. Das Prinzip der Harnstoffbestimmung mittels einer derartigen Enzymelektrode ist nachfolgend beschrieben.

Wie in Fig. 1 dargestellt, wird der in einer Untersuchungsprobe 5 enthaltene Harnstoff durch eine immobilisierte Urease enthaltende Membran 1 unter Bildung von Ammoniumionen abgebaut. Die Menge der so erhaltenen Ammoniumionen wird

mittels einer für Ammoniumionen selektiven Elektrode gemessen, die eine ammoniumionenempfindliche Membran 2, eine innere Lösungsfüllung 3 und eine Silber-Silberchlorid-Elektrode 4 enthält. Eine derartige Elektrode ist z.B. in Analytical Chemistry 49, 1067-1078 (1977) beschrieben.

Bei einer derartigen Elektrode hängt die Messzeit von den Durchlässigkeiten von Harnstoff und Ammoniumionen durch eine immobilisierte Urease enthaltenden Membran und insbesondere von der Membran selbst ab.

Erfindungsgemäss wurde nun gefunden, dass bei immobilisierte Urease enthaltenden Membranen gleicher Struktur die Permeabilität für Ammoniumionen weitgehend von den chemischen Eigenschaften der Struktur der immobilisierte Urease enthaltenden Membran abhängt, wobei insbesondere die Permeabilität für Ammoniumionen mit zunehmendem Gehalt an Aminogruppen in der Struktur ansteigt. Somit wurde erfindungsgemäss gefunden, dass bei einer Harnstoffelektrode die Messzeit dadurch verkürzt werden kann, dass man in die Struktur der immobilisierte Urease enthaltenden Membran Aminogruppen einführt.

Der Kern der vorliegenden Erfindung besteht darin, dass man eine immobilisierte Urease enthaltende Membran mit höherer Permeabilität für Ammoniumionen verwendet, und die vorliegende Erfindung ist nicht nur auf für Ammoniumionen selektive Elektroden anwendbar, sondern auf jedwede Elektroden zur direkten oder indirekten Bestimmung von Ammoniumionen. Ein Beispiel für eine Elektrode der zuletzt genannten Art ist in Analytical Chemistry 49, 1067-1078 (1977) beschrieben.

Nachfolgend ist die Erfindung anhand der Zeichnungen beschrieben. Es zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung des Aufbaus einer herkömmlichen Harnstoffelektrode und

Fig. 2 eine schematische Darstellung einer Harnstoffelektroden-Messanordnung.

Fig. 2 zeigt eine Enzymelektrode 13, eine Referenzelektrode 14, eine geerdete Elektrode 15, eine immobilisierte Urease enthaltende Membran 1, eine für Ammoniumionen empfindliche Membran 2, Dialysemembranen 6 und 7, Silber-Silberchlorid-elektroden 4, 8 und 9, Elektrolytlösungen 3, 10 und 11, eine Leitung 16, eine Pufferlösung 17 und eine Pfeilmarkierung 18, die die Fliessrichtung der Pufferlösung angibt.

Wenn eine kleine Menge (z.B. 10 μ l) einer Probe, z.B. Blut oder dergleichen, die Leitung 16 unter Verwendung der Pufferlösung als Träger durchströmt, wird in der Probe enthaltener Harnstoff bei Berührung mit der in der Membran 1 enthaltenen immobilisierten Urease der Enzymelektrode 13 unter Bildung von Ammoniumionen hydrolysiert. Die Ammoniumionen verändern das Membranpotential der für Ammoniumionen empfindlichen Membran 2, so dass zwischen der Enzymelektrode 13 und der Referenzelektrode 14 eine Potentialänderung nach Massgabe der Harnstoffkonzentration der Probe stattfindet. Diese Potentialänderung kann als zeitliche Peakänderung von der Basislinie für den alleinigen Durchfluss einer Pufferlösung beobachtet werden. Die Zeit vom Beginn der Peakänderung bis zur Rückkehr zur Basislinie gilt als Messzeit für die Probe.

Die in dieser Ausführungsform verwendete, immobilisierte Urease enthaltende Membran 1 wird so hergestellt, dass man 40 mg Urease (Hersteller Boehringer Mannheim GmbH) und 80 mg Albumin (vom Rind, Hersteller Seikagaku Kogyo Co., Ltd., Japan) in 1 ml einer 0,2 Phosphat-Pufferlösung (pH 7,4) löst, dann mit 280 μ einer wässrigen 2,5-prozentigen Glutaraldehydlösung versetzt, das Gemisch auf eine ebene Glasplatte aufbringt, mindestens 10 Minuten zur Gelierung und Filmbildung stehen lässt, den erhaltenen Film von der Glasplatte abnimmt und dann für eine Zeitdauer von 30 Sekunden bis 10 Minuten in eine 0,1 bis 10prozentige wässrige Äthylendiaminlösung eintaucht, die mit Chlorwasserstoffsäure neutralisiert ist.

Mit einer unter Verwendung der so erhaltenen, immobilisierte Urease enthaltenden Membran hergestellten Harnstoffelektrode lassen sich Messungen in mindestens 10 Prozent kürzerer Zeit mit 5 bis 30 Prozent grösserer Elektrodenleistung herstellen als mit einer Harnstoffelektrode, die eine immobilisierte Urease enthaltende Membran ohne Tauchbehandlung mit der wässrigen Äthylendiaminlösung enthält.

Als Ergebnis der 10minütigen Tauchbehandlung mit einer wässrigen 2%igen Äthylendiaminlösung erhält man eine Membran mit 10^{19} Aminogruppen pro ml Membravolumen, im Vergleich zu einer unbehandelten Membran, die nur 10^{17} Aminogruppen /ml besitzt. Während man mit der herkömmlichen Elektrode 70 Sekunden für die Messung einer Probe mit einer Harnstoffstickstoffkonzentration von 100 mg/dl benötigt, lässt sich die gleiche Messung mit der erfindungsgemässen Membran in nur 55 Sekunden mit einer um etwa 20 Prozent grösseren Elektrodenleistung durchführen.

In einer Wiederholung des Versuchs wird der gelierte Film in eine Polylysinlösung anstelle der genannten wässrigen Äthylendiaminlösung getaucht. Hierzu werden Polylysinproben mit unterschiedlichen Molekulargewichten verwendet. Hierbei wurde gefunden, dass sich die erfindungsgemäss beabsichtigte Wirkung mit wässrigen Lösungen eines Polylysins mit einem Molekulargewicht von nicht über 3000, im Vergleich zu der wässrigen Äthylendiaminlösung bei gleich kurzer Tauchzeit erreichen lässt, wobei ein Polylysin mit einem Molekulargewicht von nicht über 1000 bevorzugt ist.

Im einzelnen erhält man bei der Tauchbehandlung mit einer wässrigen 0,5%igen Lösung von Polylysin mit einem Molekulargewicht von 1000 für eine Zeitdauer von 20 Minuten eine immobilisierte Urease enthaltende Membran mit 10^{19} Aminogruppen/ml, mit der man 50 Sekunden für die Messung einer Untersuchungsprobe mit einer Harnstoffstickstoffkonzentration von 100 mg/dl benötigt, was erheblich kürzer als die für die unbehandelte Membran benötigten 70 Sekunden ist.

Weiterhin wurden immobilisierte Urease enthaltende Membranen mit unterschiedlicher Anzahl an Aminogruppen durch Veränderung der Konzentration der wässrigen Äthylendiaminlösung und der Tauchzeit der immobilisierte Urease enthalten-

den gelierten Membranen hergestellt und ihre Eigenschaften als Harnstoffelektroden untersucht. Hierbei wurde gefunden, dass gute Eigenschaften mit Membranen erhalten werden, die mindestens 10^{18} Aminogruppen/ml und vorzugsweise mindestens 10^{19} Aminogruppen/ml besitzen.

Die Anzahl der Aminogruppen wird so bestimmt, dass man die Membran in eine fluoreszierende Isothiocyanatlösung eintaucht um eine Fluoreszenzfärbung zu bewirken und dann die Fluoreszenzintensität bestimmt. Als Standardproben für die Anzahl der Aminogruppen dienen hierbei Membranen, die durch Hitzehärtung von wässrigen Albuminlösungen unterschiedlicher Konzentrationen erhalten worden sind, die der gleichen Fluoreszenzfärbung unterworfen werden. Der Fehler bei dieser Methode der quantitativen Bestimmung der Aminogruppen liegt bei etwa $\pm 20\%$; es ist schwierig, einen genauen absoluten Wert zu erhalten, die Grössenordnung lässt sich jedoch exakt bestimmen.

Eine grössere Anzahl an Aminogruppen ist nicht nachteilig, bei einer Zahl von über 10^{23} ist jedoch keine ausgeprägte Wirkung mehr feststellbar und deshalb beträgt die Zahl der Aminogruppen vorzugsweise nicht über 10^{23} /ml.

Im vorliegenden Beispiel wurden Äthylendiamin und Polylysin verwendet. Es können jedoch auch andere Verbindungen bzw. Stoffe verwendet werden, die mindestens zwei Aminogruppen in Molekül besitzen und diese Aminogruppen in die Struktur der immobilisierte Urease enthaltenden Membran einzuführen vermögen. So lässt sich z.B. mit Guanidin eine ähnliche Wirkung wie mit Äthylendiamin erreichen.

Die erfindungsgemäss beabsichtigte Wirkung lässt sich auch dadurch erreichen, dass man die immobilisierte Urease enthaltende Membran nach ihrem Einbau in eine Harnstoffelektrode in die genannte Aminlösung eintaucht, um Aminogruppen in die Membran einzuführen.

Erfindungsgemäss lässt sich die Messzeit der Untersuchungsproben verkürzen, wodurch eine erhöhte Anzahl von Untersuchungsproben pro Zeiteinheit gemessen werden kann. Darüber hinaus beobachtet man eine erhöhte Elektrodenleistung, was sich in einer Erhöhung der Empfindlichkeit bemerkbar macht.

FIG. 1

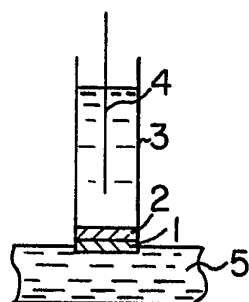


FIG. 2

