



PATENTSCHRIFT 142 248

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

Int. Cl.³

(11) 142 248 (44) 11.06.80 3(51) G 01 N 33/48
(21) WP G 01 N / 211 425 (22) 07.03.79

-
- (71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Zentralinstitut für Molekularbiologie, Berlin, DD
- (72) Scheller, Frieder, Dr. Dipl.-Chem.; Pfeiffer, Dorothea, Dipl.-Biol.; Weise, Hartmut, Dipl.-Ing., DD
- (73) siehe (72)
- (74) Akademie der Wissenschaften der DDR, Forschungszentrum für Molekularbiologie und Medizin, AG Patent- und Neuererwesen, 1115 Berlin, Lindenberger Weg 70
-

- (54) Enzymelektrode zur Bestimmung von Maltose, α -Amylase und Stärke
-

(57) Die Erfindung betrifft eine Enzymelektrode zur Bestimmung der Konzentration von Maltose und Stärke sowie der Aktivität von α -Amylase. Sie kann in der medizinischen Diagnostik und in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden. Das Ziel besteht darin, ein spezifisches Verfahren zu entwickeln, das bei einfacher Handhabung kurze Meßzeiten aufweist und das neben der quantitativen Bestimmung der α -Amylaseaktivität auch die Bestimmung der Konzentration von Maltose oder Stärke in der gleichen Probe erlaubt. Die erfindungsgemäße Enzymelektrode besteht aus einer O_2 - oder H_2O_2 -angezeigten Elektrode, die mit einer Enzymschicht aus Glukoseoxidase und Glukoamylase bedeckt ist. Zur Bestimmung von Maltose und α -Amylase wird diese Enzymschicht durch einen Dialyseschlauch von der Meßlösung abgetrennt, während zur Stärkebestimmung die Enzymschicht direkt mit der Meßlösung in Kontakt steht. Das Verfahren zur Bestimmung von Maltose, α -Amylase und Stärke ist gut handhabbar, durch den Einsatz von Enzymen spezifisch und durch deren Wiederverwendbarkeit billig.



Erfinder F. Scheller (ZIM)
D. Pfeiffer (ZIM)
H. Weise (ItM)

Enzymelektrode zur Bestimmung von Maltose, α -Amylase und Stärke

Anwendungsgebiet

Die Erfindung betrifft eine Enzymelektrode zur quantitativen Bestimmung der Aktivität von α -Amylase sowie der Konzentration von Maltose und Stärke. Das Verfahren ist vor allem für den Einsatz in der Notfalldiagnostik bei akuter Pankreatitis geeignet, wobei eine Unterscheidung zwischen normaler und erhöhter Enzymaktivität im Serum notwendig ist. Weiterhin besitzt die Bestimmung der α -Amylase, Maltose und Stärke in der Lebensmittelindustrie z. B. bei der Gewinnung von Zuckern aus Stärke, in der Backwarenindustrie, der Bierbereitung sowie in Brennereien eine große Bedeutung und das erfindungsgemäße Verfahren ist für diese Gebiete geeignet.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die verbreitetsten Methoden zur Messung von α -Amylase basieren auf dem Abbau gefärbter Stärkekompexe (Jod-Stärke, Farbstoff-Stärke). Diese Methoden benötigen zur Auswertung ein Colorimeter. Die Jod-Stärke-Reaktion ist zwar einfach zu handhaben, aber das Substrat ist schwer zu standardisieren, so daß ihre Aussagekraft nur begrenzt ist. Die Farbstoff-Stärke-Methode erlaubt zwar eine gute Differenzierung zwischen normaler und erhöhter α -Amylase-Aktivität, aber sie erfordert zeitaufwen-

dige Prozeduren wie zentrifugieren, dekantieren und Bezugsmessungen.

Die zur Stärkebestimmung eingesetzte Lichtstreuungstechnik ist im allgemeinen zu ungenau, auch die Reduktionsmethode für Maltose und α -Amylase ist zu unspezifisch. Gekoppelte enzymatische Assays für Maltose und α -Amylase sind zwar spezifisch aber durch den Einsatz von zusätzlichen Enzymreaktionen sehr zeitaufwendig und teuer (D. Lehané, P. Wissert, G. Lum und A. Levy, Clinical Chemistry 23, 1061, 1977).

In der Lebensmittelindustrie wird außerdem eine viskosimetrische Methode zur Bestimmung der α -Amylaseaktivität eingesetzt, die aber ebenfalls zu zeitaufwendig ist (Messzeit 1 Std. je Probe) (P. Anderegg, F. Schur und H. Pfenninger, Schweiz, Brauerei-Rdsch. 87, 239 (1976).

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, die Vorteile der amperometrischen Enzymelektrode, d. h. kurze Meßzeit, kleines Probenvolumen, hohe Spezifität durch Verwendung von Enzymreaktionen sowie häufige Verwendbarkeit der Enzyme für viele Meßproben auf die Bestimmung der Aktivität von α -Amylase sowie der Konzentrationsbestimmung von Maltose und Stärke anzuwenden. Außerdem soll die Methode die gleichzeitige Bestimmung der Konzentration niedermolekularer Saccaride und der α -Amylaseaktivität in der gleichen Meßprobe erlauben.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, eine Enzymelektrode zur amperometrischen Bestimmung der Aktivität von α -Amylase und der Konzentration von Maltose und Stärke zu entwickeln.

Die erfindungsgemäße Enzymelektrode besteht aus einer O_2 - oder H_2O_2 -anzeigenden Elektrode, die mit einer Enzymschicht aus Glukoseoxidase und Glukoamylase bedeckt ist. Zur Bestimmung von Maltose und α -Amylase wird diese Enzymschicht durch einen Dialyseschlauch von der Meßlösung abgetrennt, während zur Stärkebestimmung die Enzymschicht direkt mit der Meßlösung in Kontakt steht. Bei der Bestimmung der α -Amylaseaktivität in

Gegenwart von Glukoamylase wird die Differenz zwischen dem Meßwert mit der GOD-Glukoamylase-Elektrode (Gesamtamylase) und einer nur GOD-enthaltenden Enzymelektrode (Glukoamylaseaktivität) gebildet. Die Abtrennung der β -Amylaseaktivität erfordert eine Hitzedesaktivierung dieses Enzyms.

α -Amylase spaltet in Stärke 1,4- α -glykosidische Bindungen im Inneren des Moleküls, wodurch niedermolekulare Bruchstücke entstehen. Das Endprodukt des Abbaus ist Maltose. Während gelöste Stärke mit einem Molekulargewicht über 50.000 nicht durch Dialysemembranen passieren kann, gelangen die niedermolekularen Bruchstücke durch dieses "Sieb". Auf diese Weise ist eine Trennung des Substrates von den Reaktionsprodukten bzw. eine Bestimmung von Maltose in Gegenwart von Stärke möglich. Die erfindungsgemäße Enzymelektrode nutzt dieses Prinzip zum Nachweis der in der Meßlösung gebildeten Reaktionsprodukte bei α -Amylase sowie zur Messung von Maltose aus. Die Enzymschicht enthält die Enzyme Glukoamylase und Glukoseoxidase. Durch die Glukoamylase wird jeweils der endständige Glukoserest der niedermolekularen Saccaride abgespaltet und durch die Glukoseoxidase erfolgt die Oxydation zu Glukonsäure unter Sauerstoffverbrauch. Der Sauerstoffverbrauch ist damit ein Maß für die Konzentration an niedermolekularen Saccariden in der Meßlösung bzw. seine zeitliche Änderung ist der α -Amylaseaktivität proportional. Die Indikation des Meßwertes kann entweder auf der Messung des Sauerstoffverbrauches oder der Bildung von Wasserstoffperoxid mit einer Platinelektrode erfolgen. Die erfindungsgemäße Enzymelektrode, die Glukoamylase und Glukoseoxidase enthält, gibt für Glukose oder Maltose ein stationäres Meßsignal, d. h. sie zeigt die Konzentration dieser Zucker an. Damit ergibt sich aus dem Anfangswert der Stromzeitkurve die Konzentration von Glukose bzw. von Maltose, während das Gebiet des linearen Anstiegs ein Maß für die Amylaseaktivität der Meßprobe darstellt.

In der erfindungsgemäßen Enzymelektrode wird aus in der besten enzymatischen Methode (D. Nikolelis, M. Anticola, Analyt. Chem. 50, 1665, 1978) benutzte Enzym Maltose durch die billigere und stabilere Glukoamylase ersetzt. Dadurch wird die Bestimmung von Stärke erst möglich.

Das Verfahren zur Bestimmung von Maltose, α -Amylase und Stärke ist gut handhabbar, durch den Einsatz von Enzymen spezifisch und durch deren Wiederverwendbarkeit billig.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll nachstehend an 2 Ausführungsbeispielen erläutert werden.

Beispiel 1

400 IE Glukoseoxidase und 500 IE Glukoamylase werden mit Acrylamid zu einem Film von 0,1 mm Dicke und einer Fläche von 8 cm² fotopolymerisiert. Diese Enzymschicht wird auf eine umgebaute O₂-Elektrode so aufgebracht, daß sich eine Enzymprobe von 3 x 3 mm auf der Polyethylenmembran unmittelbar vor der Platinelektrode befindet. Über die Enzymschicht wird eine Polyurethanfolie (siehe DDR-Patentschrift 131414) mit einem Spannring über den Elektrodenmantel gezogen.

Die präparierte Enzymelektrode taucht in die mit einem Magnetrührer bewegte Meßlösung, sie ist an ein pH-Meter mit Schreiber angeschlossen. Die Meßzelle wird durch einen Kühlmantel auf 25°C temperiert. In der Meßzelle befinden sich 2 ml einer 1prozentigen Stärkelösung, die 0,1 M Phosphatpuffer von pH 6 enthält. Nachdem der Grundwert eingestellt wird, wird eine Eichkurve durch Zugabe von jeweils 20 µl einer Glukoselösung mit 250 mg/dl aufgenommen. Dazu werden 5 successive Zugaben durchgeführt und die Höhe des stationären Wertes ermittelt. Nach Erneuerung der Meßlösung erfolgt eine analoge Eichung mit Maltose. Zur eigentlichen Messung wird eine Probe von 50 µl Serum zur Meßlösung gegeben. Die Höhe des Signals, das sich aus der Extrapolation des Anfangsanstiegs und des darauffolgenden linearen Gebietes ergibt, liefert mit Hilfe der Eichkurve für Glukose die Glukosekonzentration im Serum.

Aus dem Anstieg des linearen Gebietes wird die Maltosemenge, die je Zeiteinheit gebildet wird (z. B. im Zeitraum von 5 - 15 Min. nach Probenzugabe) über die Eichkurve für Maltose bestimmt. Die Aktivität der α -Amylase ergibt sich unmittelbar aus diesem Wert.

Beispiel 2

Analog zu Beispiel 1 erfolgt die Herstellung der Enzymschicht. Diese Enzymschicht wird auf eine Dialysemembran aufgebracht, die auf der Stirnseite eines Elektrodenmantels befestigt ist. Über der Enzymschicht wird eine weitere Dialysemembran sowie eine Polyurethanfolie gespannt. Die weitere Präparation der Elektrode erfolgt wie in Z.med.Lab.Diagnostik (18, 312 (1977)) beschrieben wurde. Die Elektrode wird mit einem umgebauten pO_2 -Meter auf 600 mV polarisiert. Nachdem der Grundstrom einen konstanten Wert eingenommen hat, wird eine Eichkurve für Maltose und Glukose, wie in Beispiel 1, aufgenommen. Danach werden 50 μ l eines mikrobiellen Enzympräparates zur Meßlösung zugesetzt. In Analogie zu Beispiel 1 ergibt der Anfangsteil der Stromzeitkurve die Maltosekonzentration, während das lineare Gebiet, das etwa 3 Minuten nach Probenzugabe auftritt, die Amylaseaktivität liefert. Zur Abtrennung der Glukoamylaseaktivität wird die zeitliche Abhängigkeit der Glukosekonzentration mit einer Enzymelektrode gemessen, die nur Glukoseoxidase enthält. Über die Eichkurven für Glukose kann dann die Glukoamylaseaktivität von der Gesamtamylaseaktivität abgezogen werden.

Beispiel 3

40 IE Glukoseoxidase und 20 IE Glukoamylase werden mit 5 μ l Glutaraldehyd an 6 cm² Seide fixiert. Diese Enzymschicht wird direkt auf der Polyethylenmembran der in Beispiel 1 beschriebenen O_2 -Elektrode befestigt ohne daß ein Dialyseschlauch zur Lösungsseite angebracht wird.

Die so präparierte Enzymelektrode taucht zur Stärkemessung in eine gerührte 0,1 ml Pufferlösung pH 5,5. Zur Eichung wurden

definierte Mengen einer konzentrierten Zulkowski-Stärke-Lösung zugegeben. Als Meßwert dient entweder der stationäre Wert des Abfalls des O_2 -Stromes oder die Anfangsneigung der Strom-Zeit-Kurve (kinetisches Prinzip).

Die Bestimmung der Stärkekonzentration in den Proben erfolgt analog dazu über die Eichkurven.

Erfindungsanspruch

1. Enzymelektrode zur Bestimmung von Maltose, α -Amylase und Stärke, gekennzeichnet durch eine O_2 - oder H_2O_2 -anzeigende Elektrode, die mit einer Enzymschicht aus Glukoseoxidase und Glukoamylase bedeckt ist, welche ggf. mit einem Dialyseschlauch bedeckt ist.
2. Verfahren zur Bestimmung von Maltose und Amylase unter Einsatz der Enzymelektrode (mit Dialyseschlauch) nach Punkt 1, dd.gk., daß die Maltosekonzentration aus dem Anfangsteil der Stromzeitkurve und die α -Amylaseaktivität aus dem konstanten Anstieg bestimmt wird.