



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 236 553 A1

4(51) C 12 Q 1/26

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 Q / 275 509 0	(22)	24.04.85	(44)	11.06.86
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD; Wrumski Institut für Elektrochemie, Moskau, Leninskiprospekt, SU				
(72)	Scheller, Frieder, Prof. Dr. rer. nat. habil. Dipl.-Chem., DD; Wollenberger, Ulla, Dr. rer. nat. Dipl.-Biophys., DD; Pfeiffer, Dorothea, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol., DD; Seyer, Ingrid, DD; Bogdanovskaja, Vera A., Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., SU; Tarasevich, Michail R., Prof. Dr. Dipl.-Chem., SU; Hanke, Günter, Dipl.-Chem., DD				
(54)	Verfahren und Bienzymelektrode zur Bestimmung gelöster Stoffe in Gemischen				

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Bienzymelektrode zur quantitativen Bestimmung gelöster Stoffe in Gemischen. Die Bienzymelektrode besitzt eine Enzymschicht, die sowohl ein die zu bestimmende Substanz in ein elektroaktives Produkt umwandelndes Enzym (Indikatorenzym) als auch ein die interferierenden Substanzen in elektrochemisch nicht interferierende Substanzen umsetzendes Enzym (Eliminatorenzym) enthält. Interferierende Substanzen, die nicht effektiv durch das Eliminatorenzym umgesetzt werden, können durch eine vorgeschaltete chemische Reaktion in der Meßlösung in nicht interferierende Substanzen und eine interferierende Substanz, die ein Substrat des Eliminatorenzyms ist, umgesetzt werden.

Erfindungsanspruch:

1. Bienzymelektrode zur Bestimmung gelöster Stoffe in Gemischen, bestehend aus einer zu bestimmenden Substanz und einer bzw. mehrerer diese Bestimmung störende Substanzen, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine einschichtige Bienzymmembran, die sowohl ein die zu bestimmende Substanz in ein elektroaktives Produkt umwandelndes Enzym (Indikatorenzym) als auch ein interferierende Substanzen in elektrochemisch nicht interferierende Substanzen umsetzendes Enzym (Eliminatorenzym) enthält.
2. Bienzymelektrode nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Indikatorenzym Glukoseoxidase oder Uratoxidase oder Cholesteroloxidase oder Laktatoxidase oder Pyruvatoxidase oder Glutamatoxidase oder Sarcosinoxidase oder Alkoholoxidase und als Eliminatorensym Laccase oder NADH-monoxygenase oder Laktatmonoxygenase oder Ascorbatoxidase gemeinsam in einer Schicht eingesetzt werden.
3. Verfahren zur Bestimmung gelöster Stoffe in Gemischen, **dadurch gekennzeichnet**, daß interferierende Substanzen durch eine vorgeschaltete chemische Reaktion in der Meßlösung in nicht interferierende Substanzen und eine interferierende Substanz, die Substrat des Eliminatorensyms Laccase ist, umgesetzt wird.
4. Verfahren nach Punkt 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die interferierende Substanz durch Kaliumferricyanid umgesetzt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Bienzymelektrode zur Konzentrationsbestimmung gelöster Stoffe in Gemischen, die neben der Meßsubstanz eine oder mehrere die Bestimmung störende Substanzen enthält.

Das Verfahren und die Bienzymelektrode sind besonders für Analysatoren in klinischen und biologischen Labors und der Lebensmittelindustrie geeignet.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Anwendung enzymatischer Reaktionen in der Analytik mit Enzymelektroden basiert im allgemeinen auf der spezifischen Umsetzung der zu bestimmenden Substanz (enzymatische Substratwandlung) durch ein Enzym und einer elektrochemischen Anzeigereaktion, z. B. die anodische Oxidation von H_2O_2 . Diese elektrochemische Reaktion besitzt eine relativ geringe Spezifität, d. h. auch andere Bestandteile der Meßprobe (die Störsubstanzen) können beim Potential der Oxidation von H_2O_2 oxidiert werden und so das Meßsignal verfälschen.

In Enzymelektroden werden Störsubstanzen bisher hauptsächlich durch Differenzmessung, eine zusätzliche Eliminatorelektrode (DD-Pat. G 01 N/2389663), durch die Verwendung selektiver Membranen (US-Patent 3, 979, 274; US-Patent 4, 073, 713) oder die Einführung einer zusätzlichen enzymatischen Sperrschicht (DD-Pat. 211 460) vermindert.

Die Differenzmessung und die Verwendung einer Eliminatorelektrode erfordern einen erhöhten apparativen Aufwand und sind dadurch erheblich teurer als einfache Messungen, wobei die Eliminatorelektrode nicht zum vollständigen Ausschluß der Interferenz führt.

Selektive Membranen sind ebenfalls sehr kostenaufwendig, dabei sehr dünn und wenig stabil.

Durch die Verwendung von mehreren übereinanderliegenden Enzymschichten werden die Messungen wesentlich verlangsamt, wodurch sie für den Einsatz in üblichen Analysatoren nicht geeignet sind.

Ziel der Erfindung

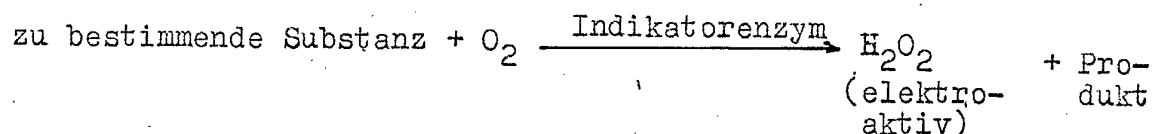
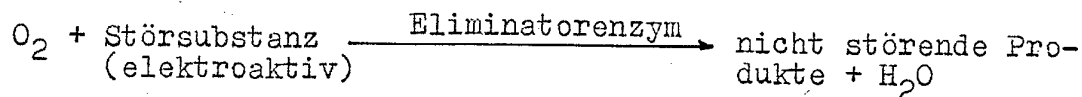
Ziel der Erfindung ist es, die Nachteile der bekannten Lösungen zu umgehen und ein Verfahren und eine Bienzymelektrode zu entwickeln, die es erlauben enzymatische Konzentrationsbestimmungen gelöster Stoffe in solchen Gemischen wie Blut, Serum, Urin und Lebensmittelproben richtiger und genauer als mit der Monoenzymelektrode und schneller als mit Multienzymschichten mit üblichen Analysatoren durchzuführen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, Störsubstanzen der elektrochemischen Anzeigereaktion in üblichen Enzymelektroden-Analysatoren auszuschalten und auf diese Weise Richtigkeit und Schnelligkeit der Messung der betreffenden Stoffkonzentration zu erhöhen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß zur quantitativen Bestimmung gelöster Stoffe in Gemischen eine Bienzymelektrode, die eine Enzymschicht besitzt, die sowohl ein die zu bestimmende Substanz in ein elektroaktives Produkt umwandelndes Enzym (Indikatorenzym) als auch ein die interferierenden Substanzen in elektrochemisch nicht interferierende Substanzen umsetzendes Enzym (Eliminatorenzym) enthält, in einem üblichen Enzymelektroden-Analysator eingesetzt wird, wobei gegebenenfalls interferierende Substanzen, die nicht effektiv durch das Eliminatorensym umgesetzt werden können durch eine vorgeschaltete chemische Reaktion in der Meßlösung in nicht interferierende Substanzen und eine interferierende Substanz, die ein Substrat des Eliminatorensyms ist, umgesetzt werden.

In der einschichtigen Bienzymmembran werden als Indikatorenzym, entsprechend der zu bestimmenden Substanz, spezifische Oxidoreduktasen, beispielsweise Glukoseoxidase (GOD) oder Uratoxidase oder Cholesteroloxidase (COD) oder Laktatoxidase (LOD) oder Pyruvatoxidase oder Glutamatoxidase oder Sarcosinoxidase oder Alkoholoxidase und das Eliminatorensym Laccase oder NADH-monoxygenase oder Laktatmonoxygenase oder Ascorbatoxidase verwendet.



Für interferierende Substanzen z. B. Ascorbinsäure oder Glutathion, die nicht effektiv durch das Eliminatorensym z. B. Laccase umgesetzt werden, wird durch eine vorgeschaltete chemische Oxidation z. B. mit Kaliumferricyanid eine Umwandlung in nicht interferierende Produkte durchgeführt, wobei das elektrochemisch interferierende Kaliumferrocyanid entsteht. Das Ferrocyanid wird in der Enzymschicht durch das Eliminatorensym Laccase in das nicht interferierende Ferricyanid zurückgebildet. Damit erfolgt eine effektive Ausschaltung der elektrochemischen Interferenz z. B. bei der H_2O_2 -Anzeige. Die Erfindung hat den Vorteil, daß die Messung gelöster Stoffe in Gemischen schneller und richtiger als nach den bekannten Methoden erfolgt.

Ausführungsbeispiele

1. Beispiel

Messung von Glukose in einem Glukose-Ascorbinsäure-Gemisch

Ein etwa 3 mm^2 großes Stück der Bienzymmembran, bestehend aus in Gelatine eingeschlossener Glukoseoxidase (46 U/cm^2) und Laccase (120 U/cm^2), wird zwischen zwei Dialysemembranen unmittelbar vor die auf $+600\text{ mV}$ polarisierte modifizierte Sauerstoffelektrode gespannt.

Diese Bienzymelektrode wird in eine temperierte Meßzelle eingesetzt und mit einem Polarographen verbunden. In der Meßzelle befinden sich 2 ml einer Phosphatpufferlösung (nach Sörensen) $\text{pH} = 5,0$ mit $5,0\text{ mmol/l}$ Kaliumferricyanid. Nach Zugabe von $50\text{ }\mu\text{l}$ einer Lösung, die sowohl Glukose als auch Ascorbinsäure enthält, laufen folgende Reaktionen ab:

- Die in der Meßlösung vorhandene Ascorbinsäure wird durch Kaliumferricyanid unter Bildung von Kaliumferrocyanid oxidiert.
- Die immobilisierte Laccase katalysiert die vollständige Oxidation des in der Membran diffundierten Ferrocyanids.
- Glukose diffundiert in die Enzymschicht und wird durch die Glukoseoxidase in Glukonolakton und H_2O_2 umgewandelt.
- H_2O_2 wird an der Elektrode anodisch oxidiert. Der Oxidationsstrom dient als glukosekonzentrationsabhängiges Meßsignal. Mit einer solchen Meßanordnung wird Glukose im Konzentrationsbereich von $1,0$ bis 50 mmol/l , ohne Störung durch Ascorbinsäure (mindestens bis 15 mmol/l), richtig gemessen.

2. Beispiel

Messung von Uringlukose

Die im 1. Beispiel beschriebene Bienzymelektrode wird im Glukosemeßgerät GKM 02 (ZWG der AdW der DDR) eingesetzt. Die Polarisationsspannung der Platin-Indikatorelektrode beträgt $+600\text{ mV}$. Die präparierte Bienzymelektrode taucht in 2 ml einer gerührten Meßvorlage (5 mmol/l Kaliumferricyanid in Phosphatpuffer nach Sörensen, $\text{pH} 5,0$). Glukosestandardlösungen zwischen $0,75$ und 40 mmol/l werden mit der Pufferlösung im Verhältnis $1:10$ vorverdünnt. Durch Zugabe von jeweils $500\text{ }\mu\text{l}$ einer solchen Standardlösung zur Meßvorlage wird das Meßgerät geeicht und/oder mit dem angeschlossenen γ -t-Schreiber eine Glukoseeichkurve aufgezeichnet. Als konzentrationsabhängiges Meßsignal dient in beiden Fällen die erste Ableitung des H_2O_2 -Oxidationsstromes, die digital angezeigt oder mit dem Schreiber aufgenommen wird.

Die Urinprobe wird mit der Meßvorlage im Verhältnis $1:10$ vorverdünnt. Reduzierte Bestandteile, die bei $+600\text{ mV}$ anodisch oxidiert werden, werden durch Ferricyanid umgesetzt. Dabei wird Ferrocyanid gebildet.

In die gefüllte Meßzelle werden $500\text{ }\mu\text{l}$ der mit Ferricyanidpuffer (Meßvorlage) versetzten Urinprobe gegeben. Ferrocyanid wird durch Laccase oxidiert. Die im Urin enthaltene Glukose gelangt an die Glukoseoxidase und wird umgewandelt. Das dabei produzierte H_2O_2 kann jetzt ohne elektrochemische Interferenzen oxidiert werden. Am Meßgerät ist die Glukosekonzentration der Probe direkt ablesbar.