

(12)

# PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2775/89

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> : **G01N 21/77**  
G01N 21/75

(22) Anmeldetag: 6.12.1989

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 6.1994

(45) Ausgabetag: 27. 2.1995

(56) Entgegenhaltungen:

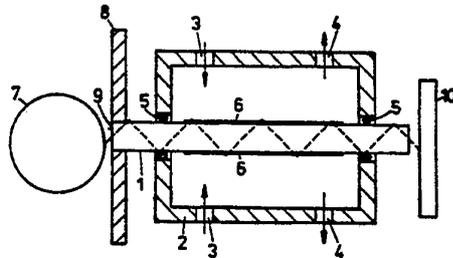
AT-B-E 29073 EP-A1-0184600 EP-A2-0263805

(73) Patentinhaber:

WEIGEL CHRISTIAN DIPL.ING.  
A-3200 OBERGRAFENDORF, NIEDERÖSTERREICH (AT).  
KELLNER ROBERT DR.  
A-1238 WIEN (AT).

(54) ANALYSENLEITLEITER ZUR BESTIMMUNG ORGANISCHER SUBSTANZEN MITTELS  
TOTALREFLEXION-INFRAROT-SPEKTROSKOPIE

(57) Zur Bestimmung von organischen Substanzen in Lösungen mittels abgeschwächter Totalreflexion-Infrarot-Spektroskopie (ATRIR), wobei die zu untersuchende Probe durch eine Durchflußzelle geleitet wird, in der ein Analysenlichtleiter vorgesehen ist, dessen Analysenlicht in die Probe eindringt, dabei von der zu bestimmenden Substanz abgeschwächt, und das Maß der Abschwächung in einem Detektor gemessen wird, wird ein Analysenlichtleiter verwendet, der mindestens an einer Stelle mit einem Katalysator beschichtet ist, welcher Katalysator eine chemische Reaktion mit der in der Probe vorhandenen, zu bestimmenden Substanz katalysiert, wobei an den mit dem Katalysator beschichteten Stellen des Analysenlichtleiters ein Reaktionsprodukt gebildet wird und wobei die beschichteten Stellen von Analysenlicht durchdrungen werden, welches dabei im Maß der Bildung des Reaktionsproduktes abgeschwächt wird und wird die Abschwächung in bekannter Weise gemessen.



Die Erfindung betrifft einen Analysenlichtleiter zur Verwendung bei der Bestimmung von organischen Substanzen in Lösungen mittels abgeschwächter Totalreflexion-Infrarot-Spektroskopie.

Bei IR-Spektroskopieverfahren nach der Methode der abgeschwächten Totalreflexion (ATRIR) wird eine Anordnung benützt, die im wesentlichen aus einem Sender zur Erzeugung des IR-Analysenlichtes, aus einer Meßzelle für die zu analysierende Probe mit einem IR-durchlässigen Analysenlichtleiter mit hohem Brechungsindex und aus einem IR-Analysator (Detektor) besteht. Als Analysenlichtleiter wird vorzugsweise kristallines Germanium oder Arsen-Germanium-Selenid verwendet, das in Form eines Stabes oder auch in Form einer Faser vorliegen kann und zumindest mit einem Teil seiner Oberfläche in direktem Kontakt mit der zu analysierenden Probe steht.

Zur Messung wird IR-Analysenlicht vom Sender unter einem bestimmten Winkel in den Lichtleiter so eingeblendet, daß das Licht beim Durchgang mehrfach an der Grenzfläche Lichtleiter/Probe totalreflektiert wird. Bei jeder Reflexion dringt das elektrische Feld des Analysenlichtes in die an den Lichtleiter angrenzende Probenschicht ein. Die Eindringtiefe ist definiert als jener Abstand von der Oberfläche des Lichtleiters, bei dem die Amplitude des elektrischen Feldes auf den e-ten Teil abgenommen hat. Sie hängt von der Wellenlänge, den Brechungsindices und dem Einfallswinkel ab. Durch das Eindringen kann das elektrische Feld mit Substanzen in unmittelbarer Nähe der Lichtleiteroberfläche in Wechselwirkung treten, wobei es bei Anwesenheit der zu bestimmenden Substanz zur Abschwächung des Analysenlichtes infolge Absorption bei molekülspezifischen Wellenlängen kommt. Diese Abschwächung erlaubt einen quantitativen Rückschluß auf die zu bestimmende Substanz.

Meßanordnungen und Meßverfahren, die die ATRIR-Technik ausnützen, sind in verschiedensten Varianten bekannt und beispielsweise in der US-A-4,798,954, der GB-A-2 040 035 und der GB-A-2 018 423 beschrieben. Ein Verfahren der eingangs beschriebenen Art ist aus der GB-A-2 018 423 bekannt. Es dient dazu, das Fortschreiten einer chemischen Reaktion an Hand einer Indikatorsubstanz zu verfolgen, wobei für die Bestimmung ständig Reaktionsgemisch aus einem Reaktor abgezweigt und kontinuierlich durch eine Meßzelle geleitet wird.

Aus der AT-B-E 29 073 ist ein photometrisches Bestimmungsverfahren bekannt, welches mit sichtbarem bzw. UV-Licht arbeitet. Ein Wellenleiterkern wird mit einem dünnen Film eines für die zu bestimmende Substanz (Analyt) spezifischen Reaktanten überzogen, mit einer Lösung des Analyt in Kontakt gebracht, wobei sich am Wellenleiterkern eine dünne Schicht eines photometrisch bestimmaren Reaktionsproduktes bildet. Dieses Meßprinzip wird auch in der EP-A - 0 184 600 verwirklicht, wobei aber wiederum kein IR als Analysenlicht vorgeschlagen wird.

Die EP-A - 0 263 805 beschreibt ein optisches Sensorelement, das eine dünne Schicht mit einer "Indikatorsubstanz" aufweist. Der Indikator dient zur Bestimmung des Analyten. Als Analysenlicht wird allerdings auch hier kein IR verwendet.

Alle bekannten IR-Verfahren haben aber den Nachteil, daß sie nur bei relativ hohen Konzentrationen der zu bestimmenden Substanz ansprechen. Dazu kommt noch, daß etwa vorhandene Begleitsubstanzen, die neben der zu bestimmenden Substanz vorliegen, das Meßergebnis verfälschen können, oder die Anwendung der ATRIR-Technik überhaupt unmöglich machen.

Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, diese Nachteile zu beseitigen und somit den Anwendungsbereich der ATRIR-Technik so zu erweitern, daß Substanzen selbst im millimolaren Bereich noch quantitativ bestimmt werden können und auch eventuell vorhandene Begleitsubstanzen die Messung nicht stören.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß ein Analysenlichtleiter der eingangs beschriebenen Art zur Verfügung gestellt wird, der mindestens an einer Stelle seiner Oberfläche mit einem Katalysator beschichtet ist, welcher Katalysator eine chemische Reaktion mit der zu bestimmenden Substanz katalysiert, wobei an der mit dem Katalysator beschichteten Stelle ein spektroskopisch bestimmbares Reaktionsprodukt gebildet wird.

Die beschichteten Stellen werden von Analysenlicht durchdrungen, welches dabei im Maß der Bildung des Reaktionsproduktes abgeschwächt wird, worauf die Abschwächung in bekannter Weise gemessen wird.

Damit die mit Katalysator beschichteten Stellen des Analysenlichtleiters von Analysenlicht durchdrungen werden können, muß die Schichtdicke kleiner sein als die Eindringtiefe des Analysenlichtes.

Das Reaktionsprodukt wird innerhalb dieser dünnen Katalysatorschicht oder in der Grenzschicht Katalysator-Lösung gebildet und damit aufkonzentriert, so daß es IR-spektroskopisch erfaßt werden kann. Dadurch ist es erfindungsgemäß möglich, organische Substanzen quantitativ zu bestimmen, die in der Probe in so geringen Konzentrationen vorliegen, daß sie mittels herkömmlicher ATRIR-Technik nicht mehr erfaßt werden könnten. Es hat sich weiters gezeigt, daß der erfindungsgemäße Analysenlichtleiter die Bestimmung einer Substanz neben Begleitsubstanzen erlaubt, wodurch eine selektive Bestimmung möglich wird.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Analysenlichtleiters besteht darin, daß als Katalysator mindestens ein Enzym vorgesehen ist, wobei die Schichtdicke des Enzyms am Analysenlichtleiter vorzugsweise weniger als 1  $\mu\text{m}$  beträgt.

Der erfindungsgemäße Analysenlichtleiter eignet sich insbesondere zur Bestimmung von Glucose in Körperflüssigkeiten, wobei als Katalysator Glucose-Oxidase verwendet wird. Die Meßwellenlänge beträgt etwa 8,7  $\mu\text{m}$  und die Beschichtungsdicke vorzugsweise weniger als 1  $\mu\text{m}$ .

Glucose-Oxidase setzt selektiv  $\beta$ -D-Glucose mit in der Probe gelöstem Sauerstoff zu Gluconsäure um, die IR-spektroskopisch bei 1153  $\text{cm}^{-1}$  quantitativ bestimmt werden kann. Andere Zucker, die in der Probe eventuell anwesend sind, beeinflussen das Meßergebnis nicht. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 0,5 mmol/l, und der Meßbereich, für den sich diese erfindungsgemäße Bestimmung besonders gut eignet, erstreckt sich zwischen 0,5 und 27 mmol/l. In diesem Bereich liegen auch die Konzentrationen von Glucose in menschlichem Blut, Blutprodukten und Harn. Diese Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erbringt somit alle Voraussetzungen für einen Einsatz im klinischen Bereich und in der Prozeßkontrolle.

Wird als Katalysator Cholesterin-Oxidase verwendet, so eignet sich der erfindungsgemäße Analysenlichtleiter zur Bestimmung von Cholesterin in Blut oder Blutprodukten, wobei bei einer Meßwellenlänge von etwa 5,8  $\mu\text{m}$  gearbeitet wird und die Schichtdicke des Katalysators ebenfalls vorzugsweise weniger als 1  $\mu\text{m}$  beträgt.

Die Enzyme liegen am Analysenlichtleiter am besten immobilisiert vor.

Als Analysenlichtleiter kann ein Germaniumkristall verwendet werden, der in folgender Weise behandelt ist:

- silanisiert mit 3-Aminopropyl-triäthoxisilan
- gewaschen mit Wasser zur Entfernung der physisorbierten Schichten
- aktiviert mit Glutaraldehyd und kontaktiert mit einer Enzymlösung.

Da der Katalysator während der Bestimmung nicht verbraucht wird, eignet sich der erfindungsgemäße Analysenlichtleiter insbesondere für Reihenuntersuchungen. Es können auch mehrere Substanzen gleichzeitig bestimmt werden, wenn der Analysenlichtleiter an verschiedenen Stellen mit verschiedenen Enzymen beschichtet ist. So ist es z.B. möglich, mehrere Zucker, oder auch Cholesterin und Glucose nebeneinander zu bestimmen.

### 30 Meßanordnung

Zur Durchführung der nachfolgenden Ausführungsbeispiele wurde die in der Zeichnung dargestellte Meßanordnung verwendet, in der mit 1 ein Germaniumkristall als Analysenlichtleiter bezeichnet ist, der eine Durchflußzelle 2 durchsetzt, mit Öffnungen 3 und 4 für die Zu- bzw. Abführung der zu untersuchenden Probe. Der Kristall 1 ist über Dichtungselemente 5 in die Durchflußzelle 2 eingebettet. Mit 6 ist die auf die Oberfläche des Lichtleiters 1 aufgebraachte Enzymschicht bezeichnet.

Der Gang des Analysenlichtes ist durch eine strichlierte Linie wiedergegeben. Es wird im Sender 7 erzeugt und durch die Blende 8 in den Kristall 1 unter einem Winkel von 45 ° eingestrahlt, wobei die Stirnfläche 9 des Germaniumkristalles 1 entsprechend geschliffen sein muß. Die Abmessungen des Kristalls betragen 50 mm x 20 mm x 2 mm, was ca. 25 innere Reflexionen ermöglichte. Die Kontaktfläche an der Grenzfläche Kristall-Lösung betrug ca. 5,6  $\text{cm}^2$ . Das infolge Absorption beim Durchgang durch die Enzymschicht 6 abgeschwächte Analysenlicht wird schließlich im Detektor 10 analysiert.

### 45 Beschichtung des IR-Analysenlichtleiters

Die Beschichtung des Germaniumkristalles mit Enzym erfolgte über folgende drei Stufen:

1. Silanisierung der Kristalloberfläche mit 3-Aminopropyl-triäthoxisilan (3-APTS) um sowohl das Ablösen des Enzyms von der hydrophilen Germaniumoberfläche zu verhindern, als auch um reaktive Aminogruppen für die Aktivierung zur Verfügung zu stellen;
2. Aktivierung des silanisierten Kristalles mit Glutaraldehyd;
3. Immobilisierung des Enzyms.

Ein Germaniumkristall mit polierter Oberfläche (50 mm x 20 mm x 2 mm; 45 °) wurde 24 Stunden mit 50 ml Wasser enthaltend 2,5 ml 3-APTS bei 90 °C behandelt. Danach wurde der Kristall 2 Stunden mit destilliertem Wasser gewaschen, um die physisorbierten Schichten zu entfernen. Der erhaltene modifizierte Kristall wurde darauf mit 50 ml einer wässrigen Pufferlösung ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH = 7) behandelt, die 2,5 Massen% Glutaraldehyd enthielt, um die Kristalloberfläche zu aktivieren. Zur Beschichtung wurde der aktivierte Kristall 24 Stunden bei 4 °C in 10 ml einer wässrigen Pufferlösung ( $\text{Na}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$ ; pH = 6,5) enthaltend 10 mg Glucose-Oxidase bzw. Cholesterin-Oxidase digeriert.

Die Dicke der aufgetragenen Enzymschicht wurde in bekannter Weise mittels parallel polarisiertem Licht gemessen und betrug weniger als 0,5  $\mu\text{m}$ .

#### Bestimmung von Glucose in wässrigen Lösungen

5

Der mit Glucose-Oxidase beschichtete Lichtleiter wurde in die Durchflußzelle eingebaut und in den Strahlengang des Analysenlichtes gebracht.

Die Zelle wurde mit wässrigen Pufferlösungen (Natriumphosphat-Puffer, pH = 6,5) gefüllt, die pro Liter 0,53 mmol, 1,66 mmol, 2,77 mmol, 5,55 mmol, 27 mmol, 55 mmol, 111 mmol und 215 mmol Glucose enthielten. Zur Zerstörung des bei der Enzymreaktion entstehenden  $\text{H}_2\text{O}_2$ , das bekanntlich ein starkes Enzymgift darstellt, wurde allen Lösungen pro Liter noch zusätzlich 100 ng Katalase zugegeben. Die Katalasezugabe hat weiters den Vorteil, daß durch die Zersetzung des  $\text{H}_2\text{O}_2$  immer genug Sauerstoff für die Oxidation der Glucose zur Glucosäure in der Lösung vorhanden ist.

Von den einzelnen Lösungen wurde jeweils die Absorption bei  $1153\text{ cm}^{-1}$  gemessen und von den erhaltenen Werten die Hintergrundabsorption des Phosphatpuffers subtrahiert. Die Meßreihe ergab, daß die Nachweisgrenze für Glucose beim erfindungsgemäßen Verfahren bei 0,53 mmol/l liegt, daß sich der lineare Bereich, in dem die Intensität der Meßbande bei  $1153\text{ cm}^{-1}$  direkt proportional der Glucosekonzentration ist, von 0,53 bis 27 mmol/l erstreckt und daß die Ansprechzeit zwischen 6 und 8 Minuten beträgt. Für den linearen Bereich wurde ein Eichfaktor errechnet, mit dessen Hilfe der Glucosegehalt von Lösungen unbekannter Glucosekonzentration mit einer Genauigkeit von  $\pm 8\%$  bestimmt werden konnte.

Für das am Lichtleiter immobilisierte Enzym wurde eine Langzeitstabilität von 30 Tagen festgestellt, während der keine Aktivitätsverminderung zu beobachten war.

Zur Bestimmung von Glucose in Proben, welche enzym-schädigende Stoffe enthalten, z.B. Harnstoff in Urin, ist es vorteilhaft, die Glucose-Oxidase-Schicht durch eine Membran geschützt zu schützen, die zwar eine Diffusion von Substrat und Produkt zu und vom Enzym erlaubt, aber alle enzymblockierenden Substanzen abblockt. Derartige Membrane sind allgemein bekannt.

#### Bestimmung von Cholesterin in wässriger Lösung

Der Versuchsablauf wurde wie oben beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, daß statt Glucose Cholesterin verwendet wurde und die Absorption bei der Wellenzahl  $1700\text{ cm}^{-1}$  gemessen wurde.

Es wurden die gleichen Ergebnisse erhalten wie im Fall der Glucose.

#### Patentansprüche

35

1. Analysenlichtleiter zur Verwendung bei der Bestimmung von organischen Substanzen in Lösungen mittels abgeschwächter Totalreflexion-Infrarot-Spektroskopie, **dadurch gekennzeichnet**, daß er an mindestens einer Stelle seiner Oberfläche mit einem Katalysator (6) beschichtet ist, welcher Katalysator (6) eine chemische Reaktion mit der zu bestimmenden Substanz katalysiert, wobei an der mit dem Katalysator (6) beschichteten Stelle ein spektroskopisch bestimmbares Reaktionsprodukt gebildet wird.
2. Analysenlichtleiter nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Katalysator (6) mindestens ein Enzym vorgesehen ist, wobei die Schichtdicke des Enzyms am Analysenlichtleiter (1) vorzugsweise weniger als  $1\text{ }\mu\text{m}$  beträgt.
3. Analysenlichtleiter nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Enzym Glucose-Oxidase vorgesehen ist.
4. Analysenlichtleiter nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Enzym Cholesterin-Oxidase vorgesehen ist.
5. Analysenlichtleiter nach einem der Ansprüche 2 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß das mindestens ein Enzym am Analysenlichtleiter (1) immobilisiert vorliegt.

55

Hiezu 1 Blatt Zeichnungen

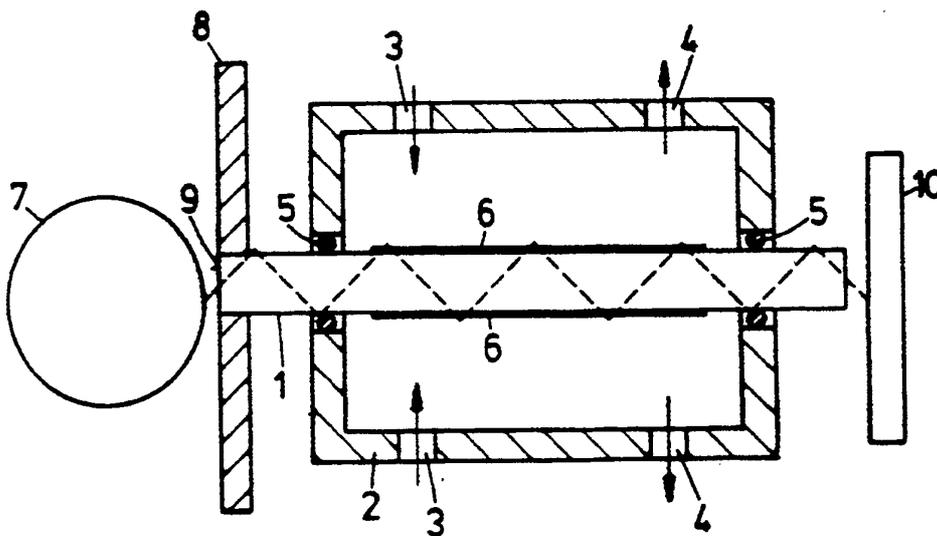


Fig.