



AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 Q / 260 018 6	(22)	13.02.84	(44)	29.05.85
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 5, DD
(72)	Schubert, Florian, Dipl.-Ing.; Scheller, Frieder, Dr. rer. nat. habil. Dipl.-Chem.; Kirstein, Dieter, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Schröder, Karl-Ludwig, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Chojnacki, Anita, DD

(54)	Verfahren zur elektrochemischen Bestimmung von Lactat, Pyruvat und der Aktivität von Alaninaminotransferase
------	---

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein elektrochemisches Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von Lactat und Pyruvat sowie der Aktivität von Alaninaminotransferase. Ziel der Erfindung ist es, die Nachweisempfindlichkeit des Verfahrens wesentlich zu erhöhen. Aufgabe ist es, mit einem bioelektrochemischen Verfahren auf der Grundlage einer akzeptoranzeigenden Elektrode mit immobilisierten Enzymen das Ziel zu erreichen. Die erfindungsgemäße Lösung besteht darin, daß die Elektrode eine Enzymschicht aufweist, die Cytochrom b_2 und Lactatdehydrogenase enthält, daß ggf. vor dieser Enzymschicht eine Schicht mit Pyruvatoxidase oder Lactatmonooxygenase angeordnet ist und daß der Meßlösung NADH zugesetzt wird. Die Erfindung wird in der klinischen Labordiagnostik, in der Lebensmittel- und mikrobiologischen Industrie angewendet.

F. Schubert
Dr. F. Scheller
Dr. D. Kirstein
Dr. K.-L. Schröder
A. Chojnacki

"Verfahren zur elektrochemischen Bestimmung von Lactat,
Pyruvat und der Aktivität von Alaninaminotransferase"

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein elektrochemisches Verfahren zur Bestimmung der Konzentrationen von Lactat und Pyruvat sowie der Aktivität von Alaninaminotransferase (ALT). Das Verfahren ist zur Lactat- und Pyruvatmessung in der Lebensmittel- und mikrobiologischen Industrie sowie zur Messung dieser Substanzen und der Aktivität von ALT in physiologischen Flüssigkeiten, also in der klinischen Labordiagnostik, geeignet.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Bestimmung von Lactat und Pyruvat sowie der Aktivität von ALT wurden in der Literatur eine Reihe von Biosensoren beschrieben, die auf der Kopplung von immobilisierten Biokatalysatoren mit Indikatorelektroden beruhen.

Zur Lactatbestimmung wurden in solchen Sensoren Lactatdehydrogenase (LDH) (C. C. Liu und A. K. Chen, Process Biochem. Sept./Oct. 1982, 12; W. J. Blaedel und R. A. Jenkins, Anal. Chem. 48 (1976) 1240), Cytochrom b_2 (DE-OS 22 43 962), Lactatmonooxygenase (J. G. Schindler und M. v. Gülich, Fresenius Z. Anal. Chem. 308 (1981) 434) oder Lactatoxidase (I. Karube et al., Anal. Chim. Acta 119 (1980) 271) angewendet. Dabei wurde das entsprechende Enzym jeweils mit einer amperometrischen oder potentiometrischen Indikatorelektrode kombiniert. Im Durchschnitt liegt die untere Bestimmungsgrenze bei diesen Enzymelektroden bei $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Die maximal erreichte

Empfindlichkeit ist durch eine untere Bestimmungsgrenze von 10^{-5} mol/l gekennzeichnet.

In Biosensoren zur Pyruvatbestimmung wurden Pyruvatoxidase (F. Mizutani et al., Anal. Chim. Acta (18 (1980) 65), Bakterien (C. L. Di Paolantonio und G. A. Rechnitz, Anal. Chim. Acta 148 (1982) 1), LDH und Glutamatdehydrogenase (P. Davies und K. Mosbach, Biochim. Biophys. Acta 370 (1974) 329) oder Maiskorngewebe (S. Kuriyama et al., J. Membr. Sci. 12 (1983) 269) eingesetzt. Bei diesen Sensoren liegt die untere Bestimmungsgrenze bei einer Pyruvatkonzentration von 10^{-4} mol/l.

Die genannte Pyruvatoxidaseelektrode wurde auch zur Bestimmung der ALT-Aktivität eingesetzt. Dabei wird die Empfindlichkeit der Aktivitätsbestimmung direkt von der Empfindlichkeit des Sensors für Pyruvat bestimmt.

Die oben genannten Lactatelektroden sind aufgrund des Charakters der ablaufenden Enzymreaktionen nicht zur Pyruvatmessung geeignet. Andererseits sind, aus demselben Grund, die genannten Pyruvatsensoren nur zur Pyruvat-, nicht aber zur Lactatbestimmung anwendbar.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, eine wesentliche Erhöhung der Empfindlichkeit der Lactat-, Pyruvat- und ALT-Messung und, als Konsequenz, eine wesentliche Verringerung der notwendigen Probenvolumina zu erreichen. Weiterhin soll mit ein und demselben Verfahren sowohl die Messung von Lactat als auch von Pyruvat und ALT ermöglicht werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

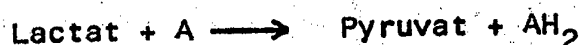
Aufgabe der Erfindung ist es, mit einem bioelektrochemischen Verfahren auf der Grundlage einer akzeptoranzeigenden Elektrode mit immobilisierten Enzymen zur Bestimmung von Lactat, Pyruvat und der ALT-Aktivität die Nachteile des Standes der Technik, wie die geringe Nachweisempfindlichkeit, zu verbes-

sern. Die erfindungsgemäße Lösung der Aufgabe besteht in einem Verfahren auf der Grundlage einer Enzymelektrode, die auf der Oberfläche des elektronenleitenden Teiles Cytochrom b_2 und LDH fixiert aufweist. Auf der elektrodenabgewandten Seite dieser Enzymschicht ist gegebenenfalls eine weitere Enzymschicht, die entweder Pyruvatoxidase oder Lactatmonooxygenase enthält, angeordnet.

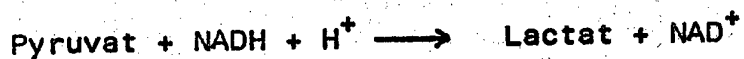
Die Erfindung soll im weiteren noch näher erläutert werden.

Die Kopplung der Reaktionen von Cytochrom b_2 und LDH ergibt ein Signal, das von der Konzentration von Lactat oder Pyruvat in einer Weise abhängt, die es ermöglicht, sehr kleine Mengen dieser Substanzen zu bestimmen. Zum Nachweis dieses Signals wird eine Cytochrom b_2 und LDH enthaltende Schicht auf der Oberfläche einer akzeptoranzeigenden Elektrode angeordnet.

Die Enzymelektrode taucht in eine gepufferte Meßlösung, die einen e^- -Akzeptor (A) der Cytochrom b_2 -Reaktion (z. B. Ferricyanid, Thionin) und NADH enthält. Die Elektrode ist so polarisiert, daß sie den reduzierten Akzeptor (AH_2) anzeigt. Bei Zugabe von Lactat zur Meßlösung wird dieses durch Cytochrom b_2 zu Pyruvat dehydriert:



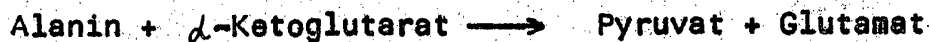
Das entstehende Pyruvat wird in der LDH-Reaktion



wieder zu Lactat reduziert, welches wiederum durch Cytochrom b_2 dehydriert wird. Durch diese kontinuierlich ablaufende Rezyklisierung des Lactats entsteht AH_2 in einer Konzentration, die um ein vielfaches größer ist, als die des ursprünglich vorliegenden Lactats. Dementsprechend erhält man für eine geringe Lactatmenge bereits ein relativ hohes Elektrodensignal.

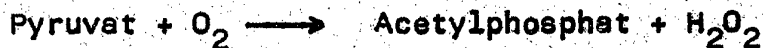
Wird anstelle von Lactat Pyruvat zugegeben, so läuft kontinuierlich derselbe Reaktionszyklus ab, beginnt jedoch mit der LDH-Reaktion.

Zur Bestimmung von ALT enthält die Meßlösung neben A und NADH noch Alanin und α -Ketoglutarat. Wird ALT zu dieser Lösung gegeben, so erfolgt eine Transaminierung, bei der Pyruvat entsteht:



Die Bildungsgeschwindigkeit des Pyruvats wird durch das erfindungsgemäße Verfahren bestimmt. Das Elektroden-signal ist von der Aktivität der ALT abhängig.

Enthält die Probe, deren Lactatgehalt zu bestimmen ist, Pyruvat, so wird vor der Enzymschicht mit Cytochrom b_2 und LDH eine Schicht, die Pyruvatoxidase enthält, angeordnet. Das in diese Schicht gelangende Pyruvat wird entsprechend:



oxidiert und kann somit nicht in die Cytochrom b_2 -LDH-Schicht eindringen. Damit wird eine Verfälschung der Lactatmessung durch Eintreten des Pyruvats in den Reaktionszyklus verhindert. In gleicher Weise wird eine Verfälschung der Pyruvat- und ALT-Bestimmung durch in der Probe vorhandenes Lactat (insbesondere bei Blutproben) verhindert, indem vor der Cytochrom b_2 -LDH-Schicht eine Schicht mit Lactatmonooxygenase aufgebracht wird.

Die Vorzüge der Erfindung im Vergleich mit existierenden Verfahren sind ihre außerordentlich hohe Empfindlichkeit (untere Bestimmungsgrenze für Lactat und Pyruvat $5 \cdot 10^{-7}$ mol/l) und die Möglichkeit, mit nur einem Verfahren sowohl Lactat als auch Pyruvat und ALT bestimmen zu können.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll nachstehend an 4 Ausführungsbeispielen erläutert werden:

1. Beispiel

15 Einheiten Cytochrom b_2 und 10 Einheiten LDH werden auf ein 10 mm^2 großes Stück Zellstoff gegeben. Dieser wird dann zwischen 2 Dialysemembranen mittels eines O-Ringes auf einer Platinelektrode fixiert, die, an einen Polarographen mit Schreiber angeschlossen, auf +0,25 V gegen Ag/AgCl (Elektrolyt 0,1 M KCl) polarisiert wird. Die Enzymelektrode taucht in 2 ml einer gerührten, auf 25°C thermostatierten Meßlösung von 0,1mol/l Phosphatpuffer, pH 6,0, mit 0,1mmol/l EDTA, 0,1mmol/l MgSO_4 , 1 mmol/l Kaliumferricyanid und 1 mmol/l NADH. Nachdem sich ein konstanter Grundstrom eingestellt hat, erfolgt die Zugabe von 2 μl Lactatlösung definierter Konzentration. Dadurch tritt eine Vergrößerung des Stromsignals ein. Der Meßwert ergibt sich als Differenz zwischen dem Grundstrom und dem Maximalwert des Stromsignals. Die Meßlösung wird entfernt, die Elektroden 2 mal mit Meßlösung gewaschen und wiederum Meßlösung vorgelegt. Auf diese Weise werden Lactatlösungen der Konzentrationen 1, 5, 10, 15, 20 mmol/l gemessen und die Meßwerte als Eichkurve aufgetragen. Nun werden 2 μl Blut zugegeben, dessen Lactatgehalt zu bestimmen ist. Mit dem Meßwert wird aus der Eichkurve dieser Gehalt abgelesen.

2. Beispiel

Eine Enzymelektrode wird präpariert und taucht in eine Meßlösung wie in Beispiel 1.

Die Elektrode wird an einen Polarographen mit Schreiber angeschlossen, bei dem die Schaltstellung "derivativ" eingestellt wird. 10 μl einer Fermentationsprobe, deren Pyruvatgehalt zu bestimmen ist, werden zugegeben. Der Meßwert ergibt sich als Höhe des angezeigten Peaks. Aus einer unter gleichen Bedingungen aufgenommenen Eichkurve mit verschiedenen Pyruvat-

Standardlösungen kann die gesuchte Pyruvatkonzentration abgelesen werden.

3. Beispiel

150 Einheiten Cytochrom b_2 und 100 Einheiten LDH werden in 0,1 ml einer 5 %igen Gelatinelösung gelöst und auf einer 1 cm^2 großen Polyethylenunterlage ausgestrichen. 100 Einheiten Pyruvatoxidase werden ebenso in 0,1 ml einer 5 %igen Gelatinelösung gelöst und auf 1 cm^2 Polyethylenunterlage gegeben. Beide Präparate werden 12 h bei 4°C getrocknet und von der Unterlage entfernt. Von den erhaltenen Membranen werden Stücke von $4 \times 4 \text{ mm}$ abgeschnitten und übereinanderliegend und durch eine Dialysemembran voneinander getrennt zwischen 2 Dialysemembranen vor einer Platinelektrode in der Weise fixiert, daß sich die Pyruvatoxidasemembran auf der elektrodenabgewandten Seite befindet. Die Elektrode wird auf $+0,25 \text{ V}$ gegen Ag/HgCl polarisiert und an einen Polarographen mit Schreiber angeschlossen. Die Meßlösung ist wie in Beispiel 1. Wie in Beispiel 1 wird eine Eichkurve aufgenommen. Nun werden $2 \text{ } \mu\text{l}$ einer pyruvatenthaltenden Fermentationsprobe, deren Lactatgehalt zu bestimmen ist, zugegeben. Der gesuchte Lactatgehalt ergibt sich aus dem Maximalwert des Stromsignals und der Eichkurve.

4. Beispiel

Eine Cytochrom b_2 -LDH-Membran wird wie in Beispiel 3 hergestellt. 30 Einheiten Lactatmonooxygenase werden in 0,05 ml einer 10 %igen Gelatinelösung gelöst, auf einer 1 cm^2 großen Unterlage ausgestrichen und bei 4°C 12 h getrocknet. Mit $4 \times 4 \text{ mm}$ von beiden Membranen wird wie in Beispiel 3 eine Enzymelektrode präpariert. Die Elektrode wird an ein Glukometer GKM O2 angeschlossen und auf $+0,25 \text{ V}$ polarisiert. 1 ml einer Meßlösung wie in Beispiel 1 wird in die Meßzelle gegeben.

Eine Eichkurve für die ALT-Aktivität wird folgendermaßen aufgenommen: je 100 μ l von Standardlösungen mit definierter ALT-Aktivität (1 U, 5 U, 10 U, 15 U, 20 U) werden mit 100 μ l 0,1 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,4, enthaltend 0,8 mol/l Alanin und 18 mmol/l α -Ketoglutarat, versetzt. Nach 2 min werden 100 μ l davon in die Meßzelle gegeben. Als Meßwert dient die sich einstellende digitale Glukometeranzeige. Nach Spülung und Vorlage einer neuen Meßlösung erfolgt die Zugabe der nächsten vorinkubierten Standardlösung. Aus den Aktivitäten und den Meßwerten wird die Eichkurve gebildet.

Nun werden 100 μ l einer Blutprobe, deren ALT-Aktivität zu bestimmen ist, ebenso behandelt wie die ALT-Standardlösungen. Aus der Glukometeranzeige und der Eichkurve ergibt sich die gesuchte Aktivität.

Erfindungsanspruch

Verfahren zur elektrochemischen Bestimmung von Lactat, Pyruvat und der Aktivität von Alaninaminotransferase in Lösung mittels einer akzeptoranzeigenden Elektrode, gekennzeichnet dadurch, daß die Elektrode mit einer Enzymschicht, in der Cytochrom b_2 und Lactatdehydrogenase aufgebracht sind, versehen ist, daß der Meßlösung NADH zugesetzt wird und daß gegebenenfalls vor der Enzymschicht eine Schicht angeordnet ist, die Pyruvatoxidase oder Lactatmonooxygenase enthält.