DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) **Wirtschaftspatent**

(19) **DD** (11) **239 274 A1**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) **G 01 N 27/48**

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP G 01 N / 278 522 3	(22)	12.07.85	(44)	17.09.86

(71) Forschungsinstitut für Medizinische Diagnostik, 8080 Dresden, Karl-Marx-Straße 3, DD
(72) Jänchen, Michael, Dr. rer. nat.; Honymus, Gerd, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Stabilisierung des elektrochemischen Harnsäuremeßverfahrens in Untersuchungsflüssigkeiten

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein einfaches Verfahren zur Vorbehandlung von Meßelektrodenanordnungen für die elektrochemisch-amperometrische Harnsäurebestimmung an manuellen Meßplätzen oder automatisierten Fließsystemen. Die Meßelektrode wird im Potentialbereich der Sauerstoffreduktion vorpolarisiert und anschließend beim Harnsäuremeßpotential einer hohen Harnsäurekonzentration ausgesetzt. Die nachfolgende Calibrierung erfolgt unter Anwendung salzhaltiger Calibrierlösungen oder Richtigkeitsseren. Das Verfahren ist vorwiegend in chemischen, biochemischen und klinisch-chemischen Laboratorien anzuwenden.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

(12) **Wirtschaftspatent**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **239 274 A1**

4(51) **G 01 N 27/48**

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP G 01 N / 278 522 3	(22)	12.07.85	(44)	17.09.86

(71) Forschungsinstitut für Medizinische Diagnostik, 8080 Dresden, Karl-Marx-Straße 3, DD
(72) Jänchen, Michael, Dr. rer. nat.; Honymus, Gerd, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Stabilisierung des elektrochemischen Harnsäuremeßverfahrens in Untersuchungsflüssigkeiten

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein einfaches Verfahren zur Vorbehandlung von Meßelektrodenanordnungen für die elektrochemisch-amperometrische Harnsäurebestimmung an manuellen Meßplätzen oder automatisierten Fließsystemen. Die Meßelektrode wird im Potentialbereich der Sauerstoffreduktion vorpolarisiert und anschließend beim Harnsäuremeßpotential einer hohen Harnsäurekonzentration ausgesetzt. Die nachfolgende Calibrierung erfolgt unter Anwendung salzhaltiger Calibrierlösungen oder Richtigkeitsseren. Das Verfahren ist vorwiegend in chemischen, biochemischen und klinisch-chemischen Laboratorien anzuwenden.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Zur PS Nr. 239274...
ist eine Zweitschrift erschienen.
(Teilweise bestätigt gem. § 18 Abs. 1 d. Änd.Ges.z.Pat.Ges.)

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Stabilisierung eines amperometrischen Harnsäure-Meßverfahrens in Untersuchungsflüssigkeiten mittels einer enzymlosen membrangeschützten Elektrodenanordnung, bestehend aus einer Arbeitselektrode und einem Bezugselektrodensystem, **dadurch gekennzeichnet,** daß vor Durchführung des Meßverfahrens die Arbeitselektrode bei Potentialen der Sauerstoffreduktion aktiviert und danach an der Arbeitselektrode Harnsäure in einer Konzentration, die gegenüber der physiologischen Harnsäurekonzentration im menschlichen Blutserum hoch ist, amperometrisch oxidiert wird und daß bei Durchführung des Meßverfahrens in ihrer ionalen Zusammensetzung aufeinander abgestimmte, salzhaltige Calibrier- und Meßlösungen verwendet werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß im diskontinuierlichen oder im kontinuierlichen Betrieb gearbeitet wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Arbeitselektrode mindestens eine Minute aktiviert wird.
4. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet,** daß Harnsäure mindestens eine Minute oxidiert wird.
5. Verfahren nach Punkt 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet,** daß chloridhaltige Calibrier- und Meßlösungen, die Chlorid in untereinander vergleichbarer Konzentration enthalten, verwendet werden.
6. Verfahren nach Punkt 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet,** daß chloridhaltige Calibrier- und Meßlösungen, deren Chloridgehalt im Konzentrationsbereich des Innenelektrolyten der Elektrodenanordnung liegt, verwendet werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Stabilisierung eines Verfahrens zur direkten Bestimmung von Harnsäurekonzentrationen in Untersuchungsflüssigkeiten wie z. B. Serum, Plasma oder Fermentationslösungen. Sie eignet sich für die Stabilisierung der quantitativen Harnsäurebestimmung in mikrobiologischen und in klinisch-chemischen Laboratorien und ist anwendbar bei der routinemäßigen Vorbereitung der Elektrodenanordnung für Einzel- oder Serientests.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die bisher in der Praxis angewandten Verfahren zur Harnsäurebestimmung beruhen entweder auf der Fähigkeit der Harnsäure, andere Stoffe zu reduzieren oder auf der Möglichkeit einer direkten oder indirekten spezifischen Messung der sich bei der enzymatischen Umsetzung mit Hilfe des Enzyms Uricase (Urat: O_2Oxidreductase) verändernden Ausgangs- (O_2)- bzw. Endproduktes (H_2O_2) oder auf der Möglichkeit der direkten elektrochemischen Harnsäureoxidation an einer amperometrischen Elektrodenanordnung entsprechend

$$\text{Harnsäure} \xrightarrow[\text{Anode}]{-e^-} \text{Allantion + Folgeprodukte}$$

Letzteres Verfahren hat den Vorteil einer vollständigen Einsparung von teurem Enzym in gelöster oder immobilisierter Form und wird nach einem kinetischen Meßprinzip durchgeführt (M. Jänchen et al., Biomed. Biochim. Acta, 42 [9] [1983], 1055–1065). Damit entfallen Probleme, die mit dem kommerziellen Vertrieb der empfindlichen Enzympräpate verbunden sind (Thermoinstabilität, Feuchtigkeit etc.). Als Meßkammer und Meßelektrodenanordnung dient eine übliche elektrochemisch-amperometrische Anordnung (DDR-Patent G01 N/217873), in der die Harnsäurebestimmung entsprechend einer bekannten Verfahrensweise vorgenommen wird (DDR-Patent G01 N/203810). Allerdings zeigte sich, daß dieses relativ einfach durchführbare enzymlose elektrochemisch-amperometrische Verfahren von einigen wichtigen Randproblemen hinsichtlich seiner Praktikabilität bzw. Stabilität über lange Meßzeiten abhängig ist: Vorbehandlung und Vorgeschichte der elektrochemisch-amperometrischen Elektrodenanordnung (Arbeitselektrode, Bezugselektrodensystem) haben einen großen Einfluß auf die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der gemessenen Harnsäurewerte in Untersuchungsflüssigkeiten wie z. B. biologischen Flüssigkeiten oder menschlichen Untersuchungsmaterialien. Hierfür sind Störungen an der Arbeitselektrode (z. B. Pt oder C) verantwortlich (R. N. Adams, „Electrochemistry at solid electrodes", M. Dekker, New York/Basel, 1969). Zur Umgehung dieser Einflüsse können neben einer vor der Messung erfolgenden Selektion der Elektroden bezüglich ihrer Eignung Elektrodenvorbehandlungsmethoden angewandt werden, die für einige andere elektrochemisch-analytische Probleme zwar bekannt, aber von Fall zu Fall unterschiedlich sind. Andererseits ist die Praktikabilität insbesondere für Routinemethoden durch zusätzliche aufwendige Elektronik oft eingeschränkt (z. B. K. Lemke et al.; Bioelectrochem. Bioenergetics 8 [1981], 115–124). Andere Verfahren sind zeitaufwendig und bedienen sich aggressiver Lösungen zur Vorbehandlung der Elektroden. Sie sind daher nicht für membranbespannte Elektroden geeignet. Außerdem führen sie oft nur zeitweise zu reproduzierbaren Messungen. Insgesamt sind die Veränderungen an Elektrodenoberflächen wie Platin bei Polarisationsvorgängen kompliziert und noch nicht vollständig aufgeklärt.
Bei der elektrochemisch-amperometrischen Bestimmung von Harnsäure in Untersuchungsflüssigkeiten mittels einer membrangeschützten, enzymlosen Elektrodenanordnung (Arbeitselektrode, Bezugselektrodensystem) ist uns ein geeignetes Verfahren zur Stabilisierung der Messungen nicht bekannt geworden.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, die nachteiligen Einflüsse auf die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Messungen, die infolge unterschiedlicher Vorgeschichte und Vorbehandlung der zur amperometrischen Bestimmung von Harnsäure in Untersuchungsflüssigkeiten verwendeten membrangeschützten, enzymlosen Elektrodenanordnung (Arbeitselektrode, Bezugselektrodensystem) auftreten, auszuschalten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, mit einer an sich bekannten membrangeschützten, enzymlosen Elektrodenanordnung (Arbeitselektrode, Bezugselektrodensystem) bei der amperometrischen Bestimmung von Harnsäure in Untersuchungsflüssigkeiten auch über größere Meßserien stabil und zuverlässig richtige Messungen zu ermöglichen.
Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß vor Durchführung des Meßverfahrens die Arbeitselektrode bei Potentialen der Sauerstoffreduktion mindestens eine Minute lang aktiviert und danach an der Arbeitselektrode Harnsäure in einer Konzentration, die gegenüber der physiologischen Harnsäurekonzentration im menschlichen Blutserum hoch ist, amperometrisch mindestens eine Minute oxidiert wird und daß bei Durchführung des Meßverfahrens in ihrer ionalen Zusammensetzung aufeinander abgestimmte salzhaltige Calibrier- und Meßlösungen verwendet werden.
Bei der erfindungsgemäßen Vorbehandlung der Elektrodenanordnung kann sowohl im diskontinuierlichen als auch im kontinuierlichen (Durchfluß, flow injection) Betrieb gearbeitet werden.
Diese Prozedur ist unkompliziert und nimmt nur etwa fünf Minuten zusätzliche Arbeitszeit vor Beginn des eigentlichen Meßvorganges in Anspruch. Bei Durchführung des Meßvorganges werden Calibrier- und Meßlösungen verwendet, die erfindungsgemäß Chlorid-Ionen in vergleichbarer Konzentration enthalten. Diese Chlorid-Ionen-Konzentrationen liegen im Konzentrationsbereich des Innenelektrolyten der Elektrodenanordnung.
Die Anwendung der erfindungsgemäßen Lösung ermöglicht stabile und zuverlässig richtige amperometrische Messungen der Harnsäurekonzentration in Untersuchungsflüssigkeiten ohne Einsatz von Enzymen und auch bei längeren Meßserien ohne die Notwendigkeit einer häufigen Nachcalibrierung.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung soll nachstehend an zwei Ausführungsbeispielen erläutert werden.
Beispiel 1:
Verwendet wird eine für direktamperometrische Harnsäuremessungen anwendbare Elektrodenanordnung (ähnlich einer Clark-Elektrode, allerdings mit einer für niedermolekulare Stoffe permeablen Membran). Arbeitselektrode ist eine Platinelektrode, Gegen- und Bezugselektrode eine größere Ag/AgCl-Elektrode, innerer Leitelektrolyt (Innenelektrolyt) ist 0,1 mol/l KCl-Lösung oder Gel. Die Elektrodenanordnung wird für die Messung in gut gerührte Boratpuffer- oder Phosphatpufferlösung mit 0,05 mmol/l KCl-Gehalt eingetaucht; zweckmäßig ist eine Meßkammer entsprechend der elektrochemisch-enzymatischen Glucosemessung.
Die Elektrodenanordnung ist bei der Messung an ein elektronisches Meßgerät angeschlossen, das sowohl die Strom-Zeit-Kurve differenziert und eine bei einem Potential von 0,4 V zwischen Arbeits- und Bezugselektrode genügende Stromempfindlichkeit aufweist (bei Pt-Elektrodendurchmesser 0,5 ... 1 mm im nA-Bereich). Außerdem soll das Gerät eine Umschaltung der Polarisation der Arbeitselektrode auf das Potential der O_2-Bildung gestatten, z. B. −0,6 V vs. Ag/AgCl.
Elektrodenvorbehandlung und Meßvorgang:
Der Meßvorgang entspricht der für die elektrochemische Harnsäurebestimmung angegebenen Verfahrensweise. Vor dem Meßvorgang sind erfindungsgemäß folgende Schritte vorzunehmen:
Zunächst erfolgt eine 2–3minütige Aktivierung der Pt-Arbeitselektrode bei dem Potential der O_2-Reduktion in dem entsprechenden Grundpuffer. Danach wird dieser erneuert und das Potential auf das Potential der Harnsäureoxidation bzw. der Harnsäuremessung umgestellt. Danach erfolgt die Zugabe einer konzentrierten Harnsäurelösung (z. B. 6 mmol/l) so, daß eine Harnsäurekonzentration von ca. 1 mmol/l in der Meßkammer resultiert. Diese Lösung verbleibt mindestens 1 Minute vor der Elektrodenanordnung, wird danach abgesaugt und nach Spülen wieder durch Grundpuffer ersetzt; in dem sich der „harnsäurefreie" Grundstrom einstellt (Änderungsgeschwindigkeit des Stromsignals = 0).
Nun erfolgt die Calibrierung der Elektrodenanordnung mit 0,15 mol/l Chlorid enthaltenden Harnsäure-Calibrierlösungen. Danach werden in den 0,15 mol/l Chlorid enthaltenden Meßlösungen die zu ermittelnden Harnsäurekonzentrationen bestimmt.
Der erfindungsgemäß einzusetzende Chloridgehalt liegt sowohl in der Calibrier- als auch in den Meßlösungen größenordnungsmäßig im Konzentrationsbereich des Innenelektrolyten der Elektrodenanordnung.
Die Meßlösungen werden durch Verdünnen der Untersuchungsflüssigkeiten, z. B. Patientenblutseren, mit Grundpuffer hergestellt.
Beispiel 2:
Verwendet wird eine Durchflußkammer nach der für O_2-Messungen üblichen Art mit zugehöriger Mikro-Elektrodenanordnung, oder nach Art der in Fließautaten zur elektrochemischen Substratbestimmung mit Enzymelektroden hergestellten Durchflußmeßkammern ähnlichen Aufbaus.
Die eingesetzte Elektrodenanordnung wird an ein elektronisches Gerät entsprechend Beispiel 1 angeschlossen.
Elektrodenvorbehandlung und Meßvorgang
Die Durchflußmeßkammer wird auf 25 °C temperiert oder bei durchlaufendem Grundpuffer (Boratpuffer, Phosphatpuffer) auf ein Temperaturgleichgewicht mit der Umgebung gebracht.
Danach erfolgt als erfindungsgemäße Vorbehandlung die Aktivierung der Arbeitselektrode im durchlaufenden Grundpuffer durch Polarisation beim Potential der O_2-Reduktion über ca. 3 Minuten.
Anschließend wird eine kontinuierliche Harnsäureoxidation aus einer 1 mmol/l-haltigen Harnsäure/Grundpufferlösung, die mindestens 1 Minute bei +0,4 V gegen Ag/AgCl durch die Meßkammer gesaugt wird, vorgenommen.
Nach erneuter Einstellung des O-Stromes durch kontinuierliches Einsaugen des Grundpuffers zur Spülung erfolgt die Calibrierung der Anordnung mit 0,06 mol/l Chlorid enthaltenden Harnsäure-Calibrierlösungen. Danach werden in den 0,06 mol/l Chlorid enthaltenden Meßlösungen die zu ermittelnden Harnsäurekonzentrationen bestimmt.
Bei der Herstellung der Meßlösungen werden z. B. Blutseren mit Grundpuffer verdünnt, wobei die zweckmäßige Verdünnung bei 1:10 bis 1:51 liegt.
Bei entsprechender Wahl von Spül- und Probenahmezeit sind Analyseraten bis zu 100 Bestimmungen/h möglich.