

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 16, 1978, pp. 447–450

Ein NH_4^+ -selektiv-enzymatisches Durchflußsystem

Verfahren zur kontinuierlichen enzymatischen Elektroanalyse von Harnstoff, II. Mitteilung

Von J. G. Schindler, R. G. Schindler und O. Aziz

Medizinisches Zentrum für Theoretische Medizin
Institut für Angewandte Physiologie der Philipps-Universität Marburg/Lahn

(Eingegangen am 15. November 1977/18. April 1978)

Zusammenfassung: Es wird ein Durchflußsystem zur NH_4^+ -selektiv-enzymatischen Harnstoffbestimmung beschrieben, bei der mit löslicher Urease schwimmend eine Harnstoffspaltung erfolgt und die NH_4^+ -Freisetzung sekundär mit einer ammoniumselektiven Disk-Elektrode erfaßt wird. Als aktive Komponente für die Elektrodenmembran wurde das Carrier-Antibiotikum Nonactin in eine Polyvinylchlorid-Matrix inkorporiert.

A NH_4^+ -selective-enzymatic flow-through system.

A method for the continuous enzymatic, electrochemical determination of urea, II.

Summary: A flow-through system for the measurement of urea concentrations is described, using soluble urease and consecutive determination of liberated ammonium ions by a selective disc-electrode. The active component of the electrode membrane was the carrier-antibiotic nonactin which was incorporated in a polyvinylchloride matrix.

Einleitung

Die elektrochemisch-enzymatische Analytik basiert auf der Messung von Ionen (1–4) oder Gasen (2–6) nach enzymatischem Substratumsatz. Da sich derartige Meßsysteme in kompakter Bauform ausbilden lassen (3, 4, 7), haben sie außer für das klinisch-chemische Laboratorium eine besondere Bedeutung für kontinuierliche elektrochemische Direktmessungen am Patienten (8). Es erscheint möglich, derartige Analyseneinrichtungen zusammen mit ionenselektiven Sensoren in einen geschlossenen Regelkreis zwischen Patient und Therapiegerät zur gesteuerten Therapie (Infusion, Medikamentenapplikation, Beatmung) zu integrieren (4).

Bisher wurden derartige Meßeinrichtungen schon zur fortlaufenden elektrochemischen Hämooanalyse des Menschen von Na^+ , K^+ , Ca^{++} und β -D-Glucose (8) in Analogie zu der bereits eingeführten Kontrolle anderer wichtiger physiologischer Meßdaten wie EKG, Puls, Blutdruck, Atmung und Temperatur eingesetzt. Im folgenden wird daher ein einfaches Verfahren zur NH_4^+ -selektiv-enzymatischen Durchflußmessung von Harnstoff beschrieben.

Technik und Methodik

Das ionenselektiv-enzymatische Meßsystem zur kontinuierlichen potentiometrischen Harnstoffanalyse besteht aus einem Metallrahmen zur elektrostatischen Abschirmung mit Buchsen für Sensoren – ionenselektive Disk-Elektroden –, Stromschlüsselkontakt-Stecker und Enzymkontakt-Stecker (3, 9, 10).

Die geringen Unterschiede in den Ionenradien von NH_4^+ ($r_{\text{Ion}} = 148$ pm) und K^+ ($r_{\text{Ion}} = 133$ pm) bedingen die hohe Querempfindlichkeit von NH_4^+ -selektiven Membranen mit dem Carrier-Antibiotikum Nonactin gegenüber K^+ (2, 10); umgekehrt weisen kaliumselektive Elektroden mit dem Träger-Antibiotikum Valinomycin eine geringe Selektivität gegenüber NH_4^+ auf (2, 3, 4). Dies erklärt der Komplexbildungsvorgang, der in gewisser Hinsicht dem Prinzip der optimalen Hohlräumenpassung folgt, wobei die Metallkation in den an der Bindung teilnehmenden Sauerstoffatomen einen Ersatz für seine Hydrathülle findet. Andererseits besteht daher nur eine geringe Transportkonkurrenz als Funktion des Ionenradius gegenüber Na^+ ($r_{\text{Ion}} = 95$ pm), Ca^{++} ($r_{\text{Ion}} = 99$ pm) und Mg^{++} ($r_{\text{Ion}} = 65$ pm).

Die Transportkonkurrenz für NH_4^+ und K^+ der Carrier-Antibiotika Nonactin und Valinomycin ist beim Aufbau eines NH_4^+ -selektiv-enzymatischen Harnstoffmeßsystems mit elektroanalytischer K^+ -Korrektur zu berücksichtigen. Der nach Enzymkontakt unter konstantem Zupumpen löslicher Urease erfolgenden NH_4^+ -Messung kann wegen der geringen Diskriminierung von Kalium-Ionen zu Korrekturzwecken ein Sensor mit Valinomycin als aktiver Komponente vorgeschaltet werden (Abb. 1), der seinerseits auf Grund des geringen NH_4^+ -Pegels bei physio-

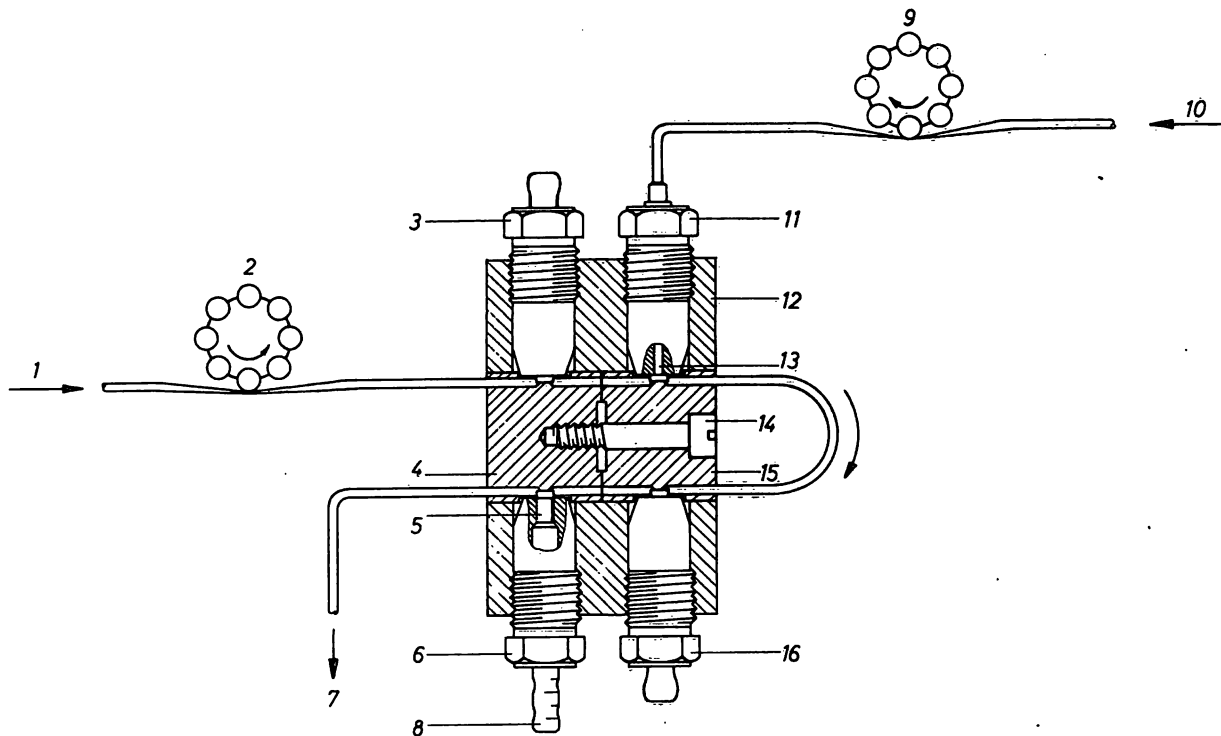


Abb. 1. Ionenselektiv-enzymatisches Durchflußsystem mit elektro-analytischer Korrekturmessung.

- | | |
|----------------------------------------|------------------------------------------|
| 1 Meßlösung | 9 Pumpe II |
| 2 Pumpe I | 10 Enzymlösung |
| 3 Ionenselektiver Sensor I (Korrektor) | 11 Enzymlösungskontakt-Stecker |
| 4 Parallelepipedischer Isolierkörper I | 12 Metallrahmen |
| 5 Stromschlüsselkontaktzone | 13 Enzymlösungskontaktzone |
| 6 Stromschlüsselkontaktstecker | 14 Spannschraube |
| 7 Abfluß | 15 Parallelepipedischer Isolierkörper II |
| 8 Anschlußstück für die Bezugslösung | 16 Ionenselektiver Sensor II (Detektor) |
| | ⤷ Enzym-Reaktor |

logischen Messungen nur wenig gestört wird. Um aber andererseits die verhältnismäßig hohe Kaliumempfindlichkeit von Nonactin in der Elektrodenmembran des NH_4^+ -Sensors ($K_{\text{NH}_4^+/\text{K}^+} \sim 10^{-1}$) ausreichend zu kompensieren, empfiehlt es sich gegenwärtig, die höhere enzymatische Aktivität löslicher Urease dem immobilisierten Enzym vorzuziehen. Wenn dabei der NH_4^+ -Pegel selbst bei einer Harnstoffkonzentration von 1,7 mmol/l auf Werte von 3,2–3,4 mmol/l – näherungsweise völliger Substratumsatz – bei einer Enzymkontaktzeit von 15 min angehoben werden kann, bedarf es keiner kaliumselektiven Korrekturmessung (Abb. 2).

Resultate

Die Selektivitätskonstanten von pNH_4^+ -Disk-Elektroden als quantitative Sensorkennzahlen wurden für die physiologisch wichtigen Störionen H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{++} und Mg^{++} nach dem Prinzip der Veränderung der Meßionenaktivität bei konstant gehaltener Störionenaktivität bestimmt (10).

Die NH_4^+ -selektiv-enzymatische Harnstoffmessung erfolgte nach schwimmend durchgeführter Substratspaltung mit tris-gepufferter (pH 7,40) löslicher Urease (Boehringer Mannheim/Biochemica-Werk Tutzing) in einem spiralförmigen Enzym-Reaktor zeit- (15 min) und temperaturkonstant (293,15 K). Im Enzym-Reaktor läßt sich luftblasengetreibt eine Vielzahl von Proben unterbringen. Da größere Harnstoffschwankungen kurzfristiger kaum zu erwarten sind, erscheint das Verfahren auch für kontinuierliche

Messungen, beispielsweise im Rahmen einer Hämodialyse, geeignet. Die langen Enzym-Reaktorzeiten wurden ge-

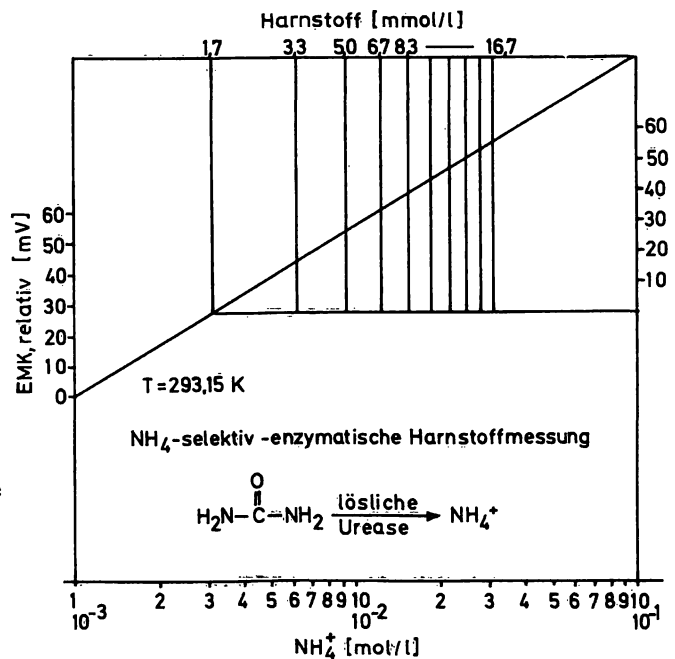


Abb. 2. Standarddiagramm zur NH_4^+ -selektiv-enzymatischen Elektroanalyse von Harnstoff mit löslicher Urease (Enzymkontaktzeit 15 min).

wählt, um durch einen näherungsweise völligen Substratumsatz einen Kaliumeinfluß auch bei niedrigem Harnstoffpegel weitgehend zu unterdrücken, so daß auf elektroanalytische Korrekturmessungen mit einem vorgeschalteten kaliumselektiven Sensor verzichtet werden kann (Abb. 2 und 3).

Zur Abschätzung des Analysenfehlers auf Grund geringer NH_4^+/K^+ -Diskriminierung wurden Modell-Versuche mit einem vorgegebenen Störionenspiegel von 10 mmol/l K^+ bei Harnstoffkonzentrationen zwischen 1,7 und 16,7 mmol/l durchgeführt (Abb. 3). Der mögliche Meßfehler liegt selbst im unteren Analysenbereich in den Toleranzgrenzen (Abb. 4) handelsüblicher Kontrollseren (DADE): LAB-TROL (5,2–5,8 mmol/l Harnstoff), MONI-TROL I (5,3–5,8 mmol/l Harnstoff), MONI-TROL II (11,8–12,2 mmol/l Harnstoff) und PATHO-TROL (17,8–18,1 mmol/l Harnstoff).

Im Hinblick auf die Einbeziehung der potentiometrischen Harnstoffmessung in die kontinuierliche elektro-

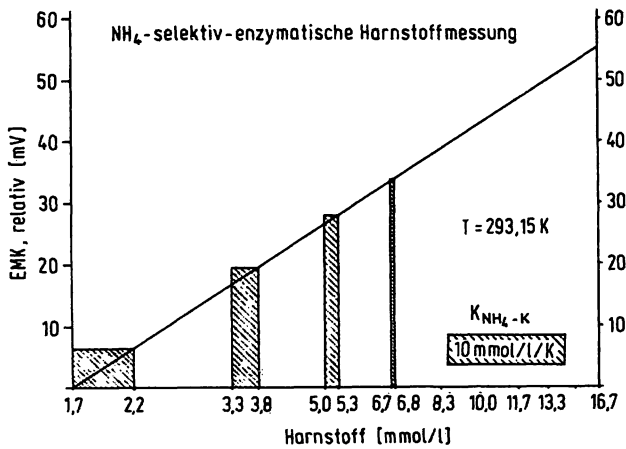


Abb. 3. $K_{\text{Harnstoff-K}}$

chemische Hämoanalyse in Analogie zu den bereits durchgeführten patientendirekten Messungen für Na^+ , K^+ , Ca^{++} und β -D-Glucose (8) wurden in vitro-Messungen nach dem Prinzip der Zwischenträgeranalyse (Dialyse) durchgeführt, die in guter Übereinstimmung mit Harnstoffmessungen im Serum stehen (Abb. 4).

Diskussion

Neben der O_2 -sensitiv-enzymatischen Messung von β -D-Glucose (2–8, 11) ist die NH_4^+ -selektiv-enzymatische Bestimmung von Harnstoff ein Paradebeispiel in der enzymatischen Elektroanalytik.

Der Nachweis für die Praktikabilität der potentiometrischen Harnstoffmessung läßt sich sehr einfach durch eine stationäre Versuchsanordnung erbringen, indem das Enzym Urease einer thermostatisierten, gerührten Substratlösung zugesetzt und aus der dann meßion-induzierten Potentialänderung auf die Substratkonzentration geschlossen wird (1). In der Weiterentwicklung zur Harnstoff-Elektrode wurde eine NH_4^+ -sensitive beziehungsweise auf Grund unzureichender Querempfindlichkeit besser als kationenselektiv zu bezeichnende Glasmembranelektrode mit in einer photopolymerisierten Acrylamidgel-Matrix immobilisierten Urease überzogen (12, 13, 14). Aus Stabilitätsgründen und auch unter dem Aspekt einer Enzymverarmung durch Auswascheffekte kann zusätzlich eine Gelfixation mit Nylonnetz (15) oder Cellophanfolie (14, 16) erfolgen. Für Direktmessungen von Harnstoff im Serum oder verdünnten Urin ist die zusätzliche Verwendung einer unbehandelten Kationen-Vergleichselektrode in einem Ionenaustausch-System erforderlich (17). Eine verbesserte Harnstoffelektrode gestattet unter Ersatz der kationenselektiven Glasmembran durch eine Silikon-gummimembran mit inkorporiertem Nonactin bei

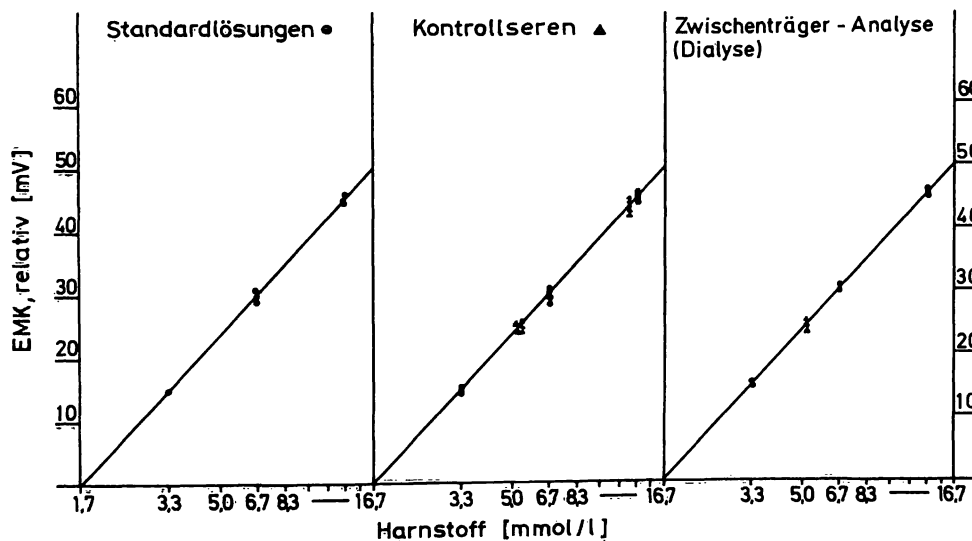


Abb. 4. Potentiometrische Harnstoff-Durchflußmessungen von Standardlösungen, Kontrollsera und nach dem Prinzip der Zwischenträger-Analyse ($T = 293,15 \text{ K}$)

bekanntem Kaliumpegel eine genaue Messung in biologischen Flüssigkeiten (18, 19). Eine andere Möglichkeit sieht vor, CO_2 - (20, 21) beziehungsweise NH_3 -Sensoren (22, 23, 24, 25) als Detektoren mit den Varianten einer Sandwich-Bauweise (21) oder Luftspalt-Elektrode (26, 27) zu verwenden.

Die Elektroanalyse mit immobilisierten Enzymen stellt gegenüber dem Einsatz löslicher Enzyme die wirtschaftlichere Alternative dar (11, 28, 29). Da aber die Immobilisierung verschiedener diesbezüglich interessanter Enzyme Schwierigkeiten zu bereiten scheint, sind Zumischverfahren mit schwimmendem Substratumsatz bei zeitkonstanter Ionen- oder Gasmessung eine Alternative auch für Analysenautomaten. Eine Auftrennung in biochemische Reaktionsstrecke und Sensor (7, 11) ist vom bautechnischen Gesichtspunkt im Hinblick auf elektro-

chemische Multimeßsysteme eine praktikable Lösung. Gegenüber mit an Schlauchinnenwandungen (28, 29) oder auf Rührsteinoberflächen (26) besetzten Enzymen bietet das schotterartig aufgebaute (11) Schichtbettverfahren (Enzympatrone) den größeren Oberflächenkontakt.

Bleibt man bei der NH_4^+ -selektiv-enzymatischen Potentiometrie, so dürften sich auch andere Substrate wie Aminosäuren unter NH_4^+ -Freisetzung (2,30) nach dem hier vorgestellten, elektroanalytischen Verfahren messen lassen.

Das Projekt wird durch die Dr. E. Fresenius Chemisch-pharmazeutische Industrie KG Apparatebau KG in Bad Homburg v.d.H. im Rahmen einer Koordinierten Forschung zur Entwicklung elektrochemischer Sensoren für Physiologie und Medizin gefördert.

Literatur

- Katz, S. A. & Rechnitz, G. A. (1963), *Z. Anal. Chem.* **196**, 248–251.
- Lakshminarayanaiah, N. (1976), *Membrane Electrodes*. Academic Press, New York, San Francisco, London, 335–359.
- Schindler, J. G. (1977), *Biomed. Techn.* **22**, 235–244.
- Schindler, J. G. & Riemann, W. (1977), *Elektrochemische Multimeßsysteme für Physiologie und Medizin*. Koordinierte Forschung des Institutes für Angewandte Physiologie der Philipps-Universität Marburg/Lahn und der Dr. E. Fresenius Chemisch-pharmazeutische Industrie KG Apparatebau KG in Bad Homburg v.d.H., 1. Aufl.
- Clark, L. C. & Sachs, G. (1968), *Bioelectrodes for Tissue Metabolism*, in: *Bioelectrodes* (Feder, W., Weyer, E. M., Krauss, M. & La Mirande, A. G., eds.), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **148**, 133–153.
- Updike, S. J. & Hicks, G. P. (1967), *Nature* **214**, 986–988.
- Schindler, J. G., Riemann, W., Sailer, D., Berg, G. & Schäl, W. (1977), *diese Z.* **15**, 709–713.
- Schindler, J. G., Dennhardt, R. & Simon, W. (1977), *Chimia* **31**, 404–407.
- Schindler, J. G. & Riemann, W. (1975), *Biomed. Techn.* **20**, 75–76.
- Schindler, J. G., Schindler, R. G. & Aziz, O. (1978), *diese Z.*, 441–445.
- Nelboeck, M. & Jaworek, D. (1975), *Chimia* **29**, 109–123.
- Guilbault, G. G. & Montalvo, J. G. (1969), *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 2164–2165.
- Guilbault, G. G. & Montalvo, J. G. (1969), *Chem. Eng. News* **47**, 35.
- Guilbault, G. G. & Montalvo, J. G. (1970), *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 2533–2538.
- Montalvo, J. & Guilbault, G. G. (1969), *Anal. Chem.* **41**, 1897–1899.
- Guilbault, G. G. & Montalvo, J. G. (1969), *Anal. Lett.* **2**, 283–293.
- Guilbault, G. G. & Hrabánková, E. (1970), *Anal. Chim. Acta* **52**, 287–294.
- Guilbault, G. G. & Geza Nagy (1973), *Anal. Chem.* **45**, 417–419.
- Guilbault, G. G., Geza Nagy & Kuan, S. S. (1973), *Anal. Chim. Acta* **67**, 195–201.
- Guilbault, G. G. & Shu, F. R. (1972), *Anal. Chem.* **44**, 2161–2166.
- Canh Tran-Minh & Broun, G. (1975), *Anal. Chem.* **47**, 1359–1364.
- Anfält, T., Graneli, A. & Jagner, D. (1973), *Anal. Lett.* **6**, 969–975.
- Guilbault, G. G. & Mads Tarp (1974), *Anal. Chim. Acta* **73**, 355–365.
- Lienado, R. A. & Rechnitz, G. A. (1974), *Anal. Chem.* **46**, 1109–1112.
- Rogers, D. S. & Pool, K. H. (1973), *Anal. Lett.* **6**, 801–808.
- Guilbault, G. G. & Stokbro, W. (1975), *Anal. Chim. Acta* **76**, 237–244.
- Hansen, E. H. & Růžička, J. (1974), *Anal. Chim. Acta* **72**, 353–364.
- Filippusson, H., Hornby, W. E. & McDonald, A. (1972), *FEBS Lett.* **20**, 291–293.
- Morris, D. L., Campbell, J. & Hornby, W. E. (1975), *Biochem. J.* **147**, 593–603.
- Neubecker, T. A. & Rechnitz, G. A. (1972), *Anal. Lett.* **5**, 653–659.

Dr. Dr. J. G. Schindler
R. G. Schindler
Prof. Dr. O. Aziz

Med. Zentrum für Theoretische Medizin
Institut für Angewandte Physiologie
Philipps-Universität
Lahnberge
D-3550 Marburg/Lahn