

Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.

Vol. 32, 1994, pp. 599–608

© 1994 Walter de Gruyter & Co.
Berlin · New York

Langlebige β -D-Glucose- und L-Lactat-Biosensoren für kontinuierliche Durchflußmessungen zur „fouling“-resistenten und selektivitätsoptimierten Serum- und Hämooanalytik

Von J. G. Schindler¹, M. M. Schindler², K. Herna¹, M. Pohl¹, H. Guntermann¹, B. Burk¹ und E. Reisinger¹

¹ *Institut für Normale und Pathologische Physiologie, Projekt: Bioelektrochemische Sensorik, Philipps-Universität, Marburg/Lahn, Germany*

² *Schindler Bio- und Chemosensoren Forschungslabor, Marburg/Lahn, Germany*

(Eingegangen am 3. März/16. Mai 1994)

Zusammenfassung: Es werden bioelektrochemische Membranelektroden zur O₂-sensitiv-enzymatischen Durchflußanalyse von β -D-Glucose und L-Lactat beschrieben. Die Enzymmembranen der Biosensoren basieren auf der Quervernetzung von Glucose-Oxidase- oder Lactat-Oxidase-Molekülen durch Glutardialdehyd zwischen zwei Dialysemembranen. Anhand einer Gegenüberstellung zur redoxmediatorfreien H₂O₂-Detektion und im Vergleich zu photometrischen Bestimmungsmethoden wird ihre Verlässlichkeit in der Elektroanalytik verdünnter Seren durch die Vermessung von Richtigkeitskontrollseren demonstriert. Die kontinuierliche Hämooanalytik im ungerinnbaren Blut erfolgt nach dem Prinzip der Zwischenträgeranalyse auf der Basis von Additivsystemen. Die tangentiale Anströmung des Miniatur-Dialysators mit zirkulärer Kanalführung minimiert eine Porenverlegung der Dialysemembran durch Erythrocyten, Leukocyten oder Proteine. Eine Oxigenatorpumpe zum Gasaustausch zwischen der gepufferten Trägerlösung und der umgebenden Atmosphäre ist der Garant für einen konstanten Sauerstoffpartialdruck im Carrierstrom. Die durch die Oxigenatorpumpe erzeugten Pulsationen werden durch eine miniaturisierte Druckausgleichskammer mit vernachlässigbarem Totraumvolumen für die Enzymmembran des Sensors gedämpft. Glutardialdehyd wirkt als Hemmstoff für mikrobielles Wachstum im Kanalsystem und beugt damit einer unerwünschten Sauerstoffzehrung durch Mikroorganismen vor, so daß auch in proteinhaltigen Meßmedien eine „fouling“-resistente Applikation der Enzymelektroden ermöglicht wird. Daher kann das bioelektrochemische Meßsystem auch in anderen Medien wie Fermentationslösungen zur Elektroanalytik eingesetzt werden. Bei kontinuierlichem Durchflußbetrieb wurde ein Wechsel der Glucose-Oxidase-Membranen nach 100 bis 150 Tagen und der Lactat-Oxidase-Membranen nach 3 bis 6 Wochen vorgenommen.

Long-functioning β -D-glucose and L-lactate biosensors for continuous flow-through measurements for "fouling"-resistant and selectivity-optimized serum- and haemoanalysis

Summary: Bioelectrochemical membrane-electrodes for O₂-sensitive enzymatic flow-through analysis of β -D-glucose and L-lactate are described. The enzyme-membranes of the biosensors consist of glucose-oxidase or lactate-oxidase molecules cross-linked with glutardialdehyde between two dialysis membranes. The accuracy of the biosensors is demonstrated by electroanalysis of diluted control serum and compared with redox-mediator-free H₂O₂ detection and photometric methods. Continuous haemoanalysis of uncoagulated blood was carried out, using an intermediate carrier stream with additive systems. Tangential streaming to the miniaturized dialysis chamber with a circular channel minimizes blockage of the pores of the dialysis membrane by erythrocytes, leukocytes or protein. An oxygenator pump for the exchange of gases between the buffered solution of the intermediate carrier and the surrounding atmosphere guarantees a constant oxygen partial pressure within the carrier stream. The pulsations produced by the oxygenator pump are dampened by a miniature pressure balance chamber with an insignificant dead space volume for protecting the enzyme membrane of the sensor. Glutardialdehyde inhibits growth of microor-

ganisms and any resulting oxygen consumption, so that even in protein-containing measuring solutions enzyme electrodes can be used without interference from microbial contamination. The bioelectrochemical measuring system can therefore also be employed for the electroanalysis of fermentation solutions. For continuous flow-through measurements, it is necessary to change the glucose-oxidase membranes after 100–150 days, and the lactate-oxidase membranes after 3–6 weeks.

Einführung

In den Annalen der New Yorker Akademie der Wissenschaften beschrieben 1962 erstmals *Clark & Lyons* eine Enzymelektrode zur Bestimmung von Glucose auf der Basis makroverkapselter Glucoseoxidase zur selektiven Sensibilisierung von pO_2 - oder pH-Elektroden als Detektoren (1). Allerdings findet sich bereits in der zwei Jahre zuvor erschienenen Ausgabe des „Polarographischen Praktikums“ von *Heyrovský* der Hinweis, daß bei Anwesenheit von Glucose in einer phosphatgepufferten Hefesuspension polarographisch eine Verminderung des Sauerstoffpartialdruckes durch enzymatische Vorgänge nachweisbar ist (2). Vom Funktionsprinzip her zeigt dieses Verfahren bereits alle Attribute eines Biosensor-Systems (3). Als Gradmesser für das stetig wachsende Interesse an bioelektrochemischen Membranelektroden (3) können Umfang bzw. Anzahl der publizierten Review-Artikel (4, 5) herangezogen werden.

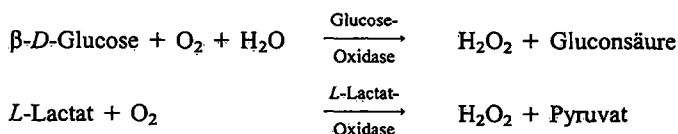
Von aktuellem Interesse ist die Verbesserung der selektiven Eigenschaften bioelektrochemischer Meßsysteme für die klinisch-chemische Analytik und Biotechnologie (6), bei der einer Prozeßkontrolle am Fermenter im Rahmen der Regeltechnik eine herausragende Rolle zukommt. Andererseits besteht in der Intensivmedizin vielfach der Wunsch, derartige Meßsysteme als „bedside-analysers“ wegen ihrer geringen Baugröße bei kleinstem Probenvolumen in robuster Ausgestaltung zur fortlaufenden trägeitarmen Meßwerterfassung für eine Überwachung von Risikopatienten einzusetzen (3). Bereits 1977 wurde von uns die kontinuierliche ionenselektive und die elektrochemisch-enzymatische Direktmessung von Na^+ , K^+ und Ca^{2+} beziehungsweise β -D-Glucose am Menschen realisiert (7) sowie 1978/79 auf die intraoperative Überwachung dieser Elektrolyte auch in der Einleitungsphase der Narkose ausgedehnt (8). Ein anderes klassisches Beispiel für die Anwendung unserer Bio- und Chemosensoren in der Medizin ist die Prozeßüberwachung der Künstlichen Niere hinsichtlich der Elektrolytveränderungen (9, 10), in die nun auch die fortlaufende Kontrolle der eliminierten Harnstoffmenge (11, 12) während der Hämodialyse einbezogen werden konnte.

Während von uns in den 70er Jahren zur O_2 -sensitiv-enzymatischen β -D-Glucose-Messung das Enzym Glucoseoxidase in seiner löslichen Form angewendet wurde

(3, 7, 13), berichten wir hier über optimierte β -D-Glucose- und L-Lactat-Biosensoren mit kovalent immobilisierten Enzymen und erforderliche Additivsysteme für kontinuierliche Durchflußmessungen zur direkten Patientenüberwachung in der Intensivmedizin und an der Künstlichen Niere.

Material und Methodik

Zur Detektion der elektrochemisch-enzymatischen Messung von β -D-Glucose und L-Lactat wurden amperometrische pO_2 - oder H_2O_2 -Detektoren herangezogen, deren Konstruktionsprinzipien in Abbildung 1 wiedergegeben sind. Bei der Herstellung der Enzymmembranen SBC-1010- β -D-Glucose, SBC-1212-L-Lactat und SBC-1222-L-Lactat wurden jeweils 40 U Glucose-Oxidase beziehungsweise Lactat-Oxidase pro Membran in kovalenter Bindung durch Quervernetzung mit Glutardialdehyd zwischen zwei Dialysemembranen immobilisiert (Glucose-Oxidase, EC 1.1.3.4 aus *Aspergillus niger*, L-Lactat-Oxidase, EC 1.1.3. – aus *Pediococcus species*).



Die Arretierung der Membransysteme erfolgte auf einem Membranträger aus Acrylglas mit Hilfe eines O-Ringes. Bei O_2 -sensitiv-enzymatischen Membranelektroden trennt eine ionenundurchlässige

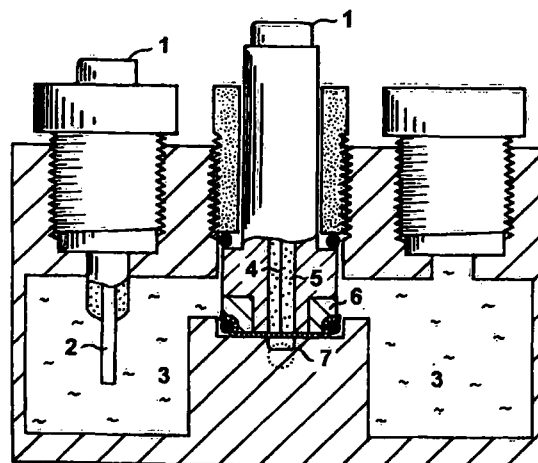
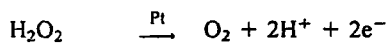


Abb. 1 Biosensor zur elektrochemisch-enzymatischen Durchflußmessung von β -D-Glucose bzw. L-Lactat über pO_2 - oder H_2O_2 -Detektion.

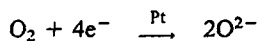
1 Stecker; 2 Ag-Referenzelektrode; 3 Innenelektrolyt; 4 Pt-Detektorelektrode; 5 unspezifischer Glasschaft; 6 austauschbarer Acrylglasring mit Membransystem aus zwischen zwei Dialysemembranen kovalent quervernetzten Glucose- bzw. Lactatoxidasemolekülen, bei pO_2 Detektion mit zusätzlicher PTFE-Folie zwischen elektrochemischer Meßzelle und Enzymmembran; 7 wannenförmig abgeflachte Durchflußkammer, punktiert: Zu- bzw. Abflußkanal.

sige, gaspermeable PTFE-Folie die Enzym-Membran von der elektrochemischen Meßzelle. Nach Benetzung mit einem Kontaktelektrolyten wird das den Biokatalysator enthaltende membrantragende Element auf den Detektor aufgeschoben, so daß nun die Elektroanalyse in sequentieller Anordnung durch den anorganischen Katalysator des Detektors erfolgen kann. Das Meßprinzip vereint zwei katalytische Prozesse zur molekularselektiven Elektroanalyse. Die Polarisationsspannung betrug für den Wasserstoffperoxid-Detektor 950 mV, für die Sauerstoff-Elektrode nach Maßgabe des Polarogramms plateauangepaßt 750 mV.

Die anodische Oxidation von H_2O_2 basiert an Platin auf einem 2-Elektronenmechanismus:



Der kathodischen Reduktion von O_2 an Platin liegt ein 4-Elektronenmechanismus zugrunde:



Die Aufnahme des ersten Elektrons stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar (14). Bezüglich einer Aufschlüsselung der diskutierten Abläufe der Elektrodenprozesse verweisen wir auf l. c. (2, 3, 14–17) und die dort zitierte Literatur.

Der elektrochemisch-enzymatische Sensor wird dichtend unter Verwendung eines O-Ringes gegen die Berandung der Durchflußkammer mit einer Überwurfmutter angezogen, so daß die Enzymmembran das Dach dieser Meßkammer bildet. Die wannenförmig abgeflachte Kammer ist in strömungsgünstiger Geometrie ausgeführt und gewinnt zur Vermeidung einer Probenverschleppung für die strömende Flüssigkeit einen totzonenfreien Anschluß an radiale Zu- und Abflußkanäle. Mit nachgeschalteter Rollenpumpe werden die Meß- und substrathaltigen Kalibrierlösungen angesaugt.

Bei einem O_2 -sensitiv-enzymatischen Meßverfahren wird naturgemäß mit ansteigender Substrat-Konzentration durch den enzymreaktionsbedingten Sauerstoffverbrauch der Meßstrom sinken und umgekehrt bei einer anodischen Detektion des gebildeten H_2O_2 ansteigen. Dementsprechend lassen sich als Ausdruck der gegensätzlichen Steigung der Funktionen die mathematisch identischen Gleichungen für die Berechnung der zu bestimmenden Konzentration des Analyten formulieren:

Molekularselektiver Sensor mit O_2 -Detektor:

$$c_x = c_1 + \frac{I_1 - I_x}{I_1 - I_2} \cdot (c_2 - c_1)$$

Molekularselektiver Sensor mit H_2O_2 -Detektor:

$$c_x = c_1 + \frac{I_x - I_1}{I_2 - I_1} \cdot (c_2 - c_1)$$

- c_x Konzentration des Analyten in der Meßlösung
- c_1 niedrigere Substratkonzentration in der Kalibriertlösung K_1
- c_2 höhere Substratkonzentration in der Kalibriertlösung K_2
- I_x Stromstärke entsprechend c_x in der Meßlösung
- I_1 Stromstärke entsprechend c_1 in K_1
- I_2 Stromstärke entsprechend c_2 in K_2

Ergebnisse

Untersuchungen über die Eigenschaften von mehr als 100 Enzymmembranen und die mit ihnen gewonnenen Meßergebnisse belegen eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit des Herstellungsverfahrens. Im kontinuierlichen Durchflußbetrieb unter Anwendung von Na_2HPO_4 /

KH_2PO_4 -Puffer mit einem pH-Wert von 7,04 betrug bei einer Temperatur von 20 bis 25 °C an O_2 -Detektoren die Funktionsdauer der Glucose-Oxidase-Membranen (SBC-1010) 100 bis 150 Tage, der *L*-Lactat-Oxidase-Membranen (SBC-1212 und SBC-1222) 3 bis 6 Wochen. Untersuchungen über die Variabilität der Lebensdauer ergaben, daß sie eine Funktion des Haltbarkeitsdatums und Lagerzeitraumes bei Anlieferung der Enzyme ist. Bis zu dem Einsatz der Membransysteme ist ihre Lagerung über mehrere Monate bei + 4 °C im Kühlschrank möglich. Unter diesen Bedingungen zeigten kovalent im Membransystem gebundene Enzyme eine geringere Aktivitätseinbuße als in gelöster Form. Im Routine-Betrieb ist mit nachlassender Aktivität des Biokatalysators ein problemloser Wechsel der Enzymmembranen in wenigen Minuten ausführbar. Naturgemäß gestalten sich die Betriebskosten im Vergleich zum analytischen Einsatz löslicher Enzyme außerordentlich gering.

Für eine niedrige Querempfindlichkeit von Biosensoren ist primär eine hohe Selektivität des enzymatischen Biokatalysators selbst eine Grundvoraussetzung. Darüberhinaus ist aber der Detektorselektivität und besonders bei O_2 -sensitiv-enzymatischen Membranelektroden den Eigenschaften additiver Einrichtungen wie gasaustauschender Systeme zwecks Aufrechterhaltung eines konstanten Sauerstoffpartialdruckes und damit definierter Meßbedingungen eine maßgebliche Bedeutung bei der Beurteilung der Gesamtselektivität eines bioelektrochemischen Meßverfahrens beizumessen.

Die experimentellen Untersuchungen im Hinblick auf eine drastischere Diskriminierung unerwünschter Reaktanden führten zu folgender Konstruktionsgestaltung der hier vorgestellten Sensoren. Zur Selektivitätssteigerung verfügt der Wasserstoffperoxid-Detektor lediglich über ein anodisches Fenster, wodurch trotz ionendurchlässigem Membransystem der Einfluß der Leitfähigkeit der Meßlösung minimiert und unerwünschte Reaktionen an der Ag-Kathode eliminiert werden, da diese im Seitenraum der elektrochemischen Zelle einem direkten Einfluß der Meßlösung entzogen ist (Abb. 1). Hingegen trennt den Innenelektrolytraum des O_2 -Detektors von der Enzymmembran eine gaspermeable, aber ionendurchlässige PTFE-Folie, um so durch diese Eigenschaft einen herausragenden Beitrag zur Erhöhung der Selektivität bioelektrochemischer Membranelektroden mit hochselektiven kovalent gebundenen Enzymen zu leisten (Abb. 1).

Unter Anwendung einer Dreipunktkalibrierung betrug bei adäquater Verdünnung mit Puffer oder im Carrierstrom der Meßbereich für β -D-Glucose 1,0 bis 1000 mg/dl (0,06–55,51 mmol/l) und *L*-Lactat 0,2 bis 100 mg/dl (0,02–11,1 mmol/l). Als Kalibrierpunkte wurden für β -D-Glucose 100, 400 und 800 mg/dl (5,55, 22,2 und 44,4

mmol/l) und für *L*-Lactat 30, 50 und 100 mg/dl (3,3, 5,6 und 11,1 mmol/l) in wäßriger phosphatgepufferter Lösung mit einem pH-Wert von 7,04 gewählt. Bei sehr niedrigen Konzentrationen des Analyten empfiehlt sich ein entsprechend gewählter vierter Kalibrierpunkt. Jede Bestimmung einer Probe ist von einer Zweipunktkalibrierung umgrenzt (Abb. 2).

Die Abhängigkeit einer Meßwerterfassung der β -*D*-Glucose und des *L*-Lactats von der Selektivität des Detektors wurde mit Membransystemen gleicher Enzymkonzentration an O_2 - und H_2O_2 -Elektroden an 1 : 21 verdünnten Seren und Citrat-Plasmen unter Anwendung des Glykolysehemmers NaF (3 g/l Blut) überprüft. Zusätzlich erfolgte eine Aufstockung dieser Plasmaproben mit dem jeweiligen Analyten. Die durch das Aufstockverfahren erwarteten und beobachteten Resultate stimmten in sich im Sinne einer linearen Funktion mit geforderter Steigung für jeden der beiden Detektoren gut überein, wobei allerdings eine analytisch relevante Diskrepanz in den Absolutwerten zwischen den beiden Detektionsver-

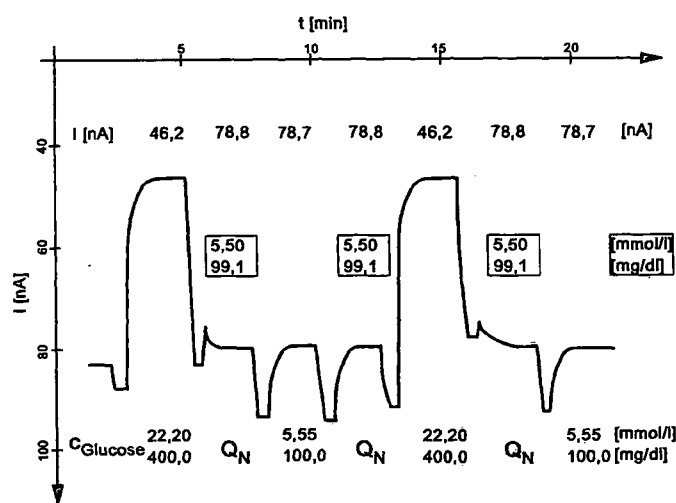


Abb. 2 Durchflußmessung von β -*D*-Glucose im 1 : 21 verdünnten Richtigkeits-Kontrollserum Qualitrol N[®] (Q_N) mit einem O_2 -sensitiv-enzymatischen Biosensor (Membran SBC-1010). Umrahmt ist die jeweils aus Zweipunktkalibrierung errechnete Glucosekonzentration in Q_N. Die den Glucosekonzentrationen zuzuordnenden Stromstärken sind jeweils oberhalb der Meßkurve aufgeführt. Glucose in Qualitrol N[®] der Chargen-Nr. 390 laut Datenschlüssel (E. Merck, Darmstadt):

Analyse- methode	Soll- wert	Soll- bereich	Erlaubter Bereich	
Referenz- methode	92,3		78,5 - 106	mg/dl
	5,12		4,35 - 5,89	mmol/l
Gluc-DH ^R	96,3	91,5 - 101	81,9 - 111	mg/dl
	5,34	5,08 - 5,61	4,54 - 6,15	mmol/l
GOD- PAP	101	96,0 - 106	85,9 - 116	mg/dl
	5,61	5,33 - 5,89	4,76 - 6,45	mmol/l
Hexo- kinase	94,8	90,1 - 99,5	80,6 - 109	mg/dl
	5,26	5,00 - 5,52	4,47 - 6,05	mmol/l

fahren beobachtet wurde. Im Rahmen photometrischer Vergleichsmessungen konnte hierfür eine Null-Linienverschiebung zu überhöhten Werten bei einer H_2O_2 -Detektion verantwortlich gemacht werden. Dies ist auf der Basis einer Querempfindlichkeit dieses Sensors aufgrund unerwünschter anodischer Elektrodenprozesse durch im Meßgut vorhandene elektrochemisch umsetzbare Reaktanden, wie beispielsweise Harnsäure, erklärlich.

Aus diesem Grund wurde eine weitere elektrochemisch-enzymatische Analytik für β -*D*-Glucose- und *L*-Lactat hinsichtlich beider Detektortypen an 1 : 21 mit Puffer verdünnten Richtigkeits-Kontrollseren erstellt. Erwartungsgemäß bestätigte sich, daß bei einer Detektion über Wasserstoffperoxid für β -*D*-Glucose um mindestens 10 bis 20 mg/dl und für *L*-Lactat um ca. 5 mg/dl zu hohe Werte gefunden würden. Hingegen lagen bei einer Detektion mit Sauerstoff-Elektroden die Meßergebnisse im Sollbereich der zugehörigen Referenz- bzw. methodenabhängigen Sollwerte (Abb. 3a und b).

Der bei einer Polarisationsspannung von 950 mV auch in Abwesenheit einer Glucose-Oxidase-Membran direkte anodische Umsatz von β -*D*-Glucose an polierten Platin-Elektroden kann quantitativ über einen Zeitraum von mehreren Wochen drastisch absinken und nicht mehr nachweisbar werden. Hierin sehen wir einen zusätzlichen Grund für das wechselnde Ausmaß in den Meßwertabweichungen von β -*D*-Glucose und *L*-Lactat unter H_2O_2 -Detektion gegenüber O_2 -Sensoren. Daher veranlassen uns die insgesamt bedeutsamen und nicht sicher kalkulierbaren Querempfindlichkeiten bei einer Detektion über Wasserstoffperoxid entgegen der vielgeübten Praxis den O_2 -sensitiven Enzymelektroden zur Messung der beiden Analyten den Vorzug zu geben.

Für kontinuierliche Messungen in Medien mit schwankendem Sauerstoffpartialdruck wie heparinisiertem Blut oder Fermentationsbrühen beziehungsweise dabei gegebener Unterschiede im pO_2 von Meß- und Kalibrierlösungen wurde eine Zwischenträgeranalyse (Abb. 4) unter biokompatibler Kopplung an einen miniaturisierten Dialysator mit kreisförmiger Kanalführung (7) und tangentialer Anströmung zwecks Minimierung einer Membranbelegung durch Proteine und Zellen vorgenommen. Durch den Dialysevorgang erfolgt eine 1 : 11 Verdünnung des Analyten. Für den Trägerstrom stand der Na^+ / K^+ -Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,04 zur Verfügung. Eine zwischen Dialyse- und Druckausgleichskammer geschaltete Oxigenatorpumpe gewährleistet durch Gasaustausch über einen Silikonschlauch zwischen dem strömenden Medium und der umgebenden Atmosphäre einen konstanten Sauerstoff-Partialdruck im Trägerstrom (18). Die dem Biosensor nachgeschaltete Rollenpumpe liefert ihm das Meßgut aus der

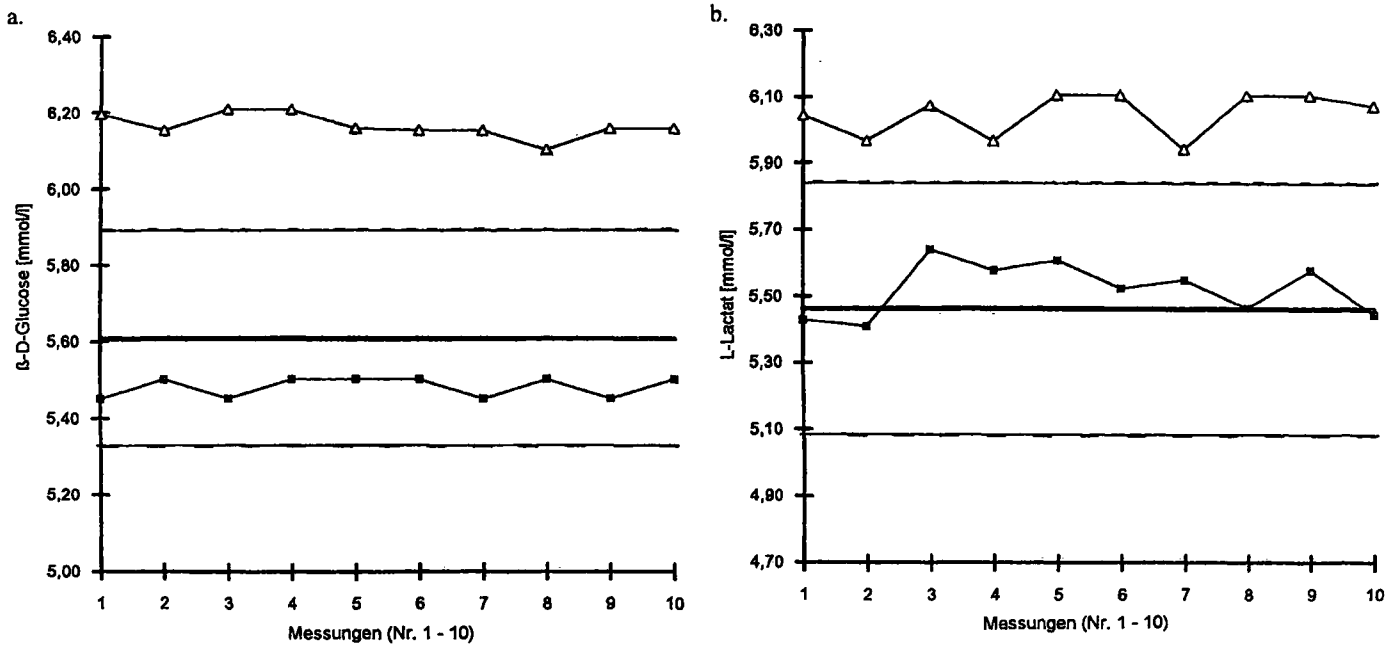


Abb. 3 Präzision in der Serie der Biosensoren im Richtigkeits-Kontrollserum Qualitrol N[®] der Chargen-Nr. 390 (E. Merck, Darmstadt):

a. β -D-Glucose

SBC-1010/H₂O₂-Detektor:

$$\bar{x}_{n=10} = 6,17 \text{ mmol/l} \quad s = \pm 0,03 \text{ mmol/l} \quad \text{VK} = 0,49\%$$

SBC-1010/O₂-Detektor:

$$\bar{x}_{n=10} = 5,48 \text{ mmol/l} \quad s = \pm 0,03 \text{ mmol/l} \quad \text{VK} = 0,55\%$$

Vergleich mit Analysenmethode GOD-PAP (Merck, Boehringer, Roche): siehe Wertetabelle in Legende Abb. 2)

- Sollwert (5,61 mmol/l)
- obere Grenze des Sollbereichs (5,89 mmol/l)
- untere Grenze des Sollbereichs (5,33 mmol/l)
- △- peroxidabhängige Detektion (SBC-1010)
- sauerstoffabhängige Detektion (SBC-1010)

b. L-Lactat

SBC-1222/H₂O₂-Detektor:

$$\bar{x}_{n=10} = 6,05 \text{ mmol/l} \quad s = \pm 0,07 \text{ mmol/l} \quad \text{VK} = 1,16\%$$

SBC-1212/O₂-Detektor:

$$\bar{x}_{n=10} = 5,52 \text{ mmol/l} \quad s = \pm 0,08 \text{ mmol/l} \quad \text{VK} = 1,45\%$$

Vergleich mit Analysenmethode laut Datenschlüssel (E. Merck, Darmstadt):

Analysenmethode	Sollwert	Sollbereich	Erlaubter Bereich
enzymatischer UV-Test, Boehringer	49,2	45,8 – 52,6	38,9 – 59,5 mg/dl
	5,46	5,08 – 5,84	4,32 – 6,61 mmol/l

- Sollwert (5,46 mmol/l)
- obere Grenze des Sollbereichs (5,84 mmol/l)
- untere Grenze des Sollbereichs (5,08 mmol/l)
- △- peroxidabhängige Detektion (SBC-1222)
- sauerstoffabhängige Detektion (SBC-1212)

Druckausgleichskammer an. Letztere dient einer Eliminierung von pulsatorischen Druckschwankungen, die von der Oxigenatorpumpe erzeugt werden, auf die Enzymmembran. Die Kalibrierung muß über die Dialysmembran zur Berücksichtigung ihrer Austauschigenschaften erfolgen (7). Ein Wechsel der Dialysmembran wurde nach ca. 4 bis 6 Wochen vorgenommen.

Fortlaufende elektrochemisch-enzymatische in vitro-Messungen von β -D-Glucose und L-Lactat im ungerinnbaren (Heparin oder Citrat) Blut konnten zunächst nach dem angegebenen Prinzip der Zwischenträgeranalyse (Abb. 4) nur bei Einsatz von H₂O₂-Detektoren durchgeführt werden und versagten kurzfristig, wenn sie durch O₂-Detektoren ersetzt wurden. Die Lösung des Problems bestand in der Erkenntnis, daß eine mikrobielle Schlauch- und Kanalbesiedelung bis in die Meßkammer

des Sensors hinein zu einer Sauerstoffzehrung führte. Damit war die wichtige Oxigenatoreigenschaft der Pumpe außer Funktion gesetzt. Die Richtigkeit dieses ursächlichen Zusammenhanges konnte ex juvantibus bewiesen werden, indem die in der kosmetischen Industrie zur Desinfektion und Konservierung benutzte bakterizide Wirkung von Glutaraldehyd ausgenutzt wurde (19). Die Perfusion des Gesamtsystems mit 1 ml einer wäßrigen Glutaraldehydlösung (2,5 Gew.%) führte bei β -D-Glucose- und L-Lactat-Sensoren augenblicklich stets zur Funktionswiederherstellung. Diese Maßnahme wird von uns bei ausgeprägter Kontamination bedarfsweise diskontinuierlich und kurzfristig unterstützend ausgeführt, wenn während der Messungen eine stetige Glutaraldehydkonzentration von 0,01 Gew.% im Trägerstrom nicht ausreichend für die Supprimierung der mikrobiellen Be-

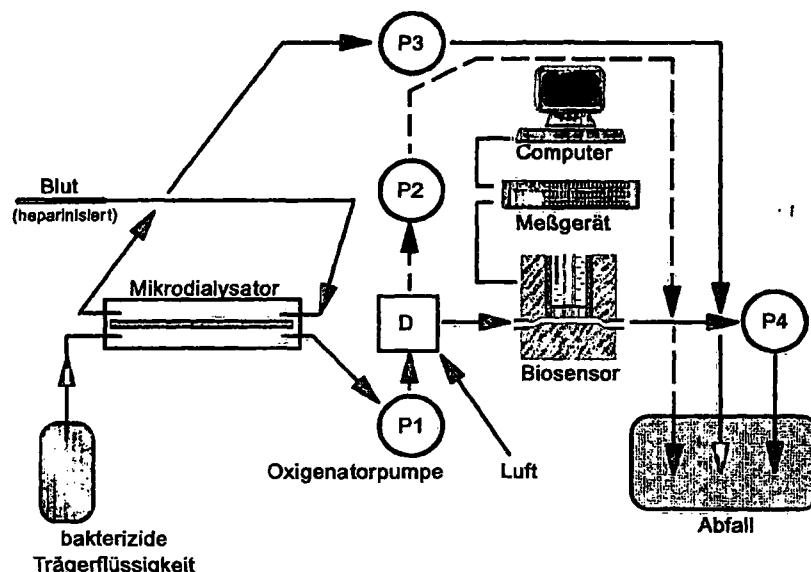


Abb. 4 Fouling-resistentes Meßsystem mit Oxigenatorpumpe zur Carrier-Analyse von β -D-Glucose oder L-Lactat im heparinisierten Blut mit O_2 -sensitiv-enzymatischen Membranelektroden.

P = Pumpe mit Kanälen 1-4
D = Druckausgleichskammer

siedelung wirksam sein sollte oder Messungen im verdünnten Serum anstehen.

Ein Ausschnitt aus einer über 6,5 Stunden ausgeführten kontinuierlichen Messung im ungerinnbaren (s. o.) und mit NaF-versetzten sowie durch Glucose in verschiedenen Konzentrationen aufgestockten Blut sowie dessen Plasma ist mit Kalibrierungen in Abbildung 5 wiedergegeben. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß ohne Zwischenkalibrierung fortlaufende Meßwertregistrierungen über einen Zeitraum von einer Stunde ausführbar

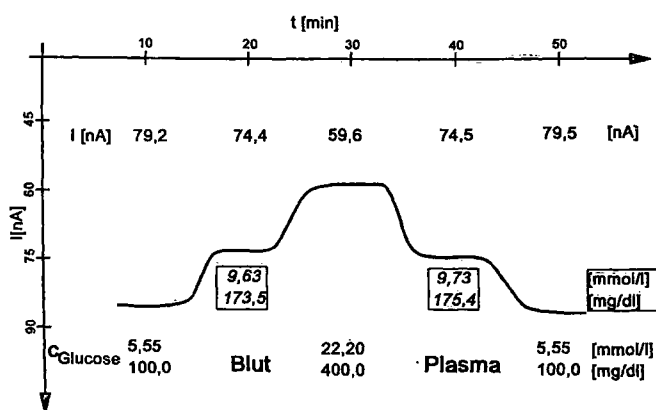


Abb. 5 Ausschnitt aus 6,5 Stunden kontinuierlicher Hämooanalytik der β -D-Glucose nach dem Prinzip der Zwischenträgeranalyse mit Oxigenatorpumpe und O_2 -sensitiv-enzymatischer Membrandurchflußelektrode (Membran SBC-1010). Umrahmt ist die jeweils aus Zweipunktkalibrierung errechnete Glucosekonzentration in Blut und dessen Plasma. Beachte die vernachlässigbaren Konzentrationsunterschiede bei dieser Analysen-Methode, hierüber werden wir separat berichten. Die den Glucosekonzentrationen zuzuordnenden Stromstärken sind jeweils oberhalb der Meßkurve aufgeführt.

sind. Abbildung 6 demonstriert im Vergleich zur Photometrie auch für den L-Lactat-Sensor mit O_2 -Detektor im Ergebnis die Verlässlichkeit der Messung von L-Milchsäure im ungerinnbaren NaF-versetzten Blut nach dem erläuterten Prinzip der Carrieranalyse. Da die Passagezeit des Blutes durch den miniaturisierten Dialysator nur wenige Sekunden beträgt, wird die Zeit zur Abtrennung des Analyten in den Trägerstrom extrem klein gehalten, eine Grundvoraussetzung zur exakten L-Lactat-Hämooanalytik.

Damit gestattet das bakterizid wirksame Glutardialdehyd durch ständige mikrobielle Wachstumshemmung im Carrierstrombereich des Analyten eine kontinuierliche und hochselektive O_2 -sensitiv-enzymatische Elektroanalyse von β -D-Glucose und L-Lactat des Blutes mit Biosensoren auf der Basis einer Zwischenträgeranalyse mit Oxigenatorpumpe.

Diskussion

Zweifellos liegt die Domäne der amperometrischen molekularselektiven Biosensoren in der kontinuierlichen Durchflußmessung, um Überwachungsfunktionen in der Regeltechnik zu übernehmen (20). Bei der fortlaufenden Prozeßkontrolle befinden sie sich in einer konkurrenzlosen Situation (20). Neben einem kleinen Probenvolumen ist zur Erfüllung dieser Aufgaben ein reagenzienfreies Arbeiten ohne Probenvorbereitung zu fordern. Die Ideallösung bei der Konzipierung bioelektrochemischer Sensoren verlangt die Verankerung der gesamten chemischen Information zur Erkennung und Bestimmung des

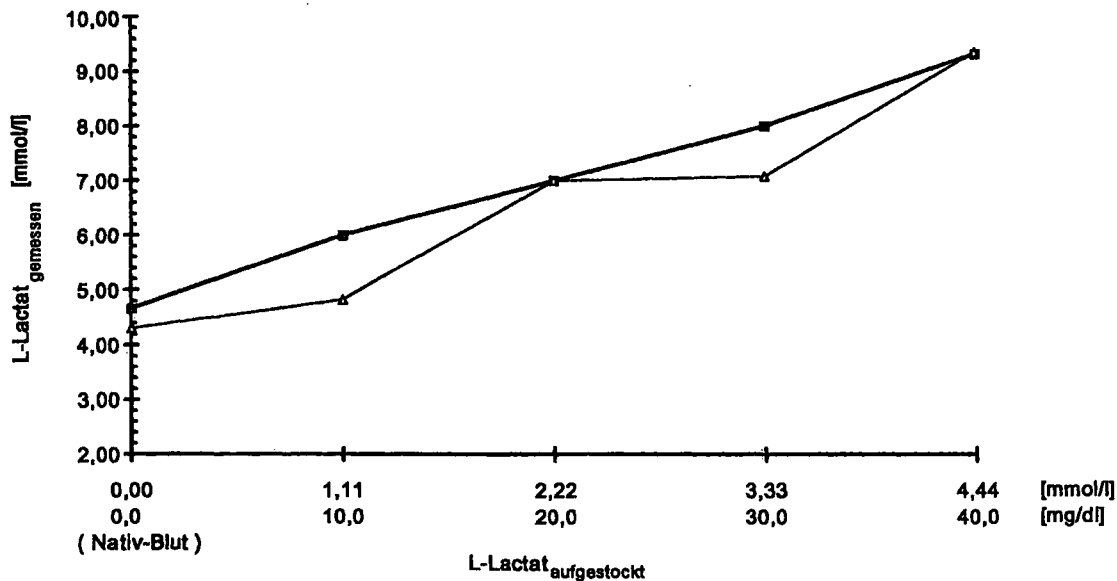


Abb. 6 Hämoanalytik des *L*-Lactats im Aufstockverfahren und Vergleich Biosensor/Photometer. Analysen im ungerinnbaren Nativ-Blut (links) und jeweils mit *L*-Lactat aufgestockten Teilproben. Photometrische Vergleichsmethode: *L*-Lactat-UV-Test zur enzymatischen Bestimmung von *L*-Milchsäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien der Firma Boehringer, Mannheim.

—■— Bioelektrochemisches Meßsystem aus Mikrodiälysat, Carrier, Oxigenatorpumpe und Sauerstoff-sensitiv-enzymatischer Durchflußelektrode mit Membran SBC-1212
 —△— Photometer: Enzymatischer UV-Test

Analyten in einem Membransystem. Besonderen anwendungsbedingten Gegebenheiten ist durch robuste Additivsysteme Rechnung zu tragen, um den Biosensoren einen an der Applikation orientierten permanent zuverlässigen Analysenbetrieb im adäquaten Milieu zu gestatten.

Substratspezifität der Enzymmembran und deren Inhibitoren prägen neben der Detektorquerempfindlichkeit das gesamte Profil der Molekularspezifität einer bioelektrochemischen Membranelektrode.

Gegenwärtig untersuchen wir bei einer Polarisationsspannung von 950 mV und einem pH-Wert von 7,04 zeitabhängig den Abfall bis zum Verschwinden der elektrokatalytischen Eigenschaften von Platin auf die direkte anodische Glucoseoxidation. Dieser an frisch polierten und mit Glucose-Oxidase-Membranen bedeckten Pt-Anoden zusätzlich ablaufende elektrochemische Prozeß steigert zwar hierüber den Meßstrom von Glucose-Sensoren bei Wasserstoffperoxid-detektion, mindert aber andererseits in extrem drastischer Weise die Selektivität entsprechender Platin-Elektroden mit *L*-Lactat-Oxidase-Membranen. Naturgemäß verlieren *L*-Lactat-Sensoren diese Art der Querempfindlichkeit, wenn wir für Glucose elektrokatalytisch inaktiv gewordene Platinanoden im Detektionssystem einsetzen. Gezielte Inaktivierungsmaßnahmen an Platinanoden für unerwünschte Reaktanden könnten daher eine weitere Möglichkeit für eine selektivere redoxmediatorfreie Elektroanalyse über H_2O_2 eröffnen.

Redoxmediatoren wie Berliner Blau, Benzochinon, Tetrathiafulvalen und dessen Derivate oder Errocene wirken bezüglich einer Reihe verschiedener Oxidasen in Enzymmembranen als Elektronentransmitter zu den Wasserstoffperoxid-Detektoren (21). Die immer wieder angeführte vorteilhafte Nutzung von Redoxmediatoren bei elektrochemischer Detektion über H_2O_2 gestattet zwar eine Messung mit abgesenkter Polarisationsspannung und mindert damit auch die Querempfindlichkeit gegenüber elektrochemisch aktiven Substanzen (21) wie Harnsäure oder Ascorbinsäure, eliminiert aber eben nicht sicher vollständig die anodischen Reaktandenquerempfindlichkeiten. Im Falle des Redoxmediators Benzochinon besteht sogar die Möglichkeit, den Sauerstoff bei der Glucosemessung im Blut (22) zu ersetzen. Aber es dürfte nicht dem Sinn und Zweck eines Biosensors entsprechen, mit toxischen Redoxmediatoren wie Benzochinon einen Beitrag zur Schadstoffhöhung in der Umwelt zu leisten. Ebenso unerwünscht ist der Anfall nach dem Meßvorgang zu entsorgender Chemikalien. Dieser Forderung kommen polymere Redoxmediatoren wie an *L*-Lysin-Polymere gebundenes Ferrocen nach, so daß die wasserlösliche makromolekulare redoxaktive Komponente als Elektronenmediator zwischen der Elektrodenoberfläche und der reduzierten Form der Glucose-Oxidase hinter einer semipermeablen Membran agieren kann (23). Der Elektronentransfer mit polymeren Ferrocenen gestaltete sich leider weniger effektiv an amperometrischen Glucosesensoren im Vergleich zu monomeren Mediatoren (24). Hierfür werden kleinere Diffu-

sionskoeffizienten oder pH-bedingte Einflüsse auf die Konformation polymerer Ferrocene diskutiert (24). Schließlich wurden aber auch auf potentiometrischer Basis funktionierende Enzymelektroden zur Messung von Lactat (25) und Glucose (26) beschrieben.

Da gleiche Glucose-Oxidase-Membranen an pO_2 -Elektroden mit Polytetrafluorethylen-Folien gegenüber H_2O_2 -Detektoren einen drastischen Anstieg in der Funktionsdauer aufwiesen, sehen wir in den elektrisch isolierenden Eigenschaften der PTFE-Folien zwischen Enzymmembran und messender Elektrolysezelle einen ursächlichen Zusammenhang gegeben. Deswegen ziehen wir für die eingeschränkte Funktionsdauer gleicher Enzymmembranen an H_2O_2 -Detektoren elektrophoretische Effekte unter dem Einfluß der angelegten Feldstärke von Pt-Anode und weiter entfernter Kathode auf die Ladungen tragenden immobilisierten Enzymproteine als diskussionswürdige Erklärung heran. Wie erwartet, kommt rechnerisch die bei der Elektrokatalyse an der Platinanode erzeugte geringe Joulesche Wärmemenge ursächlich für die beobachteten Unterschiede im Sinne einer Enzymdenaturierung nicht in Betracht.

Die ionenundurchlässige, aber gaspermeable PTFE-Folie zwischen der Enzymmembran und der Platinkathode des O_2 -Detektors stellt eine selektivitätssteigernde und zugleich isolierende und daher äußerst wirksame Diffusionsbarriere gegenüber nicht flüchtigen polarographisch aktiven Substanzen dar, so daß detektorbedingte Querempfindlichkeiten sich vorzugsweise auf grenzflächenaktive oder gasförmige, die Membran permeierende und kathodisch umsetzbare Substanzen wie beispielsweise die Halogenkohlenwasserstoffe Chloroform (Trichlormethan) (27) oder das Inhalationsnarkoticum Halothan (1,1,1-Trifluor-2-brom-2-chlor-ethan) beschränken (28).

Für die Antwortcharakteristika von Enzymelektroden mit Glucose-Oxidase und *L*-Lactat-Oxidase zur Messung von β -D-Glucose und *L*-Lactat sind Änderungen im Sauerstoffpartialdruck des Meßmediums bedeutungsvoll. Derartige Effekte werden auch weiterhin für implantierbare Glucose-Sensoren aktuell evaluiert und diskutiert (29). Unsere Lösung des Problems basiert für kontinuierliche Messungen im gerinnungsinaktivierten Blut auf einem Miniatur-Dialysator und einer den O_2 -sensitiv-enzymatischen Membranelektroden vorgeschalteten Oxigenatorpumpe zur Erzielung eines konstanten Sauerstoffpartialdruckes im Carrierstrom des Analyten (Abb. 4). Aufgrund des ständigen Walkens mit wellenförmiger Querschnittsänderung gaspermeabler Silikonpumpenschläuche kommt es auch in der Grenzzone Schlauchwandung/Carrierstrom zu einer permanenten Durchmischung, wodurch optimale Bedingungen zum Gasaustausch zwischen dem strömenden Medium und

der umgebenden Atmosphäre geschaffen werden (18). Eine Druckausgleichskammer vor dem Sensor fängt die Pulsationen der Oxigenatorpumpe auf die Enzymmembran ab (Abb. 4). Ein anderer Weg zur Realisierung einer unabhängigen Funktionsweise vom Sauerstoffpartialdruck des Meßmedium wurde für einen Glucose-Mikrosensor mit Glucose-Oxidase und H_2O_2 -Detektion über eine O_2 -Zufuhr durch den Schaft einer den Sensor umgebenden Glaskapillare eingeschlagen (30). Andererseits wurde zu subcutanen in Vivo-Messungen von Lactat an Ratten mit einem sog. Nadel-Sensor ein *L*-Lactat-Oxidase-freier Vergleichsdetektor herangezogen (31). Bei der Serumanalytik kommen wir der Forderung nach Konstanzhaltung von pO_2 und pH durch die Art der Probenvorbereitung mit einer Verdünnung durch Phosphatpuffer nach.

Die Art der Enzymimmobilisation übt einen maßgeblichen Einfluß auf verschiedene Kenndaten des Biosensors wie MeßwertEinstellung, Zuverlässigkeit und Funktionsdauer aus. Beim makroverkapselten Einschluß einer Enzymlösung zwischen zwei Dialysmembranen, wie er von Clark & Lyons erstmals als enzymatische Sensor-membran benutzt wurde (1), traten oftmals bei unseren Durchflußmessungen auch durch die dem Sensor nachgeschaltete Rollenpumpe pulsatil bedingte mechanische Instabilitäten auf. Die dabei im Rollenpumpenbetrieb hervorgerufenen flottierenden Membranbewegungen erzeugen dann wechselnde Schichtdicken des gelösten Biokatalysators mit entsprechenden Sensitivitätsschwankungen. Daher haben wir mit Glutardialdehyd eine kovalente Vernetzung der Enzymmoleküle zur Sicherung ihrer Ortsständigkeit vorgenommen. Der von Updike & Hicks eingesetzte sog. Gittertyp einer Enzymimmobilisierung durch Einschluß von Glucose-Oxidase in einem Polyacrylamidgel (32) kann Auswascheffekte des Enzyms nicht sicher vermeiden. Diesem auch von Harnstoffelektroden mit Urease-Polyacrylamid-Membranen her bekannten Phänomen begegneten Guilbault & Montalvo mit einer zusätzlich vorgeschalteten Cellophanmembran (33). Als weitere Matrices unter anderem zur Immobilisierung von Enzymen in Membransystemen für Biosensoren wurden Rinderalbumin (34), Collagen (35), Poly(*L*-leucin-co-N-benzyl-oxycarbonyl-*L*-Lysin) (36) oder Methacrylat-Copolymere (37) und PVC (26) benutzt (vgl. darüberhinaus hierzu auch l. c. (3-6)).

Eine herausragende Bedeutung in der funktionsstabilen und analytisch verlässlichen Applikation von Enzymelektroden in proteinhaltigen Medien kommt dem biologischen Phänomen des sog. „fouling“ zu. Im Verlaufe einer Hämoanalytik lassen sich an den Kanalwandungen und Elektrodenmembranen bioelektrochemischer Meßsysteme adsorptive Proteinablagerungen beobachten. Derartige Erscheinungen sind auch von Gefäßprothesen

bekannt und werden als Ablagerungen auf Membranen künstlicher Nieren beobachtet. Beim Initialvorgang dieser systemischen Veränderungen an den Phasengrenzflächen Blut/Kunststoffe spielen wahrscheinlich zwischenmolekulare *van-der-Waals*-Bindungskräfte eine Rolle (38). *Zaborsky* hat in einem ganz anderen Zusammenhang, nämlich der adsorptiven Immobilisation von Enzymproteinen, auf die Schwierigkeit hingewiesen, die der Adsorption zugrundeliegenden oft vielfältigen Mechanismen zu eruieren und dabei zwischen den verschiedenen Möglichkeiten wie Wasserstoffbrückenbindungen oder Wechselwirkungen von Ladungen und hydrophoben Bezirken zu differenzieren (39). Im Hinblick darauf wird der Einfluß von Ionenstärke und pH-Wert auf den Adsorptionsprozeß von Proteinen verständlich. In jedem Fall bilden die Proteinablagerungen einen guten Nährboden für Mikroorganismen an den Innenwandungen elektroanalytischer Meßsysteme. Mit zusätzlichen Nährstoffen aus Blut, Plasma oder Serum versorgt ist eine mikrobiell hervorgerufene Sauerstoffzehrung dann eine weitere Ursache für Fehlmessungen mit O₂-sensitiven enzymatischen Membranelektroden.

Daher bestand die Lösung des Problems in einer beidseitigen Verkapselung der kovalent quervernetzten Enzyme durch sterile Dialysemembranen, um einen mikrobiellen Enzymproteinabbau zu verhindern, mit der PTFE-Membran einer Passivation der metallischen Elektrodenoberfläche und/oder Fehlmessung durch unerwünschte Reaktanten aus dem Meßmedium vorzubeugen sowie durch das permanent im Carrierstrom mitgeführte Glutardialdehyd ein Wachstum von Mikroorganismen im gesamten bioelektrochemischen Meßsystem zu supprimieren. Glutardialdehyd ist dosisabhängig biosensorkompatibel, da es selbst als bifunktionelles Reagenz der Vernetzung der Enzymmoleküle bei der Membranherstellung dient. Immerhin wurden mit unseren Glucose-Oxidase-Membranen an O₂-Detektoren bereits Standzeiten im kontinuierlichen Durchflußbetrieb von 150 Tagen beobachtet.

Eine L-Lactat-Durchflußelektrode mit an einem Streifen aus Cellulosefasern adsorptiv immobilisierter Lactat-2-monooxygenase {Lactat-Oxidase (decarboxylierend) aus *Mycobacterium smegmatis*; L-Lactate : oxygen 2-oxido-reductase (decarboxylating), EC 1.13.12.4} haben wir bereits 1981 in l. c. (40) beschrieben.

Literatur

- Clark, L. C., Jr. & Lyons, C. (1962) Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102, 29–45.
- Heyrovský, J. (1960) *Polarographisches Praktikum*. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- Schindler, J. G. & Schindler, M. M. (1983) *Bioelektrochemische Membranelektroden*. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Janata, J. (1990) Chemical sensors. *Anal. Chem.* 62, 33R–44R.
- Janata, J. (1992) Chemical sensors. *Anal. Chem.* 64, 196R–219R.
- Trojanowicz, M. (1993) Enhancement of selectivity of electrochemical biosensing for clinical analysis and biotechnology. *Bioforum* 16, 408–413.
- Schindler, J. G., Dennhardt, R. & Simon, W. (1977) Kontinuierliche ionenselektive und elektrochemisch-enzymatische Direktmessung am Menschen. Hämoanalyse von Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺ und β-D-Glucose. *Chimia* 31, 404–407.
- Schindler, J. G., Stork, G., Dennhardt, R., Schäl, W., Braun, H.-E., Karaschinski, K.-D. & Schmid, W. (1979) Kontinuierliche intraoperative Meßwertregistrierung von Na⁺, K⁺ und Ca⁺⁺ mit Carrier-Membran-Disk-Elektroden. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17, 573–580.
- Schindler, J. G., Schindler, M. M., Herna, K., Reisinger, E., Kuhlmann, U., Gräf, R. & Lange, H. (1991) Ionenselektiver Elektroanalysator mit tubulären Festkontakt-Durchflußsensoren für die kontinuierlich bioelektrochemisch kontrollierte Hämodialyse von K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Cl⁻ und pH. *Biomed. Technik* 36, 271–284.
- Kuhlmann, U., Gräf, R., Schindler, J. G. & Lange, H. (1992) Continuous ionography (CIG) in haemodialysis by ion-selective carrier membrane electrodes (ISCME) with solid cement contact for flow-through measurement. *Int. J. Artif. Organs* 15, 209–212.
- Schindler, J. G., Schindler, M. M., Herna, K., Kuhlmann, U., Knaack, J. & Lange, H. (1993) Harnstoff-Biosensor zur Prozeßkontrolle an der künstlichen Niere. *Biomed. Technik* 38, 118–119.
- Schindler, J. G., Schindler, M. M., Herna, K., Reisinger, E., Burk, B., Kuhlmann, U., Knaack, J., Schmidt, B. & Lange, H. (1994) Harnstoff-Durchflußsensor zur ammoniumselektiv-enzymatischen Prozeßkontrolle der Künstlichen Niere. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 32, 145–152.
- Schindler, J. G., Riemann, W., Sailer, D., Berg, G. & Schäl, W. (1977) Ein Durchflußmeßsystem zur O₂-sensitiv-enzymatischen Glucose-Analyse. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 15, 709–713.
- Hamann, K. H. (1967) Austauschstromdichten und Reaktionsmechanismen der Sauerstoffelektrode. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 71, 612–619.
- Kortüm, G. unter Mitarbeit von Braun, W. (1972) *Lehrbuch der Elektrochemie*. Verlag Chemie Weinheim/Bergstr.
- Koryta, J., Dvořák, J. & Boháčková, V. (1975) *Lehrbuch der Elektrochemie*. Springer-Verlag, Wien, New York.
- Zirngiebl, E. (1993) *Einführung in die Angewandte Elektrochemie*. Otto Salle Verlag, Frankfurt am Main und Verlag Sauerländer, Aarau, Frankfurt am Main, Salzburg.
- Schindler, J. G. & Schäl, W. (1977) Vorrichtung zum Gasaustausch zwischen einem strömenden Medium und einer äußeren Atmosphäre. Deutsche Patentschrift DE 27 37 920 C2. Prioritätsdatum 23. 8. 1977.
- Neumüller, O.-A. (1981) *Römpps Chemie-Lexikon*. Bd. 2. Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart.
- Schindler, J. G. (1992) High-Tech: Bio- und Chemosensoren. Informationsschrift der Philipps-Universität Marburg.
- Wilke, D. & Müller, H. (1992) Der Einsatz von Redoxmediatoren in Enzymelektroden. *Bioforum* 11, 402–406.
- Williams, D. L., Doig, A. R., Jr. & Korosi, A. (1970) Electrochemical-enzymatic analysis of blood glucose and lactate. *Anal. Chem.* 42, 118–121.
- Iijima, S., Mizutani, F., Yabuki, S., Tanaka, Y., Asai, M., Katsura, T., Hosaka, S. & Ibonai, M. (1993) Ferrocene-attached

- L-lysine polymers as mediators for glucose-sensing electrodes. *Anal. Chim. Acta* 281, 483–487.
24. Hendry, S. P., Cardosi, M. F., Turner, A. P. F. & Neuse, E. W. (1993) Polyferrocenes as mediators in amperometric biosensors for glucose. *Anal. Chim. Acta* 281, 453–459.
 25. Shinbo, T., Sugiura, M. & Kamo, N. (1979) Potentiometric enzyme electrode for lactate. *Anal. Chem.* 51, 100–104.
 26. Abdulla, H. M., Greenway, G. M., Platt, A. E. & Fielden, P. R. (1989) Biosensing with coated-wire electrodes. Part 1. Glucose sensors *Analyst* 114, 785–788.
 27. Stracke, W. zit. nach Stackelberg, von, M. (1950) *Polarographische Arbeitsmethoden*. Walter de Gruyter & Co., Berlin.
 28. Severinghaus, J. W., Weiskopf, R. B., Nishimura, M. & Bradley, A. F. (1971) Oxygen electrode errors due to polarographic reduction of halothane. *J. Appl. Physiol.* 31, 640–642.
 29. Zhang, Y., & Wilson, G. S. (1993) In vitro and in vivo evaluation of oxygen effects on a glucose oxidase based implantable glucose sensor. *Anal. Chim. Acta* 281, 513–520.
 30. Cronenberg, C., van Groen, B., de Beer, D. & van den Heuvel, H. (1991) Oxygen-independent glucose microsensor based on glucose oxidase. *Anal. Chim. Acta* 242, 275–278.
 31. Hu, Y., Zhang, Y. & Wilson, G. S. (1993) A needle-type enzyme-based lactate sensor for in vivo monitoring. *Anal. Chim. Acta* 281, 503–511.
 32. Updike, S. J. & Hicks, G. P. (1967) The enzyme electrode. *Nature* 214, 986–988.
 33. Guilbault, G. G. & Montalvo, J. G., Jr. (1969) An improved urea specific enzyme electrode. *Anal. Lett.* 2, 283–293.
 34. Tran-Minh, C. & Broun, G. (1975) Construction and study of electrodes using cross-linked enzymes. *Anal. Chem.* 47, 1359–1364.
 35. Aizawa, M. & Suzuki, S. (1976) Specific-reactive membranes: Electrochemical preparation of enzyme membranes and its applications to electrochemical sensors. *Denki Kagaku* 44, 279–284.
 36. Higuchi, A. & Nakagawa, T. (1990) Recognition of substrates by immobilized bienzyme membranes. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 63, 3209–3215.
 37. Hall, C. E. & Hall, E. A. H. (1993) Covalent immobilisation of glucose oxidase on methacrylate copolymers for use in an amperometric glucose sensor. *Anal. Chim. Acta* 281, 645–653.
 38. Mattson, J. S. & Jones, T. T. (1976) Infrared spectrophotometric observations of the adsorption of fibrinogen from solution at optically transparent carbon film electrode surfaces. *Anal. Chem.* 48, 2164–2167.
 39. Zaborsky, O. R. (1977) Immobilization of enzymes by adsorption. In: *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins* (Chang, T. M. S., ed.) Vol. 1. Plenum Press, New York, London, pp. 37–46.
 40. Schindler, J. G. & v. Gülich, M. (1981) L-Lactat-Durchflußelektrode mit immobilisierter Lactat-Oxidase. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 308, 434–436.

Prof. Dr. J. G. Schindler
Institut für Normale u. Pathol. Physiologie
Projekt: Bioelektrochemische Sensorik
Philipps-Universität
Karl-von-Frisch-Straße 1
D-35033 Marburg/Lahn
Germany