

Kurze Mitteilungen

Maximalumfang: 6 Schreibmaschinenseiten (alles inbegriffen). Bis zum 10. des Monats bei der Redaktion eingehende Manuskripte können günstigenfalls am 15. des folgenden Monats veröffentlicht werden.

Kontinuierliche ionenselektive und elektrochemisch-enzymatische Direktmessung am Menschen

Hämoanalyse von Na^+ , K^+ , Ca^{++} und β -D-Glucose*

J. G. Schindler, R. Dennhardt, W. Simon**

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

Anästhesie-Zentrum, Philipps-Universität Marburg/Lahn

Laboratorium für Organische Chemie, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich

Abstract

An electrochemical flow-through system allows a continuous measuring of Na^+ , K^+ , Ca^{++} and glucose-concentrations in the streaming blood of patients. For this bedside-analyser electrochemical sensors and reference junction are exchangeable, the total construction being organized as a building block system. Active phases for ion-selective disc-electrodes such as carrier antibiotics and synthetic neutral carriers are used. The continuous measuring of Na^+ , K^+ , Ca^{++} and glucose during and after intravenous glucose infusion is demonstrated.

Einleitung

Die in der klinisch-chemischen Analytik vorherrschende Messwertgewinnung ist durch aufwendige Probenvorbereitung bisheriger Bestimmungsverfahren gekennzeichnet. Zumindest für den Bereich der Intensivmedizin wird zunehmend die Forderung nach fortlaufender, trägheitsarmer Analytik in Analogie zu den eingeführten und bewährten kontinuierlichen Kontrollen physiologischer Messdaten wie EKG, Puls, Blutdruck, Temperatur sowie Atmung gestellt. Auf diese Weise könnte auch die zeitliche Verzögerung zwischen diagnostischer Messwerterfassung und anschliessender Therapie verkürzt werden. Nicht zuletzt lassen sich physiologische Regulationsvorgänge und deren pathologische Modifikationen nur durch dynamische Messungen zufriedenstellend erfassen. Kontinuierliche Direktanalysen wichtiger Messgrößen im strömenden Blut scheiterten bisher an methodischen Problemen. Elektrochemische Sensoren erfüllen auf Grund ihrer geringen Baugröße und trägheitsarmen reagentienlosen Funktionsweise die an «bedside-analysers» gestellten Forderungen [1]. Neben der kontinuierlichen Messwerterfassung erscheint es möglich, derartige

Messeinrichtungen in einen Regelkreis zur gesteuerten Therapie zu integrieren [1].

Durch die Entwicklung von elektrochemischen Mehrfach-Durchflusssystemen mit in Reihe geschalteten Sensoren [1, 2, 3], die Verwendung der Träger-Antibiotika Valinomycin und Nonactin als aktive Phasen in ionenselektiven Kunststoffen [1, 2, 3, 4, 5, 6] sowie die auf der Basis von Modellberechnungen

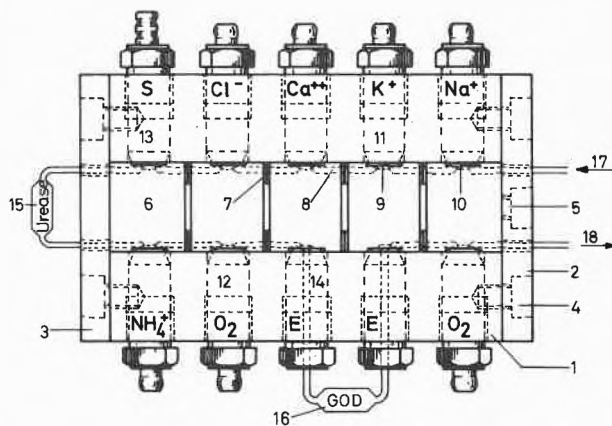
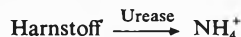
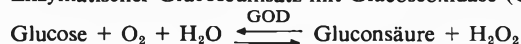


Abb. 1: Elektrochemischer Durchflussanalysator für Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Cl^- , Harnstoff und β -D-Glucose

- 1 Metallrahmen
- 2 Andruckplatte
- 3 Gegendruckplatte
- 4 Befestigungsschrauben
- 5 Andruckschraube
- 6 Parallelepipedischer Isolierkörper
- 7 Dichtflächen
- 8 Radiale Zu- und Abflusskanäle der Messkammer
- 9 Wannenförmig abgeflachte Messkammer (1 μ l)
- 10 Selektive Kunststoffmembran des Messfühlers
- 11 Ionenselektive Disk-Elektrode
- 12 pO_2 -Sensor
- 13 Stromschlüsselkontaktstecker
- 14 Enzymkontaktstecker (E)
- 15 Enzymatische Harnstoffsplaltung mit Urease



- 16 Enzymatischer Glucoseumsatz mit Glucoseoxidase (GOD)



- 17 Zufluss
- 18 Ablauf

* Erhalten mit Poststempel 4. September 1977

** Anschrift der Verfasser:

Dr. Dr. J. G. Schindler, Medizinisches Zentrum für Theoretische Medizin, Institut für Angewandte Physiologie, der Philipps-Universität, Lahnberge, D-3550 Marburg/Lahn

Prof. Dr. R. Dennhardt, Anästhesie-Zentrum, der Philipps-Universität, Robert-Koch-Strasse 8, D-3550 Marburg/Lahn

Prof. Dr. W. Simon, Laboratorium für Organische Chemie, Eidgenössische Technische Hochschule, Universitätsstrasse 16, CH-8006 Zürich

[7] erfolgte Synthese [8] elektrisch-neutraler Kationen-Carrier [5] vom Typ der Dioxakorksäure- und Dioxazelainsäurediamide stehen leistungsfähige, ionenselektive Messsysteme für die Hämoanalyse zur Verfügung (Abb. 1).

Messsystem

Disk-Elektroden (Abb. 2, I) mit acrylglasummantelten Pt-Drahtstirnflächenkontakten [1, 3, 9] zu ausgewählten Membransystemen [5] hinreichender Selektivität für Na^+ , K^+ und Ca^{++} wurden in einer verkleinerten Version des elektrochemischen Multimesssystems zur Analyse strömender Flüssigkeiten und Gase [3] bei klinisch-physiologischen Untersuchungen eingesetzt. Die Messfühler werden mit einem Drehmomentschlüssel dichtend gegen die Berandung der $1\ \mu\text{l}$ fassenden Durchflussskammern angezogen, die über radiale Kanäle in parallelepipedischen Isolierkörpern angeströmt werden. Die Stabilität elektrolytischer Membrankontakter liegt im Bereich von $0,03\ \text{mV}$ [2], metallischer Festkontakte bei $0,1\ \text{mV}$ [3], dessen vorteilhafte Ausgestaltung in einer weitgehenden Druckunabhängigkeit liegt [1, 3, 9, 10].

Die ionenselektive Multimesskette wird unter Einführung eines auswechselbaren Stromschlüsselkontaktsteckers (Abb. 2, III) mit einem mikrogekerbten PTFE-Stopfen für die Ag/AgCl -Referenz-Elektrode ($3\ \text{M KCl}$) komplettiert; Bezugs-elektrode und Metallrahmen des Messsystems mit Abschirmungsaufgaben gegenüber elektrostatischen Einflüssen benutzen gemeinsam die Masse des Elektrodenkabels.

Die fortlaufende O_2 -sensitiv-enzymatische Durchflussmessung von β -D-Glucose mit zwei $p\text{O}_2$ -Sensoren erlaubt eine aus anderen Gründen als der hochspezifischen Enzymreaktion resultierende Partialdruckänderung des Sauerstoffes im Messgut mit der ersten $p\text{O}_2$ -Elektrode zu erkennen, während mit der zweiten der Sauerstoffverbrauch nach Zupumpen löslicher Glucoseoxidase (GOD) bei konstanten Enzym-Reaktorzeiten nach partiellem β -D-Glucoseumsatz zu Glucosäure gemessen wird [11]. Immobilisierte GOD stellt eine wirtschaftlichere Alternative dar [12]. In dieser Hinsicht verdienen auch Schlauchreaktoren mit wandständig fixierten Enzymen besonderes Interesse [13, 14]. In die Reihe O_2 -sensitiv-enzymatischer Messungen lassen sich unter anderem auch die Bestimmung von Harnsäure und Cholesterin einordnen [1]. Die leckstromsicher bei ca. 395°C aufgeschweissten PTFE-Membranen dieser Sensoren (Abb. 2, II) tragen erheblich zu ihrer Betriebssicherheit bei [1, 11].

NH_4^+ -selektiv-enzymatische patientendirekte Harnstoffmessungen sind in Vorbereitung. Dabei kann durch Harnstoffspaltung mit löslicher Urease die hohe Querempfindlichkeit des Carrier-Antibiotikums Nonactin für Kalium auch bei niedrigem Harnstoffspiegel ausreichend kompensiert werden [6].

Über ein Kathetersystem mit extrakorporaler, intravasaler Heparinisierung wurde den Patienten mittels

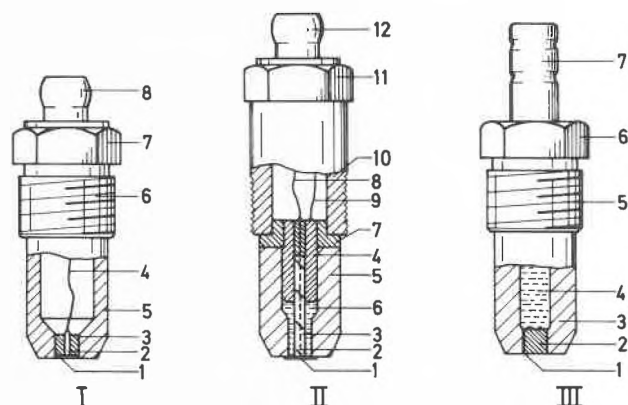


Abb. 2: Sensoren und Stromschlüsselkontakt-Stecker

I	II	III
Ionenselektive Disk-Elektrode	$p\text{O}_2$ -Sensor	Stromschlüsselkontakt-Stecker
1 Ionenselektive Kunststoff-Membran	Leckstromsicher verschweisste PTFE-Membran	Stromschlüsselkontaktzone
2 Pt-Draht	Pt-Kathode	PTFE-Stopfen mit Mikrokerbe
3 Acrylglas-Mantel	Glasmantel	Acrylglas- oder PTFE-Wandung
4 Versilberte, PTFE-isolierte Cu-Litze	Ag-Anode	Bezugslösung ($3\ \text{M KCl}$)
5 Elektrodenkörper	Abnehmbare PTFE-Kappe mit Membran	Gewinde
6 Gewinde	Innenlösung ($0,2\ \text{M KCl}$)	Sechskant (SW 8)
7 Sechskant	Abschlussplatte	Schlauchansatz
8 Steckkontakt	Litze (I, 4)	
9	Litze (I, 4)	
10	Gewinde	
11	Sechskant	
12	Steckkontakt	

Rollenpumpe kontinuierlich Blut entnommen und der Dialysekammer über ein mit Sperrvorrichtungen versehenes Schlauchsystem (Abb. 3, 1) zugeführt, so dass jederzeit Zwischeneichnungen vorgenommen werden können.

In die kompakte, kassettenförmige Bauform des Gesamtsystems (Abb. 3, 2) ist ein austauschbarer Spiraldialysator (Abb. 3, 3) mit Sterilfiltrationseigenschaften zur Abtrennung des Blutkreislaufes von der Analysenstrecke einbezogen. Dadurch wird eine Funktionsbeeinträchtigung der Sensoren auf Grund einer Proteinkontamination vermieden, und die unklare Toxikologie der verschiedenen Membrankomponenten ionenselektiver Kunststoffe bedarf keiner Klärung. Die Grundsätze der Sterilität auf der Blutseite bei Rückführung des Blutes bleiben gewahrt; dann allerdings müssen alle Teile des in Abb. 3, 1 dargestellten Messaufbaues von 1–17 steril gehalten werden. Die Antikoagulantienwirkung von Heparin lässt sich vor Reinfundierung mit

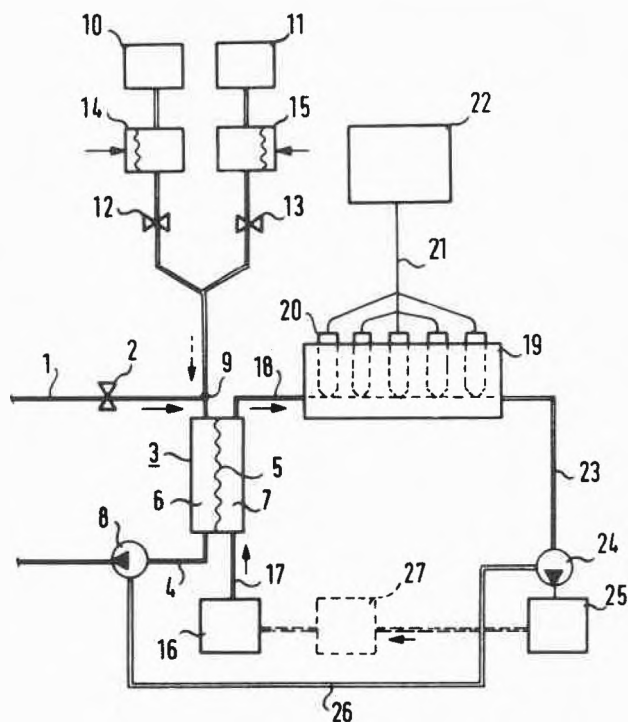


Abb. 3.1: Schema der elektrochemischen Zwischenträgeranalyse Extrakorporaler Blutkreislauf mit Zu- (1) und Abfluss (4) sowie Abklemmvorrichtung (2)

Dialysator (3) mit Sterilfiltrationsmembran (5) zur Abtrennung von Blut- (6) und Analysenseite (7) sowie mechanisch gekoppelten (26) Pumpen (8, 24)

Eichsystem mit Absperrorganen (12, 13), Eichlösungen (10, 11), Gasaustauschern (14, 15) und Einmündung auf der Blutseite (9) zwecks Miteineichung der Dialysemembraneigenschaften Zwischenträgerstrecke (17, 18, 23) mit Vorratsbehälter (16) und Auffanggefäß (25) sowie eventueller Einföhrung einer Aufbereitungspatrone (27)

Elektrochemischer Durchflussanalysator (19) mit Sensoren (20), Kabelföhrung (21) und Auswertsystem (22)

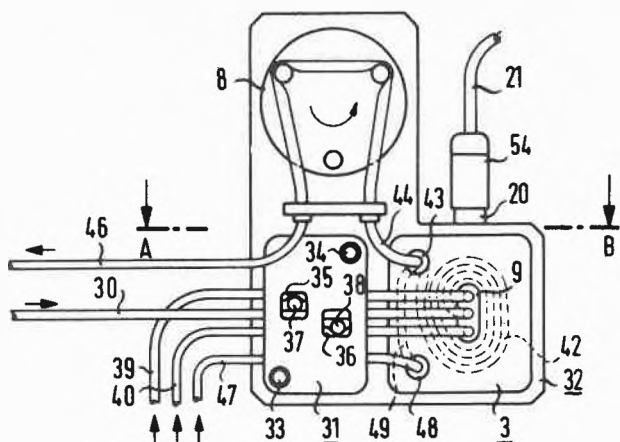


Abb. 3.2: Spiraldialysator mit mechanisch gekoppeltem Pumpsystem und Sperrvorrichtungen zur Zwischeneichung

Spiraldialysator (3) mit Kanälen (42), Anschluss (9) für Messgut (30) und Schlauchleitungen der Eichlösungen (39, 40)

Analystenstrecke mit Anschluss (48), Kanalstück (49) und Trägerflüssigkeit (47) für elektrochemische Sensoren (20) mit Steckkontakten (54) und Kabel (21)

Absperrorgane mit Klemmstiften (37, 38) und Widerlagern (35, 36) zur Steuerung der Messgut- und Eichlösungszuföhr in gemeinsamer Schlauchhalterung (31) mit Zentrierungen (33, 34)

Blutpumpe (8) mit Schlauch (44), Dialysatoranschluss (43) und Abfluss (46)

Kassettenförmiges, gemeinsames Grundgestell (32)

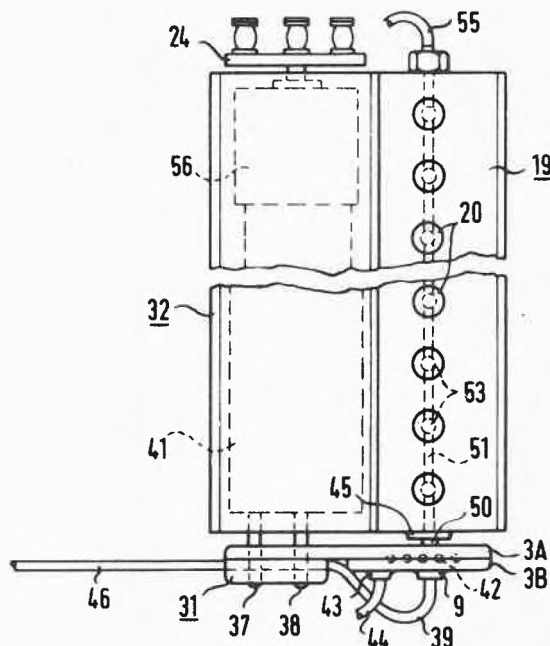


Abb. 3.3: Schnitt nach Linie A-B in Abb. 3.2

Elektrochemischer Durchflussanalysator (19) mit Sensoren (20) in Buchsen (53) zur Kanalbohrung (51) mit Anschlussstutzen (45) und Abfluss (55)

Pumpensystem aus Antriebsaggregat (56) und Getriebewelle (41) sowie mechanisch gekoppelten Rollenpumpen (8, 24) auf gemeinsamem Grundgestell (32)

Auswechselbarer Dialysator als steriler Einmalartikel mit Spiralkanal (42), Blutseite (3B) und Analysenseite (3A), Anschlussstücken (9, 43, 45), Schläuchen (39, 44, 46) und deren Halterung (31) mit Absperrorganen (37, 38)

Protaminchlorid in bekannter Weise antagonisieren. Durch den Relais-gesteuerten Eichvorgang (Abb. 3, 4) werden die Eichlösungen ebenfalls der Blutseite des Dialysators zugeföhr und die Austauschigenschaften der Membran berücksichtigt.

Resultate

Das Verfahren ist wenig patientenbelastend; es erlaubt, gleiche Messsysteme bei verschiedenen Probanden einzusetzen. In Abb. 4 sind bei einem Probanden, bei dem alle blutchemischen Parameter im Normbereich lagen, fortlaufende Registrierungen von Na^+ , K^+ und Ca^{++} vor, während und nach einer Infusion einer 10%igen Traubenzuckerlösung (500 ml) dargestellt; gleichzeitig erfolgte eine kontinuierliche O_2 -sensitiv-enzymatische Messung der Blutglucose. Für das bei diesem Versuch verwandte Messsystem betragen die Ansprechzeiten unter Einbeziehung des verkleinerungsfähigen Totraumes – Schlauchsysteme und Dialysekammer – für Elektrolyte ca. 30 s, für Glucose ca. 240 s. Der Infusionszeitraum ist durch Pfeile markiert. Dem Anstieg der Glucosekonzentration auf Werte von 13,6 mmol/l

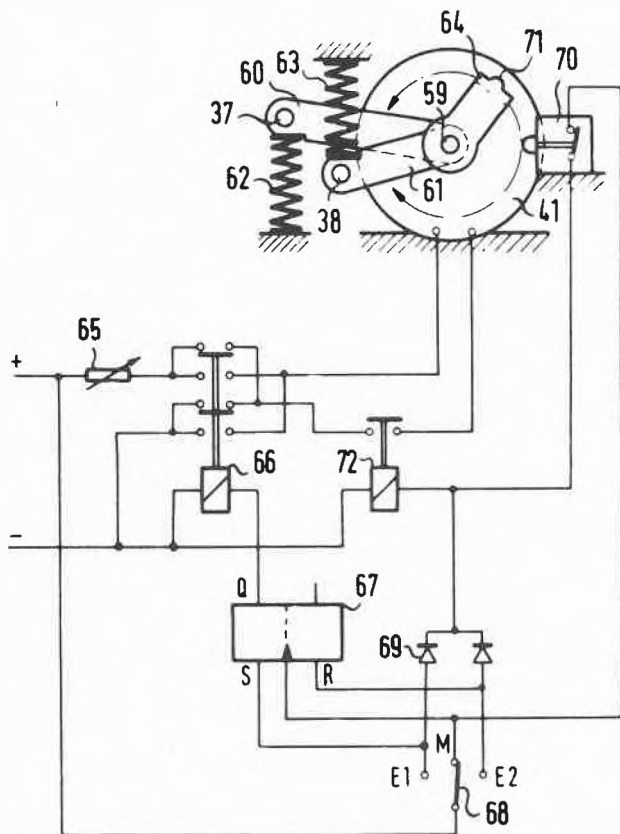


Abb. 3.4: Steuerung für die Absperrorgane aus Klemmstiften (37, 38), Druckfedern (62, 63), Hebelarmen (60, 61), Drehachse (59), Getriebewelle (41), Nocken (71) des Hebels (64). Elektrische Steuerung mit Mikroschalter (70), Relais (66, 72), Flipflop (67) und dessen Ausgang Q, Steuerschalter (68), Diode (69), Widerstand (65). Steuerschalterstellungen für Eichflüssigkeiten (E_1 , E_2) und Messlösung (M)

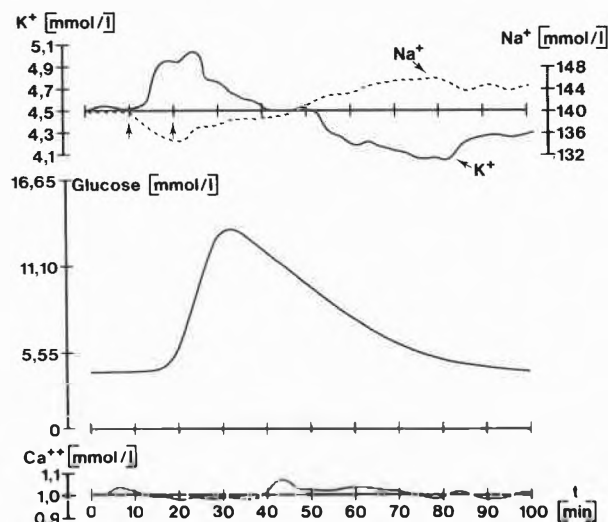


Abb. 4: Kontinuierliche elektrochemische Hämoanalyse des Menschen von Na^+ , K^+ , Ca^{++} und β -D-Glucose; die beiden Pfeile markieren den Infusionszeitraum für 500 ml einer 10%igen Traubenzuckerlösung. Die Eichung wurde mit in ihrer Zusammensetzung dem Blut vergleichbaren glucosehaltigen Elektrolytlösungen durchgeführt. Dabei erfolgte die Signalauswertung auf Grund einer Korrelation der Messgrößen mit den Konzentrationen der untersuchten Komponenten.

folgt ein exponentieller Abfall als Ausdruck der Regulation der Hyperglycämie durch das in den B-Zellen des endokrinen Pankreas gebildeten Insulins.

Dem kurzfristigen Anstieg des Kaliumpegels, der durch osmotische und/oder pH-Veränderungen bedingt sein kann, folgt ein allmählicher Abfall; dieser ist durch den mit der intrazellulären Glucose-Aufnahme gekoppelten Kalium-Einstrom bedingt.

Das im unteren Teil der Abbildung dargestellte freie Calcium demonstriert die Messwertstabilität des Gesamtsystems; das ionisierte Calcium des Blutes wird offensichtlich durch Parathormon und Thyreocalcintonin straff reguliert [15].

Das dargestellte Beispiel einer fortlaufenden, elektrochemischen Hämoanalyse des Menschen zeigt unseres Erachtens, welche grundsätzliche Bedeutung derartigen dynamischen Messungen zukommt.

Literaturverzeichnis

- 1 J.G. Schindler und W. Riemann: Elektrochemische Multi-messsysteme 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. 1977.
- 2 H. F. Osswald, R. E. Dohner, T. Meier, P. C. Meier und W. Simon: *Chimia 31* (1977) 50.
- 3 J.G. Schindler: *Biomed. Techn.*, im Druck.
- 4 W. Simon, W. E. Morf und P. Ch. Meier: Specificity for Alkali and Alkaline Earth Cations of Synthetic and Natural Organic Complexing Agents in Membranes. In: *Structure and Bonding*, ed.: J. D. Dunitz, P. Hemmerich, J. A. Ibers, C. K. Jørgensen, J. B. Neilands, D. Reinen, R. J. P. Williams: Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 16 (1973) 113.
- 5 D. Ammann, R. Bissig, Z. Cimerman, U. Fiedler, M. Güggi, W. E. Morf, M. Oehme, H. Osswald, E. Pretsch und W. Simon: Synthetic Neutral Carriers for Cations. In: M. Kessler, L. C. Clark, D. W. Lübbers, I. A. Silver, W. Simon: *Ion and Enzyme Electrodes in Biology and Medicine*. Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien 1976, 22.
- 6 J.G. Schindler, R. G. Schindler und O. Aziz: In Vorbereitung.
- 7 W. E. Morf und W. Simon: *Helv. Chim. Acta* 54 (1971), 2683.
- 8 D. Ammann, E. Pretsch und W. Simon: *Helv. Chim. Acta* 56 (1973) 1780.
- 9 J. G. Schindler und W. Riemann: *Biomed. Techn.* 20 (1975) 75.
- 10 Ch. Rohrbach, G. Andreae, A. Becker, H. Bothe, N. Czaika, H. H. Emschermann, W. Markowski, W. Strogies und G. Wagner: *Handbuch für elektrisches Messen mechanischer Größen*. VDI-Verlag GmbH, Düsseldorf 1967, 221.
- 11 J. G. Schindler, W. Riemann, D. Sailer, G. Berg und W. Schäl: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, im Druck.
- 12 M. Nelboeck und D. Jaworek: *Chimia* 29 (1975), 109.
- 13 H. Filippusson, W. E. Hornby und A. McDonald: *FEBS Letters* 20 (1972) 291.
- 14 D. L. Morris, J. Campbell und W. E. Hornby: *Biochem. J.* 147 (1975) 593.
- 15 H. G. Haas: Parathyreoidea. In: W. Siegenthaler: *Klinische Pathophysiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2. Aufl. 1973, 306.