DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) **Wirtschaftspatent**

(19) **DD** (11) **277 759 A1**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) **G 01 N 27/30**

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP G 01 N / 322 660 4	(22)	03.12.88	(44)	11.04.90

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 108C, DD
(72) Scheller, Frieder, Prof. Dr. habil. Dipl.-Chem.; Hintsche, Rainer, Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Dittrich, Frank, Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Seyer, Ingrid, DD

(54) Enzymelektrode zur spezifischen reagenzlosen Bestimmung von Stoffwechselprodukten

(55) Enzymelektrode, Stoffwechselprodukte, klinische Diagnostik, mikrobiologische Industrie, Enzym, Kohleelektrode, Redoxmediator, Benzochinon, Glucoseoxidase, Lactatoxidase, Cholinoxidase, Cholesteroloxidase

(57) Die Erfindung betrifft eine Enzymelektrode zur spezifischen reagenzlosen Bestimmung von Stoffwechselprodukten. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die klinische Diagnostik und die mikrobiologische Industrie. Die erfindungsgemäße Enzymelektrode, bei der das Enzym an einer Kohleelektrode adsorbiert oder kovalent fixiert ist, ist dadurch gekennzeichnet, daß entweder die Molekülоberfläche des Enzyms oder die Elektrodenoberfläche mit einem Redoxmediator beladen ist. Bevorzugte Redoxmediatoren sind Benzochinon und dessen Derivate, als Enzyme werden bevorzugt Glucoseoxidase, Lactatoxidase, Cholinoxidase oder Cholesteroloxidase eingesetzt.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Patentansprüche:

1. Enzymelektrode zur spezifischen reagenzlosen Bestimmung von Stoffwechselprodukten, bei der das Enzym an einer Kohleelektrode adsorbiert oder kovalent fixiert ist, **dadurch gekennzeichnet,** daß entweder die Moleküloberfläche des Enzyms oder die Elektrodenoberfläche mit einem Redoxmediator beladen ist.
2. Enzymelektrode nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß als Redoxmediator Benzochinon und dessen Derivate eingesetzt werden.
3. Enzymelektrode nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß als Enzyme Glucoseoxidase, Lactatoxidase, Cholinoxidase, Cholesteroloxidase verwendet werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf eine Enzymelektrode zur spezifischen reagenzlosen Bestimmung von Stoffwechselprodukten. Anwendungsgebiet der Erfindung sind die klinische Diagnostik und die mikrobiologische Industrie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Um eine hohe Spezifität bei der Messung mit Enzymelektroden zu erreichen, ist es zweckmäßig, daß die Indikatorelektrode bei einem möglichst geringen Potential arbeitet. Nur so wird erreicht, daß elektrodenaktive Bestandteile der Meßprobe nicht an der Indikatorelektrode kooxidiert werden (Palleschi et al, Anal. Biochem. 159, 114, 1986).
Durch die Verwendung von künstlichen Elektronenüberträgern anstelle des natürlichen Kosubstrats Sauerstoff wurde erreicht, daß bei einem erheblich niedrigeren Elektrodenpotential als bei der Anzeige der H_2O_2-Bildung (+500 bis +900 mV) gearbeitet werden kann, z. B. im Falle der Glucoseoxidase bei Ferrocenverbindungen bei +350 mV, bei Benzochinon bei +100 mV (Schläpfer et al. Clin. Chim Acta 57, 283, 1974; Frew und Hill, Anal. Chem. 59, 933 A, 1978; Cass et al. Anal. Chem. 56, 667, 1984; Geppert und Asperger, Bioelectrochem. 17, 399, 1978).
Dieses Verfahren hat jedoch den Nachteil, daß dabei die elektrochemischen Interferenzen nur teilweise ausgeschaltet werden.
Das führt zu Meßwertverfälschungen beim Einsatz der Enzymelektroden in der Praxis.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Ausschaltung von Interferenzen bei der reagenzlosen Messung von Stoffwechselprodukten mit Enzymelektroden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die erfindungsgemäße Enzymelektrode zur spezifischen reagenzlosen Bestimmung von Stoffwechselprodukten ist dadurch gekennzeichnet, daß entweder die Moleküloberfläche des Enzyms oder die Elektrodenoberfläche mit einem Redoxmediator beladen ist. Als Redoxmediatoren werden bevorzugt Benzochinon oder dessen Derivate eingesetzt.
Die Bindung der Mediatoren an das Enzym, z. B. an Glucoseoxidase, Lactatoxidase, Cholinoxidase oder Cholesteroloxidase, erfolgt gemäß der Erfindung kovalent. Die Bindung an die Elektrodenoberfläche erfolgt bevorzugt absorptiv.
Durch diese Bindung wird überraschenderweise erreicht, daß ein schneller Elektronentransfer zwischen der redoxaktiven (prosthetischen) Gruppe des Enzyms und der Elektrode stattfindet. Der gleiche Effekt wird auch erreicht, wenn das unmodifizierte Enzym an die Oberfläche einer Kohleelektrode, die mit Benzochinon beladen ist, absorbiert wird.
Die Enzymelektrode gemäß der Erfindung ermöglicht, daß der Grenzstrom bei 100–200 mV oberhalb des Redoxpotentials der prosthetischen Gruppe analytisch ausgenutzt werden kann, z. B. bei Glucoseoxidase bei −200 mV.
Gegenüber den bisher bekannten Methoden der chemischen Modifizierung von Elektroden oder Enzymen durch Mediatoren besitzt die erfindungsgemäße Elektrode den Vorteil, daß sie bei dem niedrigsten prinzipiell möglichen Elektrodenpotential arbeitet, wodurch elektrochemische Interferenzen minimiert werden.
Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen, mit Mediatoren modifizierten Elektroden erfolgt der Elektronenübergang nicht durch direkte Mitwirkung der aufgebrachten Mediatorgruppen, sondern durch vorteilhafte Orientierung des Enzymmoleküls an der Elektrode.
Sie ist besonders geeignet zur Messung von Glucose, Lactat oder Ethanol in physiologischen Lösungen sowie in Nährmedien von Fermentern.
Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1
1 mg mit Benzochinon modifizierte Glucoseoxidase (GOD) wird in 2 ml 0,05 M Phosphatpuffer *p*H 6,5 aufgelöst. In diese Enzymlösung wird die Stirnfläche einer nichtporösen Kohleelektrode für 20 Minuten eingetaucht. Die Elektrode wurde vor der Beladung mit GOD auf Schleifpapier (Körnung 800) gesäubert und entweder mit Chromat oder elektrochemisch in bekannter Weise voroxidiert. Nach der Enzymbeladung wird die Elektrode mit enzymfreier Pufferlösung abgespült und danach in eine Meßzelle mit Magnetrührer sowie Gegen- und Referenzelektrode eingesetzt. Als Meßlösung dient 1,5 ml 0,05 M Phosphatpuffer *p*H 6,5. Die Enzymelektrode wird auf ein Potential von −200 mV gegenüber der Referenzelektrode polarisiert. Nachdem der Grundstrom einen konstanten Wert erreicht hat, wird eine Bezugskurve durch Zugabe von jeweils 20 µl einer 50-, 100-, 200-, 250- und 500-mM-Glucoselösung aufgenommen. Danach wird die Meßzelle gespült und erneut mit 1 ml Puffer gefüllt. Zur Glucosebestimmung in Prüflösungen erfolgt analog dazu die Zugabe von 20 µl Probe.
Die Elektrode ist für 10 Tage meßbereit.

Beispiel 2
Die gereinigte und voroxidierte Kohleelektrode wird in eine Lösung getaucht, die 1 mM Benzochinon in 0,05 M Phosphatpuffer *p*H 6,5 enthält. Nach 20 Minuten wird diese Elektrode aus der Benzochinonlösung in eine 20 U/ml lactatoxidasehaltige Pufferlösung überführt. Nach 2 h wird die Elektrode abgespült und analog wie in Beispiel 1 bei der Lactatmessung eingesetzt.