



(19) Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: AT 397 661 B

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1967/92

(51) Int.Cl.⁵ : C12Q 1/00
C12Q 1/26, 1/54, G01N 27/327, 27

(22) Anmeldetag: 6.10.1992

(42) Beginn der Patentdauer: 15.10.1993

(45) Ausgabetag: 27. 6.1994

(56) Entgegenhaltungen:

WO-A1-89/09397EP-A2- 0286118EP-A2- 0204468
EP-A2-0207370

(73) Patentinhaber:

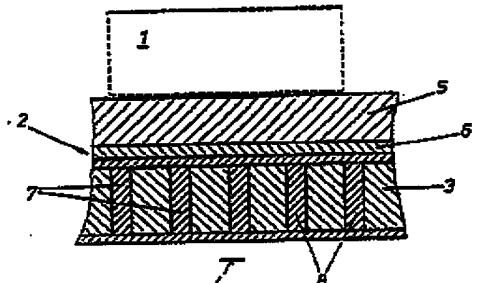
AVL GESELLSCHAFT FÜR VERBRENNUNGSKRAFTMASCHINEN
UND MESSTECHNIK MBH, PROF.DR.DR.H.C. HANS LIST
A-8020 GRAZ, STEIERMARK (AT).

(72) Erfinder:

KONTSCHIEDER HEINZ DIPLO.ING.
GRAZ, STEIERMARK (AT).
OFFENBACHER HELMUT DR.
GRAZ, STEIERMARK (AT).
MARGUC SUSANNE ING.
GRAZ, STEIERMARK (AT).
RITTER CHRISTOPH DR.
GRAZ, STEIERMARK (AT).

(54) AUSSERE MEMBRANSCHICHT EINER ENZYMELEKTRODE

(57) Bei einer äußeren Membranschicht (3) einer Enzymelektrode, von welcher eine Seite einer Probe (4) mit einem zu messenden Enzymsubstrat und die andere Seite einer zumindest ein Enzym enthaltenden Enzyschicht (6) zugewandt ist, wobei die äußere Membranschicht (3) Poren (7) aufweist, wird zur Reduzierung des effektiven Porendurchmessers vorgeschlagen, die mit Poren versehene äußere Membranschicht (3) in eine Hydrogelschicht (8) einzubetten.



B
AT 397 661
AT

Die Erfindung betrifft eine äußere Membranschicht einer Enzymelektrode, von welcher eine Seite einer Probe mit dem zu messenden Enzymsubstrat und die andere Seite einer zumindest ein Enzym enthaltenden Enzymschicht zugewandt ist, wobei die äußere Membranschicht Poren aufweist.

Bei Enzymelektroden bzw. bei Sensoren, welche Enzyme integriert haben, ist es in der Regel nötig, 6 diese Enzyme vor dem direkten Kontakt mit Proben wie z.B. Blut oder Plasma zu schützen. Zusätzlich ist es in vielen Fällen nötig, die das Enzym in der Enzymschicht erreichende Menge der zu messenden Substanz zu limitieren.

In diesem Zusammenhang ist beispielsweise aus der US-PS 3,979,274 ein mehrschichtiger Membran- 10 aufbau bekannt geworden, welcher im wesentlichen aus einer äußeren Membranschicht, einer Enzymschicht und einer inneren Membranschicht bzw. Trägerschicht, angeordnet vor einer polarisierbaren Elektrode, besteht.

Es sind auch Sensorsysteme bekannt geworden, die abgesehen von der äußeren Membranschicht nur 15 eine weitere Schicht über der elektrischen Kontaktierung aufweisen. Aus der GB-A 2 191 003 ist beispielsweise ein Sensor bekannt, der einen Edelmetalldraht aufweist, welcher direkt mit einer Schicht aus Graphit, Platin und Teflon mit einem adsorbierten Enzym kontaktiert ist. Weiters ist probenseitig eine Deckmembran angeordnet.

Um eine effektive Reduktion der die Enzymschicht erreichenden Enzymsubstrate zu erzielen, ist es 20 notwendig, die äußerste Membranschicht möglichst feinporig bzw. wenig durchlässig zu machen.

Aus der EPA 0 286 118 ist ebenfalls eine mehrschichtige Membran mit einer Gesamtdicke < 25 µm 25 bekannt. Die äußere Membranschicht besteht aus Polycarbonat und weist eine Dicke zwischen 1 und 20 µm auf. Der Porendurchmesser wird mit 1,0 bis 12,5 nm angegeben. Die innere Membranschicht besteht aus Celluloseacetat mit einer Dicke zwischen 2 und 4 µm und ist mit einer Glucoseoxidaseschicht mit der äußeren Membranschicht verbunden. Als Nachteil erweist sich, daß die reproduzierbare Herstellung von 30 derartigen Membranen, insbesondere mit Porendurchmessern < 10,0 nm sehr schwierig ist.

Ziel der Erfindung ist es, ausgehend von bekannten äußeren Membranschichten bzw. Deckmembranen 26 eine einfach herzustellende Membranschicht zu verwirklichen, mit welcher dennoch eine ausreichende Diffusionslimitierung realisierbar ist.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die mit Poren versehene äußere Membranschicht in eine Hydrogelschicht eingebettet ist. Damit wird die bisher einstückige äußere Membranschicht 30 durch eine Mehrphasenmembran ersetzt und zwar dergestalt, daß ein Poren enthaltendes Trägermaterial (z.B. Polycarbonat) in eine Hydrogelschicht eingebettet wird, sodaß einerseits die Gesamtdicke der Membranschicht nur wenig steigt, das Einbettungsmaterial jedoch den für die Diffusion zur Verfügung stehenden effektiven Porendurchmesser signifikant reduziert.

In einer ersten Ausführungsvariante der Erfindung ist vorgesehen, daß das Hydrogel der Hydrogelschicht 35 ein durch chemische Reaktion dreidimensional vernetztes hydrophiles Polymer ist. Insbesondere kann es sich beim hydrophilen Polymer um durch Glutaraldehyd vernetzte Polymere, vorzugsweise Polyvinylalkohol, Polyacrylamid oder Proteine, sowie um aminofunktionelle hydrophile Polymere handeln.

Als praktikabel haben sich beispielsweise Proteine (polyionische Biopolymere, die sowohl positive als 40 auch negative ionische Gruppen tragen) erwiesen, die nach Einbringung in die Poren des Trägermaterials mittels Glutardialdehyd in eine vernetzte Form überführt werden.

Polyvinylalkohol lässt sich mit aldehydischen Quervernetzern wie Glutardialdehyd sowie dessen Aldolkondensate, beziehungsweise mit solchen Substanzen, die neben einer aldehydischen Funktion im Molekül eine weitere, nach einem anderen Mechanismus vernetzende, funktionelle Gruppe (Vinyl, Carboxyl u.a.) enthält, bei saurer Katalyse (0,1 n HCl) in definierte Acetale umwandeln. Die Wahl des Molekulargewichtes 45 der Ausgangspolymere sowie der Grad der Acetalbildung, das heißt die Variation des molaren Verhältnisses von Aldehyd zu Polymeruntereinheit, erlauben die Schaffung von Polymernetzwerken mit gut definierten Permeselektivitäten, d.h. mit guten Reproduzierbarkeiten hinsichtlich der gewünschten Elektrodenfunktion.

Weiters ist erfindungsgemäß vorgesehen, daß es sich beim hydrophilen Polymer um ein durch mehrfunktionelle Agenzien dreidimensional vernetztes Polymer handelt. Derartige Agenzien sind beispielsweise mehrere Epoxidgruppen tragende Präpolymere, Diisocyanate, Cyanurchlorid (Trichlortriazin) u.a.

Mit diesen Agenzien lassen sich hydrophile Polymere vernetzen, die außer den für die Hydrophilie verantwortlichen Sequenzen (zum Beispiel Polyethergruppen) vernetzungsfähige Gruppen wie Hydroxyl- 55 beziehungsweise Aminogruppen tragen.

Als praktikabel hat sich auch die Verwendung hydrophiler Silikone erwiesen.

Diese lassen sich durch Reaktion eines Adduktes, welches durch Umsetzen von 2 Mol Glycidyloxypropyltriethoxysilan mit einem Mol Polyethylenglykol gebildet wird, mit einem silanolterminalen Silikonpräpolymer in Gegenwart von Organozinn - bzw. Organitanverbindungen als Katalysatoren herstellen. Die Polykondensation zum dreidimensional vernetzten Polymer findet nach Tränkung des Trägermaterials in dessen

Poren statt. Neben einer guten Hydrophilie besitzt dieses Polymer zusätzlich eine gute Sauerstoffpermeabilität und ist für den Einsatz in Glucosesensoren gut brauchbar.

- Es ist jedoch auch möglich, daß es sich beim hydrophilen Polymer um ein durch Pfpolymerisation dreidimensional vernetztes Polymer handelt. Bei der Pfpolymerisation handelt es sich um ein Verfahren bei dem ein lineares Präpolymer in Gegenwart eines Vinylgruppen tragenden Monomers sowie eines Initiators (organisches Peroxid u.a.) via UV-Strahlung zum Vernetzen gebracht wird.

Als geeignete Systeme haben sich in Wasser lösliche Polyacrylate beziehungsweise -methacrylate wie Polyhydroxyethylmethacrylat, ferner Block- und Copolymere von Hydroxyethylmethacrylat und unpolaren Acrylaten wie Butylacrylat, Methylmethacrylat u.a., gemischt mit Monomeren wie zum Beispiel Hydroxalkyl(meth)acrylat, erwiesen. Bei diesem Verfahren wird die poröse Trägermembran mit der wäßrigen Lösung des geeigneten Polymer-Monomer-Gemisches getränkt, getrocknet und in einer Inertgasatmosphäre unter UV-Bestrahlung vernetzt.

Eine zweite Ausführungsvariante der Erfindung sieht vor, daß das Hydrogel der Hydrogelschicht ein durch van der Waals-Kräfte dreidimensional vernetztes hydrophiles Polymer, bzw., ein in Wasser unlösliches, quellbares Polymer mit hohem Molekulargewicht ist.

Bei dieser Variante kommen zum Einsatz:

- a) wasserunlösliche, hydrophile in polaren organischen Lösungsmitteln wie Alkohole, cyclische Ether, Dimethylformamid u.a. gut lösliche Polymere wie Polyethersequenzen tragende Polymere u.a.

Die Polymere werden in einem Lösungsmittel beziehungsweise Lösungsmittelgemisch gelöst und in die Cavitäten des porösen Trägermaterials eingebracht. Nach Abdunsten des Lösungsmittels liegt ein Polymer vor, welches durch Van-der-Walls-Brücken verursachte Teilkristallinität aufweist.

- b) Cellulose in Form ihrer in organischen Lösungsmitteln löslichen Derivate

Nach Tränken des porösen Trägermaterials mit der Polymerlösung und nach Abdunsten des Lösungsmittels wird das Cellulosederivat (Celluloseester) durch saure beziehungsweise basische Katalyse in regenerierte Cellulose umgewandelt, die durch thermische Behandlungsverfahren in einen teilkristallinen Zustand überführt wird.

Insbesondere ist es in diesem Zusammenhang vorgesehen, daß das hydrophile Polymer hydrophile und ionische Gruppen, wie zum Beispiel Hydroxyl-, Sulfhydryl-, Amino-, quaternäre Ammonium-, Carboxylat- oder Sulfonatgruppen enthält.

Beispielsweise kann man anstelle der in der EPA 0 286 118 genannten kleinen Poredurchmesser bis 1,0 nm erfindungsgemäß eine äußere Membranschicht mit Poren > 10,0 nm, vorzugsweise > 15,0 nm bzw. ≥ 50,0 nm verwenden, welche wesentlich einfacher herstellbar ist.

Der Grad der Teilkristallinität und somit der Quellfähigkeit bzw. der Permeselektivität der Hydrogelschicht kann erfindungsgemäß durch Zusatz von 2 bis 20 %, vorzugsweise 5 % Weichmachern wie Ethylenglycol, Propylenglycol, Polyetherglycol, Glycerin und andere höherwertige Alkohole gesteuert werden. Als Alternativen zu Glycerin wären auch Dextran und andere Polyzucker zu nennen.

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert:

Figur 1 zeigt die mehrschichtige Membran einer Enzymelektrode gemäß dem Stand der Technik und die Figuren 2 bis 5 zeigen Ausführungsvarianten von erfindungsgemäßen Mehrschichtmembranen.

Die vor einer polarisierbaren Elektrode 1 einer nicht näher dargestellten, herkömmlichen Enzymelektrode (Fig. 1) angeordnete mehrschichtige Membran 2 weist eine äußere Membranschicht 3 auf, welche mit einer Probe 4 in direktem Kontakt steht. Die Probe 4 enthält das zu messende Enzymsubstrat, beispielsweise Glucose. Zwischen einer inneren Membran- bzw. Trägerschicht 5 und einer äußeren Membranschicht 3 ist eine Enzymschicht 6 angeordnet, welche im Falle eines Glucosesensors das Enzym Glucoseoxidase enthält. Das zu messende Enzymsubstrat gelangt durch feine Poren 7 in der äußeren Membranschicht 3 zur Enzymschicht 6.

Die in Fig. 2 dargestellte, mehrschichtige Membran 2 einer im wesentlichen der Ausführung nach Fig. 1 entsprechenden Enzymelektrode weist eine in eine Hydrogelschicht 8 eingebettete äußere Membranschicht 3 auf. Die Mehrphasenmembran (z.B. Polycarbonat mit Poren eingebettet in Hydrogel) weist relativ große Poren 7 mit Durchmessern > 10,0 nm vorzugsweise ≥ 50,0 nm auf, wobei der effektive Poredurchmesser durch das Einbettungsmaterial signifikant reduziert wird. Die an die Hydrogelschicht 8 angrenzende Enzymschicht 6 beinhaltet das für den jeweiligen Meßzweck (z.B. Bestimmung der Glucose- oder Lactatkonzentration) erforderliche Enzym (Glucoseoxidase bzw. Lactatoxidase).

Die Gesamtdicke der mehrschichtigen Membran 2 beträgt weniger als 25 µm.

Einen wesentlichen Vorteil weist die erfindungsgemäße äußere Membranschicht 3 im Hinblick auf Haftung der Enzymschicht 6 auf.

Der Membranschicht 3 haftet beidseitig eine dünne Hydrogelschicht an. Beim Aufbringen des Enzyms sowie bei der nachträglichen Vernetzung desselben zum Zwecke der Immobilisierung kommt es im

Grenzbereich Hydrogel / Enzym zu einem Interpenetrieren der Polymernetzwerke und somit zu einer quasi kovalenten Verbindung der beiden Schichten.

Die in Fig. 2 dargestellte mehrschichtige Membran 2 kann auch für Enzyelektroden anderer als der in Fig. 1 und Fig. 2 dargestellten Bauart verwendet werden.

5 So weist beispielsweise die mehrschichtige Membran 2 nach Fig. 3 keine innere Membran- bzw. Trägerschicht auf. Die Verwendung einer derartigen Trägerschicht für die Enzymschicht 6 kann jedoch den Herstellungsprozeß vereinfachen.

10 In den Ausführungsvarianten nach Fig. 4 und 5 weist die Mehrschichtmembran 2 zusätzlich eine Sperrmembran 9 auf, welche zwischen der Enzymschicht 6 und der Trägerschicht 5 (Fig. 4) oder als 15 innerste Membranschicht (Fig. 5) angeordnet sein kann. Diese Sperrmembran 9 ist für niedermolekulare Reaktionsprodukte der Enzymreaktion durchlässig, sodaß diese mit der Elektrode 1 reagieren können (z.B. H₂O₂ bei der Glucosemessung). Probenbestandteile, welche das Meßergebnis verfälschen könnten werden durch die Sperrmembran, die beispielsweise aus Celluloseacetat besteht zurückgehalten.

15 Patentansprüche

1. Äußere Membranschicht einer Enzyelektrode, von welcher eine Seite einer Probe mit dem zu messenden Enzymsubstrat und die andere Seite einer zumindest ein Enzym enthaltenden Enzymschicht zugewandt ist, wobei die äußere Membranschicht Poren aufweist, **dadurch gekennzeichnet**, daß die mit Poren (7) versehene äußere Membranschicht (3) in eine Hydrogelschicht eingebettet ist.
2. Membranschicht nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Hydrogel der Hydrogelschicht (7) ein durch chemische Reaktion dreidimensional vernetztes hydrophiles Polymer ist.
- 25 3. Membranschicht nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das hydrophile Polymer ein durch Glutaraldehyd vernetztes Polymer, vorzugsweise Polyvinylalkohol, Polyacrylamid oder Proteine, oder ein aminofunktionelles hydrophiles Polymer ist.
4. Membranschicht nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das hydrophile Polymer ein durch 30 mehrfunktionelle Agenzien dreidimensional vernetztes Polymer ist.
5. Membranschicht nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das hydrophile Polymer ein durch Pfpolymerisation dreidimensional vernetztes Polymer ist.
- 35 6. Membranschicht nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Hydrogel der Hydrogelschicht (7) ein durch van der Waals-Kräfte dreidimensional vernetztes hydrophiles Polymer ist.
7. Membranschicht nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Hydrogel der Hydrogelschicht (7) ein in Wasser unlösliches, quellbares Polymer mit hohem Molekulargewicht ist.
- 40 8. Membranschicht nach Anspruch 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das hydrophile Polymer hydrophile und ionische Gruppen, wie zum Beispiel Hydroxylsulfhydrylarnino-, quaternäre Ammonium-, Carboxylat- oder Sulfonatgruppen enthält.
- 45 9. Membranschicht nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Hydrogelschicht (8) 2 bis 20 %, vorzugsweise 5 %, eines Weichmachers wie Ethyenglycol, Propylenglycol, Polyetherglycol, Glycerin oder andere höherwertige Alkohole enthält.
10. Membranschicht nach einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß Poren (7) einen Durchmesser > 10,0 nm vorzugsweise > 15,0 nm aufweisen.
- 50 11. Membranschicht nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Poren (7) einen Durchmesser ≥ 50,0 nm aufweisen.

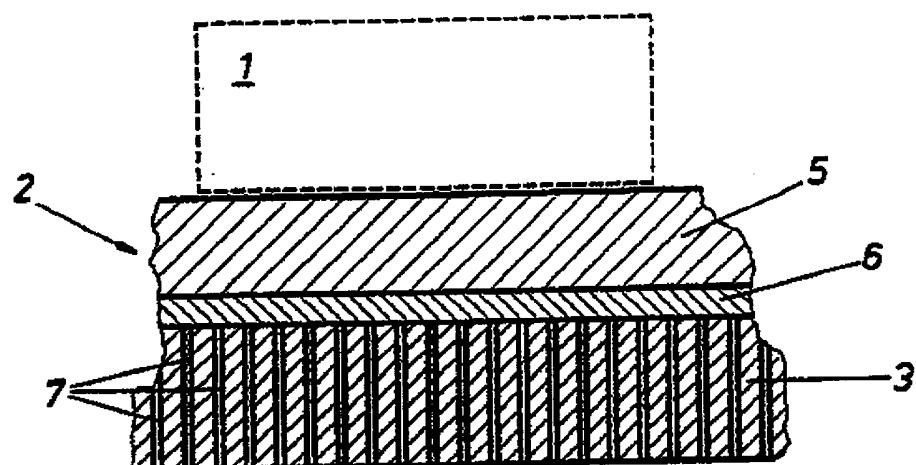
Ausgegeben

27. 6.1994

Int. Cl.⁵: C12Q 1/00

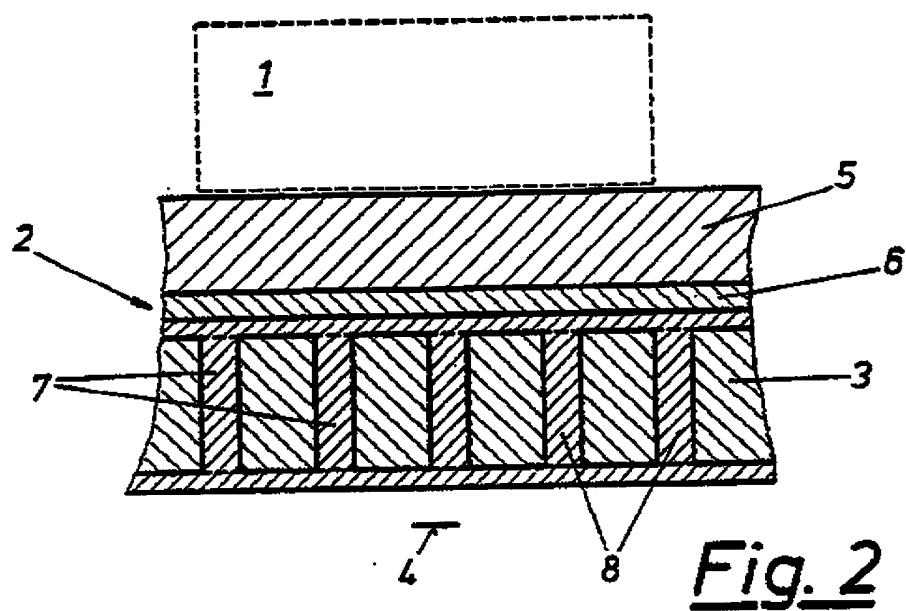
Blatt 1

C12Q 1/26, 1/54,
G01N 27/327, 27/40



7

Fig. 1



7

Fig. 2

Ausgegeben

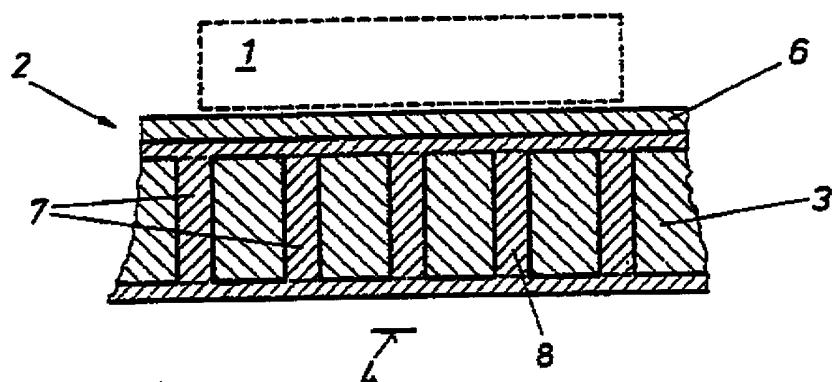
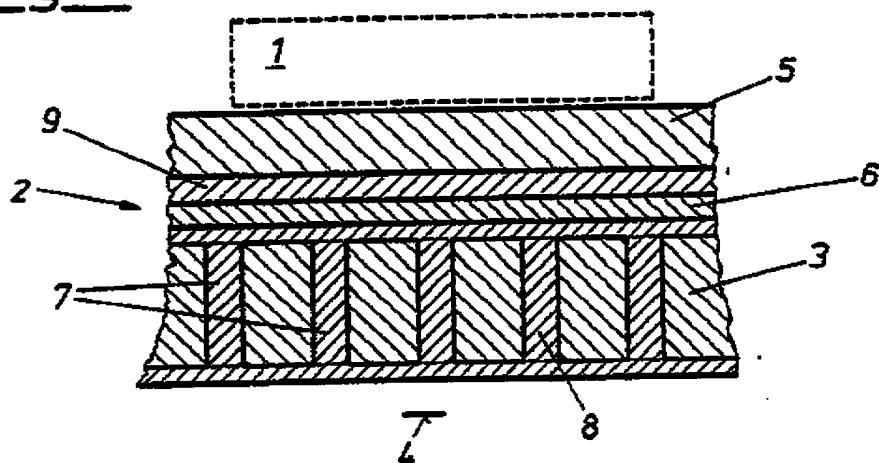
27. 6.1994

Int. Cl.⁵: C12Q 1/00

C12Q 1/26, 1/54,

G01N 27/327, 27/40

Blatt 2

Fig. 3Fig. 4Fig. 5