



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **261 843 A1**

4(51) G 01 N 27/30

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP G 01 N / 303 728 8	(22)	12.06.87	(44)	09.11.88
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72)	Hintsche, Rainer, Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Scheller, Frieder, Prof. Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Heinrich, Günter, DD

(54)	Substratspezifische Enzymelektrode
------	---

(55) Enzymelektrode, analytische Chemie, Enzyme, Kopplung, Koimmobilisation, Elektronenoberfläche, Enzymaktivität

(57) Die Erfindung betrifft eine substratspezifische Enzymelektrode zur Bestimmung von Substanzen in Lösung und ist für den Einsatz in der analytischen Chemie, in der medizinischen Diagnostik und der Biotechnologie geeignet. Die bekannten Enzymelektroden bestehen aus einem Festkörper (z. B. Kohle) mit einem kovalent oder adsorptiv gebundenen Enzym auf der Oberfläche. Das Ziel der Erfindung besteht darin, in der katalytisch aktiven Schicht auf der Festkörperoberfläche in enger räumlicher Nachbarschaft zwei Enzyme funktionell miteinander zu koppeln. Die Merkmale der Erfindung bestehen in der Koimmobilisation mehrerer Enzyme auf der Elektrodenoberfläche, wobei ein Produkt oder ein Nebenprodukt der in einer Kettenreaktion oder in einem Zyklus arbeitenden Enzyme die amperometrische Meßgröße proportional dem zu messenden Stoff liefert. Erfindungsgemäß wird eine Verstärkung und Einstellbarkeit des Meßsignals durch geeignete Wahl der Enzymaktivitäten und eine Rückkopplung, sowie durch Variation der Konzentration der Kosubstrate oder Kofaktoren erreicht.

Patentansprüche:

1. Substratspezifische Enzymelektrode, **dadurch gekennzeichnet**, daß auf einer festen Elektrode aus Kohlematerialien zwei oder mehr Enzyme koimmobilisiert sind und ggf. die Enzymschicht mit semipermeablen Membranen aus natürlichen oder künstlichen Materialien abgedeckt ist.
2. Substratspezifische Enzymelektrode nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die festen Elektroden aus nichtporöser Kohle oder isotropem Graphit bestehen.
3. Substratspezifische Enzymelektrode nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die immobilisierten Enzyme in einer Reaktionsfolge oder in einem Reaktionszyklus miteinander gekoppelt sind.
4. Substratspezifische Enzymelektrode nach Anspruch 1-3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Konzentration von reaktionsabhängigen Kosubstraten oder Hilfsstoffen zur Einstellung der Größe des elektrischen Meßsignals variiert wird.

Anwendungsbeispiel der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine substratspezifische Enzymelektrode zur Bestimmung von Substanzen in Lösung mit Hilfe funktionell gekoppelter Enzyme und kann in der analytischen Chemie, der medizinischen Diagnostik und der Biotechnologie angewendet werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Substratbestimmung sind Festkörperelektroden mit einem immobilisierten Enzym auf der Oberfläche bekannt. Das Enzym wird entweder kovalent gebunden (Anal. Chim. Acta 142 [1982] 277, 158 [1984] 137; Anal. Chem. 48 [1976] 1679, 52 [1980] 1198, 53 [1981] 2090, 54 [1982] 1098, 56 [1984] 667) oder adsorbiert (Bioelectrochem. Bioenerg. 12 [1984] 297, 13 [1984] 163; Anal. Chim. Acta 169 [1985] 237; Agric. Biol. Chem. 48 [1984] 1969; J. Electroanal. Chem. 48 [1984] 289). Diese Elektroden werden auf der Basis von Glucoseoxidase zur Glucosebestimmung genutzt. In einigen Ausführungen sind die zur enzymatischen Reaktion notwendigen Elektronendonatoren der Meßlösung zugesetzt oder in der katalytischen Schicht fixiert. Bei allen bekannten Lösungen ist nur ein Enzym an der Elektrode immobilisiert. Dadurch sind diese Elektroden auf die direkte, einstufige Umwandlung der zu messenden Substanzen bei gleichzeitiger Entstehung elektrodenaktiver Verbindungen beschränkt. Weiterhin besteht dadurch der Nachteil, daß für Enzymmembranen eingeführte Verfahren, wie Substratverstärkung, Kofaktorrecycling, Kompetition und Interferenz nicht angewendet werden können.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist eine Multienzymelektrode, die durch Eliminierung von Transportvorgängen eine verbesserte und einstellbare Empfindlichkeit für Substanzen in Lösung erreicht.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, eine substratspezifische Enzymelektrode zu entwickeln, die die Vorteile optimaler Transportbedingungen für die Reaktionsprodukte in der oberflächennahen katalytischen Schicht und zur Elektrode zu nutzen gestattet.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß auf einer Elektrodenoberfläche zwei oder mehr Enzyme koimmobilisiert sind, wobei die Enzyme in einer Reaktionsfolge oder in einem Reaktionszyklus miteinander gekoppelt sind. Zur Langzeitstabilisierung der katalytischen Enzymschicht ist diese mit bekannten semipermeablen Membranen aus synthetischen oder natürlichen Materialien abgedeckt. Die festen Elektroden bestehen entweder aus nichtporöser Kohle oder anisotropem bzw. isotropem Graphit.

Mit der erfindungsgemäßen Elektrode wird die zu messende Substanz von einem Enzym in bekannter Weise umgewandelt. Das entstehende Produkt oder ein Nebenprodukt dienen als Substrat für ein zweites Enzym. Dessen Produkte oder Koprodukte initiieren beliebige weitere Enzyme oder bewirken eine Rückkopplung mit dem ersten oder einem anderen Enzym z.B. in Form eines Recycling mit oder ohne Substratamplifizierung. Erfindungsgemäß schränkt die räumliche Anordnung mehrerer nahestehender oder sich berührender Enzymmoleküle direkt auf der Elektrodenoberfläche die Transportlimitierungen zwischen den Enzymen weitgehend ein.

Erfindungsgemäß läßt sich die Menge der in der gekoppelten Enzymreaktion entstehenden und als Meßgröße dienenden elektrodenaktiven Moleküle mittels Konzentrationsvariation von reaktionsabhängigen Kosubstraten oder Hilfsstoffen beeinflussen. In Bezug auf gleiche Analytkonzentrationen werden so Meßsignale unterschiedlicher Intensität erzeugt. Nach bekannten elektrochemischen Prinzipien wird die Zu- oder die Abnahme der elektrodenaktiven Verbindungen als quantitatives Maß für den zu messenden Analyt genutzt, nachdem die erfindungsgemäße Elektrode in die Meßlösung mit den Hilfssubstanzen eingebracht und bei einem definierten Potential polarisiert wurde. Der Analyt wird in die Meßlösung injiziert und die Stromänderung mit Hilfe von Eichlösungen der gesuchten Konzentration zugeordnet.

Die Vorteile der erfindungsgemäßen Enzymelektrode bestehen darin, daß die Enzymkopplung direkt auf der Elektrodenoberfläche die Empfindlichkeit durch den Wegfall von Diffusionsprozessen erhöht und die Möglichkeit einer chemischen Beeinflussung der enzymatischen Reaktionsschritte in Bezug auf das Meßsignal bietet. Die Erfindung soll nachstehend an Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1:

Elektrodenpräparation

Die polierte Fläche einer seitlich isolierten Elektrode aus nichtporöser Kohle oder Graphit wird 10 min bei 297 K in 0,5 ml einer Lösung von 10 U Glucoseoxidase und 200 U Lactoperoxidase in Natriumacetatpuffer (pH 5,5, 0,1 mol/l) getaucht und anschließend 10 min in Pufferlösung gewaschen.

Die so hergestellte Enzymelektrode wird in eine elektrochemische Meßzelle mit Platingegelektrode eingebaut.

Meßvorgang

In die Meßzelle werden 5 ml einer Lösung bestehend aus Natriumacetatpuffer (pH 5,5, 0,1 mol/l) und 20 µmol/l Hydrochinon gegeben. Nach Polarisation der Arbeitselektrode auf +100 mV mit Hilfe eines rechnergestützten elektrochemischen Meßsystems ECM 700 werden 100 µl einer auf Glucose zu untersuchenden Lösung in die Meßzelle injiziert. Nach Eichung des Meßsignale mit Glucosestandardlösungen kann die Glucosekonzentration der Meßprobe aus der sich einstellenden Benzochinonkonzentration an der Enzymelektrode bestimmt werden. Durch Vorlage anderer Hydrochinonkonzentrationen (z. B. 5 µmol/l oder 300 µmol/l) kann das Meßsignal verkleinert bzw. vergrößert werden.

Beispiel 2:

Eine polierte Elektrode aus anisotropem oder isotropem pyrolytischen Graphit wird 10 min in eine Lösung aus 20 U Glucoseoxidase und 180 U Meerrettich-Peroxidase in Natriumacetatpuffer (pH 5,5, 0,1 mol/l) getaucht danach 10 min in Pufferlösung gewaschen und analog Beispiel 1 zur Glucosebestimmung verwendet. Zur Langzeitstabilisierung wird vor der ersten Verwendung eine semipermeable Celluloseacetatmembran straff über die Enzymelektrode gespannt.

Beispiel 3:

Eine entsprechend dem Beispiel 1 hergestellte Enzymelektrode wird mit einem 20 µm dicken Film wäßriger Alginatlösung versehen und nach 2 h Härtung in 5%iger Calciumchloridlösung analog Beispiel 1 in die Meßlösung eingebracht. Nach Polarisation der Enzymelektrode auf +400 mV kann die Abnahme der aktuellen Hydrochinonlösung in der katalytisch aktiven Schicht nach Injektion der auf Glucose zu untersuchenden Lösung bestimmt und mit Hilfe von Glucosestandardlösungen geeicht werden. Die Variation der vorgelegten Hydrochinonkonzentrationen ist ebenso wie in Beispiel 1 möglich.
