(19) **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

PATENTSCHRIFT

(12) **Ausschließungspatent**

(11) **DD 295 509 A7**

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) **C 12 Q 1/06**

DEUTSCHES PATENTAMT

(21)	DD C 12 Q / 306 371 4	(22)	26.08.87	(45)	07.11.91

(71) Zentralinstitut für Molekularbiologie, O - 1115 Berlin-Buch, DE
(72) Kühn, Manfred, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Riedel, Klaus, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Ritter, Edith; Kettner, Günter, Dipl.-Ing., DE
(73) Zentralinstitut für Molekularbiologie, O - 1115 Berlin-Buch; Pharma Neubrandenburg, O - 2000 Neubrandenburg, DE
(74) siehe (71)

(54) Biosensor zur quantitativen Bestimmung von Antibiotika

(55) Biosensor; Antibiotikakonzentration; Medizin; Biotechnologie; Antibiotikaverstoffwechslung; Gelöstsauerstoffelektrode; immobilisierte Mikroorganismen; amperometrische Messung

(57) Die Erfindung betrifft einen Biosensor zur quantitativen Bestimmung von Antibiotika in wäßrigen Lösungen. Er kann zur quantitativen Messung von Antibiotikakonzentrationen auf dem Gebiet der Medizin, Pharmazie, Pharmakologie und Biotechnologie angewendet werden. Dadurch und durch die Konditionierung der Meßlösung ist eine hohe Spezifität (damit auch Genauigkeit), Langzeit- und Arbeitsstabilität gegeben. Ebenso entfallen aufwendige Reinigungsverfahren für alternativ verwendbare Enzyme. Der Biosensor enthält Mikroorganismen, die in Gegenwart der zu bestimmenden Antibiotika angezogen wurden, vor einer Gelöstsauerstoffelektrode, die nach dem amperometrischen Meßprinzip arbeitet, und eine Schutzmembran.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

Patentansprüche:

1. Biosensor zur quantitativen Bestimmung von Antibiotika in einer Probelösung auf der Basis immobilisierter, Antibiotika verstoffwechselnder Mikroorganismen, **dadurch gekennzeichnet,** daß der Biosensor die Mikroorganismen vor einer nach dem amperometrischen Meßprinzip arbeitenden Gelöstsauerstoffelektrode enthält und Schutzmembranen aufweist, durch die die Mikroorganismen von der Gelöstsauerstoffelektrode und/oder der Meßlösung, in der sich die Elektrode befindet, getrennt sind.
2. Biosensor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß er Mikroorganismen enthält, die in Gegenwart der zu bestimmenden Antibiotika angezogen wurden.
3. Biosensor nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet,** daß er Mikroorganismen enthält, die in Gegenwart von Penicillinen angezogen wurden.
4. Biosensor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß er Mikroorganismen enthält, deren Stoffwechsel sich unter Einwirkung von Penicillinen erhöht.
5. Biosensor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Meßlösung neben bekannten Nährlösungsbestandteilen für die Mikroorganismen puffernde Substanzen und gegebenenfalls spezifische Aktivatoren und/oder Inhibitoren enthält.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft einen Biosensor zur Bestimmung von Antibiotika in wäßrigen Probelösungen. Die Erfindung kann in der Medizin, Pharmazie, Pharmakologie, analytischen Chemie und Biotechnologie angewendet werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die quantitative Bestimmung von Antibiotika ist in verschiedenen medizinischen Bereichen, der Nahrungsgüterwirtschaft und der Biotechnologie von allergrößter Bedeutung. In der Medizin werden Antibiotikabestimmungen durchgeführt, um ihren Wirkstoffgehalt in Arzneimitteln zu bestimmen, um die Wirksamkeit von Therapien mit Antibiotika zu überprüfen oder um Resistenzerscheinungen nach längerer Applikation verfolgen zu können. Die Bestimmung von Antibiotika in tierischen Nahrungsmitteln, in die sie über die Nahrungskette von Nutztieren gelangen können, macht sich erforderlich, um ihre unkontrollierte Verabreichung über die Nahrung mit all ihren negativen Folgen für den Menschen zu verhindern. Von großer ökonomischer Bedeutung sind weiterhin schnelle und genaue quantitative Antibiotikabestimmungen bei biotechnologischen Fermentationsprozessen zur Herstellung von Antibiotika.
Zur quantitativen Bestimmung von Antibiotika in wäßrigen Lösungen unterschiedlichster Herkunft sind in der Vergangenheit physikalische, chemische, elektrochemische, biochemische und mikrobiologische Methoden entwickelt worden. Die Nachteile der bekannten Methoden sind unterschiedlichster Natur, und die wichtigsten sollen kurz zusammenfassend beschrieben werden. Die physikalischen Methoden wie die HPLC oder Titrimetrie nach vorheriger chemischer oder enzymatischer Spaltung der Antibiotika erfordern für die notwendige Genauigkeit einen großen apparativen Aufwand mit damit verbundenen hohen Kosten. Die chemischen Methoden liefern recht ungenaue Ergebnisse und erfordern zu ihrer Durchführung teilweise toxische und aggressive Chemikalien. Rein elektrochemische Methoden wie die Differential-Pulspolarographie sind nicht spezifisch genug und werden durch eine Reihe von Störsubstanzen negativ beeinflußt.
Biochemische Methoden erfordern einen hohen Enzymverbrauch, der die Kosten pro Bestimmung unvertretbar erhöht, und die bisherigen mikrobiologischen Methoden können nur von hochqualifiziertem und im Umgang mit Mikroorganismen vertrautem Fachpersonal ausgeführt werden und sind zeitaufwendig. Letztere Methoden erfordern auch die komplizierte Stammhaltung der Mikroorganismen und sind in erster Linie zur Bestimmung von Antibiotikaaktivitäten geeignet.
Viele der genannten Nachteile werden durch Biosensoren, einer Kombination von elektrochemischen und biochemischen Methoden, umgangen. Solche Biosensoren, z.B. die Enzymelektrode (L.F.Culten et al., Anal. Chem. 46 [1974], 1955), der Enzymthermistor (K.Mosbach, B.Danielsson, Anal. Chem. 53 [1981], 83A), der optoelektronische Enzymsensor (M.Goldfinch, C.R.Lowe, Anal. Biochem. 138 [1984], 430), der Enzym-Feldeffekttransistor (S.Caras, J.Janata, Anal. Chem. 52 [1980], 1935) oder ein mikrobiologischer Sensor (Karube, Suzuki, Ion-Selective Elektrode Rev. 1984, Vol.6, 39/40) sind auch für die Antibiotikabestimmungen entwickelt worden. Zwei besonders ins Gewicht fallende Nachteile mancher Biosensoren verhindern aber noch ihre breite Anwendung trotz ihrer unzweifelhaft vorhandenen Vorteile wie hoher Spezifität und Sensitivität. Zum einen besitzen Biosensoren wegen der Enzymkomponente oftmals keine ausreichende Langzeit- oder Arbeitsstabilität, und zum anderen sind Biosensoren infolge der hohen Isolierungskosten für die benötigten Enzyme noch recht teuer.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht in der Entwicklung eines Biosensors unter Verwendung von Mikroorganismen zur Antibiotikabestimmung, dessen Herstellungskosten gering sind und der eine hohe quantitative Lebensdauer und Zuverlässigkeit besitzt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung ist es, einen Biosensor zu schaffen, der die Nachteile der aufwendigen Enzymisolation und -reinigung vermeidet.
Der erfindungsgemäße Biosensor enthält immobilisierte Antibiotika verstoffwechselnde Mikroorganismen unmittelbar vor einer Gelöstsauerstoff anzeigenden Elektrode und weist eine Schutzmembran auf. Durch diese Membran sind die Mikroorganismen von der Gelöstsauerstoffelektrode und/oder der Meßlösung, in der sich die Elektrode befindet, getrennt. Dieser Biosensor taucht in eine Meßlösung ein, welcher während der Messung definierte Volumina Antibiotika enthaltende Probelösungen zugesetzt werden und in der sich puffernde Substanzen und gegebenenfalls spezifische Aktivatoren und/oderr Inhibitoren befinden. Die verwendeten Antibiotika verstoffwechselnden Mikroorganismen werden in Gegenwart der zu bestimmenden Antibiotika angezogen. Es werden solche Mikroorganismen eingesetzt, deren Stoffwechsel sich unter Einwirkung der Antibiotika erhöht. Unter Aufnahme von Sauerstoff verwerten die Antibiotika verstoffwechselnden Mikroorganismen die zur Meßlösung zugegebenen Antibiotika, was zu einer Verringerung der Sauerstoffkonzentration führt. Überraschend wurde nun gefunden, daß die dadurch eintretende Erniedrigung des Sauerstoffreduktionsstromes an der Elektrode in sehr großen Bereichen der Antibiotikakonzentration proportional ist. Damit unterscheidet sich dieser neuartige Antibiotika-Sensor von bisher bekannten Enzymelektroden zur Antibiotikabestimmung, indem ein der Antibiotikakonzentration direkt proportionales Stromsignal zur Konzentrationsbestimmung der Antibiotika herangezogen wird und nicht wie z. B. bei den potentiometrischen Enzymelektroden eine durch die Enzymreaktion hervorgerufene Spannungsänderung.
Die Verbindung der gegenüber Antibiotika sensitiven, biokatalytisch aktiven Schicht und der Sauerstoff anzeigenden Elektrode ist in einfacher Weise und auf bekannten Wegen möglich. Sie beinhaltet die Fixierung von immobilisierten Antibiotika verstoffwechselnden Mikroorganismen auf der sensitiven Oberfläche einer Sauerstoffelektrode. Zur Immobilisierung der Mikroorganismen sind schonende Methoden geeignet, um hohe Reaktivitäten der Mikroorganismen zu erreichen und zu erhalten, um damit wiederholte Bestimmungen der Antibiotika durch Messen einer ausreichend genauen ersten Ableitung des Sauerstoffreduktionsstromes nach der Zeit zu ermöglichen und um über den Vergleich mit Eichkurven den Antibiotikagehalt in unbekannten, wäßrigen Lösungen bestimmen zu können. Das erfindungsgemäße Verfahren dient bevorzugt der Bestimmung von β-Lactam- oder Peptidantibiotika, die auch zur Anzucht eingesetzt werden. Insbesondere dient das Verfahren zum Nachweis von Penicillinen. Dazu werden die immobilisierten Antibiotika verstoffwechselnden Mikroorganismen in Gegenwart von Penicillinen angezogen. Es werden solche Mikroorganismen eingesetzt, deren Stoffwechsel sich unter Einwirkung von Penicillinen erhöht.
Die Vorteile des erfindungsgemäßen Biosensors bestehen in seiner großen Langzeitstabilität (mindestens 8 Monate) und Arbeitsstabilität (6–8 Wochen mit mehr als 20 Messungen pro Tag), die ein wiederholtes Messen ermöglichen. Infolge eines großen linearen Meßbereiches können auch sehr hohe Antibiotikakonzentrationen ohne Vorverdünnung des Meßgutes vermessen werden, so daß die Isolierung und Reinigung eines zur Antibiotikabestimmung geeigneten Enzyms wegfällt und daß ganz allgemein die Nachteile bekannter Biosensoren zur Antibiotikabestimmung durch die Anwendung des amperometrischen Meßprinzips überwunden werden können. Diese Nachteile, z. B. potentiometrischer Enzymelektroden, die bei den erfindungsgemäßen amperometrischen, mikrobiellen Elektroden nicht auftreten, bestehen in den längeren Ansprech- und Analysenzeiten, der logarithmischen Abhängigkeit von Meßsignal und Antibiotikakonzentration und einen damit verbundenen größeren Fehler sowie in der negativen Beeinflussung der Meßergebnisse durch schwankende *p*H-Werte und Pufferkapazitäten der zu vermessenden Antibiotikaproben. Insbesondere ist es bei dem erfindungsgemäßen Sensor vorteilhaft, zur amperometrischen Messung die an sich bekannten Meßanordnungen wie Potentiostaten, Polarographen, Glukosemeßgeräte u. a. zu benutzen. Die Konzentrationsbestimmung von Antibiotika mit den erfindungsgemäßen, mikrobiellen Sensoren, die auf einem neuartigen, bioelektrochemischen Meßprinzip beruhen, ist auf Grund der einfachen Herstellbarkeit der Elektrode und der leichten praktischen Durchführbarkeit vor allem für den Routinebetrieb geeignet. Der erfindungsgemäße Sensor bietet weiter die Möglichkeit, in seiner Meßlösung den *p*H-Wert mit verschiedenen puffernden Substanzen vorzugeben. Dabei können vorteilhaft auch noch spezifische Aktivatoren und/oder Inhibitoren eingesetzt werden, um die Spezifität und Genauigkeit der Bestimmung von Antibiotika in Probelösungen unterschiedlichster Herkunft zu sichern.
Die Erfindung wird nachstehend an Beispielen erläutert.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1
In einem Penicillin G enthaltenden kommerziellen Glukosestandardmedium angezogene Bacillus cereus-Zellen werden nach 18- bis 20stündiger Kultivierung auf Rotationsschüttlern bei 30 °C zu Beginn der stationären Phase geerntet und zur Herstellung des mikrobiologischen Sensors benutzt. Dazu werden 500 µl Zellsuspension mit einem ungefähren Trockengewicht von 50 mg mit 500 µl 10%iger Polyvinylalkohol vermischt, und die Suspension wird auf einer Fläche von 10 cm^2 ausgestrichen und bei 4 °C getrocknet, so daß eine Beladung von ca. 5 mg Trockengewicht pro cm^2 resultiert. Ein Stück Membran von ca. 5 mm^2 wird auf die Polyäthylenmembran einer Sauerstoffelektrode gelegt und zur Lösungsseite mit einer Dialysemembran abgeschlossen. In eine gerührte, den mikrobiellen Sensor enthaltende und auf 30 °C temperierte Meßzelle mit 2,5 ml Phosphatpuffer (0,1 mol/l, *p*H 5,5) werden die zu vermessenden Proben addiert. Mit Hilfe eines Meßverstärkers wird bei −600 mV die Änderung der Stromstärke pro Zeiteinheit nach Probendosierung gemessen. Aus diesen Änderungsgeschwindigkeiten, aufgetragen gegen bekannte Antibiotikakonzentrationen, wird eine Eichkurve erstellt, mit deren Hilfe unbekannte Antibiotikakonzentrationen quantitativ bestimmt werden können. In einem kommerziellen Penicillin G-Präparat wurde mit dem beschriebenen Sensorsystem der Wirkstoffgehalt mit 154,4 mg bestimmt, während nach der chemischen Vergleichsmethode (Hydroxylaminmethode) 151,7 mg gefunden wurden. Als unterste Grenze des linearen Meßbereiches unter den in der Meßzelle vorliegenden Verdünnungsverhältnissen wurden 3 mmol/l Penicillin G und als obere Grenze etwa 45 mmol/l Penicillin G ermittelt. In einer Tablette eines kommerziellen Ampicillinpräparates mit einem angegebenen Wirkstoffgehalt von 500 mg wurde eine durchschnittliche Ampicillinmenge von 504 mg bestimmt mit einem Variationskoeffizienten von 3,8 % für 20 vermessene Proben.

Beispiel 2
Aus in Gegenwart von Penicillin G nach Standardmethoden angezogenen Bacillus subtillis-Zellen wird, wie im Beispiel 1 beschrieben, ein mikrobieller Sensor hergestellt, der täglich zur Penicillin G-Bestimmung eingesetzt wurde. Dieser Sensor besaß nach 5 Monaten noch 50% seiner Ausgangsaktivität. Die Variationskoeffizienten lagen für 5 mM/l Penicillin G bei 4% und für 50 mM/l Penicillin G bei 2,8%, wenn jeweils 20 Proben vermessen wurden.

Beispiel 3
Aus in Gegenwart von Cephalosporin C nach Standardmethoden angezogenen Bacillus megaterium-Zellen wird, wie im Beispiel 1 beschrieben, ein mikrobieller Sensor hergestellt, der zur Cephalosporin C-Bestimmung verwendet wird. Der Variationskoeffizient für eine wäßrige Cephalosporin C-Lösung von 5 mmol/l lag bei 5% für 20 vermessene Proben.
Nach 8monatiger Lagerung bei 4°C besaß der Sensor noch 60% seiner Ausgangsaktivität. Die Meßbedingungen sind die im Beispiel 1 beschriebenen.

Beispiel 4
Aus nach Standardmethoden angezogenen und zum Zeitpunkt der größten extracellulären Bacitracinproduktion geernteten Bacillus subtillis-Zellen wird nach Beispiel 1 ein mikrobieller Sensor hergestellt, der zur täglichen Bacitracin-Bestimmung in wäßrigen Lösungen eingesetzt wurde. Der Sensor besaß unter den in Beispiel 1 beschriebenen Meßbedingungen bei täglichem Messen nach 6 Wochen noch 65% seiner Ausgangsaktivität mit einem Variationskoeffizienten von 5% für 20 Messungen einer Lösung von 1 mmol/l Bacitracin.