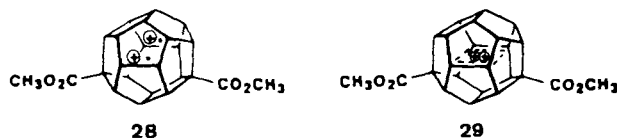


NMR(CDCl₃): δ = 7.77 (m, 8H), 7.44 (m, 8H), 7.33 (m, 4H), 7.06 (m, 4H), 6.96 (m, 4H), 3.68 (q, 8-, 12-H), 3.36 (q, 7-, 19-H), 3.33 (m, 10-, 14-H), 3.13 (m, 3-, 6-, 9-, 11-, 13-, 15-, 18-, 20-H), 2.46 (m, 4-, 5-H); $J_{3,5} = J_{6,7} = J_{7,8} = J_{12,19} = J_{8,9} = J_{8,15} = 11.0$ Hz. ¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 147.4 (4C), 139.0 (4C), 128.4 (8C), 127.1 (4C), 126.1 (4C), 126.0 (8C), 120.5 (4C), 95.4 (4C), 94.0 (C-1,-2,-16,-17), 70.8 (C-8,-12), 69.4 (C-10,-14), 67.8 (C-9,-11,-13,-15), 67.5 (C-3,-6,-18,-20), 67.4 (C-7,-19), 64.8 (C-4,-5). MS (DCI; NH₃): m/z [%] 797 (M^+ , 3), 271 (100).

- [17] Durch Veretherung des Alkohols **3a** zu **3b** (5 Äquiv., Me₃SiCl/Pyridin/CH₂Cl₂, RT, 95%) wird die Retro-Aldol-Konkurrenzreaktion (**5**→**4**) verhindert und eine 92proz. Ausbeute an Seco-dien **5b** erzielt. Für **5b** ist Wechselwirkung zwischen den CC-Doppelbindungen (vgl. die für **11** gemessenen π - π -Transannularabstände von 2.849 und 3.195 Å, Abb. 2) im UV-Spektrum (CH₃CN) durch langwellige Schultern (270 nm (ϵ = 240), 261(280), 250(420)) ausgewiesen.
- [18] W. Adam, J. Baeza, J. C. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **94** (1972) 2000.
- [19] Die ¹³C-NMR-Verschiebungen von **8** (Abb. 1), speziell die von C-8(9,18,19) (δ = 71.4) und von C-10(12,15,17) (δ = 63.5), sind im Vergleich mit denen von **7c** (δ = 63.9 bzw. 71.6) überraschend; die Zuordnungen sind indes durch selektive Entkopplungsexperimente zweifelsfrei gesichert.
- [20] L. A. Paquette, T. Kobayashi, J. C. Gallucci, *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 1305; L. A. Paquette, I. Kobayashi, M. A. Kesselmayr, *ibid.* **110** (1988) 6568.
- [21] G. A. Olah, G. K. Surya Prakash, T. Kobayashi, L. A. Paquette, *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 1304.
- [22] Für den Diendiester **12** wurden cyclovoltammetrisch (CH₂Cl₂, Bu₄NPF₆) [9] zwei irreversible Oxidationspotentiale von +1.2 und +1.4 eV (vs. Ag/AgCl) gemessen (Dikation **28/29?**) (G. Lutz, *Dissertation*, Universität Freiburg 1990).



- [23] M. Bremer, P. von R. Schleyer, K. Schötz, M. Kausch, M. Schindler, *Angew. Chem.* **99** (1987) 795; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **26** (1987) 261.
- [24] Berechnungen auf verschiedenen theoretischen Niveaus [20] werden getrennt publiziert (W.-D. Fessner, J.-P. Melder, H. Prinzbach).
- [25] C. Jaime, E. Osawa, *Tetrahedron* **39** (1983) 2769, zit. Lit.
- [26] Für eine kritische Wertung von MM2- und MM3-Berechnungen speziell gesättigter (Seco-)Dodecahedrane siehe N. L. Allinger, H. J. Geise, W. Pykhout, L. A. Paquette, J. C. Gallucci, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 1106; vgl. O. Ermer, *Angew. Chem.* **95** (1983) 251; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **22** (1983) 251.
- [27] G. Rihs, U. Reifentahl, H. Irgartinger, P. R. Spurr, J.-P. Melder, R. Pinkos, H. Prinzbach, unveröffentlicht; vgl. J. C. Gallucci, R. T. Taylor, T. Kobayashi, J. C. Weber, J. Krause, L. A. Paquette, *Acta Crystallogr. Sect. C45* (1989) 893.
- [28] Aus Gasphasen-Ion-Molekül-Reaktionen wurde kürzlich indirekt auf die Existenz des – direkt nicht beobachteten – Dodecahedrens geschlossen; für die CC-Doppelbindung dieser Spezies wurde eine Spannungsenergie (Hydrierwärme) von 63 ± 3 kcal mol⁻¹ abgeschätzt: J. P. Kiplinger, F. R. Tolens, A. G. Marshall, T. Kobayashi, D. R. Lagerwall, L. A. Paquette, J. E. Bartmess, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 6914.

Direkter Elektronenaustausch zwischen Graphitelektroden und einem adsorbierten Komplex aus Glucose-Oxidase und einem Os-haltigen Redoxpolymer**

Von Michael V. Pishko, Ioanis Katakis, Sten-Eric Lindquist, Ling Ye, Brian A. Gregg und Adam Heller*

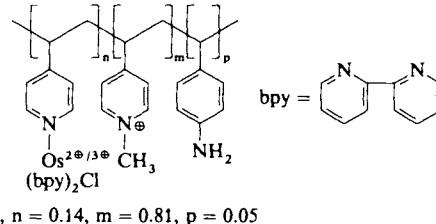
Wie bei den meisten Oxidoreduktasen sind bei Glucose-Oxidase die Redoxzentren wegen einer Protein-(Glycopro-

[*] Prof. Dr. A. Heller, M. V. Pishko, I. Katakis, Dr. S.-E. Lindquist, L. Ye, Dr. B. A. Gregg
Department of Chemical Engineering,
University of Texas at Austin
Austin, TX 78712 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde zum Teil vom Office of Naval Research und der Robert A. Welch Foundation gefördert. Wir danken Yinon Degani für wertvolle Ratschläge bei der Synthese der Polymere und Goran Svensk für die Bestimmung des Molekulargewichts des Os-haltigen Redox-Terpolymers 1.

tein-)Hülle elektrochemisch nicht zugänglich; deshalb kann das Enzym an einer Elektrode weder oxidiert noch reduziert werden. Wir haben schon früher berichtet, daß wasserlösliche Poly(vinylpyridin)/[Os(bpy)₂Cl]²⁺-Komplexe (Polykationen) in homogener Lösung an reduzierte Glucose-Oxidase (ein Polyanion) binden und vom Enzym Elektronen aufnehmen^[1]. Wir fanden nun, daß diese polykationischen Redoxpolymere von Graphit stark adsorbiert werden, daß derart modifizierte Elektrodenoberflächen das Enzym stark adsorbieren und daß zwischen den adsorbierten Enzym/Redoxpolymer-Komplexen und den Elektroden ein Elektronenaustausch stattfindet. Elektroden, die durch Adsorption dieser Komplexe modifiziert sind, lassen sich schneller und einfacher herstellen als käufliche Glucoseelektroden.

Es ist bekannt, daß sowohl Poly(4-vinylpyridin) (PVP) als auch N-methyliertes PVP stark an Pyrographit adsorbiert werden und daß daraus durch Eindiffusion von Redoxspezies langlebige, reproduzierbare Elektroden erhalten werden können^[2,3]. Die Elektrochemie dieser Elektroden ist in Einklang mit einer Physisorption von Segmenten der Makromoleküle, wobei ein dreidimensionales Netzwerk entsteht, das die Diffusion von Ionen ermöglicht. Kleine Redoxproteine, die keine dicke Isolierschicht um ihre Redoxzentren enthalten (z. B. Cytochrom c, Myoglobin, Ferredoxin und Phycocyanin), werden bekanntlich direkt an Elektroden oxidiert oder reduziert, doch kann der Elektronentransfer durch adsorbierte „Mediatoren“ (z. B. Bipyridin, Methylviologen) beschleunigt werden^[4]; die Mediatoren binden und orientieren die Proteine, sind an der Redoxreaktion selbst jedoch nicht beteiligt. Wir haben nun gefunden, daß die Oberflächen von Pyrokohlenstoff- und Graphitelektroden durch adsorbierte polykationische Redoxpolymere modifiziert werden können, die Glucose-Oxidase komplexieren. Bei derartigen Systemen werden Elektronen vektoriiell von der enzymgebundenen Glucose über die Redoxzentren des Enzyms und des Redoxpolymers auf die Elektrode übertragen.



Schema 1. Struktur des quaternisierten Redox-Terpolymers 1.

Die starke Adsorption von Redoxpolymeren an Graphit läßt sich anhand der Cyclovoltammogramme des Redox-Terpolymers 1 aus Poly(N-methyl-4-vinylpyridiniumchlorid), 4-Aminostyrol und des PVP-Komplexes von Os(bpy)₂Cl₂ (siehe Schema 1) verdeutlichen; bei Vorschubgeschwindigkeiten zwischen 2 und 200 mV s⁻¹ wird eine Peaktrennung von 30 mV oder weniger erreicht. Die Integration des Cyclovoltammogramms bei niedriger Vorschubgeschwindigkeit (2 bis 5 mV s⁻¹) ergibt, daß etwa 1.0 × 10⁻⁹ mol l pro cm² Elektrodenoberfläche elektroaktiv sind. Von der rotierenden Scheibenelektrode wird **1** selbst bei 2000 Umdrehungen pro Minute nicht desorbiert. Bewahrt man die modifizierten Elektroden 30 Tage unter Rühren in einem Wasserbad auf, so läßt sich durch coulometrische Messungen zeigen, daß nach dieser Zeit weniger als 10% **1** desorbiert sind. Glucose-Oxidase bindet stark an das adsorbierte polykationische Redox-Polymer **1**. Abbildung 1 zeigt Cyclovoltammogramme für die Oxidation von Glucose an einem

derartigen Komplex aus Glucose-Oxidase und 1. Läßt man die Elektroden in physiologischer Salzlösung, die weder Enzym noch Polymer enthält, mit 20 Upm rotieren, so bleibt bei einem konstanten Potential von 0.45 V (vs. SCE) der Stromfluß für mehr als 10 h erhalten. Der Stromfluß nimmt

sie sich für schnelle, einmal verwendbare Glucosesensoren eignen.

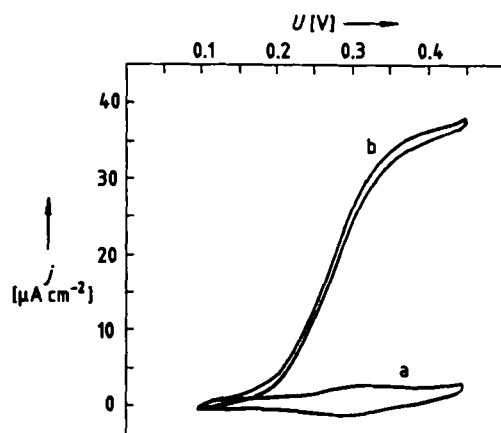


Abb. 1. Cyclovoltammogramm des Komplexes aus Glucose-Oxidase und 1 in einer Lösung aus 9.9 Einheiten Katalase pro mL und 0.15 M Natrium-4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat (NaHEPES) bei pH 7. Vorschubgeschwindigkeit: 5 mV s^{-1} . a) Keine Glucose, b) 60 mM Glucose. – Potential U vs. SCE; Glucose-Oxidase/1/Graphitelektrode.

in der ersten Stunde um etwa 10% und nach 10 Stunden um etwa 70% ab. Die Elektroden wurden etwa 30 Tage an der Luft bei Raumtemperatur aufbewahrt und zeigten nach dieser Zeit nur vernachlässigbare Aktivitätsverluste. Chronoamperometrische Messungen in einer Durchflußzelle ergaben, daß der Strom auf einen Anstieg der Glucosekonzentration in weniger als 1 s reagiert (Abb. 2). Die Reak-

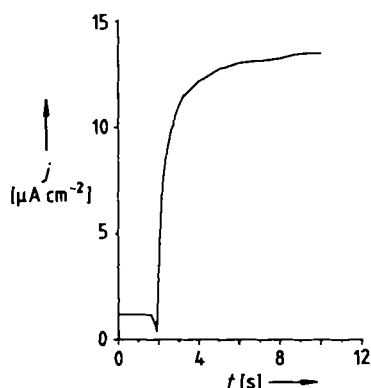


Abb. 2. Änderung der Stromdichte bei Anstieg der Glucosekonzentration von 0 auf 50 mM in 0.15 M NaHEPES-Lösung bei pH 7 in Gegenwart von 9.9 Einheiten Katalase pro mL. Durchflußgeschwindigkeit 193 cm s^{-1} ; Glucose-Oxidase/1/Graphitelektrode.

tionszeiten bei verschiedenen Durchflußgeschwindigkeiten variieren zwischen 0.4 s bei einer linearen Durchflußgeschwindigkeit von 42 cm s^{-1} und 0.2 s bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 210 cm s^{-1} . In Abbildung 3 ist die Abhängigkeit des Stromflusses von der Glucosekonzentration bei einem Potential von 0.45 V wiedergegeben. Ein Stromfluß ist auch in Abwesenheit von Glucose vorhanden. Da derartig modifizierte Elektroden einfach herzustellen sind und aus preiswerten Materialien bestehen, sollten

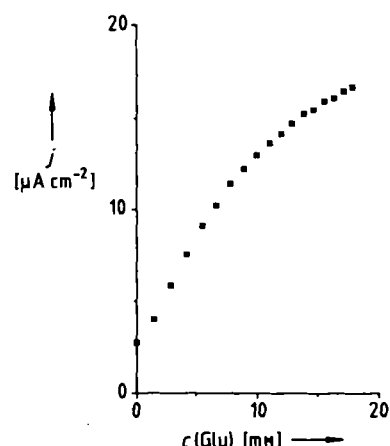


Abb. 3. Abhängigkeit der Stromdichte von der Glucosekonzentration bei einem Potential von 0.45 V für die Glucose-Oxidase/1/Graphitelektrode in 0.15 M NaHEPES-Lösung bei pH 7 in Gegenwart von 9.9 Einheiten Katalase pro mL.

Durch Chronoamperometrie wurde die Geschwindigkeit der Adsorption von Glucose-Oxidase an 1-modifizierte Graphitelektroden untersucht. Dazu wurden die Elektroden in 4 mL einer Lösung von 60 mM Glucose und 0.15 M NaHEPES bei pH 7 getaucht und unter Stickstoff gehalten. Um eine Desaktivierung der Glucose-Oxidase durch entstehendes Wasserstoffperoxid zu vermeiden, wurden der Lösung $0.9 \mu\text{g}$ Katalase (44 000 Einheiten pro mg Protein) zugesetzt. Dann wurden etwa $10 \mu\text{L}$ einer Lösung von 4 mg Glucose-Oxidase pro mL langsam in die Elektrolysezelle injiziert, so daß sich in der Zelle eine Glucoseoxidase-Konzentration von $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ einstellte. Nach Anlegen eines Potentials von 0.45 V wurde der Stromanstieg gemessen, der sich durch Bildung eines Komplexes zwischen dem Enzym und dem an der Elektrode adsorbierten Redoxpolymer 1 ergibt (siehe Abb. 4).

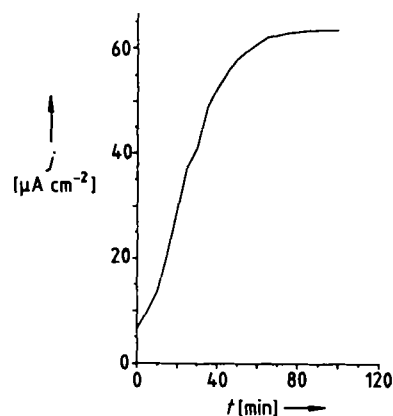


Abb. 4. Änderung der Stromdichte (Chronoamperometrie) der 1/Graphitelektrode in einer Lösung von $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ Glucose-Oxidase, 60 mM Glucose und 0.15 M NaHEPES bei pH 7 ohne Zusatz von Katalase.

Untersuchungen über den Einfluß der Salzkonzentration auf den Elektronentransfer zeigten folgendes: In Lösungen,

die nur NaCl und Puffer enthalten (kein Enzym), findet bei hohem Salzgehalt (0.5 M) kein Elektronentransfer statt; bei anschließender Verdünnung (auf 0.15 M) werden jedoch wieder Elektronen übertragen. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß sich elektrostatische Bindungen nicht nur in Lösungen^[1], sondern auch in adsorbierten Schichten kritisch auf den Elektronentransfer auswirken. Die Wiederherstellung des Stromflusses bei verminderter Ionenstärke demonstriert, daß der Komplex aus Glucose-Oxidase und **1** selbst bei hoher Ionenstärke nicht dissoziiert. Ursache für den Stromabfall bei hoher Ionenstärke ist vermutlich eine Verknäuelung des polykationischen Redoxpolymers **1**^[1,5]. Das verknäuelte Polymer kann nicht mehr in das Protein eindringen, so daß kein Elektronenaustausch mehr stattfinden kann. Bei physiologischen Ionenstärken ist der Komplex aus polyanionischer Glucose-Oxidase und polykationischem Redoxpolymer **1** jedoch ein effektiver Elektronenüberträger zwischen enzymgebundenem Substrat und elektrischem Leiter.

Experimentelles

Glucose-Oxidase (E.C. 1.1.3.4) Typ X, Katalase (E.C. 1.11.1.6) und NaHEPES wurden bei der Firma Sigma gekauft. Os(bpy)₂Cl₂ (bpy = 2,2'-Bipyridin) wurde nach Literaturvorschriften [6] aus K₂OsCl₆ (Aldrich) hergestellt. 4-Aminostyrol wurde bei Polysciences, Azobisisobutyronitril (AIBN) und 4-Vinylpyridin wurden bei Aldrich gekauft. Die Synthese des Redox-Terpolymers **1** ist in [1] beschrieben. Als Elektroden dienten Graphit (HB-Bleistiftminen von 0.5 oder 0.9 mm Durchmesser) oder Pyrokohlenstoff (Scheibchen von 4 mm Durchmesser).

Die Versuche an der rotierenden Scheibenelektrode wurden mit dem Rotator AFMSRX und der Umdrehungskontrolle MSRX der Firma Pine Instruments durchgeführt. Die Durchflußzelle ähnelte einem bekannten „wall jet“-System [7].

Die Elektroden wurden zur Isolierung mit Polypropylen-Schrumpfschlauch überzogen. Die Spitzen der Elektroden wurden mit Aluminiumoxid (0.3 µm) poliert, für 20 s in ein Ultraschallbad mit destilliertem Wasser getaucht und mit Stickstoff trockengeblasen. Für die Modifizierung der Elektrode mit dem Redoxpolymer **1** wurde ein Tropfen (4 µL) einer 1-Lösung (2.6 mg mL⁻¹ Solvens) auf die Elektrodenspitze aufgetragen und nach 4 min mit destilliertem Wasser wieder abgewaschen. Zur Adsorption des Enzyms wurde ein Tropfen (4 µL) einer Glucoseoxidase-Lösung (4.5 mg mL⁻¹) auf die Oberfläche der durch **1** modifizierten Elektrode gebracht. Die Glucoseoxidase-Lösung wurde

nach 10 min abgespült. Es wurde keine Grenzmembran verwendet. Die Scheibenelektroden wurden auf ähnliche Weise erhalten.

Eingegangen am 7. August,
ergänzte Fassung am 2. Oktober 1989 [Z 3485]

- [1] Y. Degani, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 2357.
- [2] N. Oyama, F. C. Anson, *J. Am. Chem. Soc.* **101** (1979) 739, 3450; K. Shigehara, N. Oyama, F. C. Anson, *Inorg. Chem.* **20** (1981) 518; N. Oyama, F. C. Anson, *J. Electrochem. Soc.* **127** (1980) 247, 640; N. Oyama, T. Shimomura, K. Shigehara, F. C. Anson, *J. Electroanal. Chem.* **112** (1980) 271; N. Scott, N. Oyama, F. C. Anson, *ibid.* **110** (1980) 303; T. Shimomura, N. Oyama, F. C. Anson, *ibid.* **112** (1980) 265; *J. Am. Chem. Soc.* **103** (1981) 2552; N. Oyama, S. Yamaguchi, Y. Nishita, K. Tokuda, H. Matsuda, F. C. Anson, *J. Electroanal. Chem.* **139** (1982) 371.
- [3] J. Jernigan, N. Surridge, M. Zvanut, M. Silver, R. Murray, *J. Phys. Chem.* **93** (1989) 4620; P. Denisovich, H. Abruna, C. Leidner, T. Meyer, R. Murray, *Inorg. Chem.* **21** (1982) 2153; J. Calvert, T. Meyer, *ibid.* **21** (1982) 3978; E. Kober, B. Sullivan, W. Dressiale, J. Caspar, T. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980) 7387; J. Facci, R. Schmehl, R. Murray, *ibid.* **104** (1982) 4959; J. Facci, R. Murray, *Anal. Chem.* **54** (1982) 7721; R. Murray, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **14** (1984) 145; *Philos. Trans. R. Soc. London A302* (1981) 253.
- [4] P. Yeh, T. Kuwana, *Chem. Lett.* **1977**, 1145; E. Bowden, F. Hawkrigge, H. Blount, *J. Electroanal. Chem.* **161** (1984) 355; D. Reed, F. Hawkrigge, *Anal. Chem.* **59** (1987) 2334; J. Willit, E. Bowden, *J. Electroanal. Chem.* **221** (1987) 265; K. Koller, F. Hawkrigge, *ibid.* **239** (1988) 291; E. Bowden, F. Hawkrigge, H. Blount: „Electrochemical Aspects of Bioenergetics“ in S. Srinivasan, Y. Chizmadzhev, J. Bockris, B. Conway, E. Yeager (Hrsg.): *Comprehensive Treatment of Electrochemistry*, Vol. 10, Plenum, New York 1985, S. 297–346; J. Frew, H. Hill, *Philos. Trans. R. Soc. London B316* (1987) 95–106; H. Hill, *Pure Appl. Chem.* **59** (1987) 743; F. Armstrong, H. Hill, N. Walton, *Acc. Chem. Res.* **21** (1988) 407; M. Eddowes, H. Hill, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, 771; M. Eddowes, H. Hill, K. Uosaki, *J. Am. Chem. Soc.* **101** (1979) 4461; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **7** (1980) 527; A. Cass, M. Eddowes, H. Hill, K. Uosaki, R. Hammond, I. Higgins, E. Plotkin, *Nature (London)* **285** (1980) 673; K. Uosaki, H. Hill, *J. Electroanal. Chem.* **122** (1981) 321; W. Albery, M. Eddowes, H. Hill, A. Hillman, *J. Am. Chem. Soc.* **103** (1981) 3904; M. Eddowes, H. Hill, K. Uosaki, *ibid.* **101** (1979) 7113.
- [5] I. Nagata, H. Morawetz, *Macromolecules* **14** (1981) 87; A. Katchalsky, *Pure Appl. Chem.* **26** (1971) 327; H. Eisenberg: *Biological Macromolecules and Polyelectrolytes in Solution*, Clarendon Press, Oxford 1976; S. Carnie, G. Christos, T. Creamer, *J. Chem. Phys.* **89** (1988) 6484.
- [6] D. Buckingham, F. Dwyer, H. Goodwin, A. Sargeson, *Aust. J. Chem.* **17** (1964) 325; P. Lay, A. Sargeson, H. Taube, *Inorg. Synth.* **24** (1986) 291–306.
- [7] W. Albery, P. Bartlett, A. Cass, D. Creston, B. Haggett, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **82** (1986) 1033–1050.