

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

Gasdialytisch – chemiluminometrische Wasserstoffperoxiddetektion -

Grundlagen und Anwendung zur enzymatischen Durchflußanalyse

D.Janasek, W.Bergmann, B. Fuhrmann und U.Spohn

Institut für Biotechnologie, Martin – Luther – Universität Halle – Wittenberg,

06120 Halle, Kurt – Mothes – Str.3

Registriernummer der Online- Anmeldung: xx1

Poster

Die gasdialytische Abtrennung von Wasserstoffperoxid aus wäßrigen Probenlösungen wurde unter kontinuierlichen Durchfluß - und FIA (Flow Injection Analysis) - Bedingungen systematisch untersucht. Dazu wurde die amperometrische und die chemiluminometrische Durchflußdetektion angewendet. Der Trennschritt führte in beiden Fällen zu einer wesentlichen Erhöhung der Selektivität. So lassen sich insbesondere die bei der chemiluminometrischen Detektion durch leicht reduzierbare Substanzen, wie z.B. NADH, Paracetamol, Harnsäure, reduziertes Glutathion und Ascorbinsäure verursachten Interferenzen vollständig bzw. zum wesentlichen Teil ausschalten. Untersucht wurde der Einfluß der Verweilzeit, der Trennzellengeometrie, der Temperatur, des pH - Wertes und der Pufferzusammensetzung. Sowohl das amperometrische als auch das chemiluminometrische Detektionsverfahren arbeiten bei pH – Werten < 7 nahezu pH – unabhängig. In Phosphat -, Borat - und Bicarbonatpuffern sinkt die Stofftransferrate mit ansteigendem pH – Werten und den Pufferkonzentrationen. Letzteres ist durch die zunehmende Bildung von Perphosphat -, Perborat – und Percarbonat erklärbar. Durch Anwendung kleiner Pufferkonzentrationen und geeigneterer Puffer kann die pH-Unabhängigkeit in den alkalischen pH-Bereich ausgedehnt werden.

Nach Optimierung der Wasserstoffperoxidabtrennung in einer miniaturisierten Membrantrennzelle konnte Wasserstoffperoxid im Bereich zwischen 10^{-7} und 10^{-2} M chemiluminometrisch und zwischen 10^{-5} und 10^{-2} M amperometrisch detektiert werden. Durch die Anwendung des Stopped – Flow – Prinzips auf den Gasdialyseschritt läßt sich die überraschend hohe Empfindlichkeit des automatischen Meßsystems noch weiter erhöhen.

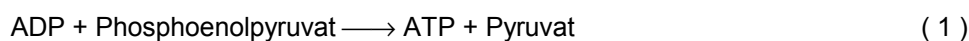
Als besonders aussichtsreich erwies sich die gasdialytisch – chemi-luminometrische Detektion in einem miniaturisierten und mit einem Photonen-countingsystem ausgerüsteten Detektor, mit dem bei kurzen Ansprechzeiten von $T^{90} < 5$ s Nachweisgrenzen um $0.5 \mu\text{M}$ erreicht werden. Dies ermöglicht Analysenfrequenzen von bis zu 100 Bestimmungen pro Stunde. Der vorgeschlagene Detektor arbeitet mit einem Meßzellenvolumen kleiner $5 \mu\text{l}$ und ist deshalb sowohl für FIA - als auch für ausgewählte HPLC – Anwendungen geeignet. Die Chemilumineszenz-detektion beruhte dabei

entweder auf der durch Peroxidase aus *Arthromyces ramosus* oder durch Co(II) katalysierten Oxydation von Luminol. Die Nachweisgrenze der Detektionssysteme wird durch die Untergrundchemilumineszenz der jeweiligen Reagenzien limitiert. Durch umfangreiche Untersuchungen wurden die für lineares Ansprechverhalten der Chemilumineszenz-detektion notwendigen Konzentrations – und pH – Bereiche bestimmt.

Die gasdialytisch – chemiluminometrische Wasserstoffperoxid-detektion wurde auf die Bestimmung von Oxidasesubstraten, wie z.B. L-Lactat, Glucose, Pyruvat und Glycerol - 3- phosphat angewendet, die dann auch in komplexen Proben-lösungen, wie z.B. in Medien von technischen Säugerzellkulturen in einem weiten Bestimmungsbereich zwischen 1 μ M und 10 mM mit sehr hoher Selektivität bestimmt werden können. Die bei der Chemilumineszenzdetektion infolge Bildung hochreaktiver Intermediate sonst immer auftretenden starken Matrixeffekte, hervorgerufen insbesondere durch zahlreiche redoxaktive Substanzen aber auch durch Chelatbildner können praktisch ausgeschlossen werden.

Die Kombination mit nahezu quantitativ arbeitenden und miniaturisierten Enzymreaktoren führt zu sehr robusten und langzeitstabilen Meßanordnungen. Dieses Prinzip wurde auf die *on line* Überwachung einer technischen Tierzellenkultur bezüglich der L-Lactat – und der Glucosekonzentration angewendet.

Die gasdialytisch – chemiluminometrische Detektion wurde auch auf mehrstufige enzymatische FIA – Assays, z.B. die selektive und empfindliche Bestimmung von ADP und ATP angewendet. Beruht die Bestimmung von ADP auf den durch immobilisierte Pyruvatkinase bzw. Pyruvatoxidase aus *Lactobacillus plantarum* katalysierten Reaktionen (1) und (2) basierte die Bestimmung von ATP auf den



durch immobilisierte Glycerolkinase bzw. Glycerol-3-phosphat katalysierten Reaktionen (3) und (4)



ADP und ATP konnten im Bereich zwischen 10^{-4} und 10^{-7} M in einem Medium für die technische Tierzellenkultur bestimmt werden, wobei eine im Vergleich zu Konkurrenzverfahren, z.B. bioluminometrischen Bestimmungsverfahren wesentlich höhere Operationsstabilität erreicht werden konnte.

Die Arbeiten wurden jeweils partiell durch die DFG (Projekt Sp 553/1-2), das Kultusministerium Sachsen – Anhalts und das BMBF gefördert.