

# *Analytik mit $\Delta$ pH-Sensortechnik*

*Anwendungen in der klinischen Chemie  
und Biotechnologie*

*Dr. Lóránt Bucsis*

**SCHLAG**

# ÜBERBLICK

1. **ΔpH-Sensortechnik bei Enzym/Substrat Umsetzungen eröffnet neuen analytischen Weg**
  - 2.1 Messprinzip
  - 2.2 Messgerät, das Modell CL 10 *Plus* MED
  - 2.3 Der Laborautomat MICROLAB® EFA
  
3. **Analytik mit lieferbaren Testkits**

*Drug monitoring bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit*

  - 3.1 „echte“ Acetylcholin-Esterase (AChE)
  - 3.2 Butyrylcholin-Esterase (BuChE)

*Erythrozytären Enzyme zur Überwachung von Anämie, Thalassämie*

  - 3.3 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH)
  - 3.4 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) und 6-Phospho-Gluconat-Dehydrogenase (6PG-DH)
  - 3.5 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase / Pyruvat Verhältnis
  - 3.6 Pyruvatkinase
  - 3.7 Glucose
  - 3.8 L-Lactat

*Infertilitätsuntersuchungen*

  - 3.9 Citronensäure
  - 3.10 Fructose
  - 3.11 L-Carnitin
  
4. **Analytik mit nachvollziehbarer Arbeitsanleitung in der Literatur**
  - 4.1 Lipase
  - 4.2 Kreatinin und Kreatin
  - 4.3 Nucleinsäuren
  - 4.4 Ethanol
  - 4.5 Magnesium
  
5. **Mögliche Analytik mit lieferbaren Testkits aus dem Lebensmittelbereich**
  - 5.1 Alkalische Phosphatase
  - 5.2 Harnstoff
  - 5.3 Glucose und Fructose (in einem Arbeitsgang)
  - 5.4 Ascorbinsäure
  
6. **Ausblick**
  
7. **Fazit**
  
8. **Vertrieb und Kontaktadresse**

## 1. $\Delta$ pH-Sensortechnik bei Enzym/Substrat Umsetzungen eröffnet neuen analytischen Weg

Enzymatische Arbeitsbestecke mit UV-Detektion als Messgröße sind weit verbreitet. Als markanter Nachteil hat sich jedoch die langwierige Probenvorbereitung, besonders in Laboratorien ohne Automaten, herausgestellt. Die Aufarbeitung ist zwingend, da die Lichtabsorption als Messgröße ermittelt wird.

Die handlichen Biosensoren mit immobilisierten Enzymen können, mit Hilfe ihres elektrochemischen Nachweises der Enzym/Substrat-Umsetzung, sehr schnell und direkt aus komplexen Matrices Substrate messen. Allerdings werden nur die gängigsten Substrate erfasst, da allein für eine geringe Anzahl von Messparametern enzymebelegte Membranen zur Verfügung stehen. Ein breiteres Spektrum an messbaren Substraten und Enzymen ermöglicht die Methode, die mit der Enzym/Substrat-Umsetzung gekoppelten pH-Wert-Änderung als Messgröße erfasst. Die Vorgaben, Spezifität einer enzymatischen Umsetzung zur Analytik auszunützen, sowie Detektion dieser in stark mit Bioballast belasteten Materialien ohne (oder mit minimaler) Probenvorbereitung, erfüllt die Methode der  $\Delta$ pH-Sensortechnik.

Dieses Messprinzip wurde in den Modellen **CL 10 Plus MED** und **MICROLAB® EFA** realisiert. Eine große Palette fertig konfektionierter Testkits ermöglicht die einfache und extrem schnelle Analyse von Körperflüssigkeiten wie z.B. Vollblut (!), gereinigte Erythrozyten, Serum, Ejakulat, Gewebehomogenisate sowie im Lebensmittelbereich Milch, Most, Wein, Backwaren etc. auf eine Vielzahl von praxisrelevanten Parametern.

### 2.1 Messprinzip

Enzym/Substrat-Umsetzungen sind meistens auch mit pH-Änderungen verbunden, wobei Produktion oder Verbrauch an  $H^+$  für die Konzentration der zu bestimmenden Zielverbindung in der Probe typisch ist. Ein mit Kapillar-pH-Elektroden ausgerüstetes Multiparameter-Messgerät bestimmt die pH-Werte vor und nach der Umsetzung. Aus der resultierenden pH-Differenz wird dann auf den fraglichen Probeninhaltsstoff oder auf das Enzym gefolgert.

Praktisch bedeutet dies: mit  $\Delta$ pH-Messungen können im Grunde genommen alle biochemischen Übergänge, die mit pH-Änderung einhergehen, quantifiziert werden, z.B. besonders bei Reaktionen wie:



**Umsetzungen die mit  $ATP \rightarrow ADP$  Übergängen gekoppelt sind ( $\rightarrow$  pH-Änderung )**

**Produktion von Carbonsäuren, Abbau von Carbonsäuren ( $\rightarrow$  pH-Änderung )**

**Abbau von Protein und Aminosäuren ( $\rightarrow$  pH-Änderung )**

**Veresterungen und Verseifungen inkl. Lipolyse ( $\rightarrow$  pH-Änderung )**

Selbstverständlich kann die zu bestimmende Entität auch die Aktivität eines Enzyms sein.

Der Wunsch in einem Arbeitsvorgang zwei Substrate oder die Aktivität von zwei Enzymen zu messen, wird durch die sog. „Doppelstarter-Technik“ möglich. Dabei wird zuerst die Probe in Reaktionskammer bzw. Systempuffer einpipettiert und der  $\Delta$ pH als Basiswert gemessen. Durch die Zugabe des ersten Starters (Enzym oder Substrat je nach Fragestellung) wird die erste Reaktion ausgelöst. Nach Ablauf der Umsetzung und erneuter  $\Delta$ pH-Messung wird der zweite

Starter aufgegeben und die zweite  $\Delta\text{pH}$ -Änderung registriert. Zu Ergebnisberechnung lassen sich die  $\Delta\text{pH}$  oder  $\Delta\text{pH}/\Delta t$  Werte endpunktmässig, kinetisch oder nach Fixzeit verwerten. Ein Beispiel der Doppelstarter-Technik ist die Bestimmung der erythrozytären Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase- und 6-Phospho-Gluconat-Dehydrogenase Bestimmung in einem Arbeitsgang (Kap. 3.4). Die Grenzen dieser Doppelstartertechnik liegen in der Einschränkung, dass für die zu bestimmenden Zielverbindungen der gleiche Arbeitspuffer, das gleiche Probenvolumen sowie die gleiche Temperatur in der Messkammer gelten muss.

## 2.2 Messgerät, das Modell CL 10 *Plus* MED

Die praktische Realisierung des Messverfahrens wird am halb-automatischen Analysator Modell CL 10 der Firma Eurochem/Italien dargestellt. Kapitel 2.3 enthält die Beschreibung der voll-automatischen Variante MICROLAB<sup>®</sup> EFA.



Abb. 1: Enzymanalysator Modell CL 10 *Plus* MED

Das „Herzstück“ des innovativen Messinstrumentes CL 10 bilden die zwei Kapillar-Glas-Elektroden, die zur Messung von pH-Differenzen von  $< 0,0005$  (!) pH-Einheiten ausgelegt wurden. Zur Vermeidung von Missverständnissen sei darauf hingewiesen, dass zwischen den parallel geschalteten Elektroden pH-Differenzen und nicht absolute pH-Werte gemessen werden. Über die serielle RS 232 Schnittstelle ist das CL 10 mit einem separaten PC verbunden, damit die systemeigene Windows Software die Substratkonzentrationen oder Enzymaktivitäten berechnen kann. Die Reaktion wird dabei parameterspezifisch durch eine geeignete Methode (kinetisch, Endpunkt oder Fixzeit) ausgewertet. Programmierbare Inkubationszeiten und Ableseintervalle während des Reaktionsverlaufs bieten dem Anwender die Möglichkeit zur eigenen Messmethoden Entwicklung und Optimierung. Die typischen Messzeiten für Parameter aus der medizinischen Analytik liegen zwischen 1-2 Minuten. Dabei ist der zeitliche Verlauf des  $\Delta\text{pH}$ -Wertes auf dem Bildschirm stets bildlich und zahlenmäßig nachvollziehbar.

Die Analyse ist weitgehend matrixfrei, weil hier das Reaktionsgeschehen nicht durch Messung der UV-Absorption, sondern durch Messung von pH-Differenzen ermittelt wird. Trübes Probenmaterial mit Partikeln bis zu 0,3 mm Durchmesser stören den Messvorgang nicht. Aus diesem Grund ist der Einsatz des CL 10 auf dem weiten Feld der human- und tiermedizinischen Analytik extrem vorteilhaft.

### Messablauf - Endpunkt Methode

Wenn in Folgenden über „Arbeitspuffer“ gesprochen wird, so ist das folgendermaßen zu verstehen: der Testkit-Arbeitspuffer hat nur eine minimale Pufferkapazität (mmol/l Bereich), um einerseits vor der eigentlichen Messung eine reproduzierbare Basislinie zu erzeugen. Andererseits soll die kleine Pufferkapazität doch ermöglichen, pH-Differenzen während enzymatischer Umsetzungen zu monitoren.

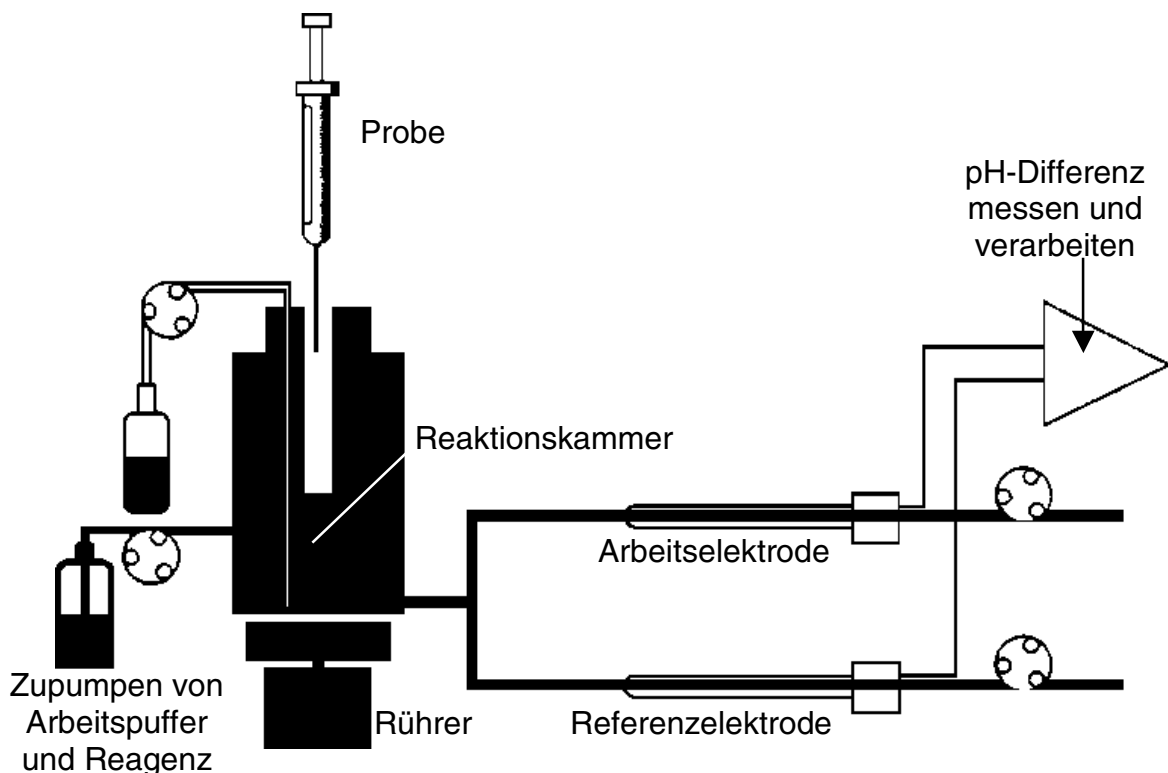


Abb. 2: Schematische Darstellung des enzymatischen  $\Delta$ pH-sensorischen Messgerätes.

### Blankwert

Hierzu füllt eine Pumpe die Reaktionskammer mit dem Arbeitspuffer. Mit der 1. Hälfte des Kammerinhalts werden beide Elektrodenräume geflutet. Anschließend wird die Differenz zwischen beiden Elektroden gemessen. Nachdem die Differenz einen konstanten Wert erreicht hat, wird dieser Wert gespeichert BW (Blankwert).

### Reagenzienleerwert

Dann fördert eine Pumpe das Reagenz z.B. das Enzym (kann auch das Substrat sein, je nach Fragestellung) - quasi als Probe - in die Reaktionskammer, aus der nach Mischen, die 2. Hälfte des Kammerinhalts (Arbeitspuffer + Enzym) nur in einen der beiden Elektrodenräumen geleitet wird. Nach kurzer Zeit stellt sich die neue pH-Differenz RW ein. RW - BL ist der Rea-

genzienleerwert  $D_1$ . Dieser wird als Korrektur für die anschließenden Probenmessungen gespeichert (Reagenzienleerwert).

### **Kalibrationsvorgang**

Beim Kalibrationsvorgang wird in die mit dem Arbeitspuffer gefüllte Reaktionskammer 10-50  $\mu\text{l}$  Standardlösung (kann Substrat oder Enzym sein) pipettiert und nach Mischen die 1. Hälfte der Arbeitspuffer + Standard - Mischung in beide Elektrodenräume geleitet und die pH-Differenz erneut gemessen ( $D_2$ ).

Zu der restlichen 2. Hälfte wird das Enzym (kann auch ein Substrat sein, je nach Fragestellung) zudosiert, gemischt und die Mischung - Arbeitspuffer + Standard + Enzym - nur in einen der Elektrodenräume gepumpt. Dann beginnt der  $\Delta\text{pH}$ -Wert zwischen den Elektroden zu wachsen oder zu sinken und nimmt zu bis einem bestimmten, konstanten Endwert  $D_3$ .

Das Messergebnis, das zur Probenbewertung herangezogen wird, resultiert aus:

$$\Delta\text{pH Kalibrationswert} = D_3 - D_2 - D_1$$

### **Messvorgang bei der Probe**

Bei Aufgabe von 10-50  $\mu\text{l}$  Probe läuft das gleiche Muster ab wie bei der Kalibration. Abgelesen wird, nachdem die  $\Delta\text{pH}$ -Messkurve keine Steigung mehr zeigt (Endpunktmethode).

Die Berechnung erfolgt nach der allgemeinen Formel:

$$\text{Konzentration der Zielverbindung} = \Delta\text{pH-Probenwert} \times \text{Steigung der Kalibriergerade}$$

Die Auswertung und Arbeitsführung erfolgt vollautomatisch über einen Rechner, so dass eine  $\Delta\text{pH}$  sensorische Messung 30-120 Sekunden dauert, wobei man routinemäßig nach 30-40 Proben eine Zwischenkalibrierung und Leerwertkontrolle vornehmen sollte. Die enorm kurzen Messzeiten, die für enzymatische Messungen ganz ungewöhnlich sind, machen Probendurchsätze bis zu 60 Proben pro Stunde möglich.

Nach Ablauf der Messungen können die Ergebnisse entweder direkt als Arbeitsliste, oder – nach Datenexport – in einer Excel Tabelle zusammengefasst, ausgegeben werden.

### **Messablauf - kinetische Methode**

Der Messablauf und die kinetische Endpunkterkennung wird bei Acetylcholin-Esterase, Kapitel 3.1 behandelt.

Methodenbedingt weist die  $\Delta\text{pH}$ -Methode die folgenden wichtigen arbeitsökonomischen Vorteile auf:

1. keinerlei Probenvorbereitung erforderlich
2. radikal verkürzte Messzeiten im Vergleich zu anderen Messmethoden
3. minimaler Materialverbrauch an wertvollen biologischen Suspensionen

## **2.3 Der Laborautomat MICROLAB® EFA**

Als nächstes wird der Laborautomat MICROLAB® EFA vorgestellt, zumal diese technische Weiterentwicklung des Grundgerätes Modell CL 10 *Plus* MED maßgebende Gründe bei der IFL IDF zur Normierung von enzymatischen  $\Delta\text{pH}$ -Methoden (für die Milchanalyse) lieferte.

Das MICROLAB® EFA ermöglicht zur Zeit die automatische Messung von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH, siehe Kapitel 3.3) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) / 6-Phospho-Gluconat-Dehydrogenase (6PG-DH) Verhältnis (siehe Kapitel 3.4). Weitere

Adaptionen der für das Modell CL 10 *Plus* MED konzipierten Parameter sind möglich.

Laborroboter dienen in steigendem Maße der Qualitätserhöhung bei analytischen Arbeiten und ermöglichen größere Probenaufkommen zu analysieren. Ziel bei der Entwicklung des hier dargestellten Laborautomaten MICROLAB<sup>®</sup> EFA war es, möglichst viele Arbeits- und Auswertungsschritte zu automatisieren. Dadurch wird die Notwendigkeit des menschlichen Eingreifens, als Quelle von Fehlern, weitgehend vermieden.

Das System basiert auf bewährte Automatisierungstechniken der Firma Hamilton, die über weitreichende Erfahrungen als Hersteller von Dosieranlagen für Laborautomatisierung verfügt.

Insgesamt ist das System so konzipiert, dass es rund um die Uhr fehlerfrei durcharbeitet. Es handelt sich also um kein Gerät, das einer ständigen Kontrolle unterliegen muss, Abb. 3.

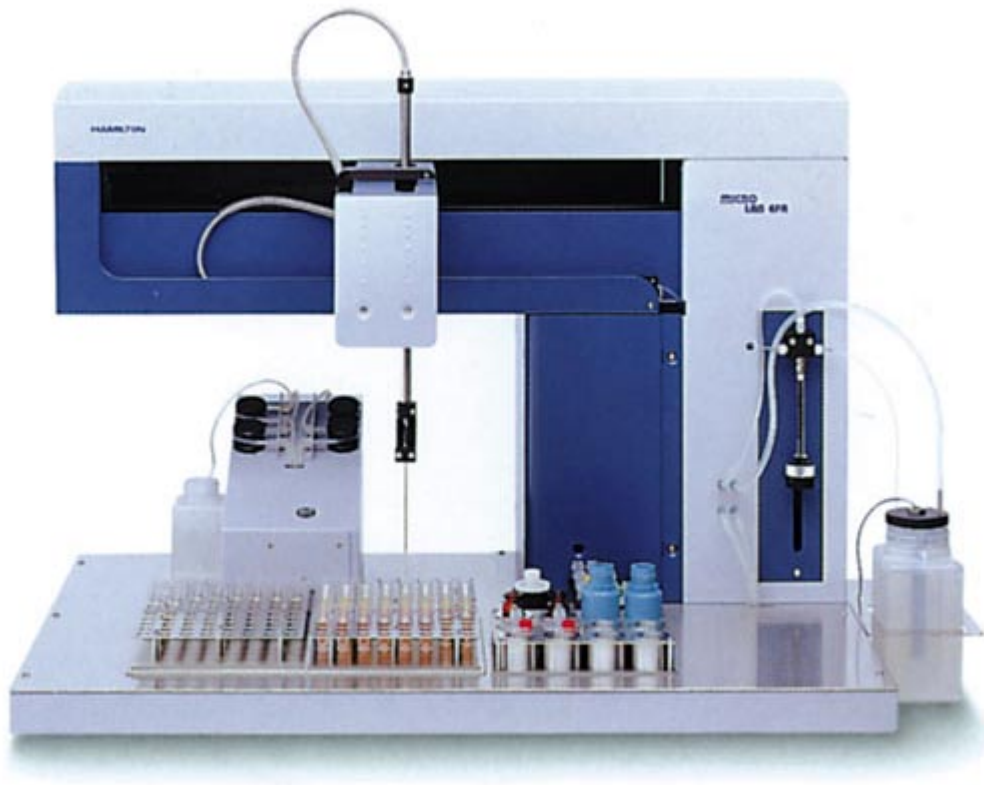


Abb. 3: Das vollautomatisierte MICROLAB<sup>®</sup> EFA

Der Laborautomat besteht aus drei miteinander verbundenen Einheiten: 1.  $\Delta$ pH-Messgerät als Messeinheit, 2. Pipettiereinheit als Bedien-Einheit (Präanalytik) und 3. Registrierungseinheit (separater Computer mit spezieller Software) zur Methoden Steuerung, Ergebnisdarstellung und Dokumentation.

### **Messeinheit**

Die Messeinheit ist weitgehend identisch mit dem CL 10 Messgerät, sie führt die eigentliche Analyse aus. Die wichtigsten Merkmale wurden vorangehend bereits besprochen.

### **Pipettiereinheit**

Die Pipettiereinheit kann alle Reagenzien und Proben, die zur enzymatischen Analyse notwendig sind, mit einer Dosiernadel automatisch ansteuern, sie aus den Vorratsbehältern ansaugen und in die Reaktionskammer hinein pipettieren. Die aktuellen Flüssigkeitsniveaus in den Behältern

werden durch eine Induktionsschleife über die Leitfähigkeit der Proben und Reagenzien erkannt. Die Pipettiereinheit führt durch die Dosiernadel sehr exakte Volumendosierungen aus und verdünnt mitunter auch Proben. Darüber hinaus kann sie Mischungen herstellen, die außerhalb der Reaktionskammer, in einem anderen Behälter, vorbereitet werden müssen. Auch ein Reinigungsschritt vorhanden: Die Dosiernadel wird, um keine Kreuzkontamination zu verursachen, zwischen den einzelnen Schritten gewaschen. Positionierfehler, die bei manueller Ausführung von Serienuntersuchungen leicht unterlaufen, werden durch das automatische Pipettieren völlig vermieden.

### **Registriereinheit**

Die Registriereinheit besteht aus einem externen Rechner und maßgeschneiderter Software. Die letztere ist für Methodensteuerung, Ergebnisdarstellung und Dokumentation zuständig. Zur Methoden Steuerung ruft der Anwender eine bereits erstellte Arbeitsmethode auf. Die ausgewählte Methode enthält alle grundlegenden Verfahrensparameter wie Reagenzienpositionen, auszuführende Verdünnungen, Inkubationszeiten, Reaktionsschema, Auswertemethode (Endpunkt, kinetische oder Fixzeit-Auswertung), Vorlauf- und Ableseintervalle und Messzeit. Eingblendete Hilfetexte erläutern kurz jeden möglichen Einstellpunkt der Methode.

Zwei generelle Verfahren zur Ausführung von Messungen gibt es: man entscheidet sich entweder für die Sofortanalyse, die sich für kleine Probenserien eignet, oder man erstellt sogenannte Arbeitsprofile. Hier lassen sich Proben auf verschiedene Parameter automatisch sequentiell abarbeiten.

Das vollautomatische MICROLAB<sup>®</sup> EFA wird durch einen externen Rechner mit einer speziellen Software gesteuert. Alle Daten während des Messprozesses werden sofort in eine Datenbank abgelegt. Ferner stehen diese Daten auch in der Microsoft Excel Tabellenkalkulation zur Verfügung. Damit kann der Anwender individuelle Berechnungen und statistische Auswertungen vornehmen.

### **Dokumentation**

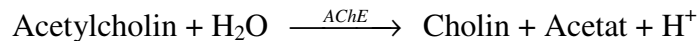
Die Probenkennndaten werden vor der Messung erfasst und im Messreport dokumentiert. Der fertige Report kann je nach Wunsch gedruckt und/oder gespeichert werden. Da die Messdaten auch in eine Microsoft Excel Datei geschrieben werden, besteht dadurch die Möglichkeit, weitergehende Berechnungen oder eigendefinierte Einheiten vorzunehmen.

### 3. Analytik mit lieferbaren Testkits

#### *Drug monitoring bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit*

##### 3.1 „Echte“ Acetylcholin-Esterase Bestimmung

Die Ausführung der („echten“) Acetylcholin-Esterase (AChE) Bestimmung beruht auf der enzymatischen Wirkung von AChE auf die Hydrolyse von Acetylcholin zu Essigsäure:



Nach Zugabe von Acetylcholin als Starter und nach der Anlaufphase wird die Geschwindigkeit der  $\text{H}^+$ -Entwicklung gemessen.

##### **Messablauf - kinetische Methode**

In der Abb. 4 ist ein typischer  $\Delta\text{pH}$ -Verlauf bei Vollblutuntersuchung zu sehen.

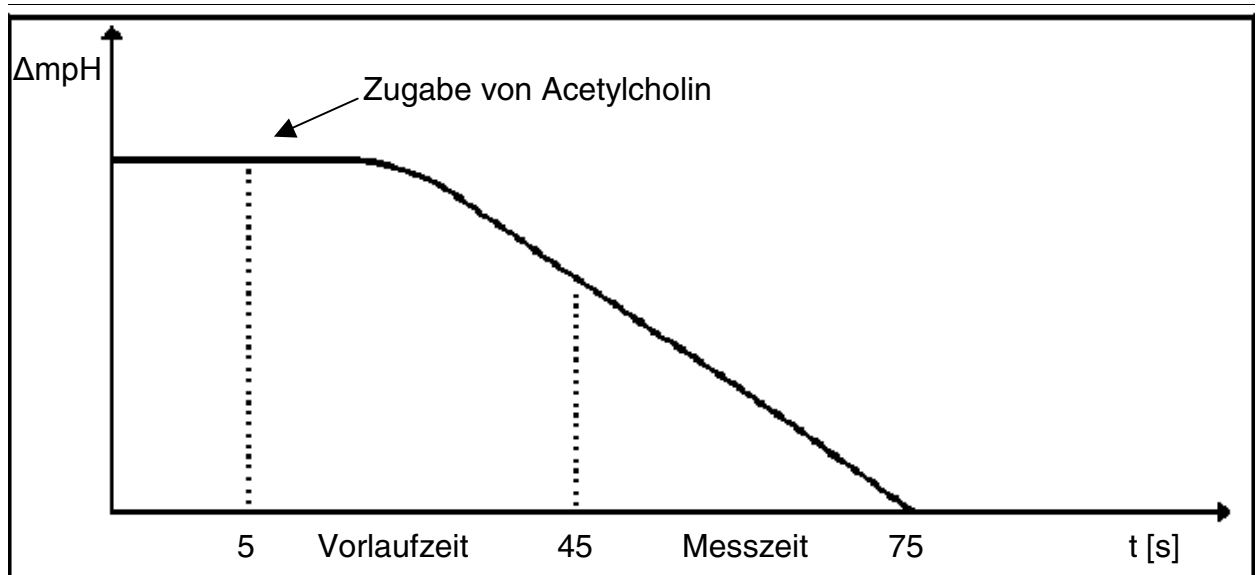


Abb. 4: Bestimmung von erythrozytären AChE in Vollblut. Typischer  $\Delta\text{pH}$  Verlauf.

Nach Einpipettieren der Probe in die Messkammer wird der Messvorgang gestartet. Nach 5 s Wartezeit wird die Substrat-Lösung (Acetylcholin) aus dem Vorratsbehälter in die Mischkammer gepumpt. Bedingt durch Hintergrundreaktionen und dadurch verursachter, nicht deutbarer, Reaktionsverlauf wird noch 40 s gewartet. Ab der 45. bis zu 75. Sekunde ist die pH-Abnahme linear. Dieser Bereich dient zur kinetischen Auswertung.

Die AChE-Aktivität wird ausgedrückt als  $\mu\text{mol}$  Essigsäure, die pro Minute freigesetzt werden:

$$\text{AChE}_{\text{Aktivität}} = \text{Steigung} \times \beta \times d \times s$$

Steigung = Steigung der Messgerade

$\beta$  = Pufferwert des Arbeitspuffers

$d$  = Probenverdünnung (Verhältnis von Mischkammer-/Probenvolumen)

$s$  = stöchiometrisches Verhältnis (freigesetzte Mol  $\text{H}^+$  pro Mol hydrolysiertes Acetylcholin)

Ein Beispiel:

Steigung = 11,4 ΔpH/min; β = 6,1 mmol/l x ΔpH; d = 99 Probenverdünnung (Mischkammer 990 μl, Vollblut 10 μl); s = 1

$$\frac{11,4 \Delta\text{pH}}{\text{min}} \times \frac{6,1 \text{ mmol}}{\text{l } \Delta\text{pH}} \times 99 \times 1 = 6684 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min l}}$$

Daraus ergibt sich eine AChE-Aktivität von 6684 E/l.

Die kinetische Messung des erythrozytären AChE kann in Voll-, Kapillarblut (EDTA oder Heparin) oder gewaschenen Erythrozyten erfolgen.

Die spezifische Abgrenzung von erythrozytärem, „true“ AChE gegenüber Aktivität der Plasma-Cholinesterase (pseudo-ChE) macht die Zugabe von Quidininsulfat in den testeigenen Arbeitspuffer möglich. Quidininsulfat inhibiert vollständig die Plasma-ChE. Die Messung dauert zusammen mit der Lyse der Zellmembranen und Vorlaufphase nur 75 Sekunden.

Die Probenvorbereitung entfällt. Der mögliche direkte Einsatz von Voll- oder Kapillarblut reduziert den Arbeitsaufwand enorm.

Ausgetestetes, lieferbares Blutmaterial sichert die Untersuchung ab.

Die angewendete kinetische Endpunkterkennung sichert grundsätzliche Vorteile zu: die Leerwert-Bestimmung und Kalibration entfallen (die Steigung ist im Beipackzettel des Kits angegeben).

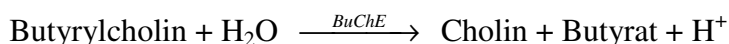
Die AChE-Bestimmung durch die ΔpH-Sensortechnik erwies sich als einfache, schnelle, zuverlässige und nichtinvasive Analysenmethode bei pharmakodynamischen Untersuchungen des AChE-Hemmers Eptastigmin in unterschiedlichen Gewebematerialien von Alzheimer Patienten. In den gleichen Studien wurde auch Butyrylcholin-Esterase in Vollblut, durch die Hydrolysenaktivität auf Butyrylcholin, erfasst (s. 3.2).

Probenmaterial	Messzeit	Probenbehandlung	Referenzwerte	Linearität	Präzision
Vollblut Gehirnextrakte	70 s	keine	5250- 9205 U/l	400-20000 U/l	± 200 U/l

Eur. J. Clin. Pharmacol. 50 (1996) 425-427

### 3.2 Butyrylcholin-Esterase Bestimmung

Die Aktivität der Butyrylcholin-Esterase (BuChE) im Blutplasma wird durch Zugabe von Butyrylcholin als Substrat bzw. durch die nachfolgende H<sup>+</sup> Produktion erfasst.



Als Probenmaterial wird 10 μl kapillares oder venöses Vollblut eingesetzt. Der Arbeitspuffer enthält kein Quidininsulfat und zur Optimierung der Reaktion wurde ein anderer Arbeitspuffer entwickelt (vgl. 3.1).

Kontrollhämolyse RBC-Enzym<sup>TM</sup> ist erhältlich.

Probenmaterial	Messzeit	Probenbehandlung	Referenzwerte	Linearität	Präzision
Vollblut Plasma	70 s	keine	4031-7622 U/l 6248-12902 U/l	500-20000 U/l	± 250 U/l

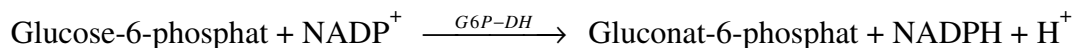
Eur. J. Clin. Pharmacol. 50 (1996) 425-427

## *Erythrozytären Enzyme zur Überwachung von Anämie, Thalassämie*

### 3.3 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Bestimmung

Bei den meisten photometrischen Verfahren zur Ausführung von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) Messungen im Blut stört 6-Phospho-Gluconat-Dehydrogenase (6PG-DH) die Bestimmung erheblich. Dagegen können durch die  $\Delta$ pH-Metrie Vollblut oder gewaschene Erythrozyten völlig problemlos analysiert werden.

Die Grundlage der Analyse bildet die Umsetzung von G6P-DH mit Glucose-6-phosphat als Substrat, wobei dem Probematerial zugesetztes Coenzym  $\text{NADP}^+$  ständig verbraucht wird. Demzufolge senkt der produzierten  $\text{H}^+$  den pH-Wert. Der resultierende Aciditätszuwachs ist der Enzymaktivität in der Probe proportional (kinetische Auswertung).



Entsprechend der WHO empfohlene Methodik wird die endogene 6PG-DH-Aktivität bei der Auswertung als Blindwert automatisch in Abzug gebracht. Statistische Vergleiche zwischen  $\Delta$ pH-metrischem Vorgehen und der WHO-Methodik weisen hohe Korrelationsraten aus. Zur Eigenkontrolle steht ein flüssiges Hämolytat RBC-Enzy<sup>TM</sup> als Kontrollmaterial zu Verfügung.

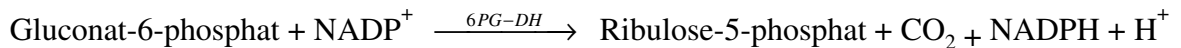
Probenmaterial	Messzeit	Probenbehandlung	Referenzwerte	Linearität	Präzision
Vollblut, Erythrozyten Gesunde Männer Mikrozytemische Männer	50 s	keine	9,4-17,8 U/g Hb 15,3-30,5 U/g Hb	150 – 20 000 U/l	± 90 U/l

Clin. Chem. 33 (1987) 579-582, Haemat. 75 (1990) 397-399

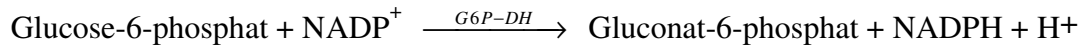
### 3.4 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) und 6-Phospho-Gluconat-Dehydrogenase (6PG-DH) Bestimmung

Das technisch methodisch gegebene Anwendungspotential des CL 10 *Plus* MED offenbart sich an der Möglichkeit, in einem Arbeitsvorgang zwei Enzyme (auch Substrate!) zu bestimmen.

Zuerst wird die 6PG-DH Aktivität ermittelt, durch Messung der pH-Änderung, die bei der Oxidation von zudosierem Gluconat-6-phosphat und  $\text{NADP}^+$  zu Ribulose-5-phosphat,  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}^+$  erfolgt:



Anschließend wird die G6P-DH-Aktivität gemessen. Dem Probenmaterial zugegebenes Glucose-6-phosphat und  $\text{NADP}^+$  setzen sich in Gegenwart von G6P-DH zu Gluconat-6-phosphat, NADPH und  $\text{H}^+$  um.



Aus der kinetischen Auswertung der kaskadisch verlaufenden  $\text{H}^+$ -Produktionen resultieren die Ergebnisse der beiden Parameter. Sinngemäß wird bei der Auswertung der G6P-DH-Aktivität die pH-Abnahme, verursacht durch die erste Reaktion, automatisch in Abzug gebracht.

Die Messdauer, inklusive der Vorlaufphasen, liegt etwa um zwei Minuten.

EDTA- und Citrat-Vollblut, Kapillarblut (10-25  $\mu\text{l}$ ), gewaschene Erythrozyten sind direkt einsetzbar. Die methodisch notwendige Hämolyse erfolgt in situ, bei Zugabe der Probe in den Systempuffer, dem der lysierende Agens zugefügt ist.

Gegenüber den konventionellen Methoden bietet die  $\Delta\text{pH}$ -Methode bei der Untersuchung von erythrozytären Enzymen, - G6P-DH, 6PG-DH, PK - auch den bemerkenswerten Vorteil, dass das sonst störende Hämoglobin den Messvorgang nicht beeinflusst, d.h. Probenvorbereitung wie Eiweißfällung, externe Lyse usw. entfällt.

Ergänzend zum Testkit steht getestetes Bluthämolysat für beide Parameter zur Verfügung.

	Messzeit	Probenbehandlung	Referenzwerte	Linearität	Präzision
Methode	120 s			G6P-DH 150-20000 U/l	Quotient G6P-DH/6PGDH $\pm 0.035$
				6PD-DH 100-20000 U/l	
Vollblut Erythrozyten		keine keine	G6P-DH/6PGDH 0,93-1,72		

Eine tabellarische Zusammenfassung von normalen, mischerbigen, nicht-,  $\beta$ - und  $\alpha$ -thallasämischen Patienten mit den zugehörigen Angaben zu Geschlecht, Phenotyp, Variant bzw. G6P-DH, 6PG-DH Werten und deren Quotient enthält das Beipackzettel des Testbestecks.

Eur. J. Chem. Clin. Biochem. 34 (1996) 431-438

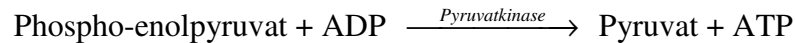
### 3.5 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase / Pyruvatkinase Verhältnis Bestimmung

Entsprechend aktuellsten Veröffentlichungen können auch die beiden Enzyme G6P-DH und Pyruvatkinase (s. 3.5) mit der Doppelstarter-Technik in einem Messvorgang erfasst werden. Der Quotient G6P-DH / PK ist ein zuverlässiger Indikator für den G6P-DH Mangel bei mischerbigen Patienten mit mikrozytämischer Anämie. Das Messergebnis ist zuverlässiger als die Quantifizierung von G6P-DH alleine. Die Bestimmung erfolgt in Vollblut.

Clin. Biochem. 37 (2004) 863-866

### 3.6 Pyruvatkinase Bestimmung

Die kinetische Messung von Pyruvatkinase-Aktivität (PK) wird, durch Umsetzung von Phospho-enolpyruvat in Pyruvat und Übertragung des Phosphatrestes an ADP hervorgerufene pH-Zunahme, erfasst.



Durch die Reaktion verursachte pH-Änderung ist der PK-Aktivität in der Probe proportional. Als Probenmaterial können isolierte Erythrozyten oder Vollblut eingesetzt werden.

Die aufgrund der anschließenden Reduktion des Pyruvats zu Lactat durch erythrozytären Lactat-Dehydrogenase verursachte pH-Änderung wird, entsprechend der ICSH empfohlenen Methodik, von dem Messwert automatisch abgezogen. Eine Zugabe von Pyruvat in den Systempuffer verhindert, dass die Pyruvatreduktion zu Lactat zum kinetikbestimmenden Schritt wird.

Weil die  $\Delta\text{pH}$ -metrische Analytik durch die Farbe des eingesetzten Probenmaterials nicht beeinflusst wird, ist die Methode geeignet, die PK-Aktivität direkt auch in Vollblut zu bestimmen. Jedoch stören in diesem Fall die Leukozyten die Bestimmung der Erythrozyten-Aktivität, d.h. die restlose Entfernung der Leukozyten zur Messung ist unerlässlich.

Die bekannte „Goldstandard“-Methode zur Feststellung von erythrozytären PK-Mangel mit Laborautomaten ist sehr gut reproduzierbar, jedoch nachteilig, hauptsächlich wegen der separaten Blindwerterfassung ohne ADP. Im Vergleich dazu zeichnet sich die  $\Delta\text{pH}$ -Methode durch exaktere Ergebnisse und kürzere Probenbehandlung aus.

Lieferbares Kontrollhämolyt RBC-Enzy<sup>TM</sup> ist empfehlenswert und kann zur Eigenkontrolle dienen.

Probenmaterial	Messzeit	Probenbehandlung	Referenzwerte	Linearität	Präzision
Vollblut, Erythrozyten	70 s	keine	26,5 – 48,7 U/ g Hb	400 – 20 000 U/l	± 200 U/l

Clin. Chem. 39 (1993) 512-516

### 3.7 Glucose Bestimmung

Das angebotene Arbeitsbesteck nützt die Umsetzung von Glucose durch Hexokinase und ATP zu entsprechendem Glucose-6-phosphat aus. Der resultierende Glucose-phosphorsäureester und ADP sind zusammen acider als die ATP alleine vor der Umsetzung war. Die  $[\text{H}^+]$ -Zunahme ist dem Hexosegehalt proportional. Messzeit um 30 Sekunden.



Vergleichende Untersuchungen von allen drei Blutmaterialien Vollblut, Plasma und Serum zeigen gute Übereinstimmung mit der FDA-Referenzmethode die, die quantitative Bestimmung von Glucose vorgibt (Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase).

Probenmaterial	Messzeit	Probenbehandlung	Referenzwerte	Linearität	Präzision
Vollblut			60 – 95 mg/dl		
Plasma	30 s	keine	70 – 105 mg/dl	10 – 1000 mg/dl	± 4 mg/dl
Serum			70 – 105 mg/dl		
Urin			1 – 15 mg/dl		

Da auch Matrix beladene Proben wie Vollblut in der Untersuchung einsetzbar sind, liegt es nahe, die Methode auch bei lipämischen, ikterischen Materialien anzuwenden.

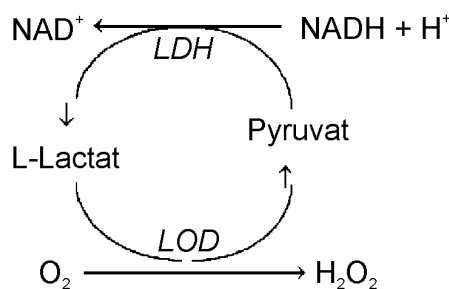
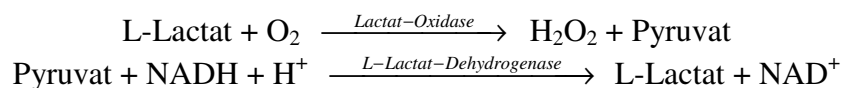
Dort, wo in der Probe mit Abwesenheit von Glucose gerechnet werden kann, kann das Besteck zu alleiniger Fructose-Bestimmung dienen. Grund: die Hexokinase-Reaktion erfasst auch Fructose.

Clin. Chem. 30 (1984) 556-559

Auf die Möglichkeit bei medizinisch-biochemischen Fragestellungen Glucose **und** Fructose individuell in einem (!) Arbeitsvorgang zu bestimmen, wird in Kap. 5.3 näher hingewiesen.

### 3.8 Lactat Bestimmung

Dem Arbeitsprinzip der  $\Delta$ pH-sensorischen Lactatbestimmung liegen zwei enzymatische Teilschritte zugrunde.



Zunächst wird L-Lactat mit Lactat-Oxidase schnell und vollständig in Pyruvat überführt. Dann, in dem eigentlichen Bestimmungsschritt, reduziert das zugesetzte L-Lactat-Dehydrogenase /NADH H<sup>+</sup>-System Pyruvat in einer langsamen Folgereaktion zu L-Lactat. Gemessen wird der kinetische Verbrauch an H<sup>+</sup> am Anfang des zweiten Teilschrittes. In dieser Phase liegt (noch) keine nennenswerte Menge an „in situ erzeugter“ Milchsäure vor, die diese Messung beeinflussen könnte.

Für Bestimmungen eignen sich arterielles oder venöses Vollblut sowie Kapillarblut. Die Probenvorbereitung entfällt und 15  $\mu$ l Probenmaterial reichen aus. Standardeinstellungen zur Bestimmung: Messdauer 45 s, davon 15 s Vorlaufzeit und 30 s eigentliche Messzeit.

Zur Zeit laboriert man an der Optimierung eines zusätzlichen Arbeitsbestecks zur Erfassung des D-Lactatisomeren. Dadurch wird in der medizinischen Mikrobiologie die Erfassung der Ge-

samtmilchsäure bzw. die Differenzierung beider Milchsäuren möglich.

Probenmaterial	Messzeit	Probenbehandlung	Referenzwerte	Linearität	Präzision
Vollblut	35 s	keine	1 mmol/l	0,5-20 mmol/l	±0,25 mmol/l

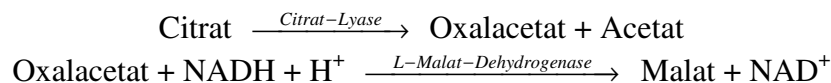
Acta Diabetol. 27 (1990) 129-138

### Infertilitätsuntersuchungen

Bei der Diagnose männlicher Infertilität werden Citrat, Fructose und Carnitin, als Hauptmarker für Samenblasen, Prostata und Epididymis angesehen und deren Untersuchung von WHO empfohlen. Der Nachweis der Marker dient auch zu klinischen Zwecken, in dem sie die physiologisch-sekretorische Antwort nach Simulation der Keimdrüsen widerspiegeln. Als Probenmaterial dienen Seminalplasma oder Ejakulat. Das letztere kommt ohne Eiweißfällung direkt zur Analyse. Die Schnelligkeit und der niedrige Materialbedarf (10-50 µl) sind weitere Vorteile der Methode.

### 3.9 Citronensäure Bestimmung

Die Grundlage der Bestimmung ist die enzymatische Spaltung des Citrats durch Citrat-Lyase und die anschließende Reduktion des entstanden Oxalacetats durch Malat-Dehydrogenase und NADH + H<sup>+</sup>.



Durch die Reaktionsfolge verursachte [H<sup>+</sup>]-Abnahme ist der Citronensäure-Konzentration in der Probe proportional.

Probenmaterial	Messzeit	Probenbehandlung	Referenzwerte	Linearität	Präzision
Ejakulat Seminalplasma	90 s	keine	350-670 mg/dl	10-1000 mg/dl	±5 mg/dl

Clin. Biochem. 30 (1997) 143-148

### 3.10 Fructose-Bestimmung

Fructose wird durch das Enzym Hexokinase und ATP zu Fructose-6-phosphat unter gleichzeitiger Bildung von H<sup>+</sup> und ADP phosphoryliert.



Der Anstieg der  $H^+$ -Konzentration ist der Fructosekonzentration in der Probe direkt proportional. Vorhandene Glucose stört. Die spezifische Beseitigung von Glucose mit Glucokinase, vor der Umsetzung von Fructose, unterdrückt den störenden Einfluss.



Der Testkit enthält auch ein homogenisierendes Reagenz, so wird der Fructosegehalt restlos erfasst.

$\Delta$ pH-Sensortechnik eröffnet einen methodisch neuen Weg zur Messung von Fructose-Initialwert, Fructose-Index bzw. zeitbedingte Veränderung des Fructosespiegels im Sperma in Zusammenhang mit weiteren Parametern.

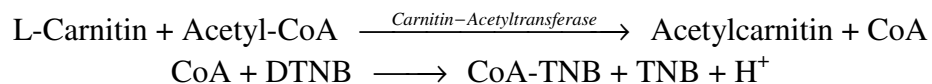
Zur differenzierender Messung von Glucose und Fructose in einem Arbeitsgang sei auf Kap. 5.3 hingewiesen.

Probenmaterial	Messzeit	Probenbehandlung	Referenzwerte	Linearität	Präzision
Ejakulat Seminalplasma	120 s	keine	150-450 mg/dl	10-1000 mg/dl	±4 mg/dl

Clin. Biochem. 30 (1997) 143-148

### 3.11 L-Carnitin Bestimmung

Die Bestimmung beruht auf der Umsetzung von Carnitin mit Acetyl-CoA zu Acetylcarnitin und freiem CoA. Als Enzym wird dabei Carnitin-Acetyltransferase eingesetzt. Das produzierte freie CoA reagiert dann mit dem Ellman's Reagenz (DTNB) unter Freiwerden von  $H^+$ . Zur Versuchsauswertung wird der kinetische  $\Delta$ pH-Verlauf herangezogen.



Thiolgruppen von Proteinen und freie Aminosäuren beeinflussen die  $\Delta$ pH-sensorische Messung nicht. Die möglichen Kreuzreaktionen werden dadurch herausgemittelt, dass in beiden Elektrodenräumen (um die Arbeits- und Referenzelektrode) die gleichen Nebenreaktionen ablaufen.

Probenmaterial	Messzeit	Probenbehandlung	Referenzwerte	Linearität	Präzision
Seminalplasma	70 s	keine	150-500 $\mu$ mol/l	100-2000 $\mu$ mol/l	±50 $\mu$ mol/l

Grundsätzlich ist die Möglichkeit gegeben, Carnitin in Serum, Harn, Nahrung- und Futtermitteln, Muskel- und weiteren Gewebehomogenisaten bei muskulärem und systematischem Carnitinmangel zu untersuchen.

Clin. Biochem. 30 (1997) 143-148

## 4. Analytik mit nachvollziehbarer Arbeitsanleitung in der Literatur

Zu den nachfolgend in wichtigsten Wesenszügen vorgestellten Enzym- oder Substratmessungen werden z.Zt. keine Testbestecke kommerziell angeboten. Jedoch enthalten die zitierten Fachartikel ausführliche Angaben über die Versuchsausführung. In diesen Quellen werden die medizinischen Fragestellungen abgehandelt und durch Literaturübersichten ergänzt. Die Zusammenstellung der Reagenzien ist problemlos, die Adaption ist leicht nachvollziehbar.

### 4.1 Lipase Bestimmung

Als Grundlage der Lipase-Bestimmung dient die Messung einer pH-Erniedrigung, die durch Einwirkung des zu prüfenden Lipase-haltigen Probenmaterials (50  $\mu$ l) auf eine Olivenölsuspension entsteht. Durch die Lipase entstehen freie Fettsäuren, die dann zu Aciditätszuwachs führen. Nach kurzer Inkubationsphase, um eine Minute, liegt die eigentliche Messdauer von Serum- oder Duodenallipase um zwei Minuten, d.h. der gesamte Messvorgang ist bereits nach drei Minuten zu Ende, Abb. 4.

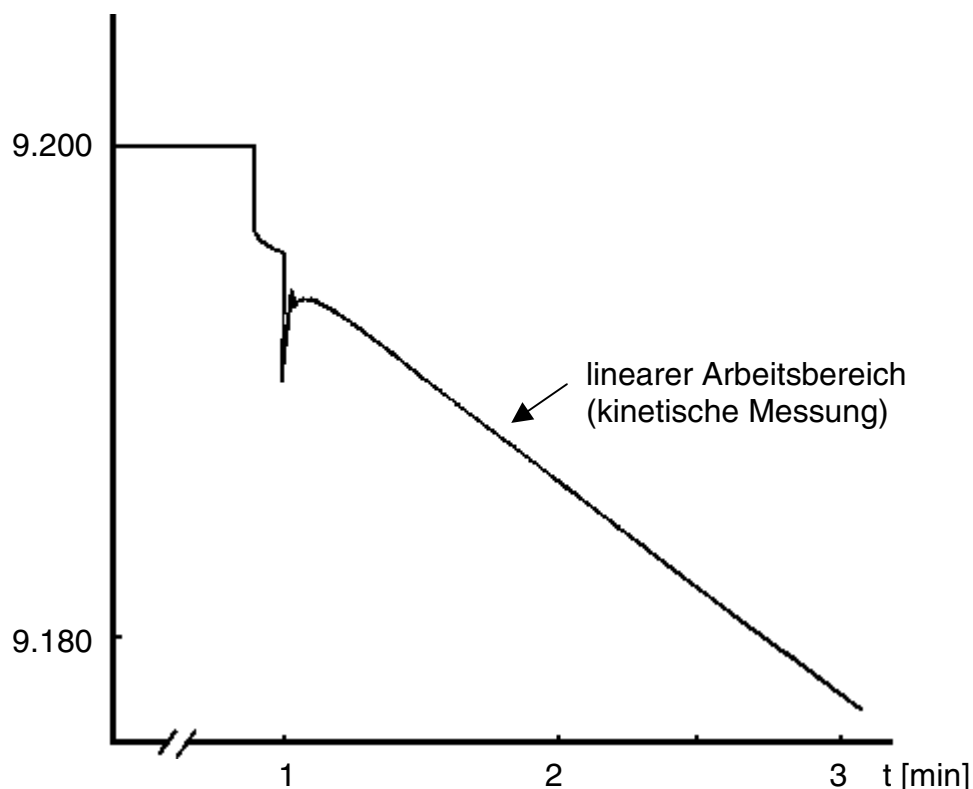


Abb.: 4  $\Delta$ pH-Änderung bei Lipasemessung. Ein typischer Messablauf.

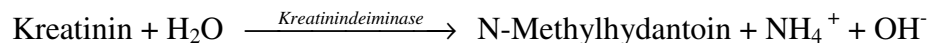
Aufgrund der hoher Empfindlichkeit der  $\Delta$ pH-Methode ist noch „Musik“ drin, d.h. die gesamte Messzeit kann bis auf eine Minute verkürzt werden. Das übliche Mitführen eines Lipase-standards entfällt, da die absolute Lipaseaktivität (in U/l) erfasst wird.

Die Lipasebestimmung durch  $\Delta$ pH-Sensortechnik ist in Richtigkeit und Genauigkeit den anderen handelsüblichen turbidimetrischen Methoden äquivalent und bietet sich besonders wegen ihrer weitgehenden Matrixfreiheit an.

Clin. Chem. 31 (1985) 257 - 260

## 4.2 Kreatinin- und Kreatin Bestimmung

Die Kreatinin-Bestimmung mittels  $\Delta$ pH-Sensortechnik in beruht auf folgender Reaktionsgleichung:

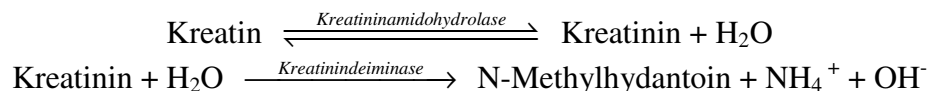


Die Kreatinin-Bestimmung kann direkt in Vollblut, normalem und pathologischem Plasma erfolgen. Die Fixzeit-Methode dient zur Endpunkterkennung in dem 5-120 s Intervall nach Enzymzugabe, d.h. nach 2 (!) Minuten kann die Aufgabe der nächsten Probe erfolgen.

Vergleichende Messungen von Vollblut und Plasma mit Referenzverfahren weisen hinsichtlich Präzision und Empfindlichkeit die Gleichwertigkeit der Messwerte aus.

### Summe von Kreatin und Kreatinin

Die Enzyme Kreatininamidohydrolase und Kreatinindeiminase katalysieren die folgenden Reaktionen:



Die durch die 2. Reaktion bewirkte pH-Erhöhung verhält sich proportional zur Summe von Kreatin- und Kreatiningehalt der Probe.

Die Reaktionen unter den Arbeitsbedingungen des Testbestecks laufen bereits in vier Minuten ab (Endpunkt-Methode). Der lineare Bereich erfasst 1-20 mmol/l.

In medizinischen Probematerialien, wo die beiden Verbindungen einzeln zu differenzieren wären, sollte man in die Ausführung mit dem käuflichen Testkit, entweder nur Kreatininamidohydrolase (Kreatin-Bestimmung) oder nur Kreatinindeiminase (Kreatinin-Bestimmung) einsetzen.

Sinngemäß in Proben in denen nur mit der Anwesenheit von Kreatin und Abwesenheit von Kreatinin zu rechnen ist, ist die Methode geeignet, Kreatin alleine zu quantifizieren; oder umgekehrt.

Clin. Chem. 30 (1984) 556-559, Arbeitsanleitung der Fa. Eurochem

## 4.3 Nucleinsäure-Bestimmung

Nucleinsäuren können in Mikrogramm-Bereich bestimmt werden bei Zugabe von hochaktiven nichtspezifischen Nucleasen. Da diese Enzyme durch die Hydrolyse der Phosphorsäurediester-Bindungen pH-Verschiebungen verursachen, wird die NA-Analytik von biologischen Probenmaterialien auch über die  $\Delta$ pH-Sensortechnik zugänglich. Als Überblick zur Methodik dient die Abb. 5.

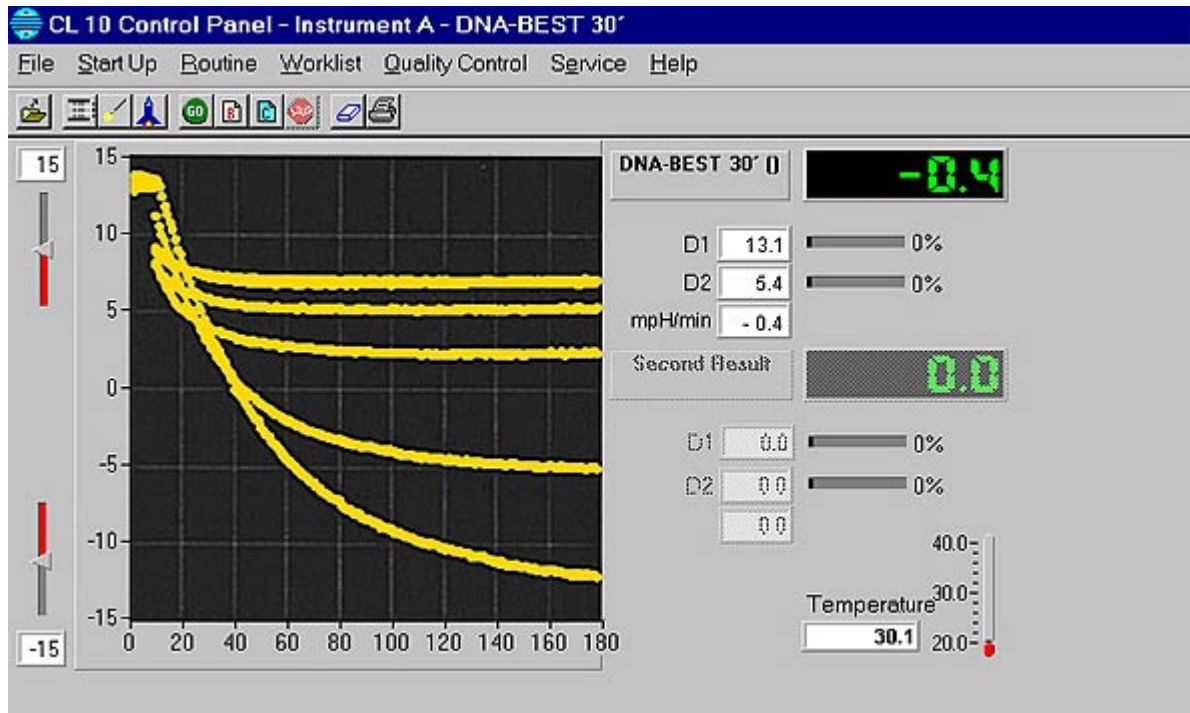


Abb. 5:  $\Delta$ pH-Verlauf gegen die Zeit bei der Hydrolyse von Heringspermien-DNA nach Zugabe *Anabaena*-Nuclease. Von oben nach unten: vorgelegt wurden zunehmende DNA-Mengen bei gleichbleibendem Nucleasegehalt.

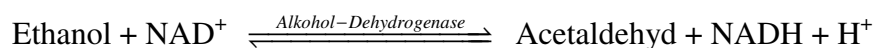
Die  $\Delta$ pH-metrische Methode weist gegenüber standardmäßigen Nucleinsäurebestimmungen markante Vorteile auf. Sie zeigt keine Abhängigkeit von der NA-Zusammensetzung und auch die Sekundärstruktur der Nucleinsäure spielt keine Rolle. Einfachheit und Robustheit in der Technik bieten eine grundsätzliche Alternative gegenüber den optischen Methoden.

Naheliegender ist es, an den Einsatz der Methode auch bei der Bestimmung von Nucleasen zu denken.

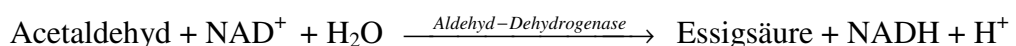
J. Biotechn. 88 (2001) 107-117

#### 4.4 Ethanol Bestimmung

Die Basis der Bestimmungsmethode bildet die Umsetzung des Ethanols mit Alkohol-Dehydrogenase und Aldehyd-Dehydrogenase unter Zugabe von  $\text{NAD}^+$ . Der produzierte  $\Delta$ pH wird nach Ablauf der Umsetzung als Bestimmungsgröße gemessen.



Durch Abfangen des gebildeten Acetaldehyds kann das Gleichgewicht auf die rechte Seite verschoben werden. Acetaldehyd wird in Gegenwart von Aldehyd-Dehydrogenase quantitativ zu Essigsäure umgesetzt.



Bereits 10  $\mu$ l konserviertes Vollblut oder venöses Blut genügt zur Bestimmung, d.h. bei Fragestellungen, wobei es auf das Probenvolumen ankommt, ist die  $\Delta$ pH-Metrie die Methode der Wahl.

Scand. J. clin. Lab. Invest. 44 (1984) 617-621

#### 4.5 Magnesium-Bestimmung

Die Geschwindigkeit der bekannten Phosphorylierung von Glucose durch ATP hängt mit der Magnesiumkonzentration zusammen. Da das resultierende Hexosephosphat und ADP zu pH-Senkung führt, kann durch  $\Delta$ pH-Metrie der Magnesiumgehalt in isolierten Erythrozyten, Serum und Plasma ausgeführt werden.

Giorn.It. Chim. Clin. 17 (1992) 13-19

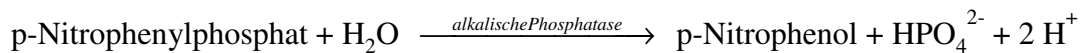
## 5. Mögliche Analytik mit lieferbaren Testkits aus dem Lebensmittelbereich

Die hier kurz referierten Testbestecke werden in der Lebensmittelanalytik eingesetzt und sind durch die Firma Eurochem lieferbar. Sie nutzen die bereits erwähnten Vorteile der  $\Delta\text{pH}$ -metrischen Messungen voll aus. Dass, anstatt flüssige Nahrungsmittel wie Milch, Wein, Fruchtsaft, medizinische Probenmaterialien in den Messvorgang eingeführt werden, dürfte keine Schwierigkeiten bereiten. Sicherlich, die eventuell modifizierten Probeneinwaagen bzw. Konzentrationsverhältnisse müssen bei der Ergebnissicherung berücksichtigt sein.

Insbesondere die summarische bzw. differenzierte Glucose und Fructose Bestimmung (Kap. 5.3) stellt ein wertvolles Unikum dar. Nach unserem Wissen wird ein gleichartiges Testbesteck anderweitig nicht hergestellt.

### 5.1 Alkalische Phosphatase Bestimmung

Das in der Milchindustrie verwendete  $\Delta\text{pH}$ -sensorische Enzymassay nutzt die katalytische Hydrolyse von p-Nitrophenyl-phosphat durch alkalische Phosphatase aus. Die Geschwindigkeit der  $\text{H}^+$ -Produktion ist ein Maß für die Enzymaktivität (kinetische Endpunkterfassung).



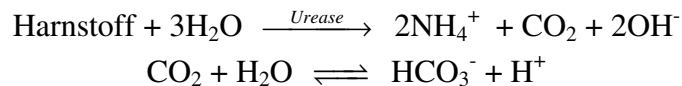
Der Einsatz des lieferbaren Arbeitsbesteck zu speziellen medizinischen Fragestellungen ist nahelegend, zumal zur Untersuchung auch trübe Gewebehomogenisate etc. eingesetzt werden könnten.

Ebenfalls dient p-Nitrophenyl-phosphat als Substrat bei der photometrischen Bestimmung von saurer Phosphatase. Durch minimale Veränderung des Testbestecks wäre die Quantifizierung von saurer Phosphatase problemlos möglich.

Arbeitsanleitung der Fa. Eurochem

### 5.2 Harnstoff Bestimmung

Die  $\Delta\text{pH}$ -sensorische Harnstoff-Bestimmung direkt in Vollblut, Plasma und Dialyseflüssigkeiten erfolgt nach Urease-Zugabe:



Aus der Hydrolyse resultiert insgesamt eine pH-Erhöhung ( $D_2 - D_1$ ), die der Harnstoffkonzentration proportional ist. Zur Auswertung wird die Endpunkt-Methode herangezogen, siehe Abb. 6.

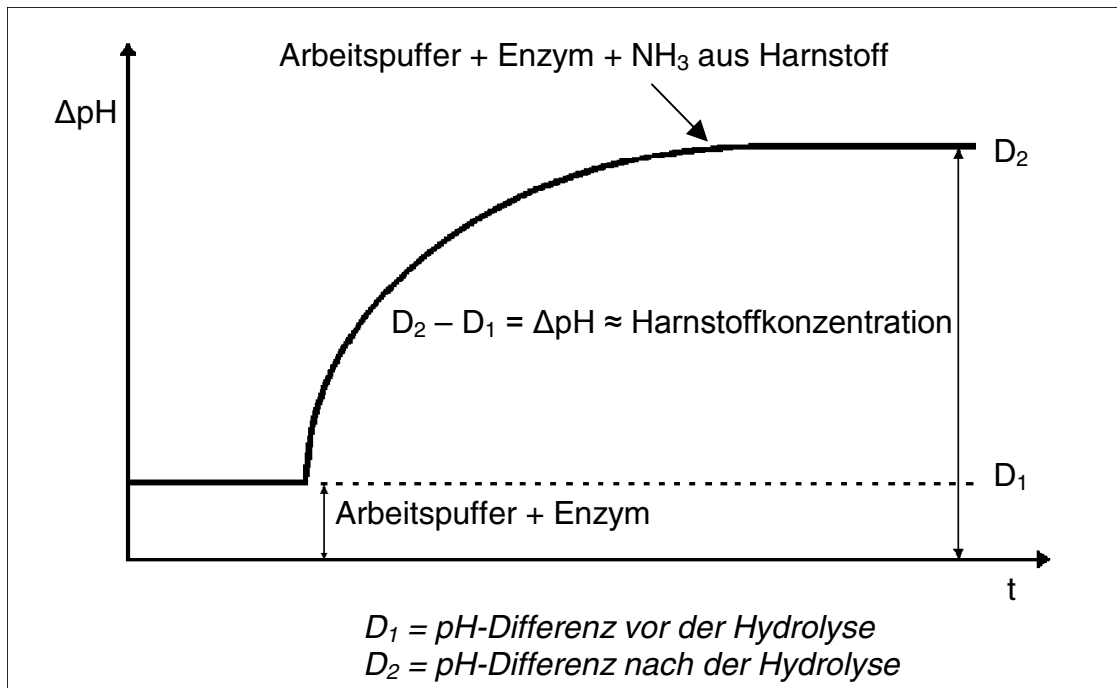


Abb.: 6 Typischer Verlauf einer  $\Delta\text{pH}$ -Messung (schematisch) bei der Harnstoff- Bestimmung.

Methodenbedingt entfällt die sonst übliche Messung des  $\text{NH}_3$ -Basiswertes und die Proben-  
vorbereitung. Die radikal verkürzte Messzeit um eine Minute bietet einen weiteren Vorteil.  $\Delta\text{pH}$ -  
sensorische Resultate und Erfahrungen mit dem Messgerät eines Dialysezentrums sind bereits  
veröffentlicht. Untersucht wurde der Harnstoffgehalt von Vollblut, Plasma und Dialyse-  
flüssigkeit.

Aufgrund der weitgehenden Matrixfreiheit der Methode, ist ihr Einsatz bei Gewebekom-  
ponen, Fermentationsproben und Zellkulturmedien denkbar.

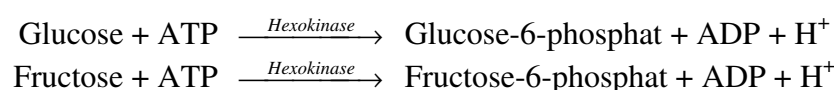
Die Bestimmung von Harnstoffs in Milch durch die  $\Delta\text{pH}$ -Sensortechnik wurde zu ISO bzw. DIN  
Norm erhoben.

Clin. Chem. 30 (1984) 556-559, Int. J. Artif. Org. 10 (1987) 352-356

### 5.3 Glucose und Fructose Bestimmung (in einem Arbeitsgang)

#### **Glucose und Fructose (als Summe)**

Da sowohl Glucose wie Fructose durch Hexokinase und ATP zu entsprechendem Hexose-  
phosphat unspezifisch umgesetzt wird, nützt dies das Testbesteck aus, um die beiden Zucker-  
arten in einem Arbeitsvorgang gleichzeitig und summarisch zu quantifizieren. Die resultierenden  
Hexose-phosphorsäureester und ADP sind insgesamt acider als die ATP vor der Umsetzung war.  
Die  $[\text{H}^+]$ -Zunahme ist dem Hexosegehalt proportional. Messzeit um 120 Sekunden.



Das Arbeitsbesteck wird für zwei Konzentrationsbereiche angeboten: für sehr hohe Konzen-  
trationen an Glucose und Fructose, d.h. ca. 60–270 g/l und niedrige Konzentrationen 0,5-70 g/l.

Dort, wo in der Probe mit Abwesenheit von Glucose gerechnet werden kann, ist das Besteck zur alleiniger Fructose-Bestimmung geeignet; und vice versa.

### **Glucose und Fructose (differenzierte Bestimmung)**

Dieses Testbesteck für das Modell MICROLAB<sup>®</sup> EFA bietet die Möglichkeit zur individuellen Bestimmung von Glucose und Fructose, d.h. sowohl Glucose wie Fructose werden in einer Probe und einem analytischen Ansatz erfasst. Diese Methode liefert mehr Information als die vorangehende. Im ersten Teil der Analyse wird nur Glucose durch die sehr spezifische Glucokinase nach folgender Reaktion umgesetzt:



Durch die Reaktion verursachte [H<sup>+</sup>]-Zunahme ist der Glucosekonzentration in der Probe proportional. Nachdem Glucose in der Probe vollständig umgesetzt wurde, wird Fructose durch die Hexokinase katalysierten Reaktion umgesetzt.



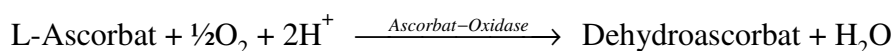
D.h. im Laufe der Analyse wird die Aciditätszunahme in dem Reaktionsansatz in zwei Stufen erfasst. Messzeiten um 280 Sekunden.

Da zu beiden Stufen zwei verschiedene Enzyme in die Reaktionskammer gefördert werden und damit zwei Zielverbindungen in einer Probe bestimmbar sind, ist diese Arbeitsmethode ein weiteres Beispiel für die Doppelstarter-Technik. Auch für die differenzierte Bestimmung von Glucose und Fructose sind zwei Arbeitsbestecke zu erhältlich. Für den Bereich 0,5-32 g/l je Zuckerart und 27- 135 g/l je Zuckerart.

Arbeitsanleitung der Fa. Eurochem

## 5.4 Ascorbinsäure Bestimmung

L-Ascorbat wird in Gegenwart von Sauerstoff durch die Ascorbat-Oxidase katalysierte Reaktion zu Dehydroascorbat umgesetzt.



Durch die Reaktion verursachte pH-Steigerung ist der Ascorbinsäurekonzentration in der Probe proportional.

Da der enzymatische Chemismus der Ascorbinsäure-Bestimmung beinahe immer auf der Umsetzung von Ascorbat-Oxidase basiert, könnte der lieferbare, für die Lebensmitteluntersuchung konzipierte Testkit im Prinzip auch zu medizinischen, pharmazeutischen Fragestellungen (Serum, Urin usw.) eingesetzt werden; mit den an anderen Stellen erwähnten technischen Vorteilen.

Arbeitsanleitung der Fa. Eurochem

## 6. Ausblick

Die Möglichkeit, Enzym/Substrat-Reaktionen in medizinischen/biotechnologischen Proben bei hoher Beladung mit Ballaststoffen durch den pH-Wert als Messgröße zu verfolgen, eröffnet Lösungswege für bis heute unlösbare Problemstellungen.

Eigene Entwicklungen in der Enzym/Substrat-Analytik werden mit kostbaren Proben im  $\mu\text{l}$ -Bereich möglich.

Überlegenswert ist der Einsatz vom Modell CL 10 zum direkten Nachweis und zur Quantifizierung von medizinisch wichtigen Mikroorganismen durch ihre spezifischen Stoffwechselaktivitäten (Proben mit korpuskulären Bestandteilen bis 0,3 mm Durchmesser sind einsetzbar).

Da auch ihre Enzymaktivitäten als Funktion der Zeit lückenlos zu monitoren möglich ist, – Elektrodenraum als Bioreaktor! – wäre durch die hochempfindliche  $\Delta\text{pH}$ -Messung die Zeitspanne zur Selektion/QS von Mikroorganismen drastisch kürzer.

Nach Aufschluss einer Zellkultur und bei entsprechender Trennung des korpuskulären Anteiles von dem echt Gelösten, wäre durch diese Methode eine Differenzierung zwischen Enzymaktivitäten in der Lösung und die von Zelltrümmern stammenden, möglich. Sinngemäß ist auch das Monitoring von korpuskulär immobilisierten Enzymen in der Pharmaproduktion möglich.

Auch das Monitoring von (de)carboxylierenden, (de)phosphorylierenden, (des)aminierenden, esterifizierenden/hydrolysierenden (lipolytischen) und proteolytischen Vorgängen ist ins Auge zu fassen. Insbesondere die letzteren, da sie in einem für das Modell CL 10 optimalen pH-Bereich 8-9 gemessen werden können. Mitunter ist auch an Nachweis und Messung von Enzyminhibitionen zu denken.

## 7. Fazit

Der innovative Multiparameteranalysator CL 10 *Plus* MED, der mit Hilfe von Kapillarglaselektroden pH-Änderungen bei Enzym/Substrat-Umsetzungen  $< 0,0005$  Einheiten messen kann, wird zur Analytik biochemisch aktiver, stark matrixbeladener Materialien eingesetzt. Konkrete Anwendungsbeispiele aus dem Bereich der medizinisch-analytischen Untersuchungen wurden besprochen. Auch Überlegungen zu Adaptationen aus der enzymatischen Lebensmittelanalytik wurden dargestellt.

Im übrigen dürfen wir darauf hinweisen, dass weitere  $\Delta$ pH-sensorische Analysemethoden aus dem Lebensmittelbereich bei [www.schlag.de](http://www.schlag.de) zu finden sind.

## **8. Vertrieb und Kontaktadresse**

Dr. Berthold G. Schlag  
Wissenschaftliche Messinstrumente  
Nachf. Im- und Export GmbH

Am Mühlenberg 19

D-51465 Bergisch Gladbach

Tel.: 02202 - 3 50 50

Fax: 02202 - 3 96 36

E-Mail: [info@schlag.de](mailto:info@schlag.de)

Internet: [www.schlag.de](http://www.schlag.de)

Stand der Angaben Dezember 2004

---