

Die kalibrierfreie Bestimmung von Creatinin und Ammoniak durch coulometrische Mikrodurchflußtitation

U.Spohn¹, B.Fuhrmann¹ und Z.K.He²

Institut für Biotechnologie, Martin – Luther – Universität Halle –

Wittenberg, 06120 Halle, Kurt – Mothes – Str.3

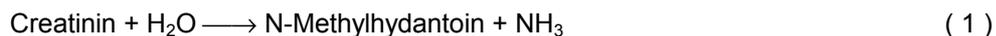
Department of Chemistry, University of Wuhan, Wuhan 43 00 72, VR China

Registriernummer der Online- Anmeldung: xx2

Poster

Zu den entscheidenden Problemen des praxisnahen Biosensoreinsatzes zählen neben der Gewährleistung einer hohen Langzeitstabilität der Meßergebnisse die Erreichung einer z.B. für prozeß – und routineanalytische Anwendungen ausreichend hohen Genauigkeit. Diese Ziele sollten durch die Kombination weitgehend absolut, d.h. kalibrierfrei arbeitender Bestimmungsverfahren mit quantitativ arbeitenden Mikro-trennschritten und enzymatischen Analytkonversionen erreichbar sein.

Dies wird am Beispiel der kalibrierfreien Bestimmung von Creatinin und Ammoniak demonstriert. Das vorgeschlagene Bestimmungsverfahren beruht auf der Kombination einer kalibrierfrei arbeitenden coulometrischen Mikrodurchflußtitation von Ammoniak mit der quantitativen, durch Creatininiminohydrolase (CIH) katalysierten Creatininumsetzung nach Gleichung (1) sowie der schnell arbeitenden gasdialytischen Abtrennung des freigeetzten Ammoniaks über eine mikroporöse Teflonmembran. Das abgetrennte Ammoniak wird mit elektrolytisch durch anodische Bromidoxydation erzeugtem Hypobromit amperometrisch titriert.



Ein amperometrischer Durchflußdetektor zeichnet den Titrationsverlauf kontinuierlich auf.

Der Mikrodurchflußtitation liegt das Prinzip der dreiecksprogrammierten Durchflußtitation zu Grunde. Durch Anlegen eines Strom - Zeit - Verlaufes in Form eines gleichschenkligen Dreiecks an eine dispersionsarme Durchflußelektrolysezelle wird ein entsprechendes Konzentrations - Zeit - Profil erzeugt, das in einem dispersionsarmen Durchflußkanalsystem z.B. mit einer Ammoniakprobenlösung vermischt wird.

Die in einem nachgeschalteten Kapillarreaktor ablaufende Bestimmungsreaktion (2)



führt dazu, daß sich zu jedem Zeitpunkt während der Durchlaufzeit 2τ (zeitliche Breite des Strom – Zeit – Profils) ein anderer Titrationsgrad einstellt, so daß zwei zueinander spiegelsymmetrische Titrationskurven resultieren. Gemessen wird die zeitliche Differenz Δt zwischen den beiden sich ergebenden Äquivalenzpunkten, die nach Gleichung (3) linear mit der Probenkonzentration C_S korreliert ist. Durch Messung von Δt zwischen den Äquivalenzpunkten wird ein hohes Maß an Unabhängigkeit von der Detektorstabilität erreicht. I_{\max} ist der maximal durchlaufende Elektrolysestrom, V_S die volumetrische Durchflußrate der Probenlösung. Der Korrekturfaktor f nähert sich mit zunehmendem 2τ bis auf geringfügige Abweichungen dem Wert 1 an, der in der vorliegenden Meßanordnung bei $2\tau \geq 40$ s erreicht wird. Dann ist Gl. (3) nur noch die Kombination des FARADAYSchen Gesetzes mit dem genau einstellbaren Stoffmengenstrom $n_S/t = C_S V_S$.

$$C_S = 2/3 \cdot \{ 1 - \Delta t/2\tau \} \cdot I_{\max}/(zFV_S f) \quad (3)$$

Die coulometrischen Ammoniaktitration arbeitet Konzentrationsbereich von 10^{-6} bis 10^{-3} M kalibrierfrei und erfaßt auch noch Konzentrationen bis 10^{-7} M. Dies ist mit der erforderlichen Präzision nur unter Durchflußbedingungen möglich. Eine vorgeschaltete, quantitativ arbeitende und miniaturisierte Dünnschichttrennzelle ermöglicht die selektive und kalibrierfreie Ammoniakbestimmung in komplexen Probenlösungen, wie z.B. im Prozeßmedium von technischen Tierzellenkulturen und biologischen Abwasserreinigungsverfahren. Andererseits liegt die Kombination mit enzymkatalysierten, ammoniakfreisetzenden Bestimmungsreaktionen nahe, um auch organische Substanzen, wie z.B. Harnstoff, L-Glutamin und Creatinin zu bestimmen. Um auch hierbei kalibrierfrei arbeiten zu können, wurden quantitativ arbeitende Enzymreaktoren entwickelt. So kann Creatinin in einem miniaturisierten, gepackten CIH – Reaktor bei Durchflußgeschwindigkeiten kleiner 0.5 mlmin^{-1} über mindestens 4 Wochen quantitativ umgesetzt werden.

Mit dem vorgeschlagenen coulometrischen Detektionsverfahren können sowohl Creatinin als auch Ammoniak im Konzentrationsbereich zwischen $10 \mu\text{M}$ und 0.5 mM mit relativen Standardabweichungen von $< 0.5 \%$ ($n = 4$) bei Titrationszeiten ≥ 40 s ohne Kalibrierung, d.h. praktisch „absolut“ bestimmt werden. Der zugängliche Creatininbestimmungsbereich liegt zwischen 10^{-6} M und 2 mM . Die jeweils optimalen Meßbereiche lassen sich über den Elektrolysestrom I_{\max} , die Durchlaufzeit 2τ und V_S sehr flexibel und automatisch einstellen. Es wird ein vollautomatisches *on line* Meßsystem und eine kompakte Meßzelle, in der die Elektrolysezelle, der amperometrische Durchflußdetektor und die Membrantrennzelle integriert sind, vorgestellt. Die notwendige Steuer – und Auswertesoftware schließt die *quasi on line* Auswertung der Titrationsverläufe und die Ergebnisprotokollierung mit ein.

Ein inherenter Vorteil besteht natürlich darin, daß das Meßverfahren limitiert durch die thermische Enzymstabilität temperaturunabhängig arbeitet. Durch Umschaltung zwischen dem CIH – Reaktor und einem By-Pass werden die Summe der Ammoiak – und Creatininkonzentration und die

Ammoniakkonzentration sequentiell gemessen. Aufgrund der hohen Präzision und Stabilität des vorgeschlagenen Detektionsverfahrens können sehr genaue Analysen von Creatinin/Ammoniaklösungen im Bereich zwischen $0.1 < [\text{Creatinin}]/[\text{Ammoniak}] < 20$ realisiert werden.

Die Leistungsfähigkeit des Systems wurde bei der Analyse von verdünnten Urinproben demonstriert und erlaubt die Anwendung auf die langzeitstabile Analyse von Dialysaten. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der kalibrierfreien Bestimmung von Harnstoff und L-Glutamin erreicht.

Die Arbeiten wurden bzw. werden jeweils partiell durch das Kultusministerium Sachsen – Anhalts, die Deutsche Bundesstiftung Umwelt, die Alexander von Humboldt Stiftung und das BMBF gefördert.