J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 16, 1978, pp. 441–445

Ammoniumselektive Disk-Elektrode mit dem Carrier-Antibiotikum Nonactin

Verfahren zur kontinuierlichen enzymatischen Elektroanalyse von Harnstoff, I. Mitteilung

Von J. G. Schindler, R. G. Schindler und O. Aziz

Medizinisches Zentrum für Theoretische Medizin, Institut für Angewandte Physiologie der Philipps-Universität Marburg/Lahn

(Eingegangen am 15. November 1977/18. April 1978)

Zusammenfassung: Die Membran der beschriebenen ammoniumselektiven Disk-Elektrode besteht aus einer Polyvinylchlorid-Matrix mit der aktiven Phase Nonactin in Tris (2-ethylhexyl)-phosphat und Diphenylether als ionenselektivem Kunststoff, der einerseits mit der Stirnfläche eines acrylglasummantelten Platin-Drahtes und andererseits mit der Meßflüssigkeit Kontakt hat, wobei sich an dieser Phasengrenze eine Potentialdifferenz ausbilden kann.

*Ammonium-selective disc-electrode with the carrier-antibiotic nonactin.
A method for the continuous enzymatic, electrochemical determination of urea, I.*

Summary: An ammonium-selective disc-electrode is described; the membrane consists of a polyvinylchloride-matrix with an active phase of nonactin in tris (2-ethylhexyl)phosphate and diphenyl ether as the ion-selective plastic. One side of the membrane is in contact with the solution to be measured and the other with the front surface of a platinum wire, which is enclosed in acrylic glass. This arrangement results in a very low drift potential.

Einleitung

Carrier-Antibiotika mit selektiven Transporteigenschaften für Kationen an natürlichen und künstlichen Membranen besitzen Interesse zur Erforschung von Transportvorgängen (1–4) und zur Herstellung ionenselektiver Sensoren (5–12).

Metallkomplexe makrocyclischer neutraler Moleküle der Valinomycin-Gruppe – Valinomycin (11, 13), Enniatin A, B und C (4, 14), Makrotetrolide (15, 16, 17), Antamanid (18, 19, 20) und Beauvericin (11) – sind positiv geladen (11); monobasische Säuren der Nigericin-Gruppe – Nigericin (21, 22), Monensin (21, 23), Grisorixin (24, 25), Dianemycin (21, 26), X-206 (27), X-537A (28–31) – elektrisch neutral (11). Acyclische Antibiotika bauen bei der Komplexbildung einen Pseudocyclus um das Kation (32).

Unphysiologische Kationentransporte an biologischen Membranen (1, 33) und Entkopplungseffekte auf die oxidative Phosphorylierung (1, 13, 33, 34) sind für einen Teil der Toxizität dieser nativen Ionophoren verantwortlich. Valinomycin und Nonactin hemmen an isolierten Fettzellen durch Inhibition der Adenylcyclase die Lipolyse (35).

Im Gegensatz zu Monensin (11) und Antamanid (11, 18, 19), die Natriumionen etwa 10 mal selektiver als Kaliumionen komplexieren, diskriminieren Valinomycin, Nactine, Enniatine, Beauvericin und Nigericin Natrium- gegenüber Kaliumionen (11).

Nonactin, von *Streptomyces griseus* produziert, ist als Träger-Antibiotikum zur Herstellung NH_4^+ -selektiver Elektroden geeignet (5, 10).

Technik und Methodik

Ionenselektive Disk-Elektroden (Abb. 1) sind gravitationsunabhängige elektrochemische Halbzellen, bei denen ein weitgehend druckunabhängiger acrylglasummantelter metallischer Festkontakt (z. B. Pt) zur Membranpotentialableitung verwandt wird (8,9).

Die zur Meßflüssigkeit hin konkave Sensoroberfläche fördert im Zusammenhang mit der strömungsgünstigen Geometrie der Meßkammer die Ausbildung einer stationären über die äußere Helmholtz-Fläche hinausreichenden Schicht der Probenflüssigkeit, wodurch elektrokinetische Potentiale durch die Relativbewegung der diffus ins Lösungsglasinnere reichenden Überschußladungen gegenüber der festen Wand vermieden werden (9).

Die weitgehend indifferente flüssige 15%ige PVC-Matrix in Cyclohexanon mit dem Carrier-Antibiotikum Nonactin in Tris(2-ethylhexyl)-phosphat und Diphenylether als aktiver Komponente wird zu einer ionenselektiven Kunststoffmembran ver-

gossen. Aus Markierungsexperimenten kann geschlossen werden, daß der Ionentransport durch Valinomycin und Makrotetrolide an Modellmembranen nach dem Träger-Stafetten-Mechanismus stattfindet, der möglicherweise an dünnen biologischen Membranen zu einem reinen freien Träger-Mechanismus entartet (36).

An der Phasengrenze von Elektrodenmembran und Elektrolytlösung bildet sich eine Potentialdifferenz aus. Die Sensoren des ionenselektiven Multimeßsystems (Abb. 1) werden dichtend gegen die Berandung der Durchflußkammern mittels eines Drehmomentschlüssels angezogen.

Anstelle eines elektrochemischen kann ein Thermo-Meßfühler in entsprechend adaptierter Bauform in das System eingeführt oder der gesamte Meßplatz zur Vermeidung einer Isothermenschnittpunktkalibrierung thermostatisiert werden.

Gegenwärtig können mit einer erweiterten Bauform des elektroanalytischen Multimeßsystems gleichzeitig Messungen von Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , Harnstoff und β -D-Glucose durchgeführt werden (8, 9, 37, 38, 39).

Nonactin, aus der Gruppe der cyclischen Makrotetrolide (No-, Mo-, Di-, Tri- und Tetranactine), besteht aus vier über Esterbindungen verknüpften chemisch identischen Nonactinsäure-Einheiten. Der 32-gliedrige Ring des Kalium-Nonactin-Komplexes läßt sich mit dem Saum eines Tennisballes vergleichen (40). Acht Sauerstoffatome begrenzen den hydrophilen Innenraum, während die lipophile Außenseite des Moleküls durch Methylsubstituenten sowie Methylengruppen der Tetrahydrofuranringe gebildet wird (40); das nicht hydratisierte K^+ -Ion wird von je vier Carbonyl- und Tetrahydrofuran-Sauerstoffatomen 8-fach näherungsweise kubisch (~ 280 pm) koordiniert (40). Im Falle einer Na^+ -Komplexierung nähern sich die Carbonylsauerstoffatome dem Metallkation auf eine Distanz von etwa 240 pm (41), beim NH_4^+ -Komplex distanzieren sie sich vom Stickstoffatom auf eine Entfernung von 301 bis 316 pm (42), so daß die Wasserstoffatome von NH_4^+ mit den Tetrahydrofuran-Sauerstoffatomen ($\sim 200 \pm 15$ pm) in besondere Wechselwirkung treten (43). Der Abstand der Tetrahydrofuran-O-Atome bleibt in den K^+ , Na^+ - und NH_4^+ - (N...O) Komplexen des Nonactins mit etwa 280 pm ungefähr gleich (40, 41, 42).

Unter Abstreifen seiner Hydrathülle schlüpft das Ammonium-Ion in den von acht Sauerstoffatomen umgrenzten Hohlraum des Nonactins (Abb. 2).

Durch den Komplexierungsvorgang, der in gewisser Hinsicht dem Prinzip der optimalen Hohlraumanpassung folgt, entstehen ligandgetrennte Ionenpaare, wobei das Metallkation in den an der Bindung teilnehmenden Sauerstoffatomen einen Ersatz für seine Hydrathülle (32) findet.

Ringflexibilität, niedrige Aktivierungsbarriere und hohe Ionenaustauschgeschwindigkeit (11) bei nur geringer Transportkon-

Ionenselektives Multimeßsystem

Ionenselektive Disk-Elektrode

Stromschlüsselkontakt-Stecker

Abb. 1. Ionenselektiver Elektroanalysator.

kurrenz durch Na^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} , gepaart mit lipophiler Außenseite und hydrophilem (polarem) Hohlraum, charakterisieren das Carrier-Antibiotikum Nonactin.

Auf Grund stabiler Gleichgewichts-Galvani-Spannung, guter reproduzierbarer Herstellung, kleiner Temperaturhysterese und bedienungsfreundlicher Handhabung wurde zur Komplettierung der Meßkette unter den sekundären Referenzhalbelementen die Ag/AgCl-Bezugselektrode ausgewählt. Durch Verwendung einer

Abb. 2. Stereoskopische Aufnahme eines Modells des NH_4^+ -Nonactin-Komplexes (42).

3 mol/l KCl-Referenzlösung wird das an der Kontaktzone zur Meßlösung auftretende Diffusionspotential auf Grund näherungsweise gleicher Überföhrungszahlen ($t_{K^+} = 0,49$ und $t_{Cl^-} = 0,51$) sehr klein gehalten. Die mikrokapilläre Stromschlüsselkontaktzone aus verschweißter PTFE-Membran mit mechanisch oder durch fokussierten Laserstrahl erzeugtem Mikroleck beziehungsweise mikrokekerbtem PTFE-Stopfen ist als auswechselbares Stecksystem ausgeführt (8,9).

Resultate

Das elektrochemische Multimeßsystem (8) zur Analyse strömender Flüssigkeiten und Gase (Abb. 1) wird mit nachgeschalteter Rollenpumpe betrieben, wobei das Meßgut mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 30–50 μ l/min zuerst die selektiven Sensoren und dann nachfolgend die Stromschlüsselkontaktzone mit dem herausdiffundierenden Referenz-Elektrolyten passiert, so daß dadurch bedingte Meßwertverfälschungen nicht in Betracht gezogen zu werden brauchen.

Die theoretische Elektrodensteilheit (*Nernst*-Faktor) für einwertige Ionen beträgt bei 293,15 K 58,165 mV/Aktivitätsdekade. Die hier untersuchte pNH_4 -Disk-Elektrode weist eine Potentialänderung von vorzugsweise $> 55,5$ mV/Aktivitätsdekade in reinen NH_4Cl -Lösungen auf. Die Elektrode wurde zu Messungen in 10^{-1} – 10^{-7} mol/l NH_4Cl -Lösungen eingesetzt und zeigte im Bereich von 10^{-1} – 10^{-6} mol/l NH_4Cl nach Delogarithmierung des Meßsignals und unter Berücksichtigung des Aktivitätskoeffizienten lineares Verhalten.

Die Anzeigegeschwindigkeit des Sensors liegt bei Meßwertveränderungen von einer Aktivitätsdekade im Bereich von 10–20 Sekunden. Unter diesen Bedingungen ließ sich eine Reproduzierbarkeit des Meßsignals von $\pm 0,1$ mV (Analysenfehler $\pm 0,4\%$) erzielen.

Die Selektivität wurde nach dem Prinzip der Veränderung der Meßionenaktivität bei konstant gehaltener Störionenaktivität bestimmt (8,9).

$$E = E' \pm \frac{2,303 RT}{z_m F} \log a_m$$

E Elektrodenpotential

E' Standardmeßkettenpotential

S Elektrodensteilheit oder *Nernst*-Faktor: $\frac{2,303 RT}{z_m F}$

R Gaskonstante (8,3144 J/mol $\cdot$ K)

T Temperatur in K

F Faraday-Konstante

z_m Ionenladung

a_m Aktivität des Meßions

2,303 Umrechnungsfaktor vom natürlichen in den dekadischen Logarithmus

$$\Delta E = (E'_2 - E'_1) + \frac{2,303 RT}{z_m F} \log \frac{a_{m2} + K_{M-S} a_{s2}^{z_m/z_s}}{a_{m1} + K_{M-S} a_{s1}^{z_m/z_s}}$$

ΔE EMK-Differenz

z_m Ionenladung_{Meßion}

z_s Ionenladung_{Störion}

a_{m1} Aktivität_{Meßion 1}

a_{m2} Aktivität_{Meßion 2}

a_{s1} Aktivität_{Störion 1}

a_{s2} Aktivität_{Störion 2}

K_{M-S} Selektivitätsverhältnis Meßion (M)/Störion (S)

Unter der Annahme, daß sich E' konstant verhält, und nach experimenteller Bestimmung der *Nernst*-Steilheit der ionenselektiven Elektrode kann durch EMK-Messungen in zwei Standardlösungen mit bekannten Ionenaktivitäten – zehnfache Meßionenaktivitätsänderungen bei konstantem Störionengehalt – ΔE ermittelt werden.

Wäßrigen Lösungen von 10^{-3} und 10^{-4} mol/l NH_4Cl wurden Störionenkonzentrationen von 10^{-1} mol/l Na^+ oder Ca^{++} bzw. Mg^{++} als Chlorid zugesetzt. Die Querempfindlichkeit gegenüber Protonen wurde nach gleichem Prinzip bei pH 2,00 ermittelt. Da im Hinblick auf den nur geringen Unterschied hinsichtlich der Ionenradien für K^+ und NH_4^+ eine beschränkte Selektivität zu erwarten ist – der Komplexbildungsvorgang folgt in gewisser Weise dem Prinzip der optimalen Hohlraum-anpassung – wurde bei zwar gleichem Meßionenpegel eine zehnfach geringere Störionenaktivität (10^{-2} mol/l K^+) gewählt. Unter Berücksichtigung des nicht idealen Verhaltens der verwandten Lösungen – der Aktivitätskoeffizient kann nur bei Ionenstärken unter 10^{-3} mol/l für einwertige und unter 10^{-4} mol/l für zweiwertige etwa gleich 1 gesetzt werden – wurden Aktivitätskoeffizient und Ionenaktivität näherungsweise nach der *Debye-Hückel*-Theorie unter Verwendung der *Kiellandschen* Formel (44) berechnet

$$-\log \gamma_i = \frac{A z_i^2 J^{0,5}}{1 + B \beta J^{0,5}}$$

A und B Lösungsmittel- und temperaturabhängige Konstanten des *Debye-Hückel*-Gesetzes

β Von der effektiven Größe des hydratisierten Ions abhängiger Annäherungsabstand

J Ionenstärke

$$J = 0,5 \sum z_i^2 c_i$$

z_i Ionenladung

$$a_i = \gamma_i c_i$$

a_i Ionenaktivität

c_i Ionenkonzentration

γ_i Aktivitätskoeffizient

Die Selektivitätskonstanten K_{M-S} als quantitative Elektrodenkennzahlen sind in Abbildung 3 zusammengestellt.

Die ammoniumselektive Disk-Elektrode wird trocken aufbewahrt und ist unproblematisch zu handhaben. Vor Inbetriebnahme wird sie mit 10^{-1} mol/l Meßionenlösung bis zur stabilen Anzeige vorperfundiert (vorkonditioniert). Aus elektrochemischen Gründen sollten die Standardlösungen in ihrer ionalen Zusammensetzung und Ionenstärke den Meßlösungen soweit wie möglich angeglichen sein.

Abb. 3. Membrankomponenten und Selektivitätskonstanten von pNH₄-Disk-Elektroden mit dem Carrier-Antibiotikum Nonactin.

Außer für ionenselektive Messungen in der chemischen Analytik sind Disk-Elektroden mit dem Carrier-Antibiotikum Nonactin als aktiver Komponente zur NH₄⁺-selektiv-enzymatischen Elektroanalyse, insbesondere des Harnstoffes, vor allem auch in der Medizin von Bedeutung (37).

Das Projekt wird von der Dr. E. Fresenius Chemisch-pharmazeutischen Industrie KG Apparatebau KG in Bad Homburg v.d.H. im Rahmen einer Koordinierten Forschung zur Entwicklung elektrochemischer Sensoren für Physiologie und Medizin gefördert.

Literatur

- Moore, C. & Pressman, B. C. (1964), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 562–567.
- Mueller, P. & Rudin, D. O. (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26, 398–404.
- Pressman, B. C. (1968), *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 1283–1288.
- Shemyakin, M. M., Ovchinnikov, Yu. A., Ivanov, V. T., Antonov, V. K., Shkrob, A. M., Mikhaleva, I. I., Evstratov, A. V. & Malenkov, G. G. (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 834–841.
- Ammann, D., Bissig, R., Cimerman, Z., Fiedler, U., Güggi, M., Morf, W. E., Oehme, M., Osswald, H., Pretsch, E. & Simon, W. (1976); *Synthetic Neutral Carriers for Cations*, in: *Ion and Enzyme Electrodes in Biology and Medicine* (Kessler, M., Clark, L. C., Lübbers, D. W., Silver, I. A. & Simon, W., eds.), 22–37. Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien.
- Pioda, L. A. R., Stankova, V. & Simon, W. (1969), *Anal. Lett.* 2, 665–674.
- Pioda, L. A. R., Wipf, H.-K. & Simon, W. (1968), *Chimia* 22, 189–191.
- Schindler, J. G. (1977), *Biomed. Techn.* 22, 235–244.
- Schindler, J. G. & Riemann, W. (1977), *Elektrochemische Multimeßsysteme für Physiologie und Medizin*. Koordinierte Forschung des Institutes für Angewandte Physiologie der Philipps-Universität Marburg/Lahn und der Dr. E. Fresenius Chemisch-pharmazeutische Industrie KG Apparatebau KG in Bad Homburg v. d. H. 1. Aufl.
- Scholer, R. P. & Simon, W. (1970), *Chimia* 24, 372–374.
- Simon, W., Morf, W. E. & Meier, P. Ch. (1973), *Specificity for Alkali and Alkaline Earth Cations of Synthetic and Natural Organic Complexing Agents in Membranes*, in: *Structure and Bonding* (Dunitz, J. D., Hemmerich, P., Ibers, J. A., Jørgensen, C. K., Neilands, J. B., Reinen, D. & Williams, R. J. P., eds.), 113–160. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Simon, W., Wuhrmann, H.-R., Vařák, M., Pioda, L. A. R., Dohner, R. & Štefanac, Z. (1970), *Angew. Chem.* 82, 433–443.
- Franklin, T. J. & Snow, G. A. (1973), *Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe*. Übersetzt und bearbeitet von Goebel, W., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Wipf, H.-K., Pioda, L. A. R., Štefanac, Z. & Simon, W. (1968), *Helv. Chim. Acta* 51, 377–381.
- Asher, I. M., Phillips, G. D. J. & Stanley, H. E. (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61, 1356–1362.
- Dobler, M. (1972), *Helv. Chim. Acta* 55, 1371–1384.
- Pioda, L. A. R., Wachter, H. A., Dohner, R. E. & Simon, W. (1967), *Helv. Chim. Acta* 50, 1373–1376.
- Ivanov, V. T., Miroshnikov, A. I., Abdullaev, N. D., Senyavina, L. B., Arkhipova, S. F., Uvarova, N. N., Khalilulina, K. Kh., Byistrov, V. F. & Ovchinnikov, Yu. A. (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 654–663.
- Wieland, Th., Faulstich, H., Bürgermeister, W., Otting, W., Möhle, W., Shemyakin, M. M., Ovchinnikov, Yu. A., Ivanov, V. T. & Malenkov, G. G., (1970), *FEBS Lett.* 9, 89–92.

20. Wieland, Th., Lüben, G., Ottenheym, H., Faesel, J., De Vries, J. X., Konz, W., Prox, A. & Schmid, J. (1968), *Angew. Chem.* **80**, 209–213.
21. Steinrauf, L. K., Czerwinski, E. W. & Pinkerton, M. (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 1279–1283.
22. Steinrauf, L. K., Pinkerton, M. & Chamberlin, J. W. (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **33**, 29–31.
23. Lutz, W. K., Winkler, F. K. & Dunitz, J. D. (1971), *Helv. Chim. Acta* **54**, 1103–1108.
24. Alleaume, M. & Hickel, D. (1970), *Chem. Commun.* 1422–1423.
25. Gachon, P., Kergomard, A., Veschambre, H., Esteve, C. & Staron, T. (1970), *Chem. Commun.* 1421–1422.
26. Czerwinski, E. W. & Steinrauf, L. K. (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 1284–1287.
27. Blount, J. F. & Westley, J. W. (1971), *Chem. Commun.* 927–928.
28. Johnson, S. M., Herrin, J., Shui Jan Liu & Paul, I. C. (1970), *Chem. Commun.* 72–73.
29. Johnson, S. M., Herrin, J., Shui Jan Liu & Paul, I. C. (1970), *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 4428–4435.
30. Maier, C. A. & Paul, I. C. (1971), *Chem. Commun.* 181–182.
31. Westley, J. W., Evans, R. H., Williams, T. & Stempel, A. (1970), *Chem. Commun.* 71–72.
32. Dietrich, B., Lehn, J.-M. & Sauvage, J.-P. (1973), *Chem. Unserer Zeit* **7**, 120–128.
33. Lehninger, A. L. (1975), *Biochemie*. Übersetzt von Fischer, K. & Ries, E., Verlag Chemie, Weinheim.
34. Graven, S. N., Lardy, H. A., Johnson, D. & Rutter, A. (1966), *Biochemistry* **5**, 1729–1735.
35. Kuo, J. F. & Dill, I. K. (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **32**, 333–337.
36. Wipf, H.-K., Olivier, A. & Simon, W. (1970), *Helv. Chim. Acta* **53**, 1605–1608.
37. Schindler, J. G., Schindler, R. G. & Aziz, O. (1978), *diese Z.*, 447–450.
38. Schindler, J. G., Riemann, W., Sailer, D., Berg, G. & Schäl, W. (1977), *diese Z.* **15**, 709–713.
39. Schindler, J. G., Dennhardt, R. & Simon, W. (1977), *Chimia* **31**, 404–407.
40. Dobler, M., Dunitz, J. D. & Kilbourn, B. T. (1969), *Helv. Chim. Acta* **52**, 2573–2583.
41. Dobler, M. & Phizackerley, R. P. (1974), *Helv. Chim. Acta* **57**, 664–674.
42. Neupert-Laves, K. & Dobler, M. (1976), *Helv. Chim. Acta* **59**, 614–623.
43. Pretsch, E., Vašák, M. & Simon, W. (1972), *Helv. Chim. Acta* **55**, 1098–1104.
44. Kielland, J. (1937), *J. Am. Chem. Soc.* **59**, 1675–1676.

Dr. Dr. J. G. Schindler
R. G. Schindler
Prof. Dr. O. Aziz
Med. Zentrum für Theoretische Medizin
Institut für Angewandte Physiologie
Philipps-Universität
Lahnberge
D-3550 Marburg/Lahn