

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.

Vol. 27, 1989, pp. 451—454

© 1989 Walter de Gruyter & Co.
Berlin · New York

Zur Anwendung der Peroxyoxalat-Chemilumineszenz in der biochemischen Analytik: Bestimmung von Oxalat

Von S. Albrecht, R. Beckert

*Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Medizinischen Akademie „Carl Gustav Carus“
Dresden, Dresden, DDR;*

Sektion Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, DDR und

W.-D. Böhm

*Abteilung Urologie der Zentralen Hochschulpoliklinik der Medizinischen Akademie „Carl Gustav Carus“ Dres-
den, Dresden, DDR*

(Eingegangen am 17. Januar/13. April 1989)

Zusammenfassung: In der vorliegenden Arbeit wird eine neue, sensitive chemiluminometrische Methode zur Bestimmung von Oxalat beschrieben. Ausgenutzt wird der chemilumineszente Zerfall der Monoperoxyoxal-säure, wobei auch sehr kleine Oxalatkonzentrationen (Erfassungsgrenze ca. 100 nmol/l) erfaßt werden können. Bei Oxalatbestimmungen im Harn macht sich allerdings wegen oxalatspezifischer Nebenemissionen eine Calciumoxalatfällung erforderlich. Dies könnte durch Kombination mit einem spezifischen enzymatischen Teilschritt vermieden werden, wodurch auch die Bestimmung anderer organischer Spezies (z. B. Citrat, Pyruvat, Malat) in niedrigen Konzentrationsbereichen ermöglicht würde.

The application of peroxyoxalate-chemiluminescence in biochemical analysis — Determination of oxalate

Summary: A new sensitive method for the determination of oxalate is presented. By using the chemilumi-nescence decay of monoperoxyoxalic acid very low concentrations of oxalate can be determined (up to 100 nmol/l). Oxalate determinations in urine require the precipitation of calcium oxalate, in order to avoid oxalate-unspecific side emissions. This could be avoided by combination with a specific enzymatic partial reaction, which would also permit the determination of low concentrations of other organic species (e. g. citrate, pyruvate, malate).

Einführung

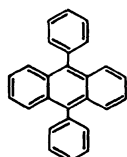
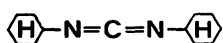
Die Anwendung von Chemilumineszenzmessungen in der biochemischen bzw. klinisch-chemischen Analytik hat sich gegenwärtig insbesondere auf zwei Gebieten etabliert: als Chemilumineszenzimmunoassay in zahl-reichen Abwandlungen und zur Untersuchung des Zellstoffwechsels (Phagozytoseaktivität, Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies etc.). Die Chemilumines-zenzquantenausbeuten der hauptsächlich eingesetzten Luminophore — Aminophthalsäurehydrazide, Ami-

nonaphthalindicarbonsäurehydrazide oder Acridi-niumderivate — liegen bei ca. 0,01 bis 0,04 Einstein · mol⁻¹, wogegen die Peroxyoxalat-Chemilumines-zenz, ausgehend von Aryloxalaten oder substituierten Oxamiden, welche bevorzugt in mäßig polar aproti-schem Medium abläuft, 0,20 bis 0,34 Einstein · mol⁻¹ liefert. Der Einsatz dieser Oxalsäurederivate in der biochemischen Analytik wird vornehmlich dadurch erschwert, daß in polar protischem bzw. wäßrigem Milieu neben unzureichender Löslichkeit und Solvo-

lysebeständigkeit eine Reihe von nichtchemilumineszenten Konkurrenzreaktionen ablaufen, welche unter anderem die Bildung von als Intermediat auftretendem elektronisch angeregtem CO_2 erschweren, was sich negativ auf die Chemilumineszenzquantenausbeute auswirkt (1, 2). Spezielle wasserlösliche Aryloxalate bzw. Oxamide (substituiert z. B. mit quarternären Ammonium- oder Sulfonsäuregruppen) führen in Gegenwart von gebräuchlichen wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffen (z. B. Rhodamine, Fluoreszeine) (3) und auch von speziell hergestellten kationisch substituierten 9,10-Bis(phenylethynyl)anthracenen (4) bzw. Rubrensulfonylen (5) zu maximalen Chemilumineszenzquantenausbeuten von ca. $0,08 \text{ Einstein} \cdot \text{mol}^{-1}$, was den enormen synthesechemischen Aufwand nur bedingt rechtfertigt. Anwendungen solcher Systeme in der biochemischen Analytik sind bislang nicht bekannt – wohl aber der Einsatz elektro-negativ substituierter Aryloxalate in heterogenem Lösungsmittelmilieu bzw. in mizellaren Systemen zur Bestimmung von H_2O_2 bzw. von Enzymen und Substraten, welche in direktem Zusammenhang mit H_2O_2 stehen (vgl. l. c. (6) und die dort zitierte Literatur).

Reagenz	ethanolische Lösung von
	• Bis(cyclohexyl)-carbodiimid
	• 9,10-Diphenylanthracen
	• H_2O_2
Vorlage	1 ml Reagenzlösung
Probe	100 μl Untersuchungsflüssigkeit mit HCl auf pH=1 eingestellt
Messung	LKB-Luminometer 1250

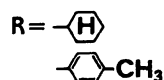
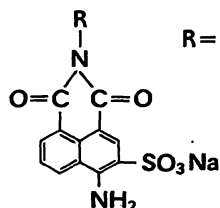
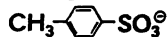
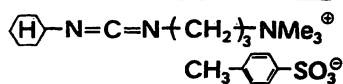
Ethanolisches System



Diphenylanthracen

$\lambda_{\text{max}} = 434 \text{ nm}$

Wässriges System



Brillantsulfloflavin

$\lambda_{\text{max}} = 526 \text{ nm}$

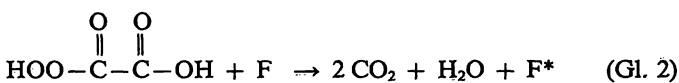
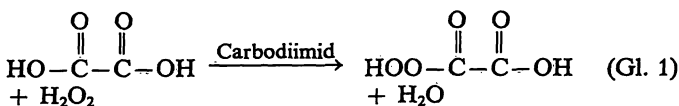
Abb. 1. Oxalat-Bestimmung durch Messung der Peroxyoxalat-Chemilumineszenz. Die Mehrzahl der Messungen wurde im ethanolischen System durchgeführt. Im wässrigen System wurde als wasserlösliches Carbodiimid N-Cyclohexyl-N'-trimethylammonium-propyl-p-toluen-sulfonat eingesetzt. λ_{max} gibt das Chemilumineszenzmaximum (\cong Fluoreszenzmaximum) der eingesetzten Fluorescer Diphenylanthracen und Brillantsulfloflavin an.

Zunächst suchten wir im Rahmen der Labordiagnostik für Urolithiasis-Patienten mit Calciumoxalatsteinleiden nach einer Möglichkeit, das hochempfindliche Peroxyoxalat-Chemilumineszenz-Prinzip zur Bestimmung von Oxalat und eventuell auch anderen organischen Säuren (Citrat) im Harn anzuwenden, wobei erste Ergebnisse hier mitgeteilt werden sollen. Ausgenutzt wird dabei eine chemilumineszente Oxidation freier Oxalsäure in ethanolischer oder wässriger Lösung.

Material und Methoden

Oxalatbestimmung

Die Methode (Abb. 1) beruht auf der von *Rauhut et al.* (7) beschriebenen Möglichkeit, freie Oxalsäure mittels Wasserstoffperoxid und Carbodiimid als Dehydratisierungsgenz in Monoperoxyoxalsäure zu überführen, welche ihrerseits in Anwesenheit eines Fluorescers F unter Photonemission in CO_2 und H_2O zerfällt (Gln. 1–3):



(F^* = Fluorescer im elektronisch angeregten Singulett- oder Triplettzustand)

Die Reagenzlösung, bestehend aus 10 g Bis(cyclohexyl)-carbodiimid, 5 ml H_2O_2 (300 g/kg) und 500 mg 9,10-Diphenylanthracen, in 50 ml absolutem Ethanol, muß stets frisch bereitete werden. 1 ml der Reagenzlösung wird in der Meßkammer des Luminometers (LKB 1250) vorgelegt. Mittels des Injection device werden dann jeweils 100 μl Probe zugegeben bei gleichzeitigem Start der Photonemissionsmessung. Das integrale Meßsignal der ersten zwei Sekunden (Anzeige in Millivolt) wurde für die Oxalatbestimmung benutzt. Zur Ermittlung der Oxalatkonzentration in Urinen wurde mit dem frischen Material zunächst eine Calciumoxalatfällung (8) vorgenommen und kurz vor der Messung in der adäquaten Menge HCl (0,5 mol/l) resolubilisiert. Die Erstellung einer linearen Bezugskurve erfolgte analog, ausgehend von einer wässrigen Kaliumoxalatlösung (entspr. 10 (111), 20 (222), 30 (333), 40 (444), 50 (555) und 60 (666) mg (μmol)/l Oxalsäure).

Als Referenzmethode wurde die vollenzymatische Oxalatbestimmung mittels Boehringer Mannheim-Testbesteck (Best.-Nr. 755699) gemäß Arbeitsanleitung (*Beutler, H. O. et al.*, Enzymatic Determination of Oxalate in Urine) durchgeführt.

Ergebnisse

Aus der wässrigen Kaliumoxalat-Standardlösung erhält man im Konzentrationsbereich von 100 bis 700 $\mu\text{mol/l}$ Oxalat eine lineare Bezugskurve, wobei der Einsatz von 100 μl Probenvolumen (vgl. Material und Methoden) zu Meßwerten zwischen 200 und 1500 mV führt (Gesamtmeßbereich des Luminometers: 0 bis 9999 mV).

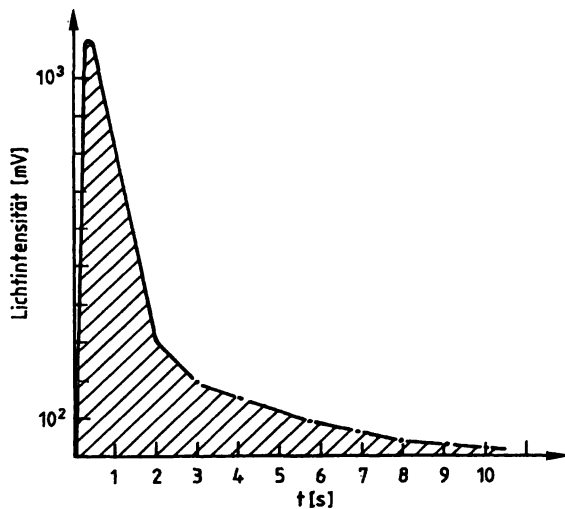


Abb. 2. Lichtintensitäts-Zeit-Kurve der chemiluminometrischen Messung einer $K_2C_2O_4$ -Standardlösung (444 $\mu\text{mol/l}$ Oxalat) bei $\text{pH} = 1$.

Die Kinetik der Reaktion ist aufgrund des niedrigen pH sehr schnell, so daß nach 2 Sekunden bereits über 50% der Gesamtphotonenmenge emittiert sind (Abb. 2). Einen vom Reagenzienleerwert (0,1 bis 0,3 mV) noch deutlich separierbaren Meßwert (0,5 bis 0,6 mV) erhält man unter sonst gleichen Bedingungen bis zu einer Grenzkonzentration von 100 nmol/l Oxalat bei Verwendung des LKB-Luminometers 1250. Die Variationskoeffizienten der sechs Standardlösungen liegen nach 10fach-Bestimmung bei den kleineren Konzentrationen im Bereich von 12%, bei den höheren Konzentrationen im Bereich von 10%. Analog liegen die Verhältnisse bei den gemessenen Harnproben nach Calciumoxalatfällung. Wir bestimmten 25 Harnproben (24-h-Sammelurin) von Calciumoxalatsteinpatienten, deren Oxalatkonzentration nach voll-enzymatischer Bestimmung mittels Boehringer Mannheim-Testbesteck im Bereich von 100 bis 460 $\mu\text{mol/l}$ lag. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,97, wobei die chemiluminometrische Methode in der Regel etwas niedrigere Werte liefert aufgrund der Unvollständigkeit der Calciumoxalatfällung (Abb. 3). Trotz der hohen Sensitivität der Methode ist der Einsatz von Nativurin wegen eines hohen Anteils oxalatspezifischer Nebenemissionen nicht unmittelbar möglich.

Diskussion

Das hier beschriebene chemiluminometrische Verfahren zur Bestimmung von Oxalat gestattet die Erfassung von Konzentrationen > 100 nmol/l und bei Verwendung eines entsprechend empfindlichen Luminometers auch bis in den pmol-Bereich. Limitierender Faktor ist die Empfindlichkeit des entsprechenden

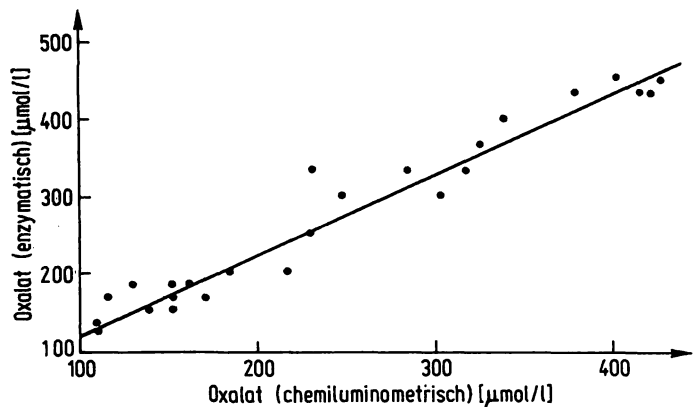


Abb. 3. Korrelationsdiagramm von 25 Oxalat-Parallelbestimmungen (24-h-Sammelurin) nach der enzymatischen und chemiluminometrischen Methode.
 $y = 1,042 x + 18,4; r = 0,97$

Photomultipliers. Bei der Untersuchung biologischer Materialien als Multisubstanzgemisch organischer Spezies reicht allerdings die Spezifität des Verfahrens nicht aus, um Oxalat direkt zu bestimmen. Substituiert man das hier verwendete Bis(cyclohexyl)carbodiimid durch ein wasserlösliches Derivat (vgl. Abb. 1), so erreicht man eine noch schnellere Kinetik der Reaktion, bei allerdings nur unwesentlich verbesserter Spezifität des Verfahrens beim Einsatz von Nativmaterialien (Nativurin). Gegenwärtig untersuchen wir zur Erreichung einer genügend großen Spezifität für die o. g. Fälle die Kombination mit einem enzymatischen Schritt, z. B. die Zersetzung des Oxalats mittels Oxalatdecarboxylase oder Oxalatoxydase und entsprechende Chemilumineszenzmessung vor und nach Enzymzusatz. Eine analoge Kombination von enzymatischer Zersetzung des Oxalats mittels Oxalatdecarboxylase/Formiatdehydrogenase in Gegenwart von NAD^+/FMN und Detektion des entstehenden FMNH_2 mittels des bakteriellen biolumineszenten Luciferase-Systems ist bereits von *Parkinson et al.* (9) beschrieben worden. Daneben berichten *Rubinstein et al.* (10) über ein Oxalatbestimmungsverfahren durch elektrochemisch erzeugte Chemilumineszenz (Rutheniumtris(bipyridyl)-System), welches aber bislang nicht auf biologische Proben angewandt wurde.

Des weiteren haben wir gefunden, daß 2-Oxocarbonylverbindungen leicht und unter milden Bedingungen in Oxalat überführbar sind, so daß auch andere organische Spezies, welche durch enzymatische Vorinkubation 2-Oxocarbonylverbindungen liefern (Abb. 4), nach dem in dieser Arbeit beschriebenen chemiluminometrischen Verfahren bestimmbar sein dürften, was Gegenstand einer eigenständigen Publikation werden soll.

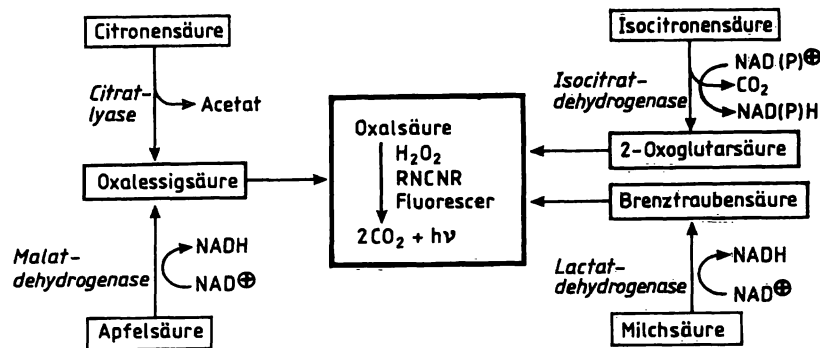


Abb. 4. Schematische Darstellung der Möglichkeiten zur Bestimmung von Citronensäure, Isocitronensäure, Äpfelsäure und Milchsäure über Peroxyoxalat-Chemilumineszenz. Die 2-Oxocarbonsäuren Oxalessigsäure, 2-Oxoglutaratsäure und Brenztraubensäure sind leicht oxidativ in Oxalat überführbar. Die einsetzbaren Fluorescer entsprechen den in Abb. 1 angegebenen.

Wir meinen, daß die in dieser Arbeit erstmals aufgezeigte analytische Anwendung des Systems Oxalsäure/Dehydratisierungsmittel/Fluorescer/Peroxyverbindung in protischen Lösungsmitteln interessante alter-

native Möglichkeiten im Bereich der biochemischen bzw. klinisch-chemischen Lumineszenzanalytik erwarten läßt.

Literatur

1. Steinfatt, M. F. D.: Privatmitteilung.
2. Steinfatt, M. F. D. (1985) Zum Mechanismus der Peroxyoxalatchemilumineszenz. *Bull. Soc. Chem. Belg.* 94, 85–86.
3. Tseng, S. S. & Rauhut, M. M. (1981) Aqueous Chemiluminescent Systems. U. S. Pat. 4.282.357 v. 4. 8. 1981; *Chem. Abstr.* 95, 169220n.
4. Kamhi, V. M. (1983) Novel cationic-substituted 9,10-bis(phenylethynyl)anthracenes. U. S. Pat. 4.405.513 v. 20. 9. 1983; *Chem. Abstr.* 99, 222155n.
5. Cohen, M. L., Arthen, F. J. & Tseng, S. S. (1984) Enhanced aqueous chemiluminescent systems. *Eur. Pat. Appl. EP* 96.749 v. 28. 12. 1983; *Chem. Abstr.* 100, 182970e.
6. Monzir, S. A.-L. & Guilbault, G. G. (1988) Fiber-Optic Sensor for the Determination of Glucose Using Micellar Enhanced Chemiluminescence of the Peroxyoxalate Reaction. *Anal. Chem.* 60, 2671–2674.
7. Rauhut, M. M., Sheehan, D., Clarke, R. A. & Semsel, A. M. (1965) Structural Criteria for Chemiluminescence in Acyl Peroxide Decomposition Reactions. *Photochem. Photobiol.* 4, 1097–1110.
8. Berg, W., Gutsche, B., Schäfer, F. & Beck, G. (1979) Eine modifizierte Methode zur quantitativen Oxalsäurebestimmung im Harn. *Z. Urol. Nephrol.* 72, 323–330.
9. Parkinson, I. S., Channon, S. M., Tomson, C. R. V., Adonai, L. R., War, M. K. & Laker, M. F. (1989) The Determination of Plasma Oxalate Concentrations using an Enzyme/Bioluminescent Assay. *Clin. Chim. Acta* 179, 97–108.
10. Rubinstein, I., Martin, C. R. & Bard, A. J. (1983) Electro-generated Chemiluminescent Determination of Oxalate. *Anal. Chem.* 55, 1580–1582.

Dr. S. Albrecht
Med. Akademie
„Carl Gustav Carus“ Dresden
Institut für Klinische Chemie
und Laboratoriumsdiagnostik
Fetscherstraße 74
DDR-8019 Dresden