

Empfindliche Wasserstoffperoxid-Messung

Dr. Claudia Lehmann, Dr. Michael Rothe und Dr. Gunther Becher, Berlin

Der ECoCheck der FILT GmbH bietet eine Alternative zu den optischen Methoden der Wasserstoffperoxid-Bestimmung in wässrigen Proben. Das Messprinzip beruht auf der elektrochemischen Detektion von Wasserstoffperoxid basierend auf der Biosensortechnologie. Der ECoCheck kann mit minimalem Laboraufwand betrieben werden. Der verwendete Biosensor ist ein Einwegsensoren. Bei jeder Messung erfolgt eine Ein-Punkt-Kalibrierung, so dass der ECoCheck auch für Einzelbestimmungen geeignet ist.



Bild 1: Das Messgerät.

Für die empfindliche Messung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) steht mit dem ECoCheck der FILT GmbH seit kurzem ein Messsystem zur Verfügung, das auf elektrochemischem Weg H_2O_2 detektiert. Es bietet eine kostengünstige Alternative zu den optischen Methoden der H_2O_2 -Bestimmung wie Photometrie, Fluorimetrie und Chemilumineszenz. Der ECoCheck ist insbesondere dort von Vorteil, wo unabhängig von einem voll ausgestatteten analytischen oder

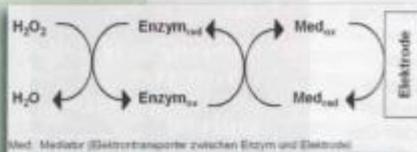


Bild 2: Reaktionsprinzip des Biosensors.

bioanalytischen Labor H_2O_2 gemessen werden soll. Aufgrund einer Ein-Punkt-Kalibrierung bei jeder Messung entfallen aufwendige Kalibrier- bzw. Standardreihen. Einzelmessungen können deshalb zeit- und kostensparend durchgeführt werden.

Der ECoCheck kann an jeden herkömmlichen PC mit Windows-Betriebssystem ab Windows 95 über eine serielle Schnittstelle angeschlossen werden. Mit seiner Größe von $155 \times 125 \times 300$ mm ist das Gerät klein und platzsparend. Eine Stand-alone-Version mit einem persönlichen digitalen Assistenten (PDA) ist in Vorbereitung. Die Messung erfolgt in einer Messkassette (Fließzelle), die an einen Potentiostaten angeschlossen ist (Bild 1).

Der ECoCheck funktioniert auf der Basis der Biosensortechnologie. Das Herzstück des Messgerätes ist ein amperometrischer Sensor-Chip. Auf diesem ist als biologisches Erkennungselement ein Enzym immobilisiert, das in einer Redoxreaktion spezifisch H_2O_2 umsetzt. Der bei der Reaktion fließende Strom wird über einen Mediator zu einer Elektrode weitergeleitet, elektronisch verstärkt und als Messsignal ausgegeben (Bild 2). Das detektierte Stromsignal ist der H_2O_2 -Konzentration in der Probe proportional.

Der Biosensor ist für Einmalmessungen ausgelegt. Probleme von Mehrwegsystemen wie Regeneration, Lagerung und Haltbarkeit der Sensoren spielen keine Rolle mehr. Die Messkammer ist temperiert, so dass unabhängig von der Umgebungstemperatur unter konstanten Bedingungen gemessen werden kann. Neben dem Basisgerät werden die Biosensoren, ein Kalibrier-Kit und die notwendigen Pufferlösungen angeboten.

Einfache Handhabung

Die Messung ist einfach in der Durchführung, die Software folgt den Windows-Regeln. Vor jeder Messung werden die für die Messreihe notwendigen Daten abgefragt und es wird

eine Identifikationsnummer (ID) vergeben. Die Messkassette wird mit Puffer und mit Kalibrierlösung unmittelbar vor dem Start befüllt und der Biosensor in die Messkammer eingesetzt. Die Probenvorbereitung ist ebenfalls schnell und unkompliziert. Die Probe ($300 \mu\text{l}$) wird zu gleichen Teilen mit Puffer verdünnt und in die Messkassette injiziert. Nach dem Start erfolgt die Messung nach einem automatischen Programmablauf. Zunächst wird der Sensor mit Puffer equilibriert und ist nach etwa 3 min messbereit. Danach erfolgt die Kalibrierung des Sensors. Nachdem der Sensor mit Puffer gespült wurde, wird die Probe gemessen. Der Messvorgang kann auf dem Bildschirm verfolgt werden (Bild 3). Der gesamte Messzyklus dauert 8 min. Die Messdaten werden in einer Datenbank abgelegt und das Messergebnis wird automatisch berechnet. Alle Messergebnisse einer ID-Nummer können gleichzeitig aufgerufen werden. Von hier sind die Einzelmessungen abrufbar und können als Report ausgedruckt werden. Bei Bedarf kann eine Rekalkulation durchgeführt werden.

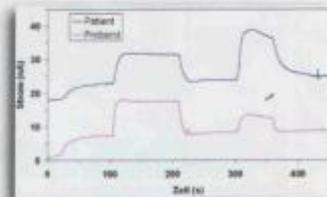


Bild 3: 2 Messkurven mit Basislinie, Kalibriersignal und unterschiedlichen Probensignalen. Das Probenmaterial ist Atemkondensat eines Asthma-Patienten und eines gesunden Probanden.

Die Messung von H_2O_2 ist bereits ab 30 nmol/l möglich und damit hinsichtlich der Empfindlichkeit vergleichbar mit Fluoreszenzmessungen und empfindlicher als photometrische oder Chemilumineszenz-Messungen. Der Messbereich beträgt $30 \text{ nmol/l} \dots 3 \mu\text{mol/l}$. Bei höheren Konzentrationen wird die Probe mit Puffer verdünnt. Die Kalibrierkurve ist linear (Bild 4). Der

Variationskoeffizient der Methode beträgt 5 %. Bild 5 zeigt die wiederholte Messung von wässrigen H₂O₂-Lösungen, die vor der Messung zu gleichen Teilen mit Puffer verdünnt wurden.

Leistungsmerkmale im Überblick

- Schnelle und empfindliche H₂O₂-Messung.
- GLP-konform.
- Jede Messung mit Ein-Punkt-Kalibrierung.
- Einweg-Biosensor (keine Regeneration/Lagerung notwendig).
- Temperierte Messkammer.
- Günstig auch für Einzelmessungen.
- Kurze Vorbereitungszeit.
- Automatische Auswertung – Datenbank.
- Unabhängig von einem analytischen Labor.

Anwendungen

Der ECoCheck ist überall dort einsetzbar, wo in wässrigen Medien H₂O₂ bestimmt wird, ob nun in der Forschung oder in anwendungsbezogenen Applikationen. H₂O₂ gehört neben den Radikalen wie beispielsweise Superoxid

Tabelle 1: Reproduzierbarkeit der Messung von verdünnten H₂O₂-Lösungen (800 nmol/l; 1:2 verdünnt).

Nr.	H ₂ O ₂ (nmol/l)
1	762
2	762
3	800
4	762
5	789
6	800
7	773
8	864
9	800
10	857
Mittelwert	797
Standardabweichung	37
Variationskoeffizient	4,7 %

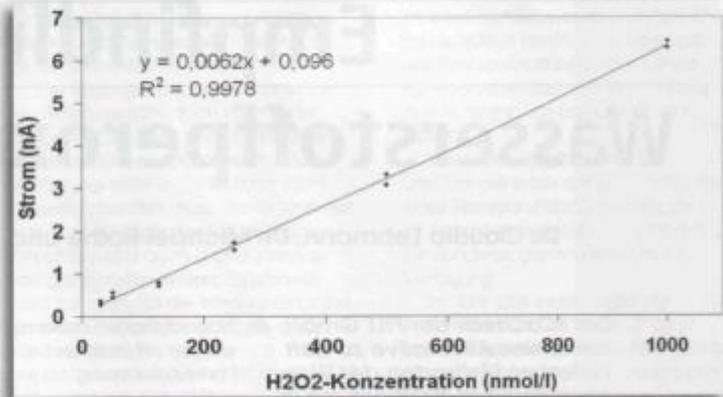


Bild 4: H₂O₂-Kalibrierkurve Biosensor 30...1000 nmol/l.

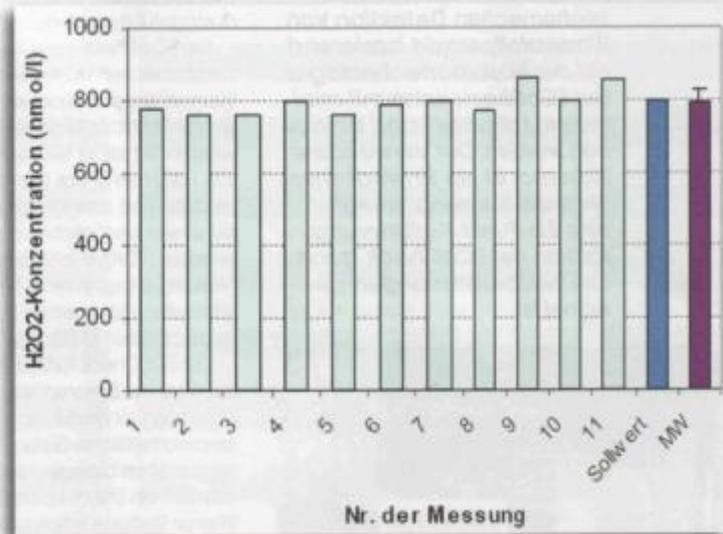


Bild 5: Wiederholte Messung von wässrigen H₂O₂-Lösungen

(O₂⁻), dem Hydroxylradikal (HO•) und dem Hydroperoxyradikal (HOO•) zu den reaktiven Sauerstoffspezies. Die radikalischen Sauerstoffspezies reagieren wesentlich schneller und werden zunächst zum stabileren und weniger reaktiven H₂O₂ umgesetzt, bevor dieses entweder enzymatisch oder nicht-enzymatisch abgebaut wird.

Interessant ist der ECoCheck deshalb insbesondere für Anwender, die sich mit dem Einfluss oder der Freisetzung von H₂O₂ bei oxidativen Prozessen in der medizinischen und biochemischen Forschung beschäftigen. Als Beispiel sei die Bestimmung von H₂O₂ in Zellkulturüberständen genannt.

Eine Anwendung hat der ECoCheck bereits als in-vitro Diagnostikum (IVD) in der klinischen Forschung zur Untersuchung entzündlicher Atemwegserkrankungen wie Asthma, chronischer Bronchitis und Mukoviszidose gefunden. Der ECoCheck wird dort zur empfindlichen Messung von H₂O₂ im Atemkondensat

von Patienten und Probanden auch im Rahmen von klinischen Studien eingesetzt (vgl. Bild 3).

Technische Daten

Netzspannung: 230 V/115 V
Leistung: 50 VA
Abmessungen: 155 x 125 x 300 mm (H x B x T)
Gewicht: 3,0 kg
Umgebungstemperatur: 0...30 °C

H₂O₂-Messgerät ECoCheck

● Kennziffer 70

Fit. Berlin, Tel. 030/9489-2114, Fax /9489-2115

www.com.de

Tel. 02842/9544-0

Fettbestimmung
schnell, ohne
Kalibration und löse-
mittelfrei.

● Kennziffer 72