

Diss. ETH Nr. 7526

**Flüssigmembranen für die potentiometrische
Bestimmung der Aktivität bzw. Konzentration
von Wasserstoff-, Natrium-, Kalium- und
Calcium-Ionen in Serum und Blut**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
PETER ANKER
dipl. Chem. ETH
geboren am 6. Mai 1955
von Ins (BE)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. W. Simon, Referent
Prof. Dr. D. Vonderschmitt, Korreferent

ADAG Administration & Druck AG
Zürich 1984

Flüssigmembranen für die potentiometrische Bestimmung der
Aktivität bzw. Konzentration von Wasserstoff-, Natrium-,
Kalium- und Calcium-Ionen in Serum und Blut

A B H A N D L U N G

zur Erlangung des Titels eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

PETER ANKER

dipl. Chem. ETH

geboren am 6. Mai 1955

von Ins (BE)

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. W. Simon, Referent

Prof. Dr. D. Vonderschmitt, Korreferent

1984

Leer - Vide - Empty

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit

Leer - Vide - Empty

Herrn Prof. Dr. W. Simon, unter dessen grosszügiger Leitung diese Arbeit entstand, danke ich für seine Unterstützung, sein Vertrauen und für die lehrreichen Diskussionen.

Daniel Ammann möchte ich herzlich danken für die vielseitigen und wertvollen Gespräche im wie auch ausserhalb des Labors.

Que mes amis trouvent à travers ces quelques mots une marque d'estime et de reconnaissance.

Leer - Vide - Empty

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	13
2. Medizinische Bedeutung von physiologisch wichtigen Kationen	16
2.1 Physiologische Grundlagen der Regulation der Kationen- konzentration im Blut	16
2.2 Störungen der Regulation der Kationenkonzentrationen	23
2.3 Zusammensetzung des Blutes und Kationenkonzentrationen in extra- und intrazellulären Körperflüssigkeiten	26
2.4 Diagnostische Bedeutung der Kationenkonzentrationen im Blut	30
2.5 Einfluss des Protein-Lipid-Volumens auf die Kationen- konzentrationen im Blut	31
3. Methoden zur quantitativen Erfassung von physiologisch wichtigen Kationen im Blut	43
3.1 Uebersicht	43
3.2 Beschreibung und Diskussion der am häufigsten eingesetzten Methoden	48
3.2.1 Titration	48
3.2.2 Colorimetrie, Fluorometrie	49
3.2.3 Atomemissionsspektrometrie	50
3.2.4 Atomabsorptionsspektrometrie	51
3.2.5 Potentiometrie	51
3.3 Klinischer Einsatz von ionenselektiven Elektroden	52
3.3.1 Uebersicht	52
3.3.2 Einzelprobenanalysatoren	53
3.3.3 Durchflussanalysatoren	53

4. Theoretische Grundlagen der potentiometrischen Bestimmung von Ionenaktivitäten bzw. Konzentrationen	60
4.1 Potentiometrische Messung mit ionenselektiven Elektroden	60
4.1.1 Die elektromotorische Kraft der Messzelle	60
4.1.2 Elektrodenfunktion und potentiometrische Selektivität. Die Gleichungen von Nernst und Nicolsky-Eisenman	62
4.1.3 Aktivität, Aktivitätskoeffizienten. Der Debye-Hückel-Formalismus	64
4.1.4 Flüssigkeitspotential an der Referenzelektrode. Der Henderson-Formalismus	67
4.1.5 Strömungspotential	69
4.2 Flüssigmembranen beruhend auf elektrisch neutralen Liganden als ionenselektive Komponenten	73
4.2.1 Definition der elektrisch neutralen Kationen-carrier und Konstitution der eingesetzten Liganden	73
4.2.2 Theoretische Beschreibung der Selektivität	75
4.2.3 Anforderungen an Membranzmatrix und Membranlösungsmittel bzw. Weichmacher	79
4.2.4 Lebensdauer der Flüssigmembranen	81
4.2.5 Ansprechzeit der Flüssigmembranelektroden	90
4.2.6 Anioneninterferenz	92
4.3 Messungen mit ionenselektiven Elektroden in Flüssigkeiten biologischer Herkunft	93
4.3.1 Anforderungen an die Selektivität	93
4.3.2 Anforderungen an Messgenauigkeit, Stabilität und Reproduzierbarkeit	95
4.3.3 Anforderungen an die Ansprechzeit und an die Lebensdauer	98
4.3.4 Eichung der Messkette	99
4.3.5 Einflüsse verschiedener Komponenten des Blutes	102
4.3.6 Kontamination der Probe durch Membrankomponenten	103

5. Flüssigmembranelektrode zur Bestimmung der Natrium- konzentration im Blutserum	104
5.1 Einleitung	104
5.2 Optimierung der Membranzusammensetzung und der Elektrodenbauart	105
5.3 Bestimmung der Natriumkonzentration in Blutserum	109
5.3.1 Eich- und Messverfahren	109
5.3.2 EMK-Messungen und deren Auswertung	110
5.3.3 Vergleich von potentiometrisch mit flammen- photometrisch ermittelten Natriumkonzentrationen	112
6. Flüssigmembranelektrode zur Bestimmung der Kalium- konzentration im Blutserum	118
6.1 Einleitung	118
6.2 Optimierung der Membranzusammensetzung und der Elektrodenbauart	119
6.3 Bestimmung der Kaliumkonzentration in Blutserum	123
6.3.1 Eich- und Messverfahren	123
6.3.2 EMK-Messungen und deren Auswertung	124
6.3.3 Vergleich von potentiometrisch mit flammen- photometrisch ermittelten Kaliumkonzentrationen	126
7. Flüssigmembranelektrode zur Bestimmung der verschiedenen Calciumfraktionen im Blut	132
7.1 Einleitung	132
7.2 Die verschiedenen Calciumfraktionen im Blutserum	133
7.3 Flüssigmembranelektrode zur Bestimmung der Konzen- tration des totalen Calciums im Blutserum	135
7.3.1 Freisetzung des gebundenen Calciums	135
7.3.2 Optimierung des pH-Puffers	137
7.3.3 Optimierung der Membranzusammensetzung zur Erfassung der Konzentration des totalen Calciums	140

7.3.4	Potentiometrische Bestimmung der Konzentration des totalen Calciums im Blutserum	144
7.3.5	Vergleich von potentiometrisch, colorimetrisch und atomspektrometrisch ermittelten Calciumkonzentrationen	146
7.4	Flüssigmembranelektrode zur kontinuierlichen in situ Bestimmung der Konzentration bzw. der Aktivität des ionisierten Calciums im Blut	152
7.4.1	Referenzelektrolytlösung für Messungen im extrakorporalen Blutkreislauf	152
7.4.2	Eich- und Messverfahren zur Bestimmung der Konzentration bzw. der Aktivität des ionisierten Calciums	158
7.4.3	Kontinuierliche in situ Bestimmung der Konzentration bzw. der Aktivität des ionisierten Calciums beim wachen Hund	159
8.	Flüssigmembranelektrode zur Bestimmung der Wasserstoffionenaktivität im Blut	164
8.1	Einleitung	164
8.2	Eigenschaften der Flüssigmembranelektrode	166
8.3	Ansprechverhalten der Flüssigmembranelektrode im Vergleich zu einer Glasmembranelektrode in wässrigen Lösungen, Blutserum, und Blutplasma	167
8.4	Vergleich zwischen pH-Werten, die mittels der Flüssigmembranelektrode bzw. einer Glasmembranelektrode in Erythrozytensuspensionen und in Blut ermittelt wurden	171
9.	Flüssigmembranelektrode zur Bestimmung der Lithiumkonzentration im Blutserum	177
9.1	Einleitung	177
9.2	Eigenschaften von lithiumselektiven Flüssigmembranelektroden	178

9.3 Einsatz von lithiumselektiven Flüssigmembranelektroden im Blutserum	181
10. Simultane, kontinuierliche in situ Bestimmung der Konzen- tration bzw. der Aktivität von H^+ , Na^+ , K^+ und Ca^{2+} im Blut	184
10.1 Einleitung	184
10.2 Einsatz eines hoch lipophilen Weichmachers in Flüssigmembranen	185
10.3 Eichung der H^+ -, Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -selektiven Flüssigmembranelektroden	188
10.4 Simultane, kontinuierliche Bestimmung der Konzentra- tion bzw. der Aktivität von H^+ , Na^+ , K^+ und Ca^{2+} im extrakorporalen Blutkreislauf beim wachen Hund bzw. Kaninchen	190
11. Elektrodenbauarten, potentiometrische Messmethoden und Auswerteverfahren	192
11.1 Makroelektroden	192
11.2 Minielektroden	193
11.3 Durchflusselektrodensystem	194
11.4 Messgeräte	197
11.5 Messmethoden und Auswerteverfahren	198
11.6 Verwendete Substanzen	201
12. Zusammenfassung	203
13. Summary	206
14. Résumé	208
15. Literaturverzeichnis	211

Leer - Vide - Empty

1. EINLEITUNG

Die Potentiometrie mit ionenselektiven Elektroden ermöglicht gegenwärtig als einzige Methode die direkte Bestimmung von physiologisch relevanten Ionenaktivitäten und nimmt dadurch in der analytischen Chemie eine besondere Stellung ein. Die Entwicklung von potentiometrischen Methoden zur Erfassung von Ionenaktivitäten wurde anfangs dieses Jahrhunderts durch die Einführung der H^+ -selektiven Glasmembranelektrode [1,2] eingeleitet. Durch Veränderung der Glaszusammensetzung wurden Membranen erhalten, welche die gezielte, quantitative Erfassung anderer Kationen ermöglichten [3-7]. Mit Ausnahme der H^+ - und auch der Na^+ -selektiven Glasmembranelektroden waren jedoch die Selektivität dieser Sensoren im allgemeinen unbefriedigend. In der Folge wurden Elektroden mit anderen Membrantypen, wie homogene und heterogene Festkörpermembranen sowie Flüssigmembranen mit elektrisch geladenen Ionenaustauschern, entwickelt und zur Bestimmung verschiedenster Kationen und Anionen eingesetzt [8-13].

Die Entdeckung des durch das elektrisch neutrale Antibiotikum Valinomycin induzierten bevorzugten Transportes von K^+ -Ionen durch biologische Membranen (vgl. u. a. [14]) führte zur Entwicklung von Flüssigmembranen beruhend auf elektrisch neutralen Carriern. Der Einsatz von Valinomycin und weiteren ionenselektiven Antibiotika in Flüssigmembranelektroden ergab tatsächlich hochleistungsfähige potentiometrische Sensoren [15-18]. Im Anschluss daran wurden an diesem Laboratorium (Laboratorium für organische Chemie ETH, Gruppe von Prof. Dr. W. Simon) auf Grund elektrostatischer Modelle [19-22], quantenmechanischer Modellberechnungen [23-26] und des Studiums von Korrelationen zwischen Struktur und Ionenselektivität synthetischer Verbindungen [27] verschiedene elektrisch neutrale, ionenselektive Carrier entworfen und synthetisiert. Flüssigmembranelektroden beruhend auf solchen Ionencarriern ermöglichten denn auch die selektive Bestimmung der Aktivität von H^+ , Li^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} und UO_2^{2+} sowie die enantiomerenselektive Erfassung von Ammoniumionen in wässrigen Lösungen (vgl. die Uebersicht in [28]). Heute

werden insbesondere Bemühungen im Bereich des Entwurfes von verbesserten Li^+ - und Mg^{2+} -selektiven neutralen Liganden sowie von Anionionencarriern [29] unternommen.

Parallel zur Entwicklung und Optimierung von ionenselektiven Flüssigmembranen wurden neuartige Elektrodenbauarten und Messanordnungen erarbeitet. Dabei waren einerseits die Miniaturisierung und andererseits die Automatisierung die wesentlichsten Beweggründe. So entstanden u. a. sogenannte Minielektroden [30-32], Katheterelektroden [33-38], Oberflächenelektroden [39,40], ionenselektive Feldeffekttransistoren (ISFET) [41,42], Durchflusselektroden [43-46] und Mikroelektroden [47-49]. Solche Sensoren sind mittlerweile wichtige Hilfsmittel in der klinischen Routineanalytik, in der Herzchirurgie (kontinuierliche Messungen während Operationen), in der Intensivmedizin sowie in der medizinischen und physiologischen Forschung (vgl. u. a. [28, 46, 48-54]).

In der klinischen Medizin zählen die Bestimmungen der Natrium-, Kalium- und totalen Calciumkonzentration in Serum sowie der H^+ -Aktivität in Blut wegen der lebenswichtigen Funktionen dieser Kationen zu den am häufigsten durchgeführten Analysen. Es ist demnach nicht erstaunlich, dass die klinische Routineanalytik zu einem der Hauptanwendungsbereiche von ionenselektiven Elektrodenmessketten geworden ist. Die leichte Automatisierung, die Miniaturisierung der Messzellen, das Wegfallen jeglicher Probevorbereitung sowie die Möglichkeit der kontinuierlichen Messung sind dabei entscheidende Vorteile der Potentiometrie. Analysatoren mit Na^+ -selektiven Glasmembranelektroden und K^+ -selektiven Flüssigmembranelektroden haben denn auch die herkömmlichen Flammenphotometer zum Teil ersetzt.

Auf Grund der im Hinblick auf klinische Anwendungen unumstrittenen Überlegenheit der ionenselektiven potentiometrischen Bestimmungsmethode gegenüber der Atomspektrometrie (Atomemissions- und Atomabsorptionsspektrometrie) war die Untersuchung der Einsetzbarkeit anderer ionenselektiver Flüssigmembranelektroden im Blut erwünscht. Nebst dem mittelfristigen Ersatz der Flammenphotometrie kann auch eine Verdrängung der H^+ -

und Na^+ -selektiven Glasmembranelektroden erwartet werden, da diese nicht in jeder Hinsicht (elektrischer Membranwiderstand, mechanische Eigenschaften, Proteineinflüsse) zufriedenstellend sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ionenselektive Flüssigmembranen beruhend auf den an diesem Laboratorium bereits vorhandenen H^+ -, Li^+ -, Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -selektiven, neutralen Liganden für Messungen im Serum bzw. im Blut erarbeitet. Im Gegensatz zur Li^+ -selektiven Membran konnte die klinische Relevanz der mittels dieser Flüssigmembranelektroden in Blut ermittelten Konzentrationen des ionisierten Na^+ , K^+ und Ca^{2+} , des totalen Calciums, sowie der H^+ -Aktivität durch Vergleich mit unabhängigen Methoden aufgezeigt werden. Die Einsetzbarkeit dieser Membranen wurde in einem Durchflusselektrodensystem anhand pharmakokinetischer Untersuchungen durch simultane, kontinuierliche Messungen im extrakorporalen Blutkreislauf von wachen Hunden und Kaninchen belegt.

Es ist anzunehmen, dass in der klinischen Analytik mittelfristig die Flammenphotometrie vollständig durch die Potentiometrie mit ionenselektiven Flüssigmembranelektroden verdrängt sein wird. Die noch ausstehende Verfügbarkeit einer für Messungen im Blut zufriedenstellenden Li^+ -selektiven Elektrode wird dabei vermutlich den Ausschlag zur endgültigen Verdrängung der Flammenphotometrie geben.

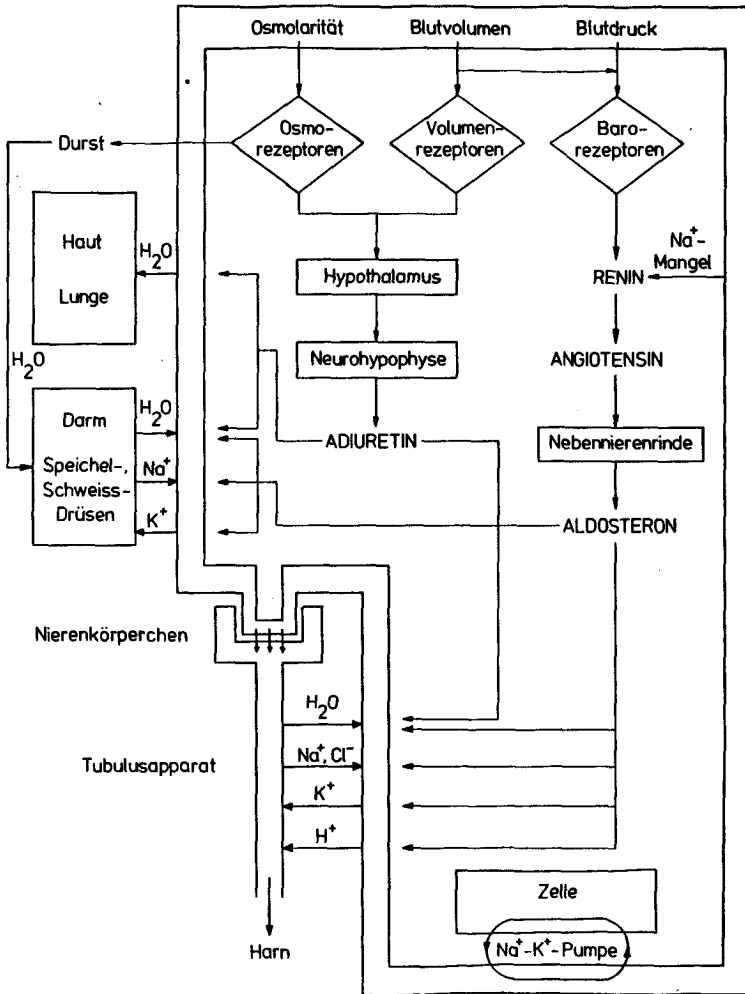
2. MEDIZINISCHE BEDEUTUNG VON PHYSIOLOGISCH WICHTIGEN KATIONEN

2.1 Physiologische Grundlagen der Regulation der Kationen- konzentrationen im Blut [55-58]

Der menschliche Organismus wird in der heutigen Medizin oft als physikalisch-chemischer Reaktor mit wässrigem Medium betrachtet. Dabei zählen die im Rahmen dieser Arbeit zur Diskussion stehenden Elemente Wasserstoff, Natrium, Kalium und Calcium zu den zehn häufigsten chemischen Elementen. Von diesen Elementen ist die ionisierte Form physiologisch wirksam. Diese vier elektrisch geladenen Teilchensorten erfüllen unter anderem im Blut, in der interstitiellen Flüssigkeit und in den Zellen (besonders gut untersucht bei Nerven und Muskeln) lebenswichtige Funktionen und bestimmen, zusammen mit den Anionen, weitgehend deren elektrochemische Eigenschaften.

Im Blut und in den übrigen Flüssigkeitsräumen werden die Kationenkonzentrationen nahezu konstant gehalten (Homöostase). Dies wird im Blutplasma durch die optimale Kopplung zwischen der Wasser- und Elektrolytaufnahme aus dem Gastrointestinaltrakt und der Ausscheidung in Urin, Stuhl und Schweiß gewährleistet. Die Durchlässigkeit der Blutkapillarwände für H_2O , H^+ , Na^+ , K^+ und Ca^{2+} verursacht einen ständigen Austausch dieser Komponenten zwischen Plasma und interstitieller Flüssigkeit und bildet so die Voraussetzung für deren Verteilung im ganzen Organismus.

Drei wichtige Blutparameter, der Blutdruck, die Osmolarität und das Blutvolumen, sind eng mit den Na^+ - und K^+ -Konzentrationen sowie dem Wassergehalt verknüpft. Spezifische Rezeptoren nehmen Änderungen dieser Parameter wahr und bewirken eine Regulation des H_2O -, Na^+ - und K^+ -Haushaltes (vgl. Fig. 2.1).



Figur 2.1. Schematische Regulation des Wasser-, Na⁺- und K⁺-Haushaltes.

Der Blutdruck wird vorwiegend durch die Herzleistung, das Blutvolumen und den Flusswiderstand der peripheren Blutbahnen bestimmt. In den Kapillaren ist der Blutdruck die treibende Kraft der Filtration von Wasser und kleinmolekularen Komponenten in den extravasalen Raum. Bei einem Blutdruckabfall oder bei Natriummangel wird in den Nieren Renin gebildet, was nach Entstehung von Angiotensin zur Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde führt. Dieses Steroidhormon bewirkt Erhöhungen der H_2O - und Na^+ -Resorption und der K^+ -Sekretion im Bereich des Darms, der Speichel- und Schweißdrüsen sowie des renalen Tubulusapparates.

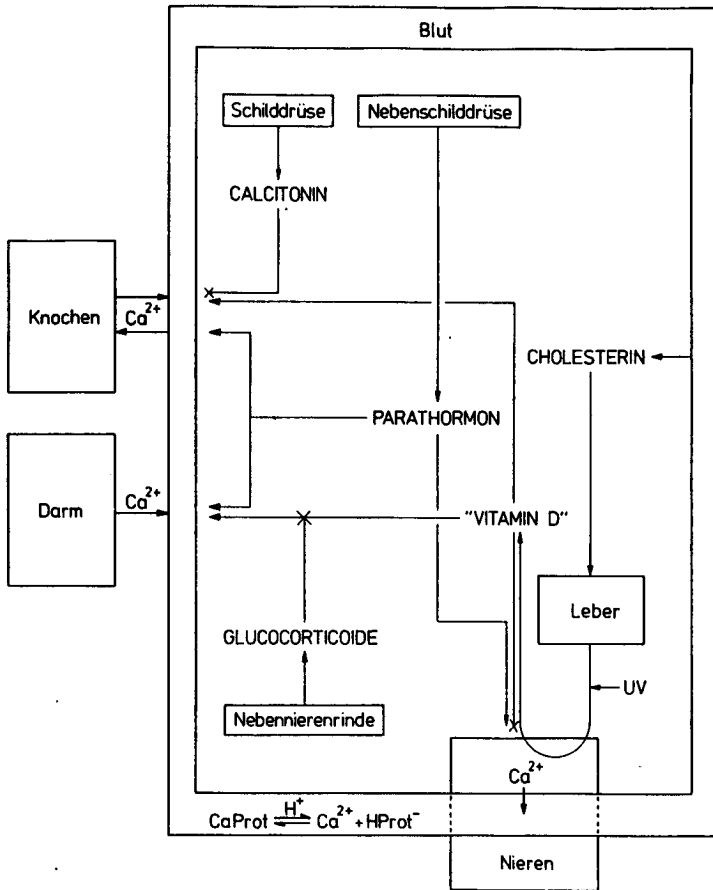
Die Osmolarität des Blutes wird durch die Summe der Konzentrationen aller im Plasma gelösten Teilchen definiert und somit vorwiegend durch H_2O und Na^+ -Ionen bestimmt. Die Osmolarität ist dem osmotischen Druck, der dem kapillaren Blutdruck entgegengesetzt ist und damit den Flüssigkeitstransport vom extra- in den intravasalen Raum bewirkt, proportional. Steigt die osmotische Konzentration an, so wird die Information nerval vom Hypothalamus zur Neurohypophyse geleitet, wo Adiuretin ins Blut freigesetzt wird. Dieses antidiuretische Hormon erhöht unter anderem die Wasserpermeabilität der Darmwand und des Tubulusapparates der Nieren, was eine verstärkte Aufkonzentrierung des Primärharns verursacht (der Primärharn ist ein Ultrafiltrat des Blutes, das in den Nierenkörperchen bei einer Rate von 120 mL/Minute gebildet wird). Durch den Schweiß wird ebenfalls Wasser mit osmolaritätsabhängigen Salzmemgen (vorwiegend NaCl) eliminiert.

Ebenso können Änderungen des Blutvolumens kompensiert werden. Bei einer Verminderung des Blutvolumens werden sowohl Adiuretin als auch Aldosteron freigesetzt. Dies bewirkt eine gesteigerte Resorption von H_2O und Na^+ , welche aus Elektroneutralitätsgründen oft von einem passiven Cl^- -Transport begleitet ist. Wie bereits erwähnt wurde, ist Aldosteron auch an der Regulation der extrazellulären K^+ -Konzentration beteiligt. Im ersten Teil des Tubulusapparates, im proximalen Tubulus, werden die Kaliumionen im gleichen Mass wie die Natriumionen etwa zu 66 % aus dem Primärharn rückresorbiert. Im nachfolgenden distalen Konvolut wird aber die K^+ -Transportrichtung dem Kaliumhaushalt angepasst und es findet

Rückresorption oder Sekretion statt.

Im Zellinnern wird die Osmolarität zum grössten Teil von den Kaliumionen bestimmt, die vorwiegend dort für lebenswichtige Prozesse erforderlich sind, im Gegensatz zu den Natriumionen, die ihre Hauptfunktion im extrazellulären Raum erfüllen. Ein aktiver Transportmechanismus, die sogenannte Natrium-Kalium-Pumpe, sorgt für die Aufrechterhaltung dieser zwei Konzentrationsgefälle. Lokale, kurzfristige Änderungen dieser Konzentrationsgradienten an der Membranoberfläche von Nervenzellen sind für die Entstehung und Fortleitung von Aktionspotentialen verantwortlich.

In Figur 2.2 wird die Regulation des Ca^{2+} -Haushaltes im Plasma schematisch dargestellt. Zu beachten ist, dass etwa 99 % des totalen menschlichen Calciums im Skelett gelagert ist. Nur ein Bruchteil des übrigen Calciums liegt im Plasma vor und ist dabei zu mehr als zur Hälfte an Proteinen und Komplexbildnern gebunden. Physiologisch aktiv ist lediglich das ionische Calcium [59, 60]. Es spielt bei zahlreichen lebenswichtigen Vorgängen wie der Calcifikation der Knochen, der Blutgerinnung, der Freisetzung oder Aktivierung verschiedener Hormone und Enzyme, oder der Umwandlung elektrischer Information in chemische Informationsträger oder in mechanische Energie eine unentbehrliche Rolle. So bewirkt das Eindringen von Calciumionen in die Synapsen von Nervenzellen als Folge eines Aktionspotentials die Freisetzung von Überträgersubstanzen. In den Muskelzellen wird durch den von einem Aktionspotential induzierten Ca^{2+} -Ausstrom vom sarcoplasmatischen Reticulum ins Cytosol eine Kontraktion ausgelöst. Um die Calciumkonzentration im Blut möglichst konstant zu halten, herrscht zwischen dem Lieferungsorgan (Darm), den Speicherzentren (Knochen) und dem Ausscheidungsorgan (Nieren) ein optimales Regulierungssystem, wobei die Schilddrüse und die Nebenschilddrüsen eine zentrale Rolle spielen. Die freigesetzten Hormone regulieren gleichzeitig den Phosphathaushalt im Blut, der sehr eng mit dem des Calciums gekoppelt ist, da beide Ionen in Form von Hydroxylapatit die Knochenmatrix aufbauen. Die Gesamtwirkung des Parathormons kann als Erhöhung der Calcium- und Senkung der Phosphatkonzentration im Blutplasma zusammengefasst werden; die des Calcitonins

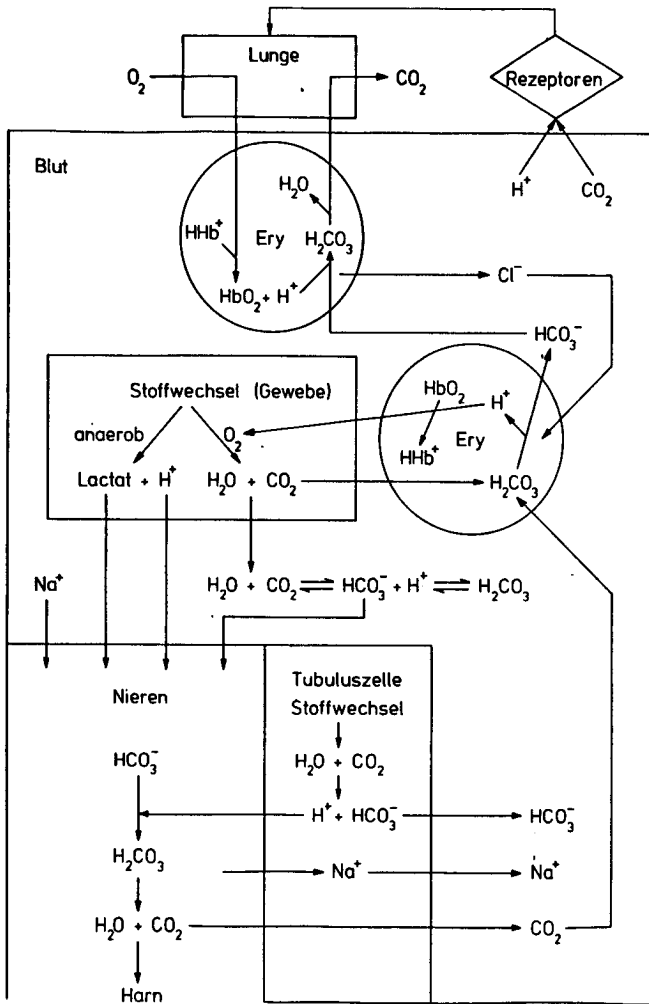


Figur 2.2. Schematische Regulation des Ca^{2+} -Haushaltes.

kann als Verminderung beider Parameter betrachtet werden. Der aktive Metabolit des Vitamins D, 1,25-Dihydroxy-cholecalciferol, senkt diese Parameter ebenfalls, indem er die Calcifikation der neugebildeten Knochengewebe fördert. Da der Ca^{2+} -Plasmaspiegel die Regelgrösse für die Produktion und Ausschüttung der erwähnten Hormone darstellt, erfüllen hier Calciumliganden (u. a. Albumin) und Wasserstoffionen als Konkurrenten bei Komplexbildungen indirekt eine massgebliche Funktion.

Da die biochemische Aktivität der meisten Enzyme pH-abhängig ist, sind die Konsequenzen von Änderungen der Wasserstoffionenaktivität für den allgemeinen Körperstoffwechsel noch umfassender. Trotz kontinuierlicher, aber schwankender Aufnahme von sauren Metaboliten durch das Blut ist dessen pH-Wert einer der am besten kontrollierten chemischen Parameter des Organismus (vgl. Fig. 2.3). Die Puffereigenschaften der extrazellulären Flüssigkeiten, die Ausscheidungsvorgänge der Niere und der pulmonale Gasaustausch sind für die Konstanthaltung der H^+ -Aktivität des Blutes verantwortlich. Die Proteine des Blutes liefern zu dessen Pufferkapazität einen wesentlichen Beitrag, wobei des Imidazolringsystem des Histidins besondere Bedeutung zukommt. Wegen dem hohen Gehalt an Imidazolsysteme ist Hämoglobin das wichtigste organische Puffersystem des Blutes [61]. Beim Desoxygenieren von Oxyhämoglobin wird gleichzeitig H^+ aufgenommen, so dass ein Ausgleich für das simultan ausgetauschte Kohlendioxid gewährleistet ist. Der umgekehrte Mechanismus findet bei der O_2 -Aufnahme statt. Das Kohlendioxid, das von den aeroben Stoffwechselvorgängen produziert wird, nimmt im Säure-Basen-Haushalt eine besondere Stellung ein, da es zu dem massgeblichen Bicarbonat-Puffersystem führt. Aus dem Dissoziationsgleichgewicht der Kohlensäure wurde folgende Beziehung zur Berechnung des pH-Wertes im Blut abgeleitet (Henderson-Hasselbalch-Gleichung):

$$\text{pH} = \text{pK}_{\text{H}_2\text{CO}_3} + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} ; \quad \text{pK}_{\text{H}_2\text{CO}_3} = 6.1 \quad (2.1)$$



Figur 2.3. Schematische Regulation des Säure-Basen-Haushaltes (Hb: Hämoglobin; Ery: Erythrozyt).

Da H_2CO_3 einerseits mit dem Kohlendioxid, andererseits mit dem Bicarbonat im Gleichgewicht steht, sind zwei anatomische Systeme (Lunge, Niere) an dem Haushalt dieser Säure beteiligt. Kohlendioxid wird im Blut von den Geweben zur Lunge transportiert z. B. als gelöstes CO_2 , in Form von an Proteine und Hämoglobin gebundenen Carbamaten bzw. als Bicarbonat und Kohlensäure. Spezifische Sensoren im Bereich des Hirnstammes nehmen den CO_2 -Partialdruck und die H^+ -Aktivität im arteriellen Blut wahr und regulieren dementsprechend die Atmung, um pH-Änderungen zu kompensieren. Ueberschreitet der arterielle CO_2 -Partialdruck 40 Torr, oder sinkt der pH-Wert unter 7.40, so wird die CO_2 -Abgabe durch Hyperventilation rasch verstärkt. Das Bicarbonat, zusammen mit dem Chlorid, wird hauptsächlich als Gegenion des Natriums in den Nieren filtriert, wobei ein Teil im Tubulusapparat ebenfalls rückresorbiert wird. Weil prinzipiell Cl^- durch HCO_3^- ersetzt werden kann, ist die renale Ausscheidung der Anionen eng mit dem Säure-Basen-Haushalt verknüpft. Dies führt u. a. zu einer nahezu konstanten Summe der Chlorid- und Bicarbonatkonzentration im Blut. Die Ausscheidung anderer saurer Stoffwechselprodukte, wie Milchsäure und Schwefelsäure, wird ebenfalls durch die Nierenfunktion übernommen.

2.2 Störungen der Regulation der Kationenkonzentrationen

[57, 62-64]

Neben einer defizienten Nahrung kann jede Gleichgewichtsverschiebung der Gesamtbilanz eines exogenen Stoffes grundsätzlich zwei organische Ursachen haben. Es sind dies Störungen in der Aufnahme und in der Ausscheidung der betreffenden Komponente. Da die Wasser- und Kationenüberführung vom Magen-Darmtrakt in die Blutbahnen hauptsächlich passiv erfolgt, die renale Elimination aber aus mehreren komplexeren Vorgänge besteht, ist die Nierenfunktion anfälliger als die gastrointestinale Gewinnung. Die meisten Nierenbeschwerden führen dementsprechend zu pathologischen Kationenkonzentrationen in den extrazellulären Körperflüssigkeiten. Aufkonzentrierungen oder Verdünnungen des Plasmas können aber auch durch ungenügende bzw. überdosierte Wasseraufnahme hervorgerufen werden. Störungen des

Kationenhaushaltes können ebenfalls bei Verlusten an isotonen Körperflüssigkeiten auftreten, wie z. B. bei Erbrechen, Durchfall, Blutverlust oder schweren Brandverletzungen. Das Herz als Förderorgan des Blutkreislaufes (d. h. blutdruck- und durchblutungsbestimmend) ist bei Leistungsabnahme oft ebenfalls für Konzentrationsänderungen der geladenen Teilchen des Blutes verantwortlich. Zu berücksichtigen ist, dass sogar bei normaler Gesamtbilanz eines Kations seine Verteilung im Körper von der gesunden Situation stark abweichen kann. Verschiebungen von der Normalkonzentration einer gegebenen Komponente im Blut werden bei erhöhten Werten mit dem Präfix Hyper-, bei erniedrigten Werten mit Hypo- bezeichnet.

Neben diesen allgemeinen Störungsquellen treten kationenspezifischere pathologische Erscheinungen auf. Das generalisierte Oedem ist eine häufige Ursache von Hyponatriämie. Wegen erhöhten Kapillarblutdruck infolge Leistungsabnahme des Herzens kommt es zu einer verallgemeinerten Flüssigkeitsansammlung und somit zu einem Verdünnungseffekt. Dieselben Folgen hat auch die Proteinausscheidung bei gewissen Nierenerkrankungen. Gleichzeitige Na^+ - und K^+ -Konzentrationsabnahme tritt oft bei chronischen Alkoholikern mit Lebercirrhose auf. Da der Transport zwischen extra- und intrazellulärem Raum dieser beiden Kationen gekoppelt ist, können Störungen dieses Vorganges ebenfalls zu Na^+ - und K^+ -Konzentrationsänderungen führen. Hypokaliämien werden zudem durch Alkalosen, Insulinüberdosen oder gewisse Nebennierenrinde-Funktionsstörungen verursacht. Durch die Erhöhung des Ruhepotentials kann im Extremfall eine Hypokaliämie zu Schlaflähmungen und Herzrhythmusstörungen, jedoch selten zum Herzstillstand führen. Durch eine Erniedrigung des Ruhepotentials induzierte starre Lähmung hat aber die akute Hyperkaliämie oft diese tödliche Folge. Da neben der Natrium-Kalium-Pumpe u. a. ein K^+ - H^+ -Austauschprozess zwischen Intra- und Extrazellulärraum besteht, bewirkt ein Anstieg der H^+ -Aktivität im Blut die Zunahme des K^+ -Uebertrittes in die extrazelluläre Flüssigkeit und somit eine Hyperkaliämie.

Die Hypercalcämie ist oft durch Hyperparathyreoidismus, der durch Nebenschilddrüsenenerkrankung erhöhten Parathormonsekretion, bedingt. Vergiftung

an Vitamin D, Calcitoninmangel oder Immobilisation führen ebenfalls zum Anstieg des Calciumspiegels im Blutplasma. Gewisse Tumoren, sowie Osteoporose (Erkrankung mit erhöhtem Knochenabbau und verminderter Knochenbildung) scheinen auch den gleichen Effekt hervorzurufen [65]. Neben zahlreichen Folgen sind u. a. Herzrhythmusstörungen und Nierensteinbildung zu nennen. Gesteigerte Calcitoninausschüttung, Hypoparathyreoidismus, Phosphatvergiftung oder Mangel an Vitamin D führen andererseits zu Hypocalcämie. Je nach Ursache dieser Erscheinung treten dann Rachitis, Hemmung der Blutgerinnung oder, infolge neuromuskulärer Uebererregbarkeit, Spasmen der Skelettmuskulatur auf.

Die Störungen des Säure-Basen-Gleichgewichtes werden mit zwei Hauptbegriffen charakterisiert. Bei Senkung des pH-Wertes im arteriellen Blut unter den Referenzbereich (vgl. Tab. 2.2) spricht man von Acidose; von Alkalose spricht man bei erhöhtem pH. In beiden Fällen unterscheidet man zwischen respiratorischen und nichtrespiratorischen Ursachen. Diese zwei organischen Systemerscheinungen können sich manchmal gegenseitig kompensieren. Dies führt dann zu keinen wesentlichen pH-Verschiebungen. Respiratorische pH-Änderungen kommen bei gestörter Atmung zum Vorschein. Acidosen ergeben sich dabei durch eine hypoventilationsbedingte Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks, während Alkalosen bei Hyperventilation auftreten. Gewisse Stoffwechselstörungen führen zu nichtrespiratorischen bzw. metabolischen Acidosen oder Alkalosen. Die bedeutsamste Ursache ist sicher ein dekompensierter Diabetes mellitus (eine Blutzuckerkrankheit) wo es als Folge des erhöhten und unvollständigen Fettsäureabbaus zur Anhäufung von Acetessigsäure und β -Hydroxybuttersäure im Blut kommt. Bei intensiver körperlichen Aktivität ist die aerobe Glycolyse in den Muskelzellen ungenügend, was zur Milchsäureanreicherung führt und damit beim gesunden Menschen eine stoffwechselbedingte Lactoacidose ergibt. Durch ergiebiges Erbrechen verbunden mit grossem Salzsäureverlust, folgt dagegen eine metabolische Alkalose. Nierenfunktionsstörungen verursachen in der Regel schwerwiegende pH-Verschiebungen im Blut, welche ebenfalls als nicht atmungsbedingte Ursachen klassifiziert werden.

2.3 Zusammensetzung des Blutes und Kationenkonzentrationen in extra- und intrazellulären Körperflüssigkeiten

Wird natives Blut zentrifugiert, so trennen sich die Zellen vom Plasma, das etwa 56 % des Blutvolumens darstellt [66]. Lässt man zuvor das Blut gerinnen, dann scheidet sich eine ähnliche Flüssigkeit, das Serum, von dem Gerinnsel ab. Plasma und Serum unterscheiden sich somit im wesentlichen nur durch den Gehalt an Fibrinogen und anderen Gerinnungsfaktoren. Für die nachstehenden Diskussionen seien in Tabelle 2.1 und 2.2 einige wichtige Daten über das Serum zusammengefasst. Dabei muss beachtet werden, dass die Referenzkonzentrationen nur Anhaltsgrößen darstellen und keinesfalls als allgemeine Erwartungswerte betrachtet werden können [67]. Die unter klinischen Bedingungen (Blut von nüchternen Individuen) erhaltenen Resultate widerspiegeln nicht unbedingt ein reelles Gesamtbevölkerungsbild. Zudem sind gewisse Parameter vom Geschlecht, vom Alter, von den Ess- und Lebensgewohnheiten oder von der Tätigkeit abhängig, was intra- und interindividuelle Variationen zur Folge hat. Die Referenzbereiche ($\bar{x} \pm 2s$) der Tabelle 2.2 sind auf Grund der 95%-Normalbereiche verschiedener Autoren zusammengestellt worden. Der Einsatz von verschiedenen Messmethoden mit zum Teil erheblichen systematischen Fehlern sowie unterschiedliche Testpopulationen und Bedingungen führen zu beachtlichen Abweichungen zwischen den Resultaten einzelnen Autoren. Die angegebenen Referenzbereiche sind daher grösser als die inter- und intraindividuellen Bereiche und können als repräsentativ für eine breitgewählte Bevölkerung betrachtet werden.

Als Filtrat des Plasmas ist die interstitielle Flüssigkeit das Transportmedium zwischen dem Blut und den Geweben. Da die beiden extrazellulären Flüssigkeiten durch passive Vorgänge in Verbindung stehen, sind ihre Zusammensetzungen etwa identisch. Das Interstitium ist jedoch proteinärmer. Dagegen unterscheiden sich Blutplasma und Cytosol sehr stark (vgl. Fig. 2.4). Während Na^+ und Cl^- die häufigsten Ionen des Serums sind, sind K^+ und HPO_4^{2-} die repräsentativsten geladenen Teilchen des Zellinnern. Diese

Tabelle 2.1. Eigenschaften und partielle Zusammensetzung des menschlichen Blutserums [55, 66, 68].

Messgrösse	Referenzwert
Osmolarität	290 mmol L ⁻¹
Viskosität, relative	4.75 (Blut), 1.88 (Plasma), 1.00 (Serum)
kinematische	2.91 mm ² s ⁻¹ (Blut), 1.15 mm ² s ⁻¹ (Serum)
Spezifische Leitfähigkeit	0.0119 Ω ⁻¹ cm ⁻¹
H ₂ O	932 g L ⁻¹ a)
Cl ⁻	104 mmol L ⁻¹
HCO ₃ ⁻	24.9 mmol L ⁻¹
CO ₂	26.1 mmol L ⁻¹ , pCO ₂ = 40 Torr
HPO ₄ ²⁻ , H ₂ PO ₄ ⁻	1.04 mmol L ⁻¹
SO ₄ ²⁻ , HSO ₄ ⁻	0.33 mmol L ⁻¹
Citrat	0.10 mmol L ⁻¹
Proteine, gesamt	73 g L ⁻¹
Albumin	45 g L ⁻¹
Lipide, gesamt	5.7 g L ⁻¹
Triglyceride	1.4 g L ⁻¹ , 1.2 mmol L ⁻¹ (875 g mol ⁻¹) b)
Cholesterin	2.0 g L ⁻¹ , 5.2 mmol L ⁻¹ (387 g mol ⁻¹) c)
Phospholipide	2.2 g L ⁻¹ , 2.8 mmol L ⁻¹ (774 g mol ⁻¹) b)
Fettsäuren, freie	0.1 g L ⁻¹ , 0.4 mmol L ⁻¹ (284 g mol ⁻¹) b)

a) Vgl. 2.5

b) Mittlere relative Molmasse

c) Relative Molmasse

Tabelle 2.2. Konzentrationen bzw. Aktivitäten [mmol L^{-1}] der freien Kationen im menschlichen Blutserum [66, 69].

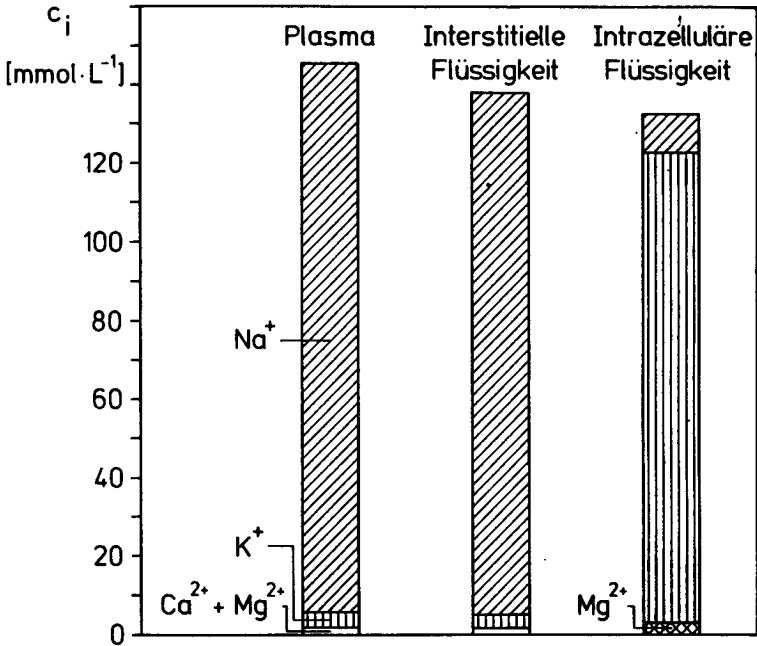
I^{Z+}	Konzentration [mmol L^{-1}]		
	Referenzwert	Referenzbereich	Extrembereich ^{a)}
H^+ b)	$4.8 \cdot 10^{-5}$	$4.4 \cdot 10^{-5} - 5.4 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5} - 25 \cdot 10^{-5}$
Na^+	140	135 - 150	90 - 200
K^+	4	3.5 - 5.0	1 - 10
Mg^{2+}	0.6	0.45 - 0.80	0.1 - 5
Ca^{2+}	1.1	1.0 - 1.2	0.5 - 2.5
Ca^{2+} tot. c)	2.5	2.25 - 2.75	1 - 6
	Aktivität [mmol L^{-1}] d)		
H^+	$3.8 \cdot 10^{-5}$ (pH 7.42)	$3.4 \cdot 10^{-5} - 4.4 \cdot 10^{-5}$ (pH 7.36 - 7.47)	$1.6 \cdot 10^{-5} - 2.0 \cdot 10^{-4}$ (pH 6.7 - 7.8)
Na^+	105	102 - 112	68 - 149
K^+	3.0	2.6 - 3.7	0.74 - 7.4
Mg^{2+}	0.21	0.16 - 0.28	0.04 - 1.75
Ca^{2+}	0.37	0.34 - 0.41	0.17 - 0.85
Ca^{2+} tot. c)	0.84	0.76 - 0.93	0.34 - 2.03

a) Extrempathologische Werte

b) Berechnung der Konzentrationen aus den pH-Werten im arteriellen Blut

c) Nach Freisetzung des gebundenen Calciums (vgl. Kap. 7)

d) Berechnung der Aktivität aus der Konzentration (vgl. 4.1.3) unter Berücksichtigung der Referenzkonzentrationen der Störionen (vgl. noch Anmerkung c))



Figur 2.4. Konzentrationen der freien Kationen in Körperflüssigkeiten des Menschen [57, 66, 70].

extrem unterschiedlichen Ionenkonzentrationen weisen eindeutig auf aktive Transportmechanismen durch die Zellmembranen hin. Es ist deshalb naheliegend, dass die Untersuchung der Kationenkonzentrationen im Plasma bzw. im Serum (klinische Routineanalytik) und in den Zellen die Hauptanwendungsbereiche ionenselektiver Elektroden darstellen.

2.4 Diagnostische Bedeutung der Kationenkonzentrationen im Blut

Seit langem wird in der medizinischen Praxis der Gehalt an Natrium, Kalium und Calcium in Blut ermittelt [71]. Die Konzentrationsbestimmungen von diesen chemischen Elementen zählen heute noch zu den Grundlagen einer gezielten Diagnostik und sind auch die verbreitetsten und häufigsten Plasma- bzw. Serumanalysen, die in den klinisch-chemischen Laboratorien durchgeführt werden [62, 72]. So wurden 1982 im Zentrallaboratorium des Universitätsspitals von Zürich (ca. 1300 Betten) pro Tag durchschnittlich 208 Natrium-, 293 Kalium- und 173 Calciumkonzentrationen in Plasma oder in Serum bestimmt (etwa 30 % aller Analysen) [73]. Zu berücksichtigen sind noch 233 pH-Messungen pro Tag, die in unmittelbarer Nähe der Patienten erfolgten (Intensivpflegestation, Operationssaal). Trotz dieser beachtlichen Anzahl Analysen soll nicht vergessen werden, dass ein Krankheitszustand sich üblicherweise mit Verzögerung in der Blutzusammensetzung auswirkt. Die Messwerte sind demnach zu relativieren und im klinischen Zusammenhang, mit anderen Symptomen, zu interpretieren [62, 74]. Bei der Interpretation einer Kationenkonzentrationsänderung muss beachtet werden, dass die Haushaltstörung des betreffenden Ions und/oder die des Wassers beteiligt sein können. Dabei sollte zusätzlich die Probebehandlung und die Analysenmethode berücksichtigt werden (vgl. 2.5 und Kap. 3).

Die Bestimmung der Natrium-, Kalium- und Calciumkonzentrationen im Plasma bzw. im Serum bleibt trotz der erwähnten Vorbehalte ein grundlegendes Hilfsmittel für die klinische Diagnostik von zahlreichen Beschwerden [63, 72, 75]. Diese Messgrößen liefern bei nahezu sämtlichen Störungen der Nierenfunktion und des Herz-Blutkreislaufes, bei hormonalen Fehlsteuerungen verschiedenster Art, bei Lebercirrhosen, Darmentzündungen, Verbrennungen, Bewusstseinstörungen und Oedemen unentbehrliche Information im Hinblick auf gezielte Behandlungen. Für gewisse Therapien, wie z. B. Infusionstherapie und während der Blutdialyse mit einer künstlichen Niere sind die Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen im Plasma, und manchmal eben-

falls der pH-Wert des Blutes, direkte Kontrollparameter. Sie werden auch nahezu vor jedem chirurgischen Eingriff bestimmt. Während schwerwiegender Operationen wie etwa Herzoperationen werden insbesondere die K^+ -Konzentration und der pH-Wert im Blut (dieser letzte Parameter ebenfalls in Intensivpflegestationen zur Ueberwachung der künstlichen Beatmung) laufend verfolgt. Dabei müssen die Analysenresultate spätestens 5 Minuten nach der Probeentnahme bekannt sein, um den aktuellen Zustand des Patienten noch sinnvoll wiederzugeben und adäquate Korrekturmassnahmen zu erlauben [76].

Zu beachten ist, dass in der klinischen Routineanalytik bei Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Bestimmungen üblicherweise die Konzentrationen ermittelt werden, bei H^+ aber die Aktivität erfasst wird (vgl. Kap. 3 und 4). Physiologisch ist jedoch wohl die Aktivität dieser Ionen der relevante Parameter bzw. die wahre Regelgrösse [60, 77, 78]. Trotzdem hat sich die Bestimmung der Konzentrationen in der medizinischen Praxis vielfach bewährt.

2.5 Einfluss des Protein-Lipid-Volumens auf die Kationen-konzentrationen im Blut

In den letzten zehn Jahren wurde zunehmend von methodebedingten Abweichungen bei Na^+ - und K^+ -Konzentrationsbestimmungen in Serum berichtet. Dabei war die Einführung der direkten Potentiometrie als Alternativtechnik zur Flammenphotometrie der Ursprung einer wachsenden Kontroverse [79], die zum Teil durch kommerzielle Interessen unterstützt wurde. Die folgenden Modellberechnungen sollen zum Verständnis der beschriebenen Konzentrationsunterschiede beitragen.

Grundsätzlich lässt sich in jeder Körperflüssigkeit die Stoffmenge einer gelösten Komponente auf das Probevolumen oder auf dessen freies Wasservolumen beziehen. Im Plasma und im Serum unterscheiden sich diese zwei Bezugsvolumen vorwiegend durch den Raum, der von den Proteinen und Lipiden eingenommen wird [78, 80-84]. Werden die folgenden Betrachtungen auf

ionische Plasma- bzw. Serumkomponenten beschränkt, so können prinzipiell zwei verschiedene Konzentrationen des Ions I ermittelt werden:

$$c_{T,i} = \frac{M_{T,i}}{V_T} = \frac{M_{F,i} + M_{K,i}}{V_W + V_{PL}} \quad (2.2)$$

$$c_{W,i} = \frac{M_{F,i}}{V_W} = \frac{M_{F,i}}{V_T - V_{PL}} \quad (2.3)$$

mit $M_{T,i} = M_{F,i} + M_{K,i}$ (2.4)

$$V_T = V_W + V_{PL} \quad (2.5)$$

wobei $c_{T,i}$: Gesamtkonzentration des Ions I bezogen auf das Plasmavolumen;
wird mittels Atomspektrometrie (z. B. Flammenphotometrie)
bestimmt (vgl. Kap. 3)

$c_{W,i}$: Konzentration der freien Form des Ions I bezogen auf das
freie Plasmawasservolumen; wird mittels direkter Potentio-
metrie bestimmt (vgl. Kap. 3 und 4)

$M_{F,i}$: Stoffmenge der freien Form des Ions I [mol]

$M_{K,i}$: Stoffmenge der gebundenen Form des Ions I [mol]

$M_{T,i}$: Gesamtstoffmenge des Ions I (vgl. Gl. 2.4) [mol]

V_W : freies Plasmawasservolumen [L]

V_{PL} : Protein-Lipid-Volumen [L]

V_T : gesamtes Plasma- bzw. Serumvolumen (vgl. Gl. 2.5) [L]

Aus verschiedenen Arbeiten [78, 79, 82, 84-97] geht hervor, dass die Ionenkonzentration $c_{W,i}$ im freien Plasmawasservolumen der physiologisch relevante Parameter sein soll. Letztlich dürfte die entsprechende Ionenaktivität die massgebende Grösse darstellen [60, 77, 78]. Aus den Gleichungen (2.2) und (2.3) können weitere Beziehungen hergeleitet werden:

a) Konzentrationsdifferenz Δc_i

$$\Delta c_i = c_{W,i} - c_{T,i} = \frac{v \cdot M_{T,i} - M_{K,i}}{V_W} \quad (2.6)$$

mit $v = \frac{V_{PL}}{V_T}$: relatives Protein-Lipid-Volumen (2.7)

b) relative Konzentrationsdifferenzen $\Delta c_i/c_{T,i}$ und $\Delta c_i/c_{W,i}$

$$\frac{\Delta c_i}{c_{T,i}} = \frac{v - m_{K,i}}{1 - v} \quad (2.8)$$

mit $m_{K,i} = \frac{M_{K,i}}{M_{T,i}}$: relative Stoffmenge der gebundenen Form des Ions I (Komplexierungsgrad) (2.9)

$$\frac{\Delta c_i}{c_{W,i}} = \frac{v - m_{K,i}}{m_{F,i}} \quad (2.10)$$

mit $m_{F,i} = \frac{M_{F,i}}{M_{T,i}}$: relative Stoffmenge der freien Form des Ions I (Ionisierungsgrad) (2.11)

c) Funktion $c_{W,i} = f(c_{T,i})$

$$c_{W,i} = \frac{m_{F,i}}{1-v} c_{T,i} \quad (2.12)$$

Auf Grund dieser Funktion (2.12) wurden in Figur 2.5 die verschiedenen Konzentrationsdifferenzbereiche mit den entsprechenden v - und $m_{F,i}$ -Randbedingungen dargestellt ($v = 0.068$ entspricht einem normalen Protein-Lipid-Volumen von 6.8 mL/100 mL Plasma; $m_{F,i} = 1$ entspricht vollständiger Ionisierung des Ions I). Aus dieser Darstellung sowie aus Gleichung (2.6) kann leicht entnommen werden, dass die absolute Konzentrationsdifferenz Δc_i der Konzentration $c_{T,i}$, dem Protein-Lipid-Volumen V_{PL} und dem Ionisierungsgrad $m_{F,i}$ proportional bzw. dem Komplexierungsgrad $m_{K,i}$ umgekehrt proportional ist. Die Komplexierung des Ions I wirkt also dem Protein-Lipid-Volumeneffekt kompensatorisch entgegen, was allgemeine Aussagen erschwert. Kann aber die Komplexierung von I vernachlässigt werden so gilt:

$$M_{K,i} = 0, \quad M_{T,i} = M_{F,i}, \quad m_{F,i} = 1 \quad (2.13)$$

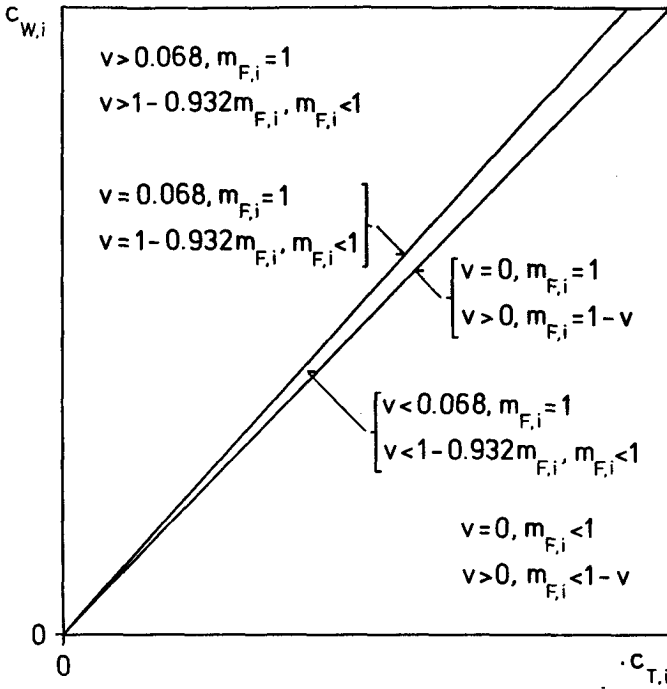
Die obenstehende Betrachtung wird dadurch wesentlich vereinfacht. Die flammenphotometrisch und direkt-potentiometrisch bestimmten Konzentrationen sind dann wie folgt definiert:

$$c_{T,i} = \frac{M_{T,i}}{V_T} \quad (2.14)$$

$$c_{W,i} = \frac{M_{T,i}}{V_W} = \frac{M_{T,i}}{V_T - V_{PL}} = \frac{M_{T,i}}{1 - v} V_T \quad (2.15)$$

Da das Protein-Lipid-Volumen V_{PL} grösser null ist, kann aus (2.14) und (2.15) die folgende wichtige Relation abgeleitet werden:

$$c_{W,i} > c_{T,i} \quad (2.16)$$



Figur 2.5. Berechnete Konzentration $c_{W,i}$ der freien Form des Ions I im freien Plasmawasservolumen als Funktion der Gesamtkonzentration $c_{T,i}$ bezogen auf das Plasma- bzw. Serumvolumen bei verschiedenem Protein-Lipid-Gehalt (Referenzwert für v : 0.068) und unterschiedlichem Ionisierungsgrad des Ions I ($m_{F,i}$) (vgl. Tab. 2.1 und Gl. 2.7 und 2.12).

Entsprechend folgen weitere Beziehungen:

$$\Delta c_i = c_{W,i} - c_{T,i} = \frac{v}{1-v} c_{T,i} = v c_{W,i} \quad (2.17)$$

$$\frac{\Delta c_i}{c_{T,i}} = \frac{v_{PL}}{v_W} = \frac{v}{1-v} \quad (2.18)$$

$$\frac{\Delta c_i}{c_{W,i}} = \frac{v_{PL}}{v_T} = v \quad (2.19)$$

$$c_{W,i} = \frac{1}{1-v} c_{T,i} \quad (2.20)$$

Sowohl Protein- als auch Lipidkonzentrationen werden heute routinemässig im klinischen Labor bestimmt. Um die abgeleiteten Gleichungen für die Praxis anwenden zu können, muss somit zwischen diesen ermittelten Konzentrationen der Proteine und Lipide und den definierten Volumina v_{PL} bzw. v_W eine Beziehung hergeleitet werden. Auf Grund von gemessenen mittleren spezifischen Volumina von Proteinen und Lipiden [83] wird die folgende Beziehung vorgeschlagen:

$$v = \frac{1}{100} (0.9 + 0.73 c_P + 1.03 c_L) \quad (2.21)$$

Diese kann für die einzelnen Lipidfraktionen auf Grund deren spezifischer Volumina erweitert werden:

$$v = \frac{1}{100} (0.9 + 0.73 c_P + 1.09 c_T + 0.99 c_C + 1.03 c_S + c_F) \quad (2.22)$$

wobei v : relatives Protein-Lipid-Volumen (vgl. Gl. 2.7)
[mL/mL Plasma bzw. Serum]
 c_P, c_L : Protein- bzw. Lipidgehaltskonzentration
[g/100 mL Plasma bzw. Serum]
 c_T : Triglyceridkonzentration [g/100 mL]
 c_C : Cholesterinkonzentration [g/100 mL]
 c_S : Phospholipidkonzentration [g/100 mL]
 c_F : Konzentration der freien Fettsäuren [g/100 mL]

Daraus können beide Plasmapartialvolumen leicht berechnet werden:

$$V_{PL} = v V_T \quad (2.23)$$

$$\text{und } V_W = V_T (1 - v) \quad (2.24)$$

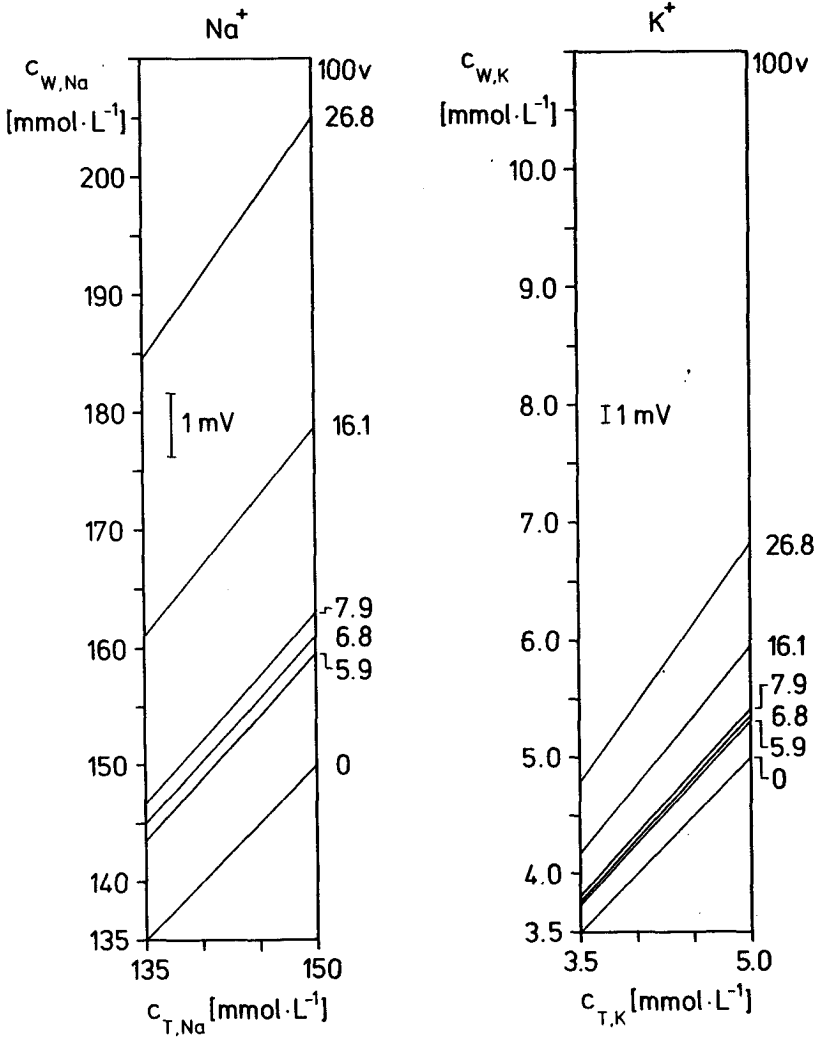
Das Ausmass des Protein-Lipid-Volumeneffektes bei normalen $c_{T,Na}^-$ und $c_{T,K}^-$ -Werten wurde für Plasmaproben mit physiologisch normalem bzw. pathologischem Protein- und Lipidgehalt berechnet (vgl. Tab. 2.3 und Fig. 2.6). Daraus ist ersichtlich, dass die absolute Grössenordnung dieses Effektes, und dementsprechend dessen klinische Auswirkungen bei Natrium wesentlich grösser ist als bei Kalium. Die höhere Na^+ -Konzentration, zusammen mit dem engen relativen Na^+ -Referenzbereich (10.7 % verglichen mit 37.5 % bei K^+) sind die Ursachen dieser unterschiedlichen Konsequenzen. Schon bei normalem Protein- und Lipidgehalt können geringe Hypernatriämien durch $c_{T,Na}^-$ -Bestimmungen übersehen werden. Viel schlimmer jedoch ist es bei Patienten mit extrem protein- und/oder lipidreichem Serum. Dort kann eine Pseudo-hyponatriämie vorgetäuscht werden, aufgrund welcher eine entsprechende Na^+ -Therapie verordnet wird, während aber die physiologisch relevante Na^+ -Konzentration $c_{W,Na}$ weit über dem Referenzbereich liegt, ja sogar die letale Grenze erreichen kann [93, 94]. Um in der medizinischen Praxis solche dramatischen Fehlinterpretationen zu verhindern, liess sich prinzipiell jeder $c_{T,Na}^-$ -Wert mit Gleichung (2.20) auf das Plasmawasservolumen beziehen, falls der Protein-Lipid-Gehalt bekannt wäre.

Tabelle 2.3. Berechnete, auf das freie Plasmawasservolumen bezogene Na^+ - und K^+ -Konzentrationen. Für die beiden Randwerte der Na^+ - bzw. K^+ -Konzentrationen des physiologischen Referenzbereiches sind jeweils Protein- und Lipidgehalt variiert worden (vgl. Tab. 2.1 und 2.2; Berechnungen beruhend auf Gl. 2.20 und 2.21).

c_p [g/100 mL]	c_L [g/100 mL]	100 v 1)	$c_{T,Na}$ 2)	$c_{W,Na}$ 2)	$c_{T,K}$ 2)	$c_{W,K}$ 2)
normal	normal		135	144.9	3.5	3.76
7.3	0.57	6.8	150	161.0	5.0	5.37
normal tief	normal tief		135	143.5	3.5	3.72
6.2	0.50	5.9	150	159.5	5.0	5.32
normal hoch	normal hoch		135	146.6	3.5	3.80
8.2	1.0	7.9	150	162.9	5.0	5.43
normal	extrem hoch		135	184.5	3.5	4.78
7.3	20.0	26.8	150	205.0	5.0	6.83
extrem hoch	normal		135	160.9	3.5	4.17
20.0	0.57	16.1	150	178.8	5.0	5.96

1) [mL/100 mL]

2) [mmol L⁻¹]



Figur 2.6. Na^+ - bzw. K^+ -Konzentration bezüglich des freien Plasmawasservolumens als Funktion der entsprechenden Konzentration bezüglich des Gesamtprobevolumens (Plasma oder Serum) bei verschiedenem Protein- und Lipidgehalt (vgl. Tab. 2.3).

Wie schon erwähnt wurde, liefert die direkte Potentiometrie die medizinisch bedeutenden Parameter. Wird aber die Probe (Plasma oder Serum) zuvor verdünnt, so verlieren die potentiometrischen Konzentrationsbestimmungen ebenfalls an Aussagekraft und nähern sich den flammenphotometrisch erhaltenen Werten. Bei einer derartigen Probevorbehandlung lauten die entsprechenden Konzentrationen wie folgt:

$$c_{T,i}^f = \frac{M_{T,i}}{f V_T} = \frac{c_{T,i}}{f} \quad (2.25)$$

$$c_{W,i}^f = \frac{M_{F,i}}{f V_T - V_{PL}} \neq \frac{c_{W,i}}{f} \quad (2.26)$$

mit f : Verdünnungsfaktor

$$(V_T : V_{\text{Verdünnung}} = 1 : n ; f = 1 + n)$$

Wird f gross und ist I nahezu vollständig ionisiert ($m_{F,i} \cong 1$) dann gilt:

$$V_{PL} \ll f V_T \quad (2.27)$$

und $c_{W,i}^f \cong c_{T,i}^f \quad (2.28)$

Aus Gleichung (2.25) und (2.26) kann eine Differenzengleichung und eine Beziehung zwischen $c_{W,i}^f$ und $c_{T,i}$ hergeleitet werden:

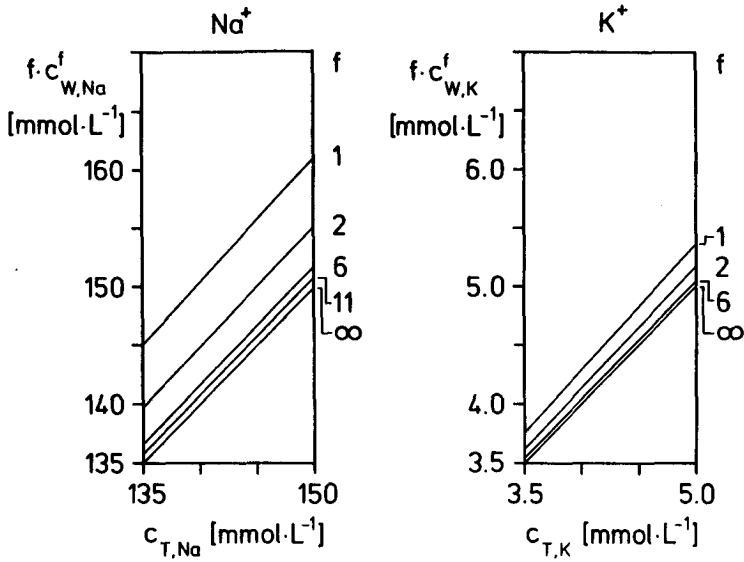
$$f \Delta c_i^f = f c_{W,i}^f - c_{T,i} = \frac{M_{T,i} v}{f V_T - V_{PL}} \quad (2.29)$$

$$c_{W,i}^f = \frac{1}{1 - \frac{v}{f}} c_{T,i}^f = \frac{1}{f - v} c_{T,i} \quad (2.30)$$

Wie aus Tabelle 2.4 und aus Figur 2.7 leicht zu entnehmen ist, nimmt der Protein-Lipid-Volumeneffekt schon bei geringer Verdünnung stark ab. Bei zehnfacher Verdünnung ($f = 11$) ist er kleiner als 10 % des ursprünglichen Wertes (keine Verdünnung: $f = 1$) und die Konzentrationsdifferenz ist bei Seren mit etwa normaler Zusammensetzung kaum noch signifikant messbar.

Tabelle 2.4. Berechnete Konzentrationsdifferenzen $f \cdot \Delta c_i^f$ bei verschiedenen Verdünnungen (vgl. Gl. 2.29) für Plasma- bzw. Serumproben mit normalen Na^+ -, K^+ -, Protein- und Lipidkonzentrationen ($v = 0.068$).

	$f \Delta c_i^f = f c_{W,i}^f - c_{T,i} ; [\text{mmol L}^{-1}]$						
Verdünnung	1:0	1:1	1:5	1:10	1:20	1:50	1:100
f	1	2	6	11	21	51	101
$c_{T,\text{Na}} = 140 \text{ mmol L}^{-1}$	10.21	4.928	1.605	0.871	0.455	0.187	0.094
$c_{T,\text{K}} = 4.0 \text{ mmol L}^{-1}$	0.292	0.141	0.046	0.025	0.013	0.005	0.003
$\Delta c_i^f / \Delta c_i$ (%)	100	48.3	15.7	8.5	4.5	1.8	0.9



Figur 2.7. Na^+ - bzw. K^+ -Konzentration bezüglich des freien Plasmawasservolumens bei verschiedenen Verdünnungsverhältnissen als Funktion der entsprechenden Konzentration bezüglich des Gesamtprobevolumens (Plasma oder Serum) bei normalem Protein- und Lipidgehalt (vgl. Tab. 2.4).

Obere Gerade: $v = 0.068$, keine Verdünnung.

Untere Gerade: unendliche Verdünnung bzw. $v = 0$.

3. METHODEN ZUR QUANTITATIVEN ERFASSUNG VON PHYSIOLOGISCH WICHTIGEN KATIONEN IM BLUT

3.1 Uebersicht

Die klinische Chemie ist schon seit längerer Zeit ein begehrter Anwendungsbereich für die verschiedensten analytisch-chemischen Methoden. Die ersten quantitativen Bestimmungen beruhten auf gravimetrischen oder volumetrischen Methoden, da Gewicht und Volumen bis zum Anfang von diesem Jahrhundert in etwa die einzigen analytisch auswertbaren und mit hinreichender Genauigkeit messbaren Parameter waren [98]. Eine bedeutende Entwicklung der instrumentellen analytischen Chemie setzte mit der photometrischen Messung der Farbintensität von Lösungen ein. Wie zuvor bei den gravimetrischen Konzentrationsbestimmungen von Kationen waren jedoch bei den colorimetrischen Methoden die chemischen Vorgänge (kationenspezifische Fällung bzw. Färbung) die kritischsten Arbeitsschritte. Konzentrationsbestimmungen ohne umfassende, vorangehende und durch das zu bestimmende Kation gegebene Probebehandlung wurden erstmals durch atomspektroskopische Methoden ermöglicht. Die spezifische Detektion beruht dabei auf verschiedenen atomaren Eigenschaften der einzelnen Kationen. Die Atomemissionsspektrometrie, insbesondere die Flammenphotometrie, und später auch die Atomabsorptionsspektrometrie wurden zum Grundgerüst der klinischen Chemie für Li^+ -, Na^+ -, K^+ -, Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Konzentrationsbestimmungen im Blutserum [99, 100]. Die direkte Ermittlung der Na^+ - und K^+ -Konzentration in unverdünntem Serum oder nativem Blut wurde aber erst durch die Entwicklung der Potentiometrie ermöglicht [77]. In der Folge wurden vermehrt Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -selektive Elektroden im medizinischen Bereich eingesetzt [77, 101]. Im Gegensatz zu den A-Kationen wurde jedoch der pH-Wert schon sehr früh potentiometrisch mittels Glasmembranelektroden bestimmt [102, 103].

Eine Uebersicht der früher und heute in der klinischen Praxis angewandten Methoden zur Konzentrationsbestimmung der im Rahmen dieser Arbeit diskutierten Kationen ist in Tabelle 3.1 gegeben. Der Einsatz dieser Methoden zur quantitativen Ermittlung der einzelnen Ionen ist im folgenden zusammengestellt.

Der pH-Wert im Serum wurde ursprünglich mittels Phenolrot als Indikator colorimetrisch bestimmt [104], wobei die Farbintensität anfänglich visuell abgeschätzt [105] und erst später spektrophotometrisch gemessen wurde [106]. Diese chemische Methode wurde durch die Einführung der hochselektiven H^+ -Glaselektrode [102] zunehmend ersetzt [103]. Die potentiometrische pH-Bestimmung im Blut gehört mittlerweile zu den ältesten und verbreitetsten Analysemethoden der klinischen Chemie. Trotzdem bestehen noch methodische Schwierigkeiten theoretischer und praktischer Art [107].

Seit etwa 20 Jahren wird in gewissen Spezialfällen die Li⁺-Konzentration im Serum ermittelt [108]. Die Bestimmung erfolgt mit atomemissions- oder atomabsorptionsspektrometrischen Methoden [109, 110].

Die Bestimmung der Na⁺-Konzentration im Serum erfolgt mit recht unterschiedlichen Verfahren. Die quantitative Fällung der Na^+ -Ionen mit Zinkuranylacetat und anschliessende gravimetrische [111] oder colorimetrische Bestimmung nach Behandlung mit Kaliumferrocyanid [112], die iodometrische Titration des Natriumpyroantimonat-Komplexes [113] und die volumetrische Ermittlung mit KOH nach der Reaktion mit α -Methoxyphenyllessigsäure sind einige Beispiele von chemischen Methoden zur quantitativen Na^+ -Bestimmung im Serum. Ab Mitte dieses Jahrhunderts wurden diese für klinischen Gebrauch eher zeitraubenden Techniken hauptsächlich durch die Flammenphotometrie abgelöst [99, 114, 115]. Andere physikalischen Methoden wurden nebenbei vereinzelt für die Na^+ -Konzentrationsermittlung im Serum eingesetzt (vgl. Tab. 3.1 und [75]). Eine echte Alternative zur Flammenphotometrie ergab sich erst 1963 durch die Einführung der NAS_{11-18} -Glaselektrode [3, 116]. Seitdem wurden verschiedene Na^+ -selektiven Elektroden in der klinischen Routineanalytik zur quantitativen Na^+ -Bestimmung im Serum

Tabelle 3.1. Methoden zur quantitativen Erfassung von physiologisch wichtigen Kationen im Blut (*: in klinisch-chemischen Laboratorien eingesetzt; 0: im Rahmen dieser Arbeit untersucht)

Methoden	Spezies					
	H ⁺	Li ⁺	Na ⁺	K ⁺	Ca _{tot}	Ca ²⁺
Gravimetrie			*	*	*	
Colorimetrie	*		*	*	*	*
Fluorometrie					*	
Titration			*	*	*	
Potentiometrie	0	0	0	0	0	0
Atomemissionsspektrometrie		*	*	*	*	
Atomabsorptionsspektrometrie		*	*	*	*	
Röntgenfluoreszenzspektrometrie				*	*	
Neutronenaktivierungsanalyse			*	*	*	

eingesetzt [28]. In mehreren Beiträgen wurden potentiometrische mit flammenphotometrischen Messungen verglichen [84, 89, 97, 117-133]. Die mit direkter Potentiometrie ermittelten Na⁺-Konzentrationen im Serum liegen jeweils zwischen etwa 1 und 8 % höher als die flammenphotometrisch erhaltenen Werte (vgl. auch 2.5).

Die Entwicklung der Bestimmung der K⁺-Konzentration im Serum verlief parallel zu der des Natriums. Ausgehend von der Fällung als Kaliumcobaltnitrit, -phosphowolframat, -chloroplatinat oder -tetraphenylborat wurden verschiedene gravimetrische, colorimetrische und titrimetrische K⁺-Bestimmungsmethoden vorgeschlagen und für Serumanalysen eingesetzt [115]. Auch hier ersetzte die Flammenphotometrie nahezu vollständig diese che-

mischen Methoden [99]. Neutronenaktivierungsanalyse [134] und Röntgenfluoreszenzspektrometrie [135] wurden zur quantitativen K^+ -Ermittlung in besonders kleinen Serumvolumina angewandt. Die Einführung von K^+ -selektiven Elektroden ersetzte allmählich teilweise die Flammenphotometrie. Dabei wurde die ursprünglich eingesetzte K^+ -Glaselektrode vollständig durch die auf Valinomycin beruhende Flüssigmembranelektrode [15, 136] verdrängt. Zahlreiche Vergleichsuntersuchungen zwischen den beiden Methoden sind in den letzten Jahren durchgeführt worden und haben im allgemeinen eine ähnliche Diskrepanz wie beim Natrium aufgezeigt [84, 89, 119-121, 123-127, 129-131, 133, 137].

Das Calcium ist in den unterschiedlichsten Bereichen der Medizin auf besonderes starkes Interesse gestossen. Dies hat während mehr als hundert Jahren zur Entwicklung einer Vielzahl von Analysemethoden der verschiedenen Formen des Calciums in Körperflüssigkeiten geführt [138-145]. Das totale Calcium im Serum wurde ursprünglich gravimetrisch bestimmt, wobei Ammoniumoxalat das meist eingesetzte Fällungsmittel war [146]. Eine Variante dieser Methode, bei welcher das ausgefällte Oxalat sauer aufgelöst und mit Kaliumpermanganat titriert wurde [147, 148], fand grosse Anwendung in der klinischen Chemie und war lange die Referenzmethode zur Bestimmung der totalen Calciumkonzentration im Serum [144]. Verschiedene komplexometrische Titrationsen mit Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder ähnlichen Ca^{2+} -Komplexbildnern unter Benützung unterschiedlicher Indikatoren wurden entwickelt (vgl. u. a. [149]). Ein Indikator (Calcein) wurde zur fluorometrischen Calciumbestimmung, insbesondere bei sehr kleinen Serumvolumina eingesetzt [150]. Eine Vielfalt von colorimetrischen Methoden sind beschrieben worden. Eine leicht automatisierbare mit o-Cresolphthalein-Komplexon arbeitende Variante [151-156] ist noch heute eine der verbreitetsten Methoden zur Konzentrationsermittlung des totalen Calciums in Serum. Etwa gleich häufig wird die Atomabsorptionsspektrometrie eingesetzt [100, 157, 158], während andere physikalischen Methoden wie die Flammenphotometrie [99, 159], die Neutronenaktivierungsanalyse [160], die Röntgenfluoreszenzspektrometrie [161] oder die Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie [162] nur vereinzelt angewandt werden. Letztere

Methode gilt jedoch heute als Referenzmethode für die Bestimmung der totalen Calciumkonzentration im Serum [144, 163].

Die quantitative Ermittlung des ionisierten Ca^{2+} im Blut wurde erst vor einigen Jahren in die klinische Chemie eingeführt. Obwohl McLean und Hastings schon 1934 eine auf der Ca^{2+} -abhängigen Kontraktion des Froschherzens beruhende Bestimmungsmethode vorgeschlagen haben [59, 164], wurden diese und später eingeführte biologische Methoden [165, 166] nie routinemässig eingesetzt. Die Ca^{2+} -konzentrationsabhängige Lumineszenz des natürlichen Proteins Aequorin wurde ebenfalls für Serumanalysen ausgenutzt [167]. Diese Biolumineszenzmethode bekam jedoch im Gegensatz zu den colorimetrischen Ca^{2+} -Bestimmungsmethoden keine Bedeutung für die klinische Chemie. In der Colorimetrie wurde Murexid oder Tetramethylmurexid als Ca^{2+} -Indikator verwendet und der Farbumschlag wurde photometrisch gemessen [168-177]. Die colorimetrischen Ca^{2+} -Bestimmungen waren jedoch wegen der unerlässlichen und zeitraubenden Probebehandlung den klinischen Anforderungen nicht angepasst. Zusätzlich kann jede Serummanipulation das Calciumgleichgewicht verschieben und somit zu verfälschten Ca^{2+} -Konzentrationen führen (vgl. Kap. 7 und [145]). Erst die Einführung der Ca^{2+} -selektiven Elektrode durch Ross [8, 9] ermöglichte die direkte quantitative Ca^{2+} -Ermittlung im Serum bzw. im Blut. Seitdem wurden weitere Ca^{2+} -selektive Membranelektroden entwickelt [178], die in mehreren Routinegeräten für die klinisch-chemische Analytik eingesetzt werden [145, 179-184]. Neben den direkten experimentellen Bestimmungen wird die Ca^{2+} -Konzentration im Serum auch heute noch indirekt ausgehend vom totalen Calcium berechnet. McLean und Hastings haben 1935 erstmals eine mathematische Beziehung zwischen den Konzentrationen des ionisierten Calciums, des totalen Calciums und der Proteine vorgeschlagen [80, 164]. Inzwischen wurde eine Vielzahl von Algorithmen eingeführt, die u. a. den pH-Wert des Messgutes berücksichtigen [138, 185-187] (vgl. auch Kap. 7). Verschiedene Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass diese indirekte Ermittlung der Ca^{2+} -Konzentration im Serum kein zuverlässiger Ersatz der direkten potentiometrischen Bestimmung darstellt [186, 188-191].

Die Entwicklung der analytischen Messmethoden als auch die physikalischen und chemischen Grundkenntnisse wurden zum Teil beachtlich durch Entwicklungen in der Elektronik geprägt. Die Automatisierung von analytischen Verfahren ist für den klinisch-chemischen Bereich besonders relevant, da täglich eine grössere Anzahl von gleichartigen Analysen durchgeführt werden muss, wobei die Reproduzierbarkeit eine der wichtigsten Qualitätsanforderungen ist. So werden heute in zahlreichen klinisch-chemischen Laboratorien mikroprozessor-gesteuerte Analysatoren für die simultane Bestimmung mehrerer Parameter in Serum eingesetzt, wobei die quantitative H^+ -, Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Ermittlung häufig potentiometrisch erfolgt (vgl. u. a. [28, 77, 101, 155, 156, 183, 192-203]). Bedingt durch die Tendenz, die Blutanalysen ohne vorherige Abtrennung der Blutzellen möglichst im Bereich des Patienten durchzuführen [204], ist anzunehmen, dass die Potentiometrie mittels ionenselektiven Elektroden die Flammenphotometrie aus dem klinischen Bereich verdrängen wird [201, 205].

3.2 Beschreibung und Diskussion der am häufigsten eingesetzten Methoden

3.2.1 Titration

Bei der titrimetrischen Bestimmung der Konzentration eines Kations wird eine Reagenzlösung bekannter Konzentration der Probe vorgegebenen Volumens hinzugefügt, bis die gesamte Menge des zu messenden Kations vollständig reagiert hat (Endpunkt). Aus dem dazu benötigten Reagenzlösungsvolumen und unter Berücksichtigung der Stöchiometrie der Reaktion wird auf die ursprüngliche Konzentration des Kations geschlossen. Der Endpunkt wird mit einem Farbindikator oder durch die Messung einer anderen Eigenschaft der Probe ermittelt [206]. Der Indikator bildet mit dem zu bestimmenden Kation einen Komplex, dessen Farbe verschieden von der des freien Indikators ist. Die Genauigkeit der Bestimmung ist u. a. durch die Thermodynamik und die Kinetik der Umsetzung des Kations, durch Nebenreaktionen

des zugegebenen Reagenzes und durch die Spezifität der Endpunktermittlung beschränkt.

Die komplexometrische Titration des Calciums mit EDTA oder EGTA mittels eines Farbindikators [115, 144, 149] ist die einzige titrimetrische Bestimmungsmethode eines Kations im Serum, die heute in gewissen klinisch-chemischen Laboratorien noch eingesetzt wird. Die sehr bescheidene notwendige instrumentelle Ausrüstung und die im allgemeinen hinreichende Genauigkeit der Calciumbestimmungen sind wesentliche Vorteile dieser volumetrischen Methoden. Mehrere Beiträge weisen jedoch auf systematische Fehler und auf Störungen durch verschiedene Serumkomponenten hin [144].

3.2.2 Colorimetrie, Fluorometrie

Gewisse Farbindikatoren, welche in der titrimetrischen Kationenbestimmung zur Anwendung gelangen, werden zusätzlich zur colorimetrischen oder fluorometrischen Konzentrationsermittlung der betreffenden Spezies eingesetzt. Dabei wird die Lichtabsorption bzw. die Fluoreszenzintensität der Serum-Indikator-Lösung bei einer vorgegebenen Wellenlänge gemessen, die durch die optischen Eigenschaften des Kation-Indikator-Komplexes bestimmt ist. Aus diesem photometrisch erhaltenen Wert kann aufgrund einer Eichung und unter Benützung des Beer-Lambert'schen Gesetzes die ursprüngliche Konzentration des Kations berechnet werden.

Die colorimetrische Ermittlung gehört zu den verbreitetsten Bestimmungsmethoden der totalen Calciumkonzentration im Serum. Die Probe wird dabei mit Salzsäure angesäuert, in eine saure o-Cresolphthalein-Komplexon-[151, 153] oder Thymolphthalexon-Lösung [207, 208] dialysiert, und anschliessend wird die Absorption bei 570 nm bzw. 578 nm photometrisch gemessen. Diese zwei Varianten werden heute in verschiedenen kommerziell erhältlichen Analysatoren eingesetzt (vgl. u. a. [155, 156, 195, 209]) und finden dadurch eine weltweite Anwendung. Die wichtigsten Fehlerquellen ergeben sich durch die Interferenz von verschiedenen Serumkomponenten

sowie durch dialysebedingete Eichprobleme [144].

3.2.3 Atomemissionsspektrometrie

Die atomemissionsspektrometrische Bestimmung der Konzentration eines Kations beruht auf der Messung der von den entsprechenden angeregten freien Atomen emittierten Strahlung. Bei der verbreitetsten Variante der Atomemissionsspektrometrie (AES), der Flammenphotometrie (FP), wird die verdünnte Probe zerstäubt und einem Brenngas und einem Oxidationsmittel zugemischt. In der Flamme werden dann die aus den Kationen erhaltenen freien Atome thermisch angeregt und emittieren dabei elementspezifische Strahlungen. Mittels Filter, Gitter oder Prismen wird aus der Lichtstrahlung der Flamme eine für das betreffende Element charakteristische Bande ausgewählt (Li: 670.8 nm; Na: 589.0 nm; K: 766.5 nm; Ca: 422.7 nm [210]) und deren Intensität gemessen. Aus dieser Messgrösse und einer vorherigen Eichung wird die ursprüngliche Konzentration des Kations ermittelt.

Die Flammenphotometrie wird routinemässig für Li-, Na- und K-Konzentrationsbestimmungen in biologischen Flüssigkeiten eingesetzt. Die Interpretation der erhaltenen Werte kann jedoch zu Probleme führen (vgl. 2.5). Für die Ermittlung der totalen Calciumkonzentration wird diese Methode wegen Störungen durch verschiedene Serumkomponenten seltener herangezogen [144]. Bei jedem Element fallen allgemeine Fehlerquellen der flammenphotometrischen Konzentrationsermittlung wie unstetige Bedingungen und Mischverhältnisse im Brenner und schwankender Atomisierungsgrad des betreffenden Kations ins Gewicht. Weiter sind offene Flammen und Brenngasflammen in modernen klinisch-chemischen Laboratorien gewöhnlich unerwünscht. Die gute Empfindlichkeit und die Bestimmungsmöglichkeit mehrerer Elemente mit demselben Gerät sind dagegen Vorteile, die zum Teil für den verbreiteten Einsatz der Flammenphotometrie verantwortlich sind. Durch die sehr hohe Probeverdünnung (etwa 1 : 200) bei Li-, Na- und K-Bestimmungen werden zudem Störioneninterferenzen und durch Matrizenunterschiede zwischen Probe (Serum) und Eichlösungen bedingte Fehler vernachlässigbar.

3.2.4 Atomabsorptionsspektrometrie

In der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) muss das zu bestimmende Teilchen ebenfalls im freien atomaren Zustand vorliegen. Die Atomisierung wird thermisch in einer Flamme oder durch elektrische Erhitzung der Probe in einer inerten Küvette (z. B. Graphit) erreicht. Die unangeregten Atome im Probedampf absorbieren die Strahlung der angeregten Atome einer Hohlkathodenlampe, deren Kathode die zu messende Spezies enthält. Unter Berücksichtigung einer vorgängigen Eichung und des Beer-Lambert'schen Gesetzes wird aus der Absorptionsmessung die entsprechende Konzentration des Teilchens in der Probe ermittelt.

In der klinischen Analytik wird die AAS u. a. für die Bestimmung der totalen Calciumkonzentration im Serum eingesetzt, wo sie wesentlich genauere Resultate liefert als die chemischen Methoden. Oft wird Li ebenfalls durch AAS quantitativ ermittelt. Für Na und K wird sie eher selten eingesetzt. Wird die Zerstäubung der Probe und die Atomisierung im Brenner bzw. in der Flamme durchgeführt, so sind die Schwierigkeiten und die Nachteile der Atomabsorptionsspektrometrie ähnlich wie bei der Flammenphotometrie. Wird dagegen die Probe direkt in eine Graphitrohrküvette eingebracht, findet keine Zerstäubung statt und die Atomisierung durch elektrische Erhitzung ist reproduzierbarer. In dieser Variante ist die AAS eine der genauesten und reproduzierbarsten Methoden zur quantitativen Ermittlung von Metallen im Serum. Die Möglichkeit der Bestimmung mehrerer Elemente mit demselben AAS-Gerät ist ein weiterer Vorteil. In der Regel ist jedoch eine Hohlkathodenlampe für jedes einzelnen Element notwendig. Der Austausch dieser Lampen bedingt oft zeitraubende Justierungen der Strahlungsquelle.

3.2.5 Potentiometrie

Die Potentiometrie ist mittlerweile zu einer klassischen Bestimmungsmethode in der klinischen Chemie geworden (vgl. 3.1 und 3.3, sowie Kap. 4

für die theoretischen Grundlagen). Der pH-Wert im Blut wird bereits seit einigen Jahrzehnten potentiometrisch ermittelt, und die Na^+ - und K^+ -selektiven Elektroden haben sich als echte Alternativen zu den Flammenphotometern durchgesetzt. Die Potentiometrie erlaubte erstmals die direkte quantitative Bestimmung von ionisiertem Ca^{2+} im Blut. Die Möglichkeit der gleichzeitigen Ermittlung von mehreren Ionen in unbehandelten Proben, kontinuierliche Messungen im Blutkreislauf, die Erfassung der physiologisch relevanten Ionenaktivitäten, sowie die leichte Automatisierbarkeit in diskreten- bzw. in Durchflussanalysatoren sind wesentliche Vorteile der Potentiometrie (vgl. auch 2.5). Probleme können sich gelegentlich durch mechanische oder chemische Beschädigungen der ionenselektiven Membran, durch Membrankontamination, sowie durch Kontamination der Probe durch Membrankomponenten ergeben.

3.3 Klinischer Einsatz von ionenselektiven Elektroden

3.3.1 Uebersicht

Ionenselektive Elektroden werden verbreitet in der klinischen Routineanalytik eingesetzt. In Tabelle 3.2 sind kommerziell erhältliche klinische Analysatoren, in denen ionenselektive Elektroden zur quantitativen Erfassung von Kationen eingebaut sind, zusammengestellt. Bei gewissen Geräten wird direkt, d. h. in der unbehandelten Probe (Blut, Plasma oder Serum) gemessen, während bei anderen indirekt, d. h. in der verdünnten Probe gemessen wird. Im letzteren Fall geht durch die Probevorbehandlung ein wesentlicher Vorteil der Potentiometrie grösstenteils verloren (vgl. 2.5). In Tabelle 3.2 wurden die über dreissig erhältlichen sogenannten Blutgasanalysatoren nicht aufgeführt. All diese Geräte erfassen den pH-Wert mit einer H^+ -selektiven Glasmembranelektrode und den pCO_2 -Wert mit einer gassensitiven Elektrode, bei der die Indikatorelektrode ebenfalls eine pH-Glaselektrode ist.

Die Probezufuhr zur Messzelle kann prinzipiell kontinuierlich oder diskontinuierlich erfolgen. Beide Techniken sowie Kombinationen beider Varianten werden heute eingesetzt. Im letzteren Fall wird die Probe kontinuierlich zugeführt, die eigentliche Messung erfolgt aber statisch.

3.3.2 Einzelprobenanalysatoren

Bei der quantitativen Bestimmung von Kationen widerspiegelt das diskontinuierliche Messprinzip der Einzelprobenanalysatoren im allgemeinen eher eine veraltete Analysetechnik. In solchen Geräten wurden die einzelnen Operationen der manuellen Analysetechnik mechanisiert und oft automatisiert [211]. Dabei wird jede Probe einem Gefäß zugeteilt und einzeln mit der potentiometrischen Messzelle in Kontakt gebracht. Die eigentliche Messung wird oft im Durchflussprinzip durchgeführt. Ueblicherweise wird der Messvorgang periodisch automatisch geeicht.

3.3.3 Durchflussanalysatoren

Die kontinuierliche Messtechnik und damit auch die Durchflussanalysatoren wurden 1957 durch Skeggs in die klinische Chemie eingeführt [212]. Dieses damals neuartige Analysenprinzip wich von der diskontinuierlichen, manuellen Arbeitsweise grundsätzlich ab. In einem Durchflussanalysator fließt die Probe kontinuierlich z. B. in einem Schlauchsystem. Sie kann dabei verdünnt, mit anderen Komponenten vermischt oder dialysiert werden. Ueblicherweise segmentieren Luftblasen die verschiedenen Proben und erschweren dadurch die gegenseitige Kontamination. Die Flüssigkeitsströme werden in der Regel durch Schlauchquetschpumpen erzeugt. In der potentiometrischen Durchflussmesszelle steht das Messgut gleichzeitig mit der Referenzelektrode und mit einer oder mehreren ionenselektiven Elektroden in Kontakt. Dies erlaubt eine simultane, quantitative Bestimmung mehrerer Ionen. Dabei können die ionenselektiven Elektroden grundsätzlich auf drei verschiedene

Tabelle 3.2. Kommerziell erhältliche Geräte, in welchen ionenselektive Elektroden eingebaut sind.

Hersteller; Gerät	Methode ^{a)}	Ion ^{b)}	Membran ^{c)}
AMT; Electrion	d	Ca ²⁺	L
Clin ± Ion	d	Na ⁺	G
		K ⁺	L (Valinomycin)
		Ca ²⁺	L
AVL; AVL-980	d	Na ⁺	G
		K ⁺	L (Valinomycin)
		Ca ²⁺	L (ETH 1001)
Beckman; Astra 4, Astra 8, Electrolyte 2	i (1:20)	Na ⁺	G
		K ⁺	L (Valinomycin)
Boehringer Mannheim; ISE 2020	d	Na ⁺	G
		K ⁺	L (Valinomycin)
Du Pont; aca	d	Na ⁺	G
		K ⁺	L (Valinomycin)
Eastman Kodak; Ektachem Electro- lyte Analyzer, Ektachem 400	d	Na ⁺	L (Monensin- methylester)
		K ⁺	L (Valinomycin)
Eschweiler; Combi-Analysator MT 55, A300, A400, A500	d	H ⁺	G
		Na ⁺	G
		K ⁺	L (Valinomycin)
Greiner; G400	i	Na ⁺	G
		K ⁺	L (Valinomycin)
Hitachi; Hitachi 702, 705, 772	i (1 : 30)	Na ⁺	L (ETH 157)
		K ⁺	L (Valinomycin)
Corning; Corning 902	d	Na ⁺	G
		K ⁺	L (Valinomycin)

Fortsetzung Tab. 3.2

Hersteller; Gerät	Methode ^{a)}	Ion ^{b)}	Membran ^{c)}
Instrumentation Laboratory; IL 502, IL 504	d	Na ⁺ K ⁺	G L (Valinomycin)
Kontron; EBS 660	d	H ⁺ Na ⁺ K ⁺	G G L (Valinomycin)
AM 721	d	Ca ²⁺ Na ⁺ K ⁺	L (ETH 1001) G L (Valinomycin)
Nova Biomedical; Nova-1, Nova-3, Nova-5	d	Na ⁺ K ⁺	G L (Valinomycin)
Nova-2	d	Ca ²⁺	L (ETH 1001)
Nova-6, Nova-7, Nova-8	d	Na ⁺ K ⁺ Ca ²⁺	G L (Valinomycin) L (ETH 1001)
Orion Research; SS-20	d	Ca ²⁺	L (ETH 1001)
SS-30	d	Na ⁺ K ⁺	G L (Valinomycin)
Space Stat, 3300	d	H ⁺ Na ⁺ K ⁺ Ca ²⁺	G G L (Valinomycin) L (Organophosphate)
Photovolt; PVA-4	i (1 :30)	Na ⁺ K ⁺	G L (Valinomycin)
Radelkis; OP-266		Na ⁺ K ⁺	G L (Valinomycin)

Fortsetzung Tab. 3.2

Hersteller; Gerät	Methode ^{a)}	Ion ^{b)}	Membran ^{c)}
Radiometer; ICA-1	d	H ⁺ Ca ²⁺	G L
KNaI	d	Na ⁺ K ⁺	G L (Valinomycin)
ABL4	d	H ⁺ K ⁺	G L (Valinomycin)
Technicon; SMAC	i (1:16)	Na ⁺	G
Stat/Lyte, Stat/Ion C 800, RA-1000 TM		K ⁺	L (Valinomycin)

a) d: direkte Potentiometrie

i: indirekte Potentiometrie (Verdünnungsverhältnis)

b) Nur diejenige Kationen, die potentiometrisch bestimmt werden, sind aufgeführt. Bei gewissen Geräten werden gleichzeitig weitere physiologisch relevante Parameter ermittelt.

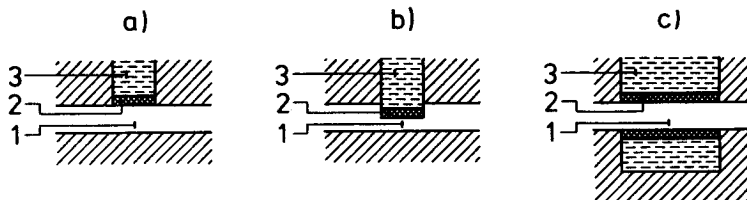
c) G: Glasmembran

L: Flüssigmembran (ETH-Liganden, vgl. 4.2.1)

Arten in den Messkanal eingebaut werden (vgl. Fig. 3.1). Die Varianten a) und c) sind den Durchflussbedingungen besonders angepasst. Gleichzeitig eignen sich diese Anordnungen für die Analysen von kleinen Probevolumen (Blut bzw. Serum), welche einen geringen Messkanaldurchmesser erfordern. Flüssigmembranelektroden werden vorwiegend nach a) oder b) und Glasmembranelektroden nach b) oder c) in den Messkanal eingebaut (vgl. auch Tab. 3.3). In Figur 3.2 sind die verschiedenen Anordnungen von potentiometrischen Durchflusszellen dargestellt. Um die elektrische Stabilität

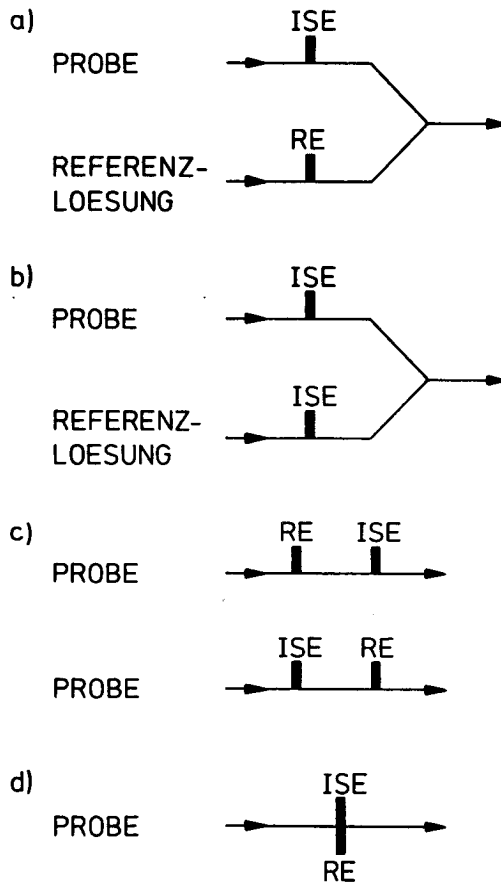
der Messungen zu verbessern, kann in jeder dieser Anordnungen eine Common-elektrode (z. B. ein Platindraht) an einer geeigneten Stelle eingebracht werden (vgl. 11.3). Durchflusssysteme, welche in Arbeitsbereichen der klinischen Medizin und der Physiologie eingesetzt werden, sind in Tabelle 3.3 zusammengestellt.

Neben der klinischen Routineanalytik ist die Messung im extrakorporalen Blutkreislauf ein weiterer Einsatzbereich der potentiometrischen Durchflussmethode. Als wohl einzige Messmethode ermöglicht sie die direkte kontinuierliche Untersuchung des Konzentrationsverlaufs von Kationen im Blutkreislauf beim Menschen [137, 213, 214], oder bei Ratten [215], Hunden [45, 216-218] oder Kaninchen [216,218]. Die ionenselektiven Durchflusselektrodensysteme haben damit in der Chirurgie, in der Intensivmedizin und bei pharmakokinetischen Untersuchungen ein grosses Interesse erweckt. Es ist anzunehmen, dass solche Messeinrichtungen in der Zukunft zunehmend bei Tierexperimenten zum Einsatz kommen. Wegen Sterilisationsproblemen wurde die Durchflussanalysentechnik im geschlossenen Blutkreislauf bis heute beim Menschen nicht eingesetzt.



Figur 3.1. Einbau einer ionenselektiven Elektrode in Durchflusssystemen.

Verschiedene Anordnungen des Messkanals 1), der ionenselektiven Membran 2) und des internen Referenzsystems 3) sind schematisch dargestellt. In a) und b) deckt die Elektrode eine Öffnung des Kanals, während in c) die Membran den Kanal bildet. In a) wird die Membran der Form der Kanalöffnung angepasst (vgl. 11.3) und in b) wird eine klassische Elektrode durch die Öffnung in den Messkanal eingebracht.



Figur 3.2. Anordnung einer ionenselektiven Elektrode (ISE) und der Referenzelektrode (RE) in Durchflusssystemen.

Zweikanalsysteme sind für konventionelle (a)) und differentielle (b)) Messtechniken dargestellt. In Einkanalsystemen können die Elektroden in Serie (c)) oder unmittelbar gegenüberstehend (d)) angeordnet sein.

Tabelle 3.3. Durchflusselektrodensysteme, welche in Arbeitsbereichen der klinischen Medizin und der Physiologie eingesetzt werden^{a)}.

Anordnung (Fig. 3.2)	Einbau ISE (Fig. 3.1)	Flüssigkeits- brücke	Messung
a	a	MgO ^{b)}	Serum [43]
a	a	offen	Blut während Herzoperationen [137], Serum [219], im extrakorporalen Blutkreislauf des Hundes [216-218] und des Kaninchens [216, 218]
a			Blut während Operationen [214]
b	b	offen	Serum [220]
b	b	offen	Im extrakorporalen Blutkreislauf des Hundes [45]
c	a	offen	Serum, Blut [221, 222]
c	a	offen	Pankreassekret [223]
c	b	offen	Im extrakorporalen Blutkreislauf der Ratte [215]
c	b	Keramik ^{b)}	Serum [132, 224, 225] Urin [32, 226]
c	a, c	offen	Serumdialysat [155]
c	a, c	offen	Blut, Plasma, Serum [199]
d	c	Keramik ^{b)}	Urin [32]

a) Wegen ungenügender Angaben verschiedener Hersteller konnten nicht alle kommerziell erhältlichen Durchflussanalysatoren (vgl. Tab. 3.2) in dieser Tabelle berücksichtigt werden

b) Diaphragma

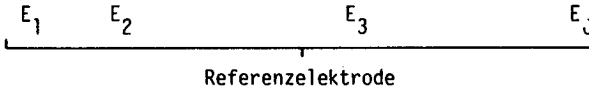
4. THEORETISCHE GRUNDLAGEN DER POTENTIOMETRISCHEN BESTIMMUNG VON IONENAKTIVITÄTEN BZW. KONZENTRATIONEN

4.1 Potentiometrische Messung mit ionenselektiven Elektroden

4.1.1 Die Elektromotorische Kraft der Messzelle

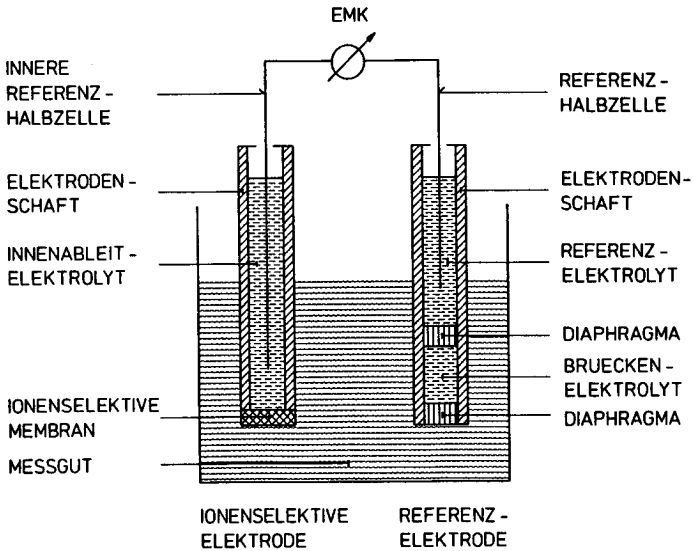
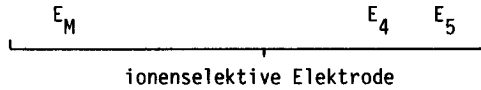
Ionenselektive Elektroden sind elektrochemische Sensoren, die eine potentiometrische Bestimmung der Aktivität eines gegebenen Ions in Gegenwart anderer Ionen erlauben, wobei das Messgut im allgemeinen eine wässrige Lösung ist [22]. Eine solche Elektrode bildet eine galvanische Halbzelle. Sie besteht üblicherweise aus einer ionenselektiven Membran, einem Innenableitelektrolyt und einer inneren Referenzelektrode [227]. Eine ionenselektive Membran ist eine räumlich begrenzte Phase, die das Messgut von der Innenableitung trennt und das zu messende Ion selektiv überführt. Die Membran kann aus verschiedenen Materialien bestehen und wird oft danach eingeordnet [228]. In dieser Arbeit werden Elektroden mit Flüssigmembranen beruhend auf elektrisch neutralen Liganden als ionenselektive Komponenten betrachtet. Die zur Messung notwendige zweite galvanische Zelle soll eine konstante und vom Messgut unabhängige Potentialdifferenz liefern. Der Kontakt zwischen dieser externen Referenzhalbzelle und dem Messgut ist im allgemeinen durch einen Brückenelektrolyten gewährleistet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die EMK-Messungen mit Messketten der folgenden Art durchgeführt (vgl. auch Fig. 4.1):

Hg; Hg_2Cl_2 , Referenzelektrolyt | Brückenelektrolyt | Messgut



(4.1)

|| Membran || Innenableitelektrolyt, AgCl; Ag
 (") (')



Figur 4.1. Schematische Darstellung einer ionenselektiven Membranelektrodenmesskette.

Die Summe der einzelnen elektrischen Potentialdifferenzen bildet die elektromotorische Kraft (EMK) der ionenselektiven Membranelektrodenmesszelle und entspricht der gesamten Potentialdifferenz für den stromlosen Zustand:

$$EMK = [E_1 + E_2 + E_3 + E_4 + E_5] + E_J + E_M = E_0 + E_J + E_M \quad (4.2)$$

wobei E_0 : vom Messgut unabhängiges Referenzpotential

$$(E_0 = E_1 + E_2 + E_3 + E_4 + E_5)$$

E_J : Flüssigkeitspotentialdifferenz zwischen Brückenelektrolyt und Messgut (vgl. 4.1.4)

E_M : Membranpotential

Der für das ionenselektive Verhalten der Messkette bestimmende Beitrag, das Membranpotential E_M , setzt sich aus zwei Grenzflächenpotentialen E_B bzw. E'_B und einem Diffusionspotential E_D zusammen [19, 22, 229]:

$$E_M = E_B + E'_B + E_D \quad (4.3)$$

Die Grenzflächenpotentiale sind durch die Ionenaustauschgleichgewichte zwischen Membranphase und Messgut bzw. Innenableitlösung bestimmt, während das Diffusionspotential auf die stromlose Diffusion geladener Teilchen innerhalb der Membran zurückzuführen ist.

4.1.2 Elektrodenfunktion und potentiometrische Selektivität.

Die Gleichungen von Nernst und Nicolsky-Eisenman.

Im Idealfall ist eine Membran ausschliesslich für ein bestimmtes Ion I permeabel. Falls die Aktivitäten aller Ionen innerhalb der Membran konstant sind, gilt für das Membranpotential folgende Beziehung:

$$E_M = \frac{R}{z_i} \frac{T}{F} \ln \frac{a_i}{a_i'} \quad (4.4)$$

Unter der Annahme von konstanter Zusammensetzung des Innenableitelektrolyts (a_i' konstant) erhält man aus den Gleichungen (4.2) und (4.4) die Nernst'sche Gleichung (4.5) [230], welche die Elektrodenfunktion einer idealen ionenselektiven Elektrodenmesskette im stromlosen Zustand beschreibt:

$$EMK = E_i^0 + s \log a_i \quad (4.5)$$

$$\text{mit } E_i^0 = E_0 + E_J - s \log a_i' \quad (4.6)$$

$$s = \frac{R}{z_i} \frac{T}{F} \ln 10 = \frac{59.16}{z_i} \text{ mV } (25^\circ \text{C}) \quad (4.7)$$

wobei EMK: elektromotorische Kraft [mV]

E_i^0 : Standardpotential der Messkette für das Ion I bei einer gegebenen Temperatur T [mV]

s : Nernst'scher Faktor (Steigung der Elektrodenfunktion EMK gegen $\log a_i$) [mV]

R : universelle Gaskonstante ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T : absolute Temperatur [K]

F : Faraday'sche Konstante ($9.6487 \cdot 10^4 \text{ C mol}^{-1}$)

a_i : Aktivität des Ions I im Messgut [mol L^{-1}]

a_i' : Aktivität des Ions I im Innenableitelektrolyten [mol L^{-1}]

z_i : Ladung des Ions I in Einheiten der Protonenladung

Im Normalfall spricht aber eine Membranelektrode nicht nur auf das Mession I, sondern gleichzeitig auch auf Störionen J an. Die semiempirische Beziehung (4.8) von Nicolsky und Eisenman [231-233] beschreibt die EMK einer solchen ionenselektiven Messzelle in guter Näherung:

$$EMK = E_i^0 + s \log [a_i + \sum_{j \neq i} K_{ij}^{Pot} (a_j)^{z_i/z_j}] \quad (4.8)$$

wobei a_i, a_j : Aktivität des Messions I bzw. des Störions J im Messgut
[mol L⁻¹]

z_i, z_j : Ladung des Messions I bzw. des Störions J in Einheiten der
Protonenladung

K_{ij}^{Pot} : potentiometrischer Selektivitätsfaktor

Der potentiometrische Selektivitätsfaktor K_{ij}^{Pot} ist ein Mass für die Bevorzugung des Störions J gegenüber dem Mession I durch die ionenselektive Membran. Ein Selektivitätsfaktor $K_{ij}^{Pot} < 1$ bedeutet eine Bevorzugung des Ions I gegenüber dem Ion J. Bei der Angabe der Selektivität einer Membran durch K_{ij}^{Pot} -Werte sollten die Messbedingungen spezifiziert werden, da diese Grössen im allgemeinen von der Aktivität der untersuchten Ionen und von der Bestimmungsmethodik abhängig sind (vgl. 11.5).

4.1.3 Aktivität, Aktivitätskoeffizienten.

Der Debye-Hückel-Formalismus.

Wie aus den Gleichungen von Nernst und Nicolsky-Eisenman (Gl. 4.5 und 4.8) hervor geht, wird die EMK einer ionenselektiven Elektrodenmesszelle von der Aktivität der Ionen im Messgut bestimmt. Für Lösungen hoher Ionenstärke (vgl. Gl. 4.14), d. h. für beinahe alle Flüssigkeiten biologischer Herkunft, können die Ionenaktivitäten a_i nicht mehr den Ionenkonzentrationen c_i gleichgesetzt werden:

$$a_i = \gamma_i c_i \quad (4.9)$$

wobei γ_i : Aktivitätskoeffizient des Ions I ($\gamma_i \neq 1$)

Die Einzelionenaktivitätskoeffizienten γ_i , bzw. γ_+ oder γ_- , sind wegen des Elektroneutralitätsprinzips experimentell nicht zugänglich. Der aus EMK-Messungen für ein Ionenpaar erhaltene mittlere Aktivitätskoeffizient $\gamma_{\pm}$ steht mit den entsprechenden Einzelionenaktivitätskoeffizienten γ_+ und γ_- in folgender Beziehung [22]:

$$\log \gamma_{\pm} = \frac{|z_-|}{|z_+| + |z_-|} \log \gamma_+ + \frac{|z_+|}{|z_+| + |z_-|} \log \gamma_- \quad (4.10)$$

Gemäss der Debye-Hückel-Konvention [234] können jedoch γ_+ - und γ_- -Werte bei Ionenstärken $I \leq 1 \text{ mol L}^{-1}$ mit hinreichender Genauigkeit approximiert werden:

$$\log \gamma_+ = \frac{|z_+|}{|z_-|} \log \gamma_{\pm} \quad (4.11)$$

$$\log \gamma_- = \frac{|z_-|}{|z_+|} \log \gamma_{\pm} \quad (4.12)$$

Debye und Hückel haben ebenfalls eine Theorie für die Berechnung der mittleren Aktivitätskoeffizienten $\gamma_{\pm}$ vorgeschlagen [235]:

$$\log \gamma_{\pm} = \frac{-0.509 |z_+ \cdot z_-| \sqrt{I}}{1 + 0.328 a \sqrt{I}} + C \quad I \quad (25^\circ \text{C}) \quad (4.13)$$

$$\text{mit} \quad I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 c_i \quad (4.14)$$

wobei z_+ , z_- : Ladung des Kations bzw. des Anions des betrachteten Elektrolyten in Einheiten der Protonenladung

I : Ionenstärke der Probelösung [mol L^{-1}]

a , C : ionenspezifische Parameter (Debye-Hückel-Parameter, vgl. Tab. 4.1)

- z_i : Ladung des Ions I in der Probelösung in Einheiten der Protonenladung
- c_i : Konzentration des Ions I in der Probelösung [mol L^{-1}]

Die so erhaltenen $\gamma_{\pm}$ -Werte sind bei Ionenstärken $I \leq 1 \text{ mol L}^{-1}$ in guter Uebereinstimmung (Fehler $< 1 \%$) mit gemessenen mittleren Aktivitätskoeffizienten [22]. Zu beachten ist, dass im Rahmen dieses Formalismus im Messgut gelöste elektrisch geladene Makromoleküle wie z. B. die Proteine nicht berücksichtigt werden.

Tabelle 4.1. Optimierte Debye-Hückel-Parameter a und C (vgl. Gl. 4.13) in wässrigen Lösungen bei 25°C [69, 238, 239].

Elektrolyt	a [Å]	C
HCl	4.30	0.120
LiCl	3.90	0.113
NaCl	4.00	0.040
KCl	3.65	0.015
NH_4Cl	3.50	0.016
MgCl_2	5.20	0.060
CaCl_2	5.00	0.040
KNO_3	2.50	-0.070
NH_4NO_3	2.70	-0.024
LiOOCCH_3	4.15	0.055

4.1.4 Flüssigkeitspotential an der Referenzelektrode.

Der Henderson-Formalismus.

An der Referenzelektrode der galvanischen Zelle (4.1) bauen sich über die Mischzone zwischen Referenzelektrolyt und Brückenelektrolyt und zwischen Brückenelektrolyt und Messgut die Flüssigkeitspotentiale E_3 bzw. E_J auf. Das Potential an der ersten Diffusionsschicht (E_3) wird als konstant angenommen. Dagegen ist das Flüssigkeitspotential E_J im allgemeinen vom Messgut abhängig. Im Hinblick auf zuverlässige, praktische Anwendungen von ionenselektiven Messzellen ist somit eine quantitative Beschreibung dieser Potentialdifferenz notwendig, da E_J und E_M die entscheidenden Beiträge der EMK darstellen (vgl. Gl. 4.2). Unter Annahme von stromloser Diffusion und von linearen Aktivitätsprofilen in der Diffusionsschicht wird das Flüssigkeitspotential E_J [mV] in guter Näherung mit der Henderson-Gleichung (4.15) beschrieben [236, 237]:

$$E_J = - \frac{\sum_i z_i u_i (a_i - a'_i)}{\sum_i z_i^2 u_i (a_i - a'_i)} \frac{R T}{F} \ln \frac{\sum_i z_i^2 u_i a_i}{\sum_i z_i^2 u_i a'_i} \quad (4.15)$$

wobei $\sum_i$: Summe über alle Ionen I des Messguts und des Brückenelektrolyts

z_i : Ladung des Ions I in Einheiten der Protonenladung

u_i : absolute Beweglichkeit (elektrochemische Mobilität) des Ions I [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{J}^{-1} \text{mol}$] (vgl. Tab. 4.2)

a_i : Aktivität des Ions I im Messgut [mol L^{-1}]

a'_i : Aktivität des Ions I im Brückenelektrolyten der Referenzelektrode [mol L^{-1}] bzw. im Referenzelektrolyten (falls kein Zwischenelektrolyt vorhanden ist)

Für den optimalen Gebrauch von ionenselektiven Elektrodenmessketten ist ein vernachlässigbares bzw. möglichst konstantes Flüssigkeitspotential E_J an der Referenzelektrode Voraussetzung:

$$E_J \cong 0 \quad \text{bzw.} \quad \sum_i z_i u_i (a_i - a'_i) \cong 0 \quad (4.16)$$

Tabelle 4.2. Absolute Beweglichkeiten u_i von Ionen I in wässrigen Lösungen bei 25 °C [69, 240].

$\begin{matrix} z_i \\ I \end{matrix}$	$\begin{matrix} u_i \cdot 10^{11} \\ [cm^2 s^{-1} J^{-1} mol] \end{matrix}$
H^+	37.59
Li^+	4.24
Na^+	5.47
K^+	8.00
NH_4^+	8.00
Mg^{2+}	2.90
Ca^{2+}	3.22
Cl^-	8.11
NO_3^-	7.58
$OOCCCH_3^-$	4.38

Bei äquitransferenten Lösungen ($u_+ \approx u_-$) hoher Konzentration ist die Bedingung (4.16) nahezu erfüllt. Konzentrierte KCl -, KNO_3 -, NH_4Cl -, NH_4NO_3 - und $LiOOCCCH_3$ -Lösungen werden demnach häufig als Brückenelektrolyte eingesetzt (vgl. Tab. 4.2 für die Mobilitätsdaten). Bei kontinuierlichen Messungen im extrakorporalen Blutkreislauf (vgl. 7.4.1) muss aus physiologischen Gründen oft eine isotonische $NaCl$ -Lösung als Referenzelektrolyt verwendet werden (dabei entfallen Brückenelektrolyt und E_3 in den Beziehungen (4.1) und (4.2)). Derartige Systeme weisen Flüssigkeitspotentialänderungen bis zu 0.5 mV auf, wenn die Na^+ -Konzentration der Probe im physiologischen Referenzbereich schwankt (vgl. Tab. 4.3). Bei hoher erwünschter Genauigkeit der Bestimmung von Ionenkonzentrationen können solche E_j -Änderungen bei der Auswertung der EMK-Messdaten nicht mehr vernachlässigt werden. Eine Unsicherheit von 0.5 mV in der EMK

entspricht einem Fehler der ermittelten Ionenaktivität von etwa $2 \cdot z_i$ %. Für äquitransferente Brückenelektrolyte (z. B. $3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$) würde sich im beschriebenen Fall die Änderung des Flüssigkeitspotentials auf 0.07 mV reduzieren, was etwa $0.3 \cdot z_i$ % Fehler in der Aktivität entsprechen würde (vgl. Tab. 4.3).

Tabelle 4.3. Einfluss der Zusammensetzung des Referenzelektrolyts und der Messlösung auf das Flüssigkeitspotential E_J (vgl. Gl. 4.15; 25°C).

Referenzelektrolyt	Messlösung [mmol L ⁻¹]	E_J [mV]	$ \Delta E_J $ [mV]
$3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$	150 (NaCl)	0.35	0.06
	135 (NaCl)	0.29	
$150 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$	150 (NaCl)	0.00	0.48
	135 (NaCl)	-0.48	

4.1.5 Strömungspotential

Bei der Beschreibung der elektromotorischen Kraft der ionenselektiven Elektrodenmesskette (vgl. (4.1) und (4.2)) wurde ein ruhendes Flüssigkeitssystem angenommen (Flüsse aller Lösungen = 0). Wird dagegen im Durchfluss gemessen, so entsteht zwischen der ionenselektiven Elektrode und der Referenzelektrode oder der Commonelektrode ein Strömungspotential E_S [241, 242], welches in der gemessenen EMK eingeschlossen ist:

$$\text{EMK} = E_0 + E_J + E_S + E_M \quad (4.17)$$

An der Phasengrenze zwischen Messlösung und Messkapillarwand bildet sich eine starre, elektrochemische Doppelschicht aus, und es entsteht eine Potentialdifferenz (elektrokinetisches Potential ζ) zwischen der Grenzfläche und dem Innern der Messlösung [235, 243]. Durch Verschiebung der Probelösung baut sich demnach zwischen zwei Stellen der Messkapillare eine Potentialdifferenz auf (Strömungspotential E_S), welche durch die modifizierte Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung beschrieben wird [235]:

$$E_S = \frac{\epsilon \zeta}{4 \pi \eta \kappa} \Delta p \quad (4.18)$$

Wird eine laminare Strömung des Messguts durch die Kapillare angenommen, so wird der flussfördernde Druckgradient durch das Hagen-Poiseuille-Gesetz gegeben [244, 245]:

$$\Delta p = \frac{8 \eta l v}{\pi r^4} \quad (4.19)$$

Durch Einsetzen von (4.19) und von verschiedenen Umrechnungsfaktoren in (4.18) wird folgende Gleichung erhalten:

$$E_S = \frac{10^{-10}}{162 \pi^2} \frac{\epsilon \zeta l v}{\kappa r^4} = 6.25 \cdot 10^{-14} \frac{\epsilon \zeta l v}{\kappa r^4} \quad (4.20)$$

wobei E_S : Strömungspotential [mV]

ϵ : Dielektrizitätskonstante der Messlösung

ζ : elektrokinetisches Potential [V]

l : Abstand zwischen den Elektroden [cm]

v : Durchflussgeschwindigkeit [mL h⁻¹]

κ : spezifische elektrische Leitfähigkeit der Messlösung [$\Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

r : Radius des Messkanals [cm]

η : Viskosität [g cm⁻¹ s⁻¹]

Wie aus diesem Modell hervorgeht, ist ein kleines Strömungspotential bei kleiner Durchflussgeschwindigkeit, bei kleinem Abstand zwischen ionenselektiver Elektrode und Referenz- bzw. Commonelektrode, und grossem Messkanaldurchmesser zu erwarten. Eine hohe elektrische Leitfähigkeit der Messlösung ist ebenfalls von Vorteil.

In Tabelle 4.4 sind E_S -Berechnungen für das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Durchflusselektrodensystem zusammengestellt. Nach unserem Modell ist das Strömungspotential zwischen der Referenz- und der Commonelektrode ($l = 4 \text{ cm}$, $v = 0.9 \text{ mL h}^{-1}$) wie auch zwischen den ionenselektiven Elektroden und der Commonelektrode ($l = 3 \text{ bzw. } 10 \text{ cm}$, $v = 18 \text{ mL h}^{-1}$) für isotonische NaCl-Lösung und für Serum unbedeutend ($E_S < 3 \text{ } \mu\text{V}$). Ebenfalls vernachlässigbar sind die E_S -Änderungen ($< 0.1 \text{ } \mu\text{V}$), die durch Schwankungen von $\pm 5 \%$ der Durchflussgeschwindigkeit des Messguts bedingt sind. Ein Probewechsel, z. B. zwischen isotonischer Eichlösung und Serum, verändert das Strömungspotential nur unwesentlich ($E_S < 0.7 \text{ } \mu\text{V}$). Nur sehr verdünnte, fliessende Lösungen können beachtliche Strömungspotentiale verursachen (vgl. E_S für H_2O puriss.). In diesem Fall sollte jedoch die elektrische Leitfähigkeit der Kapillarwand berücksichtigt werden [241]. Nach dem beschriebenen Modell scheint also das Strömungspotential im Falle der hier diskutierten Experimente nur unwesentlich zur EMK der Messkette beizutragen.

Tabelle 4.4. Strömungspotentiale für verschiedene Messlösungen, Elektrodenabstände (l) und Durchflussgeschwindigkeiten (v) für das in 11.3 beschriebene Durchflusselektrodensystem (berechnet nach Gl. 4.20; $r = 0.04 \text{ cm}$, $\zeta = 0.1 \text{ V}$ [246]).

Parameter		Strömungspotential E_S [mV], 25 °C		
l	v	H_2O puriss. ^{a)}	$0.15 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$ ^{b)}	Serum ^{c)}
[cm]	[mL h ⁻¹]		$10^3 E_S$	$10^3 E_S$
4 d)	0.9 ± 0.05	12.5 ± 0.6	0.04 ± 0.00	0.06 ± 0.00
3 e)	18 ± 0.9	188.2 ± 9.4	0.62 ± 0.03	0.83 ± 0.04
10 f)	18 ± 0.9	627.2 ± 31.4	2.07 ± 0.10	2.78 ± 0.14

a) $\epsilon = 78.5$, $\kappa = 5.5 \cdot 10^{-8} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [240]

b) $\epsilon = 75.2$ [235], $\kappa = 0.016 \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [240]

c) $\epsilon = 75.2$ (der isotonischen NaCl-Lösung gleichgesetzt),
 $\kappa = 0.0119 \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [66]

d) Abstand zwischen Referenz- und Commonelektrode

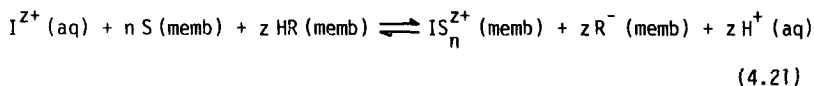
e) Abstand zwischen nächster ionenselektiver Elektrode und Commonelektrode

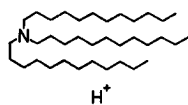
f) Abstand zwischen entferntester ionenselektiver Elektrode und Commonelektrode

4.2 Flüssigmembranen beruhend auf elektrisch neutralen Liganden als Ionenenselektiven Komponententen

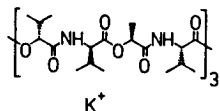
4.2.1 Definition der elektrisch neutralen Kationencarrier und Konstitution der eingesetzten Liganden

Elektrisch neutrale Carrier (eine Klasse von Ionophoren) sind lipophile Komplexbildner, welche hydrophile Ionen aus einer wässrigen Lösung rasch und reversibel in eine Membran extrahieren und sie durch diese organische Phase transportieren. Ionencarrier verursachen Permselectivität, wobei im Idealfall die Membran nur für ein bestimmtes Ion I der vorgegebenen Ionensorte durchlässig ist. Der Transport der Kationen durch die Membran verläuft nach einem Stafettenmechanismus, wobei die Ionen I als Carrierkomplexe IS_n ($n = 1, 2, \dots$) diffundieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ausschliesslich optimierte kationenselektive Carrier eingesetzt (vgl. Fig. 4.2). In Membranen beruhend auf solchen Liganden ist zur Erhaltung der Elektroneutralität wahrscheinlich eine schwache Säure HR, z. B. in der Membran vorhandenes Wasser, zusätzlich an der Extraktion beteiligt [247]:

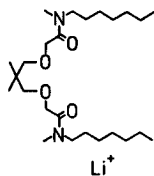




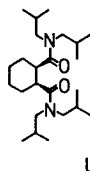
(TRIDODECYLAMIN, 522.0)



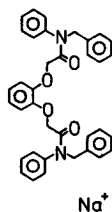
(VALINOMYCIN, 1111.3)



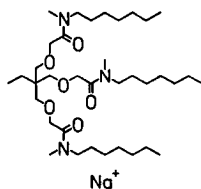
(ETH 149, 442.7)



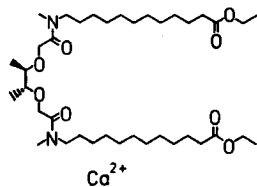
(ETH 1644, 394.7)



(ETH 157, 556.7)



(ETH 227, 641.9)



(ETH 1001, 685.0)

Figur 4.2. Konstitution der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Liganden (Bezeichnung, relative Molmasse [g mol^{-1}]).

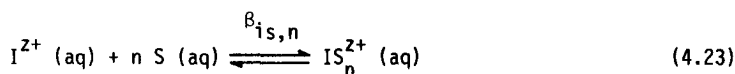
4.2.2 Theoretische Beschreibung der Selektivität

Das Extraktionsgleichgewicht (4.21) kann unter Vernachlässigung der schwachen Säure HR in verschiedene Teilprozesse zerlegt werden [22]:

- a) Uebertritt des freien Liganden von der Membranphase in die Diffusions-schicht der wässerigen Lösung:



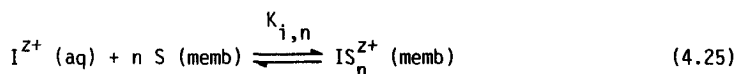
- b) Bildung der Kation-Ligand-Komplexe in der wässerigen Phase:



- c) Uebertritt der Komplexe in die Membranphase:



Die entsprechenden Gleichgewichtskonstanten bestimmen das folgende, vereinfachte Extraktionsgleichgewicht:



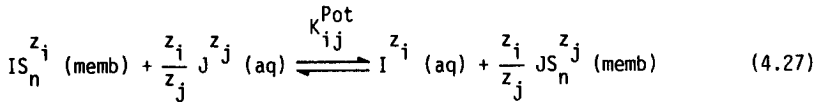
mit
$$K_{i,n} = \beta_{is,n} k_{is,n} \left(\frac{c_s}{k_s} \right)^n \quad (4.26)$$

wobei $k_s, k_{is,n}$: Verteilungskoeffizienten des Liganden S bzw. des Komplexes IS_n^{Z+} zwischen Membran- und wässriger Phase

$\beta_{is,n}$: Bruttostabilitätskonstante von IS_n^{Z+} in der wässrigen Phase

c_s'' : Konzentration des freien Liganden S in der Membran

Sind in der Messlösung neben dem Mession I^{z_i} weitere Ionen J^{z_j} anwesend, so sind die Beziehungen (2.21) bis (2.26) ebenfalls für diese Störionen gültig. Folgendes Ionenaustauschgleichgewicht kann dann aufgestellt werden:



Der potentiometrische Selektivitätsfaktor K_{ij}^{Pot} (vgl. Gl. 4.8) charakterisiert dieses Gleichgewicht und kann für gleichwertige Kationen ($z_i = z_j$) wie folgt approximiert werden [229]:

$$K_{ij}^{\text{Pot}} \cong \frac{\sum_n K_{j,n}}{\sum_n K_{i,n}} = \frac{\sum_n \beta_{js,n} k_{js,n} \left(\frac{c_s}{k_s}\right)^n}{\sum_n \beta_{is,n} k_{is,n} \left(\frac{c_s}{k_s}\right)^n} \quad (4.28)$$

Für Liganden, welche mit den Kationen vorwiegend 1:1-Komplexe bilden und deren Komplexe IS und JS dieselben Verteilungskoeffizienten haben sollen, erhält man aus dieser Gleichung:

$$K_{ij}^{\text{Pot}} \cong \frac{\beta_{js}}{\beta_{is}} \quad (4.29)$$

Diese einfache Beziehung wurde am Beispiel von Valinomycin für mehrere Membranzusammensetzungen klar bestätigt [229]. Falls $z_i \neq z_j$ und $n \neq 1$ wird die Beschreibung des Selektivitätsfaktors wesentlich komplexer (vgl. [22]).

Aus theoretischen Betrachtungen sowie experimentellen Erfahrungen wurden verschiedene selektivitätsbestimmende Parameter abgeleitet [28]:

a) Komplexbildung

Die Komplexbildung des Liganden mit dem Mession bzw. mit den Störionen bestimmen die Selektivität des Carriers. Experimentell wurde gezeigt, dass die Stabilitätskonstanten β innerhalb gewissen Grenzen liegen müssen [248, 249].

b) Dielektrizitätskonstante

Die Extraktionseigenschaften des Membranlösungsmittels, welche das Verhältnis $k_{is,n}/k_s^n$ bestimmen, beeinflussen die Selektivität des Liganden in der Membran [27]. Ausgehend von einem elektrostatischen Modell kann der Einfluss des Membranlösungsmittels auf die Selektivitätsfaktoren k_{ij}^{Pot} abgeschätzt werden [22, 28, 250]:

$$\frac{\partial \log k_{ij}^{\text{Pot}}}{\partial (1/\epsilon)} \cong \frac{243}{2 r} z_i (z_i - z_j) \quad (4.30)$$

wobei ϵ : Dielektrizitätskonstante des Membranlösungsmittels

r : mittlerer Radius der IS_n - bzw. JS_n -Komplexe [$\text{\AA}$]

Mit zunehmender Polarität bzw. Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels wird in der Membran die Diskriminierung der einwertigen gegenüber der zweiwertigen Kationen gleicher Grösse bei sonst gleichbleibenden Bedingungen erhöht.

c) Konzentration des freien Liganden

Die Ligandkonzentration in der Membran ($\cong c_s$) steht wie folgt mit dem Selektivitätsfaktor in Beziehung:

$$\frac{\partial \log K_{ij}^{\text{Pot}}}{\partial \log c_s} \approx \frac{z_i}{z_j} n_j - n_i \quad (4.31)$$

wobei n_i, n_j : mittlerer Komplexierungsgrad der Ionen I bzw. J in der Membranphase

Demnach fördert eine geringe Ligandkonzentration die Bevorzugung von zweiwertigen gegenüber einwertigen Ionen.

d) Konzentration an anionischen Zentren

Die Konzentration c_- an anionischen Zentren (z. B. Tetraphenylborate als Membranzusätze) beeinflusst ebenfalls die Selektivität der Membran:

$$\frac{\partial \log K_{ij}^{\text{Pot}}}{\partial \log c_-} \approx 1 - \frac{z_i}{z_j} \quad (4.32)$$

Dabei ist eine hohe Konzentration an anionischen Zentren für die Bevorzugung der zweiwertigen Kationen von Vorteil.

Diese verschiedenen Beziehungen zeigen deutlich, dass die Selektivitätsfaktoren K_{ij}^{Pot} einer Membran im allgemeinen nicht ausschliesslich durch die Stabilitätskonstanten der Ligandkomplexe bestimmt sind. Eine solche Korrelation wurde direkt nur für Membranen z. B. beruhend auf Valinomycin oder Nonactin erhalten, welche mit Alkaliionen durchwegs 1:1-Komplexe bilden (vgl. Gl.4.29)

4.2.3 Anforderungen an Membranmatrix und Membranlösungsmittel bzw. Weichmacher

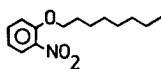
Ionenselektive Carrier werden in organischen Phasen, welche mit wässrigen Lösungen möglichst nicht mischbar sind und gleichzeitig dem Liganden eine hinreichende Mobilität gewährleisten, eingesetzt. In solchen Systemen liegen die Diffusionskoeffizienten etwa zwischen 10^{-6} bis $10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [25]. Das Lösungsmittel (Weichmacher) bzw. die Matrix sind für diese Eigenschaften stark massgebend, da sie zusammen üblicherweise etwa 99 Gew.-% der Membran darstellen.

Die Matrix einer Flüssigmembran dient als inertes Trägermaterial für die übrigen mobilen Komponenten. Grundsätzlich sind hochmolekulare Verbindungen als Matrix geeignet. Die Wahl einer Membranmatrix ist durch folgende allgemeine Anforderungen gegeben:

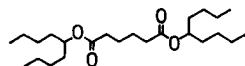
- hohe mechanische Stabilität der Membran (jedoch mit einer gewissen Elastizität),
- tiefer elektrischer Widerstand,
- keine potentiellen Koordinationsstellen und keine reaktiven funktionellen Gruppen,
- Biokompatibilität bzw. Hämkompatibilität,
- keine Ablagerungsstellen (glatte Oberfläche).

Diese Anforderungen werden vorwiegend durch plastifiziertes Poly(vinylchlorid) (PVC) und durch Silikongummi erfüllt (vgl. Fig. 4.3). Die weit- aus am häufigsten eingesetzten PVC-Membranen sind mechanisch etwas stabiler als Silikongummimembranen.

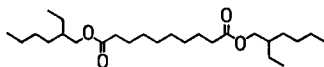
Wie anhand der Gleichung (4.30) diskutiert wurde, ist die Dielektrizitätskonstante des Membranlösungsmittels für die optimale Ausnützung der Selektivität eines Liganden entscheidend. An einen Weichmacher für PVC-Membranen werden folgenden allgemeine Anforderungen gestellt:



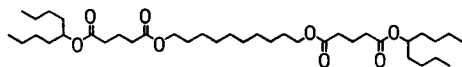
(o-NPOE, 251.3)



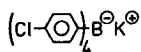
(BBPA, 398.6)



(DOS, 426.7)



(ETH 469, 654.9)



(KTpCIPB, 496.1)



(PVC, $M_n = 64000$)



(SILOPREN)

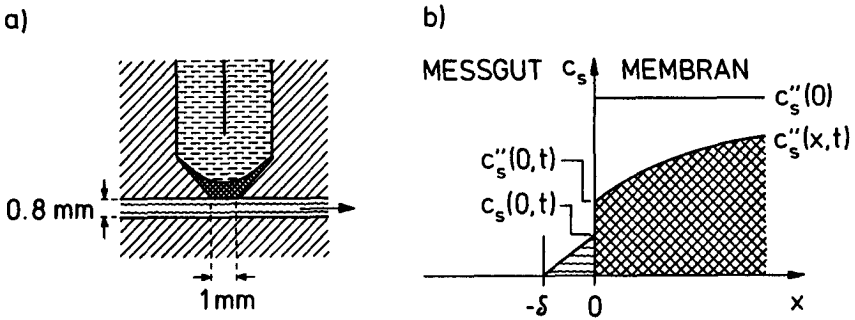
Figur 4.3. Konstitution der eingesetzten Membranlösungsmittel bzw. Weichmacher sowie der Membranzusätze und Membranmatrizen (Bezeichnung, relative Molmasse [g mol^{-1}]).

- optimale PVC-Weichmachereigenschaften,
- kleine Wasserlöslichkeit bzw. hohe Lipophilie,
- tiefer Dampfdruck,
- chemische Inertheit gegenüber dem Liganden und dem Messgut, insbesondere Abwesenheit von funktionellen Gruppen, die unter den vorgesehenen Messbedingungen protoniert oder deprotoniert werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vorwiegend apolare ($\epsilon = 4$), lipophile Di- bzw. Tetraester sowie teilweise der polare ($\epsilon = 24$), wenig lipophile o-Nitrophenyl-n-octyläther (o-NPOE) eingesetzt (vgl. Fig. 4.3).

4.2.4 Lebensdauer der Flüssigmembranen

Werden mechanische und chemische Beschädigungen, elektrische Nebenschlüsse, die Kontamination der Membranoberfläche (z. B. durch die Ablagerung von Proteinen) und die Extraktion von störenden Spezies in die Membranphase ausgeschlossen, so ist die Lebensdauer der ionenselektiven Flüssigmembranelektroden in der Regel durch die Extraktion der Membrankomponenten ins Messgut bzw. in den Elektrodenkörper begrenzt. In gewissen Fällen ist beobachtet worden, dass eine Verminderung der Carrierkonzentration in der Membran unter $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (Anfangskonzentration etwa $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) zu einem Zusammenbruch der Membranselektivität und der Steigung der Elektrodenfunktion führt, während ein Anstieg des PVC-Anteils über 70 Gew.-% (Anfangskonzentration etwa 33 Gew.-%) infolge eines Lösungsmittelverlustes eine drastische Membranwiderstandserhöhung mit sich bringt [251, 252]. Die Ausflussrate dieser zwei Membrankomponenten bestimmen dementsprechend die Lebensdauer des Sensors. Da die Lipophilie der vorzugsweise eingesetzten Lösungsmittel (BBPA, DOS, ETH 469; vgl. Fig. 4.3 und Tab. 4.5) in der Regel höher ist als die der Liganden, kann hier der Ausfluss von Carriern als lebensdauerlimitierender Prozess angenommen werden. Im folgenden Abschnitt wird ein kinetisches Modell der Ligandverteilung zwischen der Membran einer Durchflusselektrode und einer fließenden Probe vorgestellt (vgl. Fig. 4.4) [251-254].



Figur 4.4. Schematische Darstellung einer Flüssigmembrandurchflusselektrode (a)) und des entsprechenden Ligandkonzentrationsprofils (b)).

Dabei werden zwei geschwindigkeitsbestimmende Vorgänge berücksichtigt. Es sind dies einerseits die Carrierdiffusion durch die Grenzschicht und andererseits die Carrierdiffusion in der Membran.

Der gleichförmige Fluss der Probe entlang der Membran ergibt formal eine im Messgut zeitlich konstante Nernst'sche Diffusionsschicht der Dicke δ an der Grenzfläche zur Membran. Dabei wird die durchgeflossene Probe nicht wieder in Umlauf gebracht und die Probe ist somit stets ligandfrei. Die Liganddiffusion in der Grenzschicht kann also als quasistationärer Vorgang angenommen und durch das 1. Fick'sche Gesetz beschrieben werden. Für den zeitlich konstanten Fluss an der Phasengrenzfläche gilt:

$$J_g = - \frac{c_s''(0) D_s}{k_s \delta} \quad (4.33)$$

Die bis zur Zeit t hinausdiffundierte Menge an Carrier ist somit:

$$n_s(t) = \frac{c_s''(0) D_s A}{k_s \delta} t \quad (4.34)$$

mit
$$c_s''(0) = \frac{n_s''(0)}{V_M} \quad (4.35)$$

$$k_s = \frac{c_s''(0,t)}{c_s(0,t)} \quad (4.36)$$

- wobei J_g : Fluss des Liganden S durch die Phasengrenzfläche
 $[\text{mol cm}^{-1} \text{s}^{-1}]$
- $n_s(t)$: Menge an hinausdiffundiertem Liganden S zur Zeit t [mol]
- A : Membranfläche in Kontakt mit der Probe [cm^2]
- δ : Dicke der Diffusionsgrenzschicht in der Probe [cm]
- $c_s''(0)$: Anfangskonzentration des Liganden S in der Membran [mol cm^{-3}]
- D_s, D_s'' : Diffusionskoeffizient des Liganden S in der Probe bzw.
in der Membranphase [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$]
- $n_s''(0)$: Anfangsmenge des Liganden S in der Membran [mol]
- V_M : Membranzvolumen [cm^3]
- k_s : Verteilungskoeffizient des Liganden S zwischen Membran-
phase und Probe
- $c_s''(0,t)$: Ligandkonzentration in der Membranphase an der Phasen-
grenzfläche ($x = 0$) zur Zeit t [mol cm^{-3}]
- $c_s(0,t)$: Ligandkonzentration in der Probe an der Phasengrenzfläche
($x = 0$) zur Zeit t [mol cm^{-3}]
- t : Zeitdauer seit Beginn ($t = 0$) des Probenkontaktes [s]

Aus Gleichung (4.34) und (4.35) ergibt sich folgende relative Austrittsfunktion:

$$\frac{n_s(t)}{n_s''(0)} = \frac{D_s A}{k_s \delta V_M} t \quad (4.37)$$

$$\text{oder} \quad \log \frac{n_s(t)}{n_s''(0)} = \log t + \log \frac{D_s A}{k_s \delta V_M} \quad (4.38)$$

Daraus kann die formale Austrittsdauer [s] berechnet werden ($\frac{n_s(t)}{n_s''(0)} = 1$):

$$t_{\delta}^{\text{eq}} = \frac{\delta V_M}{D_s A} k_s \quad (4.39)$$

Falls die Ligandkonzentration in der Membran infolge Austritts von Ligand an der einen Phasengrenze nicht mehr konstant ist, muss die Carrierdiffusion in der Membranphase berücksichtigt werden. Dabei ist die Carrierkonzentration $c_s''(x,t)$ in der Membran ort- und zeitabhängig. Ausgehend von dem 2. Fick'schen Gesetz erhält man:

$$J_g(t) = -(c_s''(0) - c_s''(0,t)) \left(\frac{D_s''}{\pi t} \right)^{1/2} \quad (4.40)$$

$$\text{und} \quad n_s(t) = 2 A c_s''(0) \left(\frac{D_s'' t}{\pi} \right)^{1/2} \quad (4.41)$$

Daraus folgt die relative Austrittsfunktion:

$$\frac{n_s(t)}{n_s''(0)} = \frac{2A}{V_M} \left(\frac{D_s'' t}{\pi} \right)^{1/2} \quad (4.42)$$

$$\text{oder} \quad \log \frac{n_s(t)}{n_s''(0)} = \frac{1}{2} \log t + \log \frac{2A}{V_M} \left(\frac{D_s''}{\pi} \right)^{1/2} \quad (4.43)$$

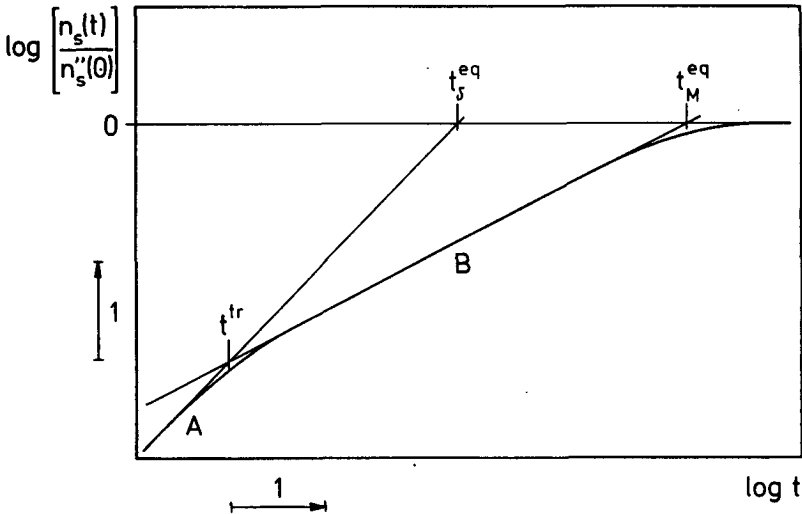
Daraus wird für diesen Diffusionsvorgang ebenfalls die formale Austrittsdauer [s] berechnet ($n_s(t)/n_s''(0) = 1$):

$$t_M^{\text{eq}} = \frac{\pi V_M^2}{4 D_s'' A} \quad (4.44)$$

In Figur 4.5 sind die Austrittsfunktionen des Liganden S für die zwei beschriebenen geschwindigkeitslimitierenden Diffusionsprozesse dargestellt. Eine doppelt logarithmische Darstellung eignet sich dazu besonders gut, da die kinetisch kontrollierten Bereiche dabei als Geraden erscheinen. Aus den Gleichungen (4.38) und (4.43) ist ersichtlich, dass nur die relative Lage der Geraden bezüglich der Zeitachse von den Systemparametern bestimmt ist (die Steigungen der Geraden sind konstant). Parameter der Geometrie der Durchflusselektrode (A , V_M), der Membran (D_s'' , k_s), der Probe (D_s , k_s) und seiner Flussgeschwindigkeit (δ) sind dabei massgebend. Die relative Lage der beiden Geraden ist durch die formale Uebergangszeit t^{tr} [s] zwischen den beiden geschwindigkeitslimitierenden Prozessen eindeutig festgelegt (vgl. Gl. 4.34 und 4.41):

$$t^{\text{tr}} = \frac{4 D_s'' \delta^2 k_s^2}{\pi D_s^2} \quad (4.45)$$

Bis zum Zeitpunkt t^{tr} ist der Ligandaustritt durch die Grenzschichtdiffusion und dann durch die Diffusion in der Membranphase bestimmt.



Figur 4.5. Relative ausgetretene Ligandmenge als Funktion der Zeit für eine mit einer fließenden Probe in Kontakt stehenden Flüssigmembran.

- A: kinetische Kontrolle durch Grenzschichtdiffusion (vgl. Gl. 4.38)
 B: kinetische Kontrolle durch Diffusion in der Membranphase (vgl. Gl. 4.43)

Wie bereits erwähnt wurde, baut sich ein diffusionsbedingter Ligandkonzentrationsgradient in der Membran auf (unter der Voraussetzung $t_M^{\text{eq}} > t_\delta^{\text{eq}}$). Da eine ionenselektive Membran eine minimale Ligandkonzentration fordert (etwa $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), ist eine Zeitfunktion der Konzentration an der Membrangrenzfläche ($c_s''(0, t)$) von besonderer Bedeutung. Aus den Gleichungen (4.33) und (4.40) erhält man (vgl. auch Fig. 4.6):

$$t = \frac{(c_s''(0) - c_s''(0,t))^2}{c_s''(0,t)^2} \frac{D_s'' \delta^2 k_s^2}{\pi D_s^2} = \frac{(c_s''(0) - c_s''(0,t))^2}{4 c_s''(0,t)^2} t^{tr} \quad (4.46)$$

$$\text{oder } t = \frac{(1 - r_s)^2}{4 r_s^2} t^{tr} \quad (4.47)$$

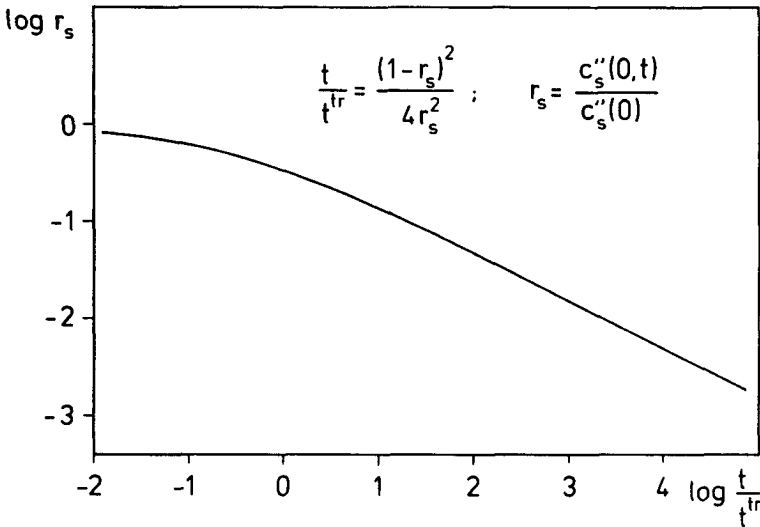
$$\text{mit } r_s = \frac{c_s''(0,t)}{c_s''(0)} \quad (4.48)$$

wobei r_s : relative Ligandkonzentration an der Membrangrenzfläche zur Zeit t bezüglich der Anfangskonzentration

Die Ligandkonzentration an der Membrangrenzfläche ist dabei von der Anfangskonzentration $c_s''(0)$ und von den Systemparametern bzw. von der Uebergangszeit t^{tr} abhängig.

Am Beispiel einer Flüssigmembrandurchflusselektrode (vgl. Fig. 4.4 a)) beruhend auf dem eher mässig lipophilen Liganden ETH 1001 (vgl. Fig. 4.2 und Tab. 4.5) wurden gemäss dem diskutierten Modell verschiedene relevante Zeitparameter berechnet [254]. Die Membran (ETH 1001, 3 Gew.-%; ETH 469, 64 Gew.-%; PVC, 33 Gew.-%; $V_M = 0.004 \text{ cm}^3$; $A = 0.008 \text{ cm}^2$; $\log D_s'' = -8.7$) ist dauernd mit einer fliessenden Serumprobe in Kontakt ($v = 18 \text{ mL h}^{-1}$; $\log D_s = -5.5$, berechnet nach der Wilke-Chang-Gleichung [255]; $\delta = 0.001 \text{ cm}$, berechnet nach der Prandtl'schen Gleichung [235]; $\log k_s = 2.9$). In diesem System ist die Uebergangszeit t^{tr} nach 2.7 Minuten erreicht und nach 2.6 Jahren ist die Membran formal ligandfrei ($c_s'' = 0$). Es ist jedoch zu beachten, dass an der Membrangrenzfläche die Ligandkonzentration $c_s''(0,t)$ bereits nach 4.6 Tagen auf 1 % der Anfangskonzentration gesunken ist ($c_s''(0) = 0.039 \text{ mol L}^{-1}$; $r_s = 0.01$), während die gesamte Membran noch 93 % der ursprünglichen Ligandmenge enthält. Nach 8.1 Tagen ist die kritische Ligandkonzentration von $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ [251] an der Phasengrenze erreicht. Wird im Laufe des Experimentes die

Serumprobe durch eine proteinfreie, wässrige Lösung (z. B. Eichlösung) ersetzt, ist wegen des höheren Verteilungskoeffizienten k_s (z. B. ETH 1001: $\log k_s = 7.4$) der Ligandaustritt nahezu aufgehoben. Die Lebensdauer des Sensors wird dadurch wesentlich verlängert. Da die Lebensdauer einer Flüssigmembranelektrode jedoch nicht klar definiert ist und zusätzlich von ihrem Einsatz abhängig ist, kann für ein bestimmtes Membransystem keine allgemeingültige Lebensdauer angegeben werden.



Figur 4.6. Relative Ligandkonzentration an der Membrangrenzfläche als Funktion der Zeit (vgl. Gl. 4.47).

Tabelle 4.5. Lipophilie der eingesetzten Liganden und Lösungsmittel bzw. Weichmacher

Membrankomponente	$\log P_H^a)$	$\log P_{DSC}^b)$	$\log k^c)$
Tridodecylamin	16.8	11.6	4.3
Valinomycin	2.0	8.6	3.3
ETH 149	4.6	6.2	2.5
ETH 1644	5.1	6.7	2.7
ETH 157	8.3	4.6	2.0
ETH 227	6.4	7.8	3.0
ETH 1001	7.5	7.5	2.9
o-NPOE	5.3	5.9	2.4
BBPA	9.0	8.8	3.3
DOS	10.0	10.1	3.8
ETH 469	13.6	10.8	4.0

- a) P_H : mit sogenannten Hansch-Parametern berechneter Verteilungskoeffizient für das System 1-Octanol/Wasser (Lipophilie) [403, 404]
- b) P_{DSC} : mittels Dünnschichtchromatographie bestimmte Lipophilie [254]
- c) k : aus P_{DSC} -Daten berechneter Verteilungskoeffizient für das System DOS/Albuminlösung ($\log k = 0.326 \log P_{DSC} + 0.481$) [254]

4.2.5 Ansprechverhalten der Flüssigmembranelektroden

Das dynamische Ansprechverhalten der Flüssigmembranelektroden ist von mehreren Prozessen abhängig [229]. Dabei sind üblicherweise die Diffusion der Messgationen durch die wässrige Grenzschicht an der Membranoberfläche und in der Membranphase die bestimmenden Vorgänge. Ein theoretisches Modell ergibt folgende Zeitfunktion für das Potential [22, 256]:

$$EMK(t) = EMK(\infty) + s \log \left[1 - \left(1 - \frac{a_i^0}{a_i} \right) \frac{1}{\sqrt{t/\tau''} + 1} + \frac{4}{\pi} e^{-t/\tau} \right] \quad (4.49)$$

$$\text{mit } \tau'' = \frac{D_{is,x}'' k_{is,x}^2 \delta^2}{\pi D_i^2} \quad (4.50)$$

$$\tau = \frac{4 \delta^2}{\pi^2 D_i} \quad (4.51)$$

wobei $EMK(t)$: EMK zur Zeit t [mV]

$EMK(\infty)$: EMK nach sehr langer Zeit (Endwert) [mV]

s : effektive Steigung der Elektrodenfunktion [mV]

a_i^0 : Aktivität des Messions I zur Zeit $t < 0$ [mol L⁻¹]

a_i : Aktivität des Messions I zur Zeit $t \geq 0$ [mol L⁻¹]

t : Zeit [s]

τ'' : Zeitkonstante für die Diffusion in der Membranphase [s]

τ : Zeitkonstante für die Diffusion in der wässrigen Grenzschicht [s]

δ : Dicke der wässrigen Grenzschicht [cm]

D_i : Diffusionskoeffizient des Messions I in der wässrigen Grenzschicht [cm² s⁻¹]

$D_{is,x}''$: mittlerer Diffusionskoeffizient des Mession-Ligand-Komplexes IS_n und der Gegenionen X in der Membranphase [cm² s⁻¹]

$k_{is,x}$: Verteilungskoeffizient des Mession-Ligand-Komplexes IS_n und der Gegenionen X zwischen wässriger Phase und Membranphase

Bei Flüssigmembranelektroden beruhend auf elektrisch neutralen Carriern ist im allgemeinen die Diffusion in der Membranphase der limitierende Prozess des Ansprechverhaltens, d. h. $\tau \gg \tau$. Um ein schnelleres Ansprechverhalten zu erreichen, muss dementsprechend τ reduziert werden. Folgende Anforderungen tragen dazu bei (vgl. Gl. 4.49):

a) Reduktion von $D_{is,x}''$

Die Mobilität des Mession-Ligand-Komplexes IS_n und der Messgutanionen X in der Membranphase muss klein sein, was mit einer hoch viskosen Membran erreicht wird.

b) Reduktion von $k_{is,x}$

Der Carrier muss ein relativ schwacher Komplexbildner sein und in eher geringer Konzentration vorhanden sein. Die Membranmatrix und das Lösungsmittel müssen möglichst apolar sein.

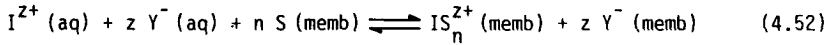
c) Reduktion von δ

Die Messung muss im Durchfluss geschehen oder das Messgut muss gerührt werden. Eine kleine Membranoberfläche trägt ebenfalls zur Reduktion von δ bei.

Für eine höhere Ansprechgeschwindigkeit sind zusätzlich dünne ionenselektive Membranen und Aktivitätsänderungen nach höheren Aktivitäten von Vorteil (vgl. Gl. 4.49). Zudem sollte das Messgut möglichst keine extrahierbare, lipophilen Anionen enthalten.

4.2.6 Anioneninterferenz

Abweichungen von der idealen kationischen Elektrodenfunktion (vgl. Gl. 4.5 und 4.8) treten manchmal auf, wenn die Messlösung eine relativ hohe Aktivität lipophiler Anionen Y^- wie z. B. SCN^- oder ClO_4^- enthält. Diese Anionen sind am Extraktionsvorgang beteiligt [28]:



Diese Reaktion tritt mit dem Gleichgewicht (4.21) in Konkurrenz und kann stark nach rechts verlagert sein, wenn die Teilchen Y^- sehr lipophil sind. Dies führt unter anderem zu einem Verlust der Kationenpermselektivität. Im Extremfall verhält sich die Carriermembran wie ein Anionentauscher, und es wird bei höherer Aktivität des lipophilen Anions Y^- eine anionische Elektrodenfunktion beobachtet [257, 258].

Eine Reduktion bzw. Elimination der Anioneninterferenz kann durch den Einsatz eines unpolaren Membranlösungsmittels bzw. einer unpolaren Membranmatrix erreicht werden [226, 257-259]. Dies eignet sich vor allem für alkaliionenselektive Membranen. Bei erdalkaliionenselektiven Membranen wird in der Regel durch den Einbau lipophiler, anionischer Komponenten, z. B. Kaliumtetrakis(p-chlorophenyl)borat (KTPClPB, vgl. Fig. 4.3), die Anioneninterferenz reduziert [28, 257, 258, 260]. Durch Zugabe dieser Salze wird die freie Ligandkonzentration c_s'' in der Membran stark reduziert:

$$c_s'' = c_{s,tot}'' - n c_{is} = c_{s,tot}'' - \frac{n}{z_i} c_- \quad (4.53)$$

wobei c_s'' : Konzentration des freien Liganden in der Membran
 $c_{s,tot}''$: totale Ligandkonzentration in der Membran
 c_{is} : Konzentration des Mession-Ligand-Komplexes IS_n
 c_- : Konzentration der anionischen Zentren in der Membran

Daraus folgt, dass zur Erhaltung der kationenselektiven Eigenschaften der Membran folgende Bedingung erfüllt sein muss:

$$c_- < \frac{z_i}{n} c_s'' \quad (4.54)$$

Durch die Erhöhung der Konzentration c_- der anionischen Zentren und durch die Erniedrigung der freien Ligandkonzentration c_s'' folgt zusätzlich eine Zunahme der Bevorzugung der zweiwertigen gegenüber den einwertigen Ionen (vgl. Gl. 4.31 und 4.32). Ausserdem bringt der Einbau von KTpClPB eine erwünschte Abnahme des elektrischen Widerstandes der Membran mit sich.

4.3 Messungen mit ionenselektiven Elektroden in Flüssigkeiten biologischer Herkunft

4.3.1 Anforderungen an die Selektivität

Um mittels Potentiometrie Ionenaktivitäten in biologischen Flüssigkeiten genau bestimmen zu können, muss die ionenselektive Elektrode hinreichende Selektivitäten gegenüber den Störionen aufweisen. Aus der Nicolsky-Eisenman-Gleichung (4.8) wird folgende Beziehung für die minimal erforderlichen Selektivitätsfaktoren $K_{ij,max}^{Pot}$ abgeleitet, wobei ein Eichverfahren ohne Störionen angenommen wird:

$$K_{ij,max}^{Pot} = \frac{a_{i,min}}{(a_{j,max})^{z_i/z_j}} \frac{p_{ij}}{100} \quad (4.55)$$

wobei $K_{ij,max}^{Pot}$: höchster zugelassener Selektivitätsfaktor
 $a_{i,min}$: minimal auftretende Aktivität des Messions $I_i^{z_i}$
 $a_{j,max}$: maximal auftretende Aktivität des Störions J^{z_j}
 p_{ij} : maximal zulässige Fehler in der Aktivität a_i der durch das Störion J verursacht wird (in %)

Tabelle 4.6. Minimal erforderliche Selektivitätsfaktoren $\log K_{ij,\max}^{\text{Pot}}$ für die Aktivitätsbestimmung des Ions I im Blutserum (vgl. Tab. 2.2) mit einem selektivitätsbedingten Fehler von maximal 1 % (vgl. Gl. 4.55 und Tab. 2.2).

I^{z_i}	J^{z_j}	$\log K_{ij,\max}^{\text{Pot}}$ (Serum, Referenzbereich)	$\log K_{ij,\max}^{\text{Pot}}$ (Serum, Extrembereich)
H^+	Na^+	-8.5	-9.0
	K^+	-7;0	-7.7
	Mg^{2+}	-7.7	-8.4
	Ca^{2+}	-7.7	-8.3
$Li^+ \text{ a)}$	H^+	2.1	1.4
	Na^+	-4.3	-4.4
	K^+	-2.8	-3.1
	Mg^{2+}	-3.5	-3.9
	Ca^{2+}	-3.6	-3.7
Na^+	H^+	4.4	3.5
	K^+	-0.6	-1.0
	Mg^{2+}	-1.2	-1.8
	Ca^{2+}	-1.3	-1.6
K^+	H^+	2.8	1.6
	Na^+	-3.6	-4.3
	Mg^{2+}	-2.8	-3.8
	Ca^{2+}	-2.9	-3.6
Ca^{2+}	H^+	9.3	7.6
	Na^+	-3.6	-4.1
	K^+	-0.6	-1.5
	Mg^{2+}	-1.9	-3.0

a) Für eine therapeutische Li^+ -Konzentration von 0.7 mmol L^{-1}
 $(a_{Li} = 0.54 \text{ mmol L}^{-1}, \text{ vgl. Kap. 9})$

In Tabelle 4.6 sind $\log K_{ij,\max}^{\text{Pot}}$ -Werte für Bestimmungen der Aktivität a_i im Blutserum mit höchstens 1 % Fehler zusammengestellt. Diese maximalen Selektivitätsfaktoren sind jedoch nur als Richtwerte zu betrachten, da in Gleichung (4.55) keine Flüssigkeitspotentialänderungen an der Referenzelektrode berücksichtigt werden und ideale Elektrodenfunktionen für Mess- und Störion angenommen werden (vgl. Gl. 4.5).

4.3.2 Anforderungen an Messgenauigkeit, Stabilität und Reproduzierbarkeit

Um Anforderungen an die potentiometrische Messung diskutieren zu können, ist es von Nutzen, die gegebenen Aktivitätsreferenzbereiche im Serum (vgl. Tab. 2.2) in EMK-Bereiche umzurechnen. Mit Hilfe der Nernst'schen Beziehung (Gl. 4.5) und unter der Annahme eines konstanten Flüssigkeitspotentials an der Referenzelektrode wurden die zwischen den unteren und oberen Aktivitätsgrenzwerte zu erwartenden Potentialdifferenzen ΔE_b berechnet (vgl. Tab. 4.7). Die unterschiedlichen EMK-Referenzbereiche bewirken, dass die Anforderung an die EMK-Messgenauigkeit bzw. Reproduzierbarkeit für jedes zu messende Ion relativ zu seinem Bereich betrachtet werden muss. Um eine klinisch zuverlässige Aussage zu gewährleisten, wird dementsprechend die erforderliche absolute Messgenauigkeit bei den Ionen mit dem engsten Potentialbereich am höchsten sein (vgl. Ca^{2+} und Na^+ in Tab. 4.7).

Wenn angenommen wird, dass die interindividuellen Ionenkonzentrationen und die Einzelmessungen einer Normalverteilung entsprechen [261, 262], kann für die erforderliche absolute Messgenauigkeit $s_{a,\max}$ einer Einzelmessung eine vom Potentialbereich ΔE_b und von der gewünschten statistischen Sicherheit S abhängende Beziehung gegeben werden:

$$s_{a,\max} = \frac{1}{2} \cdot \frac{\Delta E_b}{x_s \cdot k} \quad (4.56)$$

wobei $s_{a,max}$: erforderliche absolute Messgenauigkeit [mV] um die Klasse $\Delta E_b/k$ durch eine Einzelmessung mit der Wahrscheinlichkeit S zu treffen

ΔE_b : theoretisch zu erwartende EMK-Differenz einer Messkette in reinen Lösungen des Messions I zwischen unterer und oberer Grenze des Aktivitätsbereiches im Serum [mV]

k : Bruchteil des Referenzbereiches ΔE_b

x_s : Sicherheitsgrenze, Abstand vom Mittelwert der normierten Normalverteilung für eine gegebene statistische Sicherheit S ($x_{95\%} = 1.96$, $x_{99.5\%} = 2.81$)

S : statistische Sicherheit [263, 264]:

$$S = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-x_s}^{x_s} e^{-\frac{1}{2}t^2} dt$$

In Tabelle 4.7 sind die erforderlichen absoluten EMK-Messgenauigkeiten für Kationenaktivitätsbestimmungen im Serum aufgeführt. Die Messgenauigkeit wurde so berechnet, dass eine Einzelmessung mit einer Wahrscheinlichkeit von 99.5 % im Referenzbereich ($k = 1$), bzw. mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % in einem Fünftel des Referenzbereiches ($k = 5$) liegt. Diese letzten Anforderungen ($k = 5$, $S = 95\%$) sollten im Hinblick auf eine zuverlässige klinische Diagnostik zu hinreichend genauen Resultaten führen. Als Idealfall gilt jedoch, dass die analytische Streuung s_a kleiner als ein Zehntel der biologischen (interindividuellen) Streuung s_b ist [74]:

$$s_a \leq \frac{1}{10} s_b \approx \frac{1}{40} \Delta E_b \quad (4.57)$$

Aus Tabelle 4.7 ist ersichtlich, dass auf Grund der engen Na^+ - und Ca^{2+} -Referenzbereiche für diese Ionen die höchsten Anforderungen ans Messsystem resultieren.

Tabelle 4.7. EMK-Referenzbereiche ΔE_b [mV] und erforderliche absolute Messgenauigkeiten $s_{a,\max}$ [mV] bei Messungen mit ionenselektiven Elektroden im Serum (vgl. Gl. 4.55).

Mession	ΔE_b [mV]	$s_{a,\max}$ [mV]	$s_{a,\max}$ [mV]	$s_a \leq \frac{1}{10} s_b$
		S = 99.5% k = 1	S = 95% k = 5	[mV]
H ⁺	6.8	1.21	0.35	0.18
Li ⁺ a)	37.2	6.62	1.90	0.93
Na ⁺	2.4	0.43	0.12	0.06
K ⁺	9.1	1.62	0.46	0.23
Ca ²⁺	2.3	0.41	0.12	0.06
Ca ²⁺ b) Ca _{tot}	2.6	0.46	0.13	0.07

- a) Für den therapeutischen Li⁺-Aktivitätsbereich
(0.54-2.30 mmol L⁻¹; vgl. Kap. 9)
- b) nach Freisetzung des gebundenen Calciums

Ist man nur an relativen Aktivitätsänderungen r_a (in %) interessiert, so erhält man die zu erwartende Potentialdifferenz ΔE [mV] mit folgender Beziehung:

$$\Delta E = s \log \frac{r_a + 100}{100} \quad (4.58)$$

$$\text{oder} \quad \Delta E \cong \frac{0.25}{z_i} r_a \quad (4.59)$$

wobei r_a : relative Aktivitätsänderung bezüglich der Anfangsaktivität

Um eine relative Aktivitätsänderung von 1 % feststellen zu können, müssen dementsprechend Potentialänderungen von 0.25 mV bei einwertigen, bzw. 0.13 mV bei zweiwertigen Kationen gemessen werden können.

Aus diesen verschiedenen Betrachtungen kann geschlossen werden, dass eine EMK-Messgenauigkeit von rund 0.1 mV die klinischen Anforderungen recht ideal erfüllen würde.

4.3.3 Anforderungen an die Ansprechzeit und an die Lebensdauer

In der klinischen Analytik ist neben der Genauigkeit die Dauer einer Bestimmung ein wichtiger Faktor. Da in der direkten Potentiometrie keine Probebehandlung notwendig ist, bestimmen vorwiegend die Einlasszeit der Probe (Durchflusszeit zwischen Einlass in das Messsystem und Kontakt mit der Messzelle) und die Ansprechzeit der ionenselektiven Zelle die Analysendauer. Verschiedene Definitionen sind für die Ansprechzeit vorgeschlagen worden [265]. In der Folge wird die Ansprechzeit als die Zeitspanne $t_{0.1\text{mV}}$ zwischen dem Probewechsel ($t = 0$) und dem Zeitpunkt definiert, bei welchem das Potential der Zelle den Bereich von ± 0.1 mV um den EMK-Endwert erreicht hat (vgl. auch Gl. 4.49):

$$|\text{EMK}(t_{0.1\text{mV}}) - \text{EMK}(\infty)| = 0.1 \text{ mV} \quad (4.60)$$

Dabei führen Abweichungen von ± 0.1 mV in der EMK zu Unsicherheiten in der ermittelten relativen Aktivität von rund ± 0.4 % für die einwertigen bzw. ± 0.8 % für die zweiwertigen Kationen. Solche Abweichungen sind mit den allgemeinen Genauigkeitsanforderungen der klinischen Routineanalytik vereinbar (vgl. Gl. 4.57 und Tab. 4.7).

Die Anforderungen der klinischen Medizin an die Analysendauer sind je nach der zu bestimmenden Spezies und je nach medizinischen Gegebenheiten

sehr unterschiedlich. Bei Messungen im Operationssaal oder in der Intensivpflegestation muss oft das Analysenresultat spätestens 5 Minuten nach der Blutentnahme bekannt sein [76]. Damit die Ansprechzeit der ionenselektiven Elektroden kein limitierender Faktor darstellt, sollte die Bedingung $t_{0.1mV} < \sim 30$ s erfüllt sein. Diese Anforderung entspricht ebenfalls etwa den heute gestellten Bedingungen für den Einsatz in Durchflussanalysatoren (vgl. 3.3.3).

Im Kapitel 4.2.4 wurde schon betont, dass für eine bestimmte ionenselektive Membran keine allgemeingültige Lebensdauer angegeben werden kann. Aus praktischen Gründen muss jedoch eine ionenselektive Elektrode in der klinisch-chemischen Routineanalytik möglichst einen mehrmonatigen Einsatz gewährleisten. Da die Membran mit Unterbrechungen während kurzen Perioden (mindestens der Ansprechzeit entsprechend) mit der Messprobe (Blut, Serum oder verdünntes Serum, bzw. Plasma) in Kontakt steht, ist die praktische Lebensdauer einer ionenselektiven Elektrode in einem klinisch-chemischen Analysator wesentlich länger als die Lebensdauer der Membran bei unablässigem Gebrauch in einer sich stets erneuernden Messprobe. Die bis heute im klinischen Bereich eingesetzten Flüssigmembranelektroden [28, 202, 203] haben erfahrungsgemäss hinreichende Lebensdauer aufgewiesen.

4.3.4 Eichung der Messkette

Das Eichen sowie die Wahl von Referenzmethoden sind grundlegende Probleme der klinischen Analytik. Sie sind in vielen Fällen bis heute noch weitgehend ungelöst. Bei der quantitativen potentiometrischen Bestimmung von Ionen sind diese Schwierigkeiten besonders ausgeprägt, da die Ionenselektiven Elektroden grundsätzlich auf Aktivitäten ansprechen, während nach wie vor die Konzentration die in der klinischen Praxis vorwiegend gefragte Grösse darstellt. Trotz zahlreicher Beiträge (vgl. u. a. [227, 266-270]) ist gegenwärtig noch kein einheitliches Aktivitäts- bzw. Konzentrationseichverfahren für die potentiometrische Ionenbestimmung in

biologischen Flüssigkeiten vorhanden.

Die potentiometrische Ermittlung der Konzentration eines gegebenen Kations im Blut bzw. im Serum ist ohne Mitbestimmung der Ionenstärke bzw. der Ionenstärkebestimmenden Ionen zwangsläufig mit einer gewissen Unsicherheit verbunden. Dies ist auch der Fall, wenn ideal ionenselektive Elektroden eingesetzt werden (vgl. 4.1). Eine genaue, direkte Konzentrationsbestimmung ist durch eine Einzelmessung nur unter der Voraussetzung identischer Elektrolytzusammensetzung bzw. identischer Ionenstärke von Probe und Eichlösungen möglich. Diese Tatsache wurde im Rahmen dieser Arbeit bei der Ermittlung der Li^+ -, Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen im Serum weitgehend berücksichtigt (vgl. Kap. 5, 6, 7 und 9). Mit Hilfe von Eichlösungen ($W_{i,1}$, $W_{i,2}$ und $W_{i,3}$ mit entsprechend tiefer, normaler und hoher Konzentration an Mession I und konstanten, normalen Störionenkonzentrationen) wurde dabei die Steigung s der Elektrodenfunktion bzw. der Konzentrationseichgeraden (lineare Regression EMK gegen $\log c_i$) ermittelt. Um eventuelle Verschiebungen des Standardpotentials E_i^0 (Drift) bei Serienbestimmungen zu berücksichtigen, wurde vor jeder Serumprobe S_n die Eichlösung $W_{i,2}$ gemessen. Die Konzentration des Messions I im Serum S_n wurde mit folgender aus der Nernst'schen Gleichung (4.5) hergeleiteten Formel berechnet (unter der Annahme eines konstanten Standardpotentials bei dem Probewechsel $W_{i,2} \rightarrow S_n$):

$$c_i(S_n) = c_i(W_{i,2}) \cdot 10^{\frac{\text{EMK}(W_{i,2}) - \text{EMK}(S_n)}{s}} \quad (4.61)$$

wobei $c_i(S_n)$: Konzentration des Messions I in der Serumprobe S_n
[mmol L⁻¹]

$c_i(W_2)$: Konzentration des Messions I in der Eichlösung W_2
[mmol L⁻¹]

$\text{EMK}(W_{i,2})$: EMK der Messkette in der Eichlösung $W_{i,2}$ [mV]

$\text{EMK}(S_n)$: EMK der Messkette in der Serumprobe S_n [mV]

s : Steigung der Elektrodenfunktion bzw. der Konzentrations-eichgeraden [mV]

Dieses Eich- und Messverfahren wurde im Rahmen dieser Arbeit bei der Bestimmung der Natrium-, Kalium- und totalen Calciumkonzentration erfolgreich angewandt (vgl. Kap. 5, 6, 7, sowie [132, 217, 219, 225]). Einzelheiten werden für jedes Ion in den entsprechenden Kapiteln diskutiert.

Die potentiometrische Bestimmung der Aktivität eines Ions in einer biologischen Flüssigkeit ist ebenfalls mit einem Eichproblem verbunden. Die Schwierigkeit ist in der Tatsache begründet, dass die Aktivität eines Ions in einer gegebenen Lösung nicht aus den Einwaagen bestimmt werden kann, sondern mathematisch approximiert werden muss (vgl. 4.1.3). Dabei müssen die Flüssigkeitspotentialänderungen an der Referenzelektrode und die Interferenz durch die Störionen berücksichtigt werden. Gegenwärtig wird in der klinischen Routineanalytik lediglich in einem Fall die Aktivität eines Ions ermittelt. Es handelt sich dabei um den pH-Wert des Blutes ($\text{pH} = -\log a_{\text{H}^+}$). Auch hier ist das Eichverfahren nicht eindeutig festgelegt, obwohl vorwiegend zwei vom National Bureau of Standards vorgeschlagene Pufferlösungen mit definierten pH-Werten eingesetzt werden [107, 271]. Im Hinblick auf eine Reproduzierbarkeit von Messwerten, die von verschiedenen Laboratorien stammen, sollte zusätzlich die Flüssigkeitsbrücke (liquid junction) definiert sein [272]. Da das ionisierte Ca^{2+} ebenfalls nur potentiometrisch direkt quantitativ erfassbar ist, wäre es auch hier sinnvoll, die Aktivität zu spezifizieren. Ca^{2+} -Aktivitätseichlösungen sind aber bis heute noch nicht offiziell vorgeschlagen worden. Eichverfahren für pH- und Ca^{2+} -Bestimmungen im Blut werden in den entsprechenden Kapiteln (Kap. 7.3 und 8) beschrieben und diskutiert.

4.3.5 Einflüsse verschiedener Komponenten des Blutes

Im Rahmen dieser Arbeit wurde immer wieder festgestellt, dass für wässrige Elektrolytlösungen optimierte ionenselektive Flüssigmembranelektroden im Serum nicht erwartungsgemäss arbeiten. Dabei zeigten die ermittelten Ionenaktivitäten bzw. Konzentrationen grosse Abweichungen bezüglich der Vergleichsdaten, und das Ansprechverhalten war gegenüber den Messungen in wässrigen Lösungen z. T. extrem verlangsamt. Zusätzlich bewirkte ein Serumkontakt vielfach eine Verschiebung des Standardpotentials E_i^0 , eine Abnahme der Steigung s der Elektrodenfunktion (vgl. Gl. 4.5 und 4.8) sowie einen Verlust an Selektivität. Diese Veränderungen der Elektrodeneigenschaften waren jedoch in vielen Fällen reversibel, d. h. die Elektroden erreichten wieder ihre ursprünglichen Charakteristika nach einer Konditionierungsperiode in wässrigen Lösungen.

Diese Tatsachen können z. T. durch zwei mögliche Typen von Kontaminationen der ionenselektiven Membran durch Serumkomponenten erklärt werden. Im ersten Fall kann das Eindringen von lipophilen Anionen aus dem Serum in die Membran zu einem Verlust der Permselectivität und einer Zunahme der Ansprechzeit führen (vgl. 4.2.5 und 4.2.6). Andererseits wird die Ablagerung von Proteinen und/oder Lipiden an der Membranoberfläche vermutet. IR-Spektren der Oberfläche einer Flüssigmembran beruhend auf dem Liganden ETH 157 (vgl. Fig. 4.2), welche mehrere Monate mit Serum in Kontakt war, weisen auf Proteinablagerungen hin [273]. Morphologische Veränderungen der Membran wurden ebenfalls beobachtet [273].

4.3.6 Kontamination der Probe durch Membrankomponenten

Die Extraktion von Komponenten, insbesondere von PVC-Weichmachern aus der Membran ins Messgut wurde bei der Betrachtung der Lebensdauer eingehend diskutiert (vgl. 4.2.4). Obwohl ionenselektive Flüssigmembranelektroden in Kathetern [37, 274, 275] und in Durchflusssystemen [213, 214, 217, 218, 221, 223] direkt im Kreislauf von biologischen Flüssigkeiten von lebenden Tieren bzw. Menschen eingesetzt werden, muss leider festgestellt werden, dass nahezu keine Information über die Toxizität der extrahierten Membrankomponenten vorhanden ist. In der Medizin ist zwar die Kontamination von in Kunststoffbehältern aufbewarten Blutproben durch Weichmacher schon seit mehr als zehn Jahren bekannt [276]. Die Extraktion von Weichmachern insbesondere von Bis(2-äthylhexyl)phthalat durch in PVC-Schläuchen fließendes Blut wurde bei Patienten nach einer Hämodialyse oder einer Herzoperation beschrieben [277-279]. Von Bis(2-äthylhexyl)phthalat wurde bis heute nur über dessen Stoffwechselprodukte, jedoch ohne jegliche Toxizitätsangaben, berichtet (vgl. u. a. [280]).

Eine der wenigen bis anhin durchgeführten toxikologischen Untersuchungen eines Weichmachers bezieht sich auf Bis(2-äthylhexyl)adipat (DOA) [281]. Dabei wurden bei Tieren nach länger andauernder Einwirkung von DOA bösartige Tumore festgestellt. Ferner wurde die mutagene Wirkung von o-Nitrophenylmethyläther (o-NPME) bei Bakterien nachgewiesen [282]. Da DOA und o-NPME mit anderen in Flüssigmembranen verwendeten Weichmachern strukturell sehr ähnlich sind (vgl. Fig. 4.3 und [28, 202]), sind diese Informationen im Hinblick auf in vivo und in situ Messungen zu berücksichtigen. Weitere Untersuchungen über die Toxizität der Membrankomponenten sind wegen der zunehmenden Tendenz, an lebenden Organismen zu messen, sehr wünschenswert.

5. FLUESSIGMEMBRANELEKTRODE ZUR BESTIMMUNG DER NATRIUM-KONZENTRATION IM BLUTSERUM

5.1 Einleitung

Die Entwicklung einer Na^+ -selektiven Glasmembranelektrode [3, 6] und später die Verbesserung deren Eigenschaften [283] haben im Bereich der klinischen Analytik ein grosses Interesse hervorgerufen. Glasmembranelektroden werden routinemässig zur quantitativen Bestimmung von Na^+ in Blut [77, 89, 119, 120, 129, 131, 133, 285, 286], Serum [77, 101, 120, 124-126, 129, 130, 133, 287-296] und verdünntem Urin [77, 119, 124, 125, 131, 289-292, 295-300] eingesetzt (vgl. auch Tab. 3.2). Trotz des verbreiteten Einsatzes von solchen Sensoren sind gewisse störende systemgebundene Nachteile vorhanden. Der relativ hohe elektrische Widerstand der Glasmembran, die Proteinablagerung an deren Oberfläche und technische Schwierigkeiten beim Einbau in Elektrodenkörper können zu Störungen führen und die Bauart der Elektrode einschränken. In diesem Zusammenhang sind Flüssigmembranen vorzuziehen. Der spezifische Widerstand dieser Kunststoffmembranen ist wesentlich tiefer als bei Glasmembranen [132], und nach mehrmonatigem Serumkontakt sind sie noch funktionstüchtig [222]. Sie verlangen dementsprechend keine regelmässige Sonderbehandlung, um die Membranoberfläche zu regenerieren wie dies bei Glasmembranen der Fall ist [300, 301], und können in verschiedenen Formen angefertigt und eingesetzt werden wie z. B. in sogenannten Makro-, Mini-, Mikro-, Durchfluss-, Katheter- und Oberflächen-elektroden sowie in ISFET's (vgl. [28]).

In den letzten Jahren wurden natürliche (Monensin [302, 303] und das Derivat Methyl-monensin [304]) als auch synthetische (ETH 1097 (N,N,N,N,-Tetrabenzyl-3,6-dioxaoctandiamid) [305, 306], ETH 157 [222, 307, 308], ETH 227 [309-311], und eine Bis(12-Krone-4)-Verbindung [312]) Na^+ -Ionophore als ionenselektive Komponenten in Flüssigmembranelektroden eingesetzt. Mit einigen von diesen Sensoren wurden Bestimmungen der Na^+ -Kon-

tration in Blut [213, 222, 304], in Serum [222, 304], in Urin [310, 313], in Pankreassaft [314] und in weiteren extrazellulären Flüssigkeiten [315-317] durchgeführt. Dabei war es noch nicht möglich, ein und dieselbe Membran für Messungen in unverdünntem Blut bzw. Serum als auch in unverdünntem Urin einzusetzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Na^+ -selektive Flüssigmembran entwickelt, welche für direkte Messungen in beiden Körperflüssigkeiten anwendbar ist.

5.2 Optimierung der Membranzusammensetzung und der Elektrodenbauart

Verschiedene Flüssigmembranelektroden, welche auf den synthetischen Carriern ETH 157 bzw. ETH 227 beruhen, wurden bereits früher auf ihre Einsetzbarkeit in biologischen Flüssigkeiten untersucht (vgl. u. a. [222, 310, 318-322]). Dabei wurde eine Membranelektrode beruhend auf dem Liganden ETH 157, mit DOS als Weichmacher, erfolgreich in Serum eingesetzt [222]. Deren Na^+/K^+ -Selektivität ist jedoch ungenügend, um zuverlässige Na^+ -Bestimmungen in Urin zu gestatten. Eine weitere Membranelektrode, beruhend auf dem Liganden ETH 227 und gleichfalls mit DOS als Weichmacher, ist dagegen für direkte Messungen in Urin geeignet [310]. Leider erwiesen sich Na^+ -Bestimmungen in Serum mit dieser Elektrode als unbefriedigend [319-321]. PVC-Membranen mit dem Carrier ETH 227 und o-NPOE als Weichmacher zeigen zwar eine mit Glasmembranen vergleichbare Na^+/K^+ -Selektivität ($\log K_{ij}^{\text{Pot}} = -2.4$; vgl. [132]), sind aber wegen mangelnder Stabilität für direkte Messungen in biologischen Flüssigkeiten ungeeignet.

Auf Grund dieser Tatsache wurden im Hinblick auf Na^+ -Bestimmungen in Serum und Urin neue Membranen, zusammengesetzt aus dem Carrier ETH 157 oder ETH 227, BBPA als Weichmacher und PVC als Membranmatrix (vgl. Tab. 5.1), vorgeschlagen und charakterisiert (vgl. Tab. 5.2 und 5.3). Um einen Vergleich mit früheren Resultaten vornehmen zu können, wurde zusätzlich die Membran Na2 mit untersucht, die sich für Messungen in Urin bereits

Tabelle 5.1. Zusammensetzung (in Gew.-%) und spezifischer Widerstand [Ω cm] von Na^+ -selektiven Membranen (vgl. Fig. 4.2)

Membran	Ligand [Gew.-%]	Weichmacher [Gew.-%]	Matrix [Gew.-%]	Spezifischer Widerstand [Ω cm]
Na1	1.1 ETH 157	66.1 BBPA	32.8 PVC	$8.1 \cdot 10^7$
Na2	1.0 ETH 227	66.0 DOS	33.0 PVC	
Na3	1.0 ETH 227	65.9 BBPA	33.1 PVC	$3.0 \cdot 10^7$

bewährt hat. Da eine gewisse Abhängigkeit der Membranelektrodeneigenschaften von der Elektrodenbauart festgestellt wurde [321], wurden jeweils Makro- und Minielektroden untersucht (vgl. 11.1 und 11.2).

In Tabelle 5.2 sind die in reinen NaCl-Lösungen erhaltenen Elektrodenfunktionen numerisch zusammengefasst. Es stellt sich heraus, dass die Bauart der Elektrode nur bei der Membran Na3 einen signifikanten Einfluss auf die Elektrodenfunktion und Selektivität besitzt. Dabei ist die Steigung der Elektrodenfunktion der Minielektrode näher dem Idealwert ($s = 58.17$ mV bei 20°C) als diejenige der Makroelektrode. Zusätzlich ist der lineare Bereich grösser und die Nachweisgrenze etwas tiefer. Ein Vergleich lässt sich auch für die Selektivität durchführen (vgl. Tab. 5.3). Ein Effekt ist wiederum nur bei der Membran Na3 (mit Ausnahme der Na^+/K^+ -Selektivität) vorhanden. Die gestellten Anforderungen an die Selektivität für Messungen in Serum (vgl. 4.3.1) bzw. in Urin (vgl. [32]) werden jedoch von beiden Elektrodenbauarten sowohl für Membran Na2 als auch für Membran Na3 erfüllt, wobei der Selektivität gegenüber K^+ besondere Beachtung geschenkt werden muss. Dementsprechend ist die Na^+/K^+ -Selektivität der Membran Na1 mit Na^+ -Bestimmungen in Serum gerade noch vereinbar; für zuverlässige Messungen in Urin ist sie dagegen eindeutig ungenügend.

Tabelle 5.2. Eigenschaften der Elektrodenfunktion von Na^+ -selektiven Elektroden^{a)}.

Membran	Elektroden- bauart ^{b)}	Steigung [mV]	Linearer Bereich ^{c)} (log a_{Na})	Nachweis- grenze ^{d)} (log a_{Na})
Na1	Makro	57.8 ± 0.2	$-3.1 \div -1.0$	-5.1
	Mini	57.5 ± 0.1	$-3.1 \div -1.0$	-4.6
Na2	Makro	57.7 ± 0.7	$-3.1 \div -1.0$	-4.4
	Mini	57.9 ± 0.4	$-3.1 \div -1.0$	-4.2
Na3	Makro	56.3 ± 0.7	$-3.1 \div -1.0$	-4.8
	Mini	60.1 ± 0.7	$-4.1 \div -1.0$	-5.1

a) Innenableitelektrolyt: $140 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$

b) Makro: Makroelektrode (vgl. 11.1)

Mini: Minielektrode (vgl. 11.2)

c) Bereich der linearen Regression zur Ermittlung der Steigung s

d) vgl. [228]

Das Verhalten der Elektroden im Serum bzw. nach Serumkontakt war letztlich das entscheidende Auswahlkriterium. Bei allen drei Membranen wiesen die Makroelektroden ohne Ausnahme ein unzulässiges, langsames Ansprechverhalten (Ansprechzeit > 20 Minuten) im Serum auf. Zusätzlich bewirkte der Serumkontakt eine Abnahme der Steigung der Elektrodenfunktionen in wässrigen Lösungen, sowie einen Verlust an Selektivität. Bei den miniaturisierten Elektroden mit Membran Na1 und Na3 waren diese Serumeinflüsse dagegen nicht signifikant feststellbar. Diese Membranelektroden wurden deshalb für weitere Untersuchungen eingesetzt.

Tabelle 5.3. Selektivitätsfaktoren von Na^+ -selektiven Elektroden
(Methode der getrennten Lösungen, SSM; 0.1 mol L^{-1}
Chloridlösungen).

Membran	Elektroden- bauart	$\log K_{\text{Na}j}^{\text{Pot}} ; j^{\text{Z}+} =$				
		H^+	Li^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}
Na1	Makro	-0.1	-1.7	-0.5	-3.1	-2.8
	Mini	0.7	-1.7	-0.4	-3.3	-3.1
Na2	Makro	-0.2	0.6	-1.2	-3.1	-1.6
	Mini	-0.6	0.5	-1.6	-3.2	-1.7
Na3	Makro	0.1		-1.5	-2.9	-1.2
	Mini	-0.1	0.5	-2.0	-2.2	-1.5

Die verschiedenen Einbaumethoden der Membranen (mechanische Fixierung bei den Makroelektroden und Anschweissen auf einen Kunststoffschlauch bei den Minielektroden; vgl. 11.1 bzw. 11.2) sind mögliche, aber hypothetische Ursachen des sehr unterschiedlichen Verhaltens der beiden Elektrodenvarianten im Serum. Untersuchungen von Makroelektrodenmembranen mit dem optischen Mikroskop wiesen auf Unregelmässigkeiten der Oberfläche hin, die bei Minielektrodenmembranen nicht beobachtet wurden. Diese Unregelmässigkeiten könnten zum Teil das sehr langsame Ansprechverhalten erklären.

5.3 Bestimmung der Natriumkonzentration in Blutserum

5.3.1 Eich- und Messverfahren

Die in diesem Kapitel beschriebenen Na^+ -Bestimmungen in Serum wurden mit einem für Minielektroden entwickelten Durchflusssystem durchgeführt (vgl. 11.2 und [132]), wobei das im Abschnitt 4.3.4 allgemein beschriebene Eich- und Messverfahren angewandt wurde. Die Steigung der Elektrodenfunktion wurde mit Hilfe von drei Eichlösungen (vgl. Tab. 5.4) unmittelbar zweimal nacheinander bestimmt. Aus diesen zwei Werten für die Elektrodensteilheit (s) wurde der Mittelwert $\bar{s}$ gebildet. Da erfahrungsgemäss oft eine Verschiebung der Eichgeraden (sogenannter E^0 -Shift) nach einem ersten Serumkontakt der ionenselektiven Elektrode festzustellen ist, wurde dreimal die Eichlösung $W_{\text{Na}2}$ abwechselnd mit einer Serumprobe S_0 , die ein Gemisch von mehreren Seren war, gemessen (sogenannter Einlauf). Dieselbe Eichlösung wurde anschliessend vor jeder zu untersuchende Serumprobe gemessen und am Ende einer Messreihe wurde zur Kontrolle die Steigung der Elektrodenfunktion nochmals bestimmt (zur Reihenfolge der Messproben vgl. auch Fig. 5.1 a)).

Tabelle 5.4. Zusammensetzung der Na^+ -Eichlösungen.

Eichlösung	Zusammensetzung ^{a)} [mmol L ⁻¹]			
	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}
$W_{\text{Na}1}$	50.0	4.0	1.1	0.6
$W_{\text{Na}2}$	140.0	4.0	1.1	0.6
$W_{\text{Na}3}$	500.0	4.0	1.1	0.6

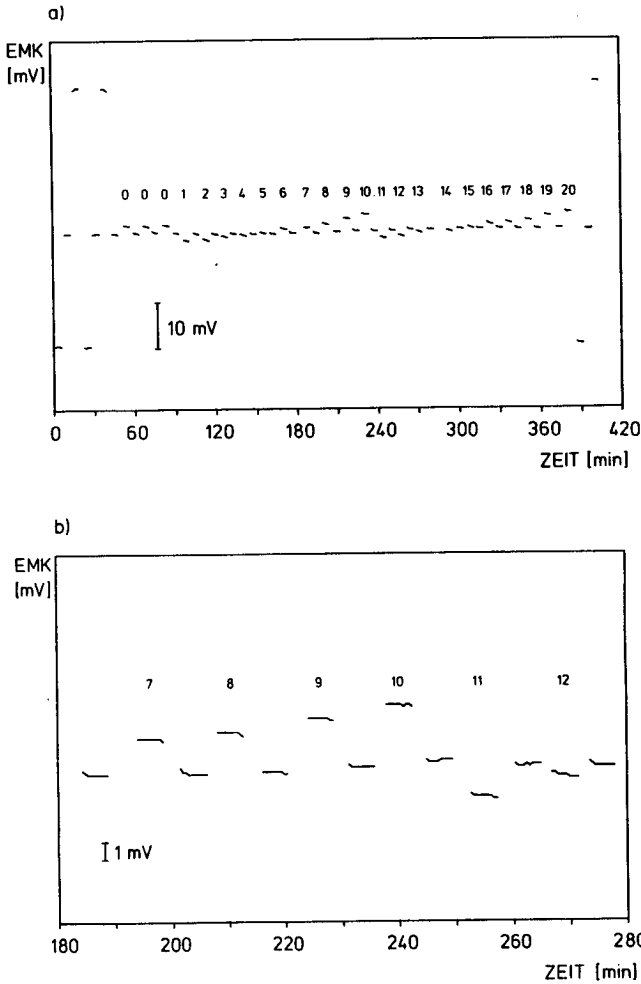
a) Als Chloride der entsprechenden Kationen

Um die gegenseitige Kontamination von Lösungen möglichst zu verhindern, wurde bei jedem Probewechsel der Messkanal mit kurzen, aufeinanderfolgenden Luft- bzw. Probesegmenten gespült. Die EMK-Messung erfolgte jedoch bei ruhender Probe. Insgesamt war für eine Bestimmung etwa 1 mL Eichlösung bzw. Serum notwendig.

5.3.2 EMK-Messungen und deren Auswertung

Es gelangten zwei Reihen von 20 Serumproben (S_1 bis S_{20}) nach dem soeben beschriebenen Verfahren zur Messung. Dabei wurde für jede Probe die EMK der einzelnen Na^+ -selektiven Messketten während 4.5 Minuten gemessen, wobei eine Registrierung der Werte alle 30 Sekunden erfolgte. Aus den letzten fünf EMK-Werten wurde jeweils der Mittelwert ($\text{EMK}(w_{i2})$ bzw. $\text{EMK}(S_n)$; vgl. Gl. 4.61) gebildet und zur Auswertung mit Hilfe von Gleichung (4.61) verwendet.

In Figur 5.1 ist der zeitliche EMK-Verlauf für die erste der beiden Messreihen dargestellt. Die Messung wurde mit Hilfe einer Minielektrode mit der Membran Na_3 durchgeführt. Obwohl auch Flüssigmembranen mit dem Liganden ETH 157 (Membran Na_1) im Serum eingesetzt werden (vgl. Tab. 3.2 und [222]), sind die Messungen auf Grund der geringeren Stabilität und Reproduzierbarkeit hier nicht aufgeführt worden (vgl. [224]). Figur 5.1 a) zeigt qualitativ eine sehr leichte, kontinuierliche Zunahme der EMK-Werte für die Eichlösung w_{Na_2} bei den wiederholten Zwischeneichungen. Dabei nahm die EMK ($\text{EMK}(w_{i2})$ in Gl. 4.61) während der ersten Messreihe kontinuierlich um 0.4 mV bzw. um 1.4 mV während der zweiten Messreihe zu (um <0.1 mV bzw. 0.4 mV nach dem ersten Serumkontakt (sogenannter E^0 -Shift; vgl. Gl. 4.5 und 4.8)). Die Streuung um den Mittelwert der $\text{EMK}(w_{\text{Na}_2})$ -Werte ($n = 26$) betrug ± 0.30 mV bzw. ± 0.41 mV. Die Steigung der Eichgeraden wurde nach diesen siebenstündigen Messungen ebenfalls leicht verändert: um +0.6 mV, bzw. um +0.8 mV. Wegen des engen physiologischen Na^+ -Bereiches im Serum und den damit verbundenen hohen Anforderungen an die EMK-Messgenauigkeit (vgl. 4.3.2) waren in diesem Fall Zwischeneichungen



Figur 5.1. Zeitlicher Verlauf der EMK der Minielektrodenmesskette mit Membran Na3 (a): erste Messreihe; b): Ausschnitt aus a)). Die Indizes n der Serumproben S_n sind bei den entsprechenden Spuren angegeben. Die übrigen Spuren entsprechen den wässrigen Eichlösungen (vgl. Tab. 5.4).

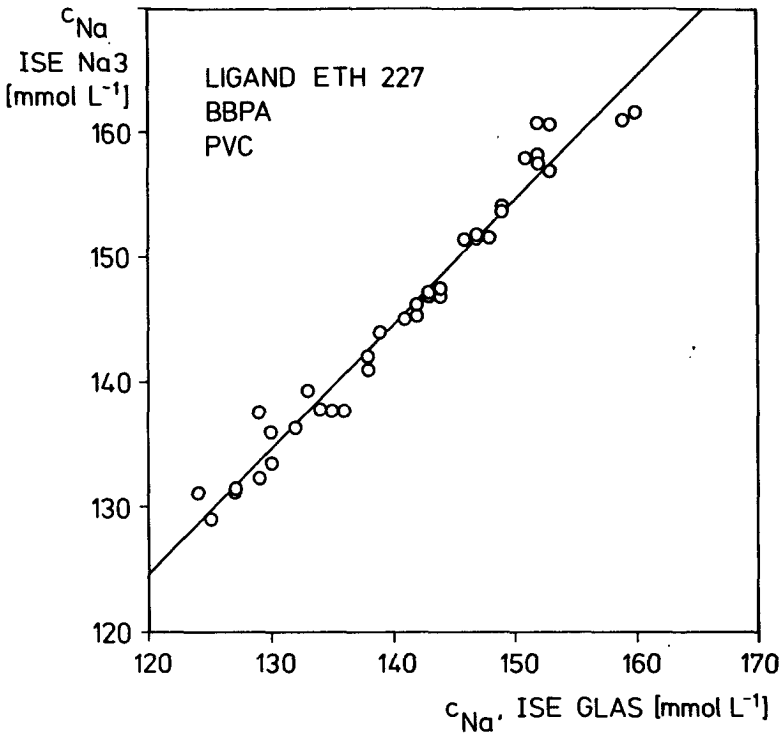
angezeigt, um die E_i^0 -Verschiebungen bei der Auswertung zu berücksichtigen.

Die Ansprechzeit der Minielektrodenmesskette und die EMK-Stabilität bei den Einzelproben können anhand von Figur 5.1 b) diskutiert werden. Aus dieser Darstellung werden für Messungen sowohl in der wässrigen Eichlösung W_{Na2} als auch in den Serumproben Ansprechzeiten $t_{0.1mV}$ kleiner als 30 Sekunden entnommen. Dies entspricht den an die Ansprechzeit einer Elektrodenmesskette für deren Einsatz in der klinisch-chemischen Routineanalytik gestellten Anforderungen (vgl. 4.3.3). Die EMK-Stabilität ist ebenfalls mit den erwähnten Anforderungen vereinbar (vgl. 4.3.2). Während den 4.5 Minuten Messdauer sind die Werte innerhalb eines Bereiches von 0.2 mV konstant geblieben. Die Unsicherheit des zur Auswertung verwendeten EMK-Mittelwertes der letzten zwei Minuten (5 Messwerte) ist jedoch $< \pm 0.05$ mV (Standardabweichung). Diese hohe Stabilität sollte genaue und reproduzierbare Na^+ -Bestimmungen in Serum erlauben.

5.3.3 Vergleich von potentiometrisch mit flammenphotometrisch ermittelten Natriumkonzentrationen

Die nach dem beschriebenen, direkten Messverfahren an 40 Serumproben erhaltenen Na^+ -Konzentrationen (2 Messreihen mit denselben 20 Seren) werden mit Resultaten von Routinebestimmungen verglichen, welche im medizinisch-chemischen Zentrallaboratorium des Universitätsspitals Zürich durchgeführt wurden.

Figur 5.2 zeigt die Korrelation mit Vergleichswerten, die ebenfalls direkt potentiometrisch erhalten wurden, allerdings fand dabei eine Glas-membranelektrode Verwendung (Gerät: Orion SS 30; vgl. Tab. 3.2). Die mit der Glaselektrode ermittelten Na^+ -Konzentrationen liegen erstaunlicherweise durchschnittlich 4.5 mmol L^{-1} tiefer als die mit Hilfe der Membran $Na3$ bestimmten Werte. Zudem ist die Streuung um die Korrelationsgerade

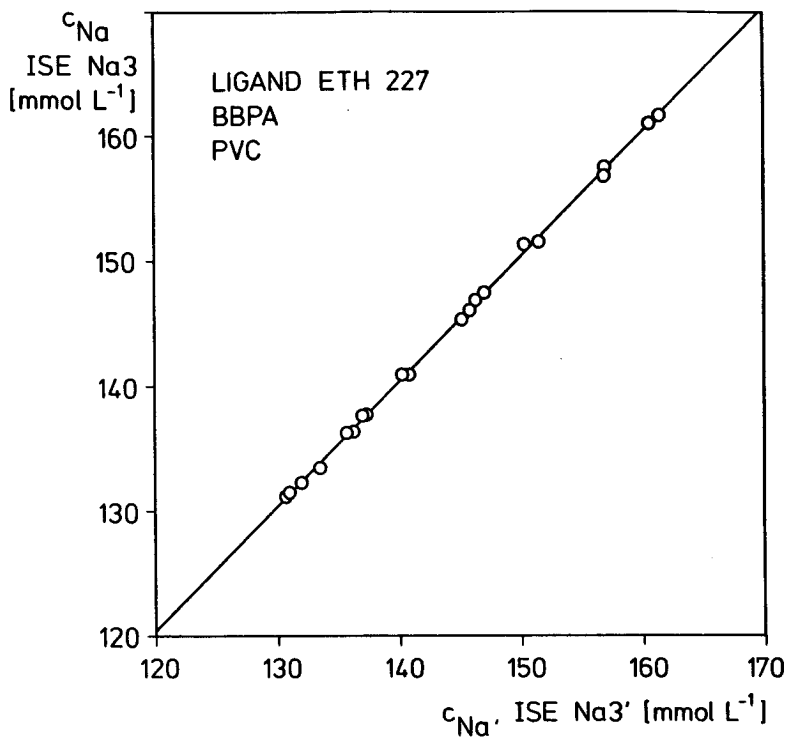


Figur 5.2. Korrelation von direkt potentiometrisch mit einer Flüssigmembranelektrode (ISE Na3) an 40 Serumproben ermittelten Na^+ -Konzentrationen mit direkt potentiometrisch mittels einer Glasmembranelektrode (ISE GLAS) erhaltenen Werten. Lineare Regression: $Y = (0.99 \pm 0.03) X + (5.36 \pm 3.97)$; Reststreuung von Y über X für den gegebenen Bereich: $\pm 1.4 \text{ mmol L}^{-1}$.

unbefriedigend. Diese überraschend grosse Abweichung der Resultate, welche mit derselben direkten Messmethodik erhalten wurden, stehen im Gegensatz zu der Korrelation von Figur 5.3. In dieser Darstellung sind Na^+ -Konzentrationen verglichen, welche mit zwei Flüssigmembranminielektroden (Membran Na3) bestimmt wurden. Die nahezu ideale Uebereinstimmung dieser Werte (durchschnittliche Abweichung: 0.3 mmol L^{-1} ; entspricht 0.05 mV) weist auf eine hervorragende Reproduzierbarkeit der mit dem angewandten Messverfahren in Serum ermittelten Na^+ -Konzentrationen hin, und widerspiegelt die für die Einzelproben gemessene hohe Stabilität (vgl. Fig. 5.1). Diese vernachlässigbaren Abweichungen stellen die Genauigkeit der mit der Glasmembranelektrode (Orion SS 30) ermittelten Na^+ -Konzentrationen in Frage. Unterschiedliche Eich- und Auswerteverfahren können sicher nur zum Teil die in gewissen Fällen beachtlichen Abweichungen zwischen den mittels der Flüssig- bzw. der Glasmembranelektrode ermittelten Werten erklären.

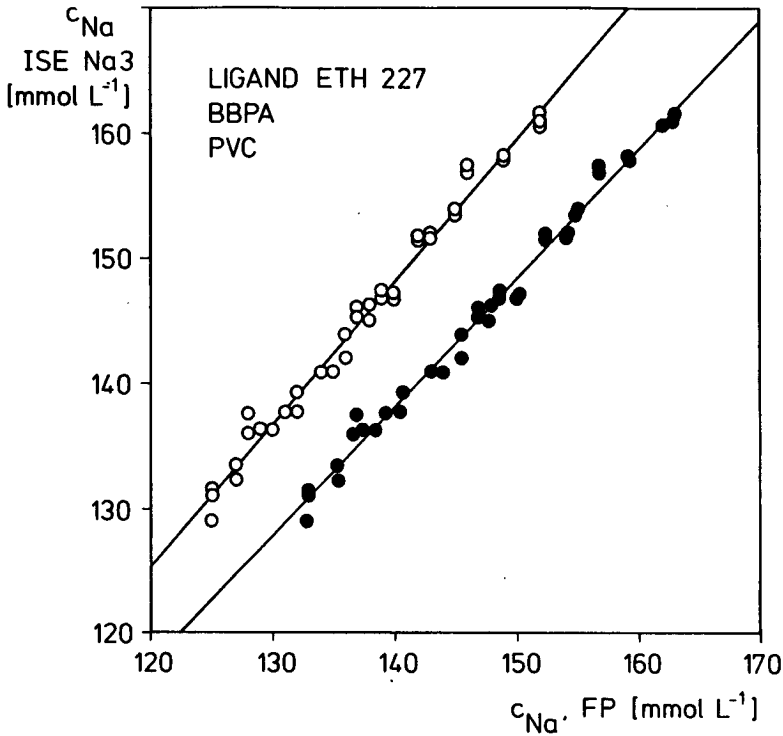
In Figur 5.4 sind die Resultate von direkten, potentiometrischen Messungen (Membran Na3) mit den indirekten, flammenphotometrischen Na^+ -Bestimmungen in denselben, aber verdünnten Serumproben verglichen. Die mit diesen zwei unabhängigen Techniken ermittelten, unkorrigierten Na^+ -Konzentrationswerte korrelieren in einem befriedigenden Mass (Regressionskoeffizient: $s_{yx} = 1.1 \text{ mmol L}^{-1}$). Die potentiometrisch erhaltenen Konzentrationen sind jedoch um $7.81 \pm 1.58 \text{ mmol L}^{-1}$ ($5.4 \pm 1.1 \%$) höher als die Vergleichswerte. Diese positive Verschiebung stimmt mit denjenigen, welche unter Verwendung von Na^+ -Glaselektroden bei ähnlichen Untersuchungen berichtet wurden [78, 89, 117-123, 127-129, 131, 133], überein. Die dort berichteten Abweichungen liegen zwischen 1 und 8 % mit einem Schwerpunkt bei etwa 3 %.

Korrekturen (vgl. 2.5) ergeben bei normaler Protein- und Lipidkonzentration eine positive Verschiebung von 6.8 %. Werden die flammenphotometrisch erhaltenen Werte bezüglich des freien Plasmawasservolumens korrigiert (vgl. Gl. 2.22 und 2.24; für jede hier gemessene Serumprobe wurden jeweils die Protein- und Lipidkonzentrationen bestimmt [224]), erhält man die untere Kurve in Figur 5.4. Die korrigierten Konzentrationswerte weichen um



Figur 5.3. Korrelation von potentiometrisch mit zwei Flüssigmembranelektroden (ISE Na3 bzw. ISE Na3') an 40 Serumproben ermittelten Na^+ -Konzentrationen.

Lineare Regression: $Y = (0.99 \pm 0.01) X + (1.17 \pm 0.95)$; Reststreuung von Y über X für den gegebenen Bereich: $\pm 0.3 \text{ mmol L}^{-1}$.



Figur 5.4. Korrelation von potentiometrisch (ISE Na3) an 40 Serumproben ermittelten Na^+ -Konzentrationen mit flammenphotometrisch (FP) erhaltenen Werten.

Lineare Regression der oberen Kurve (für Protein-Lipid-Volumen unkorrigierte Na^+ -Konzentrationen (O)): $Y = (1.13 \pm 0.02) X - (10.50 \pm 2.96)$; Reststreuung von Y über X für den gegebenen Bereich: $\pm 1.1 \text{ mmol L}^{-1}$.

Lineare Regression der unteren Kurve (für Protein-Lipid-Volumen korrigierte Na^+ -Konzentrationen (●)): $Y = (1.02 \pm 0.02) X - (5.15 \pm 2.51)$; Reststreuung von Y über X für den gegebenen Bereich: $\pm 1.0 \text{ mmol L}^{-1}$.

$1.7 \pm 1.1 \text{ mmol L}^{-1}$ ($1.2 \pm 0.7 \%$) von den potentiometrischen Bestimmungen ab. Solche übermässigen Korrekturen, die zu tiefen potentiometrischen Werten führen, sind schon oft beobachtet und diskutiert worden [78, 89, 120, 128, 129, 131, 323-328]. Zusätzlich zum Protein-Lipid-Volumen wurden weitere Einflüsse aufgeführt: die Bindung von Na^+ an Bicarbonat [128, 362], an Proteine [327, 329] und an unbekannte Substanzen [89, 96]; die Bindung von Wasser an Proteine [128, 340, 341]; Störungen an der Flüssigkeitsbrücke [328, 342-344]; das Eichverfahren und/oder die Auswertung [128, 129, 323, 328, 342, 343]. Diese zwei letzten Faktoren können jedoch mit grosser Sicherheit ausgeschlossen werden. Modellberechnungen mittels des Debye-Hückel- und dem Henderson-Formalismus sowie unter Anwendung der vorgeschlagenen Protein-Lipid-Volumenkorrektur zeigen, dass bei einer EMK-Differenz von 1 mV zwischen Probe und Eichlösung W_{Na2} die Vernachlässigung jeglicher Ionenstärke- und Flüssigkeitspotentialänderung zu einer Abweichung von weniger als 0.5 % in der Na^+ -Konzentration führt. Dies gilt ebenfalls bei der Verwendung von einem ungeeigneten Referenzelektrolyten wie z. B. von $140 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$.

Die Na^+ -selektive Minielektrode (Membran Na3) wurde ebenfalls erfolgreich bei der Bestimmung der Na^+ -Konzentration in Urin eingesetzt [32, 132, 224]. Dabei war wegen der unbedeutenden Protein- und Lipidmengen in Urin die Korrelation von den potentiometrisch mit den flammenphotometrisch erhaltenen Werten nahezu ideal (lineare Regression: $Y = (1.02 \pm 0.01) X - (1.77 \pm 1.85)$ [132]). Diese Flüssigmembran (Membran Na3, beruhend auf den Liganden ETH 227 und BBPA als PVC-Weichmacher) scheint somit in biologischen Flüssigkeiten universell zur direkten Na^+ -Bestimmung einsetzbar zu sein.

6. FLÜESSIGMEMBRANELEKTRODE ZUR BESTIMMUNG DER KALIUM-KONZENTRATION IM BLUTSERUM

6.1 Einleitung

Der heute in Membranelektroden am häufigsten eingesetzte neutrale Carrier ist ohne Zweifel das Antibiotikum Valinomycin (vgl. Tab. 3.2 und [28]). Obwohl die entsprechenden Membranen oft als K^+ -selektiv bezeichnet werden, bevorzugen sie unter den A-Kationen Rb^+ , was sich jedoch bei K^+ -Bestimmungen in biologischen Flüssigkeiten nicht störend auswirkt. Die erste Flüssigmembranelektrode beruhend auf Valinomycin wurde 1966 vorgeschlagen [15] und ersetzte vollständig die nicht zufriedenstellende K^+ -selektive Glasmembranelektrode [4, 345]. In der Folge wurden Verbesserungen und Änderungen der ursprünglichen Membran beschrieben, welche zu einem sehr verbreiteten und vielfältigen Einsatz dieser Kunststoffmembranen geführt haben (vgl. die Referenzen u. a. in [12, 28, 69]). Parallel zu dieser Entwicklung wurde versucht, den natürlichen Ionophoren Valinomycin durch synthetische Liganden zu ersetzen [346]. Membranen beruhend auf gewissen Kronenätherverbindungen [347-354] weisen tatsächlich eine nur wenig schlechtere K^+/Na^+ -Selektivität auf. Gegenwärtig liegen jedoch nur einige Messungen in Flüssigkeiten biologischer Herkunft vor [313, 352].

Flüssigmembranen beruhend auf Valinomycin mit DOS als PVC-Weichmacher wurden zur kontinuierlichen K^+ -Bestimmung im extrakorporalen Blutkreislauf beim Menschen während Operationen am offenen Herzen eingesetzt [137, 318] und sind auch in zahlreichen Analysatoren für die klinische Chemie zu finden (vgl. Tab. 3.2). Solche Membranen können jedoch wegen der Interferenz von lipophilen Anionen (vgl. 4.2.6) nicht für Messungen in nativem Urin verwendet werden [259]. Entsprechende Membranen mit Silikon-gummi als Matrix weisen keine derartige, störende Anioneninterferenz auf und werden sowohl zur diskreten als auch zur kontinuierlichen K^+ -Bestimmung im unverdünnten Urin eingesetzt [32, 226, 259]. Im folgenden wird

die Optimierung von Membranzusammensetzungen im Hinblick auf Messungen in Serum sowie in Urin und der Einsatz der Elektroden zur K^+ -Bestimmung im Blut beschrieben und diskutiert.

6.2 Optimierung der Membranzusammensetzung und der Elektrodenbauart

Obwohl eine K^+ -selektive Silikongummimembran, bei welcher eine ausgesprochen geringe Anioneninterferenz festgestellt wurde, bereits vorhanden war [226, 259], wurde erneut versucht, die Anioneninterferenz an PVC-Membranen zu vermindern bzw. zu eliminieren. Auf Grund von früheren Vorschlägen (Einsatz apolarer Weichmacher und Einbau von lipophilen Anionen in die Membran [257, 258]) wurde seinerzeit eine allerdings ungenügende Reduktion der Anioneninterferenz erreicht. Durch Erhöhung des PVC-Gehalts (von 30 Gew.-% auf 50 Gew.-% auf Kosten des Weichmacheranteils bei gleichbleibendem Valinomycinanteil) kann eine Verminderung der Extraktion von lipophilen Anionen aus dem Messgut erwartet werden. Dies traf allerdings nicht zu. Die Störung durch Anionen wurde im Gegenteil bei der Membran mit dem höchsten PVC-Anteil am ausgeprägtesten [224]. Andere Vorschläge, wie z. B. die Festkontaktierung der Membran mit der Ableit-elektrode, brachten ebenfalls keine wesentlichen Verbesserungen [355]. Die Unterdrückung der Abflachung der Elektrodenfunktion bei höheren Ionenaktivitäten (ab $a_{KSCN} > 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), scheint demnach bei PVC-Membranen beruhend auf Valinomycin kaum erreichbar zu sein.

Drei Membranen (vgl. Tab. 6.1) wurden im Hinblick auf Messungen im Serum charakterisiert. Wie aus Tabelle 6.1 hervorgeht, weist die apolare Silikongummimembran verglichen mit den PVC-Membranen einen hohen spezifischen elektrischen Widerstand auf. Erfahrungsgemäss führen Elektroden mit einem elektrischen Widerstand grösser etwa $10^9 \Omega$ bei gewissen Routinemess-einrichtungen zu Schwierigkeiten.

Tabelle 6.1. Zusammensetzung (in Gew.-%) und spezifischer Widerstand [Ω cm] von K^+ -selektiven Membranen (vgl. Fig. 4.2 und 4.3).

Membran	Ligand [Gew.-%]	Weichmacher [Gew.-%]	Matrix [Gew.-%]	Spezifischer Widerstand [Ω cm]
K1	1.3 Valinomycin	31.0 DOS	67.7 PVC	$9.8 \cdot 10^7$
K2	1.3 Valinomycin	30.4 BBPA	68.3 PVC	$3.2 \cdot 10^8$
K3	2.4 Valinomycin	-	85.3 Silopren 12.3 Vernetzer	$2.1 \cdot 10^{10}$

In Tabelle 6.2 sind Daten der Elektrodenfunktion der verschiedenen K^+ -selektiven Elektroden zusammengestellt. In Makroelektroden zeigen alle drei Membranen sehr ähnliche Eigenschaften und nahezu ideale Werte für die Steigung der Elektrodenfunktion. Ausser einer leicht verminderten Nachweisgrenze der Minielektrode, scheint die Elektrodenbauart im Falle der Silikongummimembran keinen wesentlichen Einfluss auf die Elektrodenfunktion zu haben. Auch die Selektivität der drei untersuchten Membranen sind vergleichbar und nahezu unabhängig von der Elektrodenbauart (vgl. Tab. 6.3). Im Hinblick auf K^+ -Bestimmungen in biologischen Flüssigkeiten ist besonders die K^+/Na^+ -Selektivität von Interesse. Die hier gemessenen K_{KJ}^{Pot} -Werte sind mit den gestellten minimal erforderlichen Selektivitäten für Messungen im Blut vereinbar (vgl. Tab. 4.6). Alle vier K^+ -selektiven Elektroden wurden demnach auf Grund ihrer Eigenschaften in wässrigen Lösungen für K^+ -Bestimmungen in Serum eingesetzt und weiter untersucht.

Tabelle 6.2. Eigenschaften der Elektrodenfunktion von K^+ -selektiven Elektroden^{a)}.

Membran	Elektroden- bauart ^{b)}	Steigung ^{c)} [mV]	Linearer Bereich ^{d)} (log a_K)	Nachweis- grenze ^{e)} (log a_K)
K1	Makro	59.8 ± 0.1	$-4.1 \div -1.0$	-5.3
K2	Makro	59.2 ± 0.1	$-4.1 \div -1.0$	-5.3
K3	Makro	59.4 ± 0.1	$-4.1 \div -1.0$	-5.7
	Mini	59.5 ± 0.2	$-4.1 \div -1.0$	-4.8

a) Innenableitelektrolyt: $4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KCl}$

b) Makro: Makroelektrode (vgl. 11.1)

Mini: Minielektrode (vgl. 11.2)

c) Standardabweichungen sind aufgeführt

d) Bereich der linearen Regression zur Ermittlung der Steigung s

e) vgl. [228]

Tabelle 6.3. Selektivitätsfaktoren von K^+ -selektiven Elektroden
(Methode der getrennten Lösungen, SSM; 0.1 mol L^{-1}
Chloridlösungen).

Membran	Elektroden- bauart	$\log K_{KJ}^{\text{Pot}} ; J^{Z+} = a)$				
		H^+	Li^+	Na^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}
K1	Makro	-4.2	-4.3	-4.0	-4.8	-4.6
K2	Makro	-4.1	-4.7	-3.7	-4.6	-4.8
K3	Makro	-4.3	-4.8	-3.8	-4.7	-4.9
	Mini	-4.4	-4.3	-4.0	-4.3	-4.2

a) Für weitere Störionen J vgl. [225]

6.3 Bestimmung der Kaliumkonzentration in Blutserum

6.3.1 Eich- und Messverfahren

Zur Bestimmung der K^+ -Konzentration in Blutserum wurde dasselbe Eich- und Messverfahren wie bei der Ermittlung der Na^+ -Konzentration angewandt (vgl. 5.3.1), wobei die Eichlösungen gemäss Tabelle 6.4 eingesetzt wurden. Die Messungen wurden mit allen vier K^+ -selektiven Elektroden diskontinuierlich in einzelnen Behältern ausgeführt. Um eine Kontamination der Probe zu verhindern, musste dabei auf $3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ als Brückenelektrolyt verzichtet werden. Aus diesem Grund wurde $3 \text{ mol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ eingesetzt.

Tabelle 6.4. Zusammensetzung der K^+ -Eichlösungen.

Eichlösung	Zusammensetzung ^{a)} [mmol L^{-1}]			
	K^+	Na^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}
w_{K1}	1.0	140.0	1.1	0.6
w_{K2}	4.0	140.0	1.1	0.6
w_{K3}	9.0	140.0	1.1	0.6

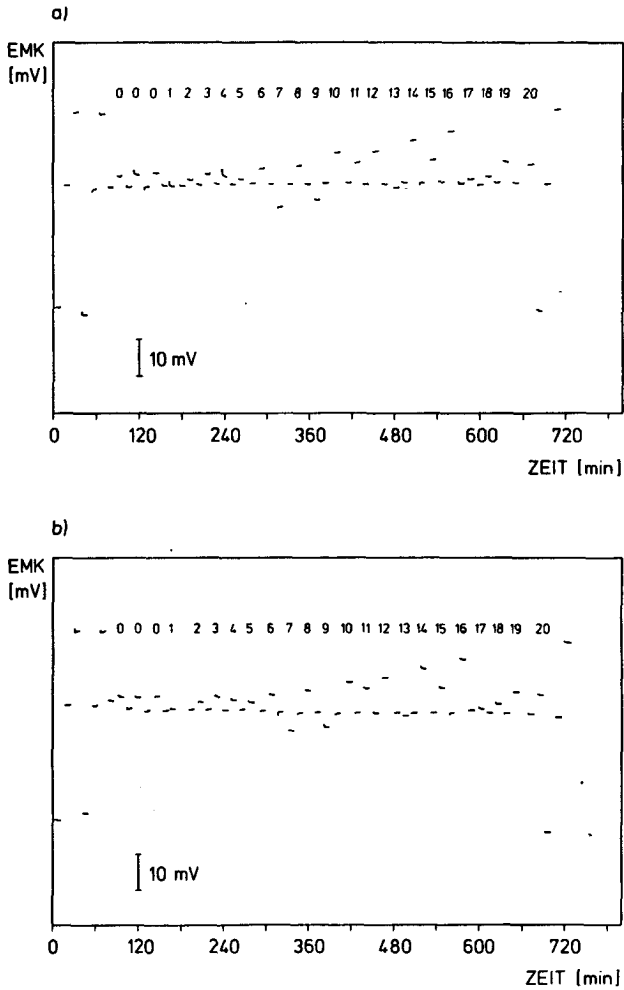
a) Als Chloride der entsprechenden Kationen

6.3.2 EMK-Messungen und deren Auswertung

Eine Reihe von 20 verschiedenen Serumproben (S_1 bis S_{20}) gelangte nach dem beschriebenen Verfahren zur Messung. Die EMK wurde in jeder Probe während 7 Minuten gemessen und die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Gleichung (4.61) (vgl. auch 5.3.2).

In Figur 6.1 sind die mit zwei K^+ -selektiven Elektroden (Makroelektrode mit Membran K2 bzw. Minielektrode mit Membran K3) gemessenen EMK-Werte als Funktion der Zeit dargestellt. Wie auf Grund des hohen elektrischen Widerstandes zu erwarten war, wies die Silikongummimembran eine etwas geringere EMK-Stabilität als die PVC-Membran K2 auf. Diese PVC-Membran zeigte denn auch die höhere Reproduzierbarkeit. Die Steigung der Elektrodenfunktion blieb vor bzw. nach dem Serumkontakt (etwa 10 Stunden) innerhalb von 0.1 mV konstant und die EMK für die Eichlösung W_{K2} veränderte sich in dieser Zeit um +0.5 mV. Bei der Silikongummimembranelektrode änderte die Steigung der Elektrodenfunktion um +0.2 mV und der EMK-Wert für die Lösung W_{K2} kontinuierlich um 2 mV. Vorgängig war unmittelbar nach dem ersten Serumkontakt eine E^0 -Verschiebung von 1 mV zu beobachten.

Ausser der leicht unterschiedlichen EMK-Stabilität ist das Ansprechverhalten der miniaturisierten Silikongummimembranelektrode (Membran K3) in etwa mit der PVC-Makroelektrode (Membran K2) vergleichbar. Die Ansprechzeiten $t_{0.1mV}$ liegen bei <30 Sekunden. Im Falle der Silikongummimembran K3 wurde eine Makroelektrode derselben Membranzusammensetzung untersucht, um den Einfluss der Bauart zu erfassen. Es stellte sich heraus, dass diese Makroelektrode eine etwa um den Faktor drei längere Ansprechzeit aufwies. Eventuelle Unregelmässigkeiten an der äusseren Oberfläche der Makroelektrodenmembran (vgl. 5.2, S.108) sowie eine unterschiedliche Geometrie der Membrananordnung (vgl. 11.1 und 11.2) könnten für diese Verlangsamung des Ansprechverhaltens verantwortlich sein. Da bei einer Makroelektrode nur ein Teil der Membran mit der Messprobe direkt in Kontakt steht, könnten durchaus leicht diffundierbare Spezies in den vom Messgut abgedeckten Membranteil diffundieren. Durch das Hinausdiffun-



Figur 6.1. Zeitlicher Verlauf der EMK der Makroelektrode mit Membran K2 (a)) bzw. der Minielektrode mit Membran K3 (b)).

Die Indizes n der Serumproben S_n sind bei den entsprechenden Spuren angegeben. Die übrigen Spuren entsprechen den wässrigen Eichlösungen (vgl. Tab. 5.4).

dieren dieser Teilchen bei einem Probewechsel kann sich das Ansprechverhalten verlangsamen. Bei einer Minielektrode ist die ganze Membran mit dem Messgut in Kontakt, weshalb dieses Phänomen dort nicht auftreten kann.

Unter den in Serum untersuchten K^+ -selektiven Elektroden zeigt die Membran mit BBPA als Weichmacher (Membran K2) in jeder Beziehung das beste Verhalten. Dabei wies die bereits routinemässig eingesetzte Membran K1 mit DOS als Weichmacher in jeder Hinsicht eindeutig die schlechtesten Eigenschaften auf. Besonders auffällig ist die Tatsache, dass für diese Membran K1 oft selbst nach 7 Minuten kein hinreichend stabiler EMK-Wert erreicht wurde.

6.3.3 Vergleich von potentiometrisch mit flammenphotometrisch ermittelten Kaliumkonzentrationen

Die mit den vier verschiedenen Elektroden erhaltenen K^+ -Konzentrationen (20 Serumproben) sollen nun mit den Ergebnissen von Routinebestimmungen korreliert werden. Die Vergleichsmessungen wurden mit einem IL 343-Flammenphotometer bzw. mit einem Orion SS 30-Gerät (direkte Potentiometrie mit einer auf Valinomycin beruhenden K^+ -selektiven Membran) im medizinisch-chemischen Zentrallaboratorium des Universitätsspitals Zürich (Dr. R. Asper) durchgeführt. Die Parameter der Korrelationsgeraden (Abszisse: Vergleichswerte) sind in Tabelle 6.5 zusammengefasst.

Die mittels Membran K1, K2, K3 ermittelten K^+ -Konzentrationen sollten mit den Werten, welche ebenfalls mittels direkter Potentiometrie, aber mit einem kommerziell erhältlichen Gerät bestimmt wurden (vgl. Kolonne 3 in Tab. 6.5), ideale Korrelationen ergeben. Wie dies auch für die Na^+ -Bestimmungen galt, trifft dieser erwartete Zusammenhang nicht zu. Unterschiedliche Mess- und Auswerteverfahren könnten die Konzentrationsabweichungen hervorrufen. Der Mittelwert der absoluten Differenzen zwischen

Tabelle 6.5. Korrelationen von potentiometrisch (Y), nach dem beschriebenen Verfahren an 20 Serumproben ermittelten K^+ -Konzentrationen mit Vergleichswerten (X).

Erste Angabe: Steigung der Korrelationsgeraden mit Standardabweichung [mV]; zweite Angabe: Reststreuung von Y über X [mmol L^{-1}]; dritte Angabe: Mittelwert der absoluten Differenzen zwischen den K^+ -Konzentrationen [mmol L^{-1}]

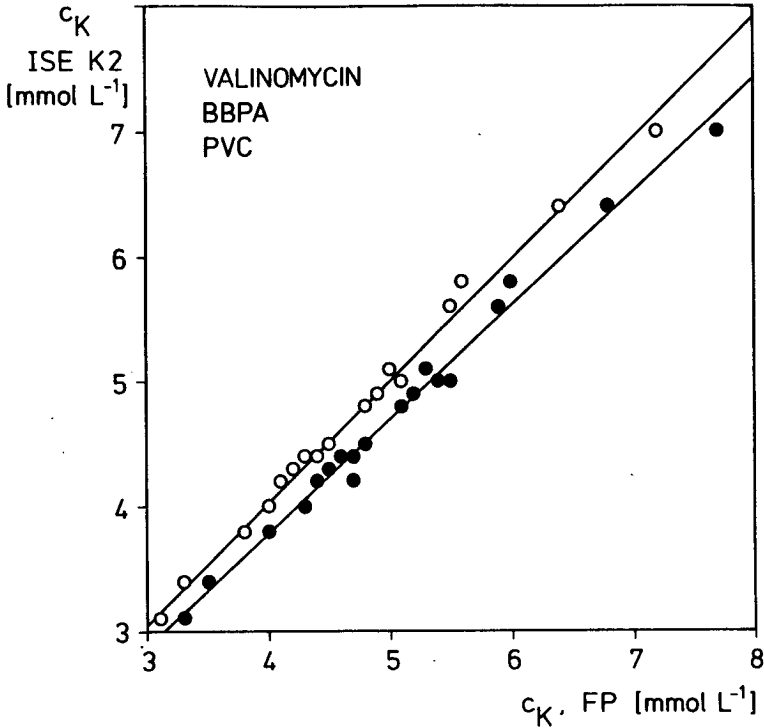
Membran	Elektroden- bauart	Vergleichsmethode		
		Potentiometrie direkt ^{a)}	Flammenphotometrie unkorrigiert	Flammenphotometrie korrigiert ^{b)}
K1	Makro	1.05 ± 0.05	1.07 ± 0.04	0.99 ± 0.04
		0.21	0.15	0.16
		0.25 (5.0 %)	0.30 (6.4 %)	0.11 (2.3 %)
K2	Makro	0.96 ± 0.03	0.97 ± 0.02	0.91 ± 0.02
		0.13	0.10	0.10
		0.08 (1.6 %)	0.06 (1.3 %)	0.30 (6.4 %)
K3	Makro	0.95 ± 0.03	0.96 ± 0.02	0.90 ± 0.02
		0.13	0.10	0.10
		0.11 (2.3 %)	0.08 (1.6 %)	0.37 (7.9 %)
K3	Mini	1.03 ± 0.03	1.05 ± 0.03	0.98 ± 0.02
		0.15	0.10	0.10
		0.10 (2.1 %)	0.10 (2.1 %)	0.21 (4.5 %)

a) Gerät: Orion SS 30

b) Für das freie Plasmawasser-Volumen korrigierte Werte (vgl. 2.5)

den mittels Membran K2 bestimmten Konzentrationen und den Vergleichswerten (0.08 mmol L^{-1}) ist jedoch mit der geforderten Messgenauigkeit (0.046 mV , entspricht $0.074 \text{ mmol L}^{-1}$; vgl. Tab. 4.7, 4. Kolonne) vereinbar. Die Korrelationsgeraden, welche mit den mittels der Silikongummimembran K3 ermittelten Konzentrationen und den Vergleichswerten (Orion SS 30) erhalten wurden, sind von der Elektrodenbauart abhängig. Die Reststreuung sowie die mittleren absoluten Konzentrationsdifferenzen sind allerdings in beiden Fällen (Membran K3, Makro- bzw. Minielektrode) etwa identisch, aber die Korrelationsgeraden weichen in entgegengesetzter Richtung von der idealen Funktion ab. Vergleicht man die Werte, welche mit Hilfe der Membran K2 bzw. K3 (beide in Makroelektroden) ermittelt wurden, erhält man jedoch eine nahezu optimale Übereinstimmung (Korrelationsgerade: $Y = (0.99 \pm 0.02) X + (0.00 \pm 0.01)$; Reststreuung: 0.07 mmol L^{-1}). Dies weist auf die hohe Reproduzierbarkeit der mit dem angewandten Messverfahren in Serum ermittelten K^+ -Konzentrationen hin.

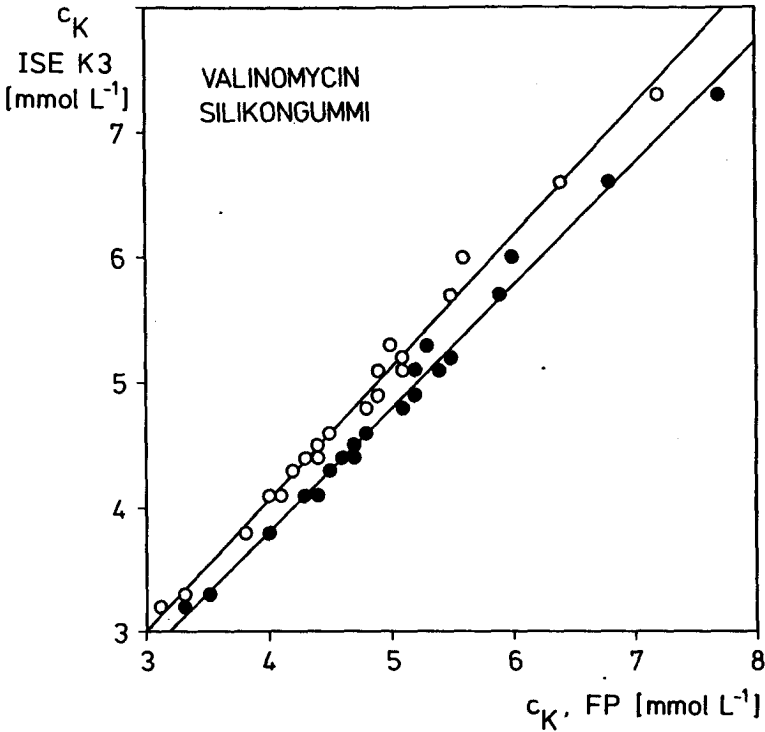
Im Vergleich der direkten Potentiometrie mit der indirekten Flammenphotometrie ist die Übereinstimmung der erhaltenen K^+ -Konzentrationen von der Zusammensetzung der ionenselektiven Membran abhängig (vgl. Tab. 6.5, 4. Kolonne). Die mittels Membran K2 ermittelten Konzentrationen ergeben mit den Vergleichswerten eine befriedigende Korrelation (vgl. Fig. 6.2). Dabei weichen die potentiometrisch von den flammenphotometrisch bestimmten Werten durchschnittlich um $+0.06 \text{ mmol L}^{-1}$ ($+1.3 \%$) ab. Eine etwas größere mittlere Abweichung wurde zwischen den mittels der Silikongummimembran K3 (Minielektrode) ermittelten K^+ -Konzentrationen und den Vergleichsdaten festgestellt ($+0.10 \text{ mmol L}^{-1}$ ($+2.1 \%$); vgl. Fig. 6.3). Verschiedene Untersuchungen über den Vergleich von direkt potentiometrisch mit flammenphotometrisch in Serumproben gemessenen K^+ -Konzentrationen haben entweder keine Verschiebung [117, 137, 356] oder eine positive Verschiebung zwischen 0.7% [129] und 4% [89] ergeben. Die Abweichungen der mittels Membran K2 bzw. K3 (Minielektrode) ermittelten Konzentrationen von den flammenphotometrisch erhaltenen Vergleichswerten liegen somit innerhalb des Bereiches der berichteten Differenzen. Im Gegensatz zu den bei Na^+ -Bestimmungen gefundenen Abweichungen (vgl. 2.5 und 5.3.3), sind die für K^+ -Konzentra-



Figur 6.2. Korrelation von potentiometrisch (ISE K2) an 20 Serumproben ermittelten K^+ -Konzentrationen mit flammenphotometrisch (FP) erhaltenen Werten.

Lineare Regression der oberen Kurve (für Protein-Lipid-Volumen unkorrigierte K^+ -Konzentrationen (○)): $Y = (0.97 \pm 0.02) X + (0.15 \pm 0.11)$; Reststreuung von Y über X für den gegebenen Bereich: $\pm 0.10 \text{ mmol L}^{-1}$.

Lineare Regression der unteren Kurve (für Protein-Lipid-Volumen korrigierte K^+ -Konzentrationen (●)): $Y = (0.91 \pm 0.02) X + (0.17 \pm 0.12)$; Reststreuung von Y über X für den gegebenen Bereich: $\pm 0.10 \text{ mmol L}^{-1}$.



Figur 6.3. Korrelation von potentiometrisch (ISE K3) an 20 Serumproben ermittelten K^+ -Konzentrationen mit flammenphotometrisch (FP) erhaltenen Werten.

Lineare Regression der oberen Kurve (für Protein-Lipid-Volumen unkorrigierte K^+ -Konzentrationen (○)): $Y = (1.05 \pm 0.02) X - (0.12 \pm 0.12)$; Reststreuung von Y über X für den gegebenen Bereich: $\pm 0.10 \text{ mmol L}^{-1}$.

Lineare Regression der unteren Kurve (für Protein-Lipid-Volumen korrigierte K^+ -Konzentrationen (●)): $Y = (0.98 \pm 0.02) X - (0.10 \pm 0.12)$; Reststreuung von Y über X für den gegebenen Bereich: $\pm 0.10 \text{ mmol L}^{-1}$.

tionen beobachteten Abweichungen von geringerer klinischen Bedeutung, da sie relativ zum physiologischen Bereich nahezu vernachlässigbar sind.

Werden die mittels Flammenphotometrie indirekt an verdünnten Serumproben bestimmten K^+ -Konzentrationen auf das freie Wasservolumen bezogen, erhält man mit den direkt potentiometrisch ermittelten Werten Korrelationen mit negativen Abweichungen (Membran K2: -6.4 %; Membran K3, Minielektrode: -4.5 %; vgl. Tab. 6.5, 5. Kolonne). Die Protein-Lipid-Volumenkorrektur beträgt durchschnittlich 6.8 % (vgl. 2.5) und wurde jeweils für jede Serumprobe gemäss ihrer gleichzeitig ermittelten Protein- bzw. Lipidkonzentrationen durchgeführt. Negative Abweichungen der potentiometrisch ermittelten K^+ -Konzentrationen könnten, ähnlich wie bei den Na^+ -Bestimmungen, u. a. auf eine K^+ -Bindung an Serumkomponenten zurückgeführt werden.

Die Silikongummimembran K3, die sich bereits früher bei Messungen in Urin bewährte [226, 259], kann nun als in Blut und Urin allgemein einsetzbar betrachtet werden. Sind jedoch ausschliesslich Messungen in Serum durchzuführen, ist eher die PVC-Membran K2 vorzuziehen.

7. FLÜESSIGMEMBRANELEKTRODE ZUR BESTIMMUNG VON VERSCHIEDENEN CALCIUMFRAKTIONEN IM BLUT

7.1 Einleitung

Die Entwicklung der Ca^{2+} -selektiven Elektroden wurde 1967 durch die Einführung eines Organophosphatsalzes als ionenselektive Komponente eingeleitet [8, 9]. Verschiedene Varianten dieser ursprünglichen Ionenaustauscherelektrode wurden später vorgeschlagen [357-360] und haben denn auch vorwiegend bis Ende der siebziger Jahre im klinisch-chemischen Bereich Einsatz gefunden [178, 361]. Natürliche, geladene Antibiotika, wie die Monocarbonsäuren X-537A und A23187, wurden ebenfalls als mögliche Ca^{2+} -Ionophore in Membranen eingesetzt [362, 363]. Keiner dieser beiden Liganden hat jedoch eine praktische Bedeutung in der Potentiometrie mit Flüssigmembranen erlangt.

Eine Klasse ionenselektiver Komponenten wurde 1972 durch den Entwurf von synthetischen, elektrisch neutralen Ca^{2+} -Ionophoren eingeführt [364, 365]. Ein Vertreter davon, der Carrier ETH 1001 (vgl. Fig. 4.2) eröffnete bereits drei Jahre später [366] neue Perspektiven im Bereich der selektiven Bestimmung der Ca^{2+} -Ionen in biologischen Flüssigkeiten. Optimierte Flüssigmembranen beruhend auf diesem Liganden werden inzwischen in den verschiedensten Arbeitskreisen der Medizin und der Physiologie eingesetzt [28, 178]. Sie werden wegen ihrer überlegenen Eigenschaften [28, 202, 219, 367-369] den Ionenaustauschermembranen vorgezogen. Obwohl anfänglich der Schwerpunkt der Anwendung von Flüssigmembranen beruhend auf dem synthetischen Carrier ETH 1001 bei extra- und intrazellulären Messungen mittels Mikroelektroden lag, bildet die Ca^{2+} -Bestimmung in Blut bzw. in Serum für die klinisch-chemische Routineanalytik ein ebenso wichtigen Einsatzbereich (vgl. Tab. 3.2). In der Folge wird das Vorliegen von verschiedenen Calciumfraktionen im Blut erläutert und deren quantitative Bestimmung mit Hilfe einer im Rahmen der vorliegenden Arbeit optimierten Flüssigmembranelektrode diskutiert.

7.2 Die verschiedenen Calciumfraktionen im Blutserum

Seit den entscheidenden Experimenten von McLean und Hastings [59, 80] ist bekannt, dass Calcium im Blutplasma bzw. im Blutserum in mehreren Formen vorliegt. Heute werden im allgemeinen drei Hauptfraktionen unterschieden:

- das an Proteine gebundene Calcium (~40 %),
- das in anderen Komplexen vorliegende Calcium (~10 %),
- das ionisierte bzw. freie Calcium (~50 %).

Die bezüglich des totalen Calciums im Plasma bzw. im Serum angegebenen Anteile sind nur Richtwerte, welche die Auswahl von Literaturdaten gemäss Tabelle 7.1 widerspiegeln. Das nicht an Proteine komplexgebundene und das ionisierte Calcium werden zusammen auch als diffusible oder ultrafiltrierbare Fraktion bezeichnet. Sie stehen im Gegensatz zum nicht diffusiblen, proteingebundenen Anteil.

Der grösste Teil des nicht ultrafiltrierbaren Calciums ist an Albumin gebunden (etwa 80 % [139]) und der Rest an Globuline, insbesondere an IgA [372, 373]. Das übrige, jedoch ultrafiltrierbare gebundene Calcium ist vor allem als Salz von Bicarbonat, Phosphat, Citrat, Sulfat und Lactat vorhanden [374]. Weiter wurde Bilirubin ebenfalls als Ca^{2+} -Komplexbildner erwähnt [375]. Obwohl dem gebundenen Calcium in der Regel keine physiologische Wirksamkeit zugeschrieben wird, sind auch andere Ansichten vertreten [373, 376, 377]. Das ionisierte Ca^{2+} wird dagegen einstimmig als die physiologisch aktive Fraktion erkannt. Trotzdem ist die Bestimmung des totalen Calciums im Serum in der medizinischen Diagnostik ein nützlicher Parameter [140, 141, 378].

Bei einer gegebenen totalen Calciumkonzentration im Serum ist der relative Anteil der gebundenen bzw. der ionisierten Form durch verschiedene physikalische und chemische Faktoren bestimmt. Neben dem Einfluss der Temperatur und der Proteinkonzentration ist in albuminhaltigen Ca^{2+} -Lösungen [185, 379-382] und im Serum [44, 80, 138, 139, 141, 142, 145,

Tabelle 7.1. Relative Referenzanteile (in %) der Calciumfraktionen im Blutplasma bzw. im Blutserum.

Calciumfraktion (%)	relative Verteilung (%) bezüglich des totalen Calciums							
	Plasma	Plasma	Plasma	Serum	Serum	Serum	Serum	
	[145]	[55]	[60]	[144]	[139]	[370]	[141]	[371]
proteingebunden	40	46.5	37.5	45	40.4	39.5	27-38	40
nicht an Proteine komplexgebunden	10	6.1	10.4	10	13.7	13.6	10-19	10
ionisiert	50	47.4	52.1	45	45.9	46.9	47-57	50
total [mmol L ⁻¹]	2.2-2.6	2.45	2.4		2.45	2.5	2.44	

383-394] vor allem der Effekt des pH-Wertes ausgiebig untersucht worden. Es wurde auch mehrmals von der Fettsäureabhängigkeit der Ca^{2+} -Bindung an Albumin berichtet [395-397]. Auf Grund solcher Untersuchungen wurden mehrere Algorithmen zur Berechnung der Konzentration des ionisierten Ca^{2+} im Serum vorgeschlagen. Ausgegangen wird dabei von der totalen Calciumkonzentration, der Proteinkonzentration und dem pH-Wert (vgl. die Uebersichten in [185-187]). Diese eher empirische Abschätzung ersetzt jedoch keinesfalls die direkte Ca^{2+} -Bestimmung [186, 187, 190, 398].

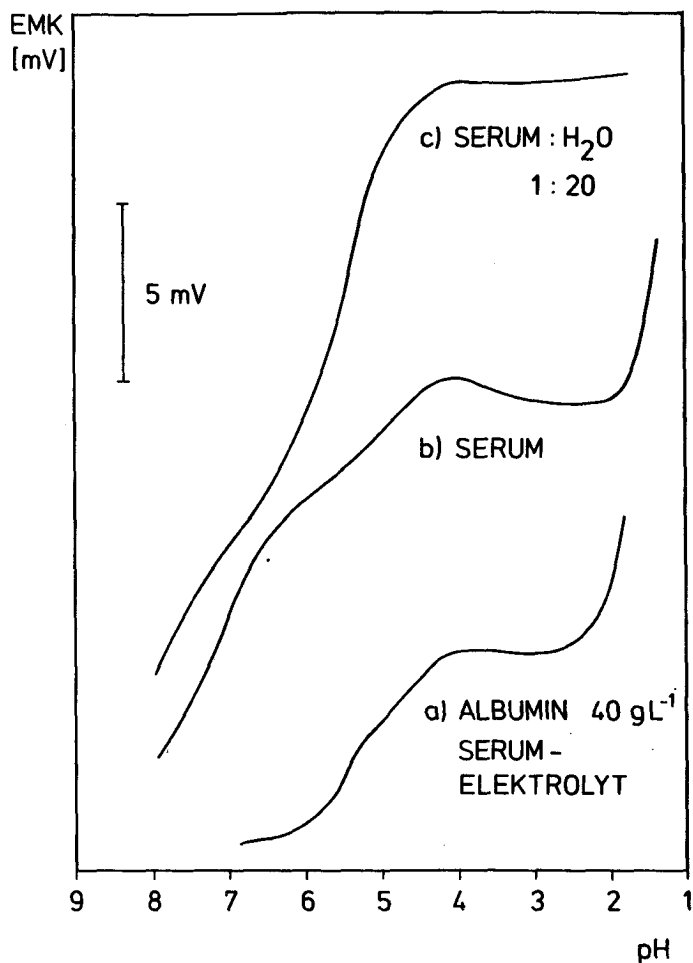
7.3 Flüssigmembranelektrode zur Bestimmung der Konzentration des totalen Calciums im Blutserum

7.3.1 Freisetzung des gebundenen Calciums

Es ist bekannt, dass die Erniedrigung des pH-Wertes vom Serum die Zunahme der Konzentration des ionisierten Ca^{2+} zur Folge hat (vgl. Zitate in 7.2). Dies lässt auf einen Ersatz von gebundenen Ca^{2+} -Ionen schliessen. Im Hinblick auf eine vollständige Freisetzung des gebundenen Calciums zur anschließenden Bestimmung der Konzentration des totalen Calciums als ionisches Ca^{2+} , wurden hinsichtlich eines Einsatzes von Ca^{2+} -selektiven Elektroden verschiedene Varianten des Ansäuerns von Serum untersucht.

In Figur 7.1 ist der EMK-Verlauf einer Ca^{2+} -selektiven Elektrodenmesskette in einer albuminhaltigen Elektrolytlösung (40 g L^{-1} Albumin, $2.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$, $140 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}^+$, $4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}^+$, $0.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$, Cl^- als Gegenion) bei schrittweiser Zugabe von konzentrierter Salzsäure dargestellt (vgl. Kurve a)). Als Ca^{2+} -selektive Elektrode wurde eine früher optimierte Flüssigmembranelektrode [399] (vgl. Membran Cal in Tab. 7.2) eingesetzt, welche unter anderem wegen ihrer relativ hohen $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Selektivität ausgewählt wurde. Bei dieser Untersuchung erwies sich die wässrige Elektrolytlösung mit gelöstem Albumin als brauchbares und nahezu ideales Serummodell. Das Ansäuern der Probe verursachte zwischen dem anfänglichen pH-Wert (etwa 7) und pH ~4 eine Zunahme der Ca^{2+} -Aktivität, was auf die Freisetzung des an Albumin gebundene Calciums zurückzuführen ist. Der EMK-Verlauf deutet auf eine vollständige Freisetzung des Calciums in Form von ionisiertem Ca^{2+} bei einem pH-Wert <4 hin. Der EMK-Anstieg unterhalb pH ~2.5 ist auf die Interferenz von H^+ -Ionen zurückzuführen.

Qualitativ etwa derselbe EMK-Verlauf wird beim Ansäuern einer unverdünnten Serumprobe erhalten (vgl. Fig. 7.1, Kurve b)). Bei einem pH-Wert der Probe <4 scheint auch in diesem Fall die totale Calciummenge in ionisierter Form vorzuliegen. Die Bestimmung der totalen Calciumkonzentration



Figur 7.1. EMK einer Ca²⁺-selektiven Flüssigmembranelektrode in verschiedenen Messproben bei Zugabe von konzentrierter Salzsäure. Die EMK-Werte sind korrigiert für Flüssigkeitspotentialänderungen der Referenzelektrode und für Ca²⁺-Aktivitätsänderungen (Änderung der Aktivitätskoeffizienten durch pH-Verschiebung und Volumenänderung).

mittels einer Ca^{2+} -selektiven Messkette ist dementsprechend prinzipiell möglich.

Im Hinblick auf ein Ansäuern der Serumprobe durch Zugabe einer pH-Pufferlösung wurde die Freisetzung des gebundenen Calciums in einer mit Wasser zwanzigfach verdünnten Serumprobe untersucht (vgl. Fig. 7.1, Kurve c)). Dabei wurde eine im Rahmen dieser Arbeit neu eingeführten Ca^{2+} -selektive Membran verwendet (vgl. Membran Ca3 in Tab. 7.2). Der Kurvenverlauf in Figur 7.1 c) ist mit denen der beiden vorangehenden Experimente (vgl. Kurve a) und b)) qualitativ ähnlich. Die vollständige Freisetzung des gebundenen Calciums bei einem pH-Wert der Probe <4 ist auch hier bestätigt.

Neben der beschriebenen Calciumfreisetzung durch H^{+} -Ionen wurde zusätzlich der Ersatz der gebundenen Ca^{2+} -Ionen durch Zn^{2+} -Ionen vorgeschlagen [69]. Durch Zugabe von ZnCl_2 zu albuminhaltigen Ca^{2+} -Lösungen bzw. zu Serum ist tatsächlich eine Zunahme der Konzentration des ionisierten Ca^{2+} beobachtet worden [401, 402]. Wegen praktischer Schwierigkeiten (u. a. Abhängigkeit der Löslichkeit von Zinksalzen vom pH-Wert der Lösung, Schaumbildung) wurde diese Methode jedoch nicht weiter verfolgt.

7.3.2 Optimierung des pH-Puffers

Die drei vorangehenden Experimente weisen eindeutig auf die prinzipiell möglich potentiometrische Bestimmung der totalen Calciumkonzentration im Serum bei einem pH-Wert <4 hin. Aus praktischen Gründen und im Hinblick auf eine eventuelle Automatisierung wurde die Verdünnung und Ansäuerung der Serumprobe mit einem pH-Puffer (pH-Wert ≈ 3.5) ausgeführt. An den Puffer (protonierte Form: HL) wurden folgende Anforderungen gestellt:

- Der pK-Wert (K: Dissoziationskonstante von HL) muss möglichst in der Nähe des gewünschten pH-Wertes liegen:

$$pK \approx 3.5$$

- Die eingeführten Anionen dürfen kaum Ca^{2+} -Komplexbildner sein:

$$pK_{CaL} < \sim 0$$

- Die Lipophilie [403, 404] der Komponenten muss gering sein:

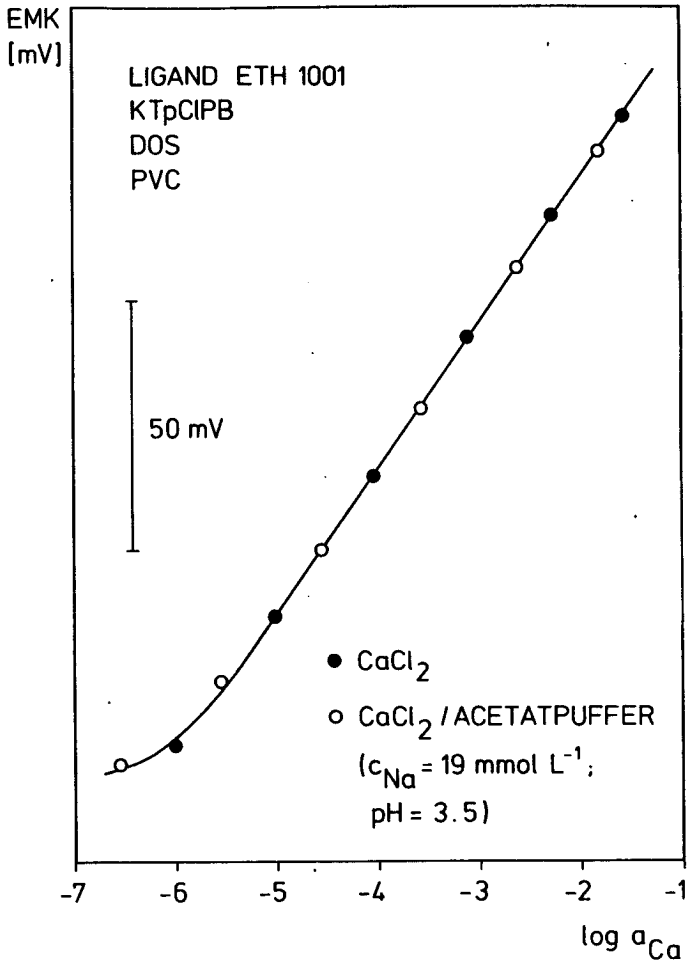
$$\log P(L) < \sim 0$$

- Die eingeführten Kationen dürfen die Ca^{2+} -Messung nicht stören.

Essigsäure, Furan-2carbonsäure, 4-Acetyl-pyridin und eine Reihe von halogenierten Essig- und Propionsäuren erfüllen in etwa die zwei ersten Anforderungen [405-407]. Wegen deren hohen Toxizität [408] wurden die halogenierten Carbonsäuren nicht weiter berücksichtigt. Auf Grund von elektromotorischen Untersuchungen (Elektrodenfunktion, Ansprechzeit, Reproduzierbarkeit) mit verschiedenen Ca^{2+} -selektiven Flüssigmembranelektroden wurde schliesslich ein Acetatpuffer mit folgender Zusammensetzung eindeutig bevorzugt:

0.382 mol L⁻¹ Essigsäure
 0.020 mol L⁻¹ Natriumhydroxid
 (pH 3.50)

Verglichen mit Messungen in reinen $CaCl_2$ -Lösungen (vgl. Fig. 7.2) erzeugt dieser Puffer keinen störenden Einfluss auf das Ansprechverhalten der eingesetzten Flüssigmembranelektroden (Membran Ca3 in Tab. 7.2). Die Steigung der in reinen $CaCl_2$ -Lösungen erhaltenen Elektrodenfunktion beträgt 28.8 ± 0.1 mV (Standardabweichung ist aufgeführt, $n = 5$; theoretische Steigung: 29.1 mV (20 °C)) im Ca^{2+} -Aktivitätsbereich $5 \cdot 10^{-6}$ bis 10^{-1} mol L⁻¹. Ca^{2+} -Lösungen, welche mit dem zwanzigfachen Volumen an Acetatpuffer verdünnt wurden, ergeben ebenfalls eine Steigung der Funktion von 28.8 ± 0.1 mV im selben a_{Ca} -Bereich. Die Nachweisgrenze liegt in beiden Fällen bei etwa $7 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹ Ca^{2+} . Durch die konstante Menge



Figur 7.2. Elektrodenfunktion einer Ca^{2+} -selektiven Durchflusselektrode (Membran Ca3).

von eingebrachtem Na^+ (20 mmol L^{-1}), wirkt die Acetatlösung bei der Verdünnung der Messprobe in einem gewissen Mass gleichzeitig als Ionenstärkepuffer, was ein zusätzlicher Vorteil im Hinblick auf Messungen in Serum darstellt.

7.3.3 Optimierung der Membranzusammensetzung zur Erfassung der Konzentration des totalen Calciums

Obwohl bei früheren Untersuchungen ein schlechteres Ansprechverhalten der Ca^{2+} -selektiven Membran mit Boratzusatz beobachtet wurde [399], gelangten solche Membranen hier nochmals zur Untersuchung. Im Hinblick auf kürzere Ansprechzeiten und längere Lebensdauer wurde aber ein apolarer Weichmacher (DOS, $\epsilon = 4.01$ (26°C) [409]) im Vergleich zum früher verwendeten polaren Lösungsmittel (o-NPOE, $\epsilon = 24.2$ (21°C) [410]) eingesetzt. Das apolare Lösungsmittel wurde ebenfalls bei Silikongummimembranen verwendet (Membran Ca4), obwohl eine solche Matrix an und für sich keinen Weichmacher benötigt. Die Zugabe von Membranlösungsmittel hatte jedoch u. a. eine signifikante Abnahme (etwa um ein Faktor 20) des elektrischen Membranwiderstandes zur Folge [411].

Die Elektrodenfunktion der vier ausgewählten Membranen weisen vergleichbare Eigenschaften auf (vgl. Tab. 7.3). Die Steigungen sind nahezu theoretisch (Abweichungen: $\pm 1 \text{ mV}$) und zeigen sehr geringe Standardabweichungen (0.1 mV). Die Verwendung von Ca^{2+} -ungepufferten Lösungen zur Messung dieser Funktionen ist für die Erfassung der wahren Nachweisgrenze ein limitierender Faktor. Es ist bekannt, dass die eigentliche Nachweisgrenze dieser Ca^{2+} -selektiven Flüssigmembranelektroden deutlich tiefer liegt [369].

Im Hinblick auf Messungen in angesäuerten Seren ($\text{pH } 3.5$) muss der $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Selektivität besondere Beachtung geschenkt werden. Auf Grund von Gleichung (4.55) wird ein maximaler Selektivitätskoeffizient von 100 ($\log K_{\text{CaH},\text{max}}^{\text{Pot}} = 2$) erfordert, um einen Fehler in der gemessenen Ca^{2+} -Aktivität von 1% nicht

Tabelle 7.2. Zusammensetzung (in Gew.-%) und spezifischer Widerstand [Ω cm] von Ca^{2+} -selektiven Membranen (vgl. Fig. 4.2 und 4.3).

Membran	Ligand [Gew.-%]	Zusatz [Gew.-%]	Weichmacher [Gew.-%]	Matrix [Gew.-%]	Spezifischer Widerstand [Ω cm]
Ca1	1.0 ETH 1001	-	65.8 o-NPOE	33.2 PVC	$1.9 \cdot 10^7$
Ca2	1.0 ETH 1001	0.7 KTpC1PB	65.3 o-NPOE	33.0 PVC	$2.4 \cdot 10^6$
Ca3	3.4 ETH 1001	2.0 KTpC1PB	62.9 DOS	31.7 PVC	$6.1 \cdot 10^7$
Ca4	4.7 ETH 1001	2.8 KTpC1PB	9.0 DOS	74.9 Silopren 8.6 Vernetzer	$1.2 \cdot 10^9$

zu überschreiten. Alle vier Ca^{2+} -selektiven Membranen erfüllen bei weitem diese Anforderung (vgl. Tab. 7.4). Diese Tatsache ist zusätzlich durch die Messungen in Figur 7.1 (Kurve a) und b): Membran Ca1; Kurve c): Membran Ca3) bestätigt, wonach die H^+ -Interferenz erst bei $\text{pH} < -2$ einsetzt. Dies steht eindeutig im Gegensatz zu Membranen beruhend auf organischen Phosphaten. Solche Membranen weisen $\log K_{\text{CaH}}^{\text{Pot}}$ -Werte von etwa 4 auf [219, 357, 360]. Sie sind demnach für Messungen in Lösungen mit einem pH-Wert < 4.9 ungeeignet [360]. Bezüglich den übrigen Kationen erfüllen die vier Ca^{2+} -selektiven Flüssigmembranelektroden ebenfalls die an die Selektivitäten gestellten Anforderungen. Der erwartete Selektivitätsverlust gegenüber Na^+ und K^+ bei der Membran Ca3 (apolarer Weichmacher) ist mit den gewünschten maximalen $K_{\text{CaJ}}^{\text{Pot}}$ -Werten noch vereinbar. Die $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ -Selektivität ist allerdings nahe der geforderten minimalen Bevorzugung ($\log K_{\text{CaNa,max}}^{\text{Pot}} = -3.2$), was jedoch bei geeigneter Eichung eine genaue Ca^{2+} -Bestimmung nicht in Frage stellt. Die leichte Abhängigkeit der Selektivitätswerte von der Bauart der Elektrode bei der Membran Ca3 ist

Tabelle 7.3. Eigenschaften der Elektrodenfunktion der Ca^{2+} -selektiven Elektroden^{a)}.

Membran	Elektroden- bauart ^{b)}	Steigung ^{c)} [mV]	Linearer Bereich ^{d)} (log a_{Ca})	Nachweis- grenze ^{e)} (log a_{Ca})
Ca1	Makro	29.5 ± 0.1	$-5.1 \div -1$	-6.0
Ca2	Makro	30.1 ± 0.1	$-5.1 \div -1$	-6.0
Ca3	Makro	30.1 ± 0.1	$-5.1 \div -1$	-6.1
	DF	28.8 ± 0.1	$-5.1 \div -1$	-6.2
Ca4	Makro	29.5 ± 0.1	$-5.1 \div -1$	-6.2

a) Innenableitelektrolyt: $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$

b) Makro: Makroelektrode (vgl. 11.1)

DF: Durchflusselektrode (vgl. 11.3)

c) Standardabweichungen sind aufgeführt

Theoretische Steigung bei 21°C : 29.2 mV

d) Bereich der linearen Regression zur Ermittlung der Steigung s

e) vgl. [228]

Tabelle 7.4. Selektivitätsfaktoren der Ca^{2+} -selektiven Elektroden
(Methode der getrennten Lösungen, SSM; 0.1 mol L^{-1}
Chloridlösungen).

Membran	Elektroden- bauart	$\log K_{\text{Ca}j}^{\text{Pot}}; j^{Z+} =$			
		H^+	Na^+	K^+	Mg^{2+}
Ca1	Makro	0.4	-4.0	-4.1	-4.6
Ca2	Makro	-1.9	-6.0	-5.8	-6.0
Ca3	Makro	-3.4	-3.5	-4.0	-6.5
	DF	-2.8	-3.4	-3.5	-4.1
Ca4	Makro	-4.1	-7.6	-6.9	-5.9

in diesem Zusammenhang ebenfalls vernachlässigbar. Erwähnenswert ist zudem die ausgesprochen hochselektive Silikongummimembran Ca4.

Auf Grund des Ansprechverhaltens der PVC-Flüssigmembranelektrode mit Membran Ca3 sowohl in albuminhaltigen Ca^{2+} -Lösungen als auch im Serum, wurde dieser Membrantyp weiter in Makroelektroden und Durchflusselektroden zur Bestimmung der totalen Calciumkonzentration in angesäuerten Seren eingesetzt.

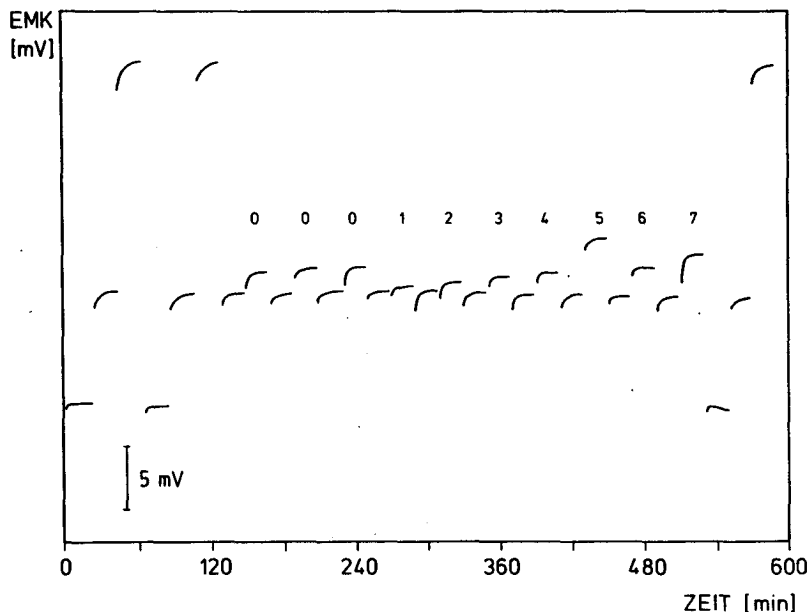
7.3.4 Potentiometrische Bestimmung der Konzentration des totalen Calciums im Blutserum

Ein Messverfahren in Analogie zur Bestimmung der Na^+ - bzw. K^+ -Konzentration in unverdünnten Serumproben (vgl. 5.3.1 und 6.3.1) wurde hier angewandt. Die Eichlösungen (vgl. Tab. 7.5) sowie die Serumproben wurden jedoch zuvor mit dem zwanzigfachen Volumen an Acetatpuffer (vgl. Zusammensetzung in 7.3.2) verdünnt. Der pH-Wert der so behandelten Messlösungen war sehr reproduzierbar ($\overline{\text{pH}} = 3.53 \pm 0.01$, $n = 30$ Serumproben). Nach der Bestimmung der Steigung der Elektrodenfunktion wurde die verdünnte Eichlösung $w_{\text{Ca}2}$ vor jeder Serumprobe gemessen (38 Serumproben wurden in 3 solche Messreihen aufgeteilt). Die Auswertung der EMK-Endwerte, welche bei den Durchflusselektroden 10 Minuten bzw. bei den Makroelektroden 20 Minuten nach dem Probekontakt ermittelt wurden, erfolgte mit Hilfe von Gleichung (4.61). Die Ansprechzeiten waren allerdings wesentlich kürzer ($t_{0,1\text{mV}} < 60$ Sekunden; vgl. Fig. 7.3). Um eine Kontamination der Messlösungen im Durchflusselektrodensystem zu verhindern, wurden die

Tabelle 7.5. Zusammensetzung der Ca^{2+} -Eichlösungen.

Eichlösung	Zusammensetzung ^{a)} [mmol L ⁻¹]			
	Ca^{2+}	Na^+	K^+	Mg^{2+}
$w_{\text{Ca}1}$	1.0	140.0	4.0	0.6
$w_{\text{Ca}2}$	2.0	140.0	4.0	0.6
$w_{\text{Ca}3}$	9.0	140.0	4.0	0.6

a) Als Chloride der entsprechenden Kationen



Figur 7.3. Zeitlicher Verlauf der EMK einer Makroelektrode mit Membran Ca3.

Die Indizes n der Serumproben S_n sind bei den entsprechenden Spuren angegeben. Die übrigen Spuren entsprechen den Eichlösungen.

Proben bei jedem Wechsel jeweils durch 10 Luftsegmente getrennt. Bei den Makroelektroden wurde der Elektrodenschaft beim Probewechsel abgetrocknet.

In Figur 7.3 ist der zeitliche EMK-Verlauf der Ca^{2+} -selektiven Makroelektrode (Membran Ca3) für die erste Messreihe dargestellt. Während der drei Messreihen war die EMK der Messkette in der Eichlösung extrem stabil (Streuung von den $\text{EMK}(w_{\text{Ca}^{2+}})$ -Werten um den Mittelwert: $\pm 0.11 \text{ mV}$; Drift

der EMK($W_{Ca^{2+}}$)-Werte: $<0.05 \text{ mV h}^{-1}$). Diese hohe Reproduzierbarkeit widerspiegelt sich ebenfalls in der vernachlässigbaren Verschiebung der EMK($W_{Ca^{2+}}$)-Werte nach dem ersten Serumkontakt (sogenannter E^0 -Shift: $<0.1 \text{ mV}$). Die Messung in der verdünnten, angesäuerten Blutflüssigkeit hatte ebenfalls keinen störenden Einfluss auf die Elektrodenfunktion, deren Steigung während aller drei Experimente lediglich um $<0.1 \text{ mV}$ variierte. Die Selektivität der Membran Ca^{2+} war ebenfalls nur geringfügig durch die Messung im Serum beeinflusst. Unmittelbar nach der ersten Messreihe bestimmte $\log K_{Ca^{2+}}^{Pot}$ -Werte haben Abweichungen von <0.1 gegenüber anfänglich ermittelten Selektivitätskoeffizienten ergeben. Die EMK-Stabilitäts- und Reproduzierbarkeitsanforderungen (vgl. 4.3.2) sind im Hinblick auf genaue und reproduzierbare Calciumbestimmungen weitaus erfüllt. Dies trifft ebenfalls für die Flüssigmembranelektroden (Membran Ca^{2+}) im Durchflusssystem zu. Die Leistungen dieser Messeinrichtung werden im Kapitel 7.4 ausführlich diskutiert.

7.3.5 Vergleich von potentiometrisch, colorimetrisch und atomspektrometrisch ermittelten Calciumkonzentrationen

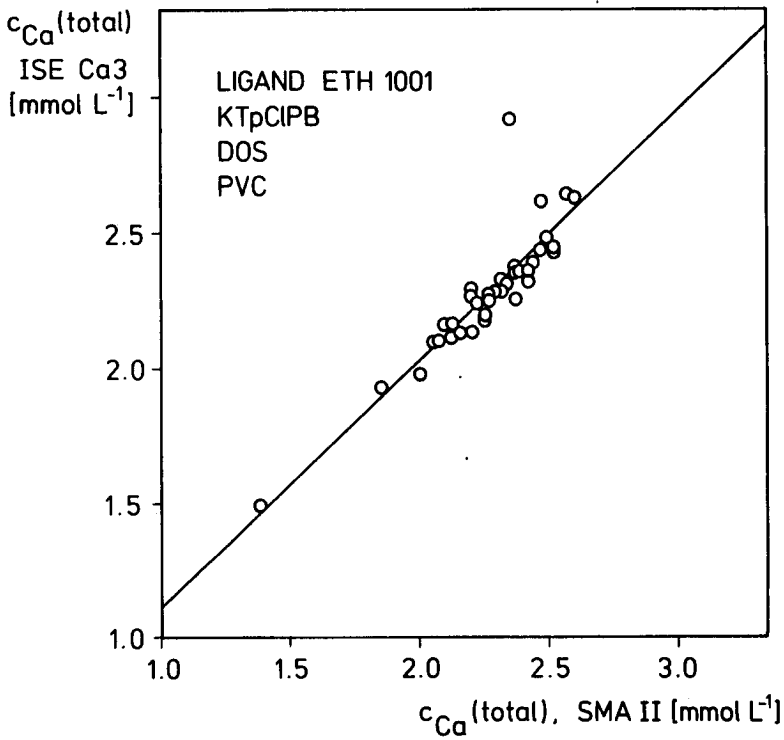
Die Konzentration des totalen Calciums wurde mit Hilfe der optimierten Ca^{2+} -selektiven Membran Ca^{2+} in 38 Serumproben nach dem beschriebenen Messverfahren bestimmt. Diese Werte wurden mit den colorimetrisch (SMA II, Technicon Instruments [151, 153, 219]) und mit den atomspektrometrisch (Elektrolytautomat FL6, Carl Zeiss [219]) erhaltenen Calciumkonzentrationen verglichen (vgl. Tab. 7.6 und [219] für die Einzelwerte).

In Figur 7.4 ist die Korrelation von den potentiometrisch (Durchflusselektrode) mit den colorimetrisch bestimmten Calciumkonzentrationen dargestellt. Dabei sind relativ grosse Abweichungen (bis zu 0.55 mmol L^{-1} ; entspricht etwa dem physiologischen Bereich) festzustellen, die von der Elektrodenbauart unabhängig sind (vgl. Reststreuung in Tab. 7.6, 1. und 3. Zeile). Wesentlich bessere Korrelationen werden mit den atomspektro-

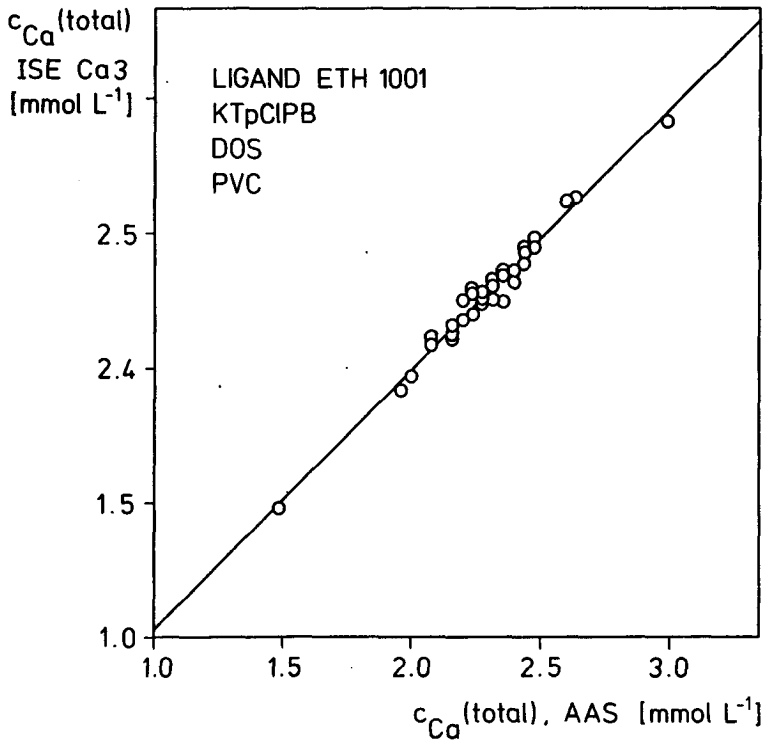
Tabelle 7.6. Korrelation von Konzentrationen des totalen Calciums in Serumproben, welche mit verschiedenen Methoden bestimmt wurden.

Methode ^{a)}	Regressionsgerade	Reststreuung [mmol L ⁻¹]
Potentiometrie (DF: Y) vs. Colorimetrie (SMA II: X)	$Y = (0.93 \pm 0.08) X$ $+ (0.18 \pm 0.19)$	± 0.11 (n = 38)
Potentiometrie (DF: Y) vs. Atomabsorptionsspektrometrie (X)	$Y = (0.96 \pm 0.03) X$ $+ (0.08 \pm 0.06)$	± 0.04 (n = 37)
Potentiometrie (Makro: Y) vs. Colorimetrie (SMA II: X)	$Y = (0.96 \pm 0.02) X$ $+ (0.10 \pm 0.42)$	± 0.15 (n = 22)
Potentiometrie (Makro: Y) vs. Atomabsorptionsspektrometrie (X)	$Y = (0.97 \pm 0.03) X$ $+ (0.02 \pm 0.08)$	± 0.04 (n = 22)
Atomabsorptionsspektrometrie (Y) vs. Colorimetrie (SMA II: Y)	$Y = (0.93 \pm 0.09) X$ $+ (0.19 \pm 0.21)$	± 0.12 (n = 37)
Potentiometrie (DF: Y) vs. Potentiometrie (DF: X)	$Y = (0.99 \pm 0.01) X$ $+ (0.03 \pm 0.03)$	± 0.02 (n = 38)
Potentiometrie (DF: Y) vs. Potentiometrie (Makro: X)	$Y = (0.97 \pm 0.00) X$ $+ (0.08 \pm 0.01)$	± 0.02 (n = 22)

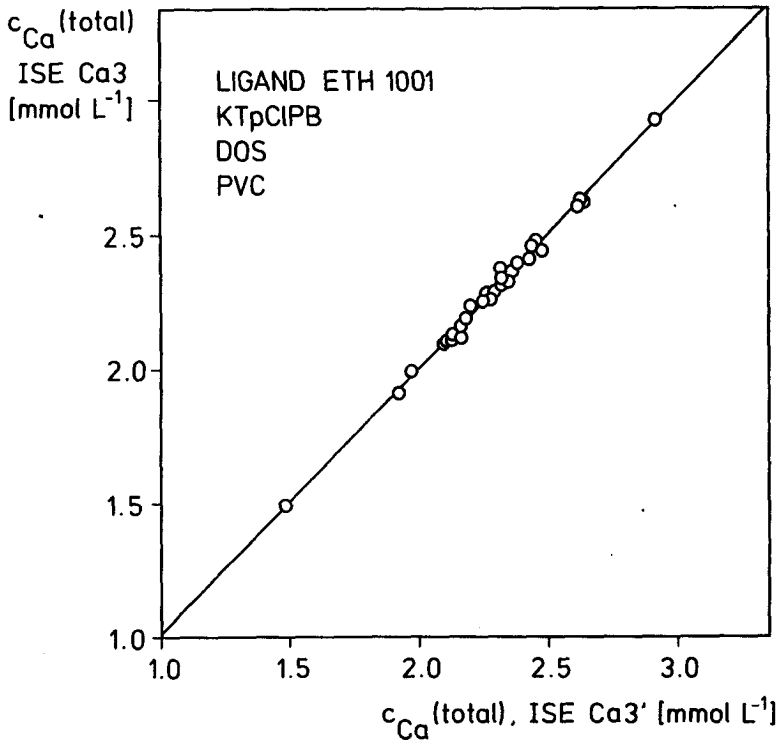
a) DF: Durchflusselektrode (Membran Ca3)
Makro: Makroelektrode (Membran Ca3)



Figur 7.4. Korrelation von potentiometrisch (ISE: Durchflusselektrode; Membran Ca3) an 38 Serumproben ermittelten totalen Calciumkonzentrationen mit colorimetrisch (SMA II) erhaltenen Werten (vgl. Tab. 7.6, 1. Zeile).



Figur 7.5. Korrelation von potentiometrisch (ISE: Durchflusselektrode; Membran Ca3) an 37 Serumproben ermittelten totalen Calciumkonzentrationen mit atomspektrometrisch (AAS) erhaltenen Werten (vgl. Tab. 7.6, 2. Zeile).



Figur 7.6. Korrelation von potentiometrisch mittels zwei Durchflusselektroden (ISE und ISE'; Membran Ca3) an 38 Serumproben ermittelten totalen Calciumkonzentrationen (vgl. Tab. 7.6, 6. Zeile).

metrischen Vergleichswerten erhalten (vgl. Tab. 7.6, 2. und 4. Zeile, sowie Fig. 7.5 für die Durchflusselektrode). Die Abweichungen der Einzelwerte sind $<0.1 \text{ mmol L}^{-1}$, was sich in den sehr kleinen Reststreuungen widerspiegelt (für beide Elektrodenbauarten $\pm 0.04 \text{ mmol L}^{-1}$). Der Vergleich der atomspektrometrisch mit den colorimetrisch erhaltenen Konzentrationen (vgl. Tab. 7.6, 5. Zeile) zeigt, dass in der klinischen Chemie eingesetzte Routinebestimmungsmethoden zu Probleme führen können (Abweichungen bis zu 0.65 mmol L^{-1} ; Reststreuung: $\pm 0.12 \text{ mmol L}^{-1}$). Die nahezu identischen Korrelationen von den potentiometrischen mit den colorimetrischen (vgl. Tab. 7.6, 1. und 3. Zeile) bzw. von den atomspektrometrischen mit den colorimetrischen Bestimmungen (vgl. Tab. 7.6, 5. Zeile) weisen eindeutig darauf hin, dass die Colorimetrie für die zum Teil beachtlichen und unzulässigen Abweichungen verantwortlich ist. Interferenzen von körpereigenen Komponenten als auch von gewissen Medikamenten sind tatsächlich bei dieser colorimetrischen Methode beobachtet worden [140, 144].

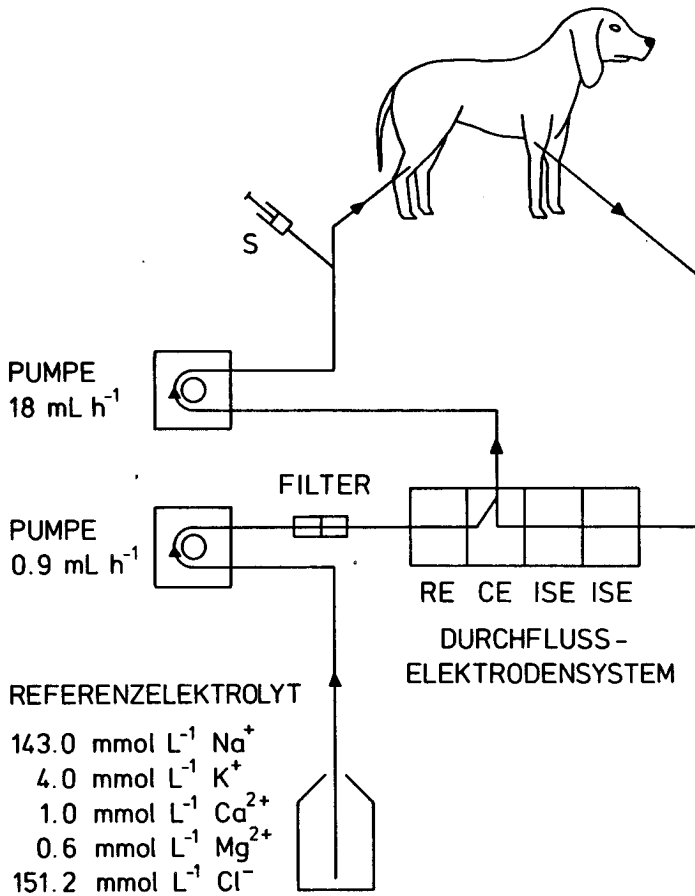
Im Gegensatz zu dem Vergleich zwischen den mittels den beiden Routinemethoden erhaltenen Werten stehen die nahezu idealen Korrelationen von den potentiometrisch unabhängig ermittelten Konzentrationen (vgl. Fig. 7.6, sowie Tab. 7.6, 6. bzw. 7. Zeile). Der angewandte, einfache und leicht automatisierbare Messvorgang führt im Vergleich zur Atomabsorptionsspektrometrie sowohl mit Durchflusselektroden als auch mit Makroelektroden zu hoch reproduzierbaren Werten (vgl. Reststreuungen) und zu genauen Bestimmungen.

7.4 Flüssigmembranelektrode zur kontinuierlichen in situ Bestimmung der Konzentration bzw. der Aktivität des ionisierten Calciums im Blut

7.4.1 Referenzelektrolyt für Messungen im extrakorporalen Blutkreislauf

Die Kontamination der Probe durch Membrankomponenten wurde im Zusammenhang mit potentiometrischen in vivo und in situ Bestimmungen bereits diskutiert (vgl. 4.3.6). Wird bei solchen Messungen eine Referenzelektrode mit offener Flüssigkeitsbrücke eingesetzt, muss ebenfalls die toxische Wirkung der ausfliessenden Referenzlösung in Betracht gezogen werden. Dabei kann die Verwendung des für in vitro Bestimmungen breit eingesetzten und nahezu idealen (vgl. 4.1.4) Referenzelektrolyten bestehend aus $3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ bei Messungen an lebenden Tieren in gewissen Fällen zu Schwierigkeiten führen. Bei einer Flussrate von 0.9 mL h^{-1} ($3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$) in den Blutkreislauf (vgl. Fig. 7.7) eines mittelschweren Hundes der Rasse Beagle (etwa 7 kg) verdoppelt sich innert 30 Minuten die K^{+} -Konzentration im Blut, wobei eine homogene Verteilung der Referenzlösung ausschliesslich in der Blutflüssigkeit angenommen wird. Eine solche Aufkonzentrierung wäre physiologisch nicht tragbar. Aus diesem Grunde wurde im Hinblick auf Messungen im extrakorporalen Blutkreislauf beim lebenden Hund eine isotonische Elektrolytlösung als Referenzlösung gewählt, deren Zusammensetzung ($143.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}^{+}$, $4.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}^{+}$, $1.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$, $0.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$, $151.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Cl}^{-}$) der des Hundeserums entsprach [412, 413].

Wären Eichlösungen zur Bestimmung der Ca^{2+} -Aktivität vorhanden, so müssten jeweils Unsicherheiten in der EMK (Digitalisierung und schwankende Stabilität der EMK), Änderungen des Flüssigkeitspotentials E_j und Interferenzen durch Störionen als Fehlerquellen berücksichtigt werden. Variiert die Ca^{2+} -Aktivität der Probe zwischen den Grenzen des physiologischen



Figur 7.7. Schema des extrakorporalen Blutkreislaufes.

S: Spritze zur Blutentnahme und zur Verabreichung von Pharmazeutika

RE: Referenzelektrode

CE: Commonelektrode

ISE: Ionenselektive Elektrode

Bereiches (bei konstanter Na^+ -Konzentration von 143 mmol L^{-1}), so schwankt das Flüssigkeitspotential an der Referenzelektrode um etwa 0.05 mV (entspricht etwa $0.0015 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$) beim Einsatz isotonischer NaCl -Referenzlösung. Bei einer Na^+ -Konzentration in der Probe von 143 mmol L^{-1} liegt die durch die Selektivität der Membran (Membran Ca3) gegebene Ioneninterferenz um $<1 \%$ (entspricht $<0.004 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$) von der Ca^{2+} -Aktivität (vgl. $K_{\text{CaJ}}^{\text{Pot}}$ -Werte in Tab. 7.4). Nimmt man eine EMK-Unsicherheit von $\pm 0.1 \text{ mV}$ an, entspricht dies einer Ungenauigkeit von $\pm 0.0034 \log a_{\text{Ca}^{2+}}$ ($\pm 0.003 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ für eine typische Ca^{2+} -Aktivität von 0.37 mmol L^{-1}). Dieser Beitrag ist hier sicher der Bedeutendste, da er bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden kann. Es resultiert daher eine Ungenauigkeit in der ermittelten Ca^{2+} -Aktivität von $0.003 \text{ mmol L}^{-1}$ (entspricht etwa 4% des physiologischen Aktivitätsbereiches). Diese Ungenauigkeit ermöglicht jedoch immer noch eine zwanzigfache Unterteilung des physiologischen Referenzbereiches der Ca^{2+} -Aktivität und ist dementsprechend mit den gestellten Anforderungen durchaus vereinbar (vgl. 4.3.2).

Da keine Eichlösungen für die Ca^{2+} -Aktivität vorhanden sind, wird eine Eichung der Elektrodenmesskette mittels Lösungen mit isotonischem Ionenhintergrund ($143.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$, $4.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KCl}$ und $0.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ MgCl}_2$, vgl. 7.4.2) ausgeführt, für welche die Ca^{2+} -Aktivität abgeschätzt werden kann (vgl. 4.1.3). Dies erfordert allerdings, dass sowohl die Konzentration als auch gewisse elektrochemischen Eigenschaften aller ionischen Komponenten der Probe bekannt sind (vgl. 4.1.3 und [69]). Haben die Eichlösungen und die Probe gleiche Ca^{2+} -Konzentration (z. B. 1.1 mmol L^{-1}) aber verschiedene Na^+ -Konzentrationen, z. B. 143 bzw. 148 mmol L^{-1} , folgt daraus ein lediglich von der Referenzlösung abhängiger Fehler in der ermittelten Ca^{2+} -Aktivität (vgl. Fig. 7.8). Eine solche Erhöhung der Na^+ -Konzentration führt zu einer Flüssigkeitspotentialänderung ΔE_j von -0.03 mV bzw. -0.17 mV für $3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ bzw. $143 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$ als Referenzelektrolyt. Die entsprechenden Aktivitätsabweichungen $\Delta \log a_{\text{Ca}^{2+}}$ liegen bei 0.0012 ($0.001 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$) bzw. 0.0065 ($0.006 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$), falls auf der ursprünglichen Eichgeraden abgelesen wird.

Muss die Konzentration des ionisierten Ca^{2+} anstelle der Aktivität potentiometrisch ermittelt werden, so wird die Fehlerbetrachtung wesentlich komplexer. Durch zufällige Gegebenheiten können sich unter gewissen Umständen EMK-Beiträge bzw. Unsicherheiten gegenseitig kompensieren und so Konzentrationsfehler verringern oder sogar ausgleichen (vgl. Fig. 7.8). Ändert zum Beispiel die Na^+ -Konzentration in der Probe um $+5 \text{ mmol L}^{-1}$, folgt dadurch ein Fehler von $-0.010 \text{ mmol L}^{-1}$ (Referenzlösung: 3 mol L^{-1} KCl) bzw. $+0.006 \text{ mmol L}^{-1}$ (isotonischer Referenzelektrolyt) in der ermittelten Ca^{2+} -Konzentration (ursprüngliche Na^+ -Konzentration: 143 mmol L^{-1} ; konstante Ca^{2+} -Konzentration: 1.1 mmol L^{-1} ; Eichlösungen mit isotonischem Ionenhintergrund: vgl. Tab. 7.7). Diese Ungenauigkeiten entsprechen -5% bzw. $+3 \%$ des physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationsbereiches (0.2 mmol L^{-1}). Falls eine genauere Bestimmung gefordert ist, muss gleichzeitig die Na^+ -Konzentration ermittelt werden.

Bei dieser letzten Betrachtung (vgl. Fig. 7.8) wurde die durch die Selektivität der Membran bestimmte Na^+ -Interferenz nicht berücksichtigt. Diese würde einen EMK-Beitrag in der selben Richtung wie die Flüssigkeitspotentialänderungen ΔE_J bzw. $\Delta E'_J$ erzeugen. Durch das Eichverfahren (Eichlösungen mit isotonischem Ionenhintergrund, vgl. 7.4.2) fallen jedoch bei den untersuchten Membranelektroden die selektivitätsbedingten Konzentrationsfehler nahezu vollständig weg. Die durch die Erythrozyten des Blutes erzeugten Änderungen des Flüssigkeitspotentials an der Referenzelektrode, wie sie aus Vergleichsmessungen im Blut bzw. im Plasma erhalten werden [414], wurden ebenfalls nicht berücksichtigt. Diese Vernachlässigung scheint besonders dann berechtigt zu sein, wenn eher verdünnte Referenzelektrolyte (z. B. isotonische NaCl-Lösung) verwendet werden [414]. Eine Flüssigkeitsbrücke mit fließender Referenzlösung ist dabei ebenfalls von Vorteil.

Figur.7.8. EMK-Änderung einer Ca^{2+} -selektiven Elektrodenmesskette bei konstanter Ca^{2+} -Konzentration (1.1 mmol L^{-1}) aber erhöhter Na^{+} -Konzentration (von 143 auf 148 mmol L^{-1}) der Probe unter der Berücksichtigung verschiedener Referenzelektrolyte ($\text{A} \rightarrow \text{B}$: $3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$; $\text{A} \rightarrow \text{B}'$: $143 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$).

- ΔE_I : Änderung der EMK, bedingt durch die Verminderung der Ca^{2+} -Aktivität als Folge der Erhöhung der Ionenstärke (entspricht der idealen Membranpotentialänderung, welche unabhängig von den Eigenschaften der ionenselektiven Elektrode bzw. der Referenzelektrode gegeben ist)
- $\Delta E_J, \Delta E'_J$: Änderungen des Flüssigkeitspotentials (ΔE_J : $3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$; $\Delta E'_J$: 143 mmol L^{-1})
- Δa_{Ca} : Änderung der Ca^{2+} -Aktivität durch die erhöhte Ionenstärke
- AB, AB' : Summe aller Beiträge ($\Delta E_I + \Delta a_{\text{Ca}} + \Delta E_J$ bzw. $\Delta E'_J$) unter Vernachlässigung der selektivitätsbedingten Ioneninterferenz
- $\Delta \log a_{\text{Ca}}, \Delta \log a'_{\text{Ca}}$: Fehler in der ermittelten Ca^{2+} -Aktivität
- $\Delta \log c_{\text{Ca}}, \Delta \log c'_{\text{Ca}}$: Fehler in der ermittelten Ca^{2+} -Konzentration
- Ca^{2+} -Eichfunktion : Vgl. die Zusammensetzung der Eichlösungen in der Tabelle 7.7

7.4.2 Eich- und Messverfahren zur Bestimmung der Konzentration bzw. der Aktivität des ionisierten Calciums

Die Komplexität des Problems der Eichverfahren und der Verfügbarkeit von Standardlösungen für die klinisch-chemischen Analytik kommt ohne Zweifel bei der quantitativen Bestimmung des ionisierten Ca^{2+} im Blut vollständig zum Ausdruck. Verschiedene proteinhaltige Lösungen wie u. a. aufgelöste, lyophilisierte Serumproben, wurden als Eich- bzw. Bezugslösungen vorgeschlagen (vgl. u. a. [416, 417]). Da der Anteil des ionisierten Ca^{2+} in solchen Lösungen von mehreren Faktoren, insbesondere dem pH-Wert (vgl. 7.2) abhängig ist, wurden hier Eichlösungen mit konstanteren Ca^{2+} -Konzentrationen gewählt. Dementsprechend wurde wie zuvor für die Na^+ - und K^+ -Bestimmung in Serum rein wässrige Elektrolytlösungen eingesetzt (vgl. Tab. 7.7). Wegen der hohen $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Selektivität der optimierten Flüssigmembranelektroden (vgl. Tab. 7.4) konnte auf den Zusatz eines pH-Puffers verzichtet werden.

Tabelle 7.7. Zusammensetzung der Ca^{2+} -Eichlösungen für die Bestimmung des ionisierten Ca^{2+} .

Eichlösung	Zusammensetzung ^{a)} [mmol L ⁻¹]			
	Ca^{2+}	Na^+	K^+	Mg^{2+}
W'_{Ca1}	0.5	143.0	4.6	0.6
W'_{Ca2}	1.0	143.0	4.6	0.6
W'_{Ca3}	5.0	143.0	4.6	0.6

a) Als Chloride der entsprechenden Kationen

Vor dem Einbau des Durchflusselektrodensystems in den extrakorporalen Blutkreislauf, wurde die EMK der Ca^{2+} -selektiven Messketten in den drei Eichlösungen (vgl. Tab. 7.7) gemessen, um die Steigung der Elektrodenfunktionen zu bestimmen (vgl. 4.3.4). Bis der extrakorporale Blutkreislauf erstellt wurde und das Durchflusssystem angeschlossen werden konnte, wurde jeweils die EMK in der Eichlösung $\text{W}_{\text{Ca}^{2+}}^I$ registriert. Die im Blut gemessenen EMK-Werte wurden mittels der Gleichung (4.61) ausgewertet. Während der ganzen Messdauer im Blut (3.7 bis 6.6 Stunden) wurde keine Zwischeneichung durchgeführt. Nur anschliessend wurde die Steigung der Elektrodenfunktionen mit Hilfe der drei Eichlösungen nochmals bestimmt. Unter der Annahme eines identischen Ionenhintergrundes im Blut (bzw. im Plasma) und in der Eichlösung $\text{W}_{\text{Ca}^{2+}}^I$, d. h. bei konstantem Aktivitätskoeffizienten ($\gamma = 0.336$), wurden aus den ermittelten Ca^{2+} -Konzentrationen im Blut mit Hilfe der Gleichung (4.9) die entsprechenden Ca^{2+} -Aktivitäten berechnet.

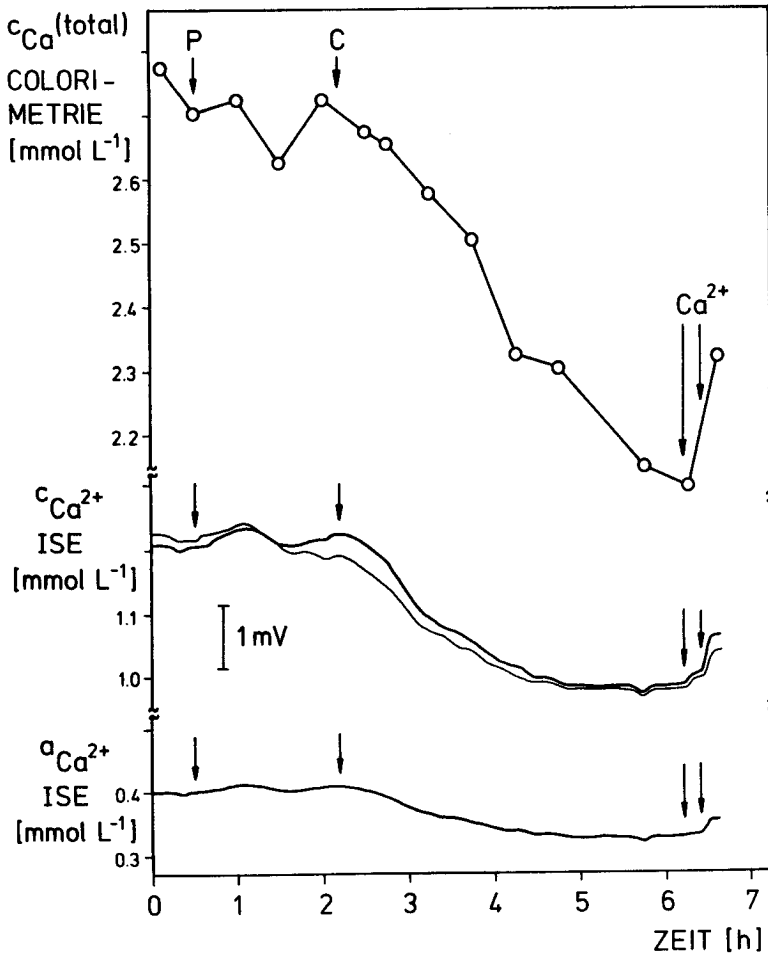
7.4.3 Kontinuierliche in situ Bestimmung der Konzentration bzw. der Aktivität des ionisierten Calciums beim wachen Hund

Die hypocalcämische Wirkung des Calcitonins ist schon seit einigen Jahren qualitativ bekannt [65]. Im Rahmen einer quantitativen pharmakokinetischen Untersuchung dieses Hormons (Sandoz A. G., Abteilung für pharmazeutische Forschung und Entwicklung, 4002 Basel; Gruppe von Dr. M. Azria) wurde die Ca^{2+} -Konzentration im Blut beim wachen Hund kontinuierlich ermittelt. Dazu wurde von der Vena cephalica zur Vena saphena ein extrakorporaler Blutkreislauf hergestellt (der Hund, junger Beagle, wurde auf einem Hängestuhl festgebunden). Der Blutfluss wurde mit Silikongummikathetern, welche jeweils mit Poly(tetrafluoroäthylen)-Schläuchen (teflon) am Durchflusselektrodensystem angeschlossen waren, ausgeführt und wieder eingeleitet. Zwischen dem Messsystem und dem zur Vena saphena leitenden Katheter wurde eine Injektionsspritze angebracht, um zur colorimetrischen Bestim-

mung des totalen Calciums Blut zu entnehmen, und um Pharmazeutika (Calcitonin, Placebo, Heparin) zu verabreichen (vgl. Fig. 7.7). Um die Bildung von Blutgerinnsel zu verhindern [418, 419], wurden unmittelbar vor der Herstellung des venösen extrakorporalen Blutkreislaufes 1250 IU Heparin/kg Körpergewicht verabreicht und während der Messung alle weiteren zwei Stunden 250 IU/kg KG. Das Volumen des extrakorporalen Blutkreislaufes lag bei 2.5 mL. Die Temperatur des Blutes im Durchflusssystem war etwa 25 ° C.

Zwei Durchflusselektroden mit verschiedenen Ca^{2+} -selektiven Flüssigmembranen (Membran Cal und Ca3) wurden eingesetzt. Die boratfreie Membran Cal wurde bereits früher im Hinblick auf Ca^{2+} -Bestimmungen im Blut untersucht [399], und die Membran Ca3 hat sich bei der Ermittlung der totalen Calciumkonzentration im verdünnten, angesäuerten Serum sehr bewährt (vgl. 7.3). Wie aus Tabelle 7.8 entnommen werden kann, weist die Membran Ca3 eine etwas bessere EMK-Stabilität bzw. Reproduzierbarkeit als die Membran Cal auf. Damit der physiologische Ca^{2+} -Referenzbereich (≈ 2.3 mV) mit 95 % Sicherheit fünffach unterteilt werden kann, liegt die erforderliche Reproduzierbarkeit der Einzelmessung bei ± 0.1 mV (vgl. 4.3.2; ähnlicher Referenzbereich wie im menschlichen Blutserum wird angenommen). Auf Grund der durchgeführten Versuche scheinen die mittels Membran Ca3 erhaltenen Werte den gestellten Anforderungen zu entsprechen. Die mittlere EMK-Abweichung für die Eichlösung $\text{W}_{\text{Ca}2}^1$ lag nach den Messungen im fließenden Blut von durchschnittlich 5.5 Stunden Dauer (zwischen 3.7 und 6.6 Stunden) nur bei 0.13 mV. Die Membran Ca3 und in einem nahezu vergleichbaren Mass die Membran Cal scheinen dementsprechend von den Blutkomponenten kaum beeinflusst zu werden. Dies steht im Gegensatz zu Membranen beruhend auf Organophosphaten, welche für Messungen im Blutserum durch eine Dialysemembran geschützt werden müssen [44, 391, 392].

In Figur 7.9 sind die Ergebnisse eines typischen Experimentes von Ca^{2+} -Bestimmungen im venösen extrakorporalen Blutkreislauf eines wachen Hundes dargestellt (Versuch IV in Tab. 7.8). Die mittels Colorimetrie (für eine Beschreibung der eingesetzten Methode vgl. [151, 219]) diskontinuierlich



Figur 7.9. Zeitlicher Verlauf der im extrakorporalen Blutkreislauf eines wachen Hundes bestimmten Konzentration des totalen Calciums, der Konzentration (dicke Linie: Membran Ca3; feine Linie: Membran Ca1) und der Aktivität des ionisierten Ca^{2+} .

P: Zugabe von 5.4 mL Placebo ($0.0147 \text{ mmol L}^{-1}$ Natriumacetat, $0.0333 \text{ mol L}^{-1}$ Essigsäure, 0.128 mol L^{-1} Natriumchlorid; pH = 3.7); C: Zugabe von 540 IU Calcitonin; Ca^{2+} : zwei Zugaben von je 0.232 mmol Calciumgluconat.

Tabelle 7.8. Ergebnisse der EMK-Messungen in den Eichlösungen (vgl. Tab. 7.7) vor bzw. nach der kontinuierlichen Ca^{2+} -Bestimmung im extrakorporalen Blutkreislauf bei wachen Hunden (alle Werte in mV).

Membran Ca1

Versuch	s ^{a)} vor	s ^{a)} nach	Δs	EMK($\text{W}'_{\text{Ca}2}$) ^{b)} vor	EMK($\text{W}'_{\text{Ca}2}$) ^{b)} nach	$\Delta \text{EMK}(\text{W}'_{\text{Ca}2})$
I	28.3	28.4	+0.1	72.2	72.8	+0.6
II						
III	27.9	27.8	-0.1	72.9	73.0	+0.1
IV	27.9	27.7	-0.2	72.9	72.8	-0.1
V	28.1	28.2	<0.1	74.2	74.3	+0.1
VI	28.4	28.1	-0.3	73.6	73.7	+0.1
VII	28.1	28.0	-0.1	72.7	72.4	-0.3
Mittelwert	28.12	28.67	0.13 ^{c)}	73.8	73.2	0.22 ^{c)}
s ^{d)}	0.20	0.29	0.10	0.7	0.7	0.20

Membran Ca3

I	28.7	28.8	+0.1	83.6	83.4	-0.2
II	28.3	28.4	+0.1	84.0	83.8	-0.2
III	28.1	28.1	<0.1	84.5	84.6	+0.1
IV	28.4	28.4	<0.1	84.7	84.7	<0.1
V						
VI	28.1	28.3	+0.2	84.2	84.1	-0.1
VII	28.0	28.3	+0.1	84.2	84.0	-0.2
Mittelwert	28.27	28.35	0.08 ^{c)}	84.2	84.1	0.13 ^{c)}
s ^{d)}	0.26	0.27	0.07 ^{e)}	0.4	0.5	0.08 ^{e)}

- a) s vor bzw. nach: Steigung der Elektrodenfunktion vor bzw. nach der Messung im extrakorporalen Blutkreislauf
 - b) $EMK(W_{Ca^{2+}})$ vor bzw. nach: EMK-Wert in der Eichlösung $W_{Ca^{2+}}$ vor bzw. nach der Messung im extrakorporalen Blutkreislauf
 - c) Mittelwert der Absolutwerte
 - d) s: Standardabweichung
 - e) Durch die Digitalisierung der EMK (Auflösungsvermögen des Voltmeters: 0.1 mV) hat die Standardabweichung im Bereich <0.1 mV (für $n = 6$) eine diskrete Verteilung; Werte z. B. zwischen ± 0.00 und ± 0.04 sind nicht möglich
-

ermittelten Konzentrationswerte des totalen Calciums sowie die potentiometrisch erfasste Konzentration bzw. Aktivität des ionisierten Ca^{2+} sind als Funktion der Zeit wiedergegeben. Dabei wurde der mittels Membran Ca1 (dünnere Linie) und mittels Membran Ca3 (dickere Linie) ermittelte Verlauf der Ca^{2+} -Konzentration gegenübergestellt. Da beide Kurven nahezu identisch sind, ist schlussendlich auf Grund der höheren Stabilität bzw. Reproduzierbarkeit die Membran Ca3 für Messungen im Blut vorzuziehen. Obwohl in Figur 7.9 drei physiologisch verschiedene Parameter verglichen werden, ist die Ähnlichkeit des Verlaufs der drei entsprechenden Kurven offensichtlich.

Die verschiedenen Versuche haben die Einsetzbarkeit der Ca^{2+} -selektiven Flüssigmembranelektroden für kontinuierliche, pharmakokinetische Untersuchungen im Blut gezeigt. Durch die Messungen im extrakorporalen Blutkreislauf wird das Problem einer pH-Verschiebung (z. B. als Folge der Probebehandlung) und damit einer Konzentrationsänderung des ionisierten Ca^{2+} umgangen.

8. FLUESSIGMEMBRANELEKTRODE ZUR BESTIMMUNG DER WASSERSTOFF- IONENAKTIVITAET IM BLUT

8.1 Einleitung

Eine klinisch relevante Bestimmung des pH-Wertes in Blut ist wie die Ermittlung der Ca^{2+} -Konzentration eine vergleichbar schwierige Aufgabe. Dabei sind anaerobe Verhältnisse von der Probenahme bis zur Messung einzuhalten, wobei die Probe vorteilhaft ohne Wartezeit zur Messung gelangt. Dies weist bereits auf von der analytischen Methode unabhängige Schwierigkeiten bei der Durchführung von repräsentativen pH-Vergleichsmessungen in Blut hin. Solche Untersuchungen sind zudem mit einem noch grundlegenden Problem verbunden, welches sich in der eigentlichen Definition des pH-Wertes [107, 420-423] begründet. Da der pH-Wert praktisch durch die Messgröße (EMK) einer gegebenen H^+ -selektiven Elektrodenmesskette bestimmt ist (theoretisch: $\text{pH} = -\log a_{\text{H}}$), kann der pH-Wert einer Probe heute nur potentiometrisch direkt ermittelt werden. Vergleichsuntersuchungen mit unabhängigen Methoden sind daher prinzipiell nicht sinnvoll.

Um den pH-Wert einer Probe potentiometrisch bestimmen zu können, muss die Elektrodenmesskette geeicht werden. Da aber keine absolute Bestimmungsmethode der H^+ -Aktivität bzw. des pH-Wertes vorhanden ist, muss der pH-Wert der Eichlösungen definiert bzw. berechnet werden (z. B. mittels der Komplexbildungskonstanten der gelösten Substanzen und dem Debye-Hückel-Formalismus). Von der Reihe der vorgeschlagenen pH-Eichlösungen (vgl. u. a. [422-425]) werden zur Ermittlung des pH-Wertes in Blut vorwiegend zwei Phosphatpufferlösungen mit pH 7.383 bzw. 6.841 (bei 37 °C) verwendet. Diese zwei Eichlösungen sind aber nicht ideal, da sie mit normalem Blutserum nicht isoton sind (Referenzionenstärke von Blutserum: $I = 0.16 \text{ mol L}^{-1}$). Allerdings sind pH-Eichlösungen von konstanter, physiologisch typischer Ionenstärke vorgeschlagen worden [425]. Im Hinblick auf reproduzierbare pH-Bestimmungen innerhalb verschiedener klinischer Laboratorien

sollte zusätzlich die Flüssigkeitsbrücke bzw. der Referenzelektrodenelektrolyt einheitlich festgesetzt werden.

Die ionenselektive Elektrode bleibt jedoch der Schlüsselpunkt jeder potentiometrischen pH-Bestimmung. Eine schon seit langem bekannte und heute noch für genaue pH-Ermittlungen vorgeschlagene H^+ -selektive Elektrode [422, 423] ist die Wasserstoffelektrode. Wegen der Umständlichkeit ihrer Handhabung hat diese jedoch kaum praktische Bedeutung erlangt. Dies steht im Gegensatz zur H^+ -selektiven Glasmembranelektrode, der ältesten und am verbreitetsten eingesetzten ionenselektiven Membranelektrode überhaupt. Nicht zuletzt wegen ihrer hervorragenden Selektivität [5, 232] und anderen günstigen Eigenschaften ist sie besonders in der klinischen Chemie und in der Physiologie zum grundlegenden Bestandteil des analytischen Instrumentariums geworden. Dies bedeutet allerdings nicht, dass der Einsatz dieses Sensors durchwegs problemlos ist. Die Bruchgefahr [426], die umständliche Herstellung insbesondere von miniaturisierten Sensoren [427-429] und von Durchflusselektroden und der hohe elektrische Membranwiderstand [233] sind einige limitierende Faktoren von Glasmembranelektroden. Bei längeren oder wiederholten Messungen im Blut bzw. im Serum, wie dies etwa in der klinisch-chemischen Routineanalytik mittels Analysatoren der Fall ist, muss die Oberfläche der Glasmembran mit einer sauren Enzymlösung (im allgemeinen Pepsin) periodisch gereinigt werden. Um diese Nachteile zu umgehen, wurde verschiedentlich versucht, H^+ -selektive Kunststoffmembranen zu entwickeln.

Wasserstoffionencarrier waren auf Grund von selektiven H^+ -Transporten durch biologische und künstliche bimolekulare Membranen bekannt [430, 431]. Um die Lipophilie zu erhöhen, wurden einige dieser Carrier chemisch modifiziert und so in verschiedenen Matrizen eingesetzt. Eine auf p-Octadecyloxy-m-chlorophenylhydrazomesoxalonitril (OCPH) beruhende H^+ -selektive Membran wurde für pH-Messungen in biologischen Flüssigkeiten beschrieben [432-434]. Der Einsatz dieser Membran war jedoch beschränkt, da OCPH nur in einer Blockcopolymermatrix funktionstüchtig ist [435]. Weiter diente das Antibiotikum Virginiamycin S als Grundlage zur Synthese

eines neuen H^+ -Carriers (3-Hydroxy-N-dodecylpicolinsäureamid [436]). Die auf diesem Liganden beruhende PVC-Flüssigmembranelektrode zeigte in wässrigen Lösungen Selektivitäten und Elektrodenfunktionen, welche Messungen in biologischen Flüssigkeiten erlauben sollten [435-437]. Messungen im Blut erfüllten allerdings die gestellten Erwartungen nicht [435]. Unabhängig von bekannten biologischen Ionentransportsystemen wurde Tri-n-dodecylamin (TDDA; vgl. Fig. 4.2) als ionenselektive Komponente untersucht [438]. Dieser neutrale Carrier induziert in Flüssigmembranen extrem hohe Selektivitäten gegenüber Na^+ und K^+ [438]. In der Folge werden die Eigenschaften und das Ansprechverhalten von Flüssigmembranelektroden beruhend auf TDDA in wässrigen Lösungen sowie in Flüssigkeiten biologischer Herkunft beschrieben.

8.2 Eigenschaften der Flüssigmembranelektrode

Die Zusammensetzung der untersuchten H^+ -selektiven Flüssigmembran (Membran H1) wurde folgendermassen gewählt (vgl. Fig. 4.2 und 4.3 für die Strukturformeln):

- 1.0 Gew.-% Tri-n-dodecylamin (TDDA),
- 0.6 Gew.-% Kaliumtetrakis(p-chlorophenyl)borat (KTPClPB),
- 65.6 Gew.-% Bis(2-äthylhexyl)sebacat (DOS),
- 32.8 Gew.-% Poly(vinylchlorid) (PVC).

Diese Membran wurde zur Charakterisierung in Makroelektroden eingesetzt. Eine Citronensäurelösung (1.00 mol L^{-1} Citronensäure, 2.73 mol L^{-1} Natriumhydroxid, 0.01 mol L^{-1} Natriumchlorid; pH 5.6) diente dabei als Innenableitelektrolyt. Die in gepufferten wässrigen Lösungen (20°C) erhaltene Elektrodenfunktion zeigte im pH-Bereich zwischen 11.0 und 4.5 (linearer Bereich) eine Steigung von $57.8 \pm 0.1 \text{ mV}$ ($n = 7$) [438]. Die Selektivitätsfaktoren wurden nach der Methode der konstanten Störionenkonzentration ("fixed interference method" [228, 266]) ermittelt [438]: $\log K_{HNa}^{Pot} = -10.4$, $\log K_{HK}^{Pot} = -9.8$, $\log K_{HCa}^{Pot} < -11.1$. Diese Selektivitäts-

angaben erfüllen bei weitem die gestellten Anforderungen für Messungen in Blut (vgl. 4.3.1). Die Bevorzugung von H^+ gegenüber Na^+ und K^+ ist allerdings bei der Glasmembran etwa um einen Faktor 1000 grösser [233].

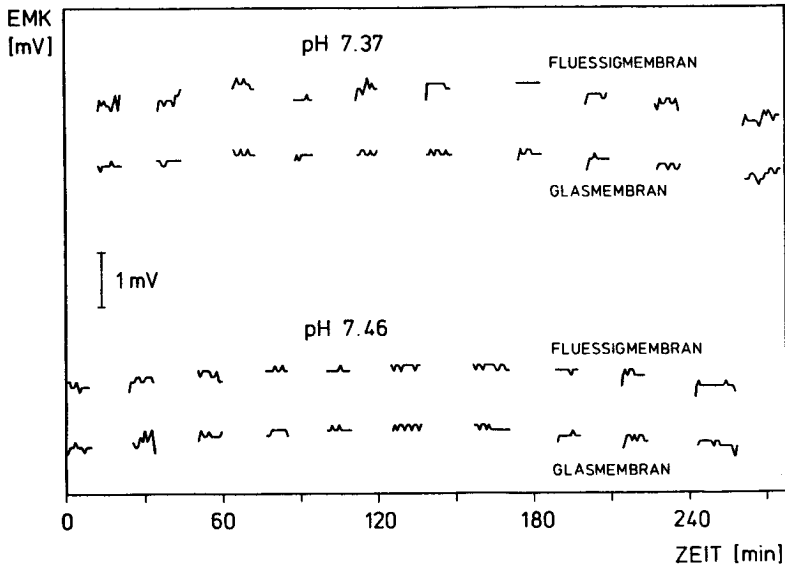
Neben dem einfachen Herstellungsverfahren und der mechanischen Flexibilität ist der relativ tiefe elektrische Membranwiderstand ein weiterer Vorteil der H^+ -selektiven PVC-Flüssigmembranelektrode. Die an Minielektroden gemessenen elektrischen Widerstände lagen bei $2 \cdot 10^6 \Omega$ für die Flüssigmembran bzw. $4 \cdot 10^9 \Omega$ für die Glasmembran. Diese Werte entsprechen einem spezifischen Widerstand von etwa $1.5 \cdot 10^7 \Omega \text{ cm}$ für die Flüssigmembran, bzw. $1.5 \cdot 10^{11} \Omega \text{ cm}$ für die Glasmembran.

8.3 Ansprechverhalten der Flüssigmembranelektrode im Vergleich zu einer Glasmembranelektrode in wässrigen Lösungen, Blutserum und Blutplasma

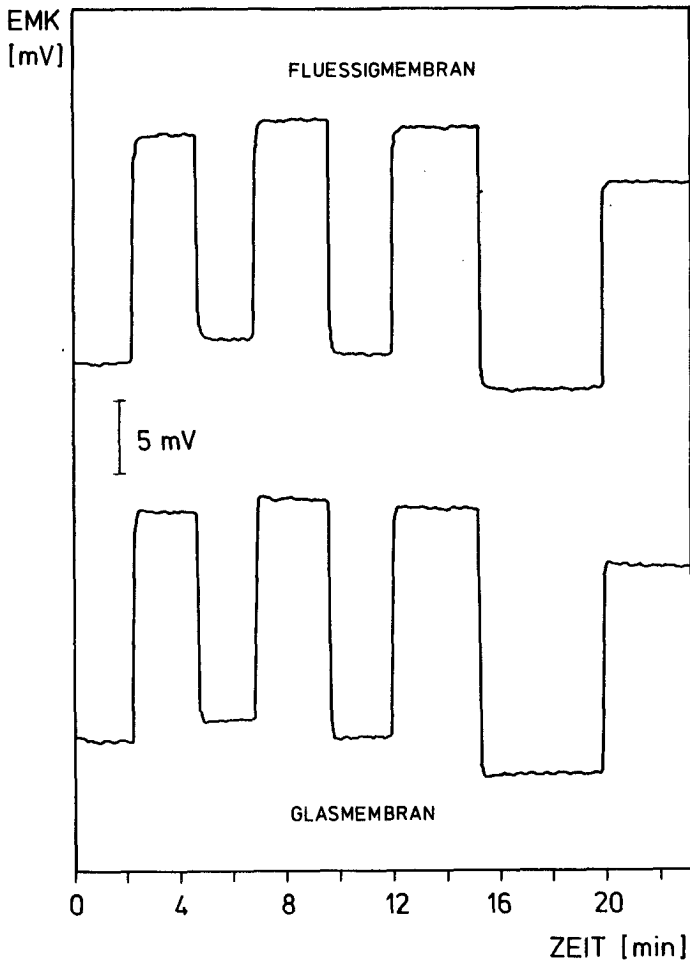
Die Reproduzierbarkeit der mittels der H^+ -selektiven Flüssigmembranelektrode (Makroelektrode, vgl. 11.1) in gepufferten wässrigen Lösungen gemessenen EMK-Werte wurde im Vergleich der mittels einer Glasmembranelektrode (Philips-pH-Glaselektrode GA 110) erhaltenen Werte untersucht. Zwei Pufferlösungen (Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) mit Serum-elektrolythintergrund, vgl. [439]) mit pH-Werten von 7.0 bzw. 8.0 wurden siebenmal abwechselungsweise gemessen. Die Standardabweichungen einer Einzelmessung lagen bei 0.17 mV (Pufferlösung: pH 7.0) bzw. 0.14 mV (Pufferlösung: pH 8.0) für die Flüssigmembranelektrode und 0.12 mV bzw. 0.15 mV für die Glasmembranelektrode. Diese Angaben liegen unterhalb der geforderten Messgenauigkeit für klinisch relevante pH-Messungen im Blut (vgl. 4.3.2).

In Figur 8.1 ist der zeitliche EMK-Verlauf während eines ähnlichen Experimentes dargestellt. Dabei wurden zwei Durchflusselektroden, eine mit der Flüssigmembran und die andere mit einem H^+ -selektiven Glasrohr, eingesetzt (vgl. 11.3). Zwei Pufferlösungen (TRIS, pH 7.46 bzw. 7.37) wurden zehnmal abwechselungsweise gemessen. Die Reproduzierbarkeit der EMK-Werte war nahezu identisch mit der des oben beschriebenen Experimentes. Die EMK-Differenzen zwischen zwei aufeinanderfolgenden Endwerten ($EMK(pH\ 7.37) - EMK(pH\ 7.46)$, $\pm$ Standardabweichung, $n = 10$) waren praktisch identisch und konstant: $5.06 \pm 0.13\ mV$ (Flüssigmembran) bzw. $4.95 \pm 0.15\ mV$ (Glasmembran). Die Ansprechzeit ($t_{0.1mV}$) beider Elektroden lag bei ≤ 30 Sekunden. Die durch Kontakt der Sensoren mit Blutflüssigkeit induzierte Veränderung der Steigung der Elektrodenfunktionen wurde ebenfalls mit derselben Messanordnung untersucht. Die Elektrodenfunktionen wurden vor bzw. nach einem einstündigen Kontakt der H^+ -selektiven Membranen mit Blutplasma im pH-Bereich 7.0 bis 9.2 mittels wässriger Standardpufferlösungen bestimmt. Dabei erlitt die Steigung der mittels der Flüssigmembranelektrode erhaltenen Eichfunktionen eine Abnahme von $0.09\ mV$ bzw. $0.26\ mV$ im Falle der Glasmembranelektrode.

In Figur 8.2 ist das Ansprechverhalten der H^+ -selektiven Flüssigmembranelektrode bzw. der Glasmembranelektrode (beide Makroelektroden) in einer Blutserumprobe bei Variation deren pH-Wertes durch HCl- bzw. NaOH-Zugaben abgebildet. Um möglichst rasche und homogene pH-Änderungen zu gewährleisten, wurde die Messprobe gerührt. Die Ansprechzeiten beider Elektroden waren dabei den Werten für wässrigen Pufferlösungen ähnlich: $t_{0.1mV} \leq 30$ Sekunden. Die mittels der Flüssigmembranelektrode gemessenen EMK-Verschiebungen lagen im Vergleich zur Glasmembranelektrode um durchschnittlich $0.24\ mV$ (1.5 % der mittleren EMK-Differenz (16 mV), vgl. Fig. 8.2) tiefer. Bezüglich des physiologischen Referenzbereiches der H^+ -Aktivität ($\approx 6.8\ mV$) ist ein Messfehler von 0.9 % (0.06 mV) kaum feststellbar und hat keine Konsequenzen für klinische Untersuchungen (vgl. 4.3.2).



Figur 8.1. Zeitlicher Verlauf der in wässrigen Pufferlösungen mittels der H^+ -selektiven Flüssigmembrandurchflusselektrode bzw. Glasmembrandurchflusselektrode gemessenen EMK-Werte.



Figur 8.2. Zeitlicher Verlauf der mittels der H^+ -selektiven Flüssigmembranelektrode bzw. Glasmembranelektrode (beide Makroelektroden) in einer Serumprobe gemessenen EMK bei Änderung des pH-Wertes durch HCl- bzw. NaOH-Zugaben.

8.4 Vergleich zwischen pH-Werten, die mittels einer Flüssigmembranelektrode bzw. einer Glasmembranelektrode in Erythrozytensuspensionen und in Blut ermittelt wurde

Ein kommerziell erhältlicher Blutgasanalysator (Gas Check AVL 939, von AVL-Messtechnik, Graz, Oesterreich (Dr. H. J. Marsoner) zur Verfügung gestellt) wurde für pH-Vergleichsmessungen verwendet. Die Referenzelektrode (Kalomel-Referenzelektrode mit Diaphragma; Referenzelektrolyt: KCl) und die pH-Glasmembranelektrode wurden mit dem Gerät mitgeliefert. Eine Flüssigmembranminielektrode (vgl. S.166 für die Membranzusammensetzung und 11.2 für den Elektrodenbau) wurde an Stelle der CO_2 -sensitiven Elektrode eingesetzt. Dabei befanden sich im Messkanal beide H^+ -selektiven Membranen in unmittelbarer Nähe (Abstand: ~ 2 cm; vgl. die Messanordnung in [439, 440]). Der für die CO_2 -sensitive Elektrode vorgesehene elektronische Teil des Blutgasanalysators wurde umgeändert, um die Angabe des mittels der Flüssigmembranelektrode ermittelten pH-Wertes zu erlauben. Alle Messungen wurden bei 37.0 ± 0.1 °C durchgeführt. Das Probevolumen für eine Bestimmung betrug etwa 40 μL . Vor jeder Messreihe wurden beide pH-Elektroden nach der sogenannten Methode der Zwei-Punkt-Eichung kalibriert. Die Steigung und das Standardpotential der Elektrodenfunktion wurde mit Hilfe von zwei kommerziell erhältlichen Phosphatpufferlösungen (pH 7.383 bzw. 6.841 [423, 424]) eingestellt.

In Tabelle 8.1 sind die Ergebnisse von verschiedenen Reproduzierbarkeits- bzw. Genauigkeitsuntersuchungen zusammengetragen. Nach der Eichung wurde der pH-Wert abwechselungsweise im Puffer mit pH 7.383 bzw. 6.841 gemessen (Dauer einer Einzelmessung: 5 Minuten; totale Messdauer: ~ 50 Minuten). Die Reproduzierbarkeit der Einzelmesswerte ist in den wässrigen Pufferlösungen für beide Elektroden vergleichbar (vgl. erstes Experiment in Tab. 8.1). Wird im gleichen Versuch abwechselungsweise die Messung im Puffer mit pH 7.383 bzw. 6.841 als sogenannte Ein-Punkt-Eichung (Einstellung des Standardpotentials) jeweils für die entsprechende Messung im Puffer mit pH 6.841 bzw. 7.383 betrachtet, ist die Genauigkeit der mittels der Flüssig-

Tabelle 8.1. Reproduzierbarkeit und Genauigkeit von pH-Messungen.

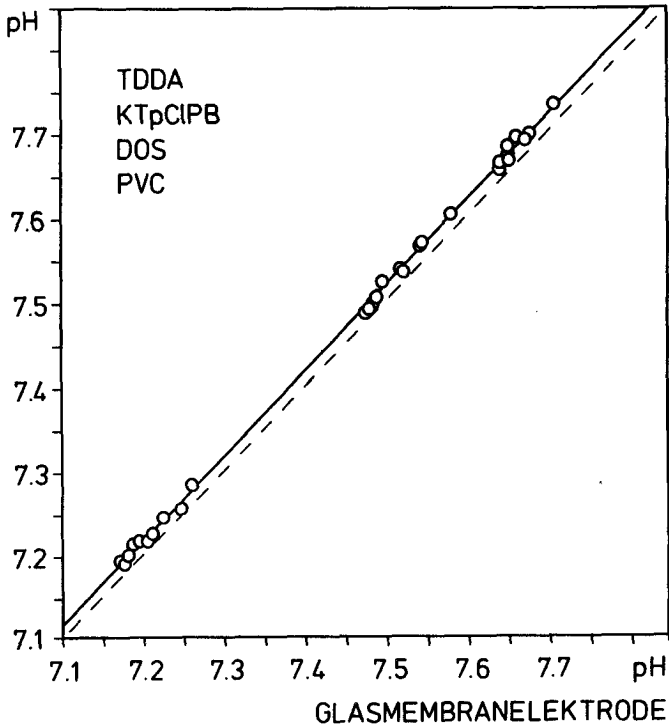
Experiment	Mittelwert der gemessenen pH-Werte mit Standardabweichung (n = 5)	
	Flüssigmembran	Glasmembran
Wechsel zwischen Puffern:		
pH 7.383 und	7.385 ± 0.001	7.378 ± 0.002
pH 6.841	6.843 ± 0.002	6.835 ± 0.002
Wechsel zwischen Puffern:		
pH 7.383 und	7.383 ± 0.003	7.385 ± 0.003
pH 6.841	6.841 ± 0.003	6.840 ± 0.003
mit Zwischeneichung (Puffer mit pH 6.841 bzw. 7.383 als Ein-Punkt-Eichung betrachtet)		
Wechsel zwischen:		
Puffer (pH 7.383) und	7.382 ± 0.003	7.378 ± 0.003
tonometrierter Blutprobe	7.379 ± 0.003	7.377 ± 0.006
Tonometrierte Blutprobe	7.380 ± 0.002	7.382 ± 0.007
(Zwischeneichung mit Puffer pH 7.383)		

sigmembranelektrode durchgeführten Messungen leicht besser im Vergleich zur Glasmembranelektrode (vgl. zweites Experiment in Tab. 8.1). Diese zwei Experimente wurden mit einem Puffer (pH 7.383) und einer tonometrierten, heparinisierten Blutprobe wiederholt (vor der Messung war die heparinisierte Blutprobe in einem thermostatierten (37 °C) Dünnschichttonometer stets mit einem konstanten Luft/CO₂-Gemisch (Partialdrücke: 4.0 bzw. 0.9 bar) in Kontakt). Die Flüssigmembranelektrode scheint auch nach Blutkontakt genauere pH-Werte in wässrigen Lösungen zu liefern (vgl. drittes Experiment in Tab. 8.1). Die mittels dieser Elektrode in Blut erhaltenen Werte weisen ebenfalls eine höhere Reproduzierbarkeit als jene auf, welche mittels der Glasmembranelektrode bestimmt wurden. Dies stimmt mit ähnlichen Feststellungen bei in vivo Messungen überein [441]. Die Flüssigmembranelektrode scheint dabei durch Serumproteine nicht merkbar gestört zu sein [441]. Sie erfüllt die an die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit gestellten Anforderungen (vgl. 4.3.2).

Vergleichsmessungen wurden an kommerziell erhältlichen gepufferten Erythrozytensuspensionen durchgeführt. Nach der Eichung der beiden H⁺-selektiven Elektrodenmessketten wurde der pH-Wert ohne Zwischeneichung in 30 solchen Proben ermittelt. In Figur 8.3 ist die erhaltene Korrelation dargestellt (Regressionsgerade: $Y = (1.007 \pm 0.005) X - (0.031 \pm 0.039)$). Auf Grund dieser nahezu idealen Vergleichsfunktion wurde eine ähnliche Untersuchung in Blut durchgeführt.

In Figur 8.4 ist die Korrelation von pH-Werten, welche an tonometrierten Blutproben mittels der Flüssigmembranelektrode bzw. mittels der Glasmembranelektrode ermittelt wurden, dargestellt. Fünf von verschiedenen Patienten stammende heparinisierte Blutproben wurden in einem Dünnschichttonometer mit unterschiedlichen Luft/CO₂-Gemischen äquilibriert [442]. Die auf Grund der 35 Messpunkte erhaltene Regressionsgerade weist eine Steigung von 0.94 bei einer Reststreuung von 0.01 pH-Einheiten auf (Korrelationskoeffizient: $r = 0.998$). Die im Vergleich zur idealen Korrelationsgeraden leicht reduzierte Steigung ist wahrscheinlich auf die Diffusion von CO₂ aus bzw. in die Blutprobe in der unmittelbaren Nähe

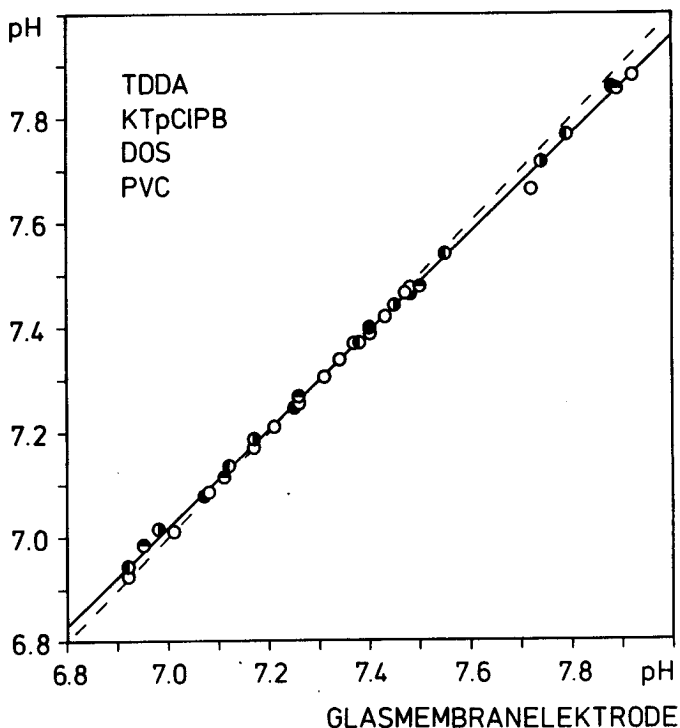
FLUESSIGMEMBRANELEKTRODE



Figur 8.3. Korrelation von pH-Werten, welche an 30 Erythrozytensuspensionen mittels einer Flüssigmembranelektrode (Y) bzw. mittels einer Glasmembranelektrode (X) ermittelt wurden.

Regressionsgerade: $Y = (1.007 \pm 0.005) X - (0.031 \pm 0.039)$. Gestrichelte Linie: ideale Korrelationsgerade.

FLUESSIGMEMBRANELEKTRODE



Figur 8.4. Korrelation von pH-Werten, welche an tonometrierten, heparinisierten Blutproben mittels einer Flüssigmembranelektrode (Y) bzw. mittels einer Glasmembranelektrode (X) ermittelt wurden (35 Messpunkte von 5 verschiedenen Blutproben; ein Symbol pro Blutprobe).

Regressionsgerade: $Y = (0.94 \pm 0.01) X + (0.42 \pm 0.04)$; Reststreuung von Y über X: ± 0.01 pH-Einheiten. Gestrichelte Linie: ideale Korrelationsgerade.

der Flüssigmembranelektrode zurückzuführen. Da gegenüber den vorherigen Experimenten eine saure Innenableitlösung (1.0 mol L^{-1} Citronensäure, 1.0 mol L^{-1} Natriumhydroxid, $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ Natriumchlorid; pH 3.44) eingesetzt wurde, kann eine störende pH-Änderung des inneren Referenzelektrolyten durch Diffusion von CO_2 durch die H^+ -selektive Flüssigmembran nahezu ausgeschlossen werden. Die Hypothese der Verschiebung des pH-Wertes der Blutprobe in der Nähe der Kunststoffmembran ist von der Tatsache unterstützt, dass bei undichter Anpassung der Elektrode in den Messkanal Korrelationsgeraden mit Steigungen bis 0.4 erhalten wurden. Trotz der Abdichtung der Kontaktstelle zwischen Elektrodenschaft und Probekanal mit Fett (Apiezon N) konnte offenbar die Diffusion von CO_2 und die damit verbundene pH-Änderung der Probe im Bereich der Flüssigmembran nicht vollständig verhindert werden. Bei gezieltem Bau von solchen Flüssigmembranelektrodenkörpern sollte allerdings diese Schwierigkeit problemlos umgangen werden können.

Die aufgeführten Experimente haben gezeigt, dass die Leistung der H^+ -selektiven Flüssigmembranelektrode bei optimalem Einsatz mit derjenigen der Glasmembranelektrode mindestens vergleichbar ist. Da die Kunststoffmembran zusätzlich mehrere mechanische Vorteile mit sich bringt, könnte diese unter anderem im Bereich der klinischen Medizin und der Physiologie die traditionelle pH-Glasmembran ersetzen (vgl. auch [28, 275, 441, 443]).

9. FLUESSIGMEMBRANELEKTRODE ZUR BESTIMMUNG DER LITHIUM-KONZENTRATION IM BLUTSERUM

9.1 Einleitung

Seit der Entdeckung der pharmakologischen Wirkungen von Lithium bei gewissen psychischen Beschwerden [444] werden Lithiumsalze unter anderem zur Behandlung von manisch-depressiven Psychosen eingesetzt [108, 445]. Die normale, physiologische Li^+ -Konzentration im Blutserum liegt bei $4.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ [446], während die therapeutische Konzentration etwa 1 mmol L^{-1} (0.7 bis 1.5 mmol L^{-1} [447-448]) beträgt. Da der letale Li^+ -Spiegel im Blut nur leicht über der benötigten therapeutischen Konzentration liegt, muss eine sogenannte Lithiumtherapie unter strenger Ueberwachung der Li^+ -Konzentration im Blut bzw. im Serum erfolgen. Die Li^+ -Bestimmungen werden heute mittels Flammenphotometrie [109, 449] oder mittels Atomabsorptionsspektrometrie [446, 450] durchgeführt. Der Mechanismus der therapeutischen Li^+ -Wirkung ist allerdings grösstenteils wegen analytischer Schwierigkeiten noch unklar. Die zur Li^+ -Bestimmung verfügbaren Methoden (AES und AAS) sind tatsächlich bei der Untersuchung des Li^+ -Transportes durch Zellmembranen kaum anwendbar. Die Potentiometrie wäre dabei sowohl im physiologischen als auch im klinischen, psychiatrischen Bereich eine ideale Methode.

Wegen der geringen Selektivität der Li^+ -selektiven Glasmembranelektrode [5] gegenüber Na^+ wurde die Entwicklung von weiteren Li^+ -Sensoren vorangetrieben. Vertreter verschiedener Substanzklassen wie Diamide (ETH 149 [451, 452], ETH 1644 [435, 453] und eine Modifikation von ETH 149 [454]), Polysiloxane [455] und Kronenäther [456, 457] wurden als neutrale Li^+ -Carrier vorgeschlagen. Eine auf dem Liganden ETH 1644 beruhende Flüssigmembran ist jedoch die einzige, welche gegenüber den anderen Alkalimetallionen Selektivitätsfaktoren $K_{\text{Lij}}^{\text{Pot}}$ kleiner 10^{-2} und gleichzeitig gegenüber Erdalkalimetallionen kleiner 10^{-3} aufweist [453]. Demnach ist der

Einsatz dieser Elektrode zur direkten Li^+ -Bestimmung im Blut während der Behandlung manisch-depressiver Psychosen denkbar.

9.2 Eigenschaften von lithiumselektiven Flüssigmembranelektroden

Zwei neutrale Li^+ -Carrier, ETH 149 und ETH 1644 (vgl. Fig. 4.2), wurden im Hinblick auf Bestimmungen von therapeutischen Li^+ -Konzentrationen im Blut bzw. im Serum untersucht. Dabei wurden ein polares (o-NPOE) und ein apolares Lösungsmittel (BBPA) eingesetzt (vgl. Tab. 9.1). Die mittels der Membran Li2 bzw. Li4 (beide mit BBPA als Weichmacher) erhaltenen Elektrodenfunktionen weisen die besten Steigungen und die tiefsten Nachweisgrenzen auf (vgl. Tab. 9.2). Solche Funktionen sind in [453] abgebildet. Die der mittleren therapeutischen Li^+ -Konzentration (1 mmol L^{-1}) im Blutserum entsprechende Li^+ -Aktivität liegt bei 0.77 mmol L^{-1} und befindet sich in beiden Fällen noch knapp im linearen Bereich der Elektrodenfunktion.

Tabelle 9.1. Zusammensetzung (in Gew.-%) von Li^+ -selektiven Flüssigmembranelektroden (vgl. Fig. 4.2 und 4.3).

Membran	Ligand [Gew.-%]	Weichmacher [Gew.-%]	Matrix [Gew.-%]
Li1	1.0 ETH 149	65.7 o-NPOE	33.3 PVC
Li2	1.0 ETH 149	66.4 BBPA	32.6 PVC
Li3	1.2 ETH 1644	66.0 o-NPOE	32.8 PVC
Li4	1.1 ETH 1644	66.1 BBPA	32.8 PVC

Tabelle 9.2. Eigenschaften der Elektrodenfunktion der Li^+ -selektiven Elektroden^{a)}.

Membran	Elektrodenbauart ^{b)}	Steigung ^{c)} [mV]	Linearer Bereich ^{d)} ($\log a_{\text{Li}}$)	Nachweisgrenze ^{e)} ($\log a_{\text{Li}}$)
Li1	Makro	51.6 ± 2.7	$-3.1 \div -1.0$	-3.6
Li2	Makro	57.3 ± 0.4	$-3.1 \div -1.0$	-5.0
	Mini	55.0 ± 0.7	$-3.1 \div -1.0$	-4.8
Li3	Makro	53.4 ± 0.6	$-3.1 \div -1.0$	-4.3
Li4	Makro	55.4 ± 1.5	$-3.1 \div -1.0$	-4.6

a) Innenableitelektrolyt: $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ LiCl}$

b) Makro: Makroelektrode (vgl. 11.1)

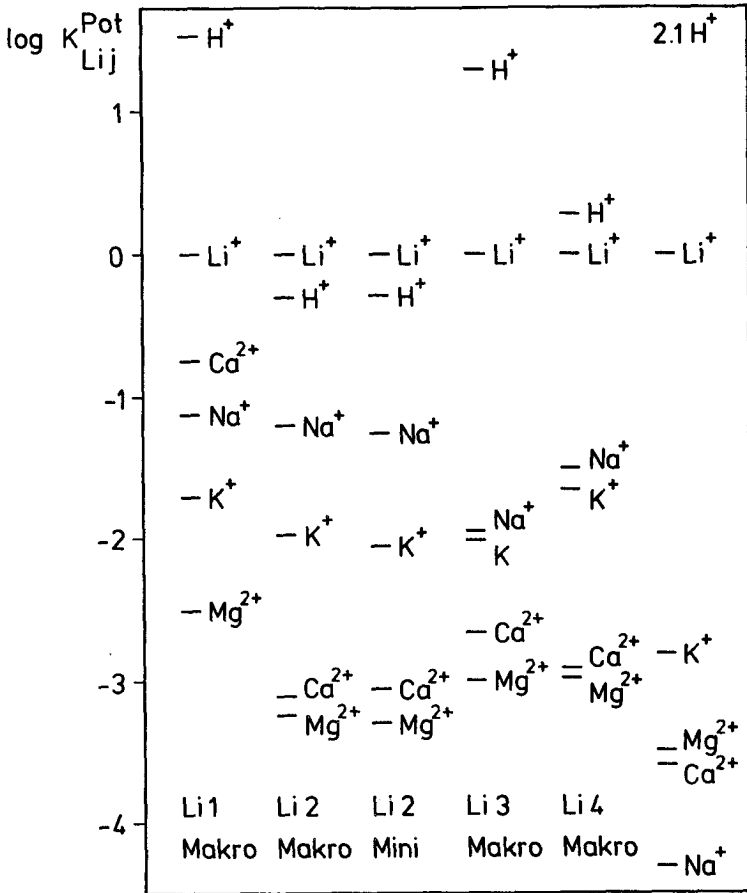
Mini: Minielektrode (vgl. 11.2)

c) Standardabweichungen sind aufgeführt

d) Bereich der linearen Regression zur Ermittlung der Steigung s

e) Vgl. [228]

In Figur 9.1 sind die Selektivitätsfaktoren der auf Ligand ETH 149 bzw. ETH 1644 beruhenden Flüssigmembranelektroden zusammengestellt. Die gegenüber den anderen Alkalimetallionen selektivste Membran ist eindeutig die Membran Li3. Dabei ist das polare Lösungsmittel (o-NPOE) vorteilhaft im Vergleich zu einem weniger polaren Weichmacher (BBPA, vgl. Membran Li4). Im Gegensatz dazu brachte im Vergleich zur Membran Li1 der Einsatz des Liganden ETH 149 im apolaren Lösungsmittel (vgl. Membran Li2) eine Erhöhung der Selektivität gegenüber zweiwertigen Ionen mit sich. Keine der vier untersuchten Flüssigmembranen erreicht jedoch die geforderten $K_{\text{Li,j}}^{\text{Pot}}$.



Figur 9.1. Selektivitätsfaktoren der Li⁺-selektiven Flüssigmembranelektroden (Methode der getrennten Lösungen, SSM (0.1 mol L⁻¹ Chloridlösungen); Membran und Elektrodenbauart sind angegeben; letzte Kolonne: geforderte log K_{Lij}^{Pot} -Werte für die Erfassung therapeutischer Li⁺-Konzentrationen; vgl. Tab. 4.6).

Werte (vgl. letzte Kolonne in Fig. 9.1), wonach bei Variation der Konzentration eines gegebenen Störions im physiologischen Bereich der Fehler in der bestimmten therapeutischen Li^+ -Konzentration nicht 1 % überschreitet. Bei Anwendung eines geeigneten Eichverfahrens ist dennoch ein Einsatz der aufgeführten Elektroden zur Bestimmung therapeutischer Li^+ -Konzentrationen in Blutserum denkbar.

9.3 Einsatz von lithiumselektiven Flüssigmembranelektroden im Blutserum

Im Hinblick auf Messungen im Serum wurden Elektroden auf Grund ihrer Elektrodenfunktion, EMK-Stabilität und Selektivität ausgewählt. Dabei wurden die Elektroden mit den Membranen Li2 bzw. Li4 weiter berücksichtigt. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit öfters beobachtet, dass der Ersatz eines polaren durch ein apolares Membranlösungsmittel eine Zunahme der EMK-Stabilität bewirkt. Im Falle dieser untersuchten Flüssigmembranelek-

Tabelle 9.3. Zusammensetzung der Li^+ -Eichlösungen.

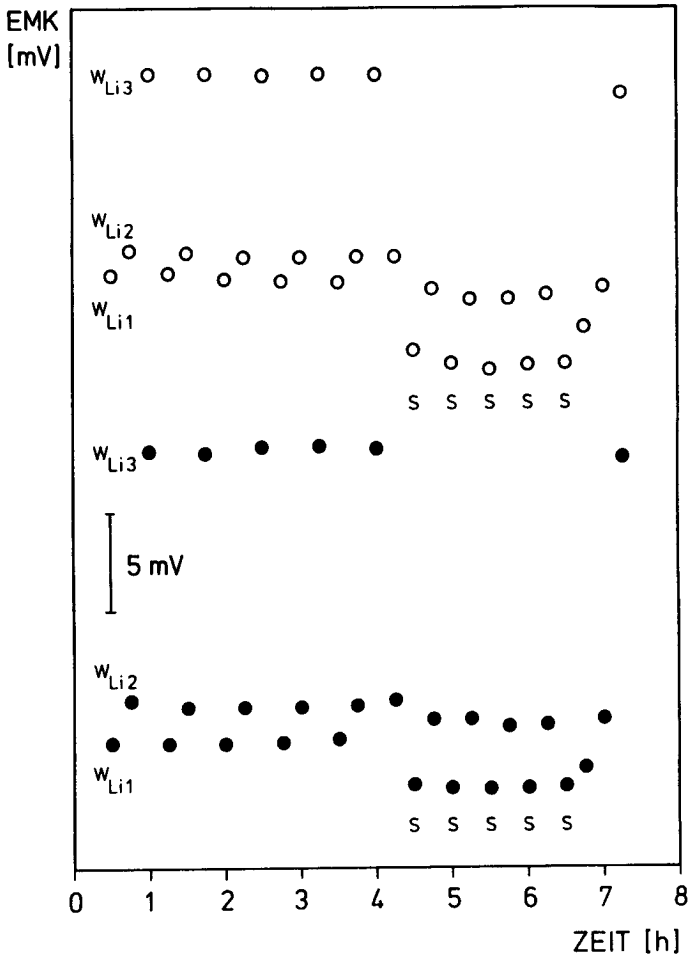
Eichlösung	Zusammensetzung ^{a)} [mmol L ⁻¹]				
	Li^+	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}
W_{Li1}	0.5	140.0	4.0	1.1	0.6
W_{Li2}	1.0	140.0	4.0	1.1	0.6
W_{Li3}	5.0	140.0	4.0	1.1	0.6

a) Als Chloride der entsprechenden Kationen

troden war denn auch trotz einer gewissen Einbusse an Selektivität die erhöhte Stabilität für die Auswahl massgebend.

In Figur 9.2 sind die mittels Membran Li2 bzw. Li4 (beide in Makroelektroden) in den Eichlösungen und in einer Serumprobe erhaltenen EMK-Endwerte als Funktion der Zeit dargestellt. Die Eichlösungen W_{Li1} , W_{Li2} und W_{Li3} (vgl. Tab. 9.3) wurden fünfmal nacheinander gemessen und anschliessend wurde die Eichlösung W_{Li2} alternierend mit einer Serumprobe ($0.99 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Li}^+$ (LiCl wurde zugegeben), $144 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}^+$; flammenphotometrische Bestimmung) gemessen. Zur Kontrolle wurde anschliessend mit Hilfe der drei Eichlösungen eine Eichung durchgeführt. Vor dem Kontakt mit Serum lieferten beide Elektroden in den wässrigen Eichlösungen relativ konstante EMK-Endwerte (im Bereich $\pm 0.15 \text{ mV}$). Der erste Serumkontakt führte allerdings zu einer Verschiebung des Standardpotentials der Messkette um -1.6 mV (Membran Li2) bzw. -1.0 mV (Membran Li4). Die nach diesem einmaligen sogenannten E^0 -Shift mittels Membran Li4 erhaltenen EMK-Werte waren sowohl in der Eichlösung W_{Li2} als auch in der Serumprobe nahezu konstant (Bereich: $\pm 0.1 \text{ mV}$). Der im Serum gemessene EMK-Wert war leider um etwa 2.5 mV zu tief, da gemäss der flammenphotometrischen Bestimmung die Li^+ -Konzentrationen in der Serumprobe und in der Eichlösung W_{Li2} identisch waren.

Eine genügend genaue Bestimmung der Li^+ -Konzentration im Blutserum zur Ueberwachung der Behandlung von manisch-depressiven Psychosen ist mittels den untersuchten Li^+ -selektiven Flüssigmembranelektroden nicht realisierbar. Zu diesem Zweck ist die Entwicklung insbesondere gegenüber Na^+ selektiverer Li^+ -Carrier erwünscht.



Figur 9.2. Zeitlicher Verlauf der mittels Membran Li2 (○) bzw. Li4 (●) (beide in Makroelektroden) in den drei Eichlösungen (vgl. 9.3) und in einer Serumprobe erhaltenen EMK-Endwerte. Die der Serumprobe entsprechenden Messwerte wurden mit S beschriftet, die übrigen Punkte entsprechen den Eichlösungen.

10. SIMULTANE, KONTINUIERLICHE IN SITU BESTIMMUNG DER KONZENTRATION BZW. AKTIVITÄT VON H^+ , Na^+ , K^+ und Ca^{2+} IM BLUT

10.1 Einleitung

In den Kapiteln 5 bis 8 wurde die Zuverlässigkeit von quantitativen, potentiometrischen Na^+ -, K^+ -, Ca^{2+} - und H^+ -Bestimmungen im Blutserum bzw. im Vollblut mittels ionenselektiver Flüssigmembranelektroden aufgezeigt. Auf Grund dieser positiven Ergebnisse wurde zusätzlich ein gleichzeitiger Einsatz der vier ionenselektiven Flüssigmembranen im optimierten Durchflusssystem (vgl. 7.4 und 11.3) angestrebt. Eine solche Anordnung ermöglicht die kontinuierliche in situ Ionenaktivitätsbestimmung im Blutbypass eines lebenden Versuchstiers (z. B. eines Hundes). Durch das geringe Volumen des extrakorporalen Blutkreislaufs sind solche Messungen auch an kleinen Versuchstieren (z. B. Kaninchen, Ratten) denkbar.

Membranelektrodensysteme mit hoher Lebensdauer sind im Hinblick auf längere, ununterbrochene Messungen im fließenden Blut unentbehrlich. Dementsprechend wurde die Zusammensetzung der ursprünglichen Membranen durch den Einsatz eines neu eingeführten, hoch lipophilen Weichmachers verändert.

10.2 Einsatz eines hoch lipophilen Weichmachers in Flüssigmembranen

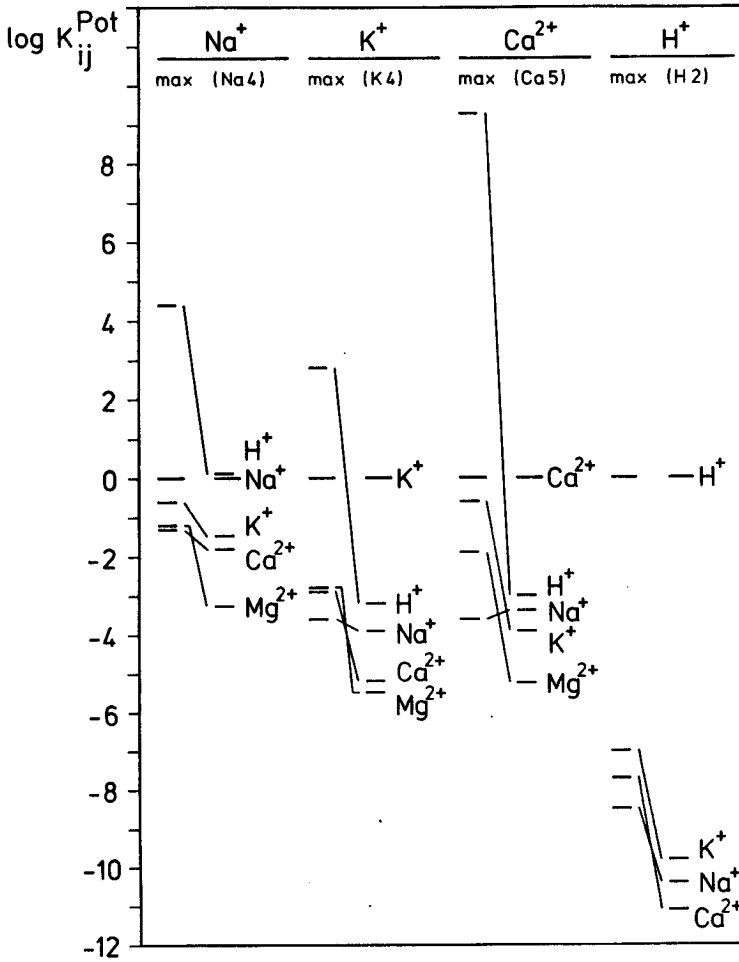
Ausgehend von der für Messungen in Blut optimierten Zusammensetzung der Na^+ -, K^+ -, Ca^{2+} - und H^+ -selektiven Flüssigmembranen (Membran Na3, K2, Ca3 und H1) wurden vier neuartige ionenselektive Membranen geplant. Dabei wurde in allen Membranen (vgl. Tab. 10.1) derselbe neuartige Weichmacher (ETH 469, vgl. Fig. 4.3) eingesetzt. Ausschlaggebend für die Wahl dieses Weichmachers war dessen gegenüber BBPA und DOS erhöhte Lipophilie (vgl. Tab. 4.5). Bei den Membranen ohne Boratzusatz (Membran Na4 und K4) brachte diese Weichmacherwahl eine Erhöhung des spezifischen elektrischen Widerstandes im Vergleich zu den ursprünglichen Membranen (Membran Na3 und K2; vgl. Tab. 10.1 bzw. Tab. 5.1 und 6.1). Der Widerstand der Ca^{2+} - und der H^+ -selektiven Membran (beide mit Boratzusatz) blieb aber nahezu unverändert (vgl. Membran Ca5 und H2 in Tab. 10.1, bzw. Membran Ca3 in Tab. 7.2 und Membran H1 auf S.166).

Tabelle 10.1. Zusammensetzung (in Gew.-%) und spezifischer Widerstand [Ω cm] von ionenselektiven Flüssigmembranen (vgl. Fig. 4.2 und 4.3).

Membran	Ligand [Gew.-%]	Zusatz [Gew.-%]	Weichmacher [Gew.-%]	Matrix [Gew.-%]	Spezifischer Widerstand [Ω cm]
Na4	1.2 ETH 227	-	66.3 ETH 469	32.5 PVC	$1.6 \cdot 10^9$
K4	1.3 Valinomycin	-	68.3 ETH 469	30.4 PVC	$7.7 \cdot 10^8$
Ca5	3.3 ETH 1001	2.1 KTpClPB	63.7 ETH 469	30.9 PVC	$4.4 \cdot 10^7$
H2	1.0 TDDA	0.5 KTpClPB	65.6 ETH 469	32.9 PVC	$1.7 \cdot 10^7$

Die Eigenschaften der vier neuen ionenselektiven Membranen (Na4, K4, Ca5 und H2) wurden sowohl in Makroelektroden als auch in Durchflusselektroden untersucht (vgl. [216]). Im Vergleich zu den ursprünglich optimierten Membranen (Na3, K2, Ca3 und H1) wurden nahezu identische Elektrodenfunktionen gemessen. Auch die Selektivitäten der Membranen mit dem Weichmacher ETH 469 blieben im wesentlichen erhalten. In Figur 10.1 sind die in Durchflusselektroden gemessenen Selektivitätsfaktoren ($\log K_{ij}^{\text{Pot}}$ -Werte) dieser Membranen den geforderten, maximalen Werten für Messungen in Blut (vgl. 4.3.1; maximaler selektivitätsbedingter Aktivitätsfehler: 1 %) gegenübergestellt. Diese Darstellung veranschaulicht die uneingeschränkte Einsetzbarkeit der vier optimierten ionenselektiven Elektroden in Blut.

Im Hinblick auf längere kontinuierliche Messungen in einem extrakorporalen Blutkreislauf wurde die Stabilität der EMK in einer wässrigen Elektrolytlösung (vgl. Eichlösung W_2' in Tab. 10.2) für jede Durchflusselektrode bestimmt. Die Standardabweichungen um den Mittelwert (Messdauer: 5 Stunden; $n = 100$) lagen bei ± 0.12 mV (Membran Na4), ± 0.03 mV (Membran K4), ± 0.03 mV (Membran Ca5) und ± 0.08 mV (Membran H2). Während dieser Messung wurde eine Abweichung (sogenannter Drift) der EMK von $+0.03$ mV h^{-1} (Na4), $+0.01$ mV h^{-1} (K4), $+0.01$ mV h^{-1} (Ca5) bzw. -0.03 mV h^{-1} (H2) beobachtet. Die Reproduzierbarkeit der Differenz zwischen den in einer wässrigen Eichlösung (W_2' , vgl. Tab. 10.2) bzw. in einer Serumprobe gemessenen EMK-Werten ($EMK(W_2') - EMK(S)$) lag bei ± 0.05 mV (Na4), ± 0.10 mV (K4) und ± 0.09 mV (Ca5) (die Standardabweichungen sind aufgeführt; $n = 5$). Da diese Messung unter aeroben Bedingungen durchgeführt wurden, wird kein Wert für die H^+ -selektive Membran angegeben. Die im Durchflusselektrodensystem mittels Membran Na4, K4, Ca5 bzw. H2 erhaltenen Stabilitäten bzw. Reproduzierbarkeiten der EMK-Werte sind mit den im Hinblick auf klinisch relevante Bestimmungen im Blut gestellten Anforderungen (vgl. Tab. 4.7) durchaus in Übereinstimmung.



Figur 10.1. Geforderte ($\log K_{ij,max}^{Pot}$ -Werte; vgl. 4.3.1) bzw. in Durchflusselektroden (Membran Na4, K4, Ca5 und H2) bestimmte Selektivitätsfaktoren.

10.3 Simultane Eichung der H^+ -, Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -selektiven Flüssigmembranelektroden

Eine aufeinanderfolgende Eichung jeder einzelnen Elektrode ist aus zeitlichen Gründen für den klinischen Gebrauch kaum denkbar. Folglich ist eine simultane Eichung sämtlicher Sensoren anzustreben. Die Herstellung solcher Lösungen ist nicht zuletzt wegen der Wahl eines pH-Puffers (vgl. auch 7.3.2) mit Schwierigkeiten verbunden. Die simultane Eichung von lediglich Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -selektiven Elektroden ist dagegen problemlos. Bei dem zusätzlichen Einsatz einer pH-Elektrode wird eine genaue Eichung wesentlich komplexer (vgl. [269]), da die im physiologischen pH-Bereich wirksamen Puffer vielfach mit Erdalkalitionen und in gewissen Fällen auch mit Alkalitionen Komplexe bilden. Durch eine Korrektur für die Komplexbildung kann aber trotzdem eine genaue, simultane Eichung H^+ -, Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -selektiver Elektrodenmessketten durchgeführt werden. Diese Variante wurde im Rahmen dieser Arbeit angewandt.

Die Steigung der Elektrodenfunktionen der Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -selektiven Durchflusselektroden wurde mit Hilfe der drei ungepufferten Eichlösungen W_1 , W_2 und W_3 (vgl. Tab. 10.2) bestimmt. Der für jede einzelne Elektrode erhaltene Wert gilt als richtige Steigung ($s_{r,i}$). Anschliessend wurde die Steigung der Elektrodenfunktionen mittels den mit TRIS pH-gepufferten Eichlösungen W'_1 , W'_2 und W'_3 (vgl. Tab. 10.2) ermittelt. Ausser für die H^+ -selektive Elektrode wurden dabei möglicherweise falsche Steigungen ($s_{f,i}$) erhalten, welche mit den entsprechenden richtigen Steigungen ($s_{r,i}$) in einem linearen Zusammenhang stehen:

$$s_{r,i} = E s_{f,i} \quad (10.1)$$

Der Proportionalitätsfaktor E ist im Idealfall für jede Elektrode konstant. Da dieser Koeffizient für die Na^+ -, K^+ - bzw. Ca^{2+} -selektive Elektrode nahezu ideal war (1 ± 0.02), konnte in der Folge auf Korrekturen der mit Hilfe der Eichlösungen W'_1 , W'_2 und W'_3 erhaltenen Steigungen ver-

Tabelle 10.2. Zusammensetzung [mmol L^{-1}] von Eichlösungen zur simultanen Eichung von H^{+} -, Na^{+} -, K^{+} - und Ca^{2+} -selektiven Elektroden.

Eichlösung	Zusammensetzung [mmol L^{-1}]					pH ^{b)}
	NaCl	KCl	CaCl_2	MgCl_2	TRIS ^{a)}	
W_1	50.0	1.0	0.5	0.6		
W_2	140.0	4.0	1.1	0.6		
W_3	250.0	10.0	5.0	0.6		
W'_1	50.0	1.0	0.5	0.6	50.0	8.02
W'_2	140.0	4.0	1.1	0.6	50.0	7.50
W'_3	250.0	10.0	5.0	0.6	50.0	6.93

a) Tris(hydroxymethyl)aminomethan

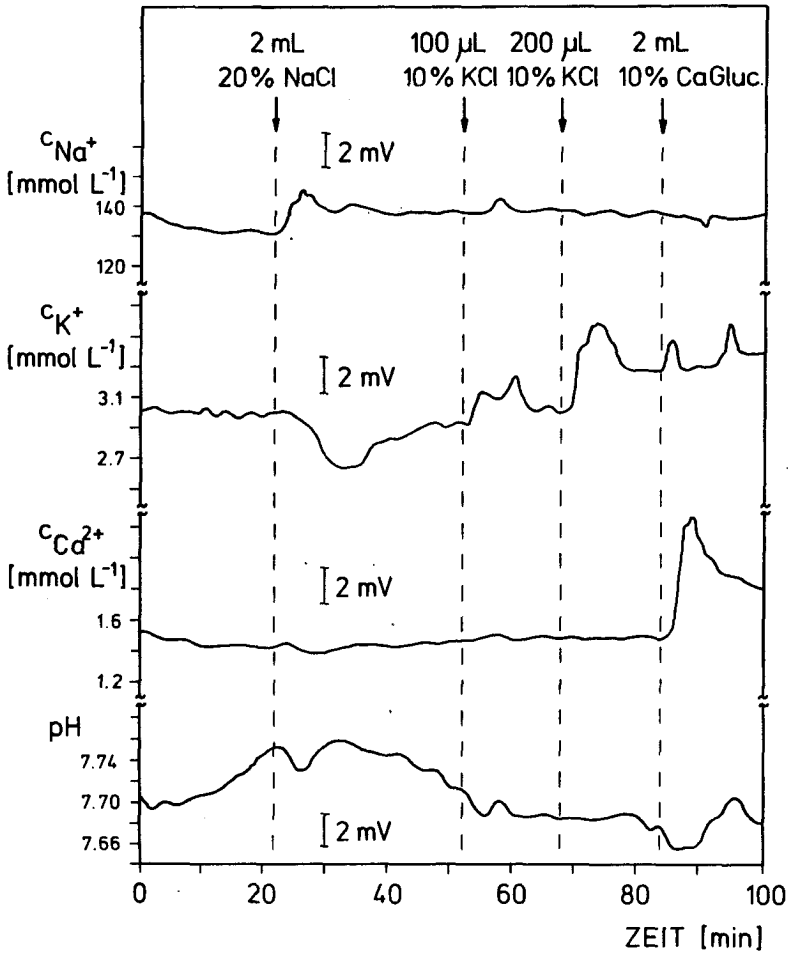
b) Mittels einer H^{+} -selektiven Glasmembranelektrode gemessene Werte. Die angegebenen pH-Werte wurden jeweils mit Salzsäure eingestellt.

zichtet werden. Die daraus folgenden Fehler in den Na^{+} -, K^{+} - und Ca^{2+} -Konzentrationen sind $<0.2\%$. Modellberechnungen haben zusätzlich gezeigt, dass Fehler in der Steigung sich bei der Auswertung wesentlich geringer auswirken als Fehler im Standardpotential bzw. Unsicherheiten in der EMK der Eichlösung W'_2 (vgl. Gl. 4.61).

10.4 Simultane, kontinuierliche Bestimmung der Konzentration bzw. Aktivität von H^+ , Na^+ , K^+ und Ca^{2+} im extrakorporalen Blutkreislauf beim wachen Hund bzw. Kaninchen

Die vier ionenselektiven Durchflusselektroden (Membran H2, Na4, K4 bzw. Ca5) wurden mittels der Elektrolytlösungen W_1' , W_2' und W_3' geeicht. Während des Aufbaus des extrakorporalen Blutkreislaufs beim wachen Hund (Beagle) bzw. Kaninchen, wurden die EMK-Werte in der fließenden Eichlösung W_2' verfolgt (vgl. 7.4). Nach der Messung im extrakorporalen Blutkreislauf wurde jeweils nochmals mit Hilfe der drei Eichlösungen die Steigung der Elektrodenfunktionen kontrolliert.

In Figur 10.2 ist der zeitliche Verlauf der Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Konzentration sowie des pH-Wertes im Blut eines wachen Kaninchens dargestellt. Um das Ansprechverhalten der Elektrode zu überprüfen, wurden verschiedene Salzlösungen intravenös injiziert. Dabei verliefen die ermittelten Konzentrationsänderungen erwartungsgemäss. Vor bzw. nach dieser Messung im fließenden Blut (6 Stunden; in Fig. 10.2 ist nur ein Ausschnitt dargestellt) wurden Verschiebungen der EMK-Werte in der Eichlösung W_2' von +0.06 mV (Membran Na4), +0.11 mV (Membran K4), +0.11 mV (Membran Ca5) und +0.37 mV (Membran H2) beobachtet. Diese Reproduzierbarkeitsangaben und die Ergebnisse von zusätzlich ausgeführten Messungen im extrakorporalen Blutkreislauf bei wachen Hunden bzw. Kaninchen (vgl. Fig. 10.2) belegen die Einsetzbarkeit der verwendeten ionenselektiven Flüssigmembranen (Membran Na4, K4, Ca5 und H2) sowie des Durchflusssystems für pharmakokinetische Untersuchungen (vgl. auch 7.4).



Figur 10.2. Zeitlicher Verlauf der im extrakorporalen Blutkreislauf eines wachen Kaninchens simultan ermittelten Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen und des pH-Wertes.

11. ELEKTRODENBAUARTEN, POTENTIOMETRISCHE MESSMETHODEN UND AUSWERTEVERFAHREN

11.1 Makroelektroden

Wegen des einfachen und reproduzierbaren Einbaus von ionenselektiven Flüssigmembranen in gewisse Makroelektrodenkörper (z. B. Philips IS-561; N. V. Philips' Gloeilampenfabrieken, Eindhoven, Holland; vgl. Fig. 10 in [367]) wurde zur Charakterisierung von neuartigen Membranen dieser Elektrodentyp gewählt (vgl. Kap. 5 bis 9). Als externe Makroreferenzelektrode wurde eine Kalomelektrode mit Brückenelektrolyt und Schliffdiaphragma eingesetzt (Philips R 44/2 SD-2; Referenzelektrolyt: gesättigte, wässrige Lösung von KCl; Brückenelektrolyt: $3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$). Die EMK-Messungen wurden diskontinuierlich (Proben in offenen Kunststoffbehältern) an jeweils etwa 40 mL Messlösung durchgeführt. Die Herstellung der Membranen erfolgte je nach Membranmatrix (PVC bzw. Silikongummi) nach einer der beiden folgenden Varianten.

PVC-Membranen. Die einzelnen Komponenten (zusammen jeweils ~180 mg) wurden in ein Pillenglas eingewogen und mit etwa 2 mL Tetrahydrofuran (THF), welches unmittelbar vor dem Gebrauch destilliert wurde, aufgelöst. Diese Membranlösung wurde in einen auf einer Glasplatte liegenden plan-geschliffenen Glasring (Innendurchmesser: 24 mm) gegossen. Nach dem Verdunsten des THF (nach etwa 12 Stunden) wurden aus der zurückbleibenden Membran (Dicke: ~0.2 mm) mittels eines Korkbohrers Membranscheiben von 7 mm Durchmesser ausgestanzt und in Makroelektrodenkörper eingebaut.

Silikongummimembranen. Die Membrankomponenten wurden eingewogen (zusammen jeweils ~180 mg) und in etwa 2 mL Methylenchlorid gelöst. Diese Membranlösung wurde in einen auf einer Teflonplatte ruhenden Glasring gegossen. Während des Verdunstens des Methylenchlorids scheint die Vernetzung der Matrix vollständig abzulaufen. Anschliessend wurden aus der resultierenden Membran (Dicke: ~0.2 mm) ebenfalls Scheiben von 7 mm Durchmesser gestanzt.

11.2 Minielektroden

Auch bei der Herstellung der Flüssigmembranminielektroden ist das Verfahren von der Membranmatrix abhängig.

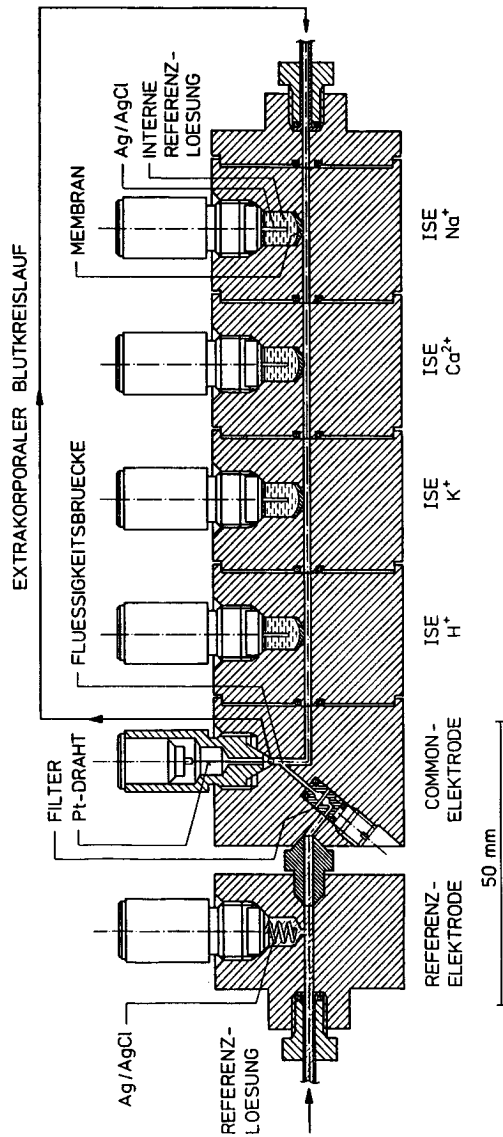
Minielektroden mit PVC-Flüssigmembranen. Die Membranscheibe (Durchmesser: 7 mm) wurde mit einer Messingkappe über das Ende eines PVC-Schlauches (Länge: ~4 cm; Querschnitt: 5 mm (a. D.), 3 mm (i. D.)) gespannt. Die Membran wurde dann auf den Kunststoffschlauch geschweisst, indem die Metallkappe kurz auf eine Heizplatte gedrückt (10 Sekunden bei 120 °C) und anschliessend in kaltes Wasser getaucht wurde. Der durch dieses Verfahren nicht vollständig angeschweisste Membranrand wurde mit einem aufgeheizten Draht an den PVC-Schlauch verschmolzen. Der Elektrodenkörper wurde mit innerer Referenzlösung gefüllt und mit einem elektrischen Ableitelement (chlorierter Silberdraht und Stecker (LEMO-Koaxialkupplung, RCS. OA. 250; Lemo SA, 1110 Morges)) versehen.

Minielektroden mit Silikongummimembranen. Die Silikongummi-Membranscheibe (Durchmesser: 7 mm) wurde mit einer Silikonlösung (Silopren und Vernetzer (10 Gew.-%) in zwei Teilen Methylenchlorid) auf ein Stück Silikongummschlauch (Länge: ~4 cm; Querschnitt: 5 mm (a. D.), 3 mm (i. D.)) geklebt. Der über den Schlauchrand vorstehende Membranteil wurde mit einer Rasierklinge abgeschnitten. Wie bei den PVC-Minielektroden wurde ein Ableitelement auf das andere Ende des Elektrodenchaftes aufgesetzt.

Ausser bei direkten Vergleichsmessungen mit Membranen in Makroelektroden oder mit einer pH-Glaselektrode (vgl. 8.4) wurden die ionenselektiven Minielektroden in dem für diese Elektrodenbauart enzwickelten Durchflusssystem eingesetzt (vgl. die schematische Darstellung dieses Systems in [32, 132]). Eine dazu passende Referenzelektrode [17] (Brückenelektrolyt: 3 mol L⁻¹ NH₄Cl) und eine Commonminielektrode (Platindraht in einer Glaskapillare als Elektrodenkörper) ermöglichten dabei die differentielle Messung der EMK. Eine peristaltische Pumpe saugte bei einer Flussgeschwindigkeit von 18 mL h⁻¹ die Messlösung in das Durchflusselektrodensystem. Die EMK-Messungen erfolgten jedoch bei ruhender Probelösung.

11.3 Durchflusselektrodensystem

Ein bereits früher entwickeltes Durchflusselektrodensystem [43, 137, 318] wurde in einer veränderten Version vor allem bei kontinuierlichen Messungen im extrakorporalen Blutkreislauf von wachen Tieren eingesetzt (vgl. Kap. 7 und 10). In Figur 11.1 ist die Messanordnung, die zur simultanen quantitativen H^+ -, Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Bestimmung (vgl. Kap. 10) verwendet wurde, in einem Längsschnitt dargestellt. Die Durchflusselektrodenkörper wurden aus Stücken eines Poly(methylmethacrylat)-Stabes (Plexiglas) angefertigt. Die Referenz- und die Commonelektrode wurden mit Hilfe eines Poly(tetrafluoroäthylen)-Doppelkonus (Teflon) miteinander verbunden, während die übrigen Verbindungen mittels Silikongummi-O-Ringen gewährleistet wurden. Die Elektrodenkörper wurden in einem Aluminiumgehäuse zusammengesetzt und befestigt. Eine peristaltische Pumpe (Perpex Modell A; H. J. Guldener, 8047 Zürich) saugte die Probelösung mit einer Flussgeschwindigkeit von 18 mL h^{-1} durch den Messkanal. Eine zweite Pumpe förderte den Referenzelektrolyten (0.9 mL h^{-1}) durch eine Verengung in die Probelösung (vgl. Fig. 7.7 und 11.1). Erfahrungsgemäss muss dabei das Verhältnis der Flussgeschwindigkeit des Referenzelektrolyten zu der der Messlösung mindestens 1:10 sein. Ein Filter aus Celluloseacetat (Porengrösse: $8 \mu\text{m}$; Typ SC; Millipore SA, 67120 Molsheim, France) wurde zusätzlich zur Verengung des Referenzelektrolytenkanals als Restriktion eingesetzt (vgl. Fig. 11.1). Um eine Verstopfung dieser Restriktion bzw. die Bildung von Luftblasen möglichst zu verhindern, wurde die Referenzlösung jeweils filtriert und entgast. Zwischen der Pumpe und der Referenzelektrode wurde ein Filter aus Teflon (Porengrösse: $10 \mu\text{m}$; Typ LC, Millipore SA) in die Zuleitung des Referenzelektrolyten eingebaut (vgl. Fig. 7.7). Die Kunststoffdeckel der Pumpen, der Behälter der Referenzlösung und sämtliche Schläuche wurden mit angepassten Metallabschirmungen bzw. Drahtwicklungen versehen. Diese Abschirmungen, das Aluminiumgehäuse und die Halterung des Versuchstiers wurden geerdet.



Figur 11.1. Längsschnitt des Durchflusselektrodensystems.

Die ionenselektiven Flüssigmembranen wurden direkt in die einzelnen Elektrodenkörper gegossen. Dabei wurde der Probekanal mit einem Teflonschlauch verdichtet. Mit einer Mikropipette wurden dann 40 μL Membranlösung (Membranlösung: ~ 180 mg Membrankomponentengemisch, 2 mL THF; vgl. 11.1) in den für die Innenableitlösung vorgesehenen Raum gegossen. Das THF wurde mit einem schwachen Stickstoffstrom inert etwa drei Minuten abgedampft. Nach dem vollständigen Trocknen der Membran mit einem stärkeren Gasstrom wurde der Teflonschlauch sorgfältig aus dem Probekanal entfernt. Nach dem Einfüllen mit Innenableitlösung wurde die innere Ableitelektrode (Ag/AgCl), welche bereits mit dem Stecker versehen war, auf den Elektrodenkörper geschraubt.

Für Vergleichsmessungen wurde zusätzlich eine H^+ -selektive Glasmembran-durchflusselektrode hergestellt. Dabei wurde ein Stück eines H^+ -selektiven Glasrohrs (Glasbläserei W. Möller, 8050 Zürich) in einem hohlen Elektrodenkörper eingeklebt. Die sensitive Membran diente somit gleichzeitig als Probekanal (vgl. Fig. 3.1 c)).

Mit dieser Durchflusselektrodenanordnung (Fig. 11.1) wurden die Potentialdifferenzen zwischen Referenzelektrode (Ag/AgCl) und ionenselektiven Elektroden differentiell relativ zur Commonelektrode (Platindraht) gemessen. Diese Messtechnik erhöht die Stabilität der Potentialmessungen [43, 137, 318, 458, 459].

Die technischen Zeichnungen der verschiedenen Teile des Durchflusselektrodensystems wurden von Herrn R. E. Dohner (Laboratorium für organische Chemie ETH, Gruppe von Prof. Dr. W. Simon) angefertigt. Herr H. Schnyder (Werkstatt des Laboratoriums für organische Chemie ETH) stellte die einzelnen Teile her.

11.4 Messgeräte

Die EMK der Makroelektrodenmessketten wurde üblicherweise mit einem integrierten Impedanzwandler (Eingangsimpedanz: $10^{14} \Omega$; operational amplifier Philbrick 1702-01; Teledyne Philbrick, Denham, MA 02026, U. S. A.) in Verbindung mit einem Digitalvoltmeter (Solartron A 240; Solartron Electronic Group Ltd., Farnborough, Hampshire, England) gemessen und in vorgewählten Zeitabständen mit einem Drucker (Print Swiss DT 21 MK II; Wenger Datentechnik, 4053 Basel) registriert. Die Durch die Messeinrichtung bedingte Standardabweichung eines Einzelwertes beträgt ± 0.1 mV.

Die Messung der EMK der Minielektroden erfolgte vorwiegend nach der differentiellen Technik. Die ionenselektive Elektrode und die Referenzelektrode wurden mit FET-Operationsverstärkern (AD 515 KH (Eingangsimpedanz: $2 \text{ pF} \parallel 10^{15} \Omega$); Analog Devices, Norwood, MA 02026, U. S. A.) versehen, und die Potentialdifferenzen wurden relativ zur Commonelektrode gemessen. Das Analogsignal des Differentialverstärkers wurde in ein Digitalsignal umgewandelt (Analog-Digital-Wandler, analog interface board DT 1744; Data Translation, Natick, MA, U. S. A.; EMK-Auflösung: 0.1 mV). Die Messdaten mit den entsprechenden Zeitangaben und Kanalbezeichnung wurden im Hinblick auf spätere Auswertungen mittels eines Kleincomputers gespeichert (single-board computer SBC 80/20-4; SBC 116 A; Intel Corp., Santa Clara, CA 95051, U. S. A.; arithmetic processor AMC 95/6011; Advanced Micro Computers, Santa Clara, CA 95051, U. S. A.). Ein Bildschirm (display terminal ADDS Regent 20; Applied Digital Data Systems Inc., Hauppauge, NY 11787, U. S. A.) und ein Drucker (Matrix-Drucker Print Swiss; Wenger Print Swiss Matrix, 4053 Basel) waren an dieser Speicher- und Rechneinheit angeschlossen. Die EMK-, Zeit- und Kanalangaben konnten auch auf Papierstreifen gestanzt werden (Facit 4070; Facit AB, Central Service Department, 59700 Åtvidaberg, Sweden) und mit Hilfe eines programmierbaren Tischrechners (HP-85; Hewlett-Packard, Colorado, U. S. A.) ausgewertet und dargestellt (Plotter HP-7225B) werden.

Die EMK-Messung mit dem Durchflusselektrodensystem erfolgte ebenfalls nach der differentiellen Messtechnik. Die Referenzelektrode und die ionenselektiven Elektroden wurden mit Impedanzwandlern (AD 515 KH) versehen. Das Analogsignal des Verstärkers (Philbrick 1702-01) wurde durch ein Digitalvoltmeter (Solartron LM 1604 DC; Messempfindlichkeit: ± 0.01 mV) umgewandelt. Die EMK-, Zeit- und Kanalangaben wurden mit Hilfe eines Druckers registriert und bei gewissen Experimenten auf Papierstreifen gestanzt. Während der Messungen an lebenden Tieren wurden die EMK-Werte kontinuierlich mit einem Schreiber (Recorder Serie 310; W+W Electronic, 4000 Basel) aufgezeichnet [217]. Dabei wurde ein nicht kommerziell erhältliches Digitalvoltmeter eingesetzt (EMK-Auflösung: 0.1 mV; Entwicklung und Herstellung: P. Périsset, Laboratorium für organische Chemie ETH, Gruppe von Prof. Dr. W. Simon).

11.5 Messmethoden und Auswerteverfahren

Die Elektrodenfunktionen (EMK gegen $\log a_i$) wurden jeweils in Chloridlösungen des entsprechenden Kations I zwischen $c_i = 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ und $c_i = 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ gemessen. Die Konzentrationen c_i wurden gemäss dem Debye-Hückel-Formalismus (vgl. 4.1.3) in Aktivitäten a_i umgerechnet und die gemessenen EMK-Werte wurden für Änderungen des Flüssigkeitspotentials gemäss dem Henderson-Formalismus korrigiert. Diese Auswertungen wurden mittels eines programmierbaren Tischrechners (Hewlett-Packard HP-9830 A; Programme P. C. Meier, Laboratorium für organische Chemie ETH, Gruppe von Prof. Dr. W. Simon) durchgeführt.

Die Selektivitätsfaktoren ($\log K_{ij}^{\text{Pot}}$) wurden gemäss der Methode der getrennten Lösungen (separate solution method, SSM [228]) in 0.1 mol L^{-1} Metallchloridlösungen ermittelt. Folgende, aus der Nicolsky-Gleichung (4.8) abgeleitete Beziehung wurde zur Auswertung der EMK-Messwerte benutzt (EMK_i: EMK in der Chloridlösung des Messions I; EMK_j: EMK in der Chloridlösung des Störions J):

$$\log K_{ij}^{\text{Pot}} = \frac{\text{EMK}_j - \text{EMK}_i}{s} - \log (a_j)^{z_i/z_j} + \log a_i \quad (11.1)$$

Der elektrische Widerstand R_M der ionenselektiven Membran wurde gemäss einer Vergleichsmethode [429, 460] ermittelt. Die EMK der ionenselektiven Elektrodenmesskette (U_0) wurde in einer 0.1 mol L^{-1} Chloridlösung des Ions I gemessen. Anschliessend wurde ein gegenüber dem zu bestimmenden Membranwiderstand R_M hoher Widerstand R_p von bekanntem Wert ($R_p \gg R_M$) parallel zu R_M geschaltet. Dabei wurde über den eingeführten Vergleichswiderstand ein Spannungsabfall ΔU ($\Delta U = U_0 - U_p$) registriert. Mit Hilfe folgender Beziehung wurde der Membranwiderstand ermittelt:

$$R_M = \frac{U_0 - U_p}{U_p} R_p \quad (11.2)$$

Aus dieser Beziehung kann entnommen werden, dass bei einem Spannungsabfall ΔU von $U_0/2$, der Membranwiderstand R_M genau dem zugeschalteten Vergleichswiderstand R_p entspricht. Da die eingesetzten Vergleichswiderstände Toleranzen von 10 % aufweisen, entspricht diese Unsicherheit auch etwa der der ermittelten Membranwiderstände.

Bei der statistischen Auswertung der EMK-Werte wurde üblicherweise für jede gemittelte Grösse ein Streuwert ($\pm$) angegeben. Falls keine weiteren Angaben erfolgen, handelt es sich dabei um die Standardabweichung s der n Einzelwerte x_i um den Mittelwert $\bar{x}$:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (11.3)$$

Die Elektrodenfunktionen und Korrelationsgeraden wurden mittels linearer Regression erhalten:

$$Y = (B \pm s_B) X + (A \pm s_A) \quad (11.4)$$

Die Steigung B, der Achsenabschnitt A und die entsprechenden Streuwerte s_B bzw. s_A wurden mit Hilfe folgender Gleichungen berechnet (n Wertepaare (x;y)) [262]:

$$B = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad (11.5)$$

$$A = \frac{\sum y}{n} - B \frac{\sum x}{n} \quad (11.6)$$

$$s_X = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (11.7)$$

$$s_Y = \sqrt{\frac{\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}}{n - 1}} = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n - 1}} \quad (11.8)$$

$$s_B = \sqrt{\frac{1}{n - 2} \left[\left(\frac{s_Y}{s_X} \right)^2 - B^2 \right]} \quad (11.9)$$

$$s_A = s_B \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}} \quad (11.10)$$

Die Streuung um die Gerade bzw. die Reststreuung von Y auf X wurde gemäss folgender Beziehung berechnet:

$$s_{YX} = \sqrt{\frac{\sum (y - \hat{y})^2}{n - 2}} = s_B s_X \sqrt{n - 1} \quad (11.11)$$

Vielfach wird bei Vergleichsuntersuchungen der Korrelationskoeffizient r als Streuwert einer Regressionsgeraden angegeben:

$$r = \sqrt{B_{XY} \cdot B_{YX}} = B \frac{s_X}{s_Y} = \sqrt{1 - \frac{n - 2}{n - 1} \left(\frac{s_{YX}}{s_Y} \right)^2} \quad (11.12)$$

$$\text{falls } B_{XY} = B_{YX} : |r| = 1$$

Die Reststreuung s_{YX} ist ein Mass für die Streuung von Y um die Regressionsgerade (Standardfehler des Schätzwertes $\hat{y}$), wobei die Streuung von X aufgehoben wurde. Zwei Parallelen zur Regressionsgeraden im Abstand $\pm 2s_{YX}$ bilden ein Band, das 95.5 % der n Wertepaare enthält. Die Reststreuung ist eine relevantere Streugrösse als der übliche Korrelationskoeffizient r.

11.6 Verwendete Substanzen

Die wässrigen Lösungen wurden mit doppelt quarzdestilliertem deionisiertem Wasser zubereitet. Die verwendeten Chemikalien (von Fluka AG, 9470 Buchs oder von E. Merck, Darmstadt, BRD) waren jeweils mit den Reinheitsgraden puriss. bzw. p. a. vermerkt. Für die albuminhaltigen Lösungen wurde Albumin aus Rinderblut (Fraktion V, pulv., Fluka AG) verwendet.

Nahezu sämtliche eingesetzten Membrankomponenten können von Fluka AG bezogen werden.

TDDA : Tri-n-dodecylamin (Fluka 91660)
Valinomycin (Fluka 94675)
ETH 149 : N,N'-Diheptyl-N,N',5,5-tetramethyl-3,7-dioxanonandiamid
(ETH-Synthese 461 , Fluka 62557)
ETH 1644: cis-N,N,N',N'-Tetraisobutyl-1,2-cyclohexandicarboxamid
(ETH-Synthese 462 , Fluka 62559)
ETH 157 : N,N'-Dibenzyl-N,N'-diphenyl-1,2-phenylendioxydiacetamid
(ETH-Synthese [308], Fluka 71733)
ETH 227 : 1,1,1-Tris[1'-(2'-oxa-4'-oxo-5'-aza-5'-methyl)-dodecyl]propan
(ETH-Synthese [309], Fluka 71732)
ETH 1001: (-)-(R,R)-N,N'-Bis[(11-äthoxycarbonyl)undecyl]-N,N',4,5-tetramethyl-3,6-dioxyoctanamid
(ETH-Synthese [463], Fluka 21192)
o-NPOE : o-Nitrophenyl-n-octyläther
(ETH-Synthese gemäss [464], Fluka 73732)
BBPA : Bis(1-butylpentyl)adipat
(ETH-Synthese [465], Fluka 02150)
DOS : Bis(2-äthylhexyl)sebacat (Fluka 84818)
ETH 469 : 1,10-Bis[4'-(5''-nonyloxy-carbonyl)-butyryloxy]decane
(ETH-Synthese [466])
KTPClPB : Kalium-tetrakis(p-chlorophenyl)borat
(ETH-Synthese gemäss [467], Fluka 60591)
PVC : Poly(vinylchlorid)
(PVC 704 hochmolekular; Lonza AG, 3930 Visp; kann bei Fluka AG (Nr. 81393) bezogen werden)
THF : Tetrahydrofuran (Fluka 87369)
Silopren (Silopren K 1000; Bayer AG, Leverkusen, BRD)
Vernetzer (KA-1; Bayer AG)
Methylenchlorid (Fluka 66740)

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, welche hier nicht erwähnt wurden, wurden von den Firmen Fluka AG oder E. Merck bezogen.

12. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Messverfahren zur potentiometrischen Bestimmung der Konzentration von freiem Li^+ , Na^+ , K^+ und Ca^{2+} , der Konzentration des totalen Calciums, sowie der H^+ -Aktivität im Blut entwickelt. Dabei kamen Elektroden mit optimierten Flüssigmembranen beruhend auf ionenselektiven neutralen Carriern zum Einsatz. Ein Teil der Messungen wurde mittels eines im Laufe dieser Arbeit verbesserten Durchflusselektrodensystems durchgeführt.

Verschiedene grundlegende Probleme der Anwendung von ionenselektiven Elektrodenmessketten im Blut, wie z. B. der Einfluss von Proteinen, Pufferlösungen sowie Eichlösungen, oder Auswirkungen von Flüssigkeits- und Strömungspotentialen wurden diskutiert. Bedingt durch Proteine und Lipide sind so z. B. auf Grund unterschiedlicher Bezugsvolumina etwa um 6.8 % höhere Konzentrationswerte bei direkt potentiometrischen im Vergleich zu atomspektrometrischen Bestimmungen zu erwarten.

Die Einsetzbarkeit von zwei synthetischen, nicht makrocyclischen Ionophoren (ETH 157 und ETH 227) für Na^+ -Bestimmungen mittels PVC-Flüssigmembranelektroden im Blut wurde untersucht. Optimierte Membranen beruhend auf dem Na^+ -Liganden ETH 227 und dem PVC-Weichmacher Bis(1-butyl-pentyl)adipat erfüllten denn auch die gestellten Anforderungen. Die in 40 Serumproben ermittelten Na^+ -Konzentrationen korrelierten erwartungsgemäss mit den flammenphotometrisch erhaltenen Werten. Die direkt potentiometrisch bestimmten Konzentrationen waren durchschnittlich um 5.4 % höher als die Vergleichswerte.

Für die K^+ -Bestimmungen wurden herkömmliche PVC-Flüssigmembranen sowie Silikongummimembranen mit dem Antibiotikum Valinomycin als ionenselektiver Komponente eingesetzt. Die Brauchbarkeit beider Membranen für K^+ -Konzentrationsbestimmungen in Blutserum wurde mittels flammenphotometrischer Vergleichsmessungen aufgezeigt. Im Gegensatz dazu kann jedoch in Urin wegen der geringeren Anioneninterferenz nur die Silikongummi-

membran eingesetzt werden.

Eine Ca^{2+} -selektive Flüssigmembran beruhend auf dem synthetischen, neutralen Carrier ETH 1001 und dem Weichmacher Bis(2-äthylhexyl)sebacat wurde im Hinblick auf Messungen im angesäuerten Serum entwickelt. Durch Verdünnung von Serumproben mit Hilfe eines Acetatpuffers (pH 3.50) wurde das gebundene Calcium freigesetzt und die Konzentration des totalen Calciums potentiometrisch erfasst. Diese Werte korrelierten nahezu perfekt mit atomspektrometrisch erhaltenen Konzentrationswerten.

Zwei auf dem Liganden ETH 1001 und dem Weichmacher Bis(2-äthylhexyl)sebacat bzw. o-Nitrophenyl-n-octyläther beruhende Ca^{2+} -selektive Membranen wurden zur kontinuierlichen Konzentrationsbestimmung des ionisierten Ca^{2+} im extrakorporalen Blutkreislauf von wachen Hunden eingesetzt. Zur Anwendung kam ein im Rahmen dieser Arbeit ausgebautes Durchflusselektrodensystem, welches sich im Hinblick auf pharmakokinetische Untersuchungen als ideal erwies.

Optimierte H^{+} -selektive Flüssigmembranen mit Tri-n-dodecylamin als ionenselektive Komponente wurden in einem Blutgasanalysator (Gas Check AVL 939) auf ihre klinisch Relevanz geprüft. Die mittels einer Flüssigmembranelektrode in tonometrierten, heparinisierten Blutproben ermittelten pH-Werte waren mit den Werten, welche mit Hilfe einer bereits im Analysator eingebauten Glaselektrode bestimmt wurden, in guter Übereinstimmung.

Verschiedene Li^{+} -selektive Flüssigmembranelektroden beruhend auf den Carriern ETH 149 bzw. ETH 1644 wurden im Hinblick auf die Überwachung von manisch-depressiven, unter Lithiumtherapie stehenden Patienten charakterisiert. Keine der untersuchten Membranelektroden erfüllte jedoch die gestellten Anforderungen.

Die Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen sowie die H^+ -Aktivität wurden mittels der vier neuen, im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten ionenselektiven Flüssigmembrandurchflusselektroden im extrakorporalen Blutkreislauf eines wachen Kaninchens simultan während mehrerer Stunden verfolgt. Dabei kam in allen vier Membranen der hoch lipophile Tetraester ETH 469 als PVC-Weichmacher zum Einsatz. Durch verschiedene intravenöse Salzzugaben wurde das Verhalten der einzelnen Elektroden überprüft.

Die ausserordentlich strengen Anforderungen an potentiometrische Messungen im Hinblick auf klinisch relevante Messergebnisse, wie sie im Rahmen dieser Arbeit diskutiert wurden, werden für H^+ -, Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -selektive Flüssigmembranelektroden bei Benutzung von geeigneten Messeinrichtungen durchwegs erfüllt.

13. SUMMARY

LIQUID MEMBRANES FOR THE POTENTIOMETRIC DETERMINATION OF THE CONCENTRATION AND THE ACTIVITY OF THE HYDROGEN, SODIUM, POTASSIUM AND CALCIUM IONS IN SERUM AND BLOOD

Potentiometric procedures to determine the concentration of Li^+ , Na^+ , K^+ and Ca^{2+} , as well as total calcium and the activity of H^+ in blood have been developed and are presented in this work. The sensors used are all based on neutral carriers incorporated in optimized liquid membranes. Some of the measurements have been done with an improved flow-through electrode system.

Several fundamental problems in the application of ion-selective electrode systems in blood are discussed, e. g. the influence of proteins, buffer and calibration solutions, the effects of liquid junction and streaming potentials. Due to the volume of proteins and lipids in serum, values obtained by direct potentiometry are expected to be 6.8 % larger than those measured by atomic spectrometry.

Two synthetic ionophores (ETH 157 and ETH 227) have been investigated in PVC liquid membrane electrodes for the determination of Na^+ in serum. The carrier ETH 227, together with bis(1-butylpentyl) adipate as the plasticizer, has been found to fulfill the imposed requirements. The Na^+ concentrations of 40 serum samples determined by direct potentiometry correlated as expected with the values obtained by flame photometry. The values determined by direct potentiometry were on average 5.4 % greater.

Flame photometric measurements have shown that, with the antibiotic valinomycin as the ionophore, both PVC based liquid membranes and silicone rubber membranes are suitable for K^+ determination in blood. For measurements in urine, only a silicone rubber membrane is suitable because of its smaller anion interference.

A Ca^{2+} selective liquid membrane based on the synthetic neutral carrier ETH 1001 with bis(2-ethylhexyl) sebacate as plasticizer has been shown to be suitable for measurements in acidified serum. The dilution of serum with an acetate buffer (pH 3.50) releases complexed calcium, and therefore the total calcium concentration could be determined potentiometrically. These measured values agreed perfectly with those obtained by atomic spectrometry.

Membranes containing the ionophore ETH 1001 with bis(2-ethylhexyl) sebacate or o-nitrophenyl-n-octyl ether as plasticizer have been used for continuous monitoring of ionized Ca^{2+} in an extracorporeal blood bypass of a conscious dog. The flow-through electrode system developed in our laboratories turned out to be ideally suited for pharmaco-kinetic investigations.

Optimized H^{+} selective liquid membranes based on tri-n-dodecylamine have been tested in a blood gas analyzer (Gas Check AVL 939) for their clinical suitability. The pH values of tonometered heparinized blood samples obtained with a liquid membrane electrode were in good agreement with those measured with the glass electrode of the analyzer.

Several Li^{+} selective liquid membrane electrodes based on ETH 149 or ETH 1644 have been evaluated for an application in lithium therapy. None meets the required performance characteristics.

A simultaneous and continuous monitoring of Na^{+} , K^{+} , Ca^{2+} and H^{+} in an extracorporeal blood bypass of a rabbit has been performed with the developed flow-through liquid membrane electrodes. The newly synthesized highly lipophilic plasticizer ETH 469 has been employed in all four membranes. The responses of the electrodes were tested using intravenous injections of electrolyte solutions.

The H^{+} , Na^{+} , K^{+} and Ca^{2+} selective liquid membrane electrodes fulfilled the extremely high demands required of clinical potentiometric measurements.

14. RESUME

MEMBRANES LIQUIDES POUR LA DETERMINATION POTENTIOMETRIQUE DE LA CONCENTRATION ET DE L'ACTIVITE DES IONS HYDROGENE, SODIUM, POTASSIUM ET CALCIUM DANS LE SERUM ET LE SANG

Le présent travail met en évidence le développement de méthodes potentiométriques destinées à la détermination de la concentration des ions libres Li^+ , Na^+ , K^+ et Ca^{2+} , du calcium total ainsi que de l'activité ionique de H^+ dans le sang. Des membranes liquides basées sur des porteurs neutres à sélectivité ionique furent optimisées et mises en application dans des électrodes. Une partie des mesures fut effectuée à l'aide d'un système d'électrodes à flux continu.

Divers problèmes fondamentaux relatifs à l'application de chaînes d'électrodes à sélectivité ionique furent examinés: l'influence des protéines ou de solutions tampons, les effets de potentiels de liquides et de potentiels de flux. La présence de protéines et de lipides appelant différents volumes de référence, des résultats supérieures de environ 6.8 % sont ainsi à prévoir pour des déterminations potentiométriques comparativement aux mesures par absorption atomique.

L'application de deux ionophores synthétiques non macrocycliques (ETH 157 et ETH 227) pour la détermination de Na^+ dans le sang au moyen d'électrodes avec membrane liquide en CPV fut étudiée. Des membranes optimisées, basées sur le ligand ETH 227 et sur le plastifiant adipate de bis(1-butyl-pentyl) répondèrent aux exigences imposées. Les concentrations de Na^+ déterminées dans 40 échantillons de sérum donnèrent avec les valeurs obtenues par photométrie de flamme une corrélation en accord avec le modèle présenté. Les concentrations déterminées par potentiométrie directe étaient en moyenne 5.4 % supérieures aux valeurs de comparaison.

Pour les déterminations de K^+ , des membranes liquides en CPV et des membranes en silicone plastifié, avec l'antibiotique valinomycine comme composant à sélectivité ionique, furent utilisées. L'applicabilité des deux membranes pour la détermination de concentrations des ions K^+ dans le sérum sanguin fut démontrée à l'aide de mesures de comparaison par photométrie de flamme. Dans l'urine, seule une membrane en silicone plastifié put toutefois être utilisée grâce à l'interférence anionique réduite.

Une membrane liquide sélective pour Ca^{2+} basée sur le porteur neutre synthétique ETH 1001 et le plastifiant sébaçate de bis(2-éthylhexyl) fut développée en vue de la mesure dans le sérum acidifié. Par la dilution d'échantillons de sérum à l'aide d'un tampon d'acétate (pH 3.50) le calcium lié fut libéré et la concentration du calcium total put être déterminé par potentiométrie. Ces valeurs étaient en corrélation presque parfaite avec les concentrations obtenues par absorption atomique.

Deux membranes sélectives pour Ca^{2+} basées sur le ionophore ETH 1001 et le plastifiant o-nitrophényl-n-octyléther, respectivement sébaçate de bis(2-éthylhexyl) furent utilisées pour la détermination continue de la concentration du Ca^{2+} ionisé dans la circulation sanguine extracorporelle de chiens non anesthésiés. Un système d'électrodes pour la mesure continue fut développé, lequel se montra particulièrement approprié pour des études pharmacocinétiques.

Des membranes liquides sélectives pour H^+ avec tri-n-dodécylamine comme composant sélectif furent incorporées dans un analyseur de gaz sanguins (Gas Check AVL 939) et examinées dans l'optique des exigences cliniques. Les valeurs de pH déterminées dans des échantillons tonométrés de sang héparinisé par l'intermédiaire d'une électrode à membrane liquide correspondaient aux valeurs obtenues avec l'électrode à membrane de verre de l'analyseur.

Différentes électrodes à membrane liquide sélective pour Li^+ , basées sur le porteur ETH 149 ou ETH 1644, furent évaluées en vue de la surveillance de patients maniaque-dépressifs soumis à une thérapie de lithium. Aucune des électrodes étudiées ne satisfaisait toutefois les exigences demandées.

La concentration de Na^+ , K^+ et Ca^{2+} , ainsi que l'activité de H^+ furent déterminées simultanément et de manière continue durant plusieurs heures dans la circulation sanguine extracorporelle d'un lapin, à l'aide des quatre nouvelles électrodes à membrane liquide développées dans le cadre du présent travail. Le tétraester ETH 469 de lipophilie très élevée fut appliqué dans les quatre membranes comme plastifiant du CPV. Le comportement de chaque électrode fut étudié par l'intermédiaire d'injections intraveineuses de solutions aqueuses de divers sels.

Les exigences exceptionnellement élevées imposées aux mesures potentiométriques en vue de déterminations cliniques représentatives sont largement satisfaites par les électrodes à membrane liquide sélective pour H^+ , Na^+ , K^+ et Ca^{2+} en application dans des systèmes de mesure appropriés.

15. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] M. Cremer, Ueber die Ursache der elektromotorischen Eigenschaften der Gewebe, zugleich ein Beitrag zur Lehre von den polyphasischen Elektrolytketten, Z. Biol. 47, 562 (1906).
- [2] F. Haber und Z. Klemensiewicz, Ueber elektrische Phasengrenzkräfte, Z. Physikal. Chem. 67, 385 (1909).
- [3] G. Eisenman, D. O. Rudin und J. U. Casby, Glass electrode for measuring sodium ion, Science 126, 831 (1957).
- [4] G. Eisenman, Cation selective glass electrodes and their mode of operation, Biophys. J. 2, 259 (1962).
- [5] G. Eisenman, The electrochemistry of cation-sensitive glass electrodes. In: Advances in analytical chemistry and instrumentation, C. N. Reilley, Ed., John Willey & Sons, New York, u. a., 1965, p. 213.
- [6] G. Eisenman, Ed., Glass electrodes for hydrogen and other cations, M. Dekker, New York, 1967.
- [7] R. A. Durst, Ed., Ion-selective electrodes, NBS Spec. Publ. 314, Washington D. C., 1969.
- [8] J. W. Ross Jr., Calcium-selective electrode with liquid ion exchanger, Science 156, 1378 (1967).
- [9] J. W. Ross Jr., Solid-state and liquid membrane ion-selective electrodes. In: [7].
- [10] E. Pungor und K. Tóth, Ion-selective membrane electrodes, Analyst 35, 625 (1970).
- [11] R. P. Buck, Ion-selective electrodes, Anal. Chem. 50, 17R (1978).
- [12] G. H. Fricke, Ion-selective electrodes, Anal. Chem. 52, 259R (1980).
- [13] M. E. Meyerhoff und Y. M. Fraticelli, Ion-selective electrodes, Anal. Chem. 54, 27R (1982).
- [14] C. Moore und B. C. Pressman, Mechanism of action of valinomycin on mitochondria, Biochem. Biophys. Res. Com. 15, 562 (1964).
- [15] W. Simon, Ionenspezifisches Elektrodensystem, Swiss Patent 479870, 1966.

- [16] Z. Štefanac und W. Simon, In-Vitro-Verhalten von Makrotetrolide in Membranen als Grundlage für hochselektive kationenspezifische Elektrodensysteme, *Chimia* 20, 436 (1966).
- [17] Z. Štefanac und W. Simon, Ion specific electrochemical behavior of macrotetrolides in membranes, *Microchem. J.* 12, 125 (1967).
- [18] L. A. R. Pioda, V. Stankova und W. Simon, Highly selective potassium ion responsive liquid-membrane electrode, *Anal. Lett.* 2, 665 (1969).
- [19] H.-R. Wuhrmann, W. E. Morf und W. Simon, Modellberechnung der EMK und der Ionenselektivität von Membranelektroden-Messketten, *Helv. Chim. Acta* 56, 1011 (1973).
- [20] W. E. Morf und W. Simon, Berechnung von freien Hydratationsenthalpien und Koordinationszahlen für Kationen aus leicht zugänglichen Parametern, *Helv. Chim. Acta* 54, 794 (1971).
- [21] W. E. Morf und W. Simon, Abschätzung der Alkali- und Erdalkali-Ionenselektivität von elektrisch neutralen Träger-Antibiotika ("Carrier-Antibiotika") und Modellverbindungen, *Helv. Chim. Acta* 54, 2683 (1971).
- [22] W. E. Morf, The principles of ion-selective electrodes and of membrane transport. Studies in analytical chemistry, volume 2, Akadémiai Kiado, Budapest, 1981.
- [23] G. Corongiu, E. Clementi, E. Pretsch und W. Simon, Ab initio calculations of the interactions of ions with neutral ligands. I. Pair potentials for Na⁺/ether, Na⁺/thioether, and Na⁺/amide systems, *J. Chem. Phys.* 70, 1266 (1979).
- [24] G. Corongiu, E. Clementi, E. Pretsch und W. Simon, Ab initio calculations of the interactions of ions with neutral ligands. Pair potentials for Li⁺/ether-, Li⁺/thioether-, and Li⁺/amide-systems, *J. Chem. Phys.* 72, 3096 (1980).
- [25] E. Pretsch, M. Gratzl, E. Pungor und W. Simon, Model calculations on the structure/selectivity relationship of ionophores. In: Ion-Selective Electrodes, E. Pungor und I. Buzas, Akadémiai Kiado, Budapest, 1981, p. 179.
- [26] M. Welti, E. Pretsch, E. Clementi und W. Simon, Interaction of Ca²⁺ and Mg²⁺ with ionophores studied by using a pair-potential model based on ab initio calculations, *Helv. Chim. Acta* 65, 1996 (1982).
- [27] D. Ammann, Darstellung von alkali- und erdalkaliionenselektiven, elektrisch neutralen Trägerliganden und Entwicklung eines hochselektiven Ca²⁺-Sensors, Diss ETHZ Nr. 5605, 1975.

- [28] D. Ammann, W. E. Morf, P. Anker, P. C. Meier, E. Pretsch und W. Simon, Neutral carrier based ion-selective electrodes, *Ion-Selective Rev.* 5, 3 (1983).
- [29] U. Wuthier, H. V. Pham, R. Zünd, D. Welte, R. J. J. Funck, A. Bezegh, D. Ammann, E. Pretsch und W. Simon, Tin organic compounds as neutral carriers for anion selective electrodes, *Anal. Chem.* 56, 535 (1984).
- [30] M. Oehme, Beitrag zur Entwicklung ionenselektiver Mini- und Mikroelektroden und zu deren Messtechnik, Diss. ETHZ Nr. 5953, 1977.
- [31] D. M. Band, J. Kratochvil, P. A. Poole Wilson und T. Treasure, Relationship between activity and concentration measurements of plasma potassium, *Analyst* 103, 246 (1978).
- [32] H.-B. Jenny, Entwicklung von Elektroden und Messsystemen für die direktpotentiometrische Bestimmung von Natrium- und Kalium-Konzentrationen in Urin, Diss ETHZ Nr. 7411, 1983.
- [33] D. M. Band, J. Kratochvil und T. Treasure, An ion selective electrode for the determination of potassium, *J. Physiol.* 265, 5P (1977).
- [34] T. Treasure und D. M. Band, A catheter-tip potassium-selective electrode, *J. Med. Eng. Technol.* 1, 271 (1977).
- [35] T. Treasure, The application of potassium selective electrodes in the intensive care unit, *Intens. Care Med.* 4, 83 (1978).
- [36] J. L. Hill, L. S. Gettes, M. R. Lynch und N. C. Hebert, Flexible valinomycin electrodes for on-line determination of intravascular and myocardial K^+ , *Am. J. Physiol.* 235, H455 (1978).
- [37] J. L. Hill, Intravascular K^+ -sensitive electrodes for clinical monitoring. In: [52].
- [38] M. Lim, A. F. Linton und D. M. Band, Early changes in plasma potassium after acute alterations in $PaCO_2$ in anesthetized dogs, monitored continuously with intravascular potassium-selective electrodes, *Crit. Care Med.* 10, 747 (1982).
- [39] H. Hirche, C. Franz und L. Bös, Ion-selective electrodes in cardiac ischemia. In: *Brain and heart infarct II*, K. J. Zülch, W. Kaufmann, K.-A. Hossmann und U. Hossmann, Eds., Springer-Verlag, Berlin, u. a. 1979, p. 104.

- [40] U. Wiegand, M. Guggi, W. Meesmann, M. Kessler und F. Greitschuss, Extracellular potassium activity changes in the canine myocardium after acute coronary occlusion and the influence of beta-blockade, *Cardiovasc. Res.* 13, 297 (1979).
- [41] J. Janata und R. J. Huber, Ion-sensitive field effect transistors, *Ion-Selective Electrode Rev.* 1, 31 (1979).
- [42] J. Janata und R. J. Huber, Chemically sensitive field effect transistors. In: *Ion-selective electrodes in analytical chemistry*, H. Freiser, Ed., Plenum Press, New York, 1980, p. 107.
- [43] H. F. Osswald, R. E. Dohner, T. Meier, P. C. Meier und W. Simon, Flow-through system of high stability for the measurement of ion activities in clinical chemistry, *Chimia* 31, 50 (1977).
- [44] N. Fogh-Andersen, T. F. Christiansen, L. Komarmy und O. Siggaard-Andersen, Measurement of free calcium ion in capillary blood and serum, *Clin. Chem.* 24, 1545 (1978).
- [45] E. J. Fogt, A. R. Eddy, A. H. Clemens, J. Fox und H. Heath, Use of electrochemical sensors for on-line monitoring of ionized calcium, potassium, and glucose in whole blood of living dogs, *Clin. Chem.* 26, 1425 (1980).
- [46] J. G. Schindler und M. M. Schindler, *Bioelektrochemische Membranelektroden*, Walter de Gruyter, Berlin, u. a., 1983.
- [47] J. L. Walker Jr., Ion specific liquid ion exchanger microelectrodes, *Anal. Chem.* 43, 89A (1971).
- [48] T. Zeuthen, Ed., *The application of ion-selective microelectrodes*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, u. a., 1981.
- [49] E. Syková, P. Hnák und L. Vyklický, Eds., *Ion-selective microelectrodes and their use in excitable tissues*, Plenum Publishing Corp., New York, u. a., 1981.
- [50] M. Kessler, L. C. Clark Jr., D. W. Lübbers, I. A. Silver und W. Simon, Eds., *Ion and enzyme electrodes in biology and medicine*, Urban & Schwarzenberg, München, u. a., 1976.
- [51] J. Koryta, Ed., *Medical and biological applications of electrochemical devices*, John Wiley & Sons, Chichester, u. a., 1980.
- [52] D. W. Lübbers, H. Acker, R. P. Buck, G. Eisenman, M. Kessler und W. Simon, Eds., *Progress in enzyme and ion-selective electrodes*, Springer-Verlag, Berlin, u. a., 1981.

- [53] E. Pungor und I. Buzas, Eds., Ion-selective electrodes, Akademiai Kiado, Budapest, 1981.
- [54] M. Kessler, D. K. Harrison und J. Höper, Eds., Recent advances in the theory and application of ion selective electrodes in physiology and medicine, Springer-Verlag, Berlin, u. a., im Druck.
- [55] W. F. Ganong und W. Auerswald, Lehrbuch der medizinischen Physiologie, Springer-Verlag, Berlin, u. a., 1974.
- [56] N. R. Carlson, Physiology of behavior, Allyn and Bacon, Boston, u. a., 1977.
- [57] G. Thews, E. Mutschler und P. Vaupel, Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1980.
- [58] S. Silbernagl und A. Despopulos, Taschenatlas der Physiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, u. a., 1983.
- [59] F. C. McLean und A. B. Hastings, A biological method for the estimation of calcium ion concentration, J. Biol. Chem. 107, 337 (1934).
- [60] O. Siggaard-Andersen, J. Thode und N. Fogh-Andersen, What is ionized calcium ?, Scand J. Clin. Lab. Invest. 43, Suppl. 165, 11 (1983).
- [61] G. Ellison, J. V. Straumfjord und J. P. Hummel, Buffer compositions of human blood and plasma, Clin. Chem. 4, 452 (1958).
- [62] V. Fattorusso und O. Ritter, Vademecum clinique du médecin praticien, Masson, Paris, 1967.
- [63] H. Zumkley, Klinik des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, u. a., 1977.
- [64] R. D. Collins, Illustrated manual of fluid and electrolyte disorders, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, u. a., 1983.
- [65] R. Ziegler, Calcitonin, Sandoz AG, Nürnberg, 1981.
- [66] Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Band 2, Ciba-Geigy AG, Basel, 1979.
- [67] F. W. Sundermann, Current concepts of "normal values", "reference values", and "discrimination values" in clinical chemistry, Clin. Chem. 21, 1873 (1975).
- [68] A. Blaque-Belair, B. M. de Fossey und M. Fourestier, Dictionnaire des constantes biologiques et physiques, Librairie Maloine, Paris, 1965.

- [69] P. C. Meier, D. Ammann, W. E. Morf und W. Simon, Liquid-membrane ion-selective electrodes and their biomedical applications. In:[51], p. 13.
- [70] P. C. Meier, F. Lanter, D. Ammann, R. A. Steiner und W. Simon, Applicability of available ion-selective liquid-membrane micro-electrodes to intracellular ion-activity measurements, Pflügers Arch. 393, 23 (1982).
- [71] R. Tandler, Laboratoriumsbuch für den klinischen Chemiker, Wilhelm Knapp, Halle a. S., 1910.
- [72] F. Müller und O. Seifert, Taschenbuch der medizinisch-klinischen Diagnostik, J. F. Bergmann Verlag, München, 1975.
- [73] R. Asper, Privatmitteilung
- [74] D. Vonderschmitt, Klinische Chemie: Wie hart sind "harte Daten"?, Swiss Med 3, 67 (1981).
- [75] R. L. Searcy, Diagnostic biochemistry, McGraw-Hill, New York, u. a., 1969.
- [76] W. Dimai, Anforderungen an die Labordiagnostik im unmittelbaren Umfeld der Operation, Klinisch-chemisches Kollokium, Universitäts-spital Zürich, 9. Dezember 1981.
- [77] R. L. Solisky, Ion-selective electrodes in biomedical analysis, CRC Crit. Rev. Anal. Chem. 14, 1 (1982).
- [78] J. H. Ladenson, Ion-selective electrodes in clinical chemistry and medicine, Proceedings of the International Symposium on Electro-analysis in Biomedical, Environmental and Industrial Sciences, Cardiff, 1983, paper 12.
- [79] J. E. Davis, R. L. Solisky, L. Giering und S. Malhotra, Clinical chemistry, Anal. Chem. 55, 202R (1983).
- [80] F. C. McLean und A. B. Hastings, The state of calcium in the fluids of the body. I. The conditions affecting the ionization of calcium, J. Biol. Chem. 108, 285 (1935).
- [81] J. Sendroy, Determination of serum calcium by precipitation with oxalate, J. Biol. Chem. 152, 539 (1944).
- [82] M. J. Albrinck, P. M. Hald, E. B. Man und J. P. Peters, The displacement of serum water by lipids of hyperlipemic serum. A new method for the rapid determination of serum water. J. Clin. Invest. 34, 1483 (1955).

- [83] W. Waugh, Utility of expressing serum sodium per unit of water in assessing hyponatremia, *Metabolism* 18, 706 (1969).
- [84] J. M. Flannery, Vergleich der Elektrolytbestimmung mit Hilfe der direkten Potentiometrie (Ionenselektive Elektroden) und der Flammenphotometrie - Erklärung abweichender Ergebnisse, *GIT Lab. Med.* 6, 436 (1982).
- [85] R. Tarail, K. W. Buchwald, F. J. Holland und O. S. Selawry, Misleading reduction of serum sodium and chloride associated with hyperproteinemia in patients with multiple myeloma, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 110, 145 (1962).
- [86] P. G. Frick, J. R. Schmid, H. J. Kistler und W. H. Hitzig, Hyponatremia associated with hyperproteinemia in multiple myeloma, *Helv. Med. Acta* 33, 317 (1966).
- [87] J. A. Bell, P. J. Hilton und G. Walker, Severe hyponatremia in hyperlipaemic diabetic ketosis, *Brit. Med. J.* IV, 709 (1972).
- [88] M. W. Steffes und E. F. Frier, A simple and precise method of determining true sodium, potassium, and chloride concentrations in hyperlipemia, *J. Lab. Clin. Med.* 88, 683 (1976).
- [89] J. H. Ladenson, Direct potentiometric analysis of sodium and potassium in human plasma: evidence for electrolyte interaction with a nonprotein, protein-associated substance(s), *J. Lab. Clin. Med.* 90, 654 (1977).
- [90] J. Burn und G. V. Gill, Pseudonormonatremia, *Br. Med. J.* II, 1110 (1979).
- [91] M. J. Dunne, A. Shenkin und C. W. Imrie, Misleading hyponatremia in acute pancreatitis with hyperlipaemia, *Lancet* I, 211 (1979).
- [92] C. Shyr und C. C. Young, Effect of sample protein concentration on results of analysis for sodium and potassium in serum, *Clin. Chem.* 26, 1517 (1980).
- [93] B. M. Frier, C. R. Steer, J. D. Baird und S. Bloomfield, Misleading plasma electrolytes in diabetic children with severe hyperlipidaemia, *Arch. Dis. Child.* 55, 771 (1980).
- [94] Lancet Editorial, Dangerous pseudohyponatremia, *Lancet* II, 1121 (1980).
- [95] J. H. Ladenson, F. S. Apple und D. D. Koch, Misleading hyponatremia due to hyperlipidaemia: A method-dependent error, *Ann. Intern. Med.* 95, 707 (1981).

- [96] J. H. Ladenson, D. D. Koch und F. S. Apple, Relationship between flame photometry and direct potentiometric measurement of sodium: the effect of water content and the nature of the discrepancy, Clin. Chem. 27, 1094 (1981).
- [97] J. H. Ladenson, F. S. Apple, J. J. Aguanno und D. D. Koch, Sodium measurements in multiple myeloma: Two techniques compared, Clin. Chem. 28, 2383 (1982).
- [98] G. W. Ewing, Instrumental methods of chemical analysis, McGraw-Hill, Tokyo, u. a., 1975.
- [99] H. A. Teloh, Clinical flame photometry, Charles C. Thomas Publ., Springfield, 1959.
- [100] J. B. Willis, The determination of metals in blood serum by atomic absorption spectroscopy. I. Calcium, Spectrochim. Acta 16, 259 (1960).
- [101] C. Fuchs, Ionenselektive Elektroden in der Medizin, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1976.
- [102] D. A. MacInnes und M. Dole, The behavior of glass electrodes of different compositions, J. Am. Chem. Soc. 52, 29 (1930).
- [103] M. Dole, The glass electrode: methods, applications, and theory, John Wiley & Sons, New York, 1941.
- [104] A. B. Hastings und J. Sendroy, Studies of acidosis. XX. The colorimetric determination of blood pH at body temperature without buffer standards, J. Biol. Chem. 61, 695 (1924).
- [105] N. W. Shock und A. B. Hastings, Studies of the acid-base balance of the blood. III. Variation in the acid-base balance of the blood in normal individuals, J. Biol. Chem. 104, 585 (1934).
- [106] D. D. Van Slyke, J. R. Weisiger und K. K. Van Slyke, Photometric measurement of plasma pH, J. Biol. Chem. 179, 743 (1949).
- [107] R. G. Bates, The modern meaning of pH, CRC Crit. Rev. Anal. Chem. 10, 247 (1981).
- [108] D. Tosteson, Le lithium et les troubles psychotiques, Pour la Science 44, 60 (1981).
- [109] A. Amdisen, Serum lithium determination for clinical use, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 20, 104 (1967).
- [110] J. L. Crammer, R. M. Rosser und G. Crane, Blood levels and management of lithium treatment, Br. Med. J. 3, 650 (1974).

- [111] J. P. Peters und D. D. Van Slyke, Quantitative clinical chemistry: Methods, Vol. II, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1932.
- [112] H. K. Barrenscheen und L. Messinger, Eine kolorimetrische Mikrobestimmung des Natriums, *Biochem. Z.* 189, 308 (1927).
- [113] M. Balint, Eine jodometrische Mikrobestimmung des Natriums, *Biochem. Z.* 150, 424 (1924).
- [114] R. B. Barnes, D. Richardson, J. W. Berry und R. L. Hood, Flame photometry: a rapid analytical procedure, *Industr. Eng. Chem., Anal. Ed.* 17, 605 (1945).
- [115] R. J. Henry, D. C. Cannon und J. W. Winkelman, *Clinical chemistry: principles and technics*, Harper & Row, Hagerstown, 1974.
- [116] E. W. Moore und D. W. Wilson, The determination of sodium in body fluids by the glass electrode, *J. Clin. Invest.* 42, 293 (1963).
- [117] W. Annan, N. A. Kirwan und W. S. Robertson, Normal range for serum sodium by ion-selective electrode analysis exceeds that by flame photometry, *Clin. Chem.* 25, 643 (1979).
- [118] R. L. Coleman, More on Na^+ determination by ion-selective electrode vs. flame photometry, *Clin. Chem.* 25, 1865 (1979).
- [119] J. H. Ladenson, Evaluation of an instrument (Nova-1) for direct potentiometric analysis of sodium and potassium in blood and their indirect potentiometric determination in urine, *Clin. Chem.* 25, 757 (1979).
- [120] C. J. Preusse und C. Fuchs, Comparison of ion-selective electrodes and flame photometry for the determination of Na^+ and K^+ for clinical purposes, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17, 639 (1979).
- [121] A. J. Bernardo, G. H. Dreier, T. F. Kelley, D. Pistone, N. F. Rolfe, N. D. Silverman und M. E. Webster, An electrode instrument optimized for plasma water sodium/potassium analysis, *Clin. Chem.* 26, 992 (1980).
- [122] M. Fleisher und M. K. Schwartz, Studies to assess true blood sodium levels: is clinical interpretation in phase with technology, *Clin. Chem.* 26, 1022 (1980).
- [123] J. G. Flood, A. L. Harris und R. E. Collins, Reference intervals and measurement biases for serum sodium and potassium using direct potentiometric, indirect potentiometric, and flame photometric techniques. *Clin. Chem.* 27, 1110 (1981).

- [124] D. D. Koch, D. Parrish und J. H. Ladenson, Evaluation of the Du Pont aca ion-selective electrode accessory ("ISE") for performing direct potentiometric analysis of sodium and potassium, *Clin. Chem.* 27, 1110 (1981).
- [125] W. J. Lambert und R. J. Byrnes, An evaluation of the IL System 502 Na/K ion specific electrode analyzer, *Clin. Chem.* 27, 1110 (1981).
- [126] N. F. Mac Donald, P. Z. Williams, J. I. Burton und J. G. Batsakis, Sodium and potassium measurements. Direct potentiometry and flame photometry, *Am. J. Clin. Pathol.* 76, 575 (1981).
- [127] P. C. Romfh, J. R. Pearson und V. Danna, Validation of ion selective electrodes (ISE) for serum Na and K in a tertiary care hospital, *Clin. Chem.* 27, 1110 (1981).
- [128] F. S. Apple, D. D. Koch, S. Graves und J. H. Ladenson, Relationship between direct-potentiometric and flamephotometric measurement of sodium in blood, *Clin. Chem.* 28, 1931 (1982).
- [129] P. Bijster, H. L. Vader und C. L. J. Vink, An evaluation of the Corning 902 direct potentiometric sodium / potassium analyzer, *J. Autom. Chem.* 4, 125 (1982).
- [130] P. Jalandra und T. T. Ho, Laboratory evaluation of an ISE analyzer for measurement of Na^+ and K^+ , *Clin. Chem.* 28, 1631 (1982).
- [131] E. Langhoff und I. Steiness, Potentiometric analysis for sodium and potassium in biological fluids, *Clin. Chem.* 28, 170 (1982).
- [132] P. Anker, H.-B. Jenny, U. Wuthier, R. Asper, D. Ammann und W. Simon, Potentiometry of Na^+ in undiluted serum and urine with use of an improved neutral carrier-based solvent polymeric membrane electrode, *Clin. Chem.* 29, 1508 (1983).
- [133] P. West, An evaluation of the AM 721 ion-selective electrode system for the estimation of sodium and potassium in plasma, urine and whole blood, *J. Autom. Chem.* 5, 182 (1983).
- [134] J. Pijck und J. Hoste, The determination of sodium and potassium in biological material by neutron activation analysis, *Clin. Chim. Acta* 7, 5 (1962).
- [135] P. K. Lund und J. C. Mathies, X-Ray spectroscopy in biological and medicine. VII. Ultramicro determination of potassium in human tissue and blood serum, *Am. J. Clin. Pathol.* 44, 398 (1965).

- [136] L. A. R. Pioda, W. Simon, H. R. Bosshard und H. C. Curtius, Determination of potassium ion concentration in serum using a highly selective liquid-membrane electrode, *Clin. Chim. Acta* 29, 289 (1970).
- [137] H. F. Osswald, R. Asper, W. Dimai und W. Simon, On-line continuous potentiometric measurement of potassium concentration in whole blood during open-heart surgery, *Clin. Chem.* 25, 39 (1979).
- [138] W. G. Robertson, Measurement of ionized calcium in biological fluids, *Clin. Chim. Acta* 24, 149 (1969).
- [139] E. W. Moore, Studies with ion-exchanger calcium electrodes in biological fluids: some applications in biomedical research and clinical medicine. In: [7].
- [140] J. A. Lott, Determination of total and ionic serum calcium, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* 3, 41 (1972).
- [141] K. Paschen, Die Bestimmung des Calciums und seiner Fraktionen im Serum. Methoden, Normalwerte und klinische Bedeutung, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1975.
- [142] W. G. Robertson, Measurement of ionised calcium in body fluids - A review, *Ann. Clin. Biochem.* 13, 540 (1976).
- [143] C. C. Ashley und A. K. Campbell, Eds, Detection and measurement of free Ca^{2+} in cells, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1979.
- [144] W. G. Robertson und R. W. Marshall, Calcium measurements in serum and plasma - Total and ionized, *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 11, 271 (1979).
- [145] W. G. Robertson und R. W. Marshall, Ionized calcium in body fluids, *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 15, 85 (1981).
- [146] R. Pribram, Eine neue Methode zur Bestimmung des Kalkes und der Phosphorsäure in Blutserum, *Verh. sächs. Akad. Wiss.* 23, 279 (1871).
- [147] B. Kramer und F. F. Tisdall, A simple technique for the determination of calcium and magnesium in small amounts of serum, *J. Biol. Chem.* 47, 475 (1921).
- [148] E. P. Clark und J. B. Collip, A study on the Tisdall method for the determination of blood serum calcium with a suggest-modification, *J. Biol. Chem.* 63, 461 (1925).
- [149] G. Schwarzenbach und H. Flaschka, Die komplexometrische Titration, F. Enke, Stuttgart, 1965.

- [150] J. B. Hill, Automated fluorometric method for determination of serum calcium, Clin. Chem. 11, 122 (1965).
- [151] G. Kessler und M. Wolfman, An automated procedure for simultaneous determination of calcium and phosphorus, Clin. Chem. 8, 686 (1964).
- [152] H. V. Connerty und A. R. Briggs, Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein (OCPC) complexone, Am. J. Clin. Path. 45, 290 (1966).
- [153] H. J. Gitelman, An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens, Anal. Biochem. 18, 521 (1967).
- [154] A. S. Olansky, L. R. Parker, S. L. Morgan und S. N. Deming, Automated development of analytical methods: the determination of serum calcium by cresolphthalein complexone method, Anal. Chim. Acta 95, 107 (1977).
- [155] Instruction Manual SMAC, Technicon Instruments Corp., Tarrytown, 1977.
- [156] Instruction Manual aca, Du Pont de Nemours Co. Inc., Wilmington.
- [157] A. Zettner und D. Seligson, Application of atomic absorption spectrophotometry in the determination of calcium in serum, Clin. Chem. 10, 869 (1964).
- [158] G. N. Bowers und J. Pybus, Total calcium in serum by atomic absorption spectrophotometry. In: Standard methods in clinical chemistry, Vol. 7, J. S. King, Ed., Academic Press, New York, 1972, p. 143.
- [159] H. Bokelund, Analysis of variation in automated determination of sodium, potassium and calcium ions in human serum, Clin. Chem. 22, 993 (1976).
- [160] H. J. M. Bowen, P. A. Cawse und M. Daglish, The determination of calcium in biological material by radioactivation analysis, Analyst 89, 266 (1964).
- [161] S. Natelson, M. R. Richelson, B. Scheid und S. L. Bender, X-Ray spectroscopy in the clinical laboratory. I. Calcium and potassium, Clin. Chem. 5, 519 (1959).
- [162] L. J. Moore und L. A. Machlan, High accuracy determination of calcium in blood serum by isotope dilution mass spectrometry, Anal. Chem. 44, 2291 (1972).

- [163] J. P. Cali, G. N. Bowen und D. S. Young, A reference method for the determination of total calcium in serum, *Clin. Chem.* 19, 1208 (1973).
- [164] F. C. McLean und A. B. Hastings, Clinical estimation and significance of calcium-ion concentrations in the blood, *Am. J. Med. Sci.* 189, 601 (1935).
- [165] J. Paupe, Utilisation du coeur de crapaud pour le dosage biologique du calcium ionisé dans le sérum, *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 149, 2103 (1955).
- [166] J. P. Soulier und J. Crosnier, Nouvelle méthode de dosage du calcium ionisé utilisant un système coagulant, *Presse Méd.* 66, 617 (1958).
- [167] K. T. Izutsu und S. P. Falton, Plasma calcium assay, with use of the jellyfish protein, aequorin, as a reagent, *Clin. Chem.* 18, 77 (1972).
- [168] G. Schwarzenbach und H. Gysling, Murexid als Indikator auf Calcium- und andere Metall-Ionen. Komplexbildung und Lichtabsorption, *Helv. Chim. Acta* 32, 1314 (1949).
- [169] J. Raaflaub, Ueber ein photometrisches Verfahren zur Bestimmung des ionisierten Calciums, *Z. physiol. Chem.* 288, 228 (1951).
- [170] G. A. Rose, Determination of the ionised and ultrafiltrable calcium of normal human plasma, *Clin. Chim. Acta* 2, 227 (1957).
- [171] J. Etori und S. M. Scoggan, Ionized calcium in biological media, *Nature* 184, 1315 (1959).
- [172] J. Raaflaub, Zur photometrischen Bestimmung des ionisierten Calciums in biologischen Flüssigkeiten, insbesondere im Harn, *Z. physiol. Chem.* 328, 198 (1962).
- [173] F. Harnach und T. B. Coolidge, Determination of ionized calcium in serum with murexide, *Analyt. Biochem.* 6, 477 (1963).
- [174] G. A. Lumb, Determination of ionic calcium in serum, *Clin. Chim. Acta* 8, 33 (1963).
- [175] K. O. Pedersen, Determination of calcium fractions of serum. III. Ionized calcium in ultrafiltrates of normal serum and examination of pertinent variables, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 25, 223 (1970).

- [176] G. A. Rose, A simple and rapid method for the measurement of plasma ultrafiltrable and ionized calcium, *Clin. Chim. Acta* 37, 349 (1972).
- [177] B. E. Cham, A semiautomated method for the estimation of ionic calcium activity and concentration in biological solutions, *Clin. Chim. Acta* 37, 5 (1972).
- [178] D. Erne und D. Ammann, Ca^{2+} -selective electrodes. In: The role of calcium in biological systems, Vol. I, L. J. Anghiler und A. M. Tuffet-Anghiler, Eds., CRC Press, Boca Raton, 1982, p. 71.
- [179] Instruction Manual Nova 2, Nova Biomedical, Newton, MA.
- [180] Instruction Manual AMT Clin $\pm$ Ion, Applied Medical Technology, Menlo Park, CA.
- [181] Instruction Manual AVL 980, AVL GmbH, Graz, Austria.
- [182] Instruction Manual Orion SS-20, Orion Biomedical, Cambridge, MA.
- [183] Instruction Manual ICA 1, Radiometer A/S, Copenhagen, 1982.
- [184] A. B. T. J. Boink, J. A. Gimpel und A. H. J. Maas, A comparison of four Ca^{2+} -analyzers, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 43, Suppl. 165, 17 (1983).
- [185] N. A. Peterson, G. A. Feigen und J. M. Crismon, Effect of pH on interaction of calcium ions with serum proteins, *Am. J. Physiol.* 201, 386 (1961).
- [186] J. H. Ladenson, J. W. Lewis und J. C. Boyd, Failure of total calcium corrected for protein, albumin, and pH to correctly assess free calcium status, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 46, 986 (1978).
- [187] O. Siggaard-Andersen, J. Thode und N. Fogh-Andersen, Nomograms for calculating the concentration of ionized calcium of human blood plasma from total calcium, total protein and/or albumin, and pH, *Scand J. Clin. Lab. Invest.* 43, Suppl. 165, 57 (1983).
- [188] S. C. Conceicao, D. Weightman, P. A. Smith, J. Luno, M. K. Ward und D. N. S. Kerr, Serum ionised calcium concentration: measurement versus calculation, *Brit. Med. J.* 1, 1103 (1978).
- [189] L. Larsson und S. Ohman, Serum ionized calcium and corrected total calcium in boderline hyperparathyroidism, *Clin. Chem.* 24, 1962 (1978).

- [190] K. O. Pedersen, An analysis of measured and calculated calcium quantities in serum, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 38, 659 (1978).
- [191] O. Müller-Plathe und K. Lindenmann, Ionized calcium versus total calcium, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 43, Suppl. 165, 71 (1983).
- [192] Instruction Manuals ASTRA 4 and ASTRA 8, Beckman Instruments GmbH, München.
- [193] Instruction Manual IL System 501, IL System 502, Instrumentation Laboratory, Lexington.
- [194] Instruction Manual EBS 660, Kontron Ltd., Zürich.
- [195] Instruction Manual G 400, Greiner Electronics AG, Langenthal.
- [196] Instruction Manual Combi-Analysator MT-A 500, L. Eschweiler & Co, Kiel.
- [197] Instruction Manual ABL 4, Radiometer A/S, Copenhagen.
- [198] Instruction Manual KNaI, Radiometer A/S, Copenhagen.
- [199] Instruction Manual ISE 2020, Boehringer, Mannheim.
- [200] D. Ammann, H.-B. Jenny, P. Anker, U. Oesch und W. Simon, Carrier based ion-selective liquid membrane electrodes and their medical applications. In: [52], p. 21.
- [201] W. Simon, Klinische Chemie: neuesten Entwicklungen auf dem Gebiet der ionenselektiven Elektroden, Swiss Med 3, 67 (1981).
- [202] W. Simon, D. Ammann und P. C. Meier, Elemental analysis using neutral-carrier based ion-selective electrodes, Hitachi Instrument News 9, 2 (1981).
- [203] D. Ammann, P. Anker, H.-B. Jenny, P. Schulthess und W. Simon, Use of neutral carrier based electrode in biomedical systems. In: Proceedings of the XI International Congress of Clinical Chemistry, E. Kaiser, F. Gabl, M. M. Müller und M. Bayer, Eds., Walter de Gruyter, Berlin, u. a., 1982, p. 1137.
- [204] L. Róka, Erfüllt das klinisch-chemische Laboratorium den Auftrag der Klinik?. In: Auftrag der Klinik an das klinisch-chemische Laboratorium, H. Lang und W. Rich, Eds., F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart, u. a., 1972.

- [205] W. Simon, D. Ammann, W. Bussmann und P. C. Meier, Ion selective electrodes in biology and medicine. In: IUPAC frontiers of chemistry, K. J. Laidler, Ed., Pergamon Press, Oxford, u. a., 1982, p. 217.
- [206] K. Doerffel und R. Geyer et al, Analytikum: Methoden der analytischen Chemie und ihre theoretischen Grundlagen, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1979.
- [207] M. Gindler und J. D. King, Rapid colorimetric determination of calcium in biological fluids with methylthymol blue, Am. J. Clin. Pathol. 58, 376 (1972).
- [208] H. Küffer und P. Degiampietro, Automated determination of calcium by a new photometric method, Clin. Chem. 21, 961 (1975).
- [209] Instruction Manual Auto Analyzer, Technicon Instruments Corp., Tarrytown.
- [210] B. Magyar, Guide-lines to planing atomic spectrometric analysis, Akadémiai Kiado, Budapest, 1982.
- [211] H. Bartels, Techniken der Automatisierung chemischer Analysenverfahren. In: Analytiker Taschenbuch, Band 2, R. Bock, W. Fresenius, H. Günzler, W. Huber und G. Tölg, Eds., Springer-Verlag, Berlin, u. a., 1981, p. 31.
- [212] L. T. Skeggs, An automatic method for colorimetric analysis, Am. J. Clin. Pathol. 28, 311 (1957).
- [213] J. G. Schindler, G. Stork, R. Dennhardt, W. Schäl, H.-E. Braun, K.-D. Karaschinski und W. Schmid, Kontinuierliche intraoperative Messwertregistrierung von Na^+ , K^+ und Ca^{2+} mit Carrier-Membran-Disk-Elektroden, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 573 (1979).
- [214] M. Totani, M. Shimada, Y. Shibazaki und M. Tsunemoto, Instrumentation for continuous potentiometric measurement of potassium concentration and pH in whole blood during open heart surgery, Japan. J. Lab. Automation 5, 14 (1980).
- [215] R. Greger, H. Oberleithner, F. Lang und H. Sporer, Continuous in vivo measurement of plasma ionized calcium, Pflügers Arch. 384, 105 (1980).
- [216] E. Metzger, Kontinuierliche "on-line" Messungen physiologisch relevanter Kationen mit Flüssigmembranelektroden in Blut, Diplomarbeit, Lab. org. Chem. ETHZ, 1983.

- [217] P. Anker, D. Ammann, P. C. Meier und W. Simon, Neutral carrier electrode for the continuous blood Ca^{2+} measurement in the extracorporeal circulation, *Clin. Chem.* 30, 454 (1984).
- [218] D. Ammann, P. Anker, E. Metzger, U. Oesch und W. Simon, Continuous potentiometric measurement of different ion concentrations in whole blood of the extracorporeal circulation. In: Recent advances in the theory and application of ion selective electrodes in physiology and medicine, M. Kessler, D. K. Harrison und J. Höper, Eds., Springer-Verlag, Berlin, u. a., im Druck.
- [219] P. Anker, E. Wieland, D. Ammann, R. E. Dohner, R. Asper und W. Simon, Neutral carrier based ion-selective electrode for the determination of total calcium in blood serum, *Anal. Chem.* 53, 1970 (1981).
- [220] R. W. Cattrall und K. T. Fong, Serum calcium and potassium determination by the split membrane ion-selective electrode technique, *Talanta* 25, 541 (1978).
- [221] J. G. Schindler, R. Dennhardt und W. Simon, Kontinuierliche ionenselektive und elektrochemisch-enzymatische Direktmessung am Menschen. Hämooanalyse von Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und β -D-Glucose, *Chimia* 31, 404 (1977).
- [222] J. G. Schindler und M. v. Gülich, Strömungsoptimiertes Multimeßsystem zur Hämooanalytik mit ionenselektiven Disk- und coated glass-Elektroden, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 49 (1981).
- [223] F. G. Haberich, Continuous recording of K^+ and Ca^{2+} pancreatic juice of conscious rats provided with an extracorporeal pancreatic loop. In [52], p. 219.
- [224] U. Wuthier, Direkt-potentiometrische Bestimmung von Natrium- und Kaliumkonzentrationen in Blutserum und Urin mittels ionenselektiver Flüssigmembranelektroden, Diplomarbeit, Lab. org. Chem. ETHZ, 1982.
- [225] P. Anker, H.-B. Jenny, U. Wuthier, R. Asper, D. Ammann und W. Simon, Determination of $[\text{K}^+]$ in blood serum with a valinomycin-based silicone rubber membrane of universal applicability to body fluids, *Clin. Chem.* 29, 1447 (1983).
- [226] D. Ammann, P. Anker, H.-B. Jenny und W. Simon, Valinomycin based silicone rubber membrane electrodes for continuous monitoring of potassium in urine. In: [53], p. 179.
- [227] K. Cammann, Das Arbeiten mit ionenselektiven Elektroden, Springer-Verlag, Berlin, u. a., 1973.

- [228] G. G. Guilbault, R. A. Durst, M. S. Frant, H. Freiser, E. H. Hansen, T. S. Light, E. Pungor, G. Rechnitz, N. M. Rice, T. J. Rohm, W. Simon und J. D. R. Thomas, Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes, *Pure Appl. Chem.* 48, 127 (1976).
- [229] W. E. Morf und W. Simon, Ion-selective electrodes based on neutral carriers. In: *Ion-selective electrodes in analytical chemistry*, Vol. 1, H. Freiser, Ed., Plenum Press, New York, u. a., 1978, p. 211.
- [230] W. Nernst, Die elektromotorische Wirksamkeit der Ionen, *Z. Physikal. Chem.* 4, 129 (1889).
- [231] B. P. Nicol'sky, *Zh. Fiz. Khim.* 10, 495 (1937), zitiert nach [22] (Artikel in russischer Sprache).
- [232] G. Karreman und G. Eisenman, Electrical potentials and ionic fluxes in ion exchangers: I. "n type" non-ideal systems with zero current, *Bull. Math. Biophys.* 24, 413 (1962).
- [233] J. O. Isard, The dependence of glass-electrode properties on composition. In: [6], p. 51.
- [234] R. G. Bates und M. Alfenaar, Activity standards for ion-selective electrodes. In: [7].
- [235] G. Kortüm, *Lehrbuch der Elektrochemie*, Verlag Chemie, Weinheim, 1972.
- [236] P. Henderson, Zur Thermodynamik von Flüssigkeitsketten, *Z. Physikal. Chem.* 59, 118 (1907).
- [237] P. Henderson, Zur Thermodynamik von Flüssigkeitsketten, *Z. Physikal. Chem.* 63, 325 (1908).
- [238] P. C. Meier, D. Ammann, H. F. Osswald und W. Simon, Ion-selective electrodes in clinical chemistry, *Med. Progr. Technol.* 5, 1 (1977).
- [239] P. C. Meier, Two-parameter Debye-Hückel approximation for the evaluation of mean activity coefficients of 109 electrolytes, *Anal. Chim. Acta* 136, 363 (1982).
- [240] R. C. West, Ed., *Handbook of chemistry and physics*, Chemical Rubber Publ. Co., Cleveland, 1975, p. D-153.
- [241] P. Van den Winkel, J. Mertens und D. L. Massart, Streaming potentials in automatic potentiometric systems, *Anal. Chem.* 46, 1765 (1974).

- [242] D. Gozzi und G. Scorcelletti, Streaming potential in a liquid ion-exchange membrane electrode, *J. Electroanal. Chem.* 93, 109 (1978).
- [243] J. Koryta, J. Dvořák und V. Boháčková, *Electrochemistry*, Methusen & Co, London, 1970.
- [244] C. Gerthsen, H. O. Kneser und H. Vogel, *Physik*, Springer-Verlag, Berlin, u. a., 1977.
- [245] F. Kneubühl, *Repetitorium der Physik*, B. G. Teubner, Stuttgart, 1975.
- [246] W. E. Morf und W. Simon, Potentiometric flow-through detectors and their clinical applications. In: *Proceedings of the scientific session on electrochemical detection in flow analysis*, Matrafüred, Ungarn, 17-20 Okt. 1982.
- [247] A. P. Thoma, A. Viviani-Nauer, S. Arvanitis, W. E. Morf und W. Simon, Mechanism of neutral carrier mediated ion transport through ion-selective bulk membranes, *Anal. Chem.* 49, 1567 (1977).
- [248] P. M. Hofstetter, Korrelation des elektrochemischen Verhaltens eines Thioamids als Ionencarrier mit seiner Austauschgeschwindigkeit in Uebergangs- und B-Metallkomplexen, Diss. ETHZ Nr. 7128, 1982.
- [249] W. Simon, E. Pretsch, W. E. Morf, D. Ammann, U. Oesch und O. Dinten, Design and application of neutral carrier based ion-selective electrodes. In: *Proceedings of the International Symposium on Electroanalysis in Biomedical, Environmental and Industrial Sciences*, Cardiff, 1983.
- [250] W. E. Morf, D. Ammann, R. Bissig, E. Pretsch und W. Simon, Cation selectivity of neutral macrocyclic and non macrocyclic complexing agents in membranes. In: *Progress in macrocyclic chemistry*, Vol. 1, R. M. Izatt und J. J. Christensen, Eds., John Wiley & Sons, New York, 1972, p. 2.
- [251] U. Oesch und W. Simon, Life time of neutral carrier based ion-selective liquid-membrane electrodes, *Anal. Chem.* 52, 692 (1980).
- [252] U. Oesch und W. Simon, Kinetische Betrachtung der Verteilung von elektrisch neutralen Ionophoren zwischen einer Flüssigmembran und einer wässrigen Phase, *Helv. Chim. Acta* 62, 754 (1979).
- [253] U. Oesch, Thermodynamisches und kinetisches Verhalten von elektrisch neutralen, ionenselektiven Liganden im Zweiphasensystem Wasser/Flüssigmembran, Diss. ETHZ Nr. 6249, 1979.

- [254] U. Oesch, O. Dinten, D. Ammann und W. Simon, Life time of neutral carrier based membranes in aqueous systems and blood serum. In: [54].
- [255] C. R. Wilke und P. Chang, Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions, A. I. Ch. E. J. 1, 264 (1955).
- [256] W. E. Morf, E. Lindner und W. Simon, Theoretical treatment of the dynamic response of ion-selective membrane electrodes, Anal. Chem. 47, 1596 (1975).
- [257] W. E. Morf, D. Ammann und W. Simon, Elimination of the anion interference in neutral carrier cation-selective membrane electrodes, Chimia 28, 65 (1974).
- [258] W. E. Morf, G. Kahr und W. Simon, Reduction of the anion interference in neutral carrier liquid-membrane electrodes responsive to cations, Anal. Lett. 7, 9 (1974).
- [259] H.-B. Jenny, C. Riess, D. Ammann, B. Magyar und W. Simon, Determination of K^+ in diluted and undiluted urine with ion-selective electrodes, Mikrochim. Acta 1980 II, 309.
- [260] R. Bissig, Makrocyclische und acyclische Ionophore vom Typ der 3,6-Dioxokorksäure-diamide. Einfluss des Ringschlusses und der Lipophilie und ihr Verhalten in Flüssigmembranen, Diss. ETHZ Nr. 6154, 1978.
- [261] E. K. Harris, P. Kanofsky, G. Shakarji und E. Coltlove, Biological and analytical components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects. II. Estimating biological components of variation, Clin. Chem. 16, 1022 (1970).
- [262] Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Band 3, Ciba-Geigy AG, Basel, 1980.
- [263] R. Zurmühl, Praktische Mathematik für Ingenieure und Physiker, Springer-Verlag, Berlin, u. a., 1965.
- [264] S. M. Selby, Ed., Standard mathematical tables, CRC Handbook Series, The Chemical Rubber Company, Cleveland, 1971.
- [265] J. Koryta, Ion-selective electrodes, Cambridge University Press, Cambridge, u. a., 1975.
- [266] G. J. Moody und J. D. R. Thomas, Selective ion sensitive electrodes, Merrow Publishing Co., Watford, 1971.

- [267] M. S. Mohan und R. G. Bates, Calibration of ion-selective electrodes for use in biological fluids, *Clin. Chem.* 21, 864 (1975).
- [268] A. K. Covington und R. A. Robinson, Reference standards for the electrometric determination, with ion-selective electrodes, of potassium and calcium in blood serum. *Anal. Chim. Acta* 78, 219 (1975).
- [269] H. F. Osswald und H. R. Wuhrmann, Calibration standards for multi ion analysis in whole blood samples. In: [52], p.74.
- [270] J. D. Czaban und K. D. Legg, Calibration and use of ISEs for direct potentiometry in biological samples. In: Proceedings of the International Symposium on Electroanalysis in Biomedical, Environmental and Industrial Sciences, Cardiff, 1983.
- [271] R. Beetham, A review of blood pH and blood-gas analysis, *Ann. Clin. Biochem.* 19, 198 (1982).
- [272] J. A. Illingworth, A common source of error in pH measurements, *Biochem. J.* 195, 259 (1981).
- [273] T. Maruizumi, H. Miyagi und Y. Takata, ^{13}C NMR of Na ion sensitive membranes. ^{13}C nmr study of Na ion sensitive solvent polymeric membranes based on a neutral carrier, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, im Druck.
- [274] N. C. Hebert, R. R. Deleaut und A. Faucon, A small flexible pH-electrode for esophageal monitoring. In: [52], p. 52.
- [275] W. Simon, D. Ammann, P. Anker, U. Oesch und D. M. Band, Ion selective electrodes and their clinical application in the continuous ion-monitoring, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, im Druck.
- [276] R. J. Jaeger und R. J. Rubin, Contamination of blood stored in plastic packs, *Lancet* II, 151 (1970).
- [277] R. E. Easterling, E. Johnson und E. A. Napier, Plasma extraction of plasticizers from "medical grade" polyvinyl chloride tubing, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 147, 572 (1974).
- [278] T. P. Gibson, W. A. Briggs und B. J. Boone, Delivery of di-2-ethylhexyl phthalate to patients during hemodialysis, *J. Lab. Clin. Med.* 87, 519 (1976).
- [279] L. M. Lewis, T. W. Flechtner, J. Kerkay, K. H. Pearson und S. Nakamoto, Bis(2-ethylhexyl)phthalate concentrations in the serum of hemodialysis patients, *Clin. Chem.* 24, 741 (1978).
- [280] E. J. Draviam, K. H. Pearson und J. Kerkay, Human metabolism of bis(2-ethylhexyl)phthalate, *Anal. Lett.* 15, 1729 (1982).

- [281] J. K. Reddy und N. D. Lalwai, Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to human, *CRC Crit. Rev. Tox.* 12, 1 (1984).
- [282] C. W. Chiu, L. H. Lee, C. Y. Wang und G. T. Bryan, Mutagenicity of some commercially available nitro compounds for *Salmonella typhimurium*, *Mutation Res.* 58, 11 (1978).
- [283] Z. Štefanac und W. Simon, Highly selective sodium ion responsive glass electrode, *Anal. Lett.* 1, 1 (1967).
- [284] C. Fuchs, D. Dorn und C. McIntosh, Potentiometric Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , and Cl^- determination of serum and whole blood in comparison to routine clinical laboratory method, *Z. Anal. Chem.* 279, 150 (1976).
- [285] M. T. Everitt, M. A. Kenny und C. J. Delany, Stat and routine use of the IL System 502 Na/K ion selective electrode analyzer, *Clin. Chem.* 28, 1630 (1982).
- [286] H. P. Covault, A. Maturen, E. W. Holmes, S. E. Kahn, W. Bermes und D. P. Lehane, Sodium and potassium assays by ion-selective electrodes on the Du Pont aca III, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 640 (1981).
- [287] H. Dahms, R. Rock und D. Seligson, Ionic activities of sodium, potassium, and chloride in human serum, *Clin. Chem.* 14, 859 (1968).
- [288] D. T. Miller, S. H. Martin, D. P. Lehane und R. J. Rossi, Sodium and potassium assays by ion-selective electrodes on the Du Pont aca, *Clin. Chem.* 26, 1073 (1980).
- [289] D. W. Chan und J. White, Evaluation of Beckman Electrolyte 2 analyzer using ion-selective sodium and potassium electrodes. *Clin. Chem.* 27, 1111 (1981).
- [290] E. E. Epstein, Laboratory evaluation of a NOVA 4+4 - A high volume analyzer for the direct potentiometric measurement of electrolytes in body fluids. *Clin. Chem.* 27, 1111 (1981).
- [291] O. R. Flores, T. Belisle und M. Wensley, Implementation of ion selective electrode technology for sodium and potassium determinations in a stat/routine system: the Electrolyte 2 Analyzer, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 668 (1981).
- [292] O. R. Flores, T. Belisle und M. Wensley, The Electrolyte 2 Analyzer. ISE technology for Na^+/K^+ - a stat routine system. *Clin. Chem.* 27, 1110 (1981).

- [293] J. A. Lustgarten, R. E. Wenk, C. Byrd und B. Hall, Evaluation of an automated selective-ion analyzer for measuring Na^+ , K^+ , and Cl^- in serum, Clin. Chem. 20, 1217 (1974).
- [294] P. R. Finley, R. J. Williams, D. A. Lichti und A. C. Thies, Evaluation of a new multichannel analyzer, "Astra-8", Clin. Chem. 24, 2125 (1978).
- [295] J. E. Sherwin, B. B. Bruegger, T. Belisle und O. A. Flores, A field evaluation of the Beckman System E4 (SE4) electrolyte analyzer, Clin. Chem. 28, 1630 (1982).
- [296] B. Wolf, S. Ishii und O. Flores, Evaluation of system E4ATM, Clin. Chem. 28, 1630 (1982).
- [297] S. W. Graves, D. D. Koch und J. H. Ladenson, Urinary sodium measurement by direct potentiometry, Clin. Chem. 28, 1631 (1982).
- [298] R. G. Burr, Determination of urinary sodium and potassium by ion-selective electrodes and flame photometry compared, Clin. Chem. 28, 1710 (1982).
- [299] H. Keller, R. Niederer und W. Richter, Ion-selective electrodes for determination of urine-electrolytes, Biomed. Techn. 25, 42 (1980).
- [300] A. Pelleg und G. B. Levy, Determination of Na^+ and K^+ in urine with ion-selective electrodes in an automated analyzer, Clin. Chem. 21, 1572 (1975).
- [301] Techn. Publ. No. UA 4-0301, Technicon Instruments Corp., Tarrytown, N. Y., 1974.
- [302] W. K. Lutz, H.-K. Wipf und W. Simon, Alkalikationen-Spezifität und Träger-Eigenschaften der Antibiotika Nigericin und Monensin, Helv. Chim. Acta 53, 1741 (1970).
- [303] R. P. Kraig und C. Nicholson, Sodium liquid ion exchanger micro-electrode used to measure large extracellular sodium transients, Science 194, 725 (1976).
- [304] D. P. Hamblen, C. P. Glover und S. H. Kim, Device for determining ionic activity of components of liquid drops, US Patent 4,053,381 (1977). C. J. Battaglia, J. C. Chang und D. S. Daniel, Ion-selective electrode, US Patent 4,214,968 (1980).
- [305] D. Ammann, E. Pretsch und W. Simon, A sodium ion-selective electrode based on a neutral carrier, Anal. Lett. 7, 23 (1974).

- [306] U. Fiedler, Optimization of sodium ion-selective electrode for use in serum measurements, *Anal. Chim. Acta* 89, 101 (1977).
- [307] D. Ammann, R. Bissig, Z. Cimerman, U. Fiedler, M. Güggi, W. E. Morf, M. Oehme, H. Osswald, E. Pretsch und W. Simon, Synthetic neutral carriers for cations. In: [50], p. 22.
- [308] F. Vögtle, M. Läubli, D. Ammann und W. Simon, Neutral ionophores with selectivity for Na^+ , *Chem. Ber.* 116, 2028 (1983).
- [309] M. Güggi, M. Oehme, E. Pretsch und W. Simon, Neutral ionophore for liquid membrane electrodes of high selectivity for sodium over potassium ions, *Helv. Chim. Acta* 58, 2417 (1976).
- [310] H.-B. Jenny, D. Ammann, R. Dörig, B. Magyar, R. Asper und W. Simon, Neutral carrier based ion-selective electrode for the determination of Na^+ in urine, *Mikrochim. Acta* 1980 II, 125.
- [311] R. A. Steiner, M. Oehme, D. Ammann und W. Simon, Neutral carrier sodium ion-selective microelectrode for intracellular studies, *Anal. Chem.* 51, 351 (1979).
- [312] T. Shono, M. Okahara, I. Ikeda, K. Kimura und H. Tamura, Sodium-selective PVC membrane electrodes based on bis(12-crown-4)s, *J. Electroanal. Chem.* 132, 99 (1982).
- [313] H. Tamura, K. Kumami, K. Kimura und T. Shono, Simultaneous determination of sodium and potassium in human urine or serum using coated-wire ion-selective electrodes based on bis(crown ether)s, *Mikrochim. Acta*, 1983 II, 287.
- [314] F. J. Haberich, T. Bozkurt und W. Reschke, Physiological studies of exocrine pancreatic secretion in conscious rats. 1. Communication: surgical methods and registration techniques, *Z. Gastroenterologie* 18, 427 (1980).
- [315] J. Höper, M. Kessler und W. Simon, Measurements with ion-selective surface electrodes (pK, pNa, pCa, pH) during no-flow anoxia. In: [50], p. 331.
- [316] M. Kessler, J. Höper und B. A. Krumme, Monitoring of tissue perfusion and cellular function, *Anesthesiology* 45, 184 (1976).
- [317] M. Kessler und J. Höper, Effects of norm-flow and no-flow anoxia on cation activities and energy requirement of liver-tissue. In: [48], p. 145.
- [318] H. F. Osswald, Beitrag zur Entwicklung ionenselektiver Durchfluss-Flüssigmembranelektroden für die Bestimmung von Natrium-, Kalium-, Calcium- und Chlorid-Ionen in Vollblut, Diss. ETHZ Nr. 6480, 1979.

- [319] W. Bussmann, Beitrag zur Bestimmung von Natrium im menschlichen Blutserum mittels ionenselektiven Flüssigmembranelektroden, Diplomarbeit, Lab. org. Chem. ETHZ, 1979.
- [320] E. Wieland, Beitrag zur potentiometrischen Bestimmung von Natrium und totalem Calcium in Blutserum mit ionenselektiven Flüssigmembranelektroden, Diplomarbeit, Lab. org. Chem. ETHZ, 1981.
- [321] M. Läubli, Beitrag zur potentiometrischen Bestimmung von Natrium in Blutserum mit ionenselektiven Flüssigmembranelektroden, Diplomarbeit, Lab. org. Chem. ETHZ, 1981.
- [322] C. Riess, Kontinuierliche Messung von Na^+ und K^+ in verdünntem Urin mit einer Na^+ -selektiven PVC-Membranelektrode und einer neu entwickelten K^+ -selektiven Silikongummi-Membranelektrode, Diplomarbeit, Lab. org. Chem. ETHZ, 1980.
- [323] J. D. Czaban und A. D. Cormier, More on direct potentiometry - the ion-selective electrode vs flame photometry, Clin. Chem. 26, 1921 (1980).
- [324] J. D. Vitiello, J. D. Czaban, S. D. Kearney und D. Pistone, Direct potentiometry vs. flame photometry for Na^+ and K^+ analysis: a difference in concentration units, Clin. Chem. 26, 1022 (1980).
- [325] J. H. Ladenson und D. Koch, Pseudohyponatremia in multiple myeloma: a method dependent artifact, Clin. Chem. 27, 1094 (1981).
- [326] R. L. Coleman und C. C. Young, Evidence for formation of bicarbonate complexes with Na^+ and K^+ under physiological conditions, Clin. Chem. 27, 1938 (1981).
- [327] T. R. Kissel, J. R. Sandifer und N. Zumbulyadis, Sodium ion binding in human serum, Clin. Chem. 28, 449 (1982).
- [328] J. D. Czaban, A. D. Cormier und K. D. Legg, The apparent suppression of Na/K data obtained with ion-selective electrodes is due to junction potential and activity coefficient effects, not bicarbonate binding, Clin. Chem. 28, 1703 (1982).
- [329] D. J. Harry, B. Davidson und M. A. Kenny, Comparison of sodium / potassium ion measurement by flame photometry vs. ion-selective electrode methodology, Clin. Chem. 26, 992 (1980).
- [340] I. D. Kuntz und A. Zipp, Water in biological systems, N. Engl. J. Med. 297, 262 (1977).
- [341] M. F. Perutz, Electrostatic effects in proteins, Science 201, 1187 (1978).

- [342] J. D. Czaban, A. D. Cormier, S. D. Kearney und J. D. Vitiello, Calibration of ion-selective electrodes for whole blood Na / K measurements, *Clin. Chem.* 26, 1022 (1980).
- [343] J. D. Czaban, A. D. Cormier und K. D. Legg, Establishing the direct-potentiometric "normal" range for Na / K: residual liquid junction potential and activity coefficient effects, *Clin. Chem.* 28, 1936 (1982).
- [344] A. D. Cormier und A. M. Fejes, Whole blood-plasma bias introduced at the liquid-liquid junction in direct potentiometry, *Clin. Chem.* 28, 1632 (1982).
- [345] E. W. Moore, Hydrogen and cation analysis in biological fluids in vitro. In [6], p. 412.
- [346] C. J. Pedersen, Cyclic polyethers and their complexes with metal salts, *J. Am. Chem. Soc.* 89, 7017 (1967).
- [347] O. Ryba und J. Petránek, Potassium ion-selective electrode based on dimethyl-dibenzo-30-crown-10 in a poly(vinyl chloride) matrix, *J. Electroanal. Chem.* 44, 425 (1973).
- [348] K. Kimura, T. Maeda, H. Tamura und T. Shono, Potassium-selective PVC membrane electrode based on bis- and poly(crown ether)s, *J. Electroanal. Chem.* 95, 91 (1979).
- [349] K. W. Fung und K. H. Wong, Potassium- and caesium-selective PVC membrane electrodes based on bis-crown ethers, *J. Electroanal. Chem.* 111, 359 (1980).
- [350] M. Yamauchi, A. Jyo und N. Ishibashi, Potassium ion-selective membrane electrodes based on naphto-15-crown-5, *Anal. Chim. Acta* 136, 399 (1982).
- [351] C. C. Young und J. P. Willis, Potassium ion-selective membrane electrode, US Patent 4,361,473 (1982).
- [352] J. P. Willis, C. C. Young, L. Olson-Mank und L. Radle, The clinical evaluation of bis crown ether based potassium ion selective electrodes, *Clin. Chem.* 29, 1193 (1983).
- [353] K. Kimura, H. Tamura und T. Shono, A highly selective ionophore for potassium ions: a lipophilic bis(15-crown-5) derivative, *J. Chem. Soc., Chem. Commn.* 1983, 492, Com. 143.
- [354] K. Kimura, A. Ishikawa, H. Tamura und T. Shono, Potassium-selectivities of bis(benzo-15-crown-5)derivatives obtained from cyclohexanedicarboxylic acid, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 56, 1859 (1983).

- [355] M. Trojanowicz, Z. Augustowska, W. Matuszecwski, G. Moraczewska und A. Hulanicki, A potassium-selective electrode with solid internal contact, *Talanta* 29, 113 (1982).
- [356] D. M. Powers, R. N. Rand und B. B. Brody, Analytical and clinical performance of Kodak Ektachem thin film ion selective electrodes for serum Na^+ , K^+ and Cl^- , *Clin. Chem.* 26, 991 (1980).
- [357] J. Růžicka, E. H. Hansen und J. C. Tjell, Selectrode, the universal ion-selective electrode. Part VI. The calcium (II) selectrode employing a new ion exchanger in a nonporous membrane and a solid-state reference system, *Anal. Chim. Acta* 67, 155 (1973).
- [358] H. M. Brown, J. P. Pemberton und J. D. Owen, A calcium-sensitive microelectrode suitable for intracellular measurement of calcium (II) activity, *Anal. Chim. Acta* 85, 261 (1976).
- [359] G. J. Moody und J. D. R. Thomas, Progress in designing calcium ion-selective electrodes, *Ion-Selective Electrode Rev.* 1, 3 (1979).
- [360] A. Craggs, G. J. Moody und J. D. R. Thomas, Evaluation of calcium ion-selective electrodes based on di(n-alkylphenyl)phosphate sensors and their calibration with ion buffers, *Analyst* 104, 412 (1979).
- [361] J. Koryta, Theory and applications of ion-selective electrodes. II. Review, *Anal. Chim. Acta* 91, 1 (1977).
- [362] H. Célis, S. Estrada-O. und M. Montal, Model translocators for divalent and monovalent ion transport in phospholipid membranes: I. The ion permeability induced in lipids bilayers by the antibiotic X-537A, *J. Membr. Biol.* 18, 187 (1974).
- [363] K. A. Covington und N. Kumar, Use of the ionophore antibiotic A23187 in liquid ion-exchange ion-selective electrodes, *Anal. Chim. Acta* 85, 175 (1976).
- [364] D. Ammann, E. Pretsch und W. Simon, A synthetic, electrically neutral carrier for Ca^{2+} , *Tetrahedron Lett.* 24, 2473 (1972).
- [365] D. Ammann, E. Pretsch und W. Simon, A calcium ion-selective electrode based on a neutral carrier, *Anal. Lett.* 5, 843 (1972).
- [366] D. Ammann, M. Güggi, E. Pretsch und W. Simon, Improved calcium ion-selective electrode based on a neutral carrier, *Anal. Lett.* 8, 709 (1975).
- [367] W. Simon, D. Ammann, M. Oehme und W. E. Morf, Calcium-selective electrodes, *Ann. New York Acad. Sci.* 307, 52 (1978).

- [368] R. Y. Tsien und T. J. Rink, Ca^{2+} -selective electrodes: a novel PVC-gelled neutral carrier mixture compared with other currently available sensors, *J. Neurosc. Meth.* 4, 73 (1981).
- [369] F. Lanter, R. A. Steiner, D. Ammann und W. Simon, Critical evaluation of the applicability of neutral carrier-based calcium selective microelectrodes, *Anal. Chim. Acta* 135, 51 (1982).
- [370] E. W. Moore, Ionized calcium in normal serum, ultrafiltrates, and whole blood determined by ion-exchanger electrodes, *J. Clin. Invest.* 49, 318 (1970).
- [371] J. H. Ladenson, Clinical aspects of direct potentiometric analysis, Reports of the Austrian Society of Clinical Chemistry 4, 208 (1981).
- [372] P. H. Duncan, M. R. Willis, J. Smith und J. Savory, Protein bound calcium: in vitro and clinical studies, *Clin. Chem.* 26, 1021 (1980).
- [373] P. H. Duncan, M. R. Willis, B. J. Smith und J. Savory, Clinical studies of protein-bound calcium in various diseases, *Clin. Chem.* 28, 672 (1982).
- [374] J. Toffaletti, H. J. Gitelman und J. Savory, Separation and quantitation of serum constituents associated with calcium by gel filtration, *Clin. Chem.* 22, 1968 (1976).
- [375] G. M. Chan, K. O. Ash, W. Hentschel und J. Wu, Effects of bilirubin on ionized calcium, *Clin. Chem.* 27, 204 (1981).
- [376] J. Toffaletti und G. N. Bowers, The possible physiological importance of calcium complexes: an opinion, *Clin. Chim. Acta* 97, 101 (1979).
- [377] J. Wortsman und R. B. Traycoff, Biological activity of protein-bound calcium in serum, *Am. J. Physiol.* 238, E104 (1980).
- [378] J. H. Ladenson und G. N. Bowers, Free calcium in serum. II. Rigor of homeostatic control, correlations with total serum calcium, and review of data on patients with disturbed calcium metabolism, *Clin. Chem.* 19, 575 (1973).
- [379] K. O. Pedersen, Binding of calcium to serum albumin. I. Stoichiometry and intrinsic association constant at physiological pH, ionic strength, and temperature, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 28, 459 (1971).
- [380] K. O. Pedersen, Binding of calcium to serum albumin. II. Effect of pH via competitive hydrogen and calcium ion binding to the imidazole groups of albumin, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29, 75 (1972).

- [381] J. W. Eastman, S. J. Rehfeld und H. Loken, Ultrafiltrable calcium and the conformation of albumin, *Clin. Chim. Acta* 58, 233 (1975).
- [382] N. Fogh-Andersen, Albumin/calcium association at different pH, as determined by potentiometry, *Clin. Chem.* 23, 2122 (1977).
- [383] H. F. Loken, R. J. Havel, G. S. Gordan und S. L. Whittington, Ultracentrifugal analysis of protein-bound and free calcium in human serum, *J. Biol. Chem.* 235, 3654 (1960).
- [384] B. Höffken, D. K. Parkinson, P. Storms und I. C. Radde, Effects of alterations of blood pH on calcium ion activity in rat plasma, *Clin. Orthop. Rel. Res.* 78, 30 (1971).
- [385] K. O. Pedersen, The effect of bicarbonate, PCO_2 and pH on serum calcium fractions, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 27, 145 (1971).
- [386] H. D. Schwartz, B. C. McConville und E. F. Christopherson, Serum ionized calcium by specific ion electrode, *Clin. Chim. Acta* 31, 97 (1971).
- [387] J. H. Ladenson und G. N. Bowers, Free calcium in serum. I. Determination with ion-specific electrode, and factors affecting the results, *Clin. Chem.* 19, 565 (1973).
- [388] D. R. Wybenga, F. A. Ibbott und D. C. Cannon, Determination of ionized calcium in serum that has been exposed to air, *Clin. Chem.* 22, 1009 (1976).
- [389] L. J. Drop, C. Fuchs und P. M. Stulz, Determination of blood ionized calcium in a large segment of the normal adult population, *Clin. Chim. Acta* 89, 503 (1978).
- [390] R. A. Kaufman und N. W. Tietz, Ion effects on measurement of ionized calcium with a calcium selective electrode, *Clin. Chem.* 26, 640 (1980).
- [391] N. Fogh-Andersen, Ionized calcium analyzer with a built-in pH correction, *Clin. Chem.* 27, 1264 (1981).
- [392] J. Thode, J. Wandrup, F. Aas und O. Siggaard-Andersen, Evaluation of a new semiautomatic electrode system for simultaneous measurement of ionized calcium and pH, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 42, 407 (1982).
- [393] J. Brauman, C. Delvigne, I. Deconinck und D. Willems, Factors affecting the determination of ionized calcium in blood, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 43, Suppl. 165, 27 (1983).

- [394] J. Thode, N. Fogh-Andersen, P. D. Wimberley, A. Møller-Sørensen und O. Siggaard-Andersen, Relation between pH and ionized calcium in vitro and in vivo in man, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 43, Suppl. 165, 79 (1983).
- [395] J. H. Ladenson und J. C. Shyong, Influence of fatty acids on the binding of human serum albumin, *Clin. Chim. Acta* 75, 293 (1977).
- [396] J. J. Aguanno und J. H. Ladenson, The quantitative influence of fatty acids on the in vitro binding of calcium to human albumin, *Clin. Chem.* 26, 1026 (1980).
- [397] D. L. Witte, B. J. Pennell, J. K. Pfohl und R. D. Feld, Elimination of non-esterified fatty acid interference with calcium measurement using alpha cyclodextrin, *Clin. Chem.* 26, 993 (1980).
- [398] M. D. Gardner, F. J. Dryburgh, J. A. Fyffe und A. S. Jenkins, Predictive value of derived calcium figures based on the measurement of ionised calcium, *Ann. Clin. Biochem.* 18, 106 (1981).
- [398] H.-B. Jenny, Messung von ionisiertem Calcium in Serum und Vollblut mit ionenselektiven Elektroden, Diplomarbeit, Lab. org. Chem. ETHZ, 1977.
- [400] P. Anker, Freisetzung des gebundenen Blutserum-Calciums durch Ansäuern und Einsatz von Calciumselektiven Flüssigmembranelektroden zur Messung des totalen Calciums, Diplomarbeit, Lab. org. Chem. ETHZ, 1979.
- [401] D. Ammann, H.-B. Jenny, P. C. Meier und W. Simon, New ion selective electrodes and their clinical and biological applications. In: *Electroanalysis in hygiene, environmental, clinical and pharmaceutical chemistry. Analytical chemistry symposia series, volume 2*, W. F. Smyth, Ed., Elsevier, Amsterdam, u. a., 1980, p.3.
- [402] S. Baumgartner, Bestimmung des totalen Calciumgehalts in Serum mit ionenselektiven Elektroden und dem Einsatz von Zinkionen zur Freisetzung des gebundenen Calciums, Diplomarbeit, Lab. org. Chem. ETHZ, 1979.
- [403] A. Leo, C. Hansch und D. Elkins, Partition coefficients and their uses, *Chem. Rev.* 71, 525 (1971).
- [404] C. Hansch und A. Leo, Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology, J. Wiley & Sons, New York, u. a., 1979.
- [405] L. G. Sillen und A. E. Martell, Stability constants of metal-ion complexes, The Chemical Society, London, 1964.

- [406] D. D. Perrin, Dissociation constants of organic bases in aqueous solution: supplement 1972, Butterworths, London, 1972.
- [407] D. D. Perrin und B. Dempsey, Buffers for pH and metal ion control, Chapman and Hall, London, 1974.
- [408] N. I. Sax, Dangerous properties of industrial materials, Van Nostrand Reinhold Comp., New York, u. a., 1975.
- [409] A. P. Thoma, Elektrochemische Chiralitätserkennung und elektro-dialytische Transporteigenschaften von elektrisch ungeladenen Komplexbildnern in Flüssigmembranen, Diss. ETHZ Nr. 6062, 1977.
- [410] A. A. Maryott und E. R. Smith, Table of dielectric constants of pure liquids, NBS Circular 514 (1951).
- [411] P. Anker, Optimierung der Membranzusammensetzung und der Messmethodik zur Bestimmung von totalem Calcium in Blutserum mittels Makro-Flüssigmembranelektroden, unveröffentlichter Bericht, 1981.
- [412] T. M. Hickey, D. E. Uddin und A. B. Gustafson, Measurement of serum ionized calcium concentration in laboratory animals, Clin. Chem. 23, 1146 (1977).
- [413] M. Azria, private Mitteilung.
- [414] O. Siggaard-Andersen, N. Fogh-Andersen und J. Thode, Elimination of the erythrocyte effect on the liquid junction potential in potentiometric measurements on whole blood using mixed salt bridge solutions, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 43, Suppl. 165, 43 (1983).
- [415] P. Bijster, H. L. Vader und C. J. J. Vink, Influence of erythrocytes on direct potentiometric determination of sodium and potassium, Ann. Clin. Biochem. 20, 116 (1983).
- [416] J. A. Fyffe, A readily available source of serum for use as a precision quality control material for ionized calcium measurement by ion-selective electrodes, J. Autom. Chem. 4, 79 (1982).
- [417] G. N. Bowers, A reference system for ionized calcium, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 43, Suppl. 165, 49 (1983).
- [418] H. J. Wigger, B. R. Bransilver und W. A. Blanc, Thromboses due to catheterization in infants and children, J. Pediatrics 76, 1 (1970).
- [419] J. Eichmeier, Medizinische Elektronik, Springer-Verlag, Berlin, u. a., 1983.
- [420] S. P. L. Sörensen, Enzymstudien II. Ueber die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen, Biochem. Z. 21, 201 (1909).

- [421] IUPAC, Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units, Pure Appl. Chem. 51, 1 (1979).
- [422] A. H. J. Maas, H. F. Weisberg, W. G. Zijlster, R. A. Durst und O. Siggaard-Andersen, Reference for pH measurement in blood, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, 313 (1983).
- [423] A. K. Covington, R. G. Bates und R. A. Durst, Definition of pH scales, standard reference values, measurement of pH and related terminology, Pure Appl. Chem. 55, 1467 (1983).
- [424] R. G. Bates, Revised standard values for pH measurements from 0 to 95 °C, J. Res. NBS 66A, 179 (1962).
- [425] R. G. Bates, C. A. Vega und D. R. White, Standards for pH measurements in isotonic saline media of ionic strength $I=0.16$, Anal. Chem. 50, 1295 (1978).
- [426] W. Mindt, H. Maurer und W. Möller, Principle and characteristics of ROCHE tissue pH electrode, Arch. Gynecol. 226, 9 (1978).
- [427] L. R. Pucacco und N. W. Carter, A submicrometer glass-membrane pH-microelectrode, Anal. Biochem. 89, 151 (1978).
- [428] T. Shigemitsu, H. Baumgärtel und D. W. Lübbers, pH needle electrode with a flat pH-glass surface of 1 to 5 μm^2 deposited by RF-sputtering, Pflügers Arch. Suppl. 362, R52 (1976).
- [429] R. C. Thomas, Ion-sensitive intracellular microelectrodes. How to make and use them, Academic Press, London, u. a., 1978.
- [430] U. Hopfer, A. L. Lehninger und T. E. Thompson, Protonic conductance across phospholipid bilayer membranes induced by uncoupling agents for oxidative phosphorylation, Proc. Natl. Acad. Sci. 59, 484 (1968).
- [431] E. Grell, I. Oberbäumer, H. Ruf und H. P. Zingsheim, Elementary steps and dynamic aspects of carrier-mediated cation transport through membranes: the streptogramin antibiotics (group B). In: Biochemistry of membrane transport, G. Semenza und E. Carafoli, Eds., Springer-Verlag, Berlin, u. a., 1977.
- [432] O. H. Le Blanc, J. F. Brown, J. F. Klebe, L. W. Niedrach, G. M. J. Slusarczuk und W. H. Stoddard, Polymer membrane sensors for continuous intravascular monitoring of blood pH, J. Appl. Physiol. 40, 644 (1976).
- [433] R. L. Coon, N. C. J. Lai und J. P. Kampine, Evaluation of a dual-function pH and P_{CO_2} in vivo sensor, J. Appl. Physiol. 40, 625 (1976).

- [434] S. M. Cobbe und P. A. Poole-Wilson, A catheter tip pH electrode for use in man, *J. Physiol.* 289, 3P (1979).
- [435] D. Erne, Ionophore mit Selektivität für Erdalkali- und Wasserstoffionen und deren Einsatz in Flüssigmembranelektroden, Diss. ETHZ Nr. 6889, 1981.
- [436] D. Erne, D. Ammann und W. Simon, Liquid membrane pH electrode based on a synthetic proton carrier, *Chimia* 33, 88 (1979).
- [437] D. Erne, K. V. Schenker, D. Ammann, E. Pretsch und W. Simon, Applicability of a carrier based liquid membrane pH electrode to measurements in acidic solutions, *Chimia* 35, 178 (1981).
- [438] P. Schulthess, Y. Shijo, H. V. Pham, E. Pretsch, D. Ammann und W. Simon, A hydrogen ion-selective liquid-membrane electrode based on tri-n-dodecylamine as neutral carrier, *Anal. Chim. Acta* 131, 111 (1981).
- [439] B. Etter, Beitrag zur Entwicklung einer neuen pH-Flüssigmembranelektrode im Hinblick auf einen Einsatz in der klinischen Analytik, Diplomarbeit, Lab. org. Chem. ETHZ, 1981.
- [440] Bedienungsanleitung Gas Check AVL 939, AVL GmbH, Graz, Oesterreich.
- [441] D. M. Band, M. P. D. Heining und R. A. F. Linton, Ion-selective electrodes for use in vivo, *J. Physiol.* 339, P1 (1983).
- [442] P. Anker, D. Ammann und W. Simon, Blood pH measurement with a solvent polymeric membrane electrode in comparison with a glass electrode, *Mikrochim. Acta* 1983 I, 237.
- [443] D. Ammann, F. Lanter, R. A. Steiner, P. Schulthess, Y. Shijo und W. Simon, Neutral carrier based hydrogen ion selective microelectrode for extra- and intracellular studies, *Anal. Chem.* 53, 2267 (1981).
- [444] J. F. J. Cade, Lithium salts in the treatment of psychotic excitement, *Med. J. Aust.* 36, 349 (1949).
- [445] B. E. Ehrlich und J. M. Diamond, Lithium, membranes, and manic-depressive illness, *J. Memb. Biol.* 52, 187 (1980).
- [446] H. A. Schroeder und A. P. Nason, Trace-element analysis in clinical chemistry, *Clin. Chem.* 17, 461 (1971).
- [447] A. Amdisen, Monitoring of lithium treatment through determination of lithium concentration, *Dan. Med. Bull.* 22, 277 (1975).

- [448] A. Amdisen und M. Schou, Die Bedeutung der Lithium-Spiegel im Serum für die Lithium-Therapie phasischer Psychosen, Münch. med. Wschr. 117, 1417 (1975).
- [449] R. A. Gorkin und E. Richelson, Lithium ion accumulation by cultured glioma cells, Brain Res. 171, 365 (1979).
- [450] Z. Janka, I. Szentistvanyi, A. Juhasz und A. Rimanoczy, Steady-state distribution of lithium during cultivation of dissociated brain cells, Experientia 36, 1071 (1980).
- [451] M. Güggi, U. Fiedler, E. Pretsch und W. Simon, A lithium ion-selective electrode based on a neutral carrier, Anal. Lett. 8, 857 (1975).
- [452] R. C. Thomas, W. Simon und M. Oehme, Lithium accumulation by snail neurones measured by a new Li^+ -sensitive microelectrode, Nature 258, 754 (1975).
- [453] A. F. Zhukov, D. Erne, D. Ammann, M. Güggi, E. Pretsch und W. Simon, Improved lithium ion-selective electrode based on a lipophilic diamide as neutral carrier, Anal. Chim. Acta 131, 117 (1981).
- [454] A. Shanzer, D. Samuel und R. Korenstein, Lipophilic lithium ion carriers, J. Am. Chem. Soc. 105, 3815 (1983).
- [455] J. G. Schindler, G. Stork, H.-J. Strüh und W. Schäl, Siloxanverbindungen als aktive Komponenten in ionenselektiven Elektrodenmembranen, Fresenius Z. Anal. Chem. 290, 45 (1978).
- [456] K. M. Aalmo und J. Krane, 1,5,9,13-Tetraoxacyclohexadecane and its 3,3,7,7,11,11,15,15-octamethyl derivative as neutral carrier for lithium ion through artificial membranes, Acta Chem. Scand. A36, 227 (1982).
- [457] U. Olsher, The lipophilic macrocyclic polyether 2,3,9,10-dibenzo-1,4,8,11-tetraoxacyclotetradeca-2,9-diene (dibenzo-14-crown-4): a selective ionophore for lithium ions, J. Am. Chem. Soc. 104, 4006 (1982).
- [458] M. J. D. Brand und G. A. Rechnitz, Differential potentiometry with ion-selective electrodes. A new instrumental approach, Anal. Chem. 42, 616 (1970).
- [459] K. Baumberger, P. Gilgen und W. Richter, Methodische und apparative Entwicklungen in der Potentiometrie, Chimia 30, 325 (1976).
- [460] E. L. Eckfeld und G. A. Perley, Measurement of and effect of temperature on electrical resistance of glass electrodes, J. Electrochem. Soc. 98, 37 (1951).

- [461] N. N. E. Kirsch, R. J. J. Funck, E. Pretsch und W. Simon, Ionophore für Li^+ : Membranselektivität, Darstellung und Stabilitätskonstanten in Äthanol, *Helv. Chim. Acta* 60, 2326 (1977).
- [462] D. Erne, D. Ammann, A. F. Zhukov, F. Behm, E. Pretsch und W. Simon, Lipophilic diamides as ionophores for alkali and alkaline earth metal cations, *Helv. Chim. Acta* 65, 538 (1982).
- [463] D. Ammann, R. Bissig, M. Güggi, E. Pretsch, W. Simon, I. J. Borowitz und L. Weiss, Preparation of neutral ionophores for alkali and alkaline earth metal cations and their application in ion selective membrane electrodes, *Helv. Chim. Acta* 58, 1535 (1975).
- [464] E. C. Horning, Ed., Organic synthesis, vol. III, John Wiley & Sons, New York, 1955, p.140.
- [465] W. Bussmann, J.-M. Lehn, U. Oesch, P. Plumeré und W. Simon, Enantiomer-selectivity for phenylethylammonium ion of membranes based on a chiral macrocyclic polyether, *Helv. Chim. Acta* 64, 657 (1981).
- [466] U. Oesch et al, in Vorbereitung.
- [467] F. P. Cassaretto, J. J. McLafferty und C. E. Moore, Studies in the tetraarylborates. Part I. The preparation and reagent properties of sodium tetrakis(p-chlorophenyl)borate, *Anal. Chim. Acta* 32, 376 (1965).

Lebenslauf

Am 6. Mai 1955 wurde ich in Delémont geboren. Nach vier Jahren Primarschule und 5 Jahren Sekundarschule in Delémont besuchte ich das Gymnasium der Ecole cantonale in Porrentruy, wo ich im Sommer 1974 mit der Maturität Typus C abschloss. Gleich anschliessend immatrikulierte ich mich an der Abteilung für Chemie der ETH Zürich. Im Herbst 1979 erwarb ich das Diplom als Chemiker. Im Januar 1980 begann ich die vorliegende Promotionsarbeit am Laboratorium für organische Chemie der ETH unter der Leitung von Prof. Dr. W. Simon. Ein Teil der Experimente wurde im Rahmen einer Zusammenarbeit an der Abteilung für pharmazeutische Forschung und Entwicklung der Sandoz AG in Basel durchgeführt. Während meiner Dissertationszeit war ich bei der Betreuung von Diplomarbeiten sowie als Lehrer an der Ecole supérieure de commerce und der Ecole de culture générale von Delémont in den Fächern Chemie, Biologie und Physik tätig.

Delémont, im April 1984

Peter Anker