

Ein Chemosensor zur Bestimmung von Citrat in Getränken**

Axel Metzger und Eric V. Anslyn*

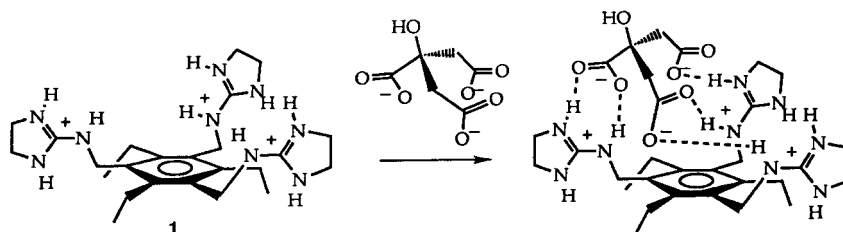
Antikörper und Enzyme sind aufgrund ihrer hohen Spezifität heute die Werkzeuge der Wahl zur Detektion und Quantifizierung von komplexen Molekülen in Mischungen. Die Entwicklung von gezielt hergestellten synthetischen Rezeptoren ist jedoch so weit fortgeschritten, daß auch ihr Einsatz als Sensoren realistisch erscheint.^[1] Zielmoleküle waren bisher neutrale und kationische Analyten wie Zucker,^[2] Metallionen,^[3] Kreatinin^[4] und Arene^[5] sowie einige wenige Anionen.^[6, 7] Fast keiner dieser synthetischen Rezeptoren erwies sich jedoch bisher als selektiv und empfindlich genug für die Untersuchung von Lösungen, bei denen mehrere Spezies um die Bindung am Rezeptor konkurrieren können. So konzentrierten sich z. B. die meisten Arbeiten auf die Bestimmung von reinen Analytlösungen. Wir zeigen hier, daß ein Chemosensor,^[8] ein mit einem Signalgeber verbundener synthetischer Rezeptor, zur spezifischen Bestimmung einer einzelnen Verbindung in einer wäßrigen Mischung in ähnlicher Weise geeignet ist wie ein auf einem Antikörper basierender Biosensor für Immunoassays.

Immunoassays sind ohne Schwierigkeiten durchzuführen, denn meist nutzt man einen einfachen Konkurrenz- oder Verdrängungsmechanismus.^[9] Wird die zu untersuchende Lösung mit dem unmarkierten Antigen zum Rezeptor gegeben, setzt dieser markiertes Antigen frei, woraus ein verändertes Signal resultiert. Solche Verdrängungsmethoden wurden bei synthetischen Rezeptoren noch nicht häufig eingesetzt. Ist ein Chemosensor für eine bestimmte Anwendung selektiv genug, sollte man ähnliche Ergebnisse wie mit Antikörpern erhalten. Ein weiteres Charakteristikum von Immunoassays ist die Detektion mit der Fluoreszenzspektroskopie.^[10] Das emittierte Fluoreszenzlicht hat eine größere Wellenlänge als die Anregungsstrahlung; dadurch ist das Hintergrundsignal in der Regel klein und die Nachweisstärke sehr hoch.^[11]

Angesichts der Leistungen der Methoden, bei denen Antikörper eingesetzt werden, und vor dem Hintergrund des augenblicklichen Standes bei synthetischen Rezeptoren hatten wir zwei Ziele. Zum einen wollten wir zeigen, daß die Selektivität synthetischer Rezeptoren ausreichen kann, um den Analyten in kompetitiven Medien zu detektieren und zu quantifizieren. Als kompetitives Medium definierten wir eine wäßrige Lösung relativ hoher Ionenstärke, die außer der Zielverbindung noch andere Verbindungen enthält. Zum anderen wollten wir belegen, daß auch mit synthetischen

Rezeptoren die Verdrängungsmethode gut geeignet ist. Für diese Ziele schien Citrat der ideale Analyt zu sein.^[12]

Im Neutralen ist Zitronensäure dreifach negativ geladen und kann somit gut von anderen, möglicherweise störenden Verbindungen unterschieden werden. Ein Rezeptor, der zur Ladung des Citrats komplementär ist und als Wasserstoffbrückendonorfunktionieren kann, würde also wahrscheinlich durch andere potentielle Analyten wie Salze, Mono- und Dicarbonsäuren oder Zucker nicht gestört. Wir berichteten vor kurzem, daß das Rezeptor-Molekül **1** Citrat in Wasser neben Mono- und Dicarboxylaten, Phosphaten, Zuckern und einfachen Salzen selektiv erkennt.^[13a] Citrat wird dabei 35- bzw. 700mal besser gebunden als einfache Di- und Monocarbonsäuren.^[13b] Der Rezeptor enthält drei Guanidiniumgruppen, die aufgrund ihrer Ladung^[14] und ihrer Wasserstoffbrückendonorfähigkeit an das Citrat-Ion binden.^[13c] Durch die Ethylgruppen in der 2-, 4- und 6-Position entsteht eine Struktur,^[15] bei der die Guanidiniumgruppen auf derselben Seite des Benzolrings angeordnet und für die Bindung an das Citrat-Ion präorganisiert sind. Der Gast-Wirt-Komplex wird, wie in Schema 1 gezeigt, durch mehrere Wasserstoffbrücken



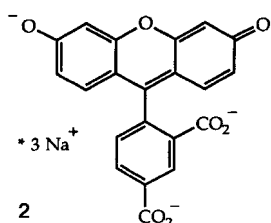
Schema 1.

und drei ionische Wechselwirkungen stabilisiert, was die hohe Bildungskonstante von $K_a = 6.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ erklärt.

Wir verwendeten für unseren Citratassay-5-Carboxyfluorescein **2** als Fluoreszenzsonde zusammen mit **1**. Carboxyfluorescein **2** ist kommerziell erhältlich, hat zwei Carboxygruppen zur Bindung an das Wirtmolekül **1** und kann in sehr geringer Konzentration (in der Regel 5 bis 18 μM) verwendet werden. Absorption und Fluoreszenz von **2** sind stark pH-abhängig, so daß bei den Messungen ein Puffer eingesetzt werden muß.^[16] Bekanntlich konkurrieren geladene Puffer um die Bindungsstellen an geladenen Rezeptoren. Um dies zu kompensieren und die Affinität des Rezeptors zu Citrat zu erhöhen, wurde den gepufferten Lösungen Methanol zugesetzt. Die besten Ergebnisse wurden in einer Pufferlösung (5 mM HEPES, pH 7.4) aus 25 Volumenteilen Wasser und 75 Volumenteilen Methanol erhalten. Die Bildungskonstante des Komplexes **1**·**2** beträgt bei unseren Meßbedingungen $K_a = 4.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$; sie wurde UV/Vis-spektroskopisch nach der Benesi-Hildebrand-Methode^[17] bestimmt. Für die Bildungskonstante des Gast-Wirt-Komplexes Citrat·**1** in diesem System wurde ein Wert von $2.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ gefunden, indem in einem Verdrängungsversuch Citrat zu einer Lösung aus dem Wirtmolekül **1** und der Sonde **2** gegeben und die Absorptionsänderung von **2** gemessen wurde.^[18] Dieser Wert ist zweifellos für die Bestimmung von Citrat im milli- und mikromolaren Bereich ausreichend.

[*] Prof. E. V. Anslyn, Dr. A. Metzger
Department of Chemistry and Biochemistry
The University of Texas at Austin
Austin, TX 78712 (USA)
Telefax: Int. + 512/471-8696
E-mail: anslyn@ccwf.cc.utexas.edu

[**] Diese Arbeit wurde von der National Science Foundation und der Welch Foundation gefördert. E. V. A. dankt für ein Sloan Award und für ein Dreyfus Teacher Scholar Award.



Wir stellten folgende Überlegung an: Die Bindung zwischen **1** und **2** sollte aufgrund der durch **1** bewirkten positiv geladenen Mikroumgebung zu einer Erniedrigung des phenolischen pK_a -Wertes von **2** führen, so daß die Phenoleinheit von **2** stärker protoniert ist, wenn **2** frei in Lösung vorliegt. Die Absorption und Fluoreszenz von **2** nehmen nun bekanntlich mit steigendem Protonierungsgrad der Phenoleinheit ab.^[16] Also sollten bei Zugabe von Citrat zu einer Mischung aus **1** und **2** Absorption und Fluoreszenz von **2** abnehmen. Wie in Abbildung 1 dargestellt, nimmt die Absorption von **2** ($\lambda_{\max} = 498$ nm) bei Zugabe des Wirtmoleküls **1** zu einer Lösung von **2** zu und wird – wie vorausgesagt – bei Zugabe von Citrat zu der Mischung aus **1** und **2** wieder kleiner. Der gleiche Effekt wurde im Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{\max} = 525$ nm) beobachtet. Die cyclische Zu- und Abnahme von Absorption und Fluoreszenz konnte in der Regel fünfmal durchlaufen werden, bevor das Signal signifikant schlechter wurde.

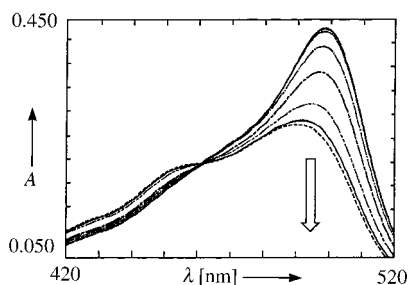
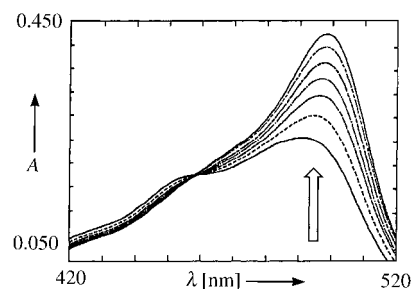


Abb. 1. UV-Spektren von **2**. Oben: Zugabe von **1** zu einer 14 μM -Lösung von **2** führt zu einer Erhöhung der Absorbanz A . Die Kurve mit der geringsten Absorbanz wurde an reinem **2** gemessen. Unten: Zugabe von Citrat zu einer Lösung aus **1** (74 μM) und **2** (14 μM) führt zu einer Abnahme der Absorbanz. Die Kurve mit der höchsten Absorbanz wurde mit einer citratfreien Lösung erhalten.

Kalibrierkurven für Citrat wurden aufgenommen, indem steigende Mengen von Citrat zu einer Lösung mit vorgegebenen Konzentrationen von **1** und **2** gegeben wurden. Gab man Succinat zu der Sensorlösung (**1**·**2**), wurden geringe Absorptions- und Fluoreszenzänderungen beobachtet, aber Acetat, Salz oder Zucker hatten praktisch keinen Einfluß (Abb. 2). Daher sollten Verbindungen, wie man sie üblicherweise in Getränken findet (z.B. Äpfelsäure, Ascorbinsäure, Milchsäure, Benzoesäure, Phosphate) unsere Sensormethode

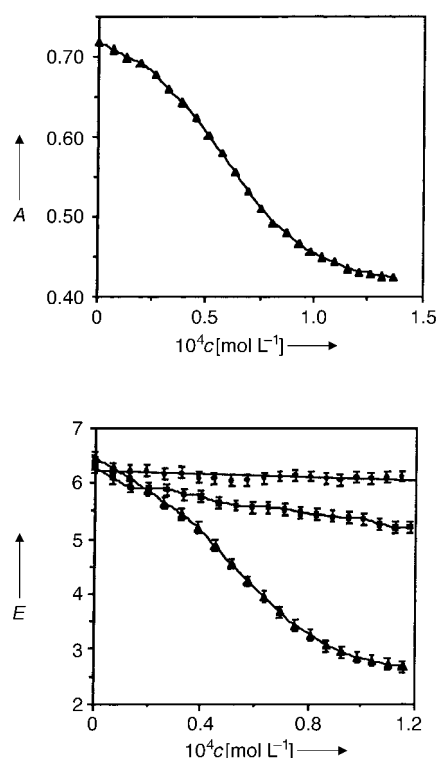


Abb. 2. Mit der Sensormethode erhaltene Kalibrierkurven (75% MeOH, 25% Wasser, 5 mM HEPES-Puffer, pH 7.4).^[19] Oben: UV-Kalibrierkurve (75 mM **1**, 14 mM **2**, $\lambda = 498$ nm). A = Absorbanz, c = Konzentration von Citrat. Unten: Fluoreszenz-Kalibrierkurven (75 mM **1**, 14 mM **2**, Anregung bei $\lambda = 490$ nm, Emission E bei $\lambda = 525$ nm). Zugabe von Citrat (▲), Succinat (■) und Acetat (●) zur Sensorlösung.

nicht stören. Dies wurde durch die erfolgreiche Anwendung bei Erfrischungsgetränken belegt.

Zur Konzentrationsbestimmung von Citrat in einer großen Anzahl von Getränken gab man 2 bis 50 μL des Getränks zur Sensorlösung, maß die Absorptions- oder Fluoreszenzänderung und ermittelte aus der Kalibrierkurve die Citratkonzentration. Die Ergebnisse für eine Reihe von Getränken sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Richtigkeit der Methode

Tabelle 1. Konzentrationsbestimmung von Citrat in Getränken mit verschiedenen Methoden; Angaben in mmol L^{-1} .

	gravi-metrisch	NMR-Methode	1 + 2 , Absorption	1 + 2 , Emission
Citrat-Modelllösung	30.1	–	30.3	29.9
Kalibrierlösung	1.33	–	1.205	1.39
Orangensaft	–	43.1	44.1	44.7
Gatorade	–	15.95	15.05	15.1
Powerade	–	12.4	11.1	11.3
All Sport	–	7.4	7.1	8.1
Mountain Dew	–	7.95	5.5	5.4
Tonic Water	–	21.0	21.15	20.8
Coca Cola	–	0	0	< 0.5
Diet Coke	–	< 0.2	< 0.4	< 0.7

wurde durch Messen von bekannten Citratkonzentrationen in Wasser und durch Vergleich mit einer NMR-Methode zur Citratbestimmung bestätigt. Die mit allen drei Methoden gefundenen Werte differierten um maximal 10% (außer bei

dem Getränk „Mountain Dew“), wobei die Übereinstimmung zwischen der Absorptions- und der Fluoreszenzmethode in der Regel bei ca. 3% lag. Wiederholungsmessungen lieferten eine Standardabweichung von weniger als 3%. Daß auch kompetitive Proben gemessen werden können, wurde durch Untersuchungen von Elektrolytgetränken, die einen sehr hohen Elektrolytgehalt (eine hohe Ionenstärke) aufweisen, gezeigt. „All Sport“ enthält z.B. Polyphosphate, Benzoat, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ und Chloride. „Mountain Dew“, ein Erfrischungsgetränk mit viel Fructose und Sucrose, wurde analysiert, um zu belegen, daß die Methode auch in Gegenwart großer Zuckermengen anwendbar ist. Durch die hohe Saccharidkonzentration wird hier die NMR-Methode wegen der geringen Empfindlichkeit bei der Integration der Citrat-Signale ungenau. Um schließlich zu zeigen, daß die Methode nicht auf andere Analyten reagiert, wenn kein Citrat vorhanden ist, wurden „Coca Cola“ und „Diet-Coke“ untersucht, die kein bzw. nur sehr wenig Citrat enthalten. In allen Fällen funktionierte die Sensormethode einwandfrei.^[20]

Zusammengefaßt läßt sich feststellen: Ist ein Rezeptor bei einer bestimmten Anwendung für sein Gastmolekül selektiv, kann er für Methoden eingesetzt werden, die normalerweise Antikörper vorbehalten sind. Außerdem eignen sich synthetische Rezeptoren auch für Verdrängungsmethoden, was zu sehr einfachen Assays führt. Beide Konzepte gelten für alle synthetischen Rezeptoren. So arbeiten wir zur Zeit daran, noch komplexere Moleküle wie Neurotransmitter zu bestimmen.

Experimentelles

Die Nachweisgrenze für Citrat unter den unten angegebenen Bedingungen liegt bei etwa 5 mM. Durch Erhöhung des Methanolanteils und/oder durch Ändern des Verhältnisses von **1** zu **2** erreicht man auch eine Nachweisgrenze von bis zu 100 μM , vorausgesetzt, die Konzentrationen von möglichen Störkomponenten bleiben unterhalb der in Lit.^[13b] angegebenen Kreuzreaktivitätskonzentrationen.

Zur UV/Vis-spektroskopischen Citratbestimmung wurde eine 5 mM HEPES-Pufferlösung aus **1** (94 μM) und **2** (18 μM) in 25 Volumenteilen Wasser und 75 Volumenteilen Methanol eingesetzt. Die Bedingungen für den Fluoreszenzassay waren identisch, nur daß **1** und **2** in geringeren Konzentrationen (84 bzw. 5 μM) verwendet wurden. Für die Bestimmung wurde der Mittelwert aus drei Einzelmessungen herangezogen. Vor Zugabe zur Sensorlösung wurde der pH-Wert der Getränke mit NH_4OH auf 7.4 eingestellt. Für die NMR-Methode wurde das Getränk zunächst durch Celit filtriert. Dann wurden Aliquote mit NH_4OH auf pH 7.4 gebracht und gefriergetrocknet. Mit Hilfe einer NMR-Titrationsmethode mit Standardlösungen von THF und Acetonitril in D_2O und anschließender Integration wurde die Citratkonzentration bestimmt und die Konzentration im Getränk berechnet.

Eingegangen am 8. Juli 1997 [Z10654]

Stichwörter: Analytische Chemie • Chemosensoren • Citrat • Guanidinium-Salze • Wirt-Gast-Chemie

- Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 685; R. A. Bissell, A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, P. L. M. Lynch, G. E. M. Maguire, K. R. A. S. Sandanyake, *Chem. Soc. Rev.* **1992**, 21, 187; R. A. Bissell, A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, P. L. M. Lynch, G. E. M. Maguire, C. P. McCoy, K. R. A. S. Sandanayake, *Top. Curr. Chem.* **1993**, 168, 223; D. N. Reinhoudt, *Sensors Actuators B* **1995**, 24–25, 33; R. J. W. Lugtenberg, Z. Brzozka, A. Casnati, R. Ungarro, J. F. J. Engbersen, D. N. Reinhoudt, *Anal. Chim. Acta* **1995**, 310, 263.
- [2] J. Yoon, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5874; T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake, S. Shinkai, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 2287; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 2207; T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake, S. Shinkai, *Nature* **1995**, 374, 345.
- [3] S.-Y. Hong, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3330; A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, M. Nieuwenhuizen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1996**, 1967; R. Y. Tsien, *Biochemistry* **1980**, 19, 2396; A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, G. E. M. Maguire, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1213; H. A. Godwin, J. M. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6514.
- [4] T. W. Bell, Z. Hou, Y. Luo, M. G. B. Drew, E. Chapoteau, B. P. Czech, A. Kumar, *Science* **1995**, 269, 671.
- [5] Z. Pikramenou, K. M. Johnson, D. G. Nocera, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 3531.
- [6] D. H. Vance, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 9397.
- [7] S. R. Adams, A. T. Harootunian, Y. J. Buechler, S. S. Taylor, R. Y. Tsien, *Nature* **1991**, 349, 694.
- [8] Ein Chemosensor ist eine Anordnung zur molekularen Erkennung ohne Hilfe eines biologischen Erkennungsprinzips. A. W. Czarnik, *Acc. Chem. Res.* **1994**, 27, 302.
- [9] *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications* (Hrsg.: J. R. Birch, E. S. Lennox), Wiley, New York, **1995**.
- [10] A. W. Czarnik, *Chem. Biol.* **1995**, 2, 423.
- [11] L. Fabbri, A. Poggi, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 24, 197.
- [12] P. N. Kale, P. G. Adsule, *Handbook of Fruit Science and Technology*, Kap. 3 („Citrus“), **1995**, S. 39–65.
- [13] a) A. Metzger, V. M. Lynch, E. V. Anslyn, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 911–914; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 862–865. b) Dissoziationskonstanten: Citrat: 147 μM ; Succinat: 4.5 mM; Acetat: > 0.1 mM. Daraus erhält man Kreuzreaktivitäten für einfache Di- und Monocarbonsäuren von etwa 28% bzw. 0.14%. c) Die gezeigte Unsymmetrie der Bindung wurde mittels Röntgenstrukturanalyse gefunden.
- [14] C. L. Hannon, E. V. Anslyn, *Bioorg. Frontiers* **1993**, 3, 143.
- [15] K. V. Kilway, J. S. Siegel, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 114, 255.
- [16] J. Bramhall, J. Hofmann, R. DeGuzman, S. Montestruque, S. Schell, *Biochemistry* **1987**, 26, 6330; M. L. Graber, D. DiLillo, B. L. Friedman, E. Pastoriza-Munoz, *Anal. Biochem.* **1986**, 156, 202.
- [17] H. A. Benesi, J. H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 2703; F. Diederich, K. Dick, D. Griebel, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2273.
- [18] K. A. Connors, *Binding Constants, The Measurement of Molecular Complex Stability*, Wiley, New York, **1987**.
- [19] Typische Kalibrierkurven von Immunoassays sind hyperbolisch, während man bei semilogarithmischer Auftragung sigmoide Kurven findet (J. Wyman, S. J. Gill, *Binding and Linkage*, University Science Books, Mill Valley, CA, USA, **1990**, S. 55–57). Wir beobachten auch bei linearer Auftragung sigmoide Kurven, weil **1** in großem Überschuß gegenüber **2** vorliegt. Bei der Zugabe von Citrat wird es zunächst an freies **1** gebunden, bevor es signifikant **2** kompetitiv verdrängt.
- [20] Wir haben die Methode mit Hilfe der HPLC weiter validiert. Eine Reihe von Zitronensäureproben aus industrieller Quelle wurde mit unserer Fluoreszenzmethode analysiert, und die Ergebnisse wurden mit den HPLC-Ergebnissen des Auftraggebers verglichen. In allen Fällen differierten die Ergebnisse um maximal 5%.

[1] M. A. Mortellaro, D. G. Nocera, *CHEMTECH* **1996**, 26, 17; D. Diamond, M. A. McKerver, *Chem. Soc. Rev.* **1996**, 16; *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition* (Hrsg. A. W. Czarnik), Am. Chem. Soc., Washington, D. C., **1992**; *Chemosensors of Ion and Molecule Recognition* (Hrsg.: J.-P. Desvergne, A. W. Czarnik), Kluwer, New York, **1997**; A. P. de Silva, C. P. McCoy, *Chem. Ind.* **1994**, 992; A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, P. L. M. Lynch, *J.*