

**Automatische *Flow Injection Analysis*-Verfahren
für die Lebensmittel-, Umwelt-
und klinische Analytik**



DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Martin-Luther-Universität (Halle - Wittenberg)

von

Diplom-Biochemiker Hasson Mana
geb. am 10.08.1963 in Aden / Jemen

Gutachter:

1. Prof. Dr. F.W. Scheller (Universität Potsdam)
2. Prof. Dr. P. Jeroschewski (Universität Rostock)
3. PD habil. Dr. U. Spohn (MLU Halle-Wittenberg)
4. PD habil. Dr. H.H. Rüttinger (MLU Halle-Wittenberg)

Halle/Saale, 05. Mai 1998 (Verteidigt am 18. Nov. 1998)

Bibliographische Beschreibung und Referat

Hasson Abdo Mana Obadi Al-Zubeery

Dissertation A

„Automatische *Flow Injection Analysis*-Verfahren für die Lebensmittel-, Umwelt- und klinische Analytik“

145 Seiten, 86 Abb., 78 Gl., 15 Tab. und 157 Literaturstellen.

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, 1998

Kurzreferat

Auf der Grundlage der Reaktion von o-Phthalaldehyd (OPA), Thioglycolat und Ammoniak wurden neuentwickelte wäßrige Reagenzien zur schnell ansprechenden fluorimetrischen Detektion von Ammoniak und von reduzierenden Schwefelverbindungen, wie Sulfid, Sulfit und Thiolen wie z.B. Glutathion, Cystein und Thiocholin, in einem vier Größenordnungen der Konzentration umfassenden linearen Bereich realisiert.

Durch den Einsatz dieser Reagenzien ohne oder mit immobilisierten Enzymen, die eine der detektierbaren Verbindungen (NH₃ und Thiole) freisetzen, läßt sich eine Vielzahl interessanter z.T. neuartiger FIA-Bestimmungsverfahren verwirklichen, die durch höhere Meßempfindlichkeit und Reagenzselektivität sowie bessere Operationsstabilität und größeren Linearitätsbereich im Vergleich zu anderen vorhandenen FIA-Verfahren ausgezeichnet sind. Sie finden in der Bioprozess- (Glutamat, Glutamin und Lysin), Lebensmittel- (Ammoniak, Lysin, Glutamat und Sulfit), Umwelt- (Ammoniak, Sulfit, Sulfid, Metallionen und Insektizide wie z.B. Carbamate, Phosphorsäure- und Phosphonsäureester) und klinischen Analytik (Ammoniak, Harnstoff, Creatinin und Creatin) Anwendung.

Computergesteuerte vollautomatische FIA-Meßplätze wurden zur Anwendung der entwickelten Verfahren realisiert.

Inhaltsverzeichnis

	Verzeichnis der verwendeten Symbole	iv
1	Einleitung	1
2	Theoretischer Teil	3
2.1	Fließinjektionsanalyse.....	3
2.2	Fluorimetrische Detektion.....	7
2.3	Von o-Phthalaldehyd (OPA) abgeleitete Bestimmungsreaktion.....	10
2.4	Enzymimmobilisierung.....	13
2.5	Grundlagen der analytischen Bestimmungsverfahren.....	15
2.5.1	Bestimmung von Enzymaktivitäten unter FIA-Bedingungen.....	15
2.5.2	Substrat- und Inhibitorbestimmung mit gelösten Enzymen.....	17
2.5.3	Substrat- und Inhibitorbestimmung mit immobilisierten Enzymen.....	19
2.5.3.1	Anwendung suspendierter Enzymimmobilisate.....	19
2.5.3.2	Anwendung gepackter Strömungsrohre.....	21
2.6	Immunoassays.....	23
3	Experimenteller Teil	27
3.1	Allgemeiner Meßplatzaufbau.....	27
3.2	Meßplätze für fluorimetrische FIA-Verfahren.....	28
3.2.1	Grundanordnung.....	28
3.2.2	FIA-Anordnung mit Gasdialyse.....	29
3.2.3	Enzymatische FIA.....	31
3.2.3.1	Einkanal-FIA-Anordnung.....	31
3.2.3.2	Multikanal-FIA-Anordnung.....	33

3.2.4	FIA-Anordnung mit Inkubationszelle	33
3.2.5	Immuno-FIA mit vorgeschalteter Festphasenextraktion.....	36
3.3	FIA-Automatisierung	38
3.4	Enzymimmobilisierung	40
3.4.1	Immobilisierung auf Glaspartikel.....	40
3.4.2	Immobilisierung auf Magnetpartikel	40
3.5	Festphasenextraktion von Pestiziden	42
4	Ergebnisse und Diskussion	44
4.1	Fluorimetrische Verfahren zur Bestimmung von Ammoniak und ammoniakfreisetzender Substanzen	44
4.1.1	Entwicklung eines wäßrigen und selektiven OPA-Reagenzes	45
4.1.2	Selektivität des OPA/Thioglycolat-Reagenzes.....	50
4.1.3	Bestimmung von Ammoniak.....	51
4.1.4	Ammoniakeliminierung	54
4.1.5	Enzymatische FIA-Assays.....	56
4.1.5.1	Bestimmung von Harnstoff	56
4.1.5.2	Bestimmung von L-Glutamin	58
4.1.5.3	Bestimmung von L-Glutamat.....	60
4.1.5.4	Bestimmung von L-Lysin.....	62
4.1.5.5	Bestimmung von Creatinin.....	63
4.1.5.6	Bestimmung von Creatin	65
4.2	Mehrkomponenten-FIA	67
4.2.1	Nebeneinanderbestimmung von Ammoniak, Harnstoff, Creatin und Creatinin	67
4.2.2	Nebeneinanderbestimmung von Ammoniak, Glutamin und Glutamat	71
4.3	Fluorimetrische Verfahren zur Bestimmung reduzierender Schwefelverbindungen	73
4.3.1	Bestimmung von Sulfit.....	75

4.3.2	Bestimmung von Sulfid.....	79
4.3.3	Bestimmung von Thiocholin	81
4.3.4	Bestimmung von reduziertem Glutathion	86
4.3.5	Bestimmung von Cystein.....	88
4.3.6	Selektivität des OPA/NH ₄ ⁺ -Reagenzes.....	89
4.4	FIA-Bestimmung von Enzyminhibitoren	94
4.4.1	Bestimmung von Ureaseinhibitoren	94
4.4.1.1	Bestimmung von Schwermetallionen.....	97
4.4.1.2	Bestimmung von Pestiziden.....	99
4.4.2	Bestimmung von Acetylcholinesteraseinhibitoren	99
4.5	Immuno-FIA	107
4.5.1	Voruntersuchungen.....	107
4.5.2	Immuno-FIA in wäßrigem Medium.....	109
4.5.3	Immuno-FIA in organischen Lösungsmitteln	111
4.5.3.1	Einfluß des Lösungsmittels auf die enzymatische Indikatorreaktion ...	111
4.5.3.2	Einfluß des Lösungsmittels auf die immunologische Reaktion.....	112
4.5.3.3	Bestimmung von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure in Methanol	113
4.5.4	Kombination der Immuno-FIA mit der Festphasenextraktion	114
5	Zusammenfassung.....	117
6	Literaturverzeichnis.....	119
Anhang	129
A.1	Liste der Chemikalien	129
A.2	Liste der Enzyme	131
A.3	Liste der Materialien.....	131
A.4	Liste der Geräte / FIA-Komponenten	132
A.5	Iodometrische Titration.....	132
A.6	Steuerprogramm.....	133

Verzeichnis der verwendeten Symbole

Abb.	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AS	Autosampler
BSA	Rinderserumalbumin
CA	Creatinase
CIH	Creatininiminohydrolase
CPG	Controlled Pore Glas
D	Detektor
DTT	Dithiotreitol
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FIA	Flow Injection Analysis
FIIA	FIA-Immunoassay
GDZ	Gasdialysezelle
Gl.	Gleichung
GluOx	Glutamatoxidase
GS	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
Hap	Hapten
HDPE	poröses <i>high density</i> Polyethylen
HRP	Meerrettichperoxidase
I	Integrator
IMER	Reaktor für immobilisiertes Enzym
Isop	Isopropanol
IV	Injektionsventil
k_{cat}	katalytische Aktivität

K_M	Michaelis-Menten-Konstante
KP_i	Kaliumphosphatpuffer
Lit.	Literatur
LysOx	Lysinoxidase
m	Anzahl der Meßpunkte
Mag	paramagnetische Partikel
MS	Mischschleife
MV	(3-Wege/2 Positions-)Magnetventil
MWV	Mehrwegeventil
n	Anzahl der Messungen pro Meßpunkt
$NaKP_i$	Natrium-Kaliumphosphatpuffer
OPA	o-Phthaldialdehyd
PC	Personalcomputer
P_i	Pumpe Nr. i
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVC	Polyvinylchlorid
R	Reagenz
r.E.	relative Einheit
r^2	Korrelationskoeffizient
RK	Reaktionskammer
RSD	relative Standardabweichung
RZ	Inkubationszelle
SPE	Festphasenextraktion
TGS	Thioglycolsäure
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
UV	Ultraviolett
v_0	Initialgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion
V_{max}	maximale Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion
WP	Waschpuffer

1 Einleitung

In der Lebensmittel-, Umwelt- und Bioprozeßanalytik sowie in der klinischen Analytik wächst der Bedarf an Bestimmungsverfahren mit hoher Selektivität und Empfindlichkeit sowie Genauigkeit und Zuverlässigkeit.

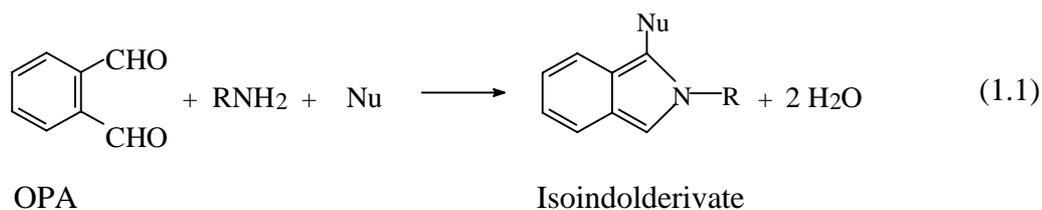
In der modernen Biotechnologie gewinnen Enzyme und Antikörper aufgrund ihrer Spezifität zunehmend an Bedeutung. Durch Immobilisierung soll die Langzeitstabilität und Signalstabilität verbessert werden.

Auch bezüglich der Entwicklung schneller, präziser und automatischer Bestimmungsverfahren ist der Einsatz von Fließinjektionsanalyse (FIA: *Flow Injection Analysis*) sehr vorteilhaft.

Die fluorimetrische Detektionsmethode zeichnet sich durch hohe Empfindlichkeit, Selektivität und Linearität über mehrere Konzentrationsdekaden aus.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung sowohl enzymatischer als auch immunochemischer FIA-Verfahren zur Bestimmung lebensmitteltechnisch-, klinisch- und umweltrelevanter Analyte.

Ausgehend von der spontanen Bildung fluoreszierender Isoindolderivate nach Gleichung (1.1) sollten neue und empfindliche Detektionsverfahren zur Indikation von enzymatischen Bestimmungsreaktionen ausgearbeitet werden,



wobei Nu reduzierende Schwefelverbindungen wie SO_2 , H_2S und Thiole sowie CN^- [1] und RNH_2 primäre Amine wie z.B. Ammoniak, Methylamin, Aminosäuren sind.

Dabei waren zunächst empfindliche und sich durch einen weiten linearen Bestimmungsbereich auszeichnende FIA-Verfahren zur Detektion von Ammoniak und Schwefelverbindungen auszuarbeiten.

Die fluorimetrische Detektion von Ammoniak ermöglicht die Bestimmung der Aktivität ammoniakfreisetzender Enzyme, wie z.B. von Amidohydrolasen, Iminohydrolasen, Aminosäureoxidasen und -dehydrogenasen und die Verfolgung entsprechender Bestimmungsreaktionen.

Die fluorimetrische Detektion von Thiocholin, Cystein, Cystin, Coenzym A sowie reduziertem und oxidiertem Glutathion eröffnet den Weg zur empfindlichen Indikation weiterer, z.T. neuartiger enzymatischer Assays.

Für die spezifische Detektion von organischen Substanzen, die sich nicht oder nur sehr aufwendig enzymatisch umsetzen lassen, können in vielen Fällen Antikörper hergestellt und in hochempfindlichen Assays eingesetzt werden.

Da die Regenerierung von immobilisierten Antikörpern relativ drastische Bedingungen erfordert, ist es schwierig oder gänzlich unmöglich, reversible bzw. langzeitstabile Immunosensoren zu entwickeln. Homogene Immunoassays stellen aufgrund der deutlich kleineren Empfindlichkeiten keine Alternative dar. Deshalb ist die Anwendung von an Magnetpartikel gebundenen Antikörpern sinnvoll. Dies trägt außer der leichten Regenerierung der immobilisierten Antikörper dazu bei, daß die Automatisierung des heterogenen Immunoassays in der FIA durch den Einsatz eines elektrischen Magneten bzw. einer magnetischen Separation möglich wird.

2 Theoretischer Teil

2.1 Fließinjektionsanalyse

Die Fließinjektionsanalyse (**FIA**, *Flow Injection Analysis*) wurde 1975 von RUZICKA und HANSEN [2] eingeführt. Die FIA ist eine Methode der nichtsegmentierten Durchflußanalyse, bei der ein präzis definiertes Volumen V_S einer Proben- oder Reagenzlösung in einen nichtsegmentierten Strom einer Trägerlösung T injiziert wird. Aufgrund der sich zwischen dem Ort der Injektion und dem Durchflußdetektor einstellenden konstanten Verweilzeitverteilung bilden sich streng reproduzierbare Konzentrationsprofile aus, die durch einen geeigneten Durchflußdetektor direkt oder nach Vermittlung durch eine Indikatorreaktion kontinuierlich aufgezeichnet werden [3]. Aufgrund ihrer hohen Einsatzflexibilität kann die FIA in vielen Anwendungsbereichen zur quantitativen Konzentrationsanalytik eingesetzt werden [4,5].

Abb. 2.1 zeigt eine einfache FIA-Anordnung mit einer Pumpe P, einem Injektionsventil IV, einer Mischschleife MS und einem Detektor D.

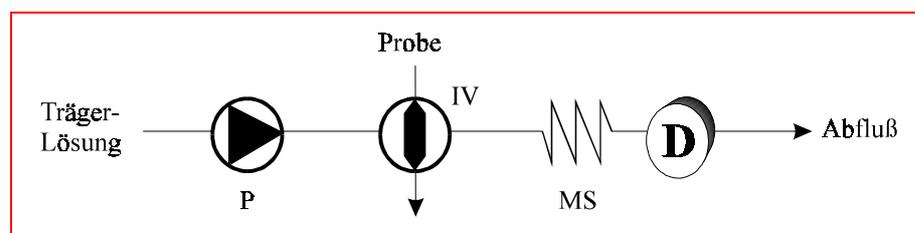


Abb. 2.1: Einfaches FIA-System, P: Pumpe, IV: Injektionsventil, D: Detektor, MS: Mischschleife.

Nach Injektion der Probenlösung läuft in der Misch- und Reaktionsschleife MS, die durch andere geeignete Durchflußreaktoren ersetzt werden kann, die Vermischung der Probenlösung mit der Trägerlösung und gegebenenfalls eine Bestimmungs- oder Indikatorreaktion ab. Das durch den Detektor aufgezeichnete Peaksignal kann bezüglich seiner Höhe, Breite und Fläche ausgewertet werden (Abb. 2.2).

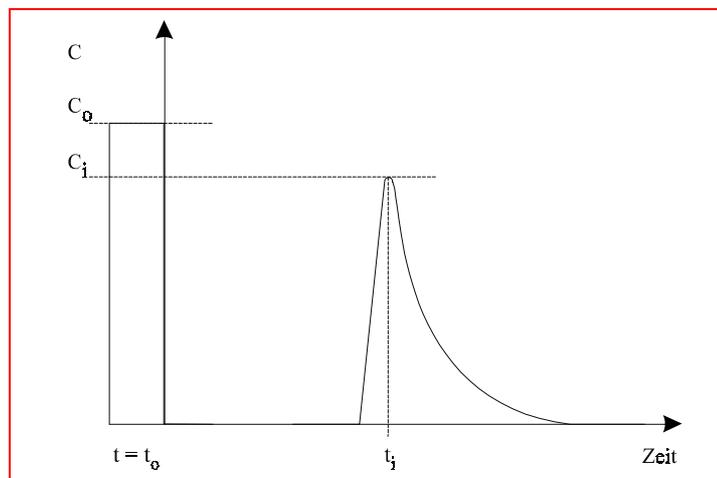


Abb. 2.2: Konzentrations-Zeit-Profil der Probe vor der Injektion ($t = t_0$) und nach der Vermischung ($t = t_i$).

Die Probe wird als Rechteckimpuls mit der Konzentration C_0 injiziert. Das sich ausbildende Konzentrationsprofil wird durch die Verdünnungsfaktoren D_i zum jeweiligen Zeitpunkt t_i charakterisiert (Gl. 2.1).

$$D_i = C_0 / C_i \quad (2.1)$$

D_i wird durch die laminare Strömung im Durchflußkanal und bei relativ langen Verweilzeiten auch durch die radiale und die axiale Diffusion bestimmt. Die Funktion $D_i(t)$ beschreibt das hydrodynamische und transportkinetische Verhalten des jeweils angewendeten FIA-Systems und wird bei der chemischen Umsetzung der Probensubstanz durch die entsprechende Reaktionskinetik überlagert.

Die Verdünnung D_i und der Umsatzgrad X der Bestimmungsreaktion sind die entscheidenden Optimierungsparameter eines jeden FIA-Verfahrens. Tab.2.1 faßt die wesentlichen Vorteile der FIA zusammen.

Tab. 2.1: Vorteile der FIA

- gute Reproduzierbarkeit,
- hohe Flexibilität bezüglich der Anwendung von Bestimmungsreaktionen, Detektoren sowie Trenn- und Anreicherungsoperationen [6,7,8],
- kurze Analysenzeiten und hoher Probendurchsatz,
- kurze Vorbereitungszeiten,
- geringer Einfluß von Kontaminationen,
- geringer Reagenzverbrauch,
- Eignung für die On-line-Kopplung an technische Stoffumwandlungsprozesse [9,10] und
- leichte Automatisierung komplexer Analysenverfahren.

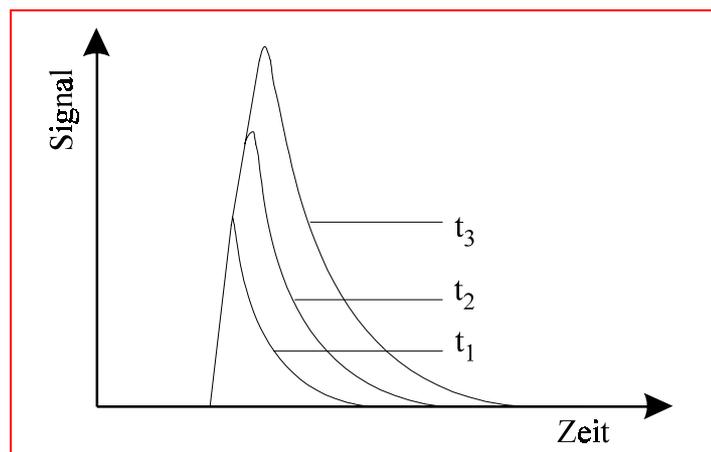


Abb. 2.3: Signale infolge der *Stopped flow*-FIA zu drei verschiedenen Inkubationszeiten (t_1 , t_2 und t_3) in der Mischschleife.

Besondere Bedeutung hat die in der vorliegenden Arbeit häufig eingesetzte **Stopped flow-FIA**, bei der der Trägerlösungsfluß im Enzymreaktor, in der Misch- bzw. Reaktionsschleife oder im Detektor angehalten wird. Bei nahezu konstanter Verdünnung D_i wird dabei über die Verweilzeit der Umsatzgrad langsamer Bestimmungsreaktionen eingestellt (Abb. 2.3). Die Vorteile der Methode [11] sind in Tabelle 2.2 zusammengefaßt.

Tab. 2.2: Vorteile der *Stopped flow-FIA*

- Durchführung langsamer Bestimmungsreaktionen und Trennprozesse,
- Aufnahme des zeitlichen Verlaufes der Bestimmungsreaktion (*variable time method*),
- keine Verlängerung der Reaktionsstrecke für die Erhöhung des Umsatzes der Bestimmungsreaktion notwendig und
- hohes Maß an zeitlicher Entkopplung mehrerer Analysenschritte möglich.

2.2 Fluorimetrische Detektion

Die in der vorliegenden Arbeit bevorzugte fluorimetrische Detektion zeichnet sich durch eine im Vergleich zur ebenfalls angewendeten photometrischen Detektion höhere Sensitivität und Selektivität aus. Das Signal/Rauschverhältnis ist durch die Messung der selektiv angeregten Fluoreszenz deutlich vergrößert. Der lineare Bestimmungsbereich umfaßt oft mehr als drei Größenordnungen. Die Fluoreszenzintensität I_f wird durch folgende Gleichung [12]

$$I_f = k_g \Phi_f I_0 (1 - e^{-\epsilon cd}), \quad (2.2)$$

beschrieben, wobei k_g eine Gerätekonstante, Φ_f die Quantenausbeute der Fluoreszenz, I_0 die Intensität des Anregungslichtes, ϵ der molare Extinktionskoeffizient, d die mit I_0 eingedrungene Schichtdicke der Lösung und c die Konzentration der zu detektierenden Substanz ist. Entwickelt man die Exponentialfunktion in einer Reihe, so kann diese für verdünnte Lösungen, da c sehr klein ist, nach dem zweiten Glied abgebrochen werden (siehe Gleichung 2.3) [12]. Unter dieser Voraussetzung ist die Fluoreszenzintensität bei konstantem I_0 der Konzentration des fluoreszierenden Stoffes proportional, so daß eine Eichkurve für Konzentrationsbestimmungen aufgenommen werden kann.

$$I_f = k_g \Phi_f I_0 \epsilon c d \quad (2.3)$$

Die Intensität der Fluoreszenz nimmt mit der Quantenausbeute und der Intensität des Anregungslichtes linear zu. Bei einer Quantenausbeute von 1 wird für jedes absorbierte Photon ein energieärmeres Photon als Fluoreszenzstrahlung emittiert. Das Fluoreszenzsignal kann durch verschiedene, weitgehend auszuschaltende Effekte, wie z.B. die Rayleigh- und die Raman-Streuung sowie die Fluoreszenzlöschung beeinflußt werden [13-15].

Dem durch einen Photomultiplier oder eine Photodiode gemessenen Signal ist je nach Selektivität der Photonendetektion in mehr oder weniger starkem Maße die **Rayleigh-Streuung** (elastische Streuung) des Anregungslichtes überlagert. Dieser Effekt wird durch Grenzflächen (Luft/Zellenwand oder Zellenwand/Lösung), Schwebeteilchen und Luftblasen in der Lösung verstärkt. Auch kolloidale Partikel, wie sie z.B. in konzentrierten Proteinlösungen vorliegen, tragen dazu bei. Der Streuungspeak ist im Anregungs- und Emissionsspektrum bei der Wellenlänge des Emissions- bzw. Anregungslichtes zu finden (Abb. 2.4). Die Differenz zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge wird als Stokessche Verschiebung bezeichnet.

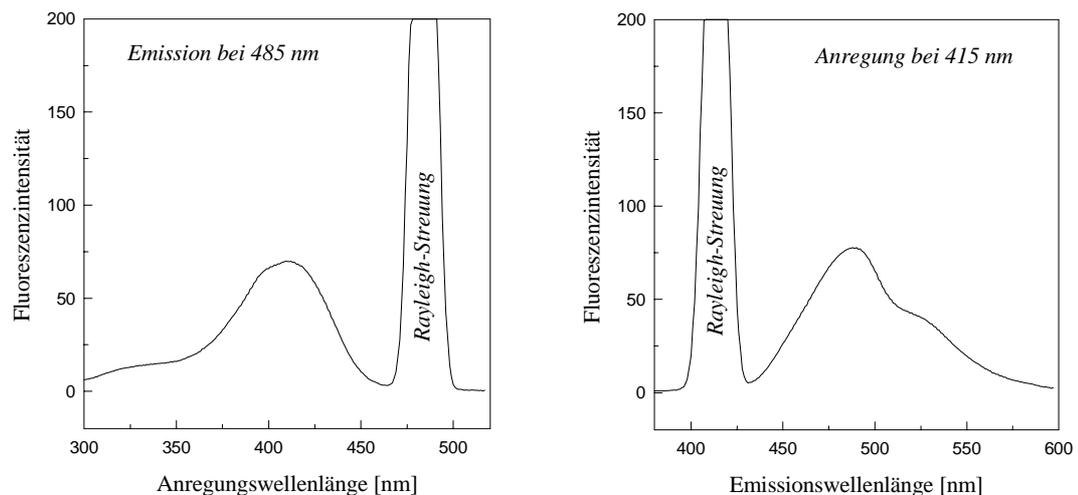


Abb. 2.4: Anregungs- (links) und Emissionsspektrum (rechts) eines von Ammoniak und Thioglycolsäure abgeleiteten Isoindolderivates (siehe Abschn. 4.1).

Zu beachten ist auch die **Raman-Streuung** (inelastische Streuung). Die Wellenlängen der Ramanstreuung ordnen sich symmetrisch um die Anregungswellenlänge an. Die Photonen des Anregungslichtes treten mit den Schwingungs- und Rotationszuständen aller in der Probenlösung befindlichen Moleküle in Wechselwirkung, wodurch den Photonen Energie entzogen oder übertragen wird. Im Ramanspektrum treten bezogen auf die Anregungs-

wellenlänge im kurzwelligen Bereich die weniger intensiven anti-Stokesschen Linien und im längerwelligen Bereich die intensiveren Stokesschen Linien auf.

Neben der Konkurrenz der strahlenden und strahlungslosen Vorgänge können andere Prozesse, wie z.B. die Reabsorptions-, die Konzentrations- und die Fremdlöschung, die Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute hervorrufen.

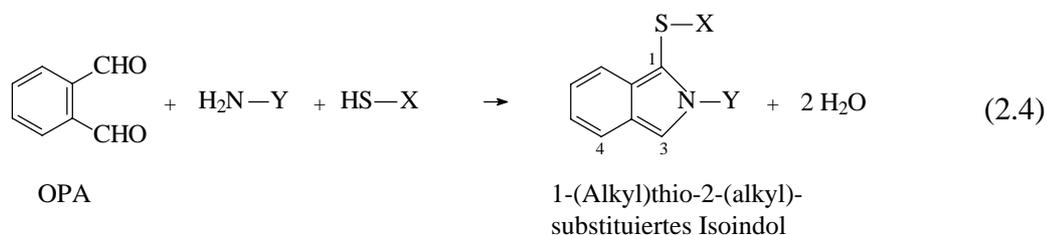
Der durch zu hohe Konzentrationen des Fluorophoren verursachte innere Filtereffekt gibt sich durch den Übergang in den nichtlinearen Detektionsbereich zu erkennen und wird durch die **Reabsorption** bzw. Selbstabsorption des von einem Molekül ausgesendeten Fluoreszenzlichtes durch ein anderes verursacht. Je höher die Konzentration ist, um so größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß die emittierte Strahlung eines Moleküls von einem anderen reabsorbiert wird. Voraussetzung dafür ist, daß sich Emissions- und Absorptionsspektrum teilweise überlappen. Dabei sind auch die Schichtdicke der Fluoreszenzküvette sowie die geometrische Platzierung im Strahlengang des Fluoreszenzspektrometers von entscheidender Bedeutung.

Die Bildung von Excimeren zwischen einem im Grund- und einem im angeregten Zustand befindlichen Molekül und von Dimeren aus zwei sich im Grundzustand befindenden Molekülen führt durch sog. **Konzentrationslöschung** ebenfalls zu einer Verringerung der am Emissionsmaximum gemessenen Fluoreszenzintensität. Bei Excimeren wird die Monomerfluoreszenz gelöscht; es tritt eine nach längeren Wellen verschobene und strukturlose Fluoreszenz auf, die als Excimerfluoreszenz bezeichnet wird. Im Gegensatz zu Excimeren kann die Assoziation zu Dimeren an Hand des UV-VIS-Absorptionsspektrums beobachtet werden. Dimere sind häufig nicht fluoreszenzfähig.

Darüber hinaus sind typische Fluoreszenzquencher, wie z.B. Sauerstoff, schwerere Halogenidionen, wie I^- und Br^- , und Schwermetallionen, die zu einer sog. **Fremdlöschung** der Fluoreszenz führen, zu berücksichtigen.

2.3 Von o-Phthalaldehyd abgeleitete Bestimmungsreaktionen

Seit der Einführung der Derivatisierung von primären Aminen mit o-Phthalaldehyd (OPA) durch Roth [16] hat die Methode eine weite Verbreitung gefunden. Das Verfahren beruht auf der Reaktion von OPA, 2-Mercaptoethanol und primärem Amin in alkalischem Medium, wobei ein 1-Mercaptoethanol-2-alkylisoindol entsteht, das fluoresziert.



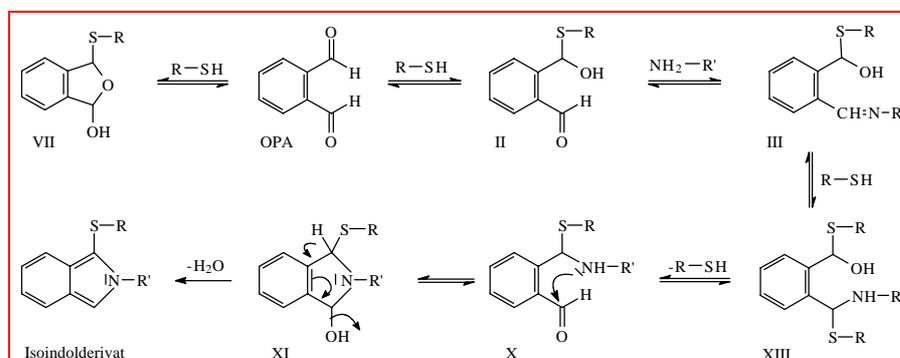
X: H oder R

Y: H oder R'

o-Phthalaldehyd reagiert mit primären Aminen in Anwesenheit von reduzierenden Schwefelverbindungen, wie z.B. Thiolen und Hydrogensulfid. Es bilden sich dabei 1-Alkylthio-2-alkylsubstituierte Isoindolderivate [17]. Solche Isoindole sind sehr reaktiv und daher oft instabil [18].

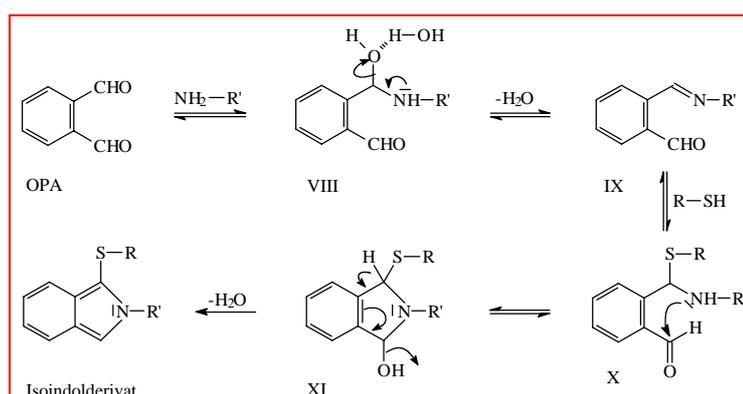
Verschiedene Reaktionsmechanismen werden diskutiert. Nach Simons und Johnson [18] reagiert das OPA mit der Thiolgruppe und nachfolgend mit dem Amin (siehe Schema 2.1). OPA und Thiol reagieren zu einem Hemithioacetal (II), das mit dem Amin zu einem Imin (III) umgesetzt wird. Durch den nukleophilen Angriff einer weiteren Thiogruppe entsteht das Hemithioacetal (XIII), das sich in das α -Alkylaminobenzylsulfid (X) umwandelt. Der Isoindolring (XI) wird durch intramolekularen nukleophilen Angriff des sekundären Amins auf die freie Carbonylgruppe gebildet. Nach Dehydration entsteht das Isoindolderivat. OPA

befindet sich in Anwesenheit der Thiolverbindung im Gleichgewicht mit dem zyklischen Thiol (VII) [18].



Schema 2.1: Mechanismus der Reaktion von OPA mit primärem Amin in Anwesenheit von Thiolverbindung [18,19].

Sternson *et al.* [19] hat einen alternativen Weg vorgeschlagen (Schema 2.2). OPA reagiert erst mit dem primären Amin zu einem Carbinolamin (VIII), das im nächsten Schritt zum reaktiven Imin (IX) umgewandelt wird. Dieses wird von der Thiolgruppe angegriffen, wobei das α -Alkylaminobenzylsulfid (X) entsteht. Im weiteren läuft die Reaktion wie im Schema 2.1 ab. Der tatsächliche Reaktionsablauf wird entscheidend vom jeweiligen pH-Wert bestimmt.



Schema 2.2: Mechanismus der Reaktion von OPA mit Thiolverbindung in Anwesenheit von primärem Amin [19].

Die Stabilität der Isoindolderivate wird durch die Substituenten X (Aminen) und Y (Thiole) sowie ihre Abstimmung aufeinander bestimmt. Jacobs *et al.* [20]

fanden, daß Thiole mit zunehmender Verzweigung zur Stabilisierung von 4-Aminobuttersäure-Isoindolderivaten beitragen. Dies führte zur Annahme, daß der sterische Umfang der Thiole ein wesentlicher Faktor für die Isoindolstabilität ist.

Stobaugh *et al.* [20] studierten die Stabilität der Isoindolderivate in Abhängigkeit vom N-Substituenten und der zusätzlichen Substitution am α -C-Atom des Amins. Die Ergebnisse zeigten, daß die Stabilität auf einen sterischen Faktor zurückzuführen ist. Mit der Carboxylatgruppe am α -C-Atom des Amins, wie im Falle der α -Aminosäuren erhöht sich die Stabilität des Isoindolderivates. Lindroth und Mopper [17] begründeten dies mit dem elektronendrückenden Effekt der Carboxylatgruppe auf das α -C-Atom.

Cystein bildet Derivate, die viel schwächer fluoreszieren als andere Aminosäuren. Beim Cystein konkurriert die Thiolgruppe mit der der Thiolcomponente im Sinne eines zusätzlichen Ringes (siehe Abschn. 4.3.5), was zu geringerer Quantenausbeute führt.

Simons und Johnson [18] charakterisierten an Hand von 2-Mercaptoethanol-Isoindolderivaten die Zersetzungskinetik in Zusammenhang mit dem intramolekularen nukleophilen Angriff der Hydroxylgruppe vom Mercaptoethanol auf die Position 1 des Isoindolrings. Die Herabsetzung der Zerfallsrate bei Mercaptoethanolprodukten in Boratpuffer, der im Gegensatz zum Phosphatpuffer zur Komplexbildung mit der Hydroxylgruppe führt, stützt die Annahme einer Beteiligung dieser Hydroxylgruppe am Zersetzungsmechanismus solcher Isoindol-derivate [21]. Stobaugh *et al.* [22] beobachteten, daß 1-Alkylthio-2-alkyl-substituierte Isoindole ähnlich wie Isoindole der Autoxydation unterliegen. Eine weitere Möglichkeit der Destabilisierung von 1-Alkylthio-2-alkylisindolprodukten ist die Bildung von 1,3-Dialkylthio-2-alkyl-substituierten Isoindol-derivaten [18].

2.4 Enzymimmobilisierung

Nach einer Definition der *European Federation of Biotechnology* (1983) umfaßt der Begriff „**immobilisierte Enzyme**“ alle Enzyme, die sich in einem Zustand befinden, der ihre Wiederverwendung erlaubt. Die für ihre Anwendung in der analytischen Chemie wesentlichen Vorteile immobilisierter Enzyme sind: die Wiederverwendbarkeit der Enzyme und die oft erhöhte Enzymstabilität, die zu einem geringeren Enzymverbrauch und in vielen Fällen zu höherer Reproduzierbarkeit führen [23].

Die kovalente Enzymbindung ist vorzuziehen, da die resultierenden Enzymimmobilisate größere Bereiche der gewählten Reaktionsbedingungen, wie z.B. pH-Wert, Ionenstärke, Konzentration gelöster Proteine und anderer Polyelektrolyte tolerieren können.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Enzyme auf poröse, aminopropylsilylierte Glaskugeln und silanierte paramagnetische Eisenoxidpartikel kovalent immobilisiert [24,25].

Die Trägerpartikel werden zunächst mit Glutardialdehyd aktiviert, wobei es zwischen Amino- und Aldehydgruppen zur Ausbildung Schiffscher Basen kommt, wobei allerdings Folgereaktionen, wie Poly- und Aldolkondensationen zu beachten sind. Das anschließend zugegebene Enzym bindet in gleicher Weise über freie Aminogruppen, in vielen Fällen jedoch fast ausschließlich über die ϵ -Aminogruppe freier Lysinreste an die verbleibenden Aldehydgruppen. Beide Reaktionsschritte laufen in einem optimalen pH-Bereich zwischen 6.0 und 8.0 ab, wobei jedoch die höchste Hydrolysestabilität der Schiffschen Basen zwischen pH 6.5 und 7.5 erreicht wird.

Poröse Glaspartikel mit einem Porendurchmesser zwischen dem 4 bis 10-fachen des scheinbaren, globulären Durchmessers des Enzymmoleküls sind aufgrund ihrer großen Oberfläche und hohen mechanischen Stabilität besonders gut als Trägermaterialien geeignet [26]. Der Porendurchmesser stellt ein Optimum

zwischen erreichbarer Oberfläche und Enzymstabilisierung sowie Zugänglichkeit dar. Solche Enzymimmobilisate zeigen oft in miniaturisierten Strömungsrohren massentransportkinetisch kontrollierte Substratumsätze [26].

Bei der Immobilisierung von Enzymen werden diese in ihren physikalischen und biochemischen Eigenschaften mehr oder weniger verändert. Vorrangig zu nennen sind die sterische Hinderung des Substratzuganges zum aktiven Zentrum, Änderungen der Proteinkonformation, sowie Änderungen der Dissoziationskonstanten basischer und saurer Seitenketten, was zu Änderungen der elektrischen Ladungsverteilung führen kann. Zu beachten ist bei der Immobilisierung in Poren die zuweilen auftretende Hemmung des Substrat- und Produkttransportes, so daß z.B. bei hoher Enzymaktivität innerhalb und sehr niedriger Enzymaktivität außerhalb der Poren eine diffusionskontrollierte Umsatzkinetik auftritt, die zwar nicht von der Durchflußgeschwindigkeit im gepackten Strömungsrohr wohl aber von der Temperatur und der Viskosität der Träger- und Probenlösungen abhängt.

2.5 Grundlagen der analytischen Bestimmungsverfahren

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen enzymatischen FIA-Verfahren beruhen auf gelösten und immobilisierten Enzymen, wobei letztere als Suspension in einem miniaturisierten Rührkessel oder als gepackte Schicht in einem miniaturisierten Strömungsrohr, dem sogenannten immobilisierten Enzymreaktor (IMER) eingesetzt werden.

2.5.1 Bestimmung von Enzymaktivitäten unter FIA-Bedingungen

Aufgrund der präzisen Einstellbarkeit von Verweilzeiten eignet sich die FIA nach genauer Thermostatierung zur Bestimmung von Enzymaktivitäten, wobei man zwischen der Festzeitmethode und der variablen Zeitmethode unterscheiden kann. Beide Meßregime sind in Abb. 2.5 schematisch dargestellt.

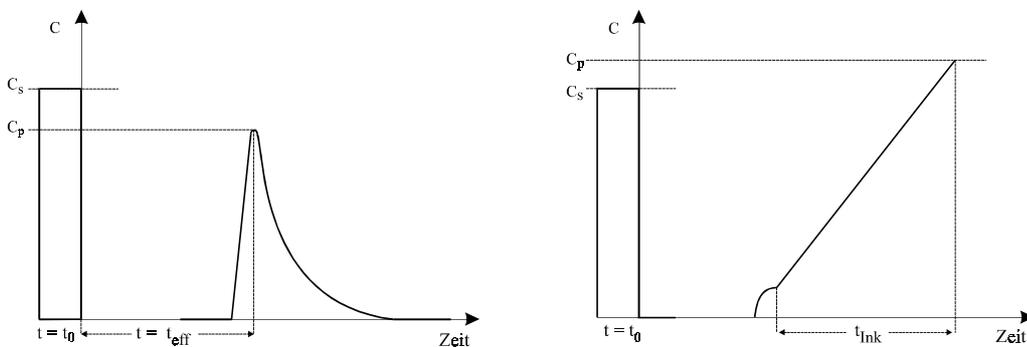


Abb. 2.5: Zeitabhängige Analytkonzentration bei der Fest- (links) und variablen Zeitmethode (rechts). c : Konzentration, c_s : [Substrat], c_p : [Produkt], t_{Ink} : Inkubationszeit.

Bei der **Festzeitmethode** wird die enzymhaltige Probenlösung in einen kontinuierlichen Trägerstrom, der das Substrat und gegebenenfalls Cofaktor enthält, injiziert und mit diesem vermischt, wobei aufgrund der konstanten Verweilzeit zwischen dem Injektionspunkt und der Detektion der Umsatzgrad einer Bestimmungsreaktion (Gl. 2.5) mit der Enzymaktivität korreliert werden kann. Bei der **variablen Zeitmethode** wird die Probenlösung nach Vermischung mit der Träger-/Reagenzlösung in einem Durchflußreaktor oder auch im Durchfluß-Detektor

angehalten. Der Umsatzgrad der jeweiligen Bestimmungsreaktion kann mit der Stopzeit und der Enzymaktivität korreliert werden. Die Empfindlichkeit der Enzymaktivitätsbestimmung kann deshalb über die Stopzeit eingestellt werden. Der Vorteil dieser sogenannten *Stopped flow*-FIA besteht darin, daß auch sehr kleine Enzymaktivitäten bestimmt werden können.

Betrachtet wird im folgenden das Reaktionsschema (Gl. 2.5)



mit dem Substrat S, dem Cofaktor C, dem Produkt P und der Enzymkonzentration [E]. Bei der Festzeitmethode wird die zu analysierende Enzymlösung in einen Konditionierpuffer injiziert und anschließend mit der Substratlösung vermischt (Abb. 2.6). Die effektive Verweilzeit t_{eff} wird durch die Volumendurchflußgeschwindigkeit v_{vol} [ml/min] zwischen dem Mischpunkt M und dem Punkt der Detektion festgelegt und errechnet sich nach Gleichung 2.6

$$t_{\text{eff}} = (AL / v_{\text{vol}}) - t_{\text{mix}} - \tau \quad (2.6)$$

aus der Querschnittsfläche A und der Länge L des Durchflußkanals sowie der Mischzeit t_{mix} . Gegebenenfalls ist die die Lagphase des Enzyms charakterisierende Zeit τ zu berücksichtigen, die man bei Extrapolation der Auftragung der Peakhöhe h gegen die Verweilzeit auf die Nulllinie erhält (siehe Abb. 2.7).

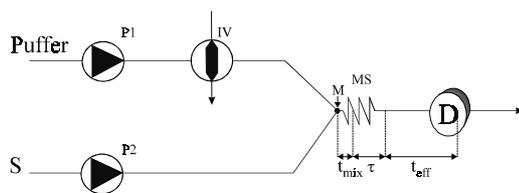


Abb. 2.6: FIA-Meßanordnung.

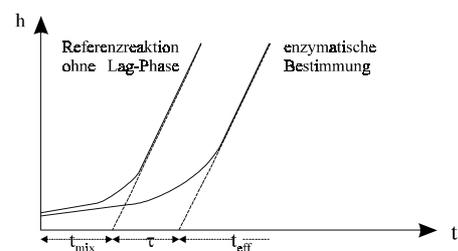


Abb. 2.7: Auftragung der Peakhöhe gegen die Zeit.

Zu berücksichtigen ist die Verdünnung $D_{E,max}$ der injizierten Enzymlösung (Gleichung 2.7)

$$D_{E,max} = [E]_o / [E]_{max} \quad (2.7)$$

mit der Enzymkonzentration $[E]_o$ in der Probenlösung bzw. $[E]_{max}$ am Peakmaximum. Ausschluß einer Substratüberschußhemmung vorausgesetzt, folgt bei der vereinfachenden Annahme einer Michaelis-Menten-Kinetik und für $[S]_o \gg K_M$ und $[C] = \text{konstant}$ und in Überschuß.

$$[P] = [S]_o - [S] = V_{max} t_{eff} = k_{cat} [E]_o t_{eff} \quad (2.8)$$

Die Detektion des Reaktionsproduktes $[P]_{max}$ am Peakmaximum (D_{max} : Verdünnung am Peakmaximum) führt zu Gleichung 2.9,

$$[P]_{max} = k_{cat} [E]_o t_{eff} / D_{max} \quad (2.9)$$

woraus sich die zu bestimmende volumenbezogene Enzymaktivität $k [E]_o$ zu

$$k_{cat} [E]_o = [P]_{max} D_{max} / t_{eff} \quad (2.10)$$

ergibt. Die Enzymaktivität A_E ergibt sich nach Gl. 2.11

$$A_E = k_{cat} [E]_o V_S \quad (2.11)$$

durch Multiplikation mit dem Volumen V_S der injizierten Ausgangslösung und wird in internationalen Einheiten $IU = \mu\text{Mol min}^{-1}$ angegeben [27].

2.5.2 Substrat- und Inhibitorbestimmung mit gelösten Enzymen

Die präzise Messung von Anfangsgeschwindigkeiten v_o

$$v_o = [P]_{max} D_{max} / t_{eff} \quad (2.12)$$

bildet den Ausgangspunkt für die exakte Bestimmung von Enzymsubstraten und -inhibitoren. Ausgehend von der Michaelis-Menten-Gleichung und bei Einhaltung der Bedingung $[S] \ll K_M$ folgt die Beziehung Gl. 2.13

$$v_o = k' [E]_o [S]_o, \quad (2.13)$$

die bei linearer Detektion der Höhe $h (= f_c [P]_{\max})$ des erzeugten Produktpeaks zu linearen Kalibrierfunktionen der Form

$$h = k' [E]_o t_{\text{eff}} \cdot f_c \cdot [S]_o / D_{\max} \quad (2.14)$$

führt, wobei f_c der Kalibrierfaktor der Detektion der Produktkonzentration ist. Die Empfindlichkeit der Substratdetektion nimmt linear mit der Enzymkonzentration $[E]_o$ und der Verweilzeit t_{eff} zu.

Bei vollständigem Substratumsatz (**Endwert-Methode**) gilt wegen $[S]_o = [P]$ Gleichung 2.15

$$h = f_c \cdot [S]_o / D_{\max}, \quad (2.15)$$

woraus weitgehende Temperaturunabhängigkeit und in bestimmten Grenzen Unabhängigkeit von Enzymeffektoren resultiert. Die Einstellung einer für den vollständigen Substratumsatz notwendigen Enzymkonzentration und/oder der entsprechenden Verweilzeit ist deshalb Voraussetzung für die genaue Substratbestimmung im nicht thermostatierten FIA-System.

Im Gegensatz zur enzymatischen Substratbestimmung erfordert die genaue Bestimmung von Enzyminhibitoren die exakte Thermostatierung und das Arbeiten mit Enzymkonzentrationen und Verweilzeiten, die nicht zum vollständigen Substratumsatz (**kinetische Methode**) führen. An dieser Stelle wird die Betrachtung auf die kompetitive, die nichtkompetitive und die unkompetitive Inhibierung von Einsubstratreaktionen durch reversible Inhibitoren und durch fest bindende Inhibitoren eingeschränkt. Tab.2.3 faßt die entsprechenden Funktionen zusammen.

Tab. 2.3: Berechnung der InhibitorKonzentration aus dem Inhibierungsgrad γ [28]. K_i ist die InhibitorKonstante, $[I]$ die InhibitorKonzentration.

	reversibel	irreversibel
kompetitiv	$[I] = \gamma/(1-\gamma) \cdot K_i(1+[S]/K_M)$	$[I] = \gamma\{[E]_o + 1/(1-\gamma) \cdot K_i(1+[S]/K_M)\}$
nichtkompetitiv	$[I] = \gamma/(1-\gamma) \cdot K_i$	$[I] = \gamma\{[E]_o + 1/(1-\gamma) \cdot K_i\}$
unkompetitiv	$[I] = \gamma/(1-\gamma) \cdot K_i(1+K_M/[S])$	$[I] = \gamma\{[E]_o + 1/(1-\gamma) \cdot K_i(1+K_M/[S])\}$

Sinnvoll ist die Messung des Inhibierungsgrades γ , der entsprechend Gleichung 2.16

$$\gamma = (v_o - v_i) / v_o \quad (2.16)$$

aus den Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten v_o in Abwesenheit und v_i in Anwesenheit des Inhibitors I berechnet wird. Lineares Ansprechen der Peakhöhendetelektion des Reaktionsproduktes [P] vorausgesetzt, folgt Gl. 2.17

$$\gamma = (h_o - h_i) / h_o \quad (2.17)$$

2.5.3 Substrat- und Inhibitorbestimmung mit immobilisierten Enzymen

2.5.3.1 Anwendung suspendierter Enzymimmobilisate

In einem miniaturisierten Rührkessel suspendierte Enzymimmobilisate wurden bisher nicht für die Substratbestimmung mittels FIA eingesetzt. Durch immobilisierte Enzyme katalysierte Bestimmungsreaktionen können oft durch eine Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden. Der Zusammenhang zwischen den für das gelöste und das immobilisierte Enzym geltenden Michaelis-Menten-Konstanten und maximalen Umsatzgeschwindigkeiten kann über den inneren und den äußeren Effektivitätsfaktor ϵ_i bzw. $\epsilon_{\bar{a}}$ nach Gleichung 2.18 [29] (K^S = scheinbarer effektiver Geschwindigkeitskoeffizient) hergestellt werden,

$$K^S = \epsilon_i \epsilon_{\bar{a}} K = \epsilon_i \epsilon_{\bar{a}} V_{\max} / K_M = V_{\max}^S / K_M^S \quad (2.18)$$

wobei ϵ_i die durch die Immobilisierung verursachte Änderung des enzymkinetischen Verhaltens und ϵ_a die Effizienz des Stofftransportes durch Diffusion und Konvektion zum Enzym ausdrücken und V_{\max}^S die scheinbare maximale Reaktionsgeschwindigkeit und K_M^S die scheinbare Michaelis-Menten-Konstanten sind.

Die Injektion eines präzis definierten Probenlösungsvolumens in einen miniaturisierten Rührkessel entsprechend der in Abb. 2.8 gezeigten FIA-Anordnung ist bei der Inkubation immobilisierter Biokatalysatoren, wie z.B. enzymmarkierter Antikörper-Hapten-Komplexe und Enzyme für die Durchführung von ELISAs bzw. Enzymhemmtests von Bedeutung.

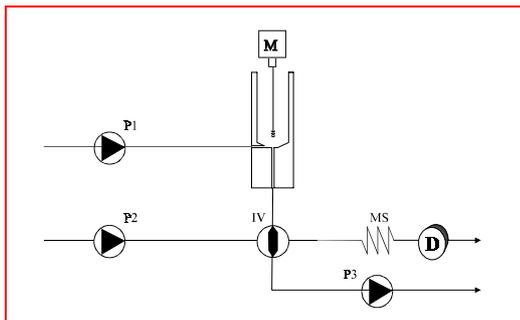


Abb. 2.8:

Miniaturisierter Rührkessel mit Eingangs- und Ausgangsöffnungen zur FIA. M: Motor, P: Pumpe, IV: Injektionsventil, MS: Mischschleife, D: Detektor.

Unter der Annahme einer Michaelis-Menten-Kinetik gilt in beiden Fällen die Gleichung

$$[P] = V_{\max}^S t_i + K_M^S \ln([S]/[S]_0) \quad (2.19)$$

Bei Substratüberschuß geht Gl. 2.19 in Gl. 2.20

$$[P] = V_{\max}^S t_i = k_{\text{cat}}^S [E]_w t_i \quad (2.20)$$

d.h. bei der Detektion des Reaktionsproduktes P nimmt bei einem linear arbeitenden Detektor die Empfindlichkeit linear mit der Inkubationszeit t_i und der wirksamen Enzymkonzentration $[E]_w$ zu. Eine hohe scheinbare Geschwindigkeits-

konstante $k_{\text{cat}}^{\text{S}}$, erreichbar durch den Einsatz von Enzymen mit einer hohen *Turnover number*, ist für kurze Detektionszeiten bei der Indikation von Immunoassays und bei Enzymhemmtests notwendig, um hohe Meßempfindlichkeiten zu erreichen.

2.5.3.2 Anwendung gepackter Strömungsrohre

Abb. 2.9 zeigt den Aufbau eines mit Enzymimmobilisat gepackten Enzymreaktors IMER, der durch die Packungslänge L_{R} , den Packungsradius R_{R} , den Partikeldurchmesser d_{p} und das Reaktorvolumen V_{R} charakterisiert ist.

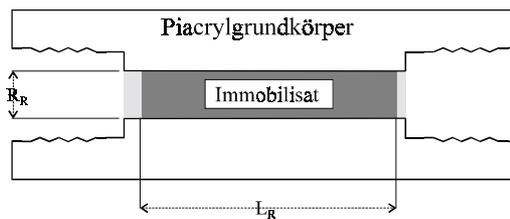


Abb. 2.9: Enzymreaktor mit Eingangs- und Ausgangsöffnungen zur FIA.

Für die optimale hydrodynamische Auslegung des IMERen entscheidend ist die Einhaltung eines minimalen Druckabfalles $\Delta p < 1 \text{ atm}$ und die Minimierung der zeitlichen Verbreiterung von injizierten Probenkonzentrationspeaks σ_t . Der Druckabfall wird durch die DARCY-Gleichung (2.21)

$$\Delta p = \eta t_m \phi F^2 / d_p^2 \quad (2.21)$$

mit der dynamischen Viskosität η der Trägerlösung, der mittleren Verweilzeit t_m , der Permeabilität ϕ der Partikelpackung und der linearen Durchflußgeschwindigkeit F annähernd beschrieben. Im Fall ideal gepackter, monodisperser Partikel im IMER bleibt Δp zeitlich konstant. Die Peakverbreiterung σ_t wird nach FREI et al. [30] durch Gleichung 2.22

$$\sigma_t = t_m N^{-0.5} d_p^{0.5} L_R^{-0.5} \quad (2.22)$$

beschrieben, in der N die Zahl äquivalenter Mischstufen ist. Ausgehend von Gl.(2.19) ergibt sich unter den Bedingungen der Substratanalytik, d.h. $[S]_o \ll K_M^S$ Gleichung 2.23 (X der Umsatzgrad $([S]_o - [S])/[S]_o$)

$$V_{\max}^S t_m = -K_M^S \ln(1-X) \quad (2.23)$$

für den Substratumsatz. Zwischen dem von Transporthemmungen unbeeinflussten Umsatzgeschwindigkeitskoeffizienten $K = V_{\max}/K_M$ und dem Geschwindigkeitskoeffizienten $K^S = V_{\max}^S / K_M^S$ besteht der Zusammenhang

$$1/K^S = 1/K + 1/\vartheta, \quad (2.24)$$

wobei ϑ der sogenannte Transportterm, der den Einfluß der diffusiven und der konvektiven Transporthemmung ausdrückt, ist und nach Gl. 2.25

$$\vartheta = 9.75(1-\theta)D_m^{2/3} \nu^{-1/6} F^{0.5} d_p^{-1.5} \quad (2.25)$$

aus dem äußeren Leerraumvolumen θ , der kinematischen Viskosität ν , der linearen Durchflußgeschwindigkeit F und dem molekularen Diffusionskoeffizienten D_m berechnet werden kann [31]. Der Transportterm $1/\vartheta$ nimmt mit zunehmender Durchflußgeschwindigkeit F und zu kleineren Partikeldurchmessern hin ab. Die Auftragung von $\ln(1-X)$ gegen die reziproke Quadratwurzel der Volumendurchflußgeschwindigkeit v nach Gl. 2.26

$$-\ln(1-X) = B L_R^{0.5} d_p^{-1.5} V_R^{0.5} v^{-0.5} \quad (2.26)$$

zeigt bei linearem Verlauf gegen den Substratumsatz im IMER Massentransportkontrolle an, die zur Ausschaltung des Enzymeffektoreinflusses auf das Analyseergebnis angewendet werden kann. B ergibt sich für sphärische CPG-Partikel nach Gleichung 2.27 [32].

$$B = 9.75(1-\theta)D_m^{2/3} \nu^{-1/6} \quad (2.27)$$

2.6 Immunoassays

Immunoassays beruhen auf der spezifischen Erkennung und Bindung von Antigenen und Haptenen durch Antikörper. Aufgrund der nahezu unbegrenzten Variabilität in der Antikörperherstellung und der hohen Spezifität gewinnen Immunoassays als Screeningtest sowie auch als quantitative Analysenmethode auch außerhalb der klinischen Chemie und Diagnostik, z.B. in der Lebensmittel- und Umweltanalytik zunehmend an Bedeutung. Zu berücksichtigen sind bei dieser Betrachtung die neuen Möglichkeiten der Hybridoma-Zellkulturtechnik und der Expression aus Mikroorganismen, die die potentiell unbegrenzte und reproduzierbare Herstellung von Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten ermöglichen.

Die Anwendung von Immunoassays [33] gewinnt in der Umweltanalytik aufgrund einfacher Durchführung, geringen Aufwandes bei der Probenvorbereitung und der instrumentellen Ausstattung sowie hoher Nachweisstärke an Bedeutung. Bezüglich der präzisen Konzentrationsbestimmung von Haptenen sind durch Anwendung durchflußanalytischer Methoden, wie z.B. der FIA noch weitere Fortschritte notwendig.

Die erreichbare Empfindlichkeit von Immunoassays wird durch die Affinität zwischen Antikörper und Analyt bestimmt. Die Affinitätskonstante K_A charakterisiert das Gleichgewicht (Gl. 2.28) zwischen Antikörper Ak und Antigen Ag [34,35].



$$K_A = K_D^{-1} = [\text{AkAg}] / [\text{Ak}][\text{Ag}] = k_a / k_d \quad (2.29)$$

wobei k_a die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation und k_d Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation des Antikörper-Antigen(Hapten)-Aggregates sind.

Als theoretische Nachweisgrenze NWG_0 ergibt sich beim turbidometrischen und nephelometrischen Immunoassay aus der Gleichung 2.29:

$$NWG_0 \geq [Ag] = K_D \cdot [AkAg]/[Ak], \quad (2.30)$$

weshalb zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit eines nephelometrisch detektierten homogenen Immunoassays mit einem Antikörperüberschuß gearbeitet wird. Im Vergleich dazu wird bei einem kompetitiven Assay mit markierten Antigenen und immobilisierten Antikörpern die Nachweisgrenze zusätzlich durch die Konzentration an markiertem Antigen $[Ag^*]_0$ und die Zahl der Bindungsstellen beeinflusst. Zur Erreichung der maximalen Empfindlichkeit muß die Konzentration $[Ag^*]_0$ minimiert werden, was durch die Nachweisempfindlichkeit der angewendeten Detektion limitiert ist.

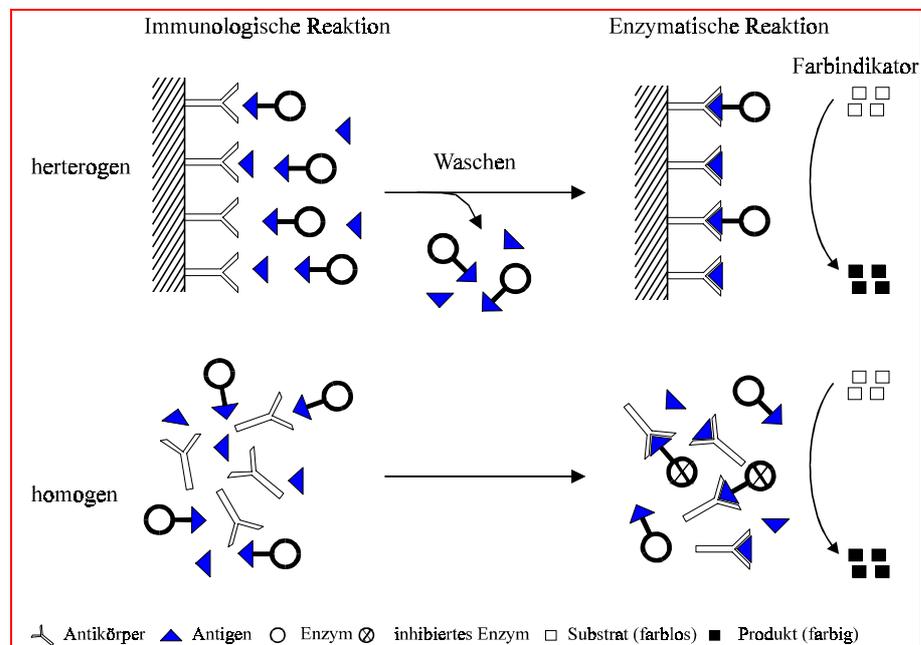


Abb. 2.10: Schematische Darstellung des heterogenen und homogenen Immunoassays mit Enzymmarkierung.

Man unterscheidet entsprechend dem in Abb. 2.10 gezeigten Schema zwischen homogenen und heterogenen Immunoassays. Im Vergleich zum homogenen Immunoassay wird beim heterogenen Immunoassay eine unlösliche Substanz (Festphase) eingesetzt, wobei diese einen Separationsschritt der ungebundenen von den gebundenen Reagenzien ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden kompetitive ELISA-Methoden untersucht und angewendet.

Beim **kompetitiven ELISA** (*Enzym Linked Immuno Sorbent Assay*) konkurrieren markierte und die Analytantigene um die Bindungsstellen immobilisierter Antikörper (Abb. 2.11). Die Markierung erfolgt z.B. mit einem Enzym, das eine Indikatorreaktion katalysiert. Das Produkt der Indikatorreaktion wird z.B. photometrisch, chemiluminometrisch und fluorimetrisch detektiert.

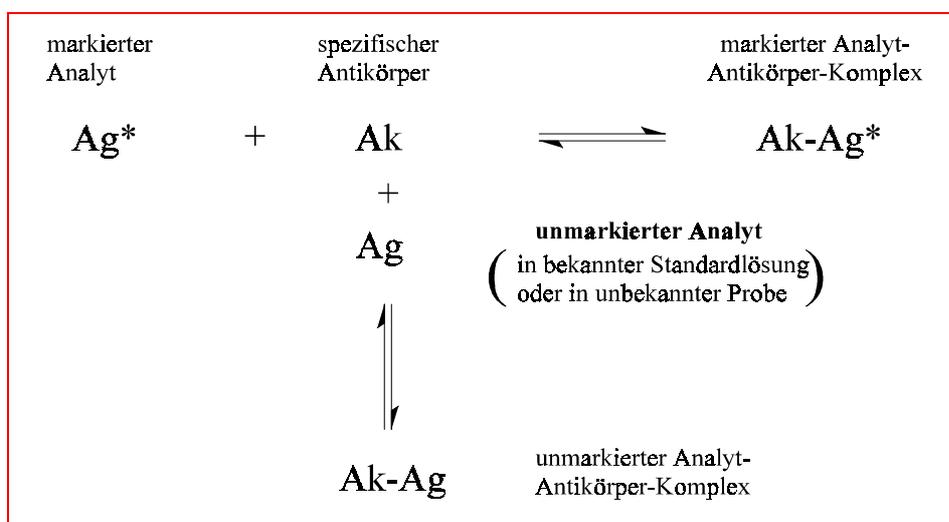


Abb. 2.11: Prinzip eines kompetitiven Immunoassays.

Um die Konzentration eines Analyten in einer Probe zu bestimmen, muß ein Kalibriergraph mit bekannten Analytkonzentrationen erstellt werden. Dabei hängt der Verlauf der Eichkurve von speziellen Parametern des Assays ab, ob z.B. poly-

oder monoklonale Antikörper benutzt werden und in welchem Verhältnis die Antigen- bzw. Antikörperkonzentrationen zur Affinitätskonstante stehen.

Es wurden mehrere Modelle entwickelt, empirisch oder abgeleitet vom Massenwirkungsgesetz, die die experimentell erhaltenen Daten gut beschreiben [36].

In den meisten Fällen handelt es sich um nichtlineare Funktionen. Um eine lineare Regression durchführen zu können, muß die nichtlineare Funktion mit Hilfe von mathematischen Transformationen in eine lineare Form überführt werden. Eine der gebräuchlichsten Methoden ist die Logit-log-Transformation (Gl. 2.32).

$$\text{logit } y = \ln \frac{y}{1-y} = a \cdot \lg x + b \quad (2.32)$$

wobei

$$y = \left(\frac{[B] - [B_{ex}]}{[B_0] - [B_{ex}]} \right)$$

x = Analytkonzentration

[B] = Analytsignal

[B₀] = B_{max}, Signal in Analytabwesenheit

[B_{ex}] = B_{min}, Signal durch unspezifische Bindung (Überschuß an Analyt)

3 Experimenteller Teil

3.1 Allgemeiner Meßplatzaufbau

Das Grundkonzept der verschiedenen Meßplätze ist in Abb. 3.1 schematisch dargestellt.

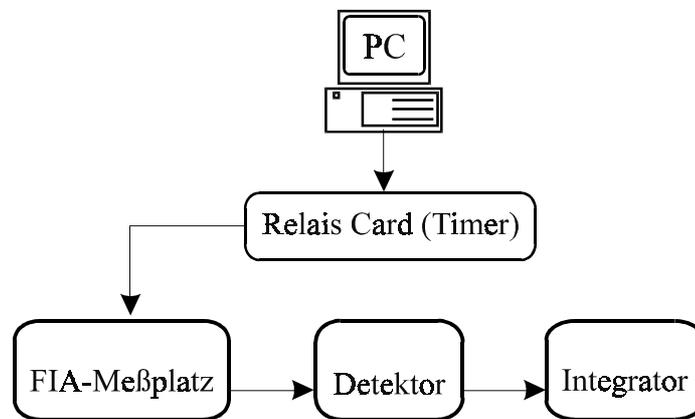


Abb. 3.1: Allgemeiner Meßplatzaufbau der zu automatisierenden FIA.

Die Probeentnahme und -injektion sowie die Reagenzzufuhr und die enzymatische Umsetzung in den Enzymreaktoren bzw. in einer speziellen Inkubationszelle sind im FIA-Meßplatz integriert. Mittels eines Detektors, z.B. Fluorimeters oder Photometers, werden die Meßsignale in eine elektrische Größe umgewandelt. Die Signale werden bezüglich ihrer Peakhöhe und -fläche durch einen Integrator D-2500 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland) aufgezeichnet und ausgewertet. Alle aktiven Komponenten der FIA-Anordnung sowie der Detektor und Integrator sind an die Relaiskarte ME 63 (Meilhaus, Deutschland) angeschlossen, welche durch das Programm TIMER (Anhang A.6) gesteuert wird (Abschn.3.3).

3.2 Meßplätze für fluorimetrische FIA-Verfahren

3.2.1 Grundanordnung

Abb. (3.2) zeigt den Grundaufbau der FIA-Anordnung, die z.B. zur fluorimetrischen Bestimmung von Ammoniak eingesetzt wurde.

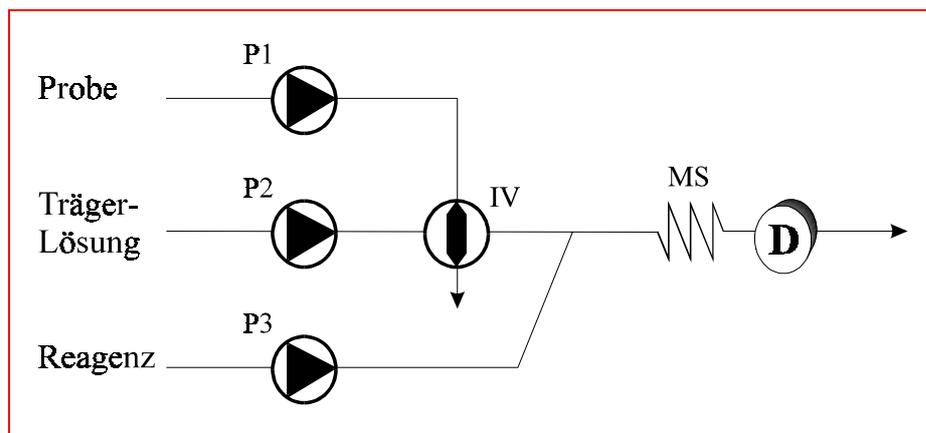


Abb. 3.2: Grundaufbau der FIA-Anordnung. P1-3: Pumpen, IV: Injektionsventil, MS: Mischschleife, D: Detektor.

Die Trägerlösung (Wasser/Puffer) und das Reagenz werden durch die Peristaltikpumpen P2 und P3 (Minipuls 3, GILSON, Frankreich) transportiert und in der Mischschleife MS kontinuierlich gemischt. Eine dritte Peristaltikpumpe P1 (Minipuls 3, GILSON) bringt die Probenlösung zu einem Injektionsventil IV (Rheodyne 9010, COTATI, USA), das die Probe ($V_i = 20 \mu\text{l}$) in die Trägerlösung einschleust. Alle Durchflußkomponenten in der FIA-Anordnung sind durch Teflon(PTFE)-Schläuche mit einem Innendurchmesser 0.5 mm verbunden. Als Detektor D wurde das Fluoreszenzspektrometer SFM-25 (KONTRON, Milan, Italien) mit einer Durchflußzelle ($20 \mu\text{l}$) verwendet.

Für die einfache Optimierung der OPA-Reagenzien wurde die FIA-Anordnung in Abb. 3.3 verwendet, bei der die Reagenzkomponenten OPA, R-NH_2 und reduzierende Schwefelverbindung getrennt gelagert, gepumpt und in-situ gemischt werden, um eine höhere Signalstabilität zu erreichen.

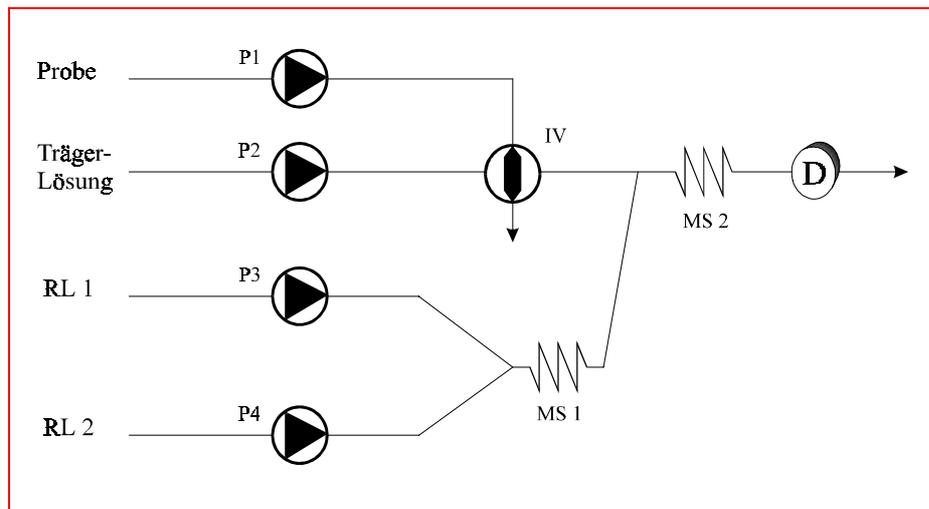


Abb. 3.3: FIA-Anordnung zur Reagenzentwicklung. RL 1 und RL 2: Lösungen der einzelnen Reagenzkomponenten, P1-4: Pumpen, IV: Injektionsventil, MS1 und MS2: Mischschleifen, D: Detektor.

3.2.2 FIA-Anordnung mit Gasdialyse

Abb. 3.4 zeigt die um eine Gasdialysezelle (Abb. 3.5) erweiterte FIA-Grundanordnung zur selektiven fluorimetrischen Bestimmung von Ammoniak.

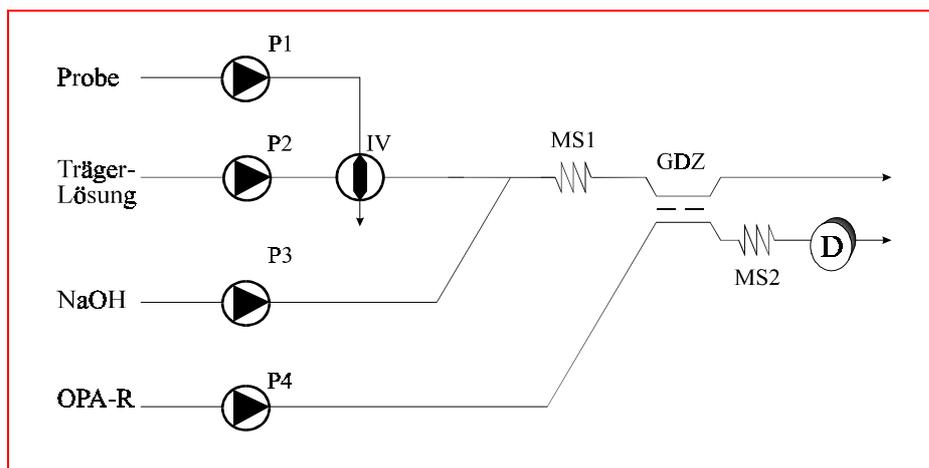


Abb. 3.4: FIA-Anordnung mit Gasdialysezelle (GDZ). P1-4: Pumpen, IV: Injektionsventil, MS1 und MS2: Mischschleifen, D: Detektor, OPA-R: OPA-Reagenz.

Eine vierte Peristaltikpumpe P3 (Minipuls 3, GILSON) fördert 0.2 M NaOH, die sich in der ersten Mischschleife (MS1) mit dem Probeninhalt trifft, um die

Ammoniumionen zu Ammoniak umzuwandeln. Die resultierende Lösung fließt in die Donorseite der Gasdialysezelle GDZ. Auf der Akzeptorseite der Gasdialysezelle (GDZ) setzt die parallel strömende Reagenzlösung die abgetrennten Ammoniakmoleküle um und fließt weiter über die zweite Mischschleife MS2 in Richtung Detektordurchflußzelle.

Gasdialysezelle

Abb. 3.5 zeigt die Gasdialysezelle. In die beiden Plexiglasplatten wurden zueinander spiegelsymmetrisch liegende Mäander mit einer Breite von 1.5 mm und einer Tiefe von 0.2 mm gefräst, welche über je zwei Bohrlöcher ($\varnothing = 0.5$ mm) mit entsprechenden Gewindeanschlüssen verbunden sind. Eine mikroporöse PTFE-Membran mit einer mittleren Porengröße von $0.2 \mu\text{m}$ und einer Dicke von $20 \mu\text{m}$ wurde zwischen den beiden Platten plaziert. Die Porosität der Membran liegt zwischen 70 und 80 %. Die aktive Austauschfläche der Membran beträgt 510 mm^2 und das Eigenvolumen eines Durchflußkanals $105 \mu\text{l}$.

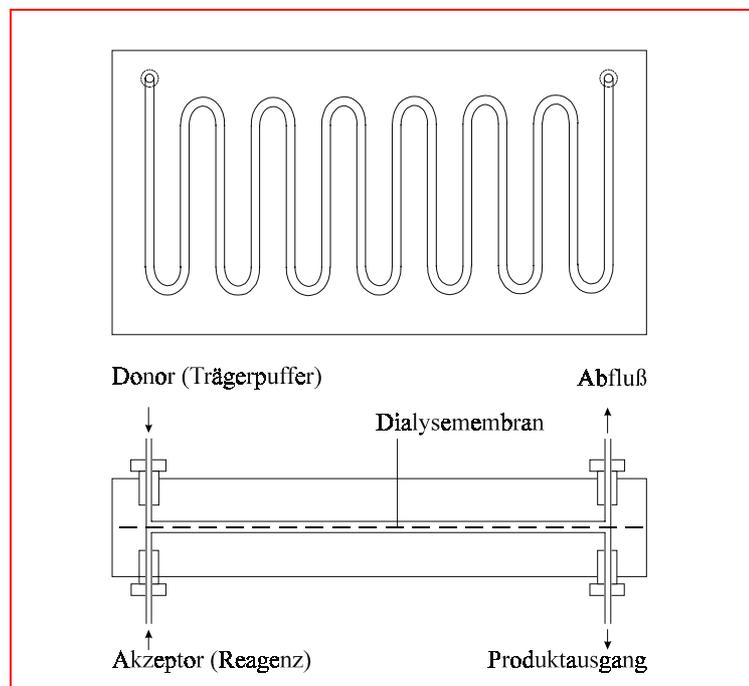


Abb. 3.5: Gasdialysezelle; oben: Strömungsbahn in einer Plexiglasplatte, unten: Schnittdarstellung der Dialysezelle.

3.2.3 Enzymatische FIA

3.2.3.1 Einkanal-FIA-Anordnung

Abb. 3.6 zeigt die um eine Gasdialysezelle (Abb. 3.5) und einen Enzymreaktor (Abb. 3.8) erweiterte FIA-Grundanordnung zur selektiven Bestimmung von Substraten ammoniakfreisetzender Enzyme.

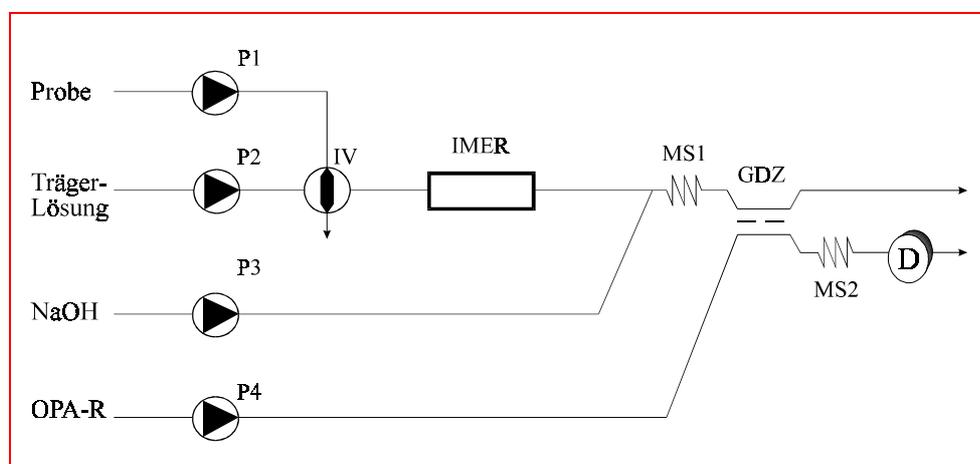


Abb. 3.6: Enzymatische FIA-Anordnung mit Gasdialyse. P1-4: Pumpen, IV: Injektionsventil, IMER: Enzymreaktor, MS1 und MS2: Mischschleifen, GDZ: Gasdialysezelle, D: Detektor, OPA-R: OPA-Reagenz.

Der Enzymreaktor befindet sich zwischen dem Injektionsventil und der ersten Mischschleife (MS1). Das Reaktoreffluenz wird mit Natronlauge gemischt, wobei das entwickelte Ammoniak durch die Membran der Gasdialysezelle GDZ zur Akzeptorseite diffundiert und mit dem OPA-Reagenz (OPA-R) umgesetzt wird. Alle nichtflüchtigen Bestandteile der Probenlösung werden zurückgehalten, so daß eine beträchtliche Erhöhung der Selektivität erreichbar ist.

Erreicht das OPA-Reagenz eine hohe Ammoniakselektivität gegenüber Aminosäuren, kann auf die Gasdialysezelle in der FIA verzichtet werden und damit eine Vereinfachung der Anordnung (Abb. 3.7) erzielt werden.

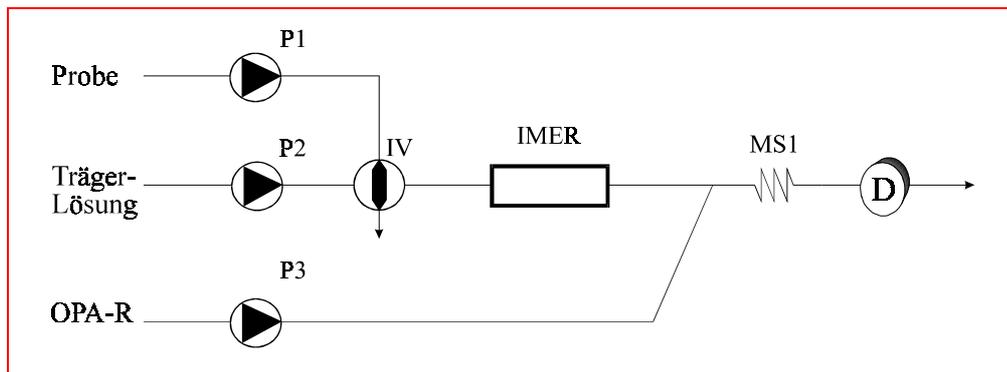


Abb. 3.7: Enzymatische FIA-Anordnung ohne Gasdialyse. Zeichenerklärung in Abb. 3.6.

Enzymreaktor (IMER)

Der Enzymreaktor (Abb. 3.8) besteht aus einem Plexiglashohlzylinder mit einem Innendurchmesser von 3 mm und einer Länge zwischen 5 und 30 mm. An dessen beiden Enden befinden sich 1/4-Zoll-UNF-Gewindeanschlüsse, die für die korrespondierenden PVC-Fittings der Ein- und Ausgangschläuche vorgesehen sind. Zur Abdichtung werden Gummiringe (LATEK, Heidelberg) zwischen den geflanschten Anschlußschläuchen und den Fittings gelegt. Das Immobilisat wird durch zwei poröse Polyethylenscheiben (Porengröße 70 μm ; REICHELT) zurückgehalten.

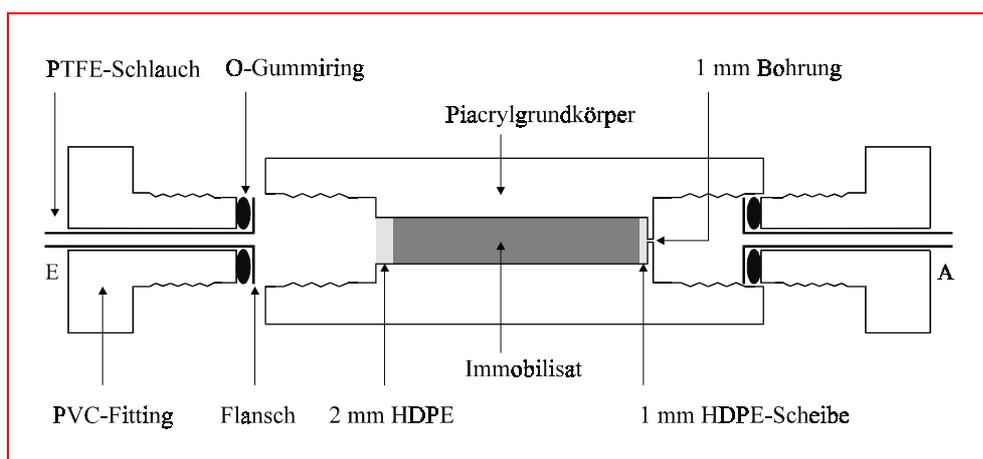


Abb. 3.8: Schematische Darstellung des Enzymreaktors (IMER). E: Eingangsschlauch, A: Ausgangsschlauch, HDPE: poröses *high density* Polyethylen, PVC: Polyvinylchlorid, PTFE: Polytetrafluorethylen.

3.2.3.2 Multikanal-FIA-Anordnung

Abb. 3.9 zeigt die 6-Kanal-FIA-Anordnung zur Bestimmung von Ammoniak und bis zu 5 Enzymsubstraten, bei deren enzymatischer Umsetzung Ammoniak entsteht.

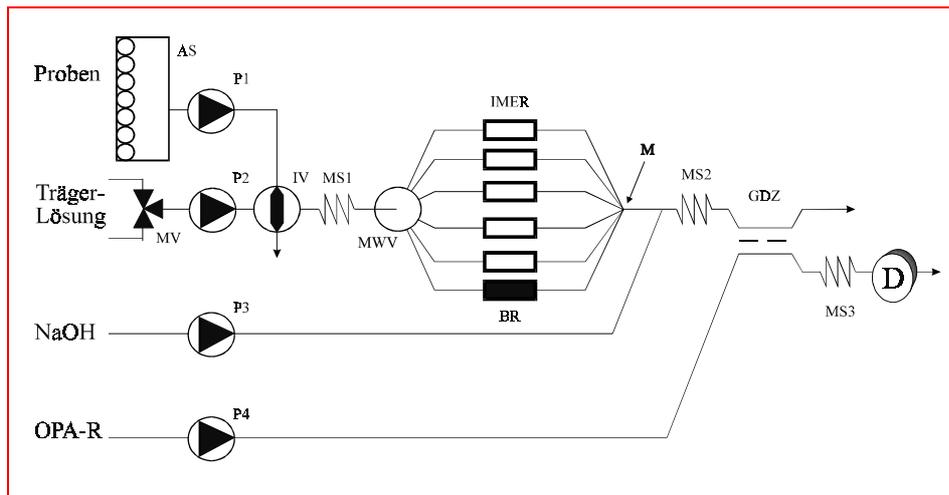


Abb. 3.9: Multikanal-FIA-Anordnung für die sequentielle Bestimmung mehrerer Komponenten. AS: Autosampler, MV: 3-Wege/2-Position-Magnetventil (2-Wegeventil), MWV: Mehrwegeventil, GDZ: Gasdialysezelle, IMER: Enzymreaktor, BR: Blindreaktor, M: Mischpunkt, MS1-3: Mischschleifen.

Ein 3-Wege/2-Position-Magnetventil MV (ASCO, BRD) dient der automatischen Auswahl des Konditionierpuffers. Die Proben werden mittels eines Autosamplers (Bio 232-410, GILSON) in das Injektionsventil transportiert und dann in die Trägerlösung injiziert. Ein 6-Wegeventil MWV (Rheodyne 9060, COTATI, USA) dient der automatischen Anwahl des jeweiligen Bestimmungskanals.

3.2.4 FIA-Anordnung mit Inkubationszelle

Für die Bestimmung von Enzyminhibitoren und für die Automatisierung von Immunoassays mit Magnetseparation wurde ein entsprechender FIA-Meßplatz nach Abb. 3.10 aufgebaut. Die enzymatische Bestimmungsreaktion läuft in der Inkubationszelle IZ (Abb. 3.11) vor dem Injektionsventil IV ab.

Die Inkubationszelle steht zwischen den Polen eines Elektromagneten mit ringförmigem Eisenkern, welcher einen rechteckigen Querschnitt von 25 x 30 mm hat (magnetische Feldstärke 5.81 kG).

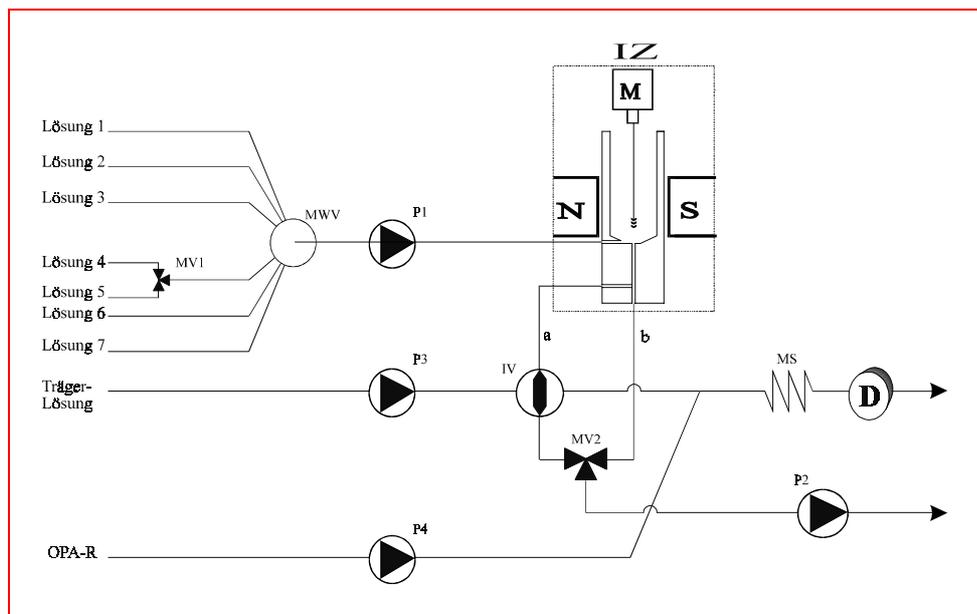


Abb. 3.10: FIA-Anordnung für Enzymhemmtest und Immunoassay. IZ: Inkubationszelle, M: Elektromotor mit Rührer, MWV: 6-Wegeventil, P1-4: Pumpen, N und S: Nord- und Südpol des Elektromagneten, MV1-2: Magnetventile, a und b: Wegebeschriftung.

Über ein 6-Wegeventil MWV werden die verschiedenen Lösungen mittels einer Mikropumpenpumpe P1 (Tec-S, TECURIA, Schweiz) entnommen und in die Inkubationszelle weitergeleitet. Der Weg zwischen MWV und IZ beträgt 10 cm. Die Lösungen befinden sich in Polypropylenröhrchen und wurden auf 20 °C thermostatiert. Der Kammerinhalt kann wahlweise über die Strecken a und b mittels MV2 geleitet werden. In die Strecke a ist das Injektionsventil IV integriert, wodurch die zu injizierende Probe in die Trägerlösung mittels Peristaltikpumpe P3 eingeschleust wird. Der Bypass b dient zum Schutz des Injektionsventils (Strecke a) vor Verstopfung durch die Magnetpartikel. Die über Strecke a injizierte Lösung kommt mit dem OPA-Reagenz in der Mischschleife MS zur Reaktion, bevor sie die Durchflußzelle D erreicht. Die Anlage wird mit 3 M Schwefelsäure (Eliminierung von Restaktivitäten), Isopropanol (Entfernung von Luftblasen und

hydrophoben Verunreinigungen) und entsprechendem Puffer (Konditionierung der Wege) gespült.

Bei der Durchführung des Immunoassays wird auf die Peristaltikpumpe P4 in Abb. 3.10, die die Reagenzlösung fördert, verzichtet, da das Produkt des Markerenzym photometrisch direkt zu detektieren ist.

Inkubationszelle

Abb. 3.11 zeigt den Aufbau der aus Plexiglas bestehenden Inkubationszelle.

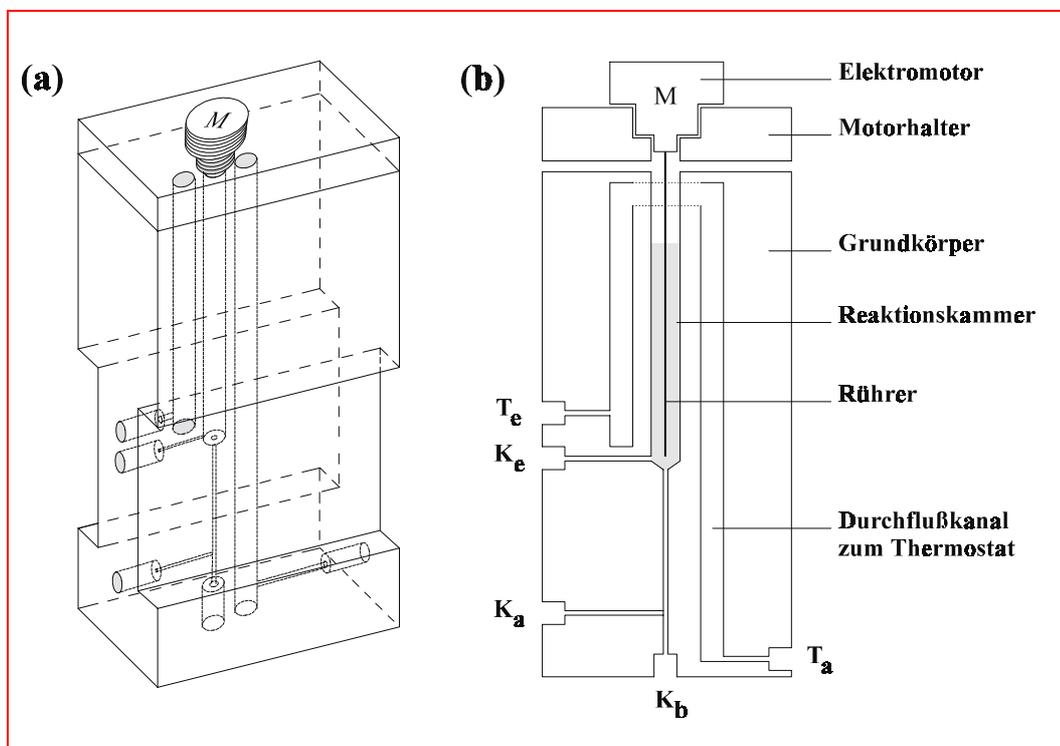


Abb. 3.11: Inkubationszelle; (a) dreidimensionale Darstellung und (b) axialer Längsschnitts. T_e und T_a : Ein- und Ausgang des Durchflußkanals zum Thermostaten, K_e : Eingang der Reaktionskammer, K_a und K_b : Ausgänge der Reaktionskammer.

Die Reaktionskammer RK hat einen Durchmesser von 5 mm und eine Höhe von 35 mm. Die Reaktionskammer ist so gearbeitet, daß sich die untere Hälfte im magnetischen Feld befindet. Die innere Oberfläche der Kammer wurde mit feuchtem und sehr feinem Sandpapier poliert. Ein seitlicher Zuflußkanal K_e trifft

auf die Basis der Kammer. Von dessen unterem Ende führt ein Abflußkanal senkrecht ab. Dieser verzweigt sich zu zwei separaten Kanälen (K_a und K_b). Der Innendurchmesser der Kanäle in der Plexiglaszelle beträgt 0.5 mm. Die Kanäle der Reaktionszelle enden in $\frac{1}{4}$ -Zoll-UNF-Gewindebohrungen, die die Verknüpfung mit den anderen Elementen der FIA-Anordnung gestatten. Die Inkubationszelle wird über die Bohrungen Th_a und Th_c ($\varnothing = 5$ mm) mit einem Umlaufthermostaten verbunden.

Ein Elektromotor (RE 140, MABUCHI) ist auf dem Zellendeckel montiert, der auf der oberen Seite der Zelle aufgesetzt wird. An die Achse des Motors ist ein Eisendraht mit einem Durchmesser von 0.5 mm geschweißt und mit einem Polypropylenschlauch überzogen, dessen unteres Ende mit einem Klebemittel (Medical Adhesive Silicone Type A, DOW CORNING) abgedichtet ist, welches sich als resistent gegenüber den verwendeten Lösungsmitteln erwiesen hat.

3.2.5 Immuno-FIA mit vorgeschalteter Festphasenextraktion

Die Kopplung der Festphasenextraktion (SPE) mit den FIA-Immunoassays (SPE-FIIA) erfolgt entsprechend der in Abb. 3.12 dargestellten Anordnung. Die Anordnung besteht aus dem Reservoir, einer Glasfritte, die die Extraktionsdisk trägt, einem Trichter und einem Auffanggefäß. Letzteres ist über eine seitliche Öffnung mit einer Vakuumpumpe verbunden, die durch ein Quetschventil QV an- und ausgeschaltet werden kann.

Die ersten 3 Komponenten bilden eine Einheit. Ein Schlauch, der im Gummistopfen des Reservoirs angebracht wurde, ist mit einer Schlauchpumpe P1 und dem 6-Wegeventil MWV verbunden und führt die gewünschte Lösung, wie Vorwasch-, Konditionier-, Proben- oder Elutionslösung zu. Die Basis des Auffanggefäßes endet in einer Glaskapillare, von der ein Schlauch zu einer Peristaltikpumpe P2 führt. Ein Magnetventil schaltet zwischen Filtrat oder Eluat, das durch das Injektionsventil IV in die Immuno-FIA (Abb. 3.10) weitergeleitet wird, um.

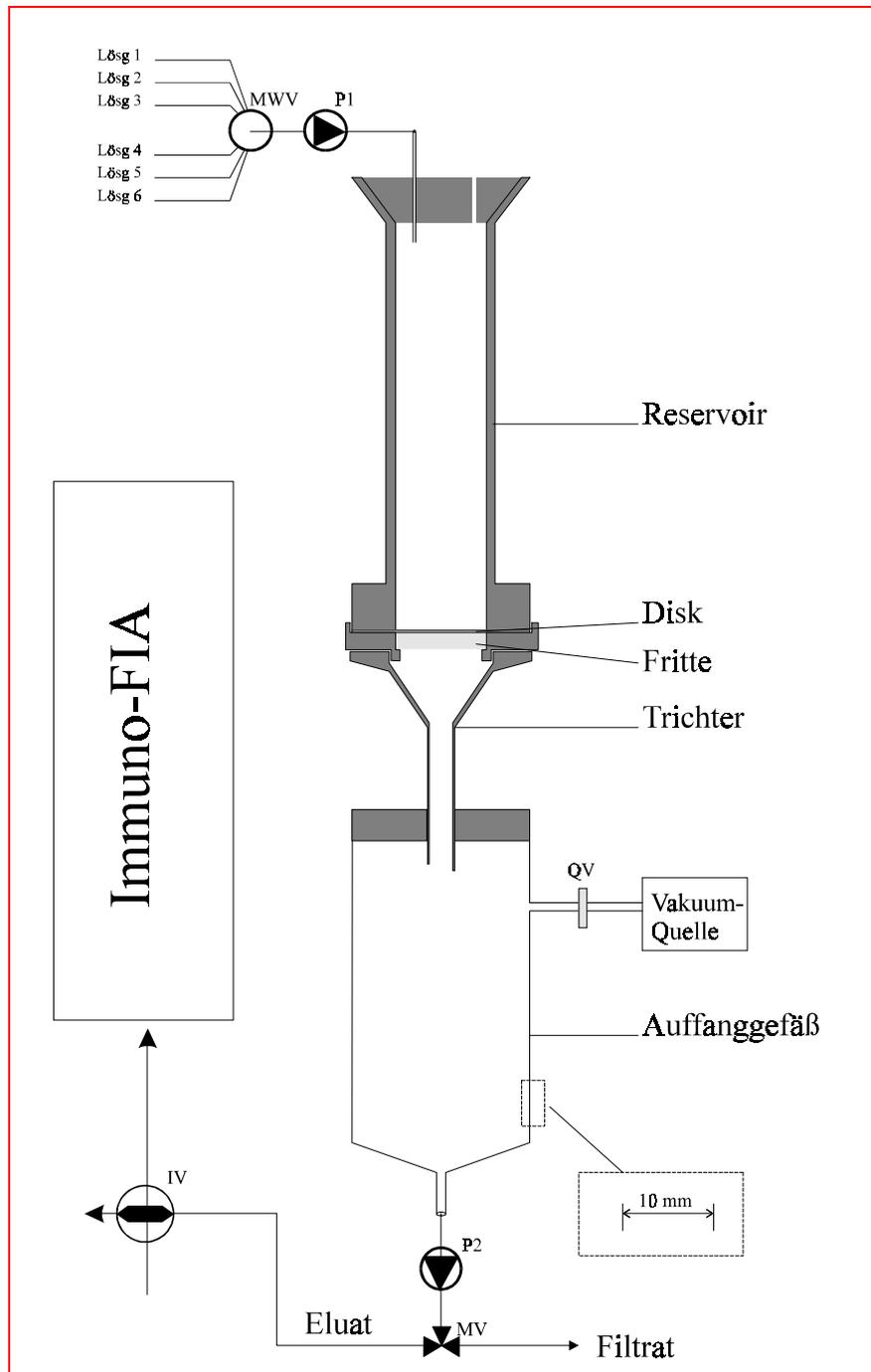


Abb. 3.12: Festphasenextraktion mit nachgeschalteter Immuno-FIA. P1 und P2: Pumpe, MV: Magnetventil, MVV: 6-Wegeventil, IV: Injektionsventil, QV: Quetschventil.

3.3 FIA-Automatisierung

Die automatische Ansteuerung aller FIA-Meßplätze wurde über eine 16-Kanal-Schaltkarte (read relais card, Typ ME 63, MEILHAUS, Puchheim, Deutschland) realisiert, die in einem Personalcomputer (386 SX und 1 MB RAM) eingebaut wurde. Das Programm wurde in Turbo Pascal (Anhang B) geschrieben. Zur einfachen Bedienung des Programms wurde folgendes Hauptmenü erstellt:

TIMER 1994	
1	Programm wählen
2	Programm ändern
3	Timer starten
4	Timertest
5	Kanalnamen
6	Zyklisch / Einmalig
7	Ende
Programmdatei:	

Die Menüpunkte haben die folgenden Funktionen:

- 1 Mit dem ersten Menüpunkt kann das gewünschte Zeitprogramm für eine bestimmte FIA-Anordnung aufgerufen werden.
- 2 Änderung der Zeitabläufe und Ein-/Ausschaltung von Hardware-Komponenten sowie die Abspeicherung unter dem gleichen oder einem anderen Namen.
- 3 Der Timerstart bedeutet Start der Analyse.
- 4 Die einzelnen Schritte eines gewählten Zeitablauf-Programms werden manuell mit einem Tastendruck aufgerufen und getestet.

- 5 Den Kanälen sind die einzelnen Hardware-Komponenten (Tab. 3.1) zugeordnet. Die Schaltzustände Ein und Aus werden während der Messung angezeigt.

Die Kanalbelegung ist unter dem Dateinamen (Namen.cfg) im Verzeichnis Timer zu finden, unter diesem aufzurufen und frei konfigurierbar.

Tab. 3.1: Kanalbelegung der Relaiskarte

Kanalnummer	FIA-Komponent
1	Elektorrührer
2	1. Mikropumpe
3, 4	6-Wegeventil
5	Elektromagnet
6	2. Mikropumpe
7	HPLC-Pumpe
8, 9	Injektionsventil
10	1. Magnetventil
11	2. Magnetventil
12	Integrator
13	1. Peristaltik-Pumpen
14	2. Peristaltik-Pumpen
15	3. Peristaltik-Pumpen
16	4. Peristaltik-Pumpen

- 6 Umschaltung zwischen einmaligem Messzyklus und nacheinander folgenden Zyklen (kontinuierlichem on-line-Betrieb).
- 7 Abbruch des Programmablaufes.

Das Programm ermöglicht die freie Programmierung auch von komplexeren analytischen Ablaufplänen, wobei Zeitschaltfenster mit einer Ausdehnung zwischen einigen Sekunden und mehreren Stunden einstellbar sind.

3.4 Enzymimmobilisierung

3.4.1 Immobilisierung auf Glaspartikel

Alle Enzyme wurden auf porösen Glasträgern (Controlled Pore Glas = CPG; Bioran, Schott, Mainz, Deutschland) kovalent immobilisiert [37,38]. Eine Siebfraktion von 180 - 200 μm wurde verwendet.

100 mg alkylaminosilyliertes CPG wurden in 2 ml 2.5 m/m-%iger Glutardialdehydlösung (in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0) suspendiert und aktiviert. Die Aktivierung dauert eine Stunde und wird in den ersten 30 Minuten unter Wasserstrahlvakuum durchgeführt. Das aktivierte CPG wird über eine G4-Glasfritte abfiltriert und mit 200 ml bidestilliertem Wasser gewaschen. 10 mg Enzym/Protein wurden in 1 ml kaltem 0.1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6.5 gelöst. Das aktivierte Trägermaterial wird dazugegeben. Nach Anlegen eines Wasserstrahlvakuums für 1 Stunde wird der Ansatz über Nacht bei 4 °C unter mäßigem Schütteln aufbewahrt. Anschließend wird das Immobilisat abfiltriert und mit 100 ml kaltem Phosphatpuffer, pH 6.5 gewaschen. Die Lagerung des Immobilisats erfolgt im feuchten Zustand bei 4 °C.

3.4.2 Immobilisierung auf Magnetpartikel

Silanisierte paramagnetische Eisenoxidpartikel (BioMag 4100, PAESL+LOREI, Frankfurt) sind in Wasser/EDTA-Lösung bei einer Konzentration von 50 mg/ml suspendiert. Die Magnetpartikel besitzen einen Durchmesser zwischen 0.5-1.5 μm . Aufgrund ihrer irregulären Formen weisen sie eine um bis zu 100 mal größere Oberfläche auf als eine gleich große Kugel (100 cm^2/mg). Die magnetischen Partikel sind mit primären Aminogruppen belegt. Die Belegungsdichte der funktionellen Gruppen beträgt etwa 250 $\mu\text{mol/g}$ BioMag [39].

Die Immobilisierung von Acetylcholinesterase AChE und Urease auf den paramagnetischen Partikeln wurde wie folgt [37,39] durchgeführt:

2 ml BioMag-Suspension werden in einen 10 ml-Kolben pipettiert. Nach Hinzufügen von bidestilliertem, entionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 ml wird die BioMag-Suspension geschüttelt und anschließend magnetisch separiert, bis sich ein klarer Überstand bildet, der abgesaugt wird. Dieser Waschschrift wird 3-mal wiederholt. Es werden 4 ml 5%ige Glutaraldehydlösung zu den gewaschenen Magnetpartikeln zugegeben und 3 Stunden bei Raumtemperatur vorsichtig geschüttelt. Es folgt die magnetische Separation und das Absaugen der Glutaraldehydlösung. Abschließend wird viermal mit dem Kopplungspuffer (0.01 M Kaliumphosphat, pH 7.0) gewaschen.

5 mg Enzym werden in 2 ml Kopplungspuffer gelöst. Nach Zugabe der Proteinlösung zur Magnetpartikelsuspension wird 16 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Es folgt die magnetische Separation und die Aspiration des Überstandes. Es werden 10 ml Quenching-Puffer (1 M Glycin) zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach folgt die magnetische Separation und die Aspiration. Anschließend wird viermal mit Kopplungspuffer gewaschen. Die Aufbewahrung von immobilisierten BioMag erfolgt bei 4 °C als Suspension in 5 ml des gewünschten Puffers.

Die Berechnung des Immobilisierungsgrades erfolgt nach Gleichung (Gl. 3.1)

$$\text{Immobilisierungsgrad} = \frac{A_{\text{PLV}} \cdot F - A_{\text{PLN}} \cdot F'}{A_{\text{PLV}} \cdot F} \quad , \quad (3.1)$$

wobei A_{PLV} die Absorption der Proteinlösung vor der Zugabe zu den Magnetpartikeln bei 280 nm, A_{PLN} die Absorption der Proteinlösung im Überstand nach der Proteinkopplung, F und F' der Verdünnungsfaktor der jeweiligen Lösung sind.

3.5 Festphasenextraktion von Pestiziden

Musterpackungen der EMPORE™-3M-Extraktionsdisks (Scheiben) mit BAKERBOND™-Octadecyl (C18) wurden von der Firma J.T. BAKER erhalten. Die Dicke beträgt 0.5 mm und der Durchmesser 25 mm. Die Scheiben bestehen zu 10 % ($\pm 2\%$) aus PTFE in Form einer Matrix. Die Matrix enthält das eigentliche Absorbent (BAKERBOND™-Octadecyl) und verleiht den Scheiben mechanische Stabilität. Die Partikelgröße beträgt 10 μm und deren Porengröße 60 \AA . Die Disks sind im pH-Bereich von 2-7 stabil.

Anreicherung von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure

Ausgehend von der SPE-FIA-Anordnung, Abb. 3.12 wurde die Anreicherung am Beispiel des Pestizids 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure 2,4-D [40] durchgeführt:

a) Herstellung der Standardlösungen

Von einer Stammlösung der Konzentration 10 $\mu\text{g/l}$ 2,4-D (Startlösung 5 mg/50 ml Methanol) wurde eine Verdünnungsreihe von 0.02, 0.1, 0.2, 1.0 und 2.0 $\mu\text{g/l}$ hergestellt. Für die Probenlösung wurde entionisiertes Wasser verwendet, dessen pH-Wert mit konzentrierter HCl auf 2 eingestellt wurde. Der Lösung wurde Methanol bis zu einer Konzentration von 0.5 % v/v zugegeben. Das Volumen einer Probe betrug 500 ml.

b) Disk-Konditionierung und Probenpräparation

Als erstes wurde die Disk mit 10 ml Methylenchlorid vorgewaschen. Für die Konditionierung wurde nacheinander mit 10 ml Methanol, 10 ml Wasser und anschließend mit verdünnter Salzsäure (pH 2) gewaschen, ohne jedoch die Disk trocken laufen zu lassen. Die Konditionierung erfolgte in 3 min. Danach wurde die Probenlösung mit einer Schlauchpumpe in die Apparatur bei einer Fließrate von 50 ml/min zudosiert.

c) Eluieren

Nachdem die Probe die Disk passiert hat, werden 5 ml Methanol ins Reservoir gegeben. Die Hälfte davon wird sofort abgesaugt. Die andere Hälfte bleibt eine Minute stehen, bevor sie abgesaugt wird. Dieser Schritt wird einmal wiederholt. Das Gesamtvolumen, in welchem die Probe gelöst ist, beträgt dann 10 ml. Durch den quantitativen FIA-Immunoassay wurde die Anreicherung zu 45 -50 bestimmt. Das Eluieren dauert 4 min.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Fluorimetrische Verfahren zur Bestimmung von Ammoniak und ammoniakfreisetzender Substanzen

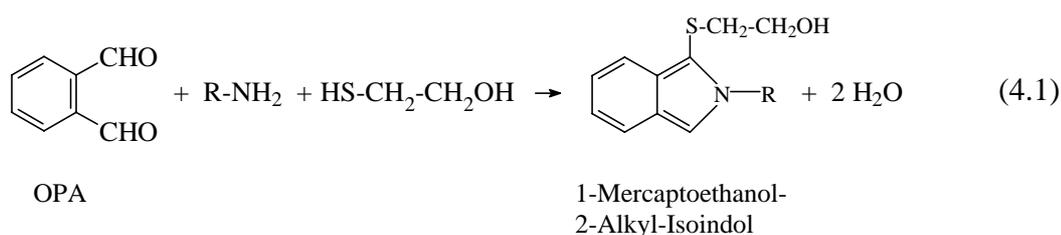
Es sind zahlreiche Enzyme bekannt, die die selektive Substratumsetzung von stickstoffhaltigen Verbindungen unter Ammoniakfreisetzung katalysieren, wie Amidohydrolasen, z.B. Asparaginase [41] und Glutaminase [42], Deaminasen, z.B. Adenosindeaminase [43] und Guanindeaminase [44], Deiminasen, z.B. Creatinindeiminase [45] und viele Aminosäure-Oxidoreduktasen.

Einige Aminosäureoxidasen wie L-Lysinoxidase [46,47], L-Glutamatoxidase [48,49], D-Aminosäureoxidasen [50-52]) und Aminosäuredehydrogenasen (wie L-Alanindehydrogenase [53] und Phenylalanindehydrogenase [54]) können für die selektive Bestimmung der entsprechenden Aminosäuren im Medium von tierischen und mikrobiellen Zellkultivierungsprozessen eingesetzt werden [55-58]. Die Ammoniakdetektion erfolgte bisher vorrangig photometrisch [59] und potentiometrisch [59,60]. Insgesamt wurde die Entwicklung enzymatischer Assays auf der Basis ammoniakfreisetzender Enzyme aber eher vernachlässigt, was an der mangelhaften Leitungsfähigkeit der Ammoniakdetektion lag.

Die Methoden der quantitativen und qualitativen Detektion von Ammoniak sind relativ unempfindlich. Die meisten davon greifen auf die Farbreaktion von Ninhydrin und Nessler's Reagenz mit der Aminogruppe bzw. dem Ammoniumion zurück. Obwohl diese Reagenzien für einige Anwendungen geeignet sind, verlangen immer mehr neue Situationen auf dem Gebiet der Biotechnologie, Lebensmittel- und klinischen Analytik einen sensitiveren und selektiveren Assay zur Detektion von Ammoniak und Aminosäuren.

4.1.1 Entwicklung eines wäßrigen und selektiven OPA-Reagenzes

Ein attraktiver Zugang zur schnellen und leistungsfähigen Detektion von Ammoniak sollte sich ausgehend von der Bestimmungsreaktion (Gl. 4.1) ableiten lassen, die von Roth zur fluorimetrischen Bestimmung von primären Aminen angewendet wurde [16].



Das Roth-Verfahren beruht auf der Reaktion von OPA, 2-Mercaptoethanol und primärem Amin im alkalischen und Ethanol enthaltenden Medium, wobei ein fluoreszierendes Isoindolderivat, 1-Mercaptoethanol-2-alkylisoindol entsteht. Kurze Zeit später wurde diese Reaktion von Taylor et al. [61] für die Bestimmung von Ammoniak angewendet. Das entsprechende OPA-Reagenz reagiert nicht nur mit Ammoniak sondern auch mit vielen primären Aminen und ist instabil.

Tranholm-Jepesen und Hansen [62], Abdel-Latif und Guilbault [63], sowie Narinesingh et al. [64] und Jansen et al. [65] haben gezeigt, daß dieses und andere OPA-Reagenzien unter FIA-Bedingungen verwendet werden können, um enzymatisch freigesetztes Ammoniak zu einem fluoreszierenden Isoindolderivat umzuwandeln. Alvarez-Coque u.M. [66] haben gezeigt, daß N-Acetyl-L-Cystein (NAC) als die Thiolkomponente im OPA-Reagenz eingesetzt werden kann. Während bei dieser Methode die Isoindolderivate stabil sind, zeigen die Aminosäuren-Isoindolderivate verschiedene molare Absorptionen und Fluoreszenzintensitäten. Darüber hinaus wird bei Ammoniak und Cystein kein Fluoreszenzsignal beobachtet [67,68]. Abdel-Latif und Guilbault haben 2-Mercaptoethanol durch Sulfit ersetzt. Das fluoreszierende Isoindolderivat wurde bei Anregungs- und Emissionswellenlänge von 372 bzw. 430 nm detektiert. Dieses Reaktionssystem zeigt hohe Selektivität gegenüber Ammoniak, ist jedoch infolge der Luftoxidation von Sulfit instabil.

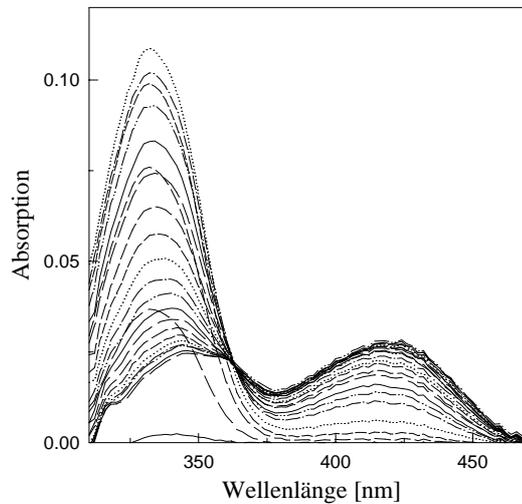
Genfa und Dasgupta [69] zeigten, daß dieses Problem durch die „in situ“-Mischung der beiden Komponenten OPA und Sulfitlösung in der FIA partiell umgangen werden kann. Durch Zugabe von Formaldehyd läßt sich das Reagenz, insbesondere bezüglich HSO_3^- stabilisieren [70]. Trotz der höheren Selektivität ihres OPA/Sulfit-Systems für Ammoniak, stören manche Aminosäuren wie Histidin, Alanin und Glycin, aber auch andere primäre Amine wie Spermin und Spermidin [69]. Darüber hinaus interferieren thiolgruppenhaltige Verbindungen, wie z.B. Cystein und reduziertes Glutathion [71]. Bei komplizierten biologischen Proben sind diese und andere Interferenzen nicht auszuschließen.

Ein attraktiver Weg, solche Interferenzen auszuschalten, ist die Anwendung der gasdialytischen Ammoniakabtrennung. Narinesingh et al. [64] wendeten dieses Prinzip in Verbindung mit dem klassischen Roth-Reagenz an, um Harnstoff aus der Serumprobe nach seiner enzymatischen Zersetzung zu bestimmen. Der direkte Kontakt einer mikroporösen hydrophoben PTFE-Membran mit der organischen Lösungsmittel (Ethanol, Methanol oder Mercaptoethanol) enthaltenden Reagenzlösung verursacht jedoch die Hydrophilisierung der PTFE-Membran und damit eine Verstopfung der Poren. Dies führt zu Veränderungen bezüglich des Massentransfers über die Membran [72,73] und damit zu schlechter Reproduzierbarkeit.

Ein Ziel der Arbeit war deshalb die Entwicklung eines stabilen OPA-Reagenzes für die schnelle, empfindliche und selektive fluorimetrische Ammoniakdetektion, das kein organisches Lösungsmittel enthält.

Um dieses Ziel zu verwirklichen, wurde das im allgemeinen verwendete Reduktionsmittel Mercaptoethanol in Gleichung 4.1 durch Thioglycolat (TGS) ersetzt.

In Abb. 4.1 wurden die Absorptionsspektren der Reaktion von Ammoniak mit OPA/Thioglycolat-Reagenz im zeitlichen Abstand von 5 Sekunden aufgenommen. Während das Maximum bei 330 nm seine volle Intensität in den ersten 15 Sekunden erreicht und danach zurückgeht, wird ein zweites Maximum bei 420 nm deutlich.

**Abb. 4.1:**

Absorptionsspektren der Reaktion von Ammoniak mit OPA/Thioglycolat-Reagenz. Die Spektren wurden im Abstand von 5 Sekunden nach Reaktionsstart aufgenommen (siehe Abb.). $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 10.6$, $[\text{Borat}] = 0.4\text{ M}$, $[\text{OPA}] = 10\text{ mM}$, $[\text{Thioglycolat}] = 20\text{ mM}$, $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4] = 10\text{ }\mu\text{M}$.

Abb. 4.2 zeigt die Fluoreszenzspektren bei Variation der Anregungs- bzw. der Emissionswellenlänge. Im Vergleich zu den Anregungs- und Emissionsmaxima bei 355 nm bzw. 460 nm des klassischen Reagenzes [16] zur Bestimmung von Ammoniak und primären Aminen lagen beim neuentwickelten Reagenz die entsprechenden Wellenlängen bei 415 nm bzw. 485 nm. Die erreichte Empfindlichkeit erhöht sich im Vergleich zum klassischen Reagenz um etwa 400-500% (Abb. 4.3).

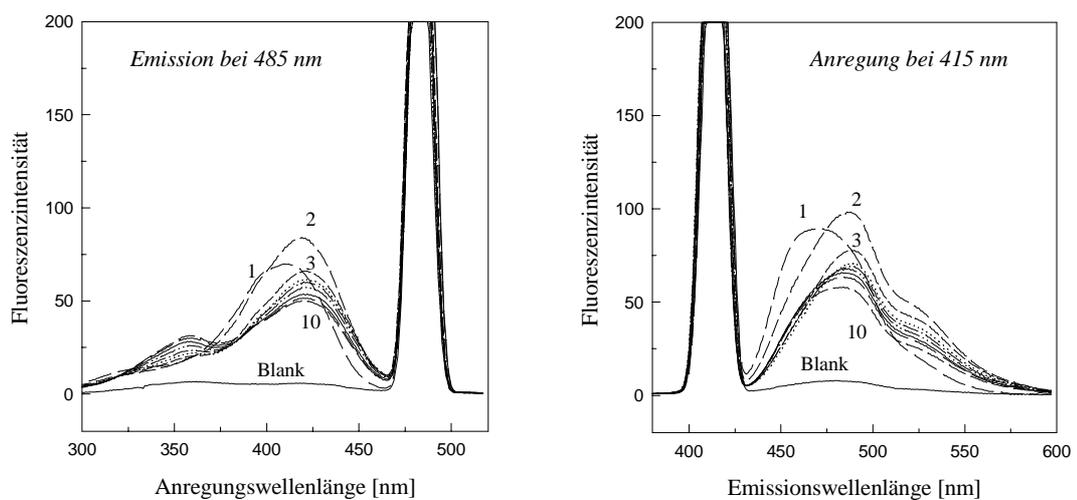


Abb. 4.2: Links: Anregungsspektrum 1-10 ($\lambda_{\text{Em}} = 485\text{ nm}$); Rechts: Emissionsspektrum 1-10 ($\lambda_{\text{Ex}} = 410\text{ nm}$). Die Spektren wurden im Abstand von 10 s aufgenommen. Bedingungen wie in Abb. 4.1.

Aus Abb. 4.3 geht hervor, daß die Fluoreszenzintensität zeitabhängig ist. Bei der Anregungswellenlänge 415 nm erreicht die Intensität der Emission bei 485 nm innerhalb der ersten 30 Sekunden ein Maximum, das anschließend zurück geht. Dies könnte darauf hindeuten, daß sich ein fluoreszierendes Intermediat gebildet hat und im Laufe der Zeit wieder zerfällt. Bei der Anregungs- und Emissionswellenlänge von 355 bzw. 460 nm erfolgt eine sehr langsame Erhöhung der Intensität mit der Zeit. Es entsteht möglicherweise das Isoindolderivat sehr langsam.

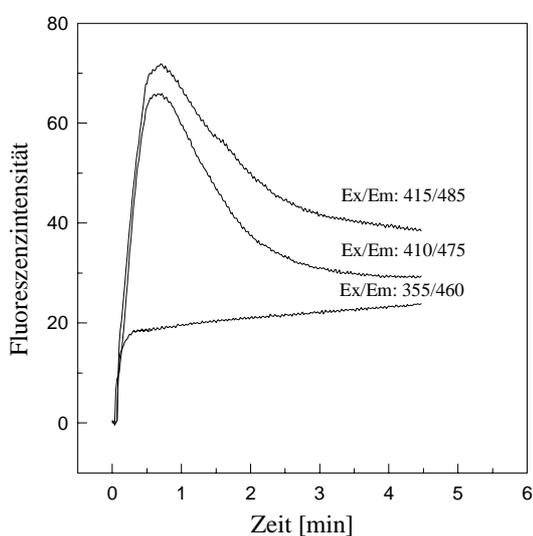


Abb. 4.3: Zeitabhängigkeit der Fluoreszenz für verschiedene Anregungs- und Emissionswellenlängen. Meßbedingungen wie in Abb. 4.1.

Für weitere Fluoreszenzmessungen erfolgt die Anregung bei 415 nm (Emission bei 485 nm).

Die Nachweisreaktion ist stark pH-abhängig. Abb. 4.4 zeigt die Empfindlichkeit als Funktion des pH-Wertes im Bereich zwischen 8.0 und 11.5. Um den pH-Wert 10.6 erreicht die Intensität der Fluoreszenz ein scharfes Maximum bei einer Meßzeit von 20 s. Deshalb ist eine präzise und stabile pH-Pufferung notwendig.

Der Einfluß der OPA-Konzentration auf die Empfindlichkeit wurde mit der FIA-Anordnung in Abb. 3.3 untersucht und optimiert. 20 µl 50 µM Ammoniumsulfatlösung wurden in einen Wasserstrom mit der Durchflußrate 0.5 ml/min injiziert. Diese wurde kontinuierlich mit der Mischung aus OPA- und Thioglycolatlösung vereinigt, die getrennt mit der gleichen Flußrate von 0.25

ml/min gepumpt werden. Die Fluoreszenzintensität erreicht eine Sättigung bei einer OPA-Endkonzentration von etwa 10 mM in Anwesenheit von 20 mM Thioglycolsäure (Abb. 4.5).

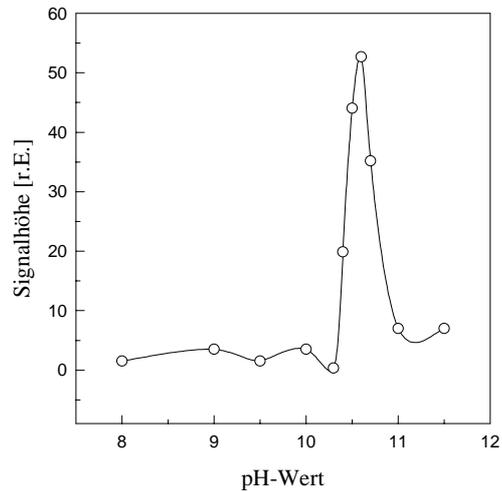


Abb. 4.4: Abhängigkeit des Ammoniak-Fluoreszenzsignals vom pH-Wert. Reaktionszeit = 20 s, andere Versuchsbedingungen wie in Abb. 4.1.

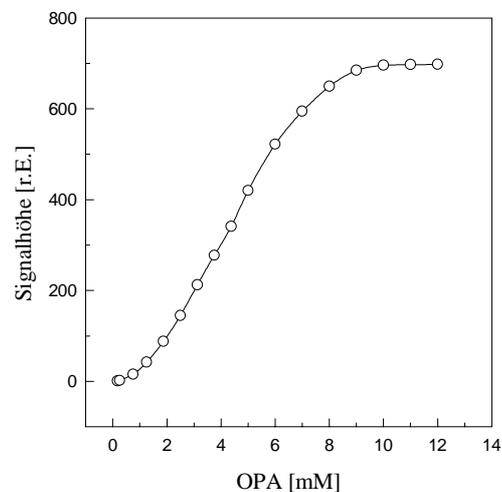


Abb. 4.5: Abhängigkeit des Ammoniak-Fluoreszenzsignals von der o-Phthalaldehydkonzentration (OPA). [Thioglycolat] = 20 mM, pH = 10.6, $[\text{NH}_4^+] = 100 \mu\text{M}$.

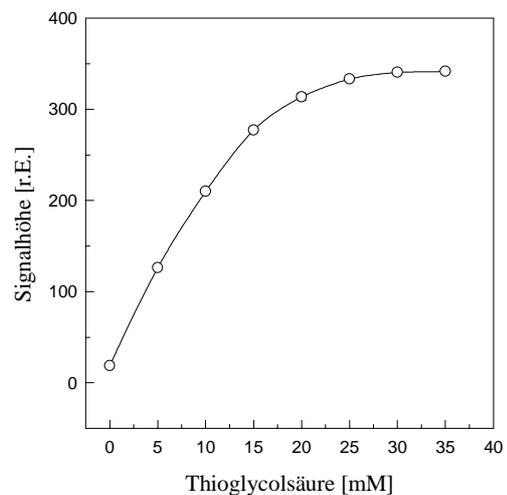


Abb. 4.6: Abhängigkeit des Ammoniak-Fluoreszenzsignals von der Thioglycolatkonzentration. [OPA] = 10 mM, pH = 10.6, $[\text{NH}_4^+] = 100 \mu\text{M}$.

Mit der Zusammensetzung von [OPA] = 10 mM, [TGS] = 20 mM und [Borat] = 0.4 M und mit pH von 10.6 wurde das OPA-Reagenz in den folgenden

Experimenten zur Bestimmung von Ammoniak angewendet. Das Reagenz kann bei Raumtemperatur im Dunkeln 2 Wochen aufbewahrt werden.

4.1.2 Selektivität des OPA/Thioglycolat-Reagenzes

Als Maß für die Selektivität ist das Verhältnis vom Meßsignal des Interferenzen zum Ammoniakmeßsignal bei gleicher Konzentration von 1 mM $S_{(1\text{mM Interf./}1\text{mM NH}_4^+)} = h_{1\text{mM Interf.}}/h_{1\text{mM NH}_4^+}$ (h: relative Signalthöhe). Tab. 4.1 faßt die gut erzielte Selektivitäten des OPA-Reagenzes gegenüber Aminosäuren und anderen primären Aminen zusammen. Insbesondere fällt die hohe Selektivität gegenüber Aminosäuren auf. Große Bedeutung hat auch die Selektivität gegenüber Harnstoff, Creatin und Creatinin.

Im Gegensatz zu bisher vorgeschlagenen OPA-Reagenzien wird eine deutlich höhere Selektivität gegenüber Aminosäuren erreicht. Die Selektivitätsfaktoren sind durchweg kleiner 0.25 % und liegen damit unterhalb der durchschnittlichen relativen Standardabweichung.

Tab. 4.1: Selektivität des OPA-Reagenzes gegenüber einigen primären Aminen und Aminosäuren im Vergleich mit Ammoniak.

		$S_{(1\text{mM Interferenz} / 1\text{mM Ammoniak})}$	[%]
Ammoniak		100.00	
Interferenzen:	Harnstoff	0.1020	
	Alanin	0.1010	
	Glutamat	0.0830	
	Glutamin	0.2160	
	Lysin	0.0720	
	Creatin	0.0990	
	Creatinin	0.1100	
	Glycin	0.0910	
	Aspartat	0.1220	
	Cystein	0.1170	

Die hohe Ammoniakselektivität bedeutet, daß Ammoniak neben den Substraten ammoniakfreisetzender Enzyme ohne vorherige gasdialytische Abtrennung bestimmt werden kann, was eine beträchtliche Vereinfachung der abgeleiteten Enzymassays bedeutet.

4.1.3 Bestimmung von Ammoniak

Ammoniakbestimmungen gehören zu den häufigsten Aufgabenstellungen in der analytischen Chemie. Die präzise Bestimmung in einem weiten Konzentrationsbereich setzt eine schnelle Analyse der oft infolge NH_3 -Flüchtigkeit instabilen Probenlösungen voraus.

Bei der Behandlung von Grundwasser ist die Kenntnis des Ammoniakgehaltes im Wasser notwendig [76]. Die Ammoniakkonzentration ist ein wichtiger Parameter technischer Wasseraufbereitungsverfahren, wie z.B. bei der Nitrifikation [77]. Ammoniak ist darüber hinaus das Produkt vieler Enzymreaktionen, wobei dessen Detektion eine Bedeutung bei der Bestimmung von Aminosäuren und anderen N-Metaboliten in physiologischen Proben hat.

Abb. 4.7 zeigt die doppeltlogarithmische Kalibrierfunktion der fluorimetrischen Ammoniakdetektion unter FIA-Bedingungen. Die Signalhöhen wurden gegen die Ammoniakkonzentration im Bereich zwischen $5 \cdot 10^{-2}$ M und $1 \cdot 10^{-7}$ M aufgetragen. Ausgehend vom FIA-Grundaufbau (ohne Gasdialyse), Abb. 3.2 wurde die Probenlösung (10 μl) in die Trägerlösung (Wasser) injiziert, die bei der Durchflußrate 0.5 ml/min mit dem OPA-Reagenz (Durchflußrate 0.5 ml/min) kontinuierlich vermischt wird.

Der lineare Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Signalhöhe und $\lg[\text{Ammoniak}]$ kann im Konzentrationsbereich $2 \cdot 10^{-7}$ M - $7 \cdot 10^{-3}$ M Ammoniak in der Abwesenheit der Gasdialysezelle durch Gleichung (4.2) mit $r^2 > 0.9999$ ($\alpha = 0.05$, $n = 4$, $m = 14$) beschrieben werden.

$$\lg y = (1.00 \pm 0.01) \cdot \lg([\text{NH}_3]/\mu\text{M}) + (1.39 \pm 0.04) \quad (4.2)$$

Das Detektionslimit liegt bei $0.1 \mu\text{M}$ und die maximale Probenrate beträgt 70 Injektionen in der Stunde. Gleiche Ergebnisse wurden bei der Ammoniakbestimmung in Gegenwart von Harnstoff erhalten. Der in den Ammoniakproben befindliche Harnstoff hat im linearen Bereich keinen signifikanten Einfluß auf die Meßwerte.

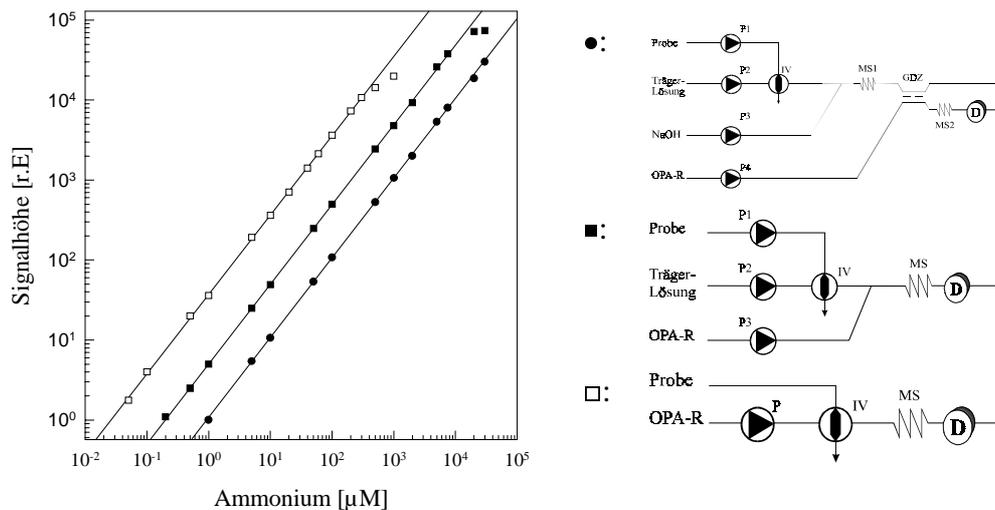


Abb. 4.7: Doppeltlogarithmische Auftragung der Fluoreszenzsignalhöhen gegen die Ammoniakkonzentration bei drei verschiedenen FIA-Anordnungen. (■) und (□) ohne GDZ, (●) mit GDZ.

Bei der Ammoniakbestimmung mit der gasdialytisch arbeitenden FIA-Anordnung (Abb. 3.4, Abschn. 3.2.2) zeigte sich eine erweiterte Linearität im oberen Detektionslimit bis 20 mM , was auf die Verdünnung der Proben durch die NaOH-Lösung und der Diffusion von Ammoniak in der GZD zurückzuführen ist. Daraus resultiert eine niedrigere Meßempfindlichkeit von $1 \mu\text{M}$ (Abb. 4.7). Infolge der stärkeren Probendispersion liegt die Probenfrequenz bei 35 Bestimmungen in der Stunde. Gleichung 4.3 gibt den linearen Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Signalhöhe und $\lg [\text{Ammoniak}]$ (Abb. 4.7) für die gasdialytische FIA-Anordnung wieder.

$$\lg y = (1.00 \pm 0.01) \cdot \lg([\text{NH}_3]/\mu\text{M}) + (0.73 \pm 0.03) \quad (4.3)$$

Beim direkten Kontakt der Gasdialysemembran mit OPA-Reagenz wird Ammoniak vom Reagenz aufgefangen, in dem es in die irreversible Reaktion zu Isoindolderivaten miteinbezogen wird. Dies fördert den Massentransfer von Ammoniak und schließt die Rückdiffusion aus. Unter diesen Umständen konnte eine quantitative Abtrennung erreicht werden.

Der FIA-Grundaufbau konnte weiter vereinfacht werden (Abb. 4.7), wobei die Probenlösung direkt in den OPA-Reagenzstrom injiziert wurde. In diesem Fall ist die Linearität im Bereich des oberen Limits auf 0.5 mM zurückgegangen und das Detektionslimit lag bei 0.02 μM , was mit der kleineren Verdünnung der Probenlösung zu erklären ist. Die Probenrate erhöht sich damit auf 95 Injektionen pro Stunde. Diese FIA kann für die im Wasser stark verdünnten Proben, die eine sehr geringe Änderung des Reagenz-pH ausmachen, geeignet sein.

Abb. 4.8 zeigt die Operationsstabilität der fluorimetrischen Ammoniakdetektion. Bei der kontinuierlichen Arbeit mit der FIA-Anordnung (mit GDZ) nach 7 Tagen geht die Empfindlichkeit um 2% und nach 10 Tagen um 8% zurück.

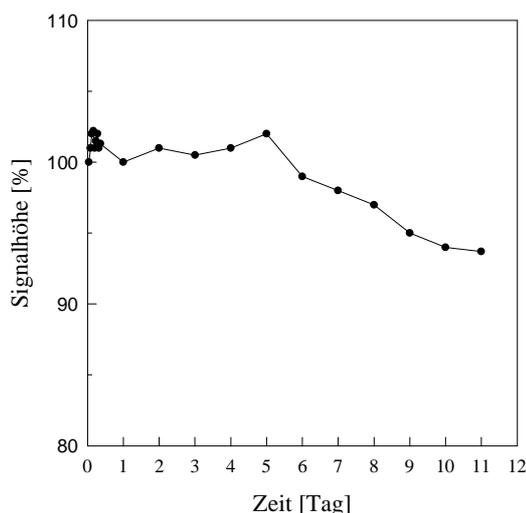


Abb. 4.8: Die Operationsstabilität des fluorimetrischen Verfahrens zur Ammoniakbestimmung, Bedingungen wie in Abb. 4.1.

Die schnelle OPA-Reaktion, die höhere Meßempfindlichkeit, die gute Selektivität und der breite Linearitätsbereich bilden die Basis für die Kopplung dieses

Detektionsprinzips mit enzymatischen Assays, bei denen Ammoniak freigesetzt wird.

4.1.4 Ammoniakeliminierung

Bei der Bestimmung von Analyten über die Ammoniakfreisetzung stellt sich in jedem Fall die Frage der Störung durch bereits in der Probenlösung vorhandenes Ammoniak.

Abb. 4.9 zeigt die für die On-line-Eliminierung von Ammoniak angewendete Anordnung. Die Dialysezelle GDZ ist zwischen 2 Injektionsventilen eingebaut. 200 μ l Probenlösung werden in die Trägerlösung (Wasser) injiziert. Diese wird kontinuierlich mit 0.2 M NaOH-Lösung (0.05 ml/min) vermischt. Das resultierende Gemisch passiert die Donorseite der GDZ. Auf der anderen Seite der GDZ wird 0.1 M HCl-Lösung (0.5 ml/min) als Akzeptorlösung gepumpt. Das Probenvolumen und die geringe Verdünnung durch die niedrige Fließrate der NaOH-Lösung führen nachfolgend nur zu einem geringen Empfindlichkeitsverlust. Nach der Ammoniakeliminierung wird die vorbehandelte Probenlösung durch das zweite Injektionsventil IV2 (10 μ l) in die angekoppelte Enzym-FIA injiziert.

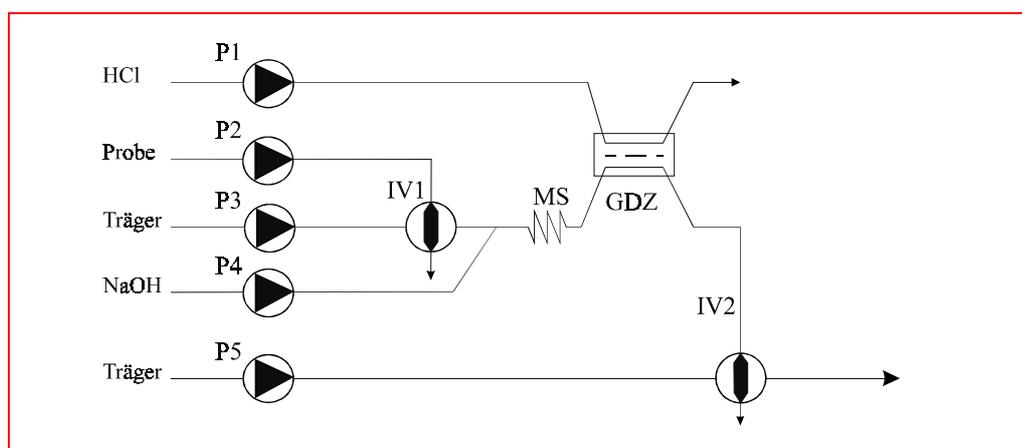


Abb. 4.9: Anordnung zur quantitativen Ammoniakeliminierung mit der Gasdialysezelle (GDZ). IV1 und IV2: Injektionsventile, P1-5: Pumpen.

Bis 1 mM Ammoniak können quantitativ eliminiert werden. Dies ermöglicht z.B. die direkte Bestimmung von Aminosäuren in Anwesenheit von Ammoniak. Abb. 4.10 zeigt die Abhängigkeit der Ammoniakeliminierung von der Donorfließrate, bei der sich die Eliminierung der Nulllinie mit sinkender Fließrate annähert. Wird die Probe in der Gasdialysezelle für 20 Sekunden gestoppt, erhöht sich der Eliminierungsgrad beträchtlich.

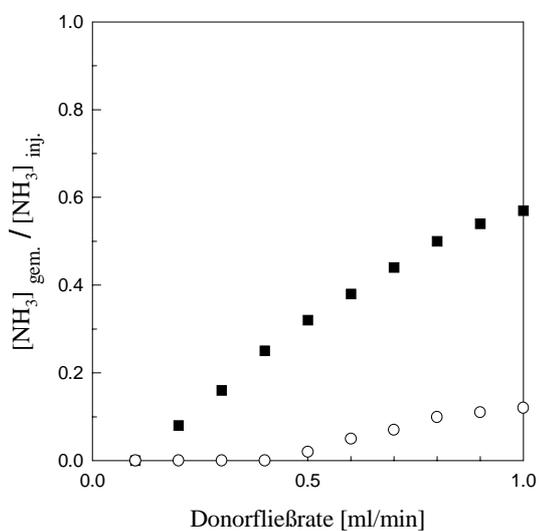


Abb. 4.10:

Eliminierung von Ammoniak: Verhältnis zwischen detektierter und injizierter Ammoniakkonzentration [1 mM] in Abhängigkeit von der Fließrate des Donorstroms. Akzeptorfließrate = 0.5 ml/min, o: *stopped flow*, ■: kontinuierlich.

4.1.5 Enzymatische FIA-Assays

Die einzelnen enzymatischen Assays zur Substratbestimmung wurden auf Grund der Selektivität von OPA-Reagenz gegenüber Ammoniak mittels der enzymatischen FIA-Anordnung ohne Gasdialysezelle, Abb. 3.7 (Abschn. 3.2.3.1) durchgeführt. Die Fließgeschwindigkeiten der Träger-, NaOH- und Reagenzlösung wurden auf 0.5 ml/min eingestellt.

Tab. 4.2 faßt die eingesetzten Enzyme und die optimalen Bedingungen ihrer nach der in Abschn. 3.4.1 beschriebenen Vorschrift durchgeführten Immobilisierung auf CPG zusammen.

Tab. 4.2: Übersicht über die eingesetzten Enzyme und deren Immobilisierungsbedingungen. Genauere Angaben zu den Enzymen befinden sich im Text bzw. Anhang.

Enzym	Enzymmenge mg auf 100 mg CPG	BSA mg auf 100 mg CPG	Immobilisierung-pH-Wert	Reaktor-Länge[mm]
Urease	10.0	0	7.0	15
Glutaminase	2.0	3.0	6.0	20
Glutamatoxidase	4.0	1.0	6.5	15
Glutamatoxidase/Catalase	4.0/2.0	0	7.0	15
Lysinoxidase	8.0	2.0	7.0	15
Lysinoxidase/Catalase	8.0/2.0	0	7.0	15
Creatininiminohydrolase	5.0	0	7.0	15
Creatinase/Urease	5.0/5.0	0	7.0	15

4.1.5.1 Bestimmung von Harnstoff

Harnstoff ist das wichtigste Stickstoffsekret vieler Wirbeltiere und des Menschen. Er wird in der Leber über den Ornithinzyklus gebildet [78]. Da der quantitative Nachweis für diagnostische Zwecke herangezogen wird, kommt der präzisen Harnstoffbestimmung beträchtliche Bedeutung in der klinischen Chemie zu. Deren Bestimmung liefert Hinweise über Stickstoffbilanz und mögliche Krankheitsbilder, wie z.B. bei Fehlernährung [79] und Nierenleiden.

Aufgrund der Verwendung von Harnstoff als Stickstoffdünger ist deren Analyse auch für die Agrochemie von Bedeutung [63].

Urease katalysiert die Reaktion (Gl. 4.4) mit sehr hoher Selektivität, was die enzymatische Harnstoffbestimmung sehr attraktiv macht.



Urease aus Sojabohnen (EC 3.5.1.5, 440 U/mg, SIGMA) wurde auf CPG immobilisiert. Die auf die Proteinbindung bezogene Immobilisierungsausbeute betrug mehr als 78%. In diesem Fall wurde eine Reaktorlänge von 15 mm benötigt, um eine quantitative Substratumwandlung im Konzentrationsbereich $1 \cdot 10^{-5}$ - $8 \cdot 10^{-4}$ M Harnstoff bei Fließraten zwischen 0.1 - 0.5 ml/min zu erreichen. Der Umsatzgrad wurde durch coulometrische Durchflußtitation [80] gemessen. Der Ureasereaktor kann für 3 Monate in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer, der 0.5 M NaCl und 0.2 mM Dithiothreitol enthielt und auf pH 7.0 eingestellt war, bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt werden. Bei mehr als 750 20 µl-Injektionen, 0.1 mM Harnstoff wird eine Signalstabilität ($I_{750,0.1 \text{ mM Urea}}/I_0$) von > 95 % erreicht. Das Bestimmungsverfahren von Harnstoff in der FIA-Anordnung ohne Gasdialysezelle (Abb. 3.7) ergibt eine lineare Kalibrierung im Bereich zwischen $5 \cdot 10^{-7}$ und $1 \cdot 10^{-3}$ M, die z.B. durch die Gleichung 4.5

$$\lg y = (1.00 \pm 0.01) \cdot \lg([\text{Harnstoff}]/\mu\text{M}) + (0.56 \pm 0.05) \quad (4.5)$$

mit $r^2 > 0.9999$ ($\alpha = 0.05$, $n = 4$, $m = 12$) beschrieben werden kann. Das Detektionslimit lag bei 0.2 µM und die Probenfrequenz beträgt 60 Injektionen pro Stunde.

Ähnlich wie bei der Ammoniakbestimmung in der gasdialytischen FIA-Anordnung (Abb. 3.6) geht das Detektionslimit auf 1 µM (Abb. 4.11) zurück und die Probenfrequenz auf 30 Injektionen in der Stunde, woraus Gleichung 4.6

$$\lg y = (0.99 \pm 0.01) \cdot \lg([\text{Harnstoff}]/\mu\text{M}) - (0.01 \pm 0.06) \quad (4.6)$$

resultiert. Der Empfindlichkeitsverlust des gasdialytischen Verfahrens resultiert aus der Verdünnung der Probenlösung nach der enzymatischen Umsetzung. Der lineare Bereich wird durch den Enzymreaktor limitiert.

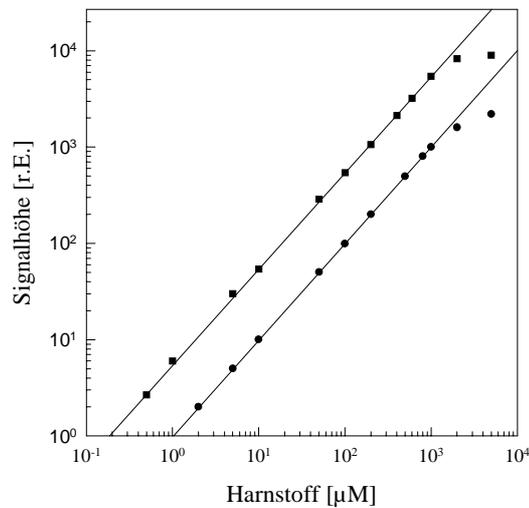
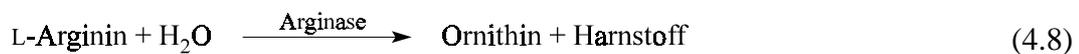
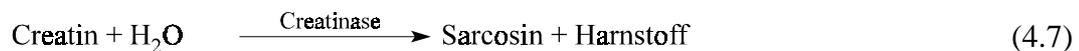


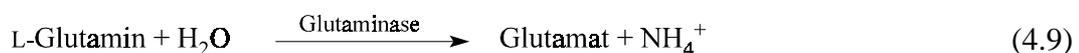
Abb. 4.11:
Doppeltlogarithmische Auftragung der Fluoreszenzsignalthöhen gegen Harnstoffkonzentration mit (●) und ohne Gasdialyse (■).

Die Bestimmung von Harnstoff ermöglicht die Detektion der Bestimmungsreaktionen 4.7 (Abschn. 4.1.5.6) und 4.8 [81]



4.1.5.2 Bestimmung von L-Glutamin

L-Glutamin, das Halbamid der Glutaminsäure, ist in pflanzlichen und tierischen Proteinen weit verbreitet. Es entsteht aus Glutamat durch Glutaminsynthetase, die vor allem in der Leber und im Gehirn vorkommt. Neben Harnstoff ist Glutamin die zweite Transportform des Stickstoffs im tierischen Organismus. Seine Spaltung findet in der Niere unter Freisetzung von Ammoniak statt, welches in den Harn übertragen werden kann [82]. Die Glutaminkonzentration ist ein wichtiger Kontrollparameter bei der automatischen Regelung tierischer Zellkulturen [83].



Die Immobilisierungsausbeute der Glutaminase (*Escherichia coli* EC 3.5.1.2, 180 U/mg) erreichte 85 % (m/m) bezogen auf die Proteinbindung. Ein Enzymreaktor mit einer Packungslänge von 20 mm arbeitete bei Fließraten zwischen 0.1 und 0.5 ml/min quantitativ. L-Glutamin wurde im Konzentrationsbereich von $1 \cdot 10^{-6}$ bis $1 \cdot 10^{-3}$ M bestimmt. Der Reaktor kann in 0.1 M Natriumacetatpuffer, pH 4.9 bei 4°C für einen Monat ohne Abnahme des Umsatzgrades gelagert werden.

Lineare Kalibriergraphen werden zwischen $2 \cdot 10^{-6}$ und $1 \cdot 10^{-3}$ M Glutamin erhalten (Abb. 4.12). Das Detektionslimit liegt bei $1 \cdot 10^{-6}$ M. Eine Regressionsgerade konnte durch Gl. 4.10

$$\lg y = (1.07 \pm 0.02) \cdot \lg([\text{Gln}]/\mu\text{M}) - (0.56 \pm 0.04) \quad (4.10)$$

mit $r^2 > 0.9996$ ($\alpha = 0.05$, $n = 3$, $m = 10$) beschrieben werden. Durch Verzicht auf den Gasdialyseschnitt konnte unter den gleichen Bedingungen eine Erhöhung der maximalen Probeninjektionsfrequenz von 25 auf 55 Bestimmungen pro Stunde erreicht werden.

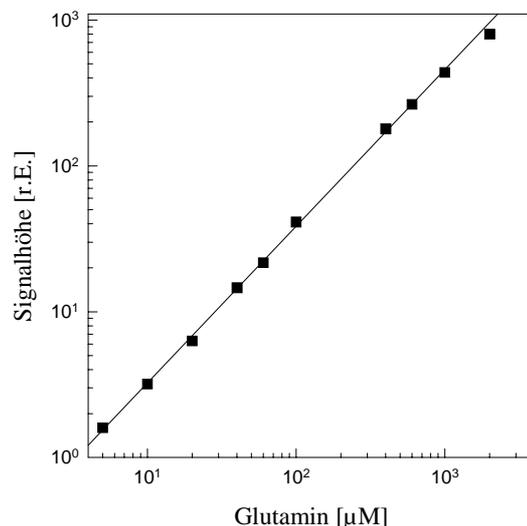


Abb. 4.12: Doppeltlogarithmische Auftragung der Fluoreszenzsignalhöhen gegen die Glutaminkonzentration. FIA ohne GDZ.

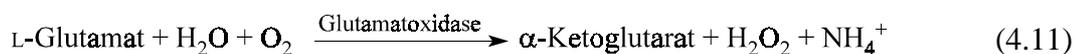
Die Selektivität dieses FIA-Verfahrens ist ausgezeichnet. Außer Asparagin interferieren die anderen Aminosäuren bei Konzentrationen ≤ 10 mM nicht.

Ein Vorteil dieses Glutaminassays gegenüber den üblichen mit Glutaminase/Glutamatoxidase [56,58,84] bzw. Glutaminase/Glutamatdehydrogenase [55,57] arbeitenden Bestimmungsverfahren ist die Verwendung von nur einem Enzym.

4.1.5.3 Bestimmung von L-Glutamat

L-Glutaminsäure ist ein wichtiger Parameter in der klinischen Analytik, da Glutamat das Produkt der durch Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) katalysierten Transaminierungen darstellt. Die Aktivität dieser Enzyme spielt in der Diagnose von myocardialen und hepatischen Erkrankungen eine Rolle [85]. Glutamat und Glutamin sind die Aminosäuren mit der höchsten Konzentration im Zentralnervensystem [86]. Moderne Studien in der Pathophysiologie weisen auf eine mögliche Rolle von Glutamat bei geistigen Störungen wie Schizophrenie, Depression und organischer Gehirnschädigung hin [87].

Neben seinem natürlichen Vorkommen in der Nahrung findet L-Glutamat in der Lebensmittelindustrie als Geschmackskorrektiv Anwendung. Selektive Methoden zur L-Glutamatbestimmung werden u.a. für die Überwachung in der Lebensmittelproduktion und Bioprozeßanalytik, wie z. B. bei dessen mikrobieller Herstellung und technischen Zellkulturen benötigt. L-Glutamat wird in Gegenwart von Glutamatoxidase entsprechend Gl. 4.11 in α -Ketoglutarat, Wasserstoffperoxid und Ammoniak umgesetzt.



Glutamatoxidase aus *Streptomyces sp.* (EC 1.4.3.11, 5 U/mg, SIGMA) wurde auf CPG mit einer Bindungsausbeute von 82% immobilisiert (Tab. 4.2). Eine Reaktorlänge von 20 mm ermöglicht einen Umsatzgrad von 95-100% bei einer Durchflußrate von 0.5 ml/min. Der Reaktor wurde im 0.1 M Kaliumphosphatpuffer/0.2 M NaCl pH 6.5 bei 4 °C gelagert.

Der Kalibriergraph (Abb. 4.13) ist im Konzentrationsbereich zwischen $1 \cdot 10^{-6}$ und $5 \cdot 10^{-4}$ M linear und wird durch Gl. 4.12

$$\lg y = (1.05 \pm 0.02) \cdot \lg([\text{Glu}] / \mu\text{M}) - (0.49 \pm 0.04) \quad (4.12)$$

mit $r^2 > 0.9997$ ($\alpha = 0.05$, $n = 4$ und $m = 10$) beschrieben. Das Detektionslimit liegt bei $8 \cdot 10^{-7}$ M. Die maximale Probenfrequenz beträgt 60 Bestimmungen in der Stunde.

Die hergestellten Glutamatoxidase-reaktoren arbeiteten mehr als 2 Monate ohne nennenswerte Abnahme der Umsatzgrade. Die Coimmobilisierung von Catalase führt zu einer Erhöhung der Signalstabilität, was auf die In-situ-Zersetzung von H_2O_2 zurückführbar ist, da H_2O_2 die Glutamatoxidase langsam desaktiviert. Die Operationsstabilität I/I_0 erhöht sich von 600 auf 1100 ($20 \mu\text{l}$, 0.5 mM L-Glutamat) Injektionen ohne Empfindlichkeitsverlust. Von den Aminosäuren ist nur bei L-Aspartat eine Interferenz zu beobachten. 1 mM L-Aspartat macht 1% des Signals von 1 mM Glutamat aus.

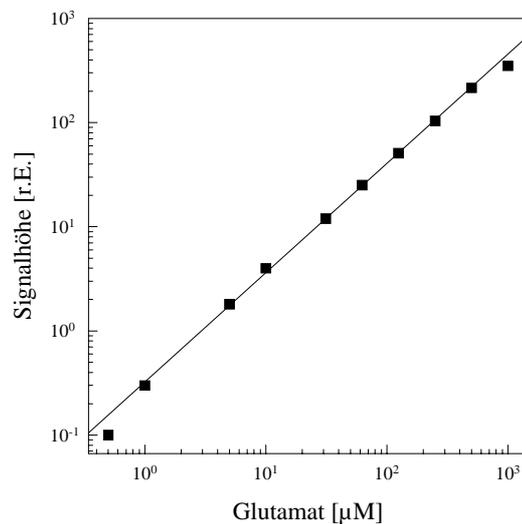


Abb. 4.13:

Doppeltlogarithmische Auftragung der Fluoreszenzsignalhöhen gegen die Glutamatkonzentration. FIA ohne GDZ.

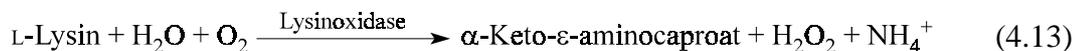
Der Vorteil der Ammoniakdetektion gegenüber der weiter verbreiteten Wasserstoffperoxiddetektion liegt außer in der Anwendbarkeit von Catalase in der

höheren Detektionseffizienz, da sich Wasserstoffperoxid auf dem Weg durch den IMER und zum Detektor oft in beträchtlichem Maße zersetzt.

4.1.5.4 Bestimmung von L-Lysin

L-Lysin ist eine essentielle Aminosäure, die in Proteinen aus Getreide (Weizen, Gerste und Reis) und anderen pflanzlichen Nahrungsmitteln in begrenzter Menge vorhanden ist und für die menschliche und tierische Ernährung benötigt wird [88]. Lysin regt die Knochenbildung sowie die Zellteilung und die Nucleosidsynthese an [89].

L-Lysin wird durch Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* und *Brevibacterium lactofermentum* gewonnen [83]. Es wird großtechnisch aus dem Hydrolysat des Sojabohnenproteins gewonnen. L-Lysin wird nach Gl. 4.13 durch Lysinoxidase selektiv zu α -Keto- ϵ -aminocaproat unter Freisetzung von Ammonium und Wasserstoffperoxid umgesetzt.



Lysinoxidase aus *Trichoderma viride* T4 (EC 1.4.3.14, 20 U/mg), präpariert nach Weber et al. [38], wurde wie Glutamatoxidase auf CPG immobilisiert. Ein 15-mm langer Enzymreaktor arbeitete bei Fließraten bis 0.6 ml/min quantitativ. Der Kalibriergraph ist im Bereich zwischen $1 \cdot 10^{-6}$ und $5 \cdot 10^{-4}$ M linear (Abb. 4.14) und wird durch Gl. 4.14 mit $r^2 > 0.9997$ ($\alpha = 0.05$, $n = 4$ und $m = 10$) beschrieben.

$$\lg y = (1.04 \pm 0.02) \cdot \lg([\text{Lys}]/\mu\text{M}) - (0.18 \pm 0.03) \quad (4.14)$$

Das Detektionslimit liegt bei $0.7 \cdot 10^{-7}$ M und die maximale Probenfrequenz der Lysinbestimmung beträgt 60 Injektionen in der Stunde.

Die Stabilität des Immobilisates gewährleistet, daß nach 600 Injektionen (20 μ l, 0.5 mM Lysin) noch nahezu die ursprüngliche Peakhöhe (> 95% des Peaks der ersten Injektion) erreicht wird. Durch Coimmobilisierung mit Catalase verbessert sich die Operationsstabilität, so daß die Durchführung von mehr als 1000

Injektionen ohne wesentlichen Empfindlichkeitsverlust ermöglicht wird. Nur L-Ornithin (+15%), L-Phenylalanin (+2%), L-Arginin (+1%) und L-Histidin (< +2%) verursachen eine signifikante Interferenz, wobei sich diese Werte auf bei der gleichen L-Lysin-konzentration gemessene Signalthöhen beziehen.

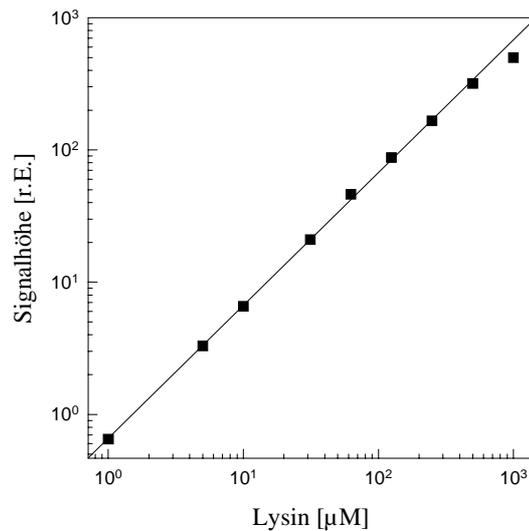


Abb. 4.14: Doppeltlogarithmische Auftragung der Fluoreszenzsignalthöhen gegen die Lysinkonzentration. FIA ohne GDZ.

4.1.5.5 Bestimmung von Creatinin

Creatinin (Glykomethylguanidin) bildet sich im Muskel aus Creatin, wobei Wasser spontan in einer irreversiblen Reaktion abgespalten wird [90]. Es wird ans Blut abgegeben, in die Niere transportiert und letztlich mit dem Harn ausgeschieden, was einen Verlust an transferierbaren Methylgruppen darstellt [91]. Die täglich ausgeschiedene Menge ist der Muskelmasse, weniger dem Körpergewicht proportional. Seine Konzentration im Serum ist ein wichtiger Indikator für renale, muskuläre oder thyroideale Funktionsstörungen [92].

Die gewöhnliche nichtenzymatische Methode für die Creatinin- und die Creatinbestimmung in der klinischen Analytik ist die Jaffé-Methode [93], die auf der Bildung eines roten Komplexes mit Picrat beruht, welcher spektrophotometrisch bei 515 nm detektiert wird. Mehrere in der Probe vorkommende Substanzen wie Pyruvat, Glucose, Harnsäure, Ascorbinsäure und einige Antibiotika interferieren bei diesem Verfahren [94].



Zur fluorimetrischen Bestimmung von Creatinin wurde mikrobielle Creatininiminohydrolase (CIH, EC 3.5.4.21, 25-50 U/mg, SIGMA) auf CPG mit einem Proteinbindungsgrad von 89% immobilisiert (Tab. 4.2). Es ergab sich ein bezüglich der erreichbaren Empfindlichkeiten breites Optimum zwischen pH 7.0 und 9.0. Das Optimum der Operationsstabilität des Enzymreaktors lag bei 7.5. Es wurde mit 0.1 M Kalium-Natriumphosphatpuffer pH 7.5 gearbeitet.

Abb. 4.15 zeigt die ermittelte Kalibrierfunktion, die durch Gleichung 4.16

$$\lg y = (1.01 \pm 0.03) \cdot \lg([\text{Creatinin}]/\mu\text{M}) + (0.40 \pm 0.05) \quad (4.16)$$

mit $r^2 > 0.9996$ ($\alpha = 0.05$, $n = 4$ und $m = 10$) beschrieben werden kann. Der Verlauf der Kalibrierfunktion ist zwischen $1 \cdot 10^{-6}$ und $1 \cdot 10^{-3}$ M linear. Als Nachweisgrenze wurde $8 \cdot 10^{-7}$ M ermittelt. Pro Stunde können maximal 60 Bestimmungen realisiert werden. Die Signalstabilität beträgt nach 1000 Injektionen (20 μl , 0.5 mM Creatinin) 92% der anfänglich gemessenen Peakhöhe. Die Lagerung des Enzymimmobilisates erfolgt in 0.1 M KP_i -Puffer pH 7.0 und bei 4 °C.

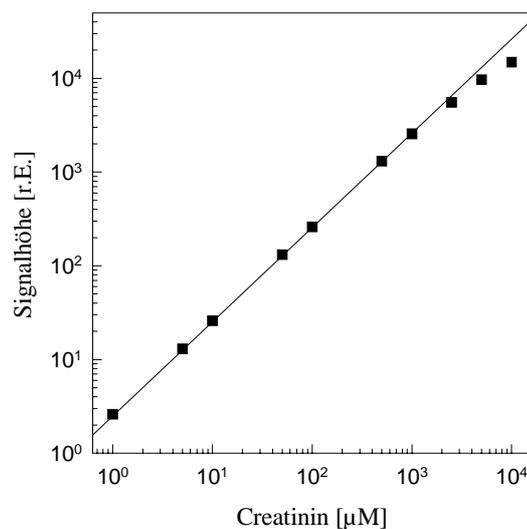
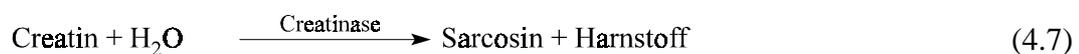


Abb. 4.15: Doppeltlogarithmische Auftragung der Fluoreszenzsignalhöhen gegen die Creatininkonzentration. FIA ohne GDZ.

4.1.5.6 Bestimmung von Creatin

Creatin ist beim erwachsenen Menschen zu über 90% in der Muskulatur lokalisiert. Creatinphosphat ist der intermediäre Energiespeicher der Muskelzelle, welcher das während der Kontraktion verbrauchte ATP regeneriert. Die Konzentration des Creatins im Blut und Körperflüssigkeiten ist normalerweise sehr niedrig (2.5-3.0 % m/m) und erreicht höhere Werte bei Nierenschädigung. Creatinurie tritt bei Muskeldystrophien und anderen Krankheiten auf [89].



Für die fluorimetrische Creatinbestimmung eignet sich die durch Creatinase (CA aus *Actinobacillus*, Creatinamidinohydrolase, EC 3.5.3.3, 20-40 U/mg, SIGMA) und Urease (Sojabohnen, EC 3.5.1.5., 440 U/mg, SIGMA) katalysierte Reaktionsfolge (Gl. 4.7 und 4.4), bei der pro Creatinmolekül 2 Moleküle Ammoniak freigesetzt werden. Bei der Immobilisierung auf CPG (Tab. 4.2) wurde eine Lösung beider Enzyme eingesetzt. Der Proteinbindungsgrad beider Proteine betrug etwa 75 %. Aufgrund der nah beieinander liegenden pH-Optima von Sojabohnenurease und Creatinase aus *Actinobacillus* von pH 7.0 bzw. 7.5 bot sich die Anwendung eines coimmobilisierten Enzymreaktors an. Als Trägerlösung wurde 0.1 M Kalium/Natriumphosphatpuffer pH 7.2 eingesetzt.

Abb. 4.16 zeigt eine für die Creatinbestimmung aufgenommene Kalibrierfunktion, die sich durch die Gleichung

$$\lg y = (0.98 \pm 0.03) \cdot \lg([\text{Creatin}]/\mu\text{M}) + (0.81 \pm 0.06) \quad (4.17)$$

mit $r^2 > 0.9995$ ($\alpha = 0.05$, $n = 4$ und $m = 11$) beschreiben läßt. Bemerkenswert ist die im Vergleich zur Creatininbestimmung gefundene, doppelt so hohe Empfindlichkeit, die zumindest auf die quantitative Umsetzung des zunächst freigesetzten Harnstoffs durch die coimmobilisierte Urease hinweist und für einen hohen

Umsatzgrad von Reaktion (Gl. 4.7) spricht. Die hohen Umsatzgrade sind ein wesentlicher Grund für die erzielte, hohe Signalstabilität, da die Abhängigkeit von Enzymeffektoren und der Temperatur signifikant geringer und im Idealfall ausgeschaltet ist. Der zugängliche Gesamtbestimmungsbereich liegt zwischen $5 \cdot 10^{-7}$ M und $5 \cdot 10^{-3}$ M.

Pro Stunde können maximal 55 Proben bestimmt werden. Die Signalstabilität ist nach 380 Injektionen (20 μ l, 0.5 mM Creatin) größer als 85% der anfänglich gemessenen Peakhöhe. Der gepackte Reaktor wurde in 0.1 M KP_i -Puffer, pH 7.0 und bei 4 °C aufbewahrt.

Im Vergleich zu den anderen Enzymreaktoren hat der Coimmobilisatreaktor eine schlechtere Lagerstabilität. Von der anfänglichen Umsatzaktivität ist nach 14 Tagen etwa ein Drittel geblieben, was auf eine Desaktivierung der Creatinase zurückzuführen ist (Abschn. 4.2.1).

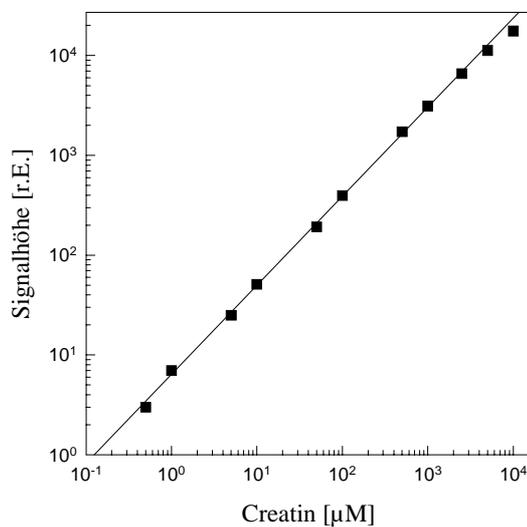


Abb. 4.16: Doppeltlogarithmische Auftragung der Fluoreszenzsignalhöhen gegen die Creatinkonzentration. FIA ohne GDZ.

4.2 Mehrkomponenten-FIA

Das vorgeschlagene Konzept der fluorimetrischen Detektion von enzymkatalytisch erzeugtem Ammoniak wurde für den Aufbau eines neuen Mehrkomponenten-FIA-Konzeptes angewendet. Dieses Konzept ist analog den auf NADH-abhängigen Dehydrogenasen [55,57,95] oder Oxidasen [56,58] basierenden und stellt eine wesentliche Erweiterung des Anwendungsgebietes [72,96] dar.

Zur Bestimmung mehrerer Komponenten wurde die in Abb. 3.9 gezeigte FIA-Meßanordnung, deren Funktionsweise im Abschnitt 3.2.3.2 erläutert wurde, angewendet. Die Meßbedingungen bezüglich der Enzymreaktoren entsprechen im wesentlichen denen, die bei den Einkomponentenbestimmungen angewendet wurden (Abschn. 4.1.5) und wurden automatisch über die Zusammenschaltung und Vermischung von unterschiedlichen Konditionierlösungen eingestellt.

4.2.1 Nebeneinanderbestimmung von Ammoniak, Harnstoff, Creatin und Creatinin

Da Ammoniak, Harnstoff, Creatin und Creatinin zu den wichtigsten Analyten gehören, die bei der Nierenfunktion ausgeschieden werden, ist deren schnelle Nebeneinanderbestimmung bei der Überwachung künstlicher Nieren von Bedeutung.

Zur Nebeneinanderbestimmung der genannten Analyte wurden die entsprechenden Enzymreaktoren (Urease, Creatininiminohydrolase, Creatinase/Urease) und ein Blindreaktor (für Ammoniak) mit den gleichen Abmessungen und Trägerpartikeln in der FIA-Anordnung parallel geschaltet (siehe Abb. 3.9). Um die Meßanordnung so einfach wie möglich zu halten, wurden alle 4 Bestimmungskanäle bei einem pH-Wert von 7.5 betrieben, womit noch eine akzeptable Annäherung an die jeweiligen Stabilitäts-pH- und Empfindlichkeitsoptima erreicht werden konnte.

Bei der Analyse von Probenlösungen werden die einzelnen Kanäle nacheinander über das 6-Wegeventil angewählt, wobei jeweils dreimal injiziert wird.

Zuerst wurde jeder Kanal mit einer Ammoniak-Standardlösung im Bereich zwischen 0.05 und 1.0 mM kalibriert. Danach wurden die enzymatischen Bestimmungskanäle mit den entsprechenden Einzelkomponenten-Standardlösungen im gleichen Konzentrationsbereich geeicht. In Abb. 4.17 sind die Regressionsgeraden der Kalibrierfunktionen, die durch Vermessung der Einzelkomponenten-Standardlösungen erhalten wurden, dargestellt. Tab. 4.3 faßt die Regressionsanalyse zusammen.

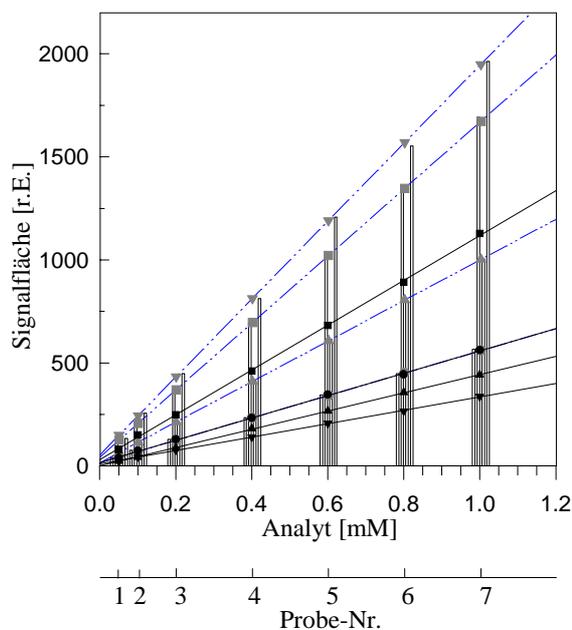


Abb. 4.17:

Durchgezogene Linien sind die Regressionsgeraden der Kalibrierfunktionen der Einzelkomponenten-Standardlösungen für die entsprechenden Meßkanäle. ●: Ammoniak, ■: Harnstoff, ▲: Creatinin, ▼: Creatin.

Gestrichelte Linien stellen die Regressionsgeraden der berechneten Kalibrierfunktionen für die Mischproben dar. ●: Ammoniak-, ■: Urease-, ▲: Creatininiminohydrolase-, ▼: Creatinasekanal.

Balken stellen die gemessenen Peakflächen der gemischten Proben 1 bis 7 durch die vier Kanäle dar. 1.: Ammoniak-, 2.: Urease-, 3.: Creatininiminohydrolase-, 4.: Creatinasekanal. (Analyte haben gleiche Konzentrationen).

Ausgehend von den Anstiegen der Kalibrierfunktionen der Einzelkomponenten-Standardlösungen für die 4 Kanäle können die Umsatzgrade der enzymatischen Bestimmungskanäle berechnet werden. Wird die Steilheit der Regressionsgerade der Ammoniakbestimmung auf 100% gesetzt, können die prozentualen Umsatzgrade ermittelt werden (Tab. 4.3). Ein drastischer Rückgang der Aktivität des Creatinase/Urease-Coimmobilisats bezüglich der Creatinumsetzung ist auf die

schlechte Lagerstabilität zurückzuführen. Bei der Bestimmung von Harnstoff mittels dieses Coimmobilisats wurde festgestellt, daß nur eine Desaktivierung der Creatinase stattgefunden hatte (Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Regressionsanalyse der Einzelkomponenten-Standardlösungen für die vier Kanäle; S: Signalfäche [relative Einheiten], a: Anstieg, n: 4, m: 7, CIH: Creatininiminohydrolase, [mM].

Standard- lösung	Kanal- Nr.	Reaktor	Gleichung der Regressionsgerade $S = a [\text{Analyt}] + b$	Umsatz- grad (X)	r^2
Ammoniak	1	Blank	$= 543 [\text{NH}_3] + 16.0$		0.9996
	2	Urease	$= 543 [\text{NH}_3] + 17.3$		0.9995
	3	CIH	$= 542 [\text{NH}_3] + 15.1$		0.9994
	4	Creatinase/Urease	$= 542 [\text{NH}_3] + 16.9$		0.9992
Harnstoff	2	Urease	$= 1086 [\text{Harnstoff}] + 15.5$	1.00	0.9996
	4	Creatinase/Urease	$= 1029 [\text{Harnstoff}] + 15.6$	0.95	0.9999
Creatinin	3	CIH	$= 442 [\text{Creatinin}] + 1.1$	0.82	0.9998
Creatin	4	Creatinase/Urease	$= 326 [\text{Creatin}] + 9.6$	0.30	0.9998

Aus den Ammoniak-Kalibrierfunktionen und den Umsatzgraden wurden die Gleichungen zur Beschreibung der Kalibrierfunktionen für die Mischproben, die äquivalente Konzentrationen aller Analyte enthalten, zusammengestellt (Tab. 4.4). Mit Hilfe dieser Gleichungen wurden die zu erwartenden Meßsignale der Mischproben berechnet und in Abb. 4.17 aufgetragen. Die Balken stellen in Abb. 4.17 die gemessenen Signale der gemischten Proben dar.

Tab. 4.4: Zusammengesetzte Kalibrierfunktionen der gemischten Probenlösungen für die vier Kanäle; a_{NH_3} : Anstieg der Kalibrierfunktion von Ammoniak im entsprechenden Kanal (Tab. 4.3).

Kanal	Reaktor	Gleichung zur Beschreibung der Kalibrierfunktion $Y = a_{\text{NH}_3} \{ [\text{NH}_3] + \sum (X * [\text{Analyt}]) \} + b$
1	Ammoniak	$= 541 [\text{NH}_3] + 16.0$
2	Urease	$= 543 \{ [\text{NH}_3] + 1.0 * 2 * [\text{Harnstoff}] \} + 17.3$
3	Creatininiminohydrolase	$= 542 \{ [\text{NH}_3] + 0.82 * [\text{Creatinin}] \} + 15.1$
4	Creatinase/Urease	$= 542 \{ [\text{NH}_3] + 0.95 * 2 * [\text{Harnstoff}] + 0.3 * 2 * [\text{Creatin}] \} + 16.9$

Abb. 4.18 stellt die Relation zwischen den gemessenen und berechneten Meßsignalen der Mischproben mit den vier Kanälen. Tab. 4.5 zeigt die Anstiege der Regressionsgeraden von den gemessenen und berechneten Meßwerten und die Korrelationskoeffizienten dazu.

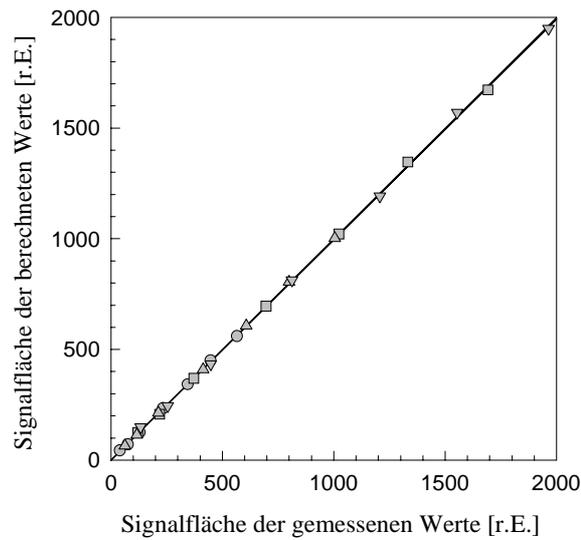


Abb. 4.18:

Korrelationsgraph der Relation von den gemessenen zu den berechneten Meßsignalen. \circ : Ammoniak-, \square : Urease-, \triangle : CIH-, ∇ : Creatinasekanal.

Tab. 4.5: Vergleich zwischen den berechneten und den gemessenen Anstiege (Abb. 4.17).

Kanal	Reaktor	berechnete Anstiege	gemessene Anstiege	Korrelation
1	Ammoniak	543	545	0.9996
2	Urease	1629	1632	0.9997
3	Creatininiminohydrolase	986	986	0.9999
4	Creatinase/Urease	1894	1899	0.9996

Bei der Analyse der gemischten Standardlösungen, die jeweils gleiche Konzentrationen aller Analyte enthalten, verhalten sich die Meßsignale aufgrund der hohen Linearität der Analysenkanäle in den betreffenden Konzentrationsbereichen additiv. Die Übereinstimmung der Ammoniakmeßempfindlichkeit zeigt die gute Reproduzierbarkeit beim Aufbau der Bestimmungskanäle und der Herstellung der gepackten Durchflußreaktoren (IMER), einschließlich der Hydrodynamik der gepackten Enzymreaktoren [96].

4.2.2 Nebeneinanderbestimmung von Ammoniak, Glutamin und Glutamat

Die quasisimultane Bestimmung von Ammoniak, Glutamin und Glutamat ist für die Überwachung und Kontrolle technischer Tierzellkulturen von Bedeutung [55-58].

In die Multikanal-FIA-Anordnung, Abb. 3.9, Abschnitt 3.2.3.2 wurden zwei Enzymreaktoren eingebaut. Ein dritter Kanal arbeitet als Blindreaktor. Der Multikanal-FIA wird die Anordnung zur Eliminierung von Ammoniak vorgeschaltet (Abb. 4.9).

Tab. 4.6 faßt die Ergebnisse der Analyse gemischter Proben zusammen. Die zu untersuchenden Konzentrationen von Ammoniak, Glutamin und Glutamat lagen im Bereich zwischen 0.05 bis 2.50 mM. Ammoniak wurde vor Beginn der Aminosäurenbestimmung mit der *Stopped flow*-Methode (siehe Abschnitt 4.1.4) quantitativ eliminiert.

Bei der Bestimmung des Ammoniaks wurde die NaOH-Pumpe ausgeschaltet. Ausgehend von den einzelnen Bestimmungen der Aminosäuren sind Interferenzen zwischen den vier Bestimmungskanälen in den angegebenen Konzentrationsbereichen auszuschließen. Eine gute Wiederfindung der Analyte wurde in allen Kanälen erreicht. Der Korrelationskoeffizient zwischen zugegebenen und gemessenen Konzentrationen für jeden Bestimmungskanal ist größer als 0.999. Die Wiederfindungsraten liegen zwischen 80 und 105 %. Die Varianzen der Anstiege sind bei sorgfältiger Thermostatierung kleiner als 2% ($\alpha = 0.05$, $n = 3$, $m = 7$). Eine hohe Zuverlässigkeit der Analyse gemischter Probenlösungen ist durch die hohe Reproduzierbarkeit und Langzeitstabilität der Bestimmungskanäle bedingt. Bis zu 20 3-Komponenten-Bestimmungen können pro Stunde realisiert werden.

Tab. 4.6: Mehrkomponenten-FIA-Analyse der mit Ammoniak, Glutamin und Glutamat gemischten Proben. add: zugegebene Menge, gem: wiedergefundene Menge (n = 4), Temperatur 20 °C [72].

Lösungs- Nummer	Ammoniak [mM]		Glutamin [mM]		Glutamat [mM]	
	add	gem	add.	gem.	add	gem
1	0.05	0.05	0.10	0.10	0.10	0.09
2	0.10	0.11	0.25	0.25	0.25	0.26
3	0.50	0.49	0.50	0.51	0.50	0.48
4	1.00	0.98	1.00	1.02	1.00	1.03
5	2.50	2.53	2.50	2.51	2.50	2.54
6	0.05	0.04	2.50	2.52	2.00	2.02
7	0.10	0.10	1.00	0.98	1.00	1.01
8	0.50	0.45	0.50	0.49	0.50	0.50
9	1.00	0.99	0.25	0.26	0.25	0.24
10	2.50	2.48	0.10	0.08	0.10	0.10

Bezüglich der Selektivität gegenüber Ammonium könnte das vorgeschlagene Reagenz im Vergleich zu allen anderen OPA-Reagenzien, die auch unterschiedlich stark auf Aminosäuren reagieren, zur quantitativen Bestimmung des Gesamtproteingehaltes nach vollständiger Proteolyse und quantitativer enzymatischer Oxidation von L-Aminosäuren ohne einen Abtrennungsschritt verwendet werden.

Ähnliche OPA-Reagenzien, wie OPA/Mercaptoethanol [97] oder OPA-N-Acetylcystein [98], können zur Bestimmung einer Reihe klinisch [97,99], pharmazeutisch [100,101], umwelt- [102,103] und lebensmittelrelevanter [98], primärer Amine, wie z.B. Argininosuccinat [99], Gentamicin [100], Ranitidin [101], 3,4-Dihydroxyphenylalanin, γ -Aminobutylsäure, Taurin [97], Carbaryl, Aldicarb [103], Histamin, Tyramin, Cadaverin, Agmatin, Putrescin, Spermidin [98] eingesetzt werden. Zur Abtrennung von Probenmaterial können chromatographische Trennverfahren, wie z.B. HPLC mit der Postderivatisierungsmethode (Nachsäulenderivatisierung) kombiniert werden.

4.3 Fluorimetrische Verfahren zur Bestimmung reduzierender Schwefelverbindungen

Das bei der Reaktion (Gl. 2.4) zwischen o-Phthaldialdehyd (OPA), primärem Amin und reduzierender Schwefelverbindung deutlich werdende Nachweisprinzip der Bildung fluoreszierender Isoindolderivate läßt sich außer auf die Bestimmung primärer Amine auch auf die Bestimmung reduzierender Schwefelverbindungen ausdehnen.

Die schnelle, selektive und präzise Detektion reduzierender Schwefelverbindungen, insbesondere von Thiolen mit kleinem Molekulargewicht, wie Sulfid, reduziertem Gluthation, Dithiothreitol, Thioglycolsäure, Cystein und Coenzym A sowie von Sulfit sind in der pharmazeutischen [104,105], Umwelt- [106,107] und klinischen Analyse [108,109] sowie in der analytischen Chemie [110,111] von Interesse.

Trotz der erreichbaren hohen Empfindlichkeiten wurden OPA-Reagenzien nur selten zur Detektion von Thiolen [112,113] und anderen reduzierenden Schwefelverbindungen [113] angewendet. Nakamura und Tamura [71] haben die Umsetzung biogener Thiole nach chromatographischer Trennung mit methanolischer OPA- und Taurinlösung zu ihrer fluorimetrischen Detektion verwendet. Mopper und Delmas [111] haben eine methanolische OPA- und eine wäßrige 2-Aminoethanollösung pH 7.4 separat zur Probe zugegeben, um die Thiolverbindungen in fluoreszierende Isoindolderivate umzuwandeln. Abdel-Latif [74] zeigte, daß Sulfit in Anwesenheit von Ammoniak mit OPA zu einem tiefblauen Produkt reagiert, das spektrophotometrisch bei der Wellenlänge von 628 nm detektierbar ist.

Im Abschn. 4.1 wurde gezeigt, daß Ammoniak schnell und empfindlich nach der Derivatisierung mit OPA und Thioglycolsäure im wäßrigen Medium fluorimetrisch bestimmt werden kann. Durch Umkehr des Systems, um Thioglycolat und ähnliche Verbindungen zu detektieren, wurden in der

vorliegenden Arbeit auch wässrige Reagenzien für die schnelle und selektive fluorimetrische Detektion von SO_2 , H_2S und anderer polarer Thiole entwickelt, die eine leichte Kombination mit einem membrangeschützten Gasdialyseschritt erlauben.

Bei der Reaktion von reduzierenden Schwefelverbindungen mit einem OPA/Ammonium-Reagenz ähneln die resultierenden Fluoreszenzspektren in der Abhängigkeit der Intensitäten von der Zeit den Spektren, die bei der Reaktion eines OPA/TGS-Reagenzes mit Ammoniak aufgezeichnet wurden. Bei den eingestellten Bedingungen wird das Maximum der Fluoreszenzintensität bei der Reaktion von Thiocholin innerhalb der ersten 30 s erreicht (Abb. 4.19).

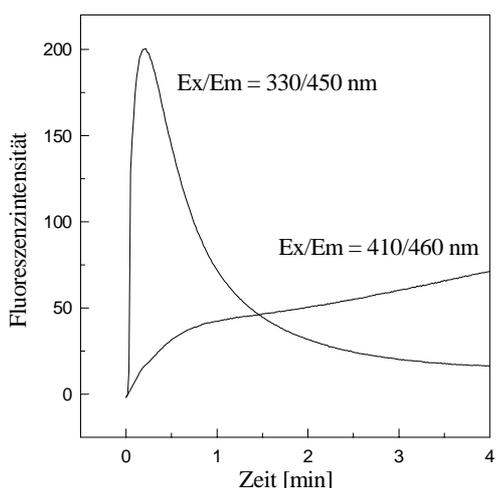


Abb. 4.19:

Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität bei der Reaktion von OPA-Reagenz mit Thiocholin bei verschiedenen Anregungs- und Emissionswellenlängen. $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7$, $[\text{KPi}] = 0.1\text{ M}$, $[\text{OPA}] = 8\text{ mM}$, $[\text{NH}_4^+] = 1\text{ mM}$, Thiocholin = $100\text{ }\mu\text{M}$.

Das pH-Optimum ist im Gegensatz zur Reaktion von NH_3 mit dem OPA/TGS-Reagenz (Abschn. 4.1.1) nicht auf einen schmalen Bereich beschränkt, wodurch die Arbeit in einem pH-Intervall von einer pH-Einheit zentriert um das pH-Maximum, ermöglicht wird. Abb. 4.20 zeigt die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom pH-Wert bei der Thiocholindetektion.

Bei höheren Ammoniumkonzentrationen ($> 4\text{ mM}$) im Gemisch mit OPA ist das Reagenz instabil. Es bildet sich ein schwarzes Präzipitat. Die Untersuchungen zur Optimierung des Reagenzes wurden mittels der FIA-Anordnung, Abb. 3.3 durchgeführt, wobei die beiden Reagenzkomponenten OPA und Ammonium in-situ vermischt wurden. Ist die Ammoniumkonzentration gering ($< 1\text{ mM}$), erhöht

sich die Stabilität des Reagenzes auf mehr als zwei Tage ohne nennenswerten Empfindlichkeitsverlust.

Die zu analysierenden Probenlösungen reduzierender Schwefelverbindungen wurden durch jodometrische Titration (siehe Anhang 5) eingestellt.

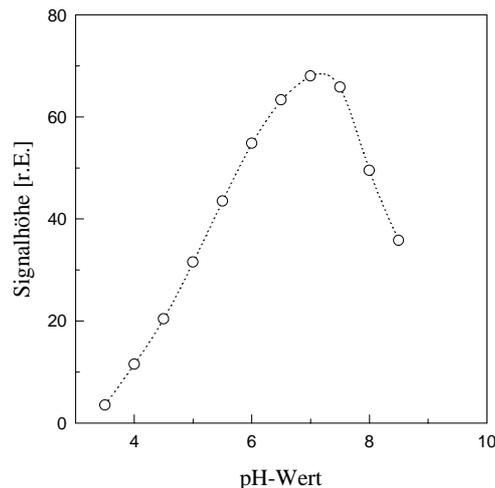


Abb. 4.20: Abhängigkeit des Thiocholin-Fluoreszenzsignals vom pH. $[\text{KPi}] = 0.1 \text{ M}$, $[\text{OPA}] = 8 \text{ mM}$, $[\text{NH}_4^+] = 1 \text{ mM}$, $[\text{Thiocholin}] = 100 \text{ }\mu\text{M}$.

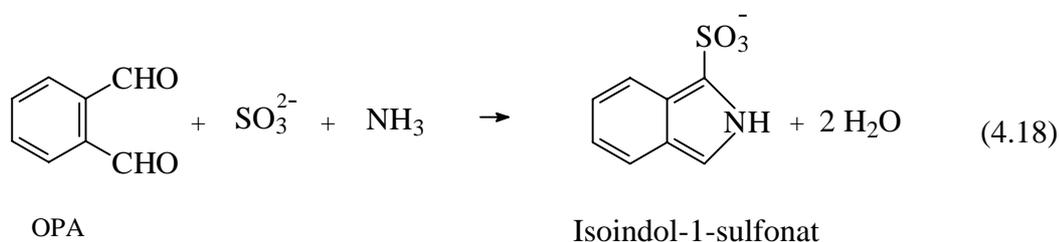
Die Bestimmung der reduzierenden Schwefelverbindungen wurde mit dem FIA-Grundaufbau (Abb. 3.2) durchgeführt. Es wurden jeweils 20 μl Probenlösung in die Trägerlösung (Wasser) injiziert, die sich bei Fließgeschwindigkeiten von 0.5 ml/min mit dem OPA/ NH_4^+ -Reagenz vermischt.

4.3.1 Bestimmung von Sulfit ($\text{SO}_3^{2-}/\text{HSO}_3^-$)

Sulfit wird in der Lebensmittelindustrie als Konservierungsmittel angewendet [114]. Bei niedrigem pH-Wert bildet sich schweflige Säure, die ein sehr reaktives antimikrobielles Agens ist. Außerdem findet Sulfit eine weit verbreitete Anwendung in der Bier- und Weinherstellung [114].

Von Abdel-Latif [74] wurde Sulfit durch die Reaktion mit OPA in Anwesenheit von Ammoniak spektrophotometrisch bestimmt. Der Nachteil dieser Methode besteht in dem relativ hohen Detektionslimit von 5 μM und der Instabilität des Reagenzes sowie im hohen Hintergrundsignal bei der Analyse realer Probenlösungen.

Sulfit reagiert bei schwach saurem pH mit OPA im Gegenwart von Ammoniak zum fluoreszierenden Isoindol-1-sulfonat (Gl. 4.18)



OPA-Reagenz

Abb. 4.21 zeigt die Absorptionsspektren der Umsetzung von Sulfit mit dem OPA/Ammoniak-Reagenz. In den ersten 10 Sekunden bildet sich ein Maximum bei etwa 335 nm. Zwei andere Maxima werden in der nachfolgenden Reaktionszeit bei etwa 440 und 570 nm deutlich. In den Fluoreszenzspektren liegt das Anregungsmaximum bei 330 nm und das Emissionsmaximum bei 390 nm (Abb. 4.22).

Bei der Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf die Reaktion OPA/NH₄⁺/SO₃²⁻ ergab sich ein Empfindlichkeitsmaximum um 6.5 (Abb. 4.23). Der pH-Wert kann im Bereich zwischen 6.0 und 7.2 ohne wesentlichen Empfindlichkeitsverlust eingestellt werden. Die Signalhöhe der relativen Fluoreszenz durchläuft in Abhängigkeit von der Phosphationenkonzentration ein breites Maximum im Bereich zwischen 40 und 80 mM Phosphat (Abb. 4.24).

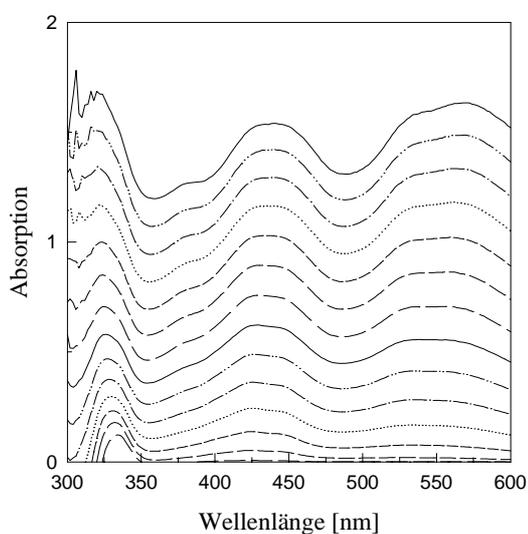


Abb. 4.21: Absorptionsspektren der Reaktion von SO₃²⁻ mit OPA/Ammoniak-Reagenz. Die Spektren wurden nach Reaktionsstart im zeitlichen Abstand von 5 Sekunden aufgenommen. T = 20 °C, pH = 6.5, [KPi] = 80 mM, [OPA] = 4 mM, [NH₄⁺] = 40 mM, [SO₃²⁻] = 10 μM.

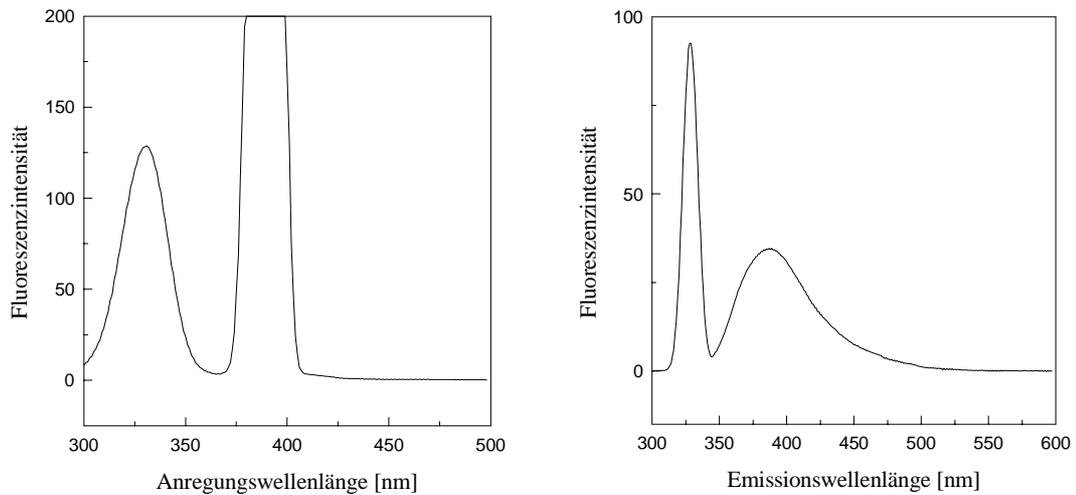


Abb. 4.22: Fluoreszenzspektren der Reaktion von OPA/Ammoniak-Reagenz mit Sulfid; Links: das Anregungsspektrum bei $\lambda_{Em} = 385$ nm, Rechts: das Emissionsspektrum bei $\lambda_{Ex} = 330$ nm. Meßbedingungen wie in Abb. 4.21.

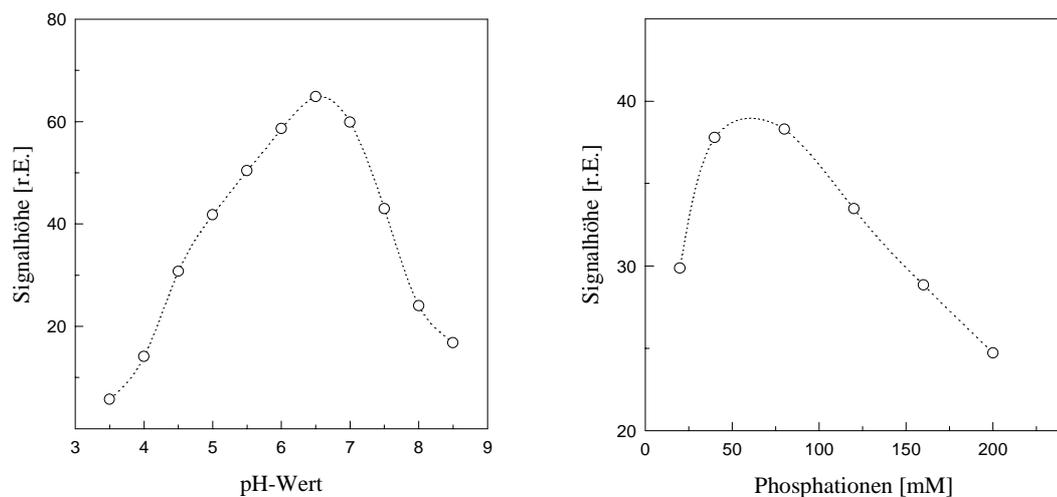


Abb. 4.23: Die Abhängigkeit des SO_3^{2-} -Fluoreszenzsignals vom pH-Wert. $[\text{OPA}] = 4$ mM, $[\text{NH}_4^+] = 40$ mM, $[\text{KP}_i] = 80$ mM, $[\text{SO}_3^{2-}] = 100$ μM .

Abb. 4.24: Abhängigkeit des SO_3^{2-} -Fluoreszenzsignals von der Phosphationenkonzentration (KP_i), pH = 6.5, $[\text{OPA}] = 4$ mM, $[\text{NH}_4^+] = 40$ mM, $[\text{SO}_3^{2-}] = 100$ μM .

Bei der OPA-Konzentration 3.0 mM erreicht die Fluoreszenzintensität Sättigung, und fällt bei höheren OPA-Konzentrationen langsam ab (Abb. 4.25). Die Empfindlichkeit der Sulfiddetektion erreicht bei 40 mM Ammonium Sättigung (Abb. 4.26).

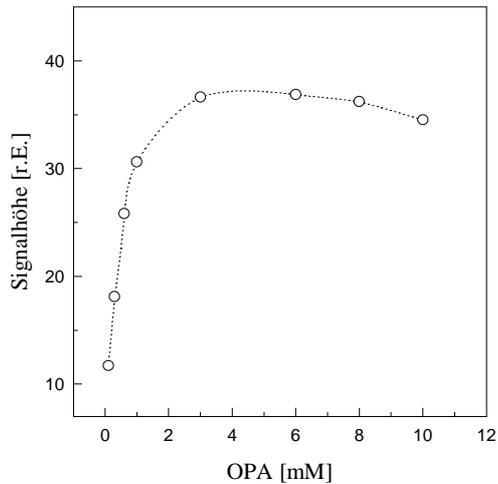


Abb. 4.25: Die Abhängigkeit des SO_3^{2-} -Fluoreszenzsignals von der OPA-Konzentration. $\text{pH} = 6.5$, $[\text{KPi}] = 80 \text{ mM}$, $[\text{NH}_4^+] = 40 \text{ mM}$, $[\text{SO}_3^{2-}] = 100 \text{ }\mu\text{M}$.

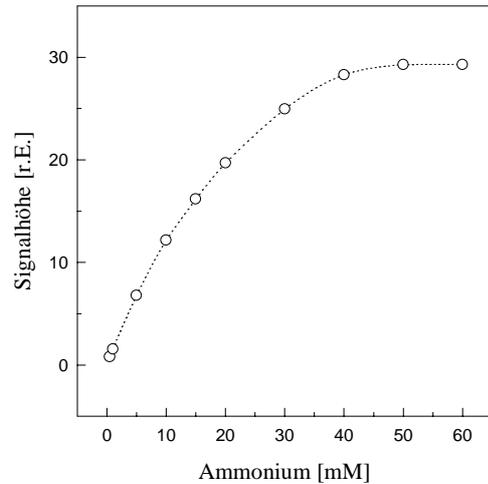


Abb. 4.26: Die Abhängigkeit des SO_3^{2-} -Fluoreszenzsignals von der NH_4^+ -Konzentration. $\text{pH} = 6.5$, $[\text{KPi}] = 80 \text{ mM}$, $[\text{OPA}] = 4 \text{ mM}$, $[\text{SO}_3^{2-}] = 100 \text{ }\mu\text{M}$.

Die Bestimmung von Sulfitionen wurde in der FIA-Anordnung (Abb. 3.2) durchgeführt. Abb. 4.27 zeigt einen doppeltlogarithmischen Kalibriergraphen von Na_2SO_3 . Im Bereich zwischen $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ und $1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ gilt Gleichung (4.19)

$$\lg y = (1.00 \pm 0.03) \cdot \lg ([\text{Na}_2\text{SO}_3]/\mu\text{M}) + (2.96 \pm 0.03) \quad (4.19)$$

mit $r^2 > 0.9989$ ($\alpha = 0.05$, $n = 4$, $m = 10$). Das Detektionslimit liegt bei $5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$.

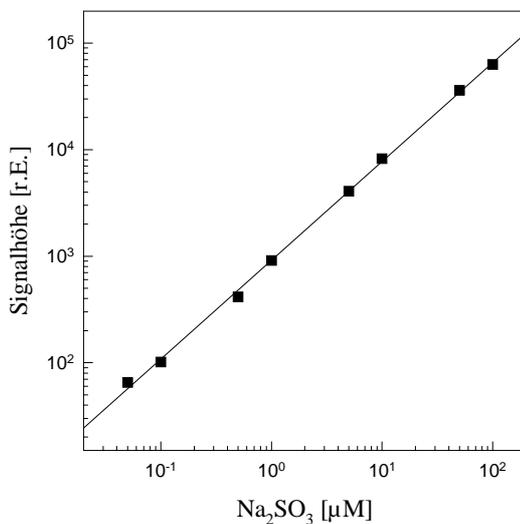


Abb. 4.27: Doppeltlogarithmischer Kalibriergraph von Natriumsulfit. $\lambda_{\text{Ex}} = 330 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 390 \text{ nm}$, $\text{pH} = 6.5$, $[\text{KPi}] = 80 \text{ mM}$, $[\text{OPA}] = 4 \text{ mM}$, $[\text{NH}_4^+] = 40 \text{ mM}$.

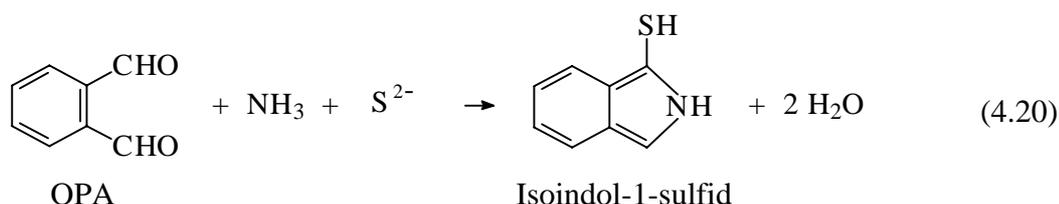
Damit gehört diese Methode zu den empfindlichsten Verfahren zur Bestimmung von Schwefeldioxid und seinen Salzen. Bei Durchflußgeschwindigkeiten von jeweils 0.4 ml/min für OPA-Reagenz und Trägerlösung ist eine Probenrate von 60 pro Stunde erreichbar.

4.3.2 Bestimmung von Sulfid ($\text{HS}^-/\text{S}^{2-}$)

Schwefelwasserstoff entsteht bei der Zersetzung von Proteinen durch Fäulnisbakterien und in erheblichem Umfang durch anaerobe Sulfatreduktion. Darüber hinaus ist es Bestandteil von Vulkangasen. Es kommt in sogenannten Schwefelquellen vor und ist toxikologisch ein wichtiger Bestandteil des Kloakengases (2-8 Vol-%). Bereits bei Konzentrationen von 0.5-1.0 $\mu\text{g/l}$ in der Luft wirkt Schwefelwasserstoff tödlich [115]. Von Pflanzen kann Sulfid in Cystein überführt werden. Außerdem ist Sulfid in organisch gebundener Form Zwischenprodukt der assimilatorischen Sulfatreduktion bei Pflanzen. Die Bestimmung von Schwefelwasserstoff und seinen Salzen ist eine häufige umwelt- und prozeßanalytische Aufgabenstellung.

Die nach der Reaktion von OPA/ NH_4^+ -Reagenz mit Sulfid aufgezeichneten Fluoreszenzspektren sind denen des Isoindol-1-sulfonats ähnlich. Die Maxima der Anregung und der Emission liegen bei 330 bzw. 390 nm.

Die Verläufe der Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom pH-Wert (Abb. 4.28) und der Phosphationenkonzentration sind denen des Reaktionssystems OPA/ NH_4^+ /Sulfit vergleichbar (Abb. 4.23 und 4.24). Dies weist auf ähnliche Reaktionsmechanismen und Reaktionsintermediate bei der Bildung von Isoindol-1-hydrogensulfid (Gl. 4.20) hin. Der Umsatz könnte nach Gleichung 4.20 erfolgen.



Das Empfindlichkeitsmaximum liegt bei pH 6.5 bzw. bei einer Phosphationenkonzentration von 50 mM.

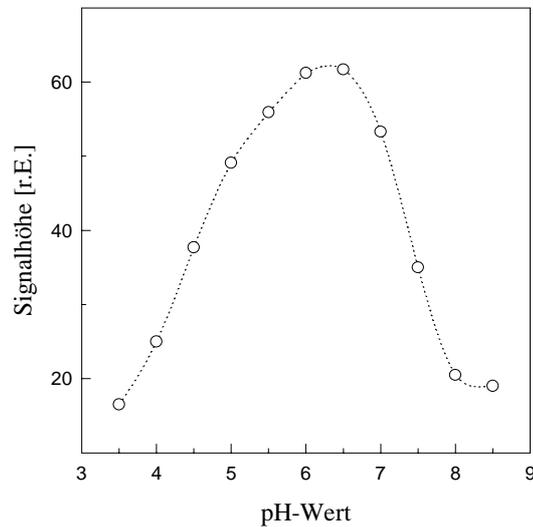


Abb. 4.28:

Abhängigkeit des Sulfid-Fluoreszenzsignals von pH-Wert. $[KP_i] = 50 \text{ mM}$, $[OPA] = 3 \text{ mM}$, $[NH_4^+] = 80 \text{ mM}$, $[S^{2-}] = 100 \text{ }\mu\text{M}$.

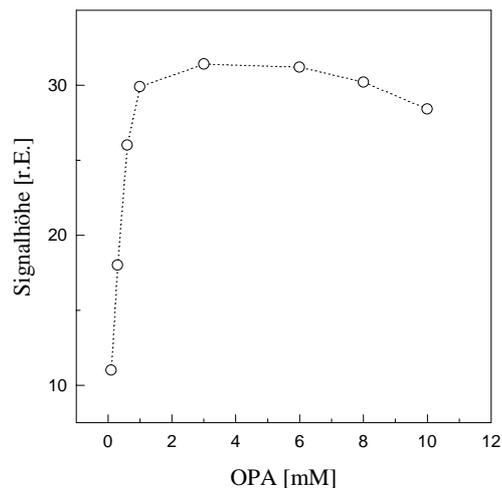


Abb. 4.29: Abhängigkeit des Sulfid-Fluoreszenzsignals von OPA-Konzentration. $\text{pH} = 6.5$, $[KP_i] = 50 \text{ mM}$, $[NH_4^+] = 80 \text{ mM}$, $[S^{2-}] = 100 \text{ }\mu\text{M}$.

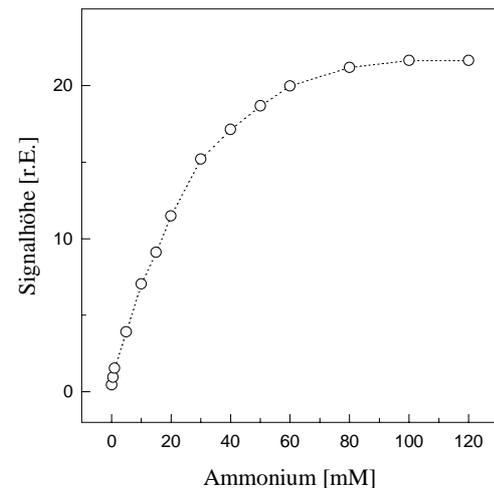


Abb. 4.30: Abhängigkeit des Sulfid-Fluoreszenzsignals von NH_4^+ -Konzentration. $\text{pH} = 6.5$, $[KP_i] = 50 \text{ mM}$, $[OPA] = 30 \text{ mM}$, $[S^{2-}] = 100 \text{ }\mu\text{M}$.

Die Untersuchung des OPA-Einflusses führt zu analogen Ergebnissen wie bei der Sulfiddetektion. Die optimale Konzentration liegt zwischen 2 und 3 mM OPA. Bei noch höheren Konzentrationen ist ein Rückgang der Intensität zu beobachten. (Abb. 4.29). Hinsichtlich der Ammoniumkonzentration erreicht die Fluoreszenzintensität bei 80 mM eine Sättigung (Abb. 4.30). Es ist deshalb wichtig, das

eigentliche Reagenz durch In-situ-Vermischung von OPA- und Ammoniumlösung herzustellen.

Abb. 4.31 zeigt die doppeltlogarithmische Auftragung der Signalhöhen gegen die Na_2S -Konzentration.

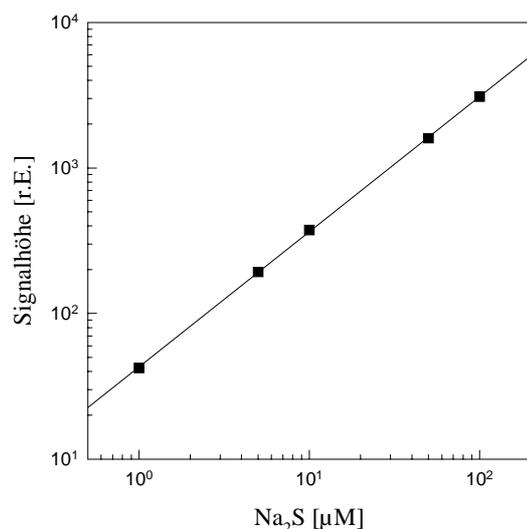


Abb. 4.31:

Doppeltlogarithmischer Kalibriergraph von Natriumsulfid. $\lambda_{\text{Ex}} = 330 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 390 \text{ nm}$, $\text{pH} = 6.5$, $[\text{KP}_i] = 50 \text{ mM}$, $[\text{OPA}] = 3 \text{ mM}$, $[\text{NH}_4^+] = 80 \text{ mM}$.

Eine Na_2S -Stammlösung wurde nach jodometrischer Titration (Anhang A.5) hergestellt. Die wäßrige Probenlösung von Na_2S wurde mit Argon entgast, auf $\text{pH} 9.0$ eingestellt und mit EDTA stabilisiert

Im linearen Bereich zwischen 1 und 100 μM ist die Regressionsgerade nach der folgenden Gleichung

$$\lg y = (0.93 \pm 0.02) \cdot \lg ([\text{Na}_2\text{S}]/\mu\text{M}) + (1.63 \pm 0.02) \quad (4.21)$$

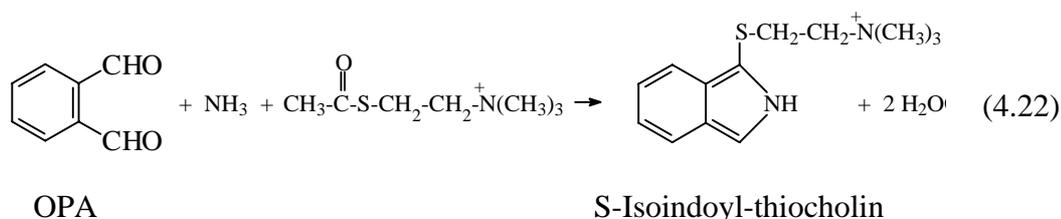
mit $r^2 > 9999$ ($\alpha = 0.05$, $n = 3$, $m = 7$) zu beschreiben. Das Detektionslimit liegt im Vergleich zur Sulfitbestimmung über eine Zehnerpotenz höher (bei $8 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) und die Probenfrequenz bei 60 Bestimmungen in der Stunde.

4.3.3 Bestimmung von Thiocholin

Thiocholin enthält eine β -Thiolgruppe und ähnelt in seinem Reaktionsverhalten den Thiolverbindungen, wie z.B. reduziertem Glutathion, Coenzym A und Coenzym M.

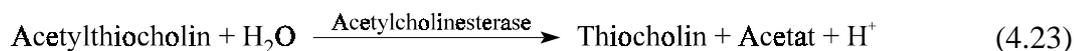
Die empfindliche fluorimetrische Detektion von Thiocholin kann zur Messung der Enzymaktivität der Acetyl- und Butyrylcholinesterase und ihrer Inhibierung durch

Carbamate, Phosphorsäure- und Phosphonsäureesterderivate genutzt werden. In Anwesenheit von Ammonium reagiert Thiocholin mit OPA zu einem intensiv fluoreszierenden Isoindolderivat, dem S-Isoindoylthiocholin (Gl. 4.22).



Herstellung von Thiocholinstandarlösungen

Da Thiocholin kommerziell nicht verfügbar ist, wurde dieses durch enzymkatalysierte Zersetzung von Acetylthiocholin nach Gl. 4.23 gewonnen.



Zur Gewinnung von Thiocholin wurde ein Enzymreaktor mit einer Länge von 20 mm mit Acetylcholinesterase aus *Electric Eel* (EC 3.1.1.7, Typ V-S, 1000-2000 U/mg, SIGMA) eingesetzt. 10 mg Enzymprotein wurden an 200 mg porösen Glaspartikeln (Trisola, Siebfraktion 160-200), wie im Abschn. 3.2.1 beschrieben, bei pH 7.0 immobilisiert. Der Reaktor wurde in die Anordnung, Abb. 4.32 eingebaut. Um einen quantitativen Umsatz bei einer Substratkonzentration von 1 mM in 0.1 M Phosphatpuffer pH 7 zu verwirklichen, wurde ein Reaktordurchfluß von 0.4 ml/min eingestellt.

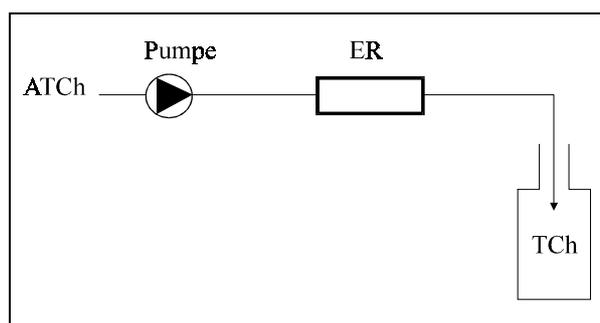


Abb. 4.32:
FIA-Anordnung zur Erzeugung von Thiocholin. ATCh = Acetylthiocholin, TCh = Thiocholin, ER = Enzymreaktor.

Die sich ergebende Thiocholinkonzentration wurde durch jodometrische Titration bestimmt (Anhang A.5). Die Thiocholinlösung wurde in einem dicht geschlossenen Behälter bei 4°C für die weiteren Arbeiten aufbewahrt und ist dann unter Stickstoff oder Argon für mindestens 48 Stunden stabil.

OPA-Reagenz

Abb. 4.33 zeigt die Absorptionsspektren der Reaktion von Thiocholin mit dem OPA/Ammoniak-Reagenz. Ähnlich wie bei der Reaktion von Sulfid entsteht erst ein Maximum bei 333 nm. Dieses wird nach 10 Sekunden von einem zweiten bei 435 nm überholt und befindet sich mit einem dritten bei 580 nm auf gleicher Intensität.

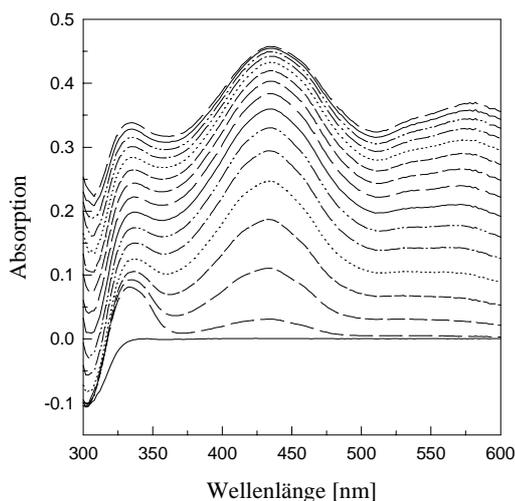


Abb. 4.33: Absorptionsspektren der Reaktion von Thiocholin mit OPA/Ammonium-Reagenz. Die Spektren wurden nach Reaktionsstart im zeitlichen Abstand von 5 Sekunden aufgenommen. $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7$, $[\text{KP}_1] = 0.1\text{ M}$, $[\text{OPA}] = 8\text{ mM}$, $[\text{NH}_4^+] = 1\text{ mM}$.

Die Anregungsspektren weisen zwei Maxima auf. Ein Maximum liegt bei 330 nm, das andere befindet sich bei 410 nm (Abb. 4.34). Die Emissionsmaxima für die Anregungsmaxima 330 und 410 nm überlappen sich stark. Sie liegen bei 450 bzw. 460 nm. Die entsprechenden Fluoreszenzintensitäten sind zeitabhängig (Abb. 4.19). Die bei der Anregungs- und Emissionswellenlänge von 330 bzw. 450 nm gemessene Fluoreszenzintensität erreicht in den ersten 20 Sekunden nach dem Start der Reaktion ein Maximum und fällt danach ab. Dies deutet, ähnlich zur Reaktion von Ammoniak mit OPA/Thioglycol-Reagenz, auf die Bildung eines

instabilen Zwischenproduktes hin. Die Fluoreszenzintensität, die bei der Anregungs- und Emissionswellenlänge von 410 bzw. 460 nm gemessen wird, nimmt hingegen langsamer und kontinuierlich zu.

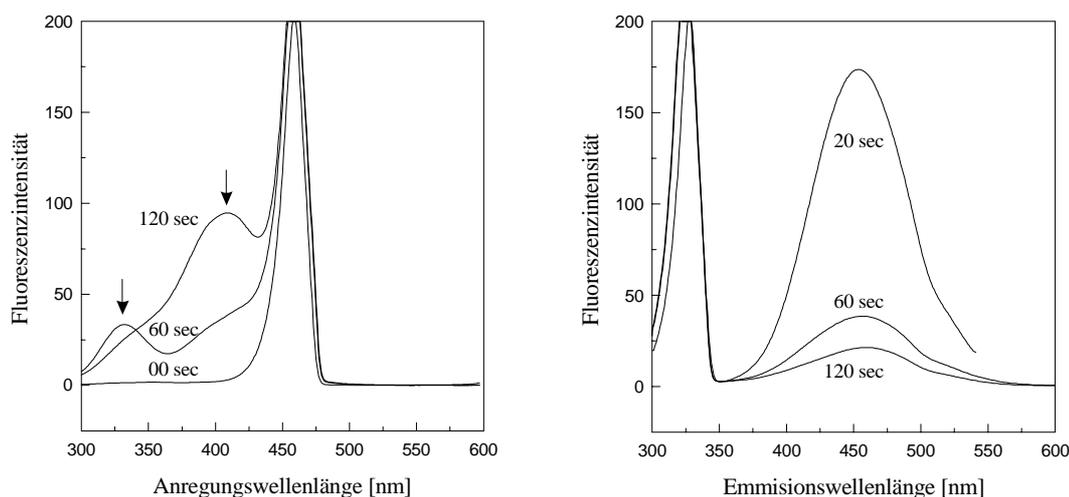


Abb. 4.34: Fluoreszenzspektren der Reaktion von OPA/Ammoniak-Reagenz mit Thiocholin; Links: Anregungsspektrum ($\lambda_{Em} = 450$ nm), Rechts: Emissionsspektrum ($\lambda_{Ex} = 330$ nm). Meßbedingungen wie in Abb. 4.33.

Der bezüglich der Fluoreszenzintensität optimale pH-Wert liegt bei 7.0 und kann ähnlich wie bei der analogen Detektion von Sulfit und Sulfid um jeweils 0.5 pH-Einheiten nach beiden Seiten des Maximums mit einem Empfindlichkeitsverlust < 6 % ausgedehnt werden (Abb. 4.20).

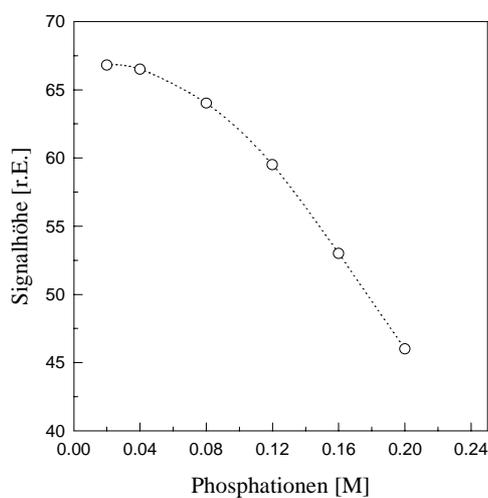


Abb. 4.35: Abhängigkeit des Thiocholin-Fluoreszenzsignals von Phosphationen. $T = 20$ °C, $pH = 7$, $[OPA] = 8$ mM, $[NH_4^+] = 1$ mM, $[Thiocholin] = 100$ μ M.

Die Empfindlichkeit der Detektion nimmt mit abnehmender Phosphationenkonzentration zu, was auf eine Inhibierung der Isoindolbildung zurückgeführt werden kann, da Phosphationen unter diesen Bedingungen einen geringen Quenchingeffekt zeigen. In Gegenwart von 0.1 M Kaliumphosphat erreicht die Signalthöhe 93 % des Wertes, welcher sich aus der Extrapolation der gemessenen Signalthöhen auf $[\text{Phosphat}] = 0$ ergibt (Abb. 4.35).

Beim Variieren der OPA-Konzentration wurde die maximale Fluoreszenzintensität bei $[\text{OPA}] > 8 \text{ mM}$ erreicht (Abb. 4.36). Die Empfindlichkeit in Abhängigkeit von Ammoniumkonzentrationen zeigt eine Sättigung bei $[\text{Ammoniak}] > 40 \text{ mM}$ (Abb. 4.37).

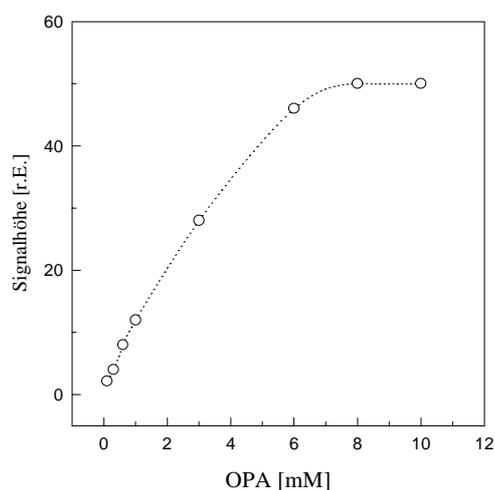


Abb. 4.36: Abhängigkeit des Thiocholin-Fluoreszenzsignals von OPA-Konzentration. $\text{pH} = 7$, $[\text{KP}_i] = 0.1 \text{ M}$, $[\text{NH}_4^+] = 1 \text{ mM}$, $[\text{Thiocholin}] = 100 \text{ }\mu\text{M}$.

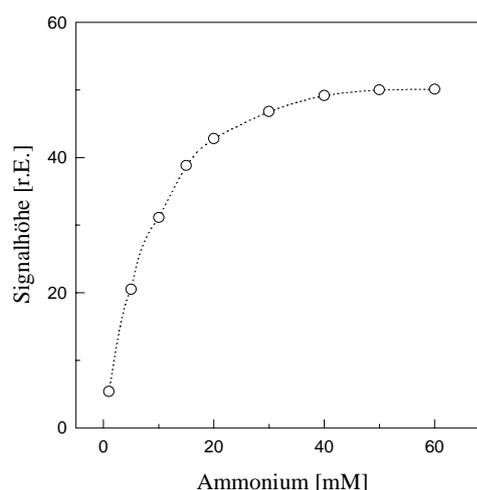


Abb. 4.37: Abhängigkeit des Thiocholin-Fluoreszenzsignals von NH_4^+ -Konzentration. $\text{pH} = 7$, $[\text{KP}_i] = 0.1 \text{ M}$, $[\text{OPA}] = 8 \text{ mM}$, $[\text{Thiocholin}] = 100 \text{ }\mu\text{M}$.

Abb. 4.38 zeigt die doppellogarithmische Auftragung der Signalthöhen gegen die Thiocholinkonzentration. Zwischen $1 \cdot 10^{-4}$ und $1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ist der Kalibriergraph linear. Eine entsprechende Regressionsgerade kann durch folgende Gleichung

$$\lg y = (0.96 \pm 0.04) \cdot \lg ([\text{Thiocholin}]/\mu\text{M}) + (2.69 \pm 0.03) \quad (4.24)$$

mit $r^2 > 0.9998$ ($\alpha = 0.05$, $n = 4$, $m = 10$) beschrieben werden. Das Detektionslimit beträgt $8 \cdot 10^{-8}$ M und die Probenrate 60 Injektionen in der Stunde bei Fließgeschwindigkeiten von 0.5 ml/min für Träger- und Reagenzlösung.

Eine solche Meßempfindlichkeit und Nachweiststärke eröffnet einen leistungsfähigen Zugang zur Messung kleiner Aktivitäten von Acetylcholinesterase.

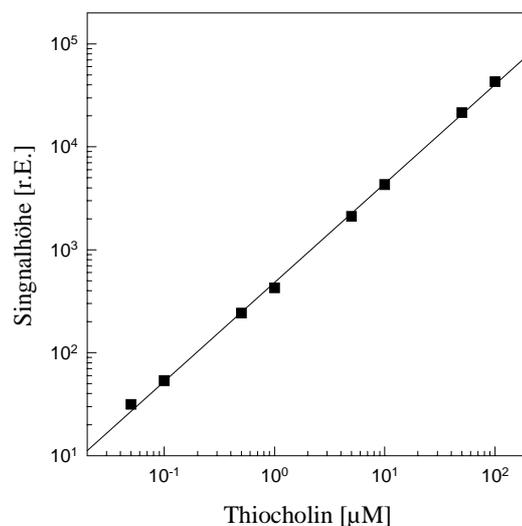


Abb. 4.38:

Doppeltlogarithmische Auftragung der Fluoreszenzsignalhöhen gegen die Thiocholin-konzentration. $\lambda_{\text{Ex}} = 330$ nm, $\lambda_{\text{Em}} = 450$ nm, pH = 7.0, $[\text{KP}_i] = 0.1$ M, $[\text{OPA}] = 8$ mM, $[\text{NH}_4^+] = 40$ mM.

4.3.4 Bestimmung von reduziertem Glutathion

Glutathion (L- γ -Glutamyl-L-Cysteinyl-Glycin) ist ein Tripeptid von universeller zellphysiologischer Bedeutung, das in fast allen tierischen und pflanzlichen Zellen in hoher Konzentration (mM) vorkommt [116]. Wie Cystein fungiert es als biologisches Redoxsystem und gewährleistet den Schutz aktiver SH-Gruppen vieler Enzyme gegenüber Oxidationsprozessen [117]. Glutathion fungiert auch als Coenzym.

Glutathionmangel führt zu einer Reihe von Erkrankungen, wie z.B. Degenerationen im Zentralnervensystem, Myopathien und vermehrte Exkretion von Aminosäuren [118]. Die präzise und empfindliche Detektion von reduziertem Glutathion ist zur Bestimmung des Redoxzustandes im Cytoplasma und bei der

Proteinfaltung von Bedeutung und ermöglicht die Indikation von Enzymaktivitäten, wie z.B. der Glutathionreduktase.

Bei der Bestimmung von Glutathion wurde das für die Bestimmung von Thiocholin optimierte OPA-Reagenz ohne weitere Veränderungen ($\lambda_{\text{Ex}} = 330 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 450 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7.0$, $[\text{KP}_i] = 0.1 \text{ M}$, $[\text{OPA}] = 8 \text{ mM}$, $[\text{NH}_4^+] = 1 \text{ mM}$) eingesetzt. Auch die FIA-Bedingungen wurden beibehalten. Die Fließgeschwindigkeiten von Träger- und Reagenzlösung sind 0.5 ml/min .

In Abb. 4.39 ist die Auftragung der Signalhöhen gegen die Glutathion-Konzentration doppeltlogarithmisch dargestellt. Es wurde eine Linearität im Bereich zwischen $1 \cdot 10^{-4}$ und $1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ erhalten. Eine Regressionsgerade konnte durch die folgende Gleichung

$$\lg y = (0.99 \pm 0.02) \cdot \lg ([\text{GS}_{\text{red}}]/\mu\text{M}) + (2.52 \pm 0.02) \quad (4.25)$$

mit $r^2 > 0.9999$ ($\alpha = 0.05$, $n = 3$, $m = 8$) beschrieben werden. Das Detektionslimit beträgt $6 \cdot 10^{-8} \text{ M}$. Die Probenfrequenz liegt bei 60 in der Stunde.

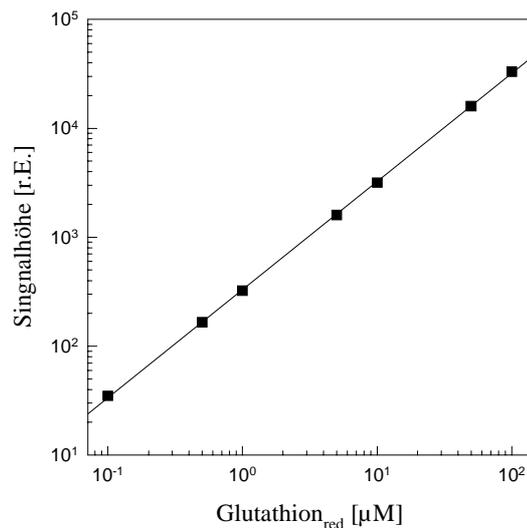


Abb. 4.39:

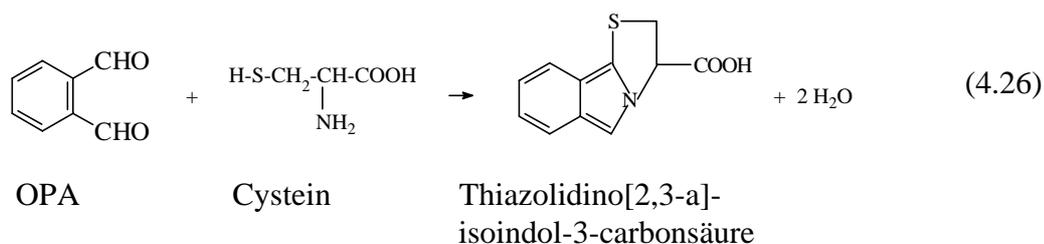
Doppeltlogarithmische Auftragung der Fluoreszenzsignalhöhen gegen die Konzentration des reduzierten Glutathions. $\lambda_{\text{Ex}} = 330 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 450 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7.0$, $[\text{KP}_i] = 0.1 \text{ M}$, $[\text{OPA}] = 8 \text{ mM}$, $[\text{NH}_4^+] = 1 \text{ mM}$.

4.3.5 Bestimmung von Cystein

Cystein (L- α -Amino- β -mercaptopropionsäure) ist eine proteinogene schwefelhaltige Aminosäure. Im Säugerorganismus wird Cystein aus Cystathionin gebildet, welches wiederum aus der essentiellen Aminosäure Methionin hervorgeht [119].

Cystein ist an vielen physiologisch wichtigen Redoxreaktionen beteiligt. Durch Oxidation unter milden Bedingungen geht es unter Bildung einer Disulfidbrücke in Cystin über. Andererseits kann Cystein wichtige katalytische Funktionen erfüllen. Es ist im aktiven Zentrum der Cysteinproteasen [120] und vieler Oxidoreduktasen vorhanden. Aufgrund der Fähigkeit seiner SH-Gruppe, Metallionen zu binden, wird Cystein bei Schwermetallvergiftungen [121] verabreicht.

Cystein läßt sich unter den gleichen Bedingungen wie Thiocholin und Glutathion detektieren. Lineare Kalibriergraphen wurden im Konzentrationsbereich zwischen $1 \cdot 10^{-6}$ M und $1 \cdot 10^{-2}$ M gemessen. Die Empfindlichkeit der Detektion von Cystein beträgt nur 5% der bei der Detektion von Thiocholin und Glutathion unter gleichen Bedingungen gemessenen. Dies kann an N-Acetylcystein durchgeführten Vergleichsmessungen, die zu einer höheren Empfindlichkeit führen, erklärt werden. Offensichtlich verhindert die Acetylierung der α -Aminogruppe von Cystein die unerwünschte Konkurrenzreaktion unter Bildung von Thiazolidino[2,3-a]-isoindol-3-carbonsäure nach Gl. 4.26 [122], die nicht fluoresziert [67,68,71].



Während das untere Detektionslimit $5 \cdot 10^{-6}$ M ist, liegt das obere Limit um 2 Größenordnungen höher als beim Thiocholin. Die doppeltlogarithmische Auftragung des Kalibriergraphen in Abb. 4.40 wird durch Gleichung

$$\lg y = (1.02 \pm 0.02) \cdot \lg ([\text{Cys}]/\mu\text{M}) + (0.14 \pm 0.05) \quad (4.27)$$

mit $r^2 = 0.9997$ ($\alpha = 0.05$, $n = 3$, $m = 8$) beschrieben. Die Bestimmungsfrequenz beträgt bei Fließgeschwindigkeiten von 0.5 ml/min für Träger- und Reagenzlösung 60 Injektionen in der Stunde.

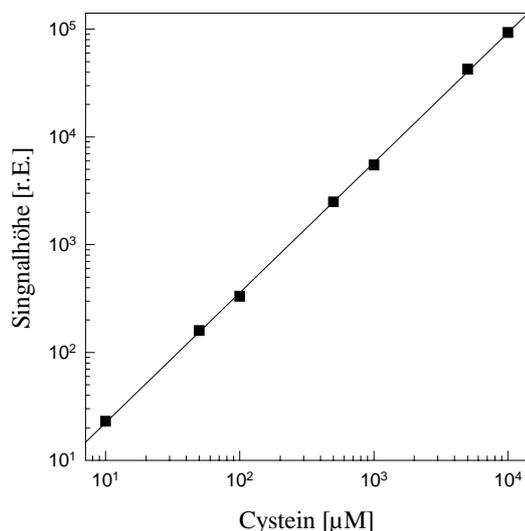


Abb. 4.40:

Doppeltlogarithmische Auftragung der Fluoreszenzsignalhöhen gegen die Cystein-konzentration. $\lambda_{\text{Ex}} = 330$ nm, $\lambda_{\text{Em}} = 450$ nm, pH = 7.0, $[\text{KP}_i] = 0.1$ M, $[\text{OPA}] = 8$ mM, $[\text{NH}_4^+] = 1$ mM.

4.3.6 Selektivität des OPA/ NH_4^+ -Reagenzes

Das beschriebene OPA/ NH_4^+ -Reagenz zur Bestimmung von Thiolverbindungen zeigt eine hohe Selektivität gegenüber Aminosäuren, die keine Thiolgruppen enthalten oder deren Sulfidgruppen blockiert sind, wie z. B. Methionin. Die reduzierte und oxidierte Form von Dithiotreititol DTT (Threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol) sowie Mercaptoethanol zeigen kein Signal. Als Maß für die Selektivität ist das Verhältnis vom Meßsignal des Interferenzen zum Glutathion-Meßsignal

(Tab. 4.7) bei gleicher Konzentration von 1 mM ($S_{(1\text{mM Interf./}1\text{mM GS})} = h_{1\text{mM Interf.}}/h_{1\text{mM GS}}$).

Tab. 4.7: Die Selektivität des OPA/NH₄⁺-Reagenzes gegenüber einigen Thiolverbindungen und Aminosäuren im Vergleich mit Glutathion. DTT: Dithiotreitol.

	$S_{(1\text{mM Interferenz}/1\text{mM GS})}$	[%]
reduziertes Glutathion (GS)	100.00	
Interferenzen:		
oxidiertes Glutathion (GSSG)	0.7455	
Cystin	0.1236	
oxidiertes DTT	0.0202	
reduziertes DTT	0.0509	
Methionin	0.0436	
Alanin	0.0400	
Glutamat	0.0800	
Glutamin	0.0109	
Lysin	0.0720	
Glycin	0.0145	

Die Selektivität des OPA-Reagenzes gegenüber reduziertem Dithiotreitol (DTT) ermöglicht eine neue einfache fluorimetrische Detektion von Cystin und GSSG. Cystin und oxidiertes Glutathion können mittels DTT_{red} stöchiometrisch reduziert werden (Gl. 4.28 und 4.29).



In Abwesenheit von DTT_{red} können reduziertes Glutathion und Cystein gemessen werden. In Gegenwart von DTT_{red} werden die Summen [GS]+[GSSG] und [Cys]+[Cystin] bestimmt. Bei der selektiven Analyse für Mischlösungen von GS/GSSG und Cystein/Cystin sind in der FIA-Anordnung (Abb. 4.41) zwei Injektionsventile (IV1 und IV2) eingebaut. Sie werden zur Bestimmung von GSSG und Cystin simultan eingeschaltet, wobei IV1 20 µl Probenlösung (GSSG oder Cystin) und IV2 100 µl DTT_{red}-Lösung in die identisch zusammengesetzten Trägerlösungen (0.1 M KP_i pH 7.0) einschleusen. Die beiden Vermischungen

werden nach ihrem Zusammentreffen im MS1 unter *stopped flow*-Bedingungen inkubiert. Das resultierende Gemisch wird anschließend mit OPA-Reagenz zur Nachweisreaktion gebracht.

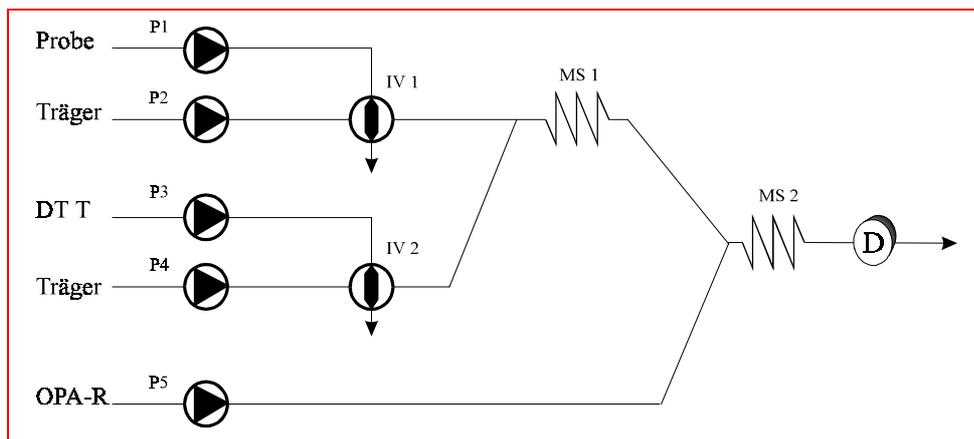


Abb. 4.41: FIA-Anordnung zur Bestimmung von Mischproben aus Glutathion, Cystein und ihren oxidierten Formen.

Es wurde mit 10 mM DTT_{red.}-Lösung und Reaktionszeit von 60 s eine quantitative Umwandlung von GSSG und Cystin erreicht (Abb. 4.42). Dadurch könnten die Verhältnisse $[GSSG]/[GS]$ und $[Cystin]/[Cystein]$ in einer Proteinlösung nach dialytischer Abtrennung oder Ultrafiltration bestimmt werden. Das pH-Optimum von 6.6-7.6 steht für milde Reaktionsbedingungen bei der Detektion. Da die Empfindlichkeit für reduziertes Glutathion um den Faktor 100 über der des Cysteins liegt, kann reduziertes Glutathion mit relativ hoher Selektivität neben Cystein bestimmt werden. Aus der Differenz der gemessenen Konzentrationen $0.5\{([GS]+[GSSG])-[GS]\}$ sowie $0.5\{([Cystein]+[Cystin])-[Cystein]\}$ wird die Konzentration der jeweiligen oxydierten Form berechnet.

In einer neuen Studie von Kok et al. [123] wurde ein OPA-Reagenz mit Glycin als Aminkomponente zur Bestimmung von Captopril, einem Inhibitor des Angiotensin-Converting-Enzyms, modifiziert. Im Vergleich zum vorgeschlagenen Reagenz verursacht DTT als Reduktionsmittel von Captoprildisulfid

Interferenzen. Dagegen könnte das neuentwickelte Reagenz eine Alternative zur selektiven Bestimmung von freiem Captopril und Captoprildisulfid darstellen.

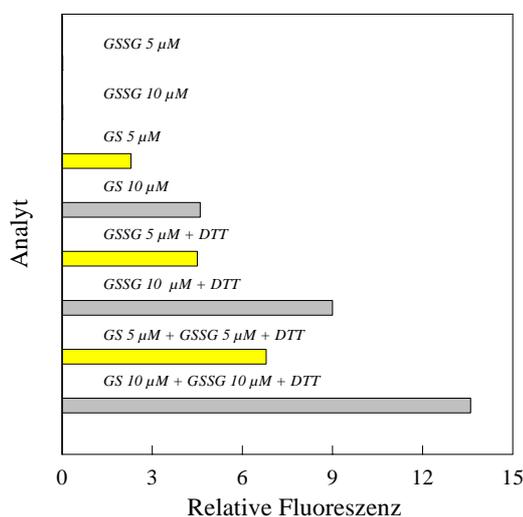


Abb. 4.42:

Graphische Darstellung der Reaktion von OPA mit reduziertem und oxidiertem Glutathion GS bzw. GSSG (je 5 und 10 μ M). $\lambda_{\text{Ex}} = 330$ nm, $\lambda_{\text{Em}} = 450$ nm, pH = 7.0, $[\text{KP}_i] = 0.1$ M, $[\text{OPA}] = 8$ mM, $[\text{NH}_4^+] = 1$ mM, $[\text{DTT}] = 10$ mM.

Aus eigenen Untersuchungen und durchgeführten Experimenten anderer Gruppen [124] folgt, daß neben sterischen Faktoren eine Balance zwischen Nucleophilie und Elektrophilie der reduzierenden Schwefelverbindung bzw. der Aminogruppe für die schnelle Bildung der fluoreszierenden Isoindolderivate und deren ausreichende Stabilität eingestellt werden muß. So können geladene polare Verbindungen, wie z.B. HS^- , HSO_3^- , reduziertes Glutathion, Thiocholin, Coenzym A und Coenzym M in Anwesenheit von DTT_{red} mit hoher Empfindlichkeit und Selektivität mittels OPA-Reagenz detektiert werden.

Das Protein BSA liefert bei der Mischung mit OPA-Reagenz ein hohes Signal, welches nur um 12 % abfällt, wenn ein 1000-facher Überschuß an Iodacetamid zugegeben wird (Abb. 4.43).

Dieses blockiert bzw. methyliert die Thiolgruppen im Proteinmolekül. Es ist zu vermuten, daß bei der Bildung von fluoreszierenden Isoindolderivaten in Proteinen nicht nur Thiolgruppen beteiligt sind, sondern auch andere nucleophile Zentren [125]. Hinzu kommt die Möglichkeit von Ringbildungen. Das bedeutet, daß bei der Analyse realer proteinhaltiger Probenlösungen ein Ultrafiltrations-

schritt, eine chromatographische Trennung oder eine Proteinfällung vorgeschaltet werden muß, um Glutathion, Cystein und Cystin selektiv bestimmen zu können.

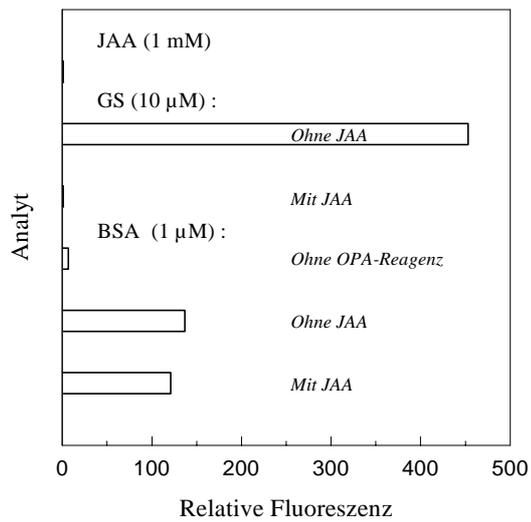


Abb. 4.43:

Graphische Darstellung der Reaktion von OPA-Reagenz mit Glutathion, methyliertem GS, BSA und methyliertem BSA. JAA: Iodacetamid, $\lambda_{\text{Ex}} = 330 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 450 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7.0$, $[\text{KP}_i] = 0.1 \text{ M}$, $[\text{OPA}] = 8 \text{ mM}$, $[\text{NH}_4^+] = 1 \text{ mM}$.

4.4 FIA-Bestimmung von Enzyminhibitoren

Zur Detektion von Metallionen und Pestiziden wurde die Inhibierung von Urease und Acetylcholinesterase (Enzymhemmtest) gemessen. Während bei Urease die Aktivität durch die Reaktion von OPA-Reagenz mit dem freigesetzten Ammoniak ermittelt wird, wird zur Bestimmung der Acetylcholinesteraseaktivität das nichtnatürliche Substrat Acetylthiocholin eingesetzt, dessen Zerfallsprodukt Thiocholin mit OPA reagiert.

Die Bestimmung von Metallionen und Pestiziden wurde mittels der FIA-Anordnung Abb. 3.10 mit eingebauter Inkubationszelle (Abschn. 3.2.5) durchgeführt.

4.4.1 Bestimmung von Ureaseinhibitoren

Die Urease ist eine Amidohydrolase und ein in Pflanzen, Bakterien, Algen und anderen Mikroorganismen weit verbreitetes Enzym [126]. Ihre Aktivität wird stark durch Metallkationen [127], metallorganische Schwermetallverbindungen [128] und einige Pestizide [129] inhibiert.

Auf Grund der Sensibilität der Urease auch gegenüber Eisenionen wurde nicht mit an Magnetpartikeln immobilisiertem Enzym gearbeitet.

Urease aus Sojabohnen (Glycerollösung; SIGMA; 680 U/ml; etwa 11.5 mg Protein/ml) wurde für die Hemmtest-Untersuchungen verwendet. Die Aktivität der Urease wurde unter FIA-Bedingungen überprüft. Sie betrug 720 U/ml. Da Phosphationen die Ureaseaktivität negativ beeinflussen (Abb. 4.44), wurde die Phosphatkonzentration auf 0.02 M minimiert.

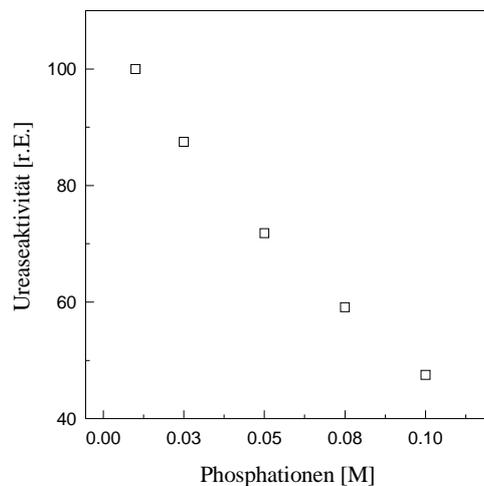


Abb. 4.44: Der Hemmeffekt von Phosphationen auf die Ureaseaktivität.

Charakterisierung und Bestimmung der Ureaseaktivität

Das meßtechnische Potential der FIA für enzymkinetische Untersuchungen wurde bisher kaum betrachtet [130]. Die genau einstellbaren Verweilzeiten ermöglichen bei entsprechender Thermostatierung die präzise Bestimmung kinetischer Konstanten [131]. Die Charakterisierung und Bestimmung von Enzymaktivitäten zeichnet sich durch einfache Durchführung und hohe Präzision aus [132].

Werden entsprechend Abb. 3.10 Substratlösungen verschiedener Konzentration zugegeben und in der Reaktionskammer mit der Enzymlösung vermischt, starten die enzymatischen Bestimmungsreaktionen. Bei dieser FIA-Konfiguration ist die mehrmalige Injektion der Reaktionsmischung zeitlich zu protokollieren oder aufzuzeichnen und damit der zeitliche Abstand zwischen den verschiedenen Messungen zu definieren. Nach Kalibrierung der FIA bezüglich der Detektion des Reaktionsproduktes über die Messung der Peakhöhe gegen die Produktkonzentration wird die v/S -Charakteristik erstellt sowie K_M - und V_{max} -Werte berechnet. Der K_M -Wert für Harnstoff wurde zu 8.3 mM ermittelt (Abb. 4.45).

Die erwähnte FIA-Anordnung eignet sich auch zur schnellen und präzisen Bestimmung kleiner Enzymaktivitäten. Zur konstanten Substratkonzentration (Harnstoff) von 50 mM ($S > K_M$) werden verschiedene Enzymkonzentrationen

zugegeben. Die Empfindlichkeit der Detektion kann durch die Verlängerung oder Verkürzung der Inkubationszeit variiert werden. Abb. 4.46 zeigt einen Kalibriergraphen der Ureaseaktivität. Das Detektionslimit liegt bei einminütiger Inkubation um 10 mU/ml. Der lineare Bereich liegt zwischen 0.02 - 2.0 U/ml.

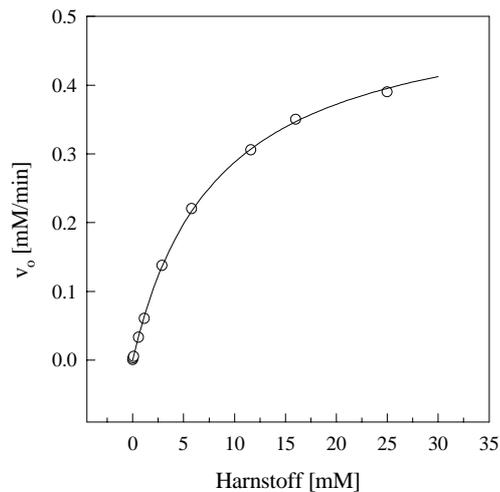


Abb. 4.45: v/S -Charakteristik der Urease. $K_M = 8.3$ mM, $T = 20$ °C, $pH = 7.0$, $[K_P] = 0.02$ M.

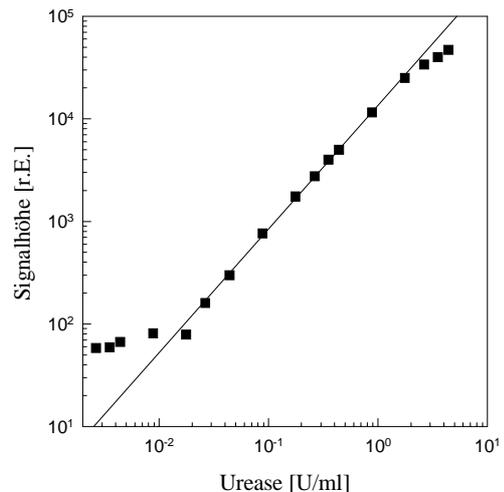


Abb. 4.46: Kalibriergraph der Ureaseaktivität. $[Harnstoff] = 50$ mM, Inkubationszeit = 1 min.

Mit diesem FIA-Prinzip könnten weitere biochemisch und klinisch interessante Enzymeaktivitäten, wie die in Abschn. 4.1 genannten, die die selektive Substratumsetzung von stickstoffhaltigen Verbindungen unter Ammoniakfreisetzung katalysieren, bestimmt werden.

Ähnliche OPA-Reagenzien können zur Bestimmung anderer Enzymaktivitäten, die in der klinischen Biochemie eine Rolle spielen, wie z.B. von Cysteinsulfinsäure-Decarboxylase [133], die das primäre Amin Hypotaurin freisetzt, und von Argininosuccinatlyase [99], die die Freisetzung von Arginin und Fumarat katalysiert, eingesetzt werden.

4.4.1.1 Bestimmung von Schwermetallionen

Auf der Basis photometrischer [134], potentiometrischer [60] und amperometrischer Methoden [129] wurde das durch Urease freigesetzte Ammoniak nach der Inkubation detektiert. Narinesingh et al. [135] berichteten von der fluorimetrischen Bestimmung von Quecksilber und Silber mit Hilfe des klassischen OPA-Reagenzes, welches organisches Lösungsmittel enthält. Im Vergleich zu dieser Arbeit liegt hier das OPA-Reagenz im wäßrigen System vor. Die hohe Ammoniakselektivität gegenüber Harnstoff ermöglicht den Verzicht auf die Gasdialysezelle bei der Enzyminhibierungsanalyse.

Das Ziel war die automatische Bestimmung des Inhibierungsgrades. Für unsere Untersuchungen wurden Cu^{2+} und Ag^+ ausgewählt.

Bei Substratkonzentrationen von 0.1 mM Harnstoff wurde eine Inkubationszeit von 1 min eingestellt. Die Anwendung höherer Harnstoffkonzentrationen wurde vermieden, um die Gefahr einer Produktinhibierung [136] zu umgehen. Die Proteinkonzentration lag bei etwa $1 \cdot 10^{-8}$ M und deren Vorinkubation mit Inhibitorlösung dauerte 30 s. Eine Verbesserung des Hemmeffekts durch Verlängerung der Inkubationszeit konnte nicht ermittelt werden [135].

Für den **Hemmtest der Urease** wurde die FIA-Anordnung, Abb. 3.10 angewendet. 50 μl Ureaselösung werden über P1 und bei Position 1 des MWV in die RK gepumpt. 250 μl Probelösung (Inhibitor) werden über MWV-Position 2 zugegeben und 30 s unter Rühren inkubiert. 100 μl Substratlösung werden anschließend über die entsprechende Position des MWV zugegeben und für 1 min unter Rühren inkubiert. Nach der Inkubationszeit der enzymatischen Reaktion wird auf Weg a umgeschaltet. Es werden dreimal je 20 μl Produktlösung nacheinander über das Injektionsventil in die Trägerlösung injiziert. Abschließend wird die Anlage gewaschen. Der zeitliche Ablauf des FIA-Verfahrens zur Inhibitorbestimmung für eine Probe ist in Abb. 4.47 schematisch dargestellt.

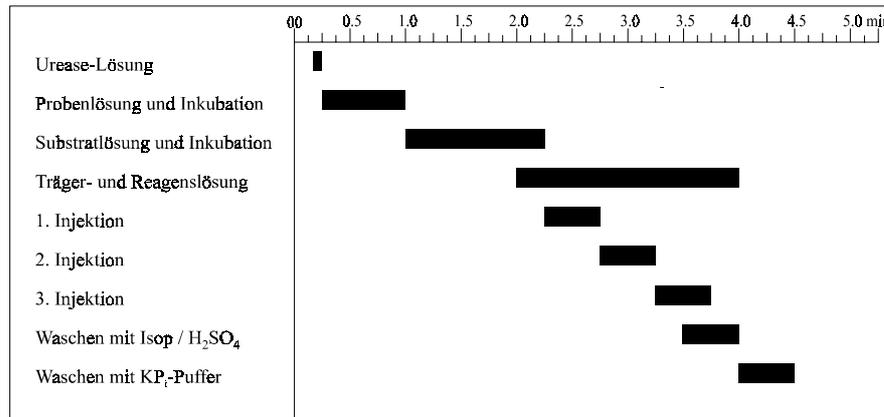


Abb. 4.47: Zeitlicher Verlauf der automatisierten Urease-Hemmtest-FIA. Isop: Isopropanol, KP_i: Kaliumphosphatpuffer.

Die Abb. 4.48 und 4.49 zeigen die Kalibriergraphen von Ag⁺ bzw. Cu²⁺. Bei einer signifikanten Inhibierung von 5% liegt das Detektionslimit für Ag⁺ bei 0,18 µg/l (1,7·10⁻⁹ M) und für Cu²⁺ bei 2,2 µg/l (3,5·10⁻⁸ M). Lineare Bestimmungsbereiche sind zwischen 0,2-1,2 und 2,5-25 µg/l für Ag⁺ bzw. Cu²⁺. Es ist festzustellen, daß Silberionen die Ureaseaktivität 12-fach stärker als Kupferionen hemmen. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeiten [137] überein.

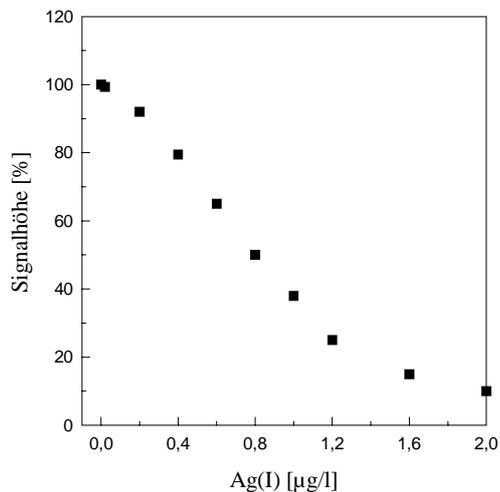


Abb. 4.48: Kalibriergraph für Silberionen durch Hemmung der Urease. Inkubation mit Probe und Substrat = 30 bzw. 60 s, Enzym = 1·10⁻⁸ M, Harnstoff = 0,1 mM.

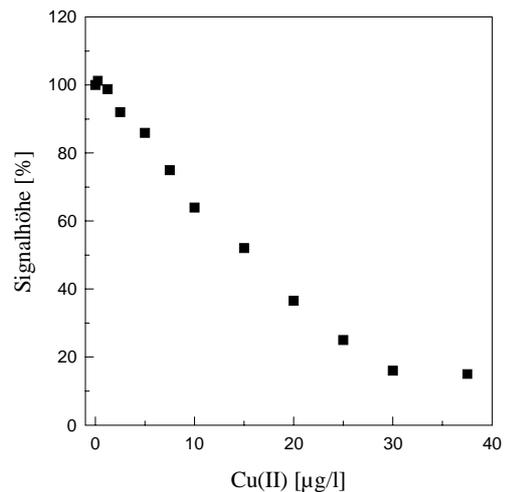


Abb. 4.49: Kalibriergraph für Kupferionen durch Hemmung der Urease. Meßbedingungen wie in Abb. 4.48.

4.4.1.2 Bestimmung von Pestiziden

Einige Pestizide, die laut Literaturangaben [138-142] einen Hemmeffekt auf die Bodenurease (Urease von Bodenbakterien) haben, wurden unter den in Abschn. 4.4.1.1 beschriebenen FIA-Bedingungen untersucht (Tab. 4.8).

Die Enzymaktivität der Urease wurde durch diese Pestizide kaum beeinflusst. Trotz der verlängerten Inkubationszeit auf 2 Stunden zeigten manche der Pestizide, wie Atrazin, Aldicarb und Carbofuran keine Hemmwirkung [143,144]. Bei anderen, wie 2,4-D und Linuron wurde eine größere Menge (Tab. 4.8) gebraucht, um einen Effekt zu erzielen. Bei Carbofuran findet man sogar eine leichte Erhöhung der Ureaseaktivität im Bereich kleiner Konzentrationen. Tab. 4.8 zeigt die untersuchten Pestizide und deren Mindestkonzentration, die eine Inhibierung der Urease hervorrufen. Hier wurde zusätzlich die mikrobielle Urease aus *Bacillus pasteurii* (Typ X; 200 U/mg; SIGMA) untersucht, wobei sich keinerlei Inhibierung zeigte.

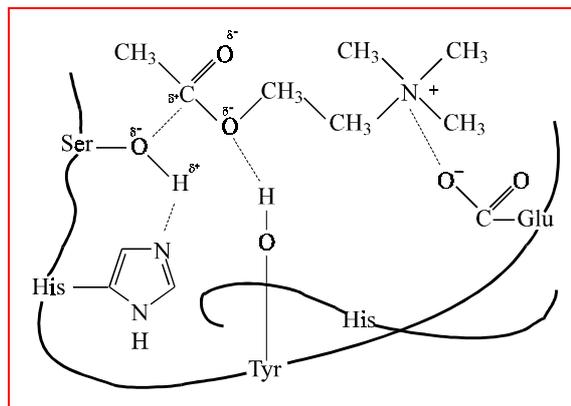
Tabelle. 4.8: Effekt einiger Pestizide auf die Sojabohnen-Urease. Inkubationszeit von 2 Stunden.

Pestizid	geringste Konzentration, die eine Hemmung zur Folge hat [mg/l]
2,4-D	über 600
Linuron	über 800
Atrazin	keine Hemmung bis 1000
Aldicarb	keine Hemmung bis 1000
Carbofuran	keine Hemmung bis 1000

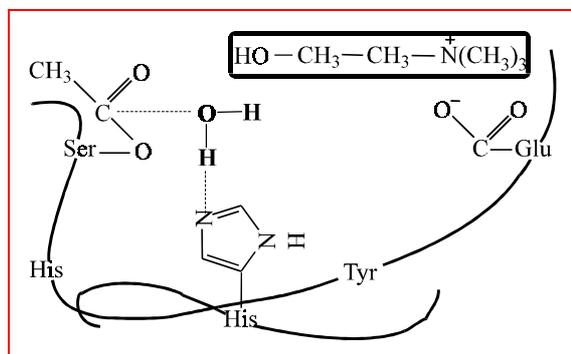
4.4.2 Bestimmung von Acetylcholinesteraseinhibitoren

Die spezifische Reaktion der Acetylcholinesterase ist die Hydrolyse des Acetylcholins, das in den Nervengewebe als Neurotransmitter fungiert (Gl. 4.30).

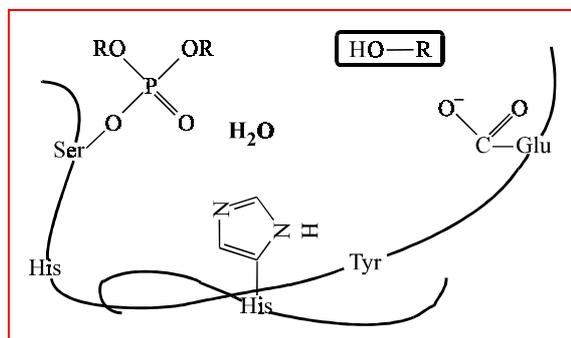




Das aktive Zentrum mit dem nativen Enzymsubstrat. Die Hydroxylgruppe vom Serin wird durch die Imidazolgruppe des Histidins aktiviert. Serin wird acetyliert und Cholin abgespalten.



Die rasche Deacetylierung des Enzyms mit Beteiligung von einem zweiten Histidin und einem Wassermolekül.



Serin greift in ähnlicher Weise die Organophosphorsäureester an, wobei sich das phosphorylierte Enzym langsam regeneriert.

Abb. 4.50: Mechanismus der Acetylcholinesterase nach KRUPKE [145]. Erläuterung in Abb.

Im ersten Schritt wird das Enzym acetyliert und das freie Cholin kann nun die Enzymoberfläche leicht verlassen. Die schwache Esterbindung wird daraufhin rasch hydrolysiert (Abb. 4.50) [146].

Insektizide vom Phosphorsäureester- und Carbamattyp haben strukturelle Ähnlichkeit mit dem nativen Substrat und binden in ähnlicher Weise an die Acetylcholinesterase, wobei das phosphorylierte oder carbamylierte Serin im aktiven Zentrum des Enzyms langsamer als das acetylierte hydrolysiert wird. Die Hydrolyse der Serincarbaminsäureester erfolgt wesentlich langsamer als die von

Acetylcholin, jedoch deutlich rascher als die des entsprechenden Phosphorsäureesters (Abb. 4.50) [147].

Der Inhibierungsmechanismus ist in An- und Abwesenheit des Substrates unterschiedlich. Während Carbamatverbindungen in Gegenwart von Acetylcholin um das aktive Zentrum konkurrieren (kompetitive Hemmung), bilden sie in Abwesenheit von Substrat (Präinkubation mit Inhibitor) einen *dead end*-Komplex bestehend aus Carbamatrest und AChE (nichtkompetitive Hemmung). Organophosphatverbindungen bewirken in beiden Fällen eine gemischte Inhibierung, die zwischen nichtkompetitiv und unkompetitiv liegt [148].

Zur Bestimmung von Insektiziden beider Gruppen, die eine breite Anwendung vor allem in der Landwirtschaft finden, wurden enzymatisch-amperometrische [148,149], enzymatisch-potentiometrische [150,151] und enzymatisch-photometrische Methoden [152,153] entwickelt. Eine Verbesserung der automatischen Probenahme und On-Line Überwachung kann durch die FIA verwirklicht werden [149,152].

Ein Ziel der Arbeiten war es auch, die photometrische Detektion von Thiocholin mit Ellman's Reagenz (5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure), die trotz Referenz als Standardmethode [154] keine ausreichende Stabilität zeigt, durch das neuentwickelte und stabiler arbeitende fluorimetrische Detektionsverfahren zu ersetzen.

Zur Bestimmung von Phosphorsäureester- und Carbamatverbindungen wurde die Acetylcholinesterase AChE aus *Electric Eel* (EC 3.1.1.7; Typ VI-S; 270 U/mg) an Magnetpartikeln immobilisiert (Abschn. 3.4.2). Der Immobilisierungsgrad lag bei 87 % (4.12 mg AChE/100 mg BioMag in einer Suspensionlösung von 2 ml). Die Stammlösung der Immobilisatsuspension wurde durch turbidometrische Messung [155] standardisiert. Im 0.1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.2 und bei der Wellenlänge 610 nm wurden die Stammsuspensionen mit einer Trübung von 0.25 Absorptionseinheiten hergestellt. Die Enzymkonzentration lag

bei $7 \cdot 10^{-9}$ M. Die Immobilisat-Stammlösung wurde vor der Verwendung 1:10 verdünnt. Das Immobilisat wies eine Stabilität von über 8 Monaten bei 4°C im 0.1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.2 auf, wobei gelöste Acetylcholinesterase unter diesen Bedingungen sehr schnell, innerhalb von 2 Tagen völlig deaktiviert wird. Als Substrat wurde Acetylthiocholinhydrochlorid im Kaliumphosphatpuffer, pH 7.2 eingesetzt. Das bei der enzymatischen Hydrolyse entstehende Produkt Thiocholin wurde, wie in Abschn. 4.3.3 beschrieben, detektiert. Unter FIA-Bedingungen beträgt der scheinbare K_M -Wert für Acetylthiocholin 0.127 mM (Abb. 4.51). Die Aktivität des Immobilisates lag bei 236 U/mg.

Insektizide sind meistens hydrophobe Verbindungen, die in Wasser schwerlöslich sind. Diesbezüglich und bei Kombination mit der Festphasenextraktion (siehe Abschn. 4.5.4) ist es sinnvoll, die Aktivität der immobilisierten AChE im organischen Lösungsmittel Methanol zu untersuchen. Bis zu einer Konzentration von 25% v/v Methanol behält das Enzym seine volle Aktivität (Abb. 4.52). Eine Erhöhung der Aktivität um 20% konnte bei einem Methanolgehalt von 10% beobachtet werden.

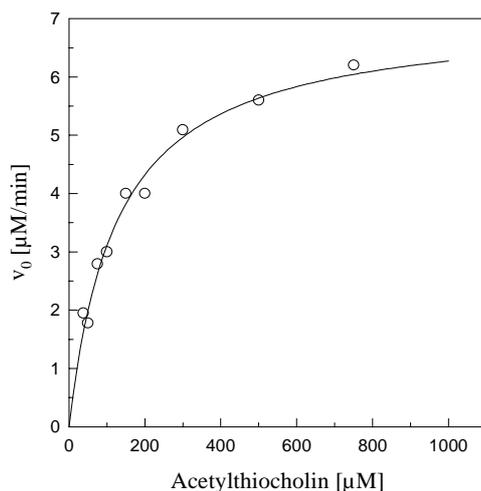


Abb. 4.51: v/S-Charakteristik der immobilisierten Acetylcholinesterase. $K_M = 1.27 \cdot 10^{-4}$ M, pH = 7.2, $[K_P] = 0.1$ M.

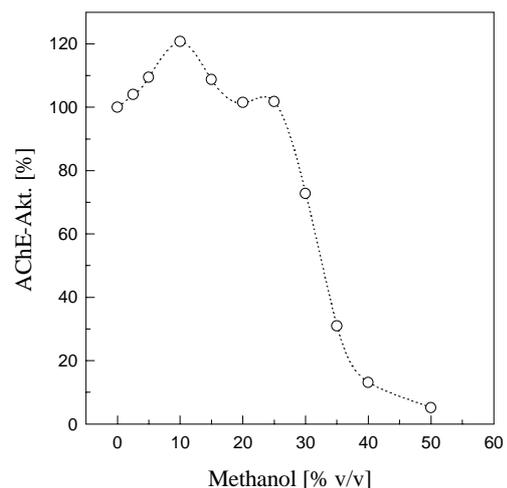


Abb. 4.52: Aktivitätsverhalten der AChE beim Variieren des Methanolgehaltes. Inkubationszeit für Substrat = 2.5 min.

Das entwickelte OPA/NH₄⁺-Reagenz und das vorgeschlagene FIA-Prinzip könnten zur automatischen Bestimmung anderer relevanter Enzymaktivitäten eingesetzt werden. So kann z.B. die Glutathionreduktase-Aktivität über das Produkt Glutathion bestimmt werden. Wie in Abschn. 4.3.4. und 4.3.6 gezeigt wurde, reagiert Glutathion selektiv mit dem Reagenz in Anwesenheit der oxidierten Form.

Für den **Acetylcholinesterase-Hemmtest** wurde die in Abb. 3.10 dargestellte FIA-Anordnung verwendet. 100 µl BioMag-AChE-Suspension werden über Pumpe 1 (P1) bei Position 1 des Mehrwegventils (MWV) in die Reaktionskammer (RK) gefördert. Es folgt die magnetische Separation und das Leeren des Überstandes mittels der zweiten Pumpe (P2) bei der entsprechenden Umschaltposition des Magnetventils (MV) über Weg b. 300 µl Probelösung (Inhibitor) werden über MWV-Position (2) in die Reaktionskammer (RK) gepumpt und für die gewünschte Zeit unter Rühren inkubiert. Anschließend werden die Magnetpartikel magnetisch separiert und fixiert und die flüssige Fraktion über Weg b abgesaugt. 300 µl Substratlösung werden über MWV-Position (3) in die RK eingebracht und für 1 min unter Rühren inkubiert. Nach der Inkubationszeit der enzymatischen Reaktion werden die BioMag-AChE-Partikel erneut magnetisch zurückgehalten. Danach wird auf Weg a umgeschaltet. Es werden dreimal je 20 µl der resultierenden Produktlösung nacheinander über das Injektionsventil in die Trägerlösung injiziert. Die Anlage wird aufeinanderfolgend mit Schwefelsäure, Isopropanol und Kaliumphosphatpuffer gewaschen. Schwefelsäure dient der Ab- und Auflösung der Magnetpartikel. Isopropanol ist für das vollständige Ausspülen der hydrophoben Analyte notwendig.

Der Hemmeffekt von Carbofuran und Paraoxondiethyl wurde in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht. Bei Inhibitorkonzentrationen von jeweils 10 µg/l (Carbofuran = $4.5 \cdot 10^{-8}$ M, Paraoxon = $3.5 \cdot 10^{-8}$ M) wird die vollständige Inhibierung von $7 \cdot 10^{-10}$ M Acetylcholinesterase im Falle des Carbofurans nach 10

min, im Falle des Paraoxons nach 25 min erreicht (Abb. 4.53). Die Substratkonzentration beträgt 0.4 mM.

Im Vergleich zu Arbeiten mit Biosensoren [149] oder Bioreaktoren [152] kann eine verbesserte Vermischung durch eine verstärkte, reproduzierte Konvektion erreicht werden, woraus eine Verkürzung der Inkubationszeiten resultiert.

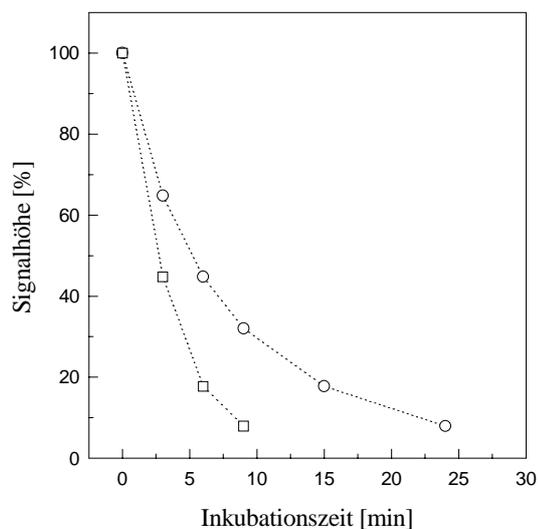


Abb. 4.53:

Die Abhängigkeit der AChE-Hemmung von der Inkubationszeit bei Carbofuran (□, $4.5 \cdot 10^{-8} \text{M}$) und Paraoxon (○, $3.5 \cdot 10^{-8} \text{M}$). $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7.2$, $[\text{KP}_i] = 0.1 \text{ M}$, $[\text{Enzym}] = 7 \cdot 10^{-10} \text{ M}$, $[\text{Substrat}] = 0.4 \text{ mM}$.

In weiteren Versuchen zur Bestimmung der Insektizide wurden die Inhibitoren 2.5 min lang mit dem Enzym inkubiert, um einen schnellen Test durchzuführen. Unter diesen Bedingungen inhibieren 10 $\mu\text{g/l}$ Carbofuran etwa 25% und die gleiche Konzentration von Paraoxon über 15% der Enzymaktivität.

Der zeitliche Ablauf der automatisierten Hemmtest-FIA für einen Meßwert ist in Abb. 4.54 graphisch dargestellt.

Die Abb. 4.55 und 4.56 zeigen die beiden Kalibriergraphen von Carbofuran bzw. Paraoxondiethyl. Bei einer signifikanten Inhibierung von 95% liegt das Detektionslimit für Carbofuran bei 3 $\mu\text{g/l}$ ($1.35 \cdot 10^{-8} \text{M}$) und für Paraoxon bei 5 $\mu\text{g/l}$ ($1.75 \cdot 10^{-8} \text{M}$). Durch Verlängerung der Inkubationszeit (Abb. 4.53) kann das Detektionslimit um den Faktor 5 abgesenkt werden. Lineare Bestimmungsbereiche sind zwischen 3-25 und 5-25 $\mu\text{g/l}$ für Carbofuran bzw. Paraoxon ermittelt worden.

Es wurde von Burstein et. al. [156] beobachtet, daß der Inhibierungseffekt von Paraoxon in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und dessen Konzentration unterschiedlich ist. So wurde in 5% Cyclohexan eine maximale Erhöhung der Empfindlichkeit des Hemmtests um den Faktor 500 gefunden.

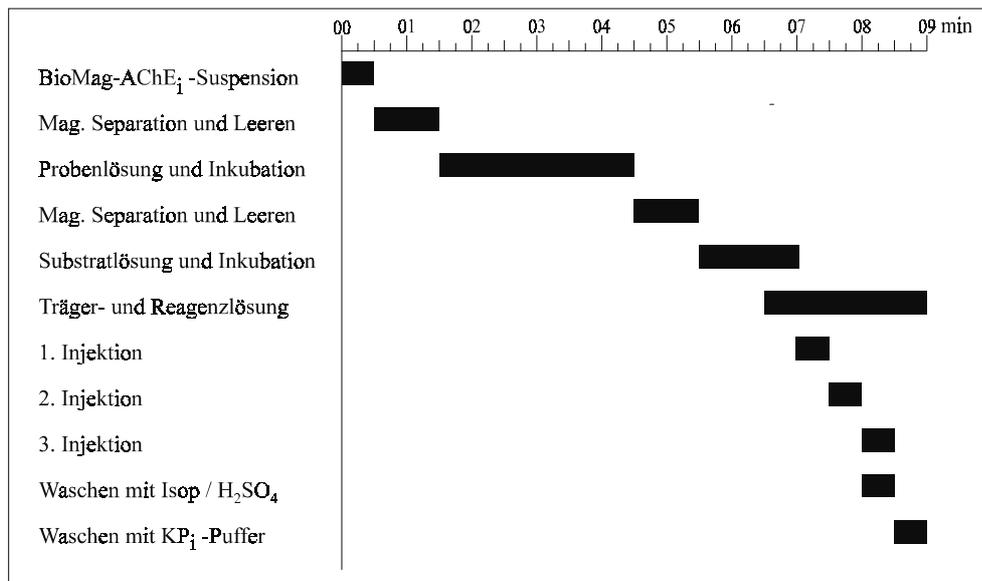


Abb. 4.54: Zeitlicher Verlauf der automatisierten AChE-Hemmtest-FIA.

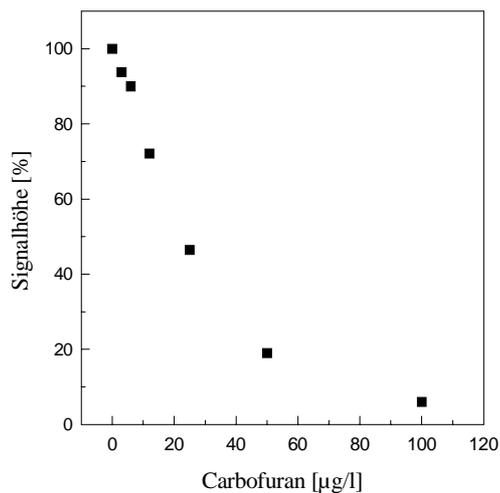


Abb. 4.55: Kalibriergraph für Carbofuran durch die Hemmung der AChE.

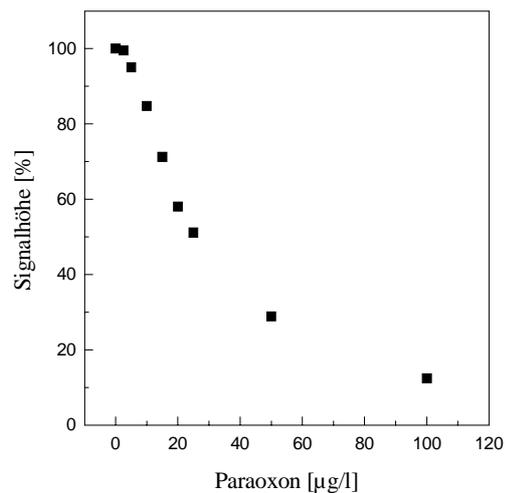


Abb. 4.56: Kalibriergraph für Paraoxon-diethyl durch die Hemmung der AChE.

Das Immobilisat wurde nicht regeneriert, so daß die Abnahme der Enzymaktivität und die Reproduzierbarkeit der Regenerierung keinen Einfluß auf die Meßergebnisse haben. Bei Anwendung von 100 µl Immobilisatsuspension für jede Bestimmung genügen 5 mg immobilisierte Acetylcholinesterase für über 70000 Bestimmungen.

4.5 Immuno-FIA

Ausgehend von der FIA-Anordnung, Abb. 3.10 wurden vollautomatische Immunoassays zur Bestimmung von Pestiziden, Atrazin, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), Metolachlor und Carbofuran ausgearbeitet.

Die Immuno-FIA beruht auf dem Prinzip des kompetitiven *enzyme linked immunosorbent assays* (ELISA). Die zu untersuchende Probe und das Enzymhaptenkonjugat (Meerrettichperoxidase) konkurrieren um die Bindungsstellen der an den paramagnetischen Magnetpartikeln gebundenen Antikörper. Am Ende der Inkubation wird ein magnetisches Feld angewendet, um die Magnetpartikel zurückzuhalten und die überschüssigen Reagenzien zu entfernen. Danach wird gewaschen. Anschließend erfolgt die enzymatische Indikatorreaktion.

4.5.1 Voruntersuchungen

Kinetik der immunochemischen Bestimmungsreaktion

Die Inkubationszeit der immunologischen Reaktion sollte unter FIA-Bedingungen (siehe Abschn. 4.5.2) untersucht werden. Durch gleichmäßiges Rühren wird die Homogenität der Magnetpartikel, an denen die Antikörper gebunden sind, gewährleistet. Dabei wurde eine erhebliche Verkürzung der notwendigen Inkubationszeit um die Hälfte gegenüber der herkömmlichen Testmethode [157] erreicht. Während in der Beschreibung des Vergleichsverfahrens für die Inkubation der Immunoreaktion 30 Minuten angegeben sind, zeigt Abb. 4.57, daß die immunologische Reaktion in der Reaktionskammer in 15 min nahezu abgeschlossen ist. Die Magnetpartikel wurden beim Vergleichsverfahren in den Teströhrchen für 1-2 Sekunden geschüttelt und stehengelassen. Bei der Durchführung der nachstehenden Immuno-FIA wurde 10 min inkubiert, da in dieser Zeit der relative

Signalpeak für die niedrigste 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-Konzentration von 1.0 µg/l etwa 94 % der erreichbaren Intensität ausmachte.

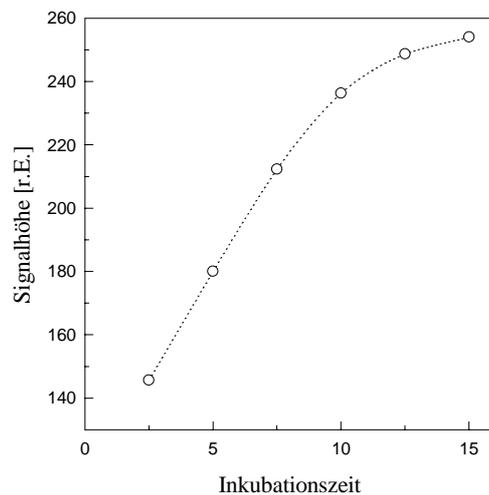


Abb.4.57:

Die Abhängigkeit des Meßsignals der Immuno-FIA von der Inkubationszeit der Immunoreaktion. Immunoassay von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure bei T = 20 °C.

Enzymatische Indikatorreaktion

Die Inkubationszeit der enzymatischen Reaktion wurde unter den gleichen FIA-Bedingungen nach Abscheidung der überschüssigen Hapten- und Haptenmarkerkonjugatmoleküle zwischen 5 und 20 min variiert.

Als Marker ist die Meerrettichperoxidase an den Haptenmolekülen kovalent gebunden. Das Substrat der Meerrettichperoxidase bestand aus den beiden Lösungen 1.7 mM 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und 0.02 % Wasserstoffperoxid (H₂O₂) [157], die erst in-situ vermischt wurden. Bereits nach 8 Minuten zeigte sich bei konzentrierten Haptenproben, der höchsten 2,4-Dichlorphenoxyessigsäurekonzentration von 50 µg/l, eine Färbung, die eine quantitative Auswertung ermöglicht. Dabei wurden um 20% höhere Absorptionswerte erreicht als bei 20-minütiger Inkubation unter den herkömmlichen Testbedingungen. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen.

4.5.2 Immuno-FIA im wäßrigen Medium

Zur Bestimmung von Atrazin, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, Metolachlor und Carbofuran im wäßrigen Medium wurden die entsprechenden polyklonalen Antikörper aus Kaninchen (RaPID Assays, OMICRON [157]) verwendet.

Ablauf der Immuno-FIA

200 µl BioMag-Antikörper-Suspension werden über P1 in die Reaktionskammer RK gefördert. Über das 6-Wegeventil MWV werden nacheinander je 100 µl Proben- und Enzymhaptenkonjugat-Lösung in die RK zugegeben. Die immunologische Reaktion läuft 10 min unter Rühren ab. Anschließend wird der Elektromagnet angeschaltet, um die Magnetpartikel abzutrennen und an der Kammerwand zu fixieren und die flüssige Fraktion über Kanal b abgesaugt. Es folgen 2 Waschschrirte mit 0.1 M Trispuffer pH 7.2, deren Waschlauge über Kanal b gesaugt wird. Die beiden Substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und H₂O₂ wurden nacheinander im Volumenverhältnis 1:1 in die RK mit einem Gesamtvolumen vom 200 µl dosiert. Durch Rührung werden die magnetischen Partikel nach Abschaltung des Elektromagneten resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 8 min werden 100 µl 3 M Schwefelsäure zugegeben und 30 Sekunden weitergerührt.

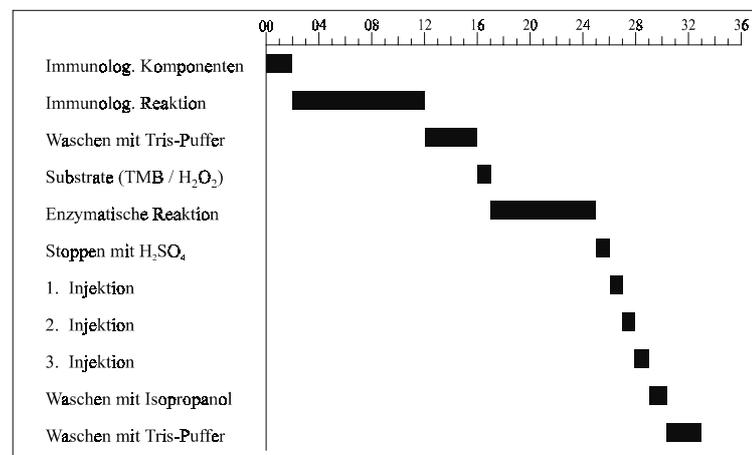


Abb. 4.58: Zeitlicher Verlauf der automatisierten Immuno-FIA.

Nach dem Umschalten auf Kanal a werden dreimal je 20 µl Reaktionsmischung nacheinander über das Injektionsventil in die Trägerlösung (Wasser) injiziert. Es folgt das Spülen mit Isopropanol und die Konditionierung mit dem Trispuffer. Der zeitliche Ablauf der automatisierten Immuno-FIA ist in Abb. 4.58 graphisch dargestellt.

Unter den oben angegebenen FIA-Bedingungen wurden für die 4 Pestizide Kalibriergraphen in den in Tab. 4.9 genannten Konzentrationsbereichen aufgenommen.

Tab. 4.9: Die Standardlösungen der Immunoassays für die 4 Pestizide.

Pestizid	Standardlösung [µg/l]				
	0.0	0.1	1.0	3.0	5.0
Atrazin	0.0	0.1	1.0	3.0	5.0
2,4-D	0.0	1.0	10	30	50
Metolachlor	0.0	0.1	1.0	3.0	5.0
Carbofuran	0.0	0.1	1.0	3.0	5.0

Nach Subtraktion des Hintergrundsignals von den Meßsignalen wurden die Meßdaten durch die Signalhöhe der Nullprobe dividiert und mit 100 multipliziert (%B/B₀-Werte). Die so erhaltenen Werte wurden zu einer Logit-log-Auftragung gegen die logarithmierten Pestizidkonzentrationen herangezogen (siehe Abschn. 2.6).

Nach der Logit-log-Transformation der gemessenen Peakhöhen nach Gl. 4.31, ergibt sich folgender linearer Zusammenhang

$$\text{logit } y = \ln \frac{y}{100-y} = a \cdot \lg ([\text{Pestizid}] / \mu\text{gl}^{-1}) + b \quad , \quad (4.31)$$

wobei

$$y = \% \text{ B/B}_0 = \left(\frac{B}{B_0} \cdot 100 \right)$$

a = Anstieg der Regressionsgerade

b = Schnittstelle der Regressionsgerade mit der Ordinate

sind. Durch die lineare Regression können die Parameter a und b für Atrazin, 2,4-D, Metolachlor und Carbofuran bestimmt werden (Tab. 4.10).

Tab. 4.10: Parameter der linearen Regression der Logit-log-Transformation (Gl. 4.31) für die 4 Pestizide im wäßrigen Immunoassay. Die erhaltenen Daten resultieren aus Dreifachbestimmungen ($\alpha = 0.05$, $n = 3$, $m = 5$).

Pestizid	a	b	r^2	Variation
Atrazin	-1.4400	0.6763	0.9996	0.082
2,4-D	-1.6963	2.0714	0.9992	0.090
Metolachlor	-1.8530	0.3670	0.9985	0.046
Carbofuran	-1.5781	-0.0550	0.9997	0.073

Hervorzuheben ist die in allen Fällen sehr gute Linearität der Logit-log-Korrelation. Die Variationswerte von 4.6-9.0% zeigen, daß sich die Pestizide im Bestimmungsbereich von 0.1 bis 50 $\mu\text{g/l}$ reproduzierbar quantifizieren lassen.

4.5.3 Immuno-FIA in organischen Lösungsmitteln

Die Durchführung der Immuno-FIA in Gegenwart organischer Lösungsmittel, wie z.B. Methanol und Isopropanol, vereinfacht die direkte Kombination mit der extraktiven Anreicherung und dem Eluieren hydrophober Substanzen von festen Phasen und eröffnet die Möglichkeit, die Nachweisstärke der Pestizidbestimmung beträchtlich zu erhöhen.

4.5.3.1 Einfluß des Lösungsmittels auf die enzymatische Indikatorreaktion

Zunächst wurde der Einfluß von organischen Lösungsmitteln auf die Aktivität des Meerrettichperoxidase-Hapten-Konjugates untersucht. Dabei wurde bei den angegebenen Konzentrationen der Peroxidasesubstrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin TMB und H_2O_2 die Enzymaktivität in Gegenwart von Methanol und

Isopropanol gemessen. Abb. 4.59 stellt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Lösungsmittelkonzentration dar. Isopropanol wirkt sich ungünstiger auf die Enzymaktivität aus als Methanol. Die Restaktivität in Anwesenheit von 25% v/v Lösungsmittelgehalt beträgt bei Methanol um 55% und bei Isopropanol um 35%. Die Enzymaktivität nimmt mit steigendem Lösungsmittelgehalt bis zu 40 % v/v linear ab.

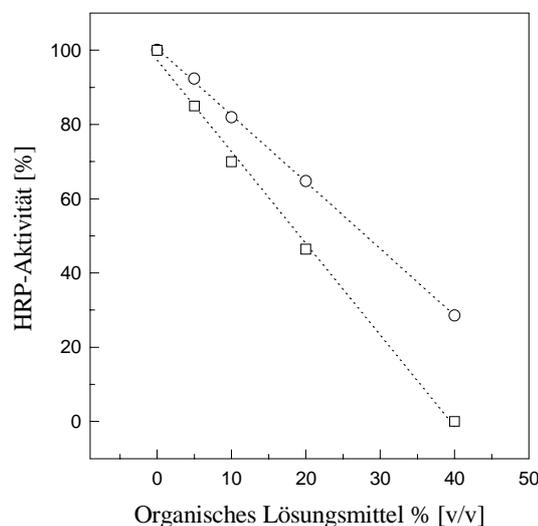


Abb. 4.59:

Die Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit (v_0) des Enzym-Hap-Konjugates vom prozentualen Lösungsmittelgehalt (v/v).
○: Methanol, □: Isopropanol.

4.5.3.2 Einfluß des Lösungsmittels auf die immunologische Reaktion

Da die enzymatische Indikationsreaktion sich der immunologischen Reaktion nach mehrmaligem Waschen anschließt, läuft sie in der optimierten wäßrigen Reagenzlösung ab. Somit kann der Lösungsmiteleinfluß auf die Wechselwirkung (Bindung) des Haptens an Antikörper untersucht werden.

Die Immunreaktion zwischen den HRP-Haptenkonjugaten und den immobilisierten Antikörpern wurde am Beispiel von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-Immunoassay in den Lösungsmitteln Methanol, Isopropanol und Acetonitril untersucht. Es wurde jeweils mit einem Lösungsmittelanteil von 25 % v/v im Assayansatz gearbeitet. Abb. 4.60 zeigt den Effekt dieser Lösungsmittel im

Vergleich zum herkömmlichen Puffer. Während bei Methanol über 70 % der Empfindlichkeit erhalten blieb, wurde bei Isopropanol weniger als 20 % der Empfindlichkeit erzielt. Acetonitril hebt die Immunoreaktion nahezu auf.

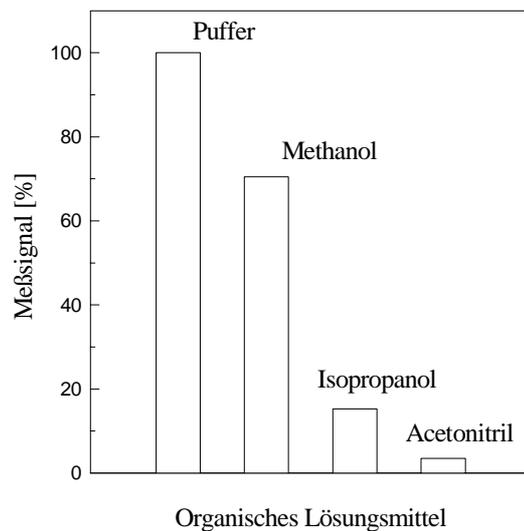


Abb. 4.60:

Der Einfluß von organischen Lösungsmitteln (25 % v/v) auf die Reaktion von HRP-Haptenkonjugat mit den immobilisierten Antikörpern (Anti 2,4-D). Meßbedingungen wie in Abschn. 4.5.2.

4.5.3.3 Bestimmung von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure in Methanol

Bei den Voruntersuchungen erwies sich Methanol als geeignetes Lösungsmittel zur Aufnahme der Probe für den Immunoassay. Unter den gleichen FIA-Bedingungen wie im wäßrigen Immunoassay wurde 2,4-D zwischen 1 und 100 µg/l bestimmt. Die Stammlösung wurde durch Lösen von 5 mg 2,4-D in 50 ml Methanol hergestellt.

Der Zusammenhang zwischen %B/B₀ und 2,4-D-Konzentrationen in der Logit-log-Darstellung (Abb. 4.61) kann durch Gleichung (4.32)

$$\text{logit } y = -1.136 \cdot \lg ([2,4\text{-D}]/\mu\text{gl}^{-1}) + 2.0267 \quad (4.32)$$

($r^2 = 0.9986$) beschrieben werden. 2,4-D hatte unter den angegebenen Bedingungen keinen Einfluß auf HRP-Aktivität. Die Nachweisgrenze lag bei 1 µg/l.

4.5.4 Kombination der Immuno-FIA mit Festphasenextraktion

Abb. 3.12 (Abschn. 3.2.6) zeigt die FIA-Anordnung zur Durchführung der Festphasenextraktion (SPE). Diese wurde mit dem Meßplatz der Immuno-FIA kombiniert. Die ausgewählten EMPORE-Extraktionsdisks liefern eine schnellere und effizientere Anreicherung der Pestizide als die Flüssig/Flüssig-Extraktion. Die Vorteile der EMPORE-Disks bestehen in dem reduzierten Einsatz von Lösungsmitteln, schnellem Probendurchfluß und geringerer analytischer Interferenz. Die Reproduzierbarkeit wird nicht signifikant von der Durchflußrate beeinflusst, die in einem breiten Bereich zwischen 5 und 45 min pro Liter Probenlösung variiert werden kann [40], was gegenüber der klassischen Festphasenextraktion einen beträchtlichen Vorteil darstellt.

Es wurde ein größeres Volumen von 0.5-1.0 Liter in 10-20 min eingesetzt sowie ein Anreicherungsfaktor von 50 bis 100 erreicht. Durch Eluieren mit Methanol konnte diese Technik leicht an die vorhandene Konfiguration der Immuno-FIA angepaßt werden.

Bestimmung von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure nach Anreicherung durch Diskextraktion

Die Herstellung von Standardlösungen sowie die Automatisierung der Probenpräparation und des Eluierens erfolgte mittels SPE-FIA-Anordnung, wie in Abschn. 3.5 erläutert. Die Anreicherung von 2,4-D wurde für Konzentrationen von 0.02, 0.1, 0.2, 1.0 und 2.0 µg/l durchgeführt. 100 µl des Eluates werden in die Immuno-FIA, Abb. 3.10 injiziert. Der weitere Verlauf entspricht dem im wäßrigen Medium.

Abb. 4.61 zeigt die Logit-log-Auftragung der %B/B₀-Werte gegen die 2,4-Dichlorphenoxyessigsäurekonzentration, die ohne und nach einer Festphasenextraktion erhalten wurden. Mit Gleichung 4.33, die aus Gl. 4.31 folgt,

$$[\text{Pestizid}/\mu\text{g l}^{-1}] = \{10^{\ln(y/100 - y) - b}\}^{1/a} \quad (4.33)$$

und mit $a = -1.1364$ und $b = 2.0267$ (aus Gl. 4.32) können die wiedergefundenen Konzentrationen nach der Extraktion berechnet werden (Tab. 4.11).

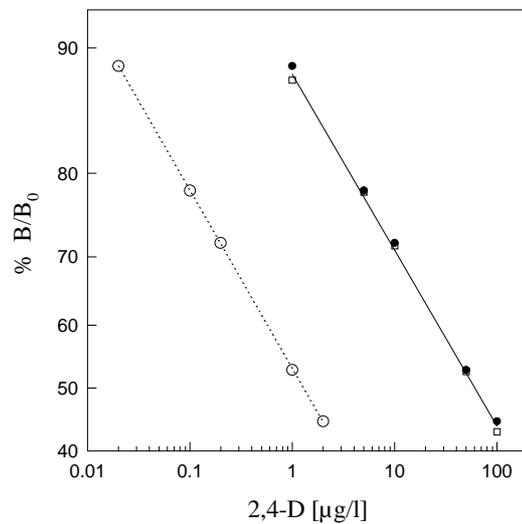


Abb. 4.61:

Lineare Regression der Logit-log-Darstellung von 2,4-D im Methanol.

□: Meßwerte der Kalibrierung,

●: Meßwerte nach Festphasenextraktion (SPE) bezüglich der Konzentrationen nach SPE,

○: Meßwerte nach Festphasenextraktion (SPE) bezüglich der Konzentrationen vor SPE.

Tab. 4.11: Die Wiederfindungsrate der 2,4-D-Konzentrationen nach der Festphasenextraktion.

Probe vor SPE [µg/l]	zu erwartende Konzentration [µg/l]	Wiederfindung [µg/l]	Wiederfindung [%]
0.02	1.00	0.9	90.78
0.10	5.00	4.7	92.90
0.20	10.0	9.3	93.09
1.00	50.0	47.9	95.78
2.00	100	94.1	94.06

Aus Tab. 4.11 geht hervor, daß die Wiederfindungsrate zwischen 90 und 95 % liegt und die Empfindlichkeit nach der Anreicherung um den Faktor 50 steigt. Bei einer akzeptablen Präzision von weniger als 3 % ($n = 3$) Richtigkeit können extrem kleine Konzentrationen von 2,4 D zuverlässig bestimmt werden.

Es konnte gezeigt werden, daß sich das entwickelte Immuno-FIA-Verfahren mit der automatisierten Festphasenextraktion kombinieren läßt. Auf analoge Weise kann die Festphasenextraktion mit dem FIA-Verfahren zur Bestimmung von

Acetylcholinesteraseinhibitoren, wie Carbofuran und Paraoxon u.a. kombiniert werden. Dies würde die Empfindlichkeit beträchtlich erhöhen und das Detektionslimit der Enzymhemmer entsprechend senken, so daß die durch die Europäische Kommission festgelegten Grenzwerte von 0.1 µg/l Pestizid im Trinkwasser quantitativ bequem erfaßt werden könnten.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden ausgehend von der Reaktion von o-Phthalaldehyd (OPA), Ammoniak und reduzierender Schwefelverbindungen neue fluorimetrische und automatisierte FIA-Verfahren entwickelt.

Durch den Einsatz immobilisierter Enzyme läßt sich eine Vielzahl neuer für die Bioprozess- (Glutamat, Glutamin und Lysin), Lebensmittel- (Lysin und Glutamat), Umwelt- (Metallionen und Insektizide wie z.B. Carbamate, Phosphorsäure- und Phosphonsäureester) und klinische Analytik (Ammoniak, Harnstoff, Creatinin und Creatin) interessanter Bestimmungsverfahren verwirklichen.

Auf der Grundlage eines aus OPA und Thioglycolat hergestellten wäßrigen Reagenzes lassen sich sehr empfindliche und schnell ansprechende Verfahren zur selektiven Ammoniakdetektion in einem vier Konzentrationsgrößenordnungen umfassenden linearen Bereich realisieren. Durch Kombination mit Enzymen, die Ammoniak freisetzende Reaktionen katalysieren, wurden Verfahren zur Bestimmung von Harnstoff, Glutamin, Glutamat, Lysin, Creatin und Creatinin ausgearbeitet, die sich durch hohe Empfindlichkeit, Nachweisgrenzen zwischen 0.1 und 1.0 μM und Langzeitstabilität auszeichnen. Der Einfluß von in den Probenlösungen oft vorhandenem Ammoniak/Ammonium konnte durch einen vorgeschalteten und kontinuierlich arbeitenden Gasdialyseschnitt zur quantitativen Ammoniakabtrennung ausgeschaltet werden. Aufbauend auf der quantitativen Ammoniakabtrennung und der fluorimetrischen Detektion von enzymkatalytisch erzeugtem Ammoniak wurde ein neues Konzept für die Mehrkomponenten-FIA zur quasisimultanen Bestimmung von mehreren Analyten, wie z.B. Harnstoff, Creatin und Creatinin realisiert.

Das bei der Reaktion zwischen o-Phthalaldehyd (OPA), primärem Amin und reduzierender Schwefelverbindungen genutzte Nachweisprinzip der Bildung fluoreszierender Isoindolderivate läßt sich außer auf die Bestimmung primärer Amine auch auf die Bestimmung reduzierender Schwefelverbindungen anwenden. So wurden wäßrige OPA-Reagenzien zur schnellen und präzisen Detektion von Sulfid, Sulfit und Thiolen wie Glutathion, Cystein und Thiocholin entwickelt. Die Nachweisgrenze der Bestimmungen liegt bei 0.05-0.08 μM . Die Selektivität des OPA-Reagenzes zur Bestimmung von Glutathion und Cystein gegenüber reduziertem Dithiotreitol (DTT) ermöglicht eine neue einfache Detektionsmethode von oxidiertem Glutathion und Cystin, die sich durch reduziertes DTT stöchiometrisch reduzieren lassen.

Aufbauend auf der fluorimetrischen Detektion von Ammoniak und Thiocholin und der Entwicklung einer Inkubationszelle wurden mit Hilfe der Inhibierung von Urease und Acetylcholinesterase Verfahren zur Bestimmung von Schwermetallionen bzw. Pestiziden ausgearbeitet. Das Detektionslimit für Silberionen lag bei 1.7 nM, für Kupferionen bei 35 nM, für Carbofuran (als Carbamate) bei 23 nM und für Paraoxon (als Phosphorsäureester) bei 10 nM.

Ausgehend von der FIA-Anordnung mit Inkubationszelle wurden automatische Immunoassays zur Bestimmung von Pestiziden, wie Carbofuran, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, Atrazin und Metolachlor entwickelt. Nach der Optimierung der Immunoassays in Methanol konnte das entsprechende FIA-Verfahren erfolgreich mit einer Festphasenextraktionseinrichtung kombiniert werden. Die Nachweisgrenze wurde um den Faktor 50 auf 0.02 $\mu\text{g/l}$ (0.9 pM) gesenkt.

Zur Steuerung sowie Automatisierung der FIA-Anordnung wurde ein spezielles Computerprogramm, das über eine Schaltkarte die verschiedenen FIA-Komponenten kontrolliert, entwickelt.

6 Literaturverzeichnis

1. Miralles, E.; Prat, D.; Compano, R. and Granados, M.: *Analyst* **122** (1997): 553-558.
2. Ruzicka, J. and Hansen, E.H.: Flow Injection Analysis, Part I: A new concept of fast continuous flow analysis: *Anal. Chim. Acta* **106** (1975): 207-224.
3. Ruzicka, J. and Hansen E.H.: *Flow Injection Analysis*, 1st Ed.. John Wiley & Sons, Inc. New York 1981.
4. Ruzicka, J. and Hansen E.H.: *Flow Injection Analysis*. John Wiley & Sons, Inc. New York 1987.
5. Möller, J.: *Flow Injection Analysis: Grundlagen und Anwendung*. In: *Analytiker Taschenbuch Bd. 7*. Springer-Verlag, Berlin 1987.
6. Lacy, N.; Christian, G.D. and Ruzicka, J.: *Anal. Chem.* **62** (1990): 1482-1490.
7. Fernandes-Band, B.; Lazaro, F.; Luque de Castro, M.D. and Valcarcel, M.: *Anal. Chim. Acta* **229** (1990): 177-182.
8. Valcarcel, M. and Luque de Castro, M.D.: *Trends Anal. Chem.* **10** (1991): 114-121.
9. Gisin, M. and Thoman, C.: *Industrial Process Control by Flow Injection Analysis: Anal. Chim. Acta* **190** (1986): 165.
10. Ruzicka, J.: *Anal. Chim. Acta* **190** (1986): 155.
11. Ruzicka, J. and Hansen, E.H.: *Anal. Chim. Acta* **173** (1985): 3-21.
12. Schmidt, W.: *Optische Spektroskopie* pp. 205. VCH-Verlag, Weinheim 1994.
13. Schulman, S.G.: *Molecular Luminescence Spectroscopy: Methodes and Application: part 1* pp. 2-7. John Wiley & Sons, Inc. New York 1985.

14. Bisswanger, H.: Enzymkinetik: Theorie und Methoden pp. 237-239. VCH, Weinheim 1994.
15. Galle, H.J.: Spektroskopische Methoden in der Biochemie pp. 46-52. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1988.
16. Roth, M.: Anal. Chem. **43(7)** (1971): 880-882.
17. Garcia Alvarez-Coque, M.C.; Medina Hernandez, M.J.; Villanueva Camanas, R.M. and Mongay Fernandes, C.: Anal. Biochem. **178** (1989): 1-7.
18. Simons, S.S. and Johnson, D.F.: J. Org. Chem. **43** (1978): 2886-2891.
19. Sternson, L.A.; Stobaugh, J.F. and Repta, A.J.: Anal. Biochem. **144** (1985): 233-246.
20. Stobaugh, J.F.; Repta, A.J.; Sternson, L.A. and Garren, K.W.: Anal. Biochem. **135** (1983): 495-504.
21. Simons, S.S. and Johnson, D.F.: Anal. Biochem. **90** (1978): 705-725.
22. Stobaugh, J.F.; Repta, A.J. and Sternson, L.A.: J. Pharm. Biomed. Anal. **4** (1986): 341-351.
23. Uhlig, H.: Enzyme arbeiten für uns: Technische Enzyme und ihre Anwendung pp. 198. Carl Hanser Verlag, München, Wien 1991.
24. Lubig, R.; Kusch, P.; Röper, K. und Zahn ,H.: Monatshefte für Chemie **112** (1981): 1313-1323.
25. Hardy, P.M.; Nicholls, A.C. and Rydon, H.N.: J.C.S. Perkin I **5/1775** (1975): 958-962.
26. Artyomova, A.A.; Voroshilova, O.I.; Nikitin, Y.S. and Khoklova, T.D.: Adv. Colloid Interface Sci. **25** (1986): 235.
27. Schellenberger, A.: Enzymkatalyse pp. 72. Gustav Fischer Verlag, Jena 1989.
28. Segel, I.H.: Enzyme Kinetics. John Wiley & Sons, New York 1993
29. Spohn, U.: Persönliche Mitteilung.
30. Frei, R.W.; Jansen, H. and Brinkman, U.A.Th.: Anal. Chem. **57** (1985): 1529.

31. Spohn, U.: Habilitationsschrift pp 12-19. Martin-Luther-Universität, Institut für Biotechnologie 1996.
32. Rovito, B.J. and Kittrell, J.R.: *Biotech. Bioeng.* **15** (1973) 143.
33. VanEmon, J.M.: *Immunochemical Methods for Environmental Analysis*, ACS Symposium Series 442. American Chemical Society, Washington DC 1990.
34. Liddell, E. and Weeks, I.: *Antibody Technology*. BIOS Scientific Publisher Ltd. 1995.
35. Roitt, I.M.; Brostoff, J. and Male, D.K.: *Kurzes Lehrbuch der Immunologie* pp. 84. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1991.
36. Masseyeff, R.F.; Albert, W.H. and Staines, N.A.: *Methods of Immunological Analysis Vol. 1: Fundamentals* pp. 663. VCH, Weinheim 1993.
37. Weetall, H.H.: *Methods Enzymol.* **44** (1976): 134-148.
38. Weber, E.; Tonder, H.; Aurich, K.; Weide, H.; Siegler, K. and Weber, B.: *Bioscope* **1** (1993): 34.
39. Technische Anleitung zu BioMag und magnetische Separation der Firma PAESEL + LOREI.
40. Technische Anleitung zu Festphasenextraktionsdisk (EmporeTM 3M) der Firma J. T. Baker, USA.
41. Wriston, J.C.: *Methods Enzymol.* **113** (1985): 608.
42. Kwamme, E.; Torgner, I.A.A. and Svenneby, G.: *Methods Enzymol.* **113** (1985): 241.
43. Kidder, G.W. and Nolan, L.L.: *Natl. Acad. Sci. USA* **76** (1979): 3670.
44. Glantz, M.D. and Lewis, A.S.: *Methods Enzymol.* **51** (1978): 512.
45. Tabata, M.; Kido, T.; Totani, M. and Murachi, T.: *Anal. Biochem.* **134** (1983): 44.
46. Pohlmann, A.; Stamm, W.; Kusakabe, H. and Kula, M.-R.: *Anal. Chim. Acta* **235** (1990): 329.

47. Preuschoff, F.; Spohn, U.; Weber, E.; Unverhau, K. and Mohr, K.-H.: *Anal. Chim. Acta* **280** (1993): 185.
48. Blankenstein, G.; Preuschoff, F.; Spohn, U.; Mohr, K.-H. and Kula, M.-R.: *Anal. Chim. Acta* **271** (1993): 231.
49. Kusakaba, H.; Midorikawa, Y. and Fujishima, T.: *Agrc. Biol. Chem.* **48** (1984): 181.
50. Yao, T. and Wasa, T.: *Anal. Chim. Acta* **209** (1988): 259.
51. Taylor, D.W. and Nieman, T.A.: *J. Chromatogr.* **368** (1986): 95.
52. Cooper, J.C.; Danzer, J. and Schmidt, H.-L.: *Anal. Chim. Acta* **282** (1993): 369.
53. Kiba, N.; Tagami, H. and Furusawa, M.: *Anal. Chim. Acta* **239** (1990): 307.
54. Hummel, W.; Tauschensky, S.; Spohn, U.; Wendel, U. and Langenbeck, U.. In: *Biosensors Applications in Medicine, Environmental Protection and Process Control* (Ed.: Schmid, R.D. and Scheller, F.) pp. 313. VCH, Weinheim 1989.
55. Spohn, U.; van der Pol, J.; Eberhardt, R.; Joks, B. and Wandrey, Ch.: *Anal. Chim. Acta* **292** (1994): 281.
56. Blankenstein, G.; Spohn, U.; Preuschoff, F.; Thömmes, J. and Kula, M.-R.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* **20** (1994): 291.
57. Van der Pol, J.; Spohn, U.; Eberhardt, R.; Gaetgens, J.; Biselli, M.; Wandrey, C. and Tramper, J.: *J. Biotechnol.* **37** (1994): 253-264.
58. Spohn, U.; Preuschoff, F.; Blankenstein, G.; Janasek, D.; Kula, M.-R. and Hacker, A.: *Anal. Chim. Acta* **303** (1995): 109.
59. Johansson, G. and Ögren, L.: *Anal. Chim. Acta* **84** (1976): 23.
60. Johansson, G.; Edström, K. and Ögren, L.: *Anal. Chim. Acta* **85** (1976): 55.
61. Taylor, S.; Ninjoor, V.; Dowd, D.M. and Tappel, A.L.: *Anal. Biochem.* **60** (1974): 153-162.
62. Tranholm Jeppesen, M. and Hansen, E.H.: *Anal. Chim. Acta* **245** (1991): 89.
63. Abdel-Latif, M.S. and Guilbault, G.G.: *J. Biotechnol.* **14** (1990): 53-60.

64. Narinesingh, D.; Mungal, R. and Ngo, T.T.: *Anal. Biochem.* **188** (1990): 325.
65. Jansen, H.; Frei, R.W. and Brinkman, U.A.Th.: *J. Chromatogr.* **325** (1985): 255.
66. Garcia Alvarez-Coque, M.C.; Medina Hernandez, M.J.; Villanueva Camanas, R.M. and Mongay Fernandez, C.: *Anal. Biochem.* **180** (1989): 172-176.
67. Medina Hernandez, M.J.; Villanueva Camanas, R.M. and Garcia Alvarez-Coque, M.C.: *Microchemical J.* **42** (1990): 288-293.
68. Oguri, S.; Yokoi, K. and Motohase, Y.: *J. Chromatogr.* **787** (1997): 253-260.
69. Genfa, Z. and Dasgupta, P.K.: *Anal. Chem.* **61** (1989): 408-412.
70. Genfa, Z.; Dasgupta, P.K. and Dong, S.: *Environ. Sci. Technol.* **23** (12) (1989): 1467-1474
71. Nakamura, H. and Tamura, Z.: *Anal. Chem.* **53** (1981): 2190.
72. Mana, H. and Spohn, U.: *Anal. Chim. Acta* **325** (1996): 93-104.
73. Joksch, B.; Eberhardt, R.; Spohn, U. and Wandrey, Ch.. In: *Flow Injection Analysis Based on Enzymes and Antibodies* (Ed.: Schmid, R.D.) **Vol. 14** pp. 63. VCH, Weinheim 1990.
74. Abdel-Latif, M.S.: *Anal. Lett.* **27(13)** (1994): 2601-2614.
75. Canale-Gutierrez, L.; Maquieira, A. and Puchades, R.: *Analyst* **115** (1990): 1243-1246.
76. Alegret, S.; Alonso, J.; Bartroli, J. and Martinez-Fabregas, E.: *Analyst* **114** (1989): 1443-1447.
77. Becker, M.; Martienssen, M.; Fuhrmann, B. and Spohn, U.: *Acta Biotechnol.* **17(1)** (1997): 39-50.
78. Penzlin, H.: *Lehrbuch der Tierphysiologie* pp. 331. Gustav Fischer Verlag, Jena 1989.
79. Eckfeld, J.H.; Levine, A.S.; Greiner, C. and Kershaw, M.: *Clin. Chem.* **28** (1982): 1500-1502.

80. Fuhrmann, B.; Spohn, U. and Mohr, K.-H.: *Biosensors* **7** (1992): 653-660.
81. Persönliche Mitteilung von Priv. Doz. Uwe Spohn.
82. Rapoport, S.M.: *Medizinische Biochemie* pp. 379. Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1987.
83. Stamm, W.W.; Pohlmann, A.; Buchholz, M. and Kula, M.-R.: On-line monitoring of L-Lysin in technical chromatography by flow injection analysis. International FIA-Workshop in Braunschweig 13.-15 Mai 1990.
84. Fuhrmann, B.; Spohn, U.; Wandrey, Ch. and Mohr, K.-H.: Proc. 2nd Bioelectroanalytical Symposium pp. 285. Matrafüred, Akademia Kiado, Budapest 1992.
85. Rietz, B. and Guilbault, G.G.: *Anal. Chim. Acta* **77** (1975): 191-198.
86. Perry, T.L.; Hansen, S. and Kenneedy, J.: *J. Neurochem.* **24** (1975): 287-289.
87. Blakeslee, S.: *The New York Times*, 29.November 1988.
88. Belitz, H.-D. und Grosch, W.: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie* pp. 12. Springer Verlag, Berlin 1992.
89. Brockhaus ABC Chemie. F. A. Brockhaus Verlag, Leipzig 1971.
90. Keller, H.: *Klinisch-chemische Labordiagnostik für die Praxis* pp. 231. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1991.
91. Rapoport, S.M.: *Medizinische Biochemie* pp. 384. Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1987.
92. Tobata, M.: *Anal. Chim. Acta* **262** (1992): 315-321.
93. Jaffé, M.: *Z. Physiol. Chem.* **10** (1886): 391.
94. Moges, G. and Johansson, G.: *Anal. Lett.* **27(3)** (1994): 495-510.
95. Ogbomo, I.; Kittsteiner-Eberle, R.; Engelbrecht, U.; Prinzing, U.; Danzer, U. and Schmidt, H.-L.: *Anal. Chim. Acta* **249** (1991): 137.
96. Mana, H. and Spohn, U.: *Anal. Chim. Acta*, in Vorbereitung (1998).
97. Krasnova, I.N.; Kolmakova, , I.V. and Kartsova, L.A.: *J. Anal. Chem.* **52(7)** (1997): 693-697.

98. Yamamoto, A. and Matsunaga, A.: Toyama-ken Eisei Kenkyusho Nenpo **1995(19)** (1996): 194-196.
99. Habal, Z.M. and Sakr, A.: Clin. Chim. Acta **264** (1997): 239-243.
100. Calderon, L.; Brunetto, R.; Leon, A.; Burguera, J.L. and Burguera, M.: Am. Lab. (Shelton, Conn.) **28(18)** (1996): 56-59.
101. Lopez-Erroz, C.; Vinas, P.; Campillo, N. and Hernandez-Cordoba, M.: Analyst **121(8)** (1996): 1043-1046.
102. Sabala, A.; Portillo, J.L.; Broto-Puig, F. and Comellas, L.: J. Chromatogr., A **778(1+2)** (1997): 103-110.
103. Stuart, I.A.; Ansell, R.O.; Maclachlan, J.; Bather, P.A and Gardiner, W.P.. Analyst **122(4)** (1997): 303-308.
104. Mank, A.; Molenaar, E.; Gooijer, G.; Lingman, H.; Velthorst, N. and Brinkman, U.: J. Pharm. Biomed. Anal. **13** (1995): 255.
105. Perez-Puiz, T.; Martinez-Lozano, C.; Tomas, V. and Lampbertos, G.: Talanta **83** (1991): 1235.
106. Milosavljevic, E.; Solujic, L.; Hendrix, J. and Nelson, J.: Anal. Chem. **60** (1988): 2791.
107. Wood, Ch. and Marr, I.: Analyst **113** (1988): 1635.
108. Orwar, O.; Sandberg, M.; Jacobson, I.; Sundahl, M. and Folestad, S.: Anal. Chem. **66** (1994): 4471.
109. Hogan, B.L. and Yeung, E.: Anal. Chem. **64** (1992): 2841.
110. Medina Hernandez, M.J.; Villanueva Camanas, R.M.; Monfort Cuenca, E. and Garcia Alvarez-Coque, M.C.: Analyst **115** (1990): 1125.
111. Mopper, K. and Delmas, D.: Anal. Chem. **56** (1984): 2557.
112. Jocelyn, P. and Kamminga, A.: Anal. Biochem. **37** (1970): 417.
113. Kaneda, H.; Takashio, M.; Osawa, T.; Kawakishi, S.; Koshino, S. and Tamaki, T.: J. Food Sci. **61** (1996): 105.
114. Frazier, W.C. and Westhoff, D.: Food Microbiology pp. 150. McGraw-Hill Book Company, New York 1988.

115. Falbe, J. und Regitz, M.: Römpp Lexikon Umwelt. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1993.
116. Rapoport, S.M.: Medizinische Biochemie pp. 100. Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1987.
117. Kleber, H.P. und Schlee, D.: Biochemie **I** pp. 381. Gustav Fischer Verlag, Jena 1987.
118. Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie. **Bd. 2** pp. 78. Verlag Herder Freiburg 1991.
119. Kleber, H.P. und Schlee, D.: Biochemie **I** pp. 372. Gustav Fischer Verlag, Jena 1987.
120. Schellenberger, A.: Enzymkatalyse pp. 274. Gustav Fischer Verlag, Jena 1989.
121. Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie **Bd. 1** pp. 313. Verlag Herder Freiburg 1991.
122. Metz, P.A.; Gehas, J.; Spriggle, J.E. and Veening, H.: J. Chromatog. **330** (1985): 307-313.
123. Kok, R.J.; Visser, J.; Moolenaar, F.; de Zeeuw, D. and Meijer, D.K.F.: J. Chromatogr. B, **693** (1997): 181-189.
124. Mana, H. and Spohn U.: Anal. Chem. Acta. in press (1998)
125. Kuralay, A.; Ortapamuk, O.; Yilmas, S.; Sumer, N. and Ozer, I.: Analyst **120(4)** (1995): 1087-1090.
126. Jung, K.; Bitton, G. and Koopman, B.: Wat. Res. **29(8)** (1995): 1929-1933.
127. Enzyme Handbook. Springer-Verlag, Berlin 1991.
128. Geike, F. and Schuphan, I.: J. Chromatogr. **72** (1972): 153-163.
129. Zürn, A. and Müller, H.: Anal. Chem. **346** (1993): 589-593.
130. Spohn, U.: Habilitationsschrift pp 156. Martin-Luther-Universität, Institut für Biotechnologie 1996.
131. Bergmann, W.: Dissertationsschrift. Martin-Luther-Universität, FB Biochemie-Biotechnologie, in Vorbereitung 1998.
132. Stamm, W. W. and Kula, M.-R.: J. Biotechn. **14** (1990) 99.

133. Ide, T.: *J. Chromatogr. B*, **694** (1997): 325-332.
134. Schwedt, G.; Waldheim, D.-O.; Neumann, K.-D. and Stein, K.: *J. Anal. Chem.* **346** (1993): 659-662.
135. Narinesingh, D.; Mungal, R. and Ngo, T.T.: *Anal. Chim. Acta* **292** (1994): 185-190.
136. Mattiason, B.: *Nature* **286** (1977) 519.
137. Preininger, C. and Wolfbeis, O.S.: *Biosens. Bioelectron.* **11(10)** (1996): 981-990.
138. Cervelli, S.; Nannipieri, P.; Giovannini, G. and Perna, A.: *Soil. Biol. Biochem.* **9** (1977): 393-396.
139. Davies, H.A. and Greaves, M.P.: *Weed Research* **21** (1981): 205-209.
140. Lethbridge, G.; Bull, A.T. and Burns, R.G.: *Pestic. Sci.* **12** (1981): 147-155.
141. Lethbridge, G. and Burns, R.: *Soil. Biol. Biochem.* **8** (1976): 99-102.
142. Gianfreda, L.; Sannino, F.; Filazzola, M.T. and Violante, A.: *Pestic. Sci.* **39** (1993): 237-244.
143. Oslon, D.L. and Christensen, G.M.: *Bull. envir. contam. Toxic* **28** (1982): 439-445.
144. Summer, J.B.: Urease. In: *Metabolic Inhibitors Vol. III* pp. 882-885 (Ed.: Hochster, R.M. and Quastel, J.H.). Academic Press, New York 1963.
145. Eto, M.: Organophosphorus Pesticides. In: *Organic and Biological Chemistry* pp. 131-133. CRC Press, Boca Raton 1979.
146. Hassall, K.A.: *The Biochemistry and Uses of Pesticides* pp. 92. VCH, Weinheim 1990.
147. Mutschler, E.: *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie* pp. 567. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1991.
148. La Rosa, C.; Pariente, F.; Hernandez, L. and Lorenzo, E.: *Anal. Chim. Acta* **295** (1994): 273-282.
149. Günter, A. and Bilitewski, U.: *Anal. Chim. Acta* **300** (1995): 117-125.
150. Imato, T. and Ishibashi, N.: *Biosens. Bioelectron.* **10** (1995): 435-441.

151. Ristori, C.; Del Carlo, C.; Martini, M.; Barbaro, A. and Ancarani, A.: *Anal. Chim. Acta* **235** (1996): 151-160.
152. Shi, R. and Stein, K.: *Anal. Chim. Acta* **234** (1996): 21-27.
153. Lui, J.; Tan, M.; Liang, C. and Ying, K.B.: *Anal. Chim. Acta* **329** (1996): 297-304.
154. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andrea, V. and Featherstone, R.M.: *Biochem. Pharmacol.* **7** (1961) 88.
155. Kindervater, R.; Künnecke, W and Schmid, R.D.: *Anal. Chim. Acta* **234** (1990): 113-117.
156. Fennouch, S.; Casimiri, V. and Burstein, C.: *Biosens. Bioelectron.* **12(2)** (1997): 97-104.
157. Technische Anleitung zu Immunoassaykit (Baker *RaPID Assays*) der Firma OHMICRON. J.T. Baker, Postfach 1661, D-6080 Groß-Gerau.

Anhang

A.1 Liste der Chemikalien

Alle Chemikalien sind von p. A. Qualität oder reiner.

Riedel-de Haën

Aldicarb	2-Methyl-2-(methylthio)-propionaldehyd-O-(methylcarbamoyl)oxim
Atrazin	2-Chlor-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazin
Carbaryl	1-Naphthylmethyl-carbamat
Carbofuran	2,3-Dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl-N-methylcarbamat
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
Linuron	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1-methoxy-1-methylharnstoff
Metolachlor	2-Chlor-6'-ethyl-N-(2-methoxy-1-methylethyl)-acet-o-toluidid
Paraoxon	O,O-Diethyl-O-(4-nitrophenyl)-phosphat

Merck

Acetonitril, Ammoniaklösung (32%ige Lösung), Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat, Borsäure, Citronensäure, Dikaliumhydrogenphosphat, Dinatriumhydrogenphosphat, EDTA, Ethanol, Iod, Isopropanol, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumiodid, Methanol, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumhydroxid, Natriumsulfit, Phosphorsäure, ortho-Phthalaldehyd, Salzsäure, Schwefelsäure, Stärke, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Sigma

Acetylthiocholinchlorid, L-Alanin, L-Arginin.HCl, L-Aspartat.Na, L-Cystein.HCl, Creatin, Creatinin, Cystin, DL-Dithiothreitol, 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure), Glutardialdehydlösung (25%ige Lösung), Glutathion (reduziert), L-Glutamat, L-Glutamin, Glutathion (oxidiert), L-Glycin, Harnstoff, L-Histidin.HCl, Kupfersulfat, L-Lysin, L-Methionin, Natriumsulfid, L-Ornithin.HCl, L-Phenylalanin, Rinderserumalbumin, Silbernitrat, Thioglycolsäure (80%ige Lösung).

RaPIDAssays, Ohmicron Corp., Newtown, PA, USA

Antikörper: Die polyklonalen Antikörper gegen Metolachlor, 2,4-D, Atrazin und Carbofuran sind an paramagnetische Partikel des Durchmessers 1 μm (Advanced Magnetics, Cambridge, MA) gebunden. Die Magnetpartikel wurden mittels der Glutaraldehyd-Methode aktiviert (WESTON und AVRAMEAS, 1971). Diese wurden mit 0.01 M 2-Morpholinoethansulfonsäure-Puffer gewaschen, um überschüssiges Glutaraldehyd zu entfernen. Die aktivierten Magnetpartikel wurden dann bei Raumtemperatur mit den Antiseren über Nacht unter vorsichtigem Schütteln stengelassen. Die enzymmodifizierten Partikel wurden nach magnetischer Separation und Dekantieren gewaschen und schließlich in Trispuffer (0.1 M Tris-HCl pH 7.2, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % BSA) gelöst.

Markerenzym: Als Marker dient das Enzym Meerrettich-Peroxidase, welches mit den vier Pestiziden konjugiert und im gleichen Puffer gelöst ist.

Substrat: Das Substrat für die Meerrettichperoxidase besteht aus 2 Lösungen, die im Verhältnis 1:1 gemischt werden sollen.

- (a) 0.8 mM 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (TMB) in einer Dimethylformamid/Wasser-Lösung (etwa 20:80), pH 8
- (b) 0.02 % Wasserstoffperoxid in Citratpuffer, pH 2.75.

Standardlösungen: Die Standardlösungen liegen in TBS/BSA-Puffer vor.

A.2 Liste der Enzyme (Sigma)

Acetylcholinesterase aus Electric Eel, Typ V-S, 1000-2000 U/mg

Acetylcholinesterase aus Electric Eel, Typ VI-S, 200-600 U/mg

Creatinase aus Actinobacillus, EC 3.5.3.3, 20-40 U/mg

Creatininiminohydrolase aus Mikroorganismen, EC 3.5.4.21, 25-50 U/mg

Glutaminase aus Escherichia coli, EC 3.5.1.2, 1, 50 - 200 U/mg

Glutamatoxidase aus Streptomyces sp., EC 1.4.3.11, 5 U/mg

Urease aus Sojabohnen Typ VII, EC 3.5.1.5, 400-800 U/mg

Urease aus Sojabohnen, Glycerollösung, 680 U/ml

Urease aus Bacillus pasteurii, 100 - 200 U/mg

A.3 Liste der Materialien

Stoff	Art / Typ	Firma
Teflonschläuche	PTFE	LATEK, Heidelberg, BRD
¼-Zoll-UNF-Fittings	PVC	LATEK, Heidelberg, BRD
Gummiringe		DEKATOR, Rottkau, BRD
mikroporöse PTFE-Membran	Porengröße 0.2 µm	SARTORUS, Göttingen, BRD
<i>high density</i> Polyethylen-Stäbchen		REICHELTE, BRD
Klebepaste (Medical Adhesive Silicone)	Typ A	DOW CORNING
aminopropylsililierte CPG	Bioran	SCHOTT, Mainz, BRD
aminopropylsililierte CPG	Trisola	TRISOLA, Steinach, BRD
Magnetpartikel	BioMag 4100	PAESEL + LOREI, Frankfurt
Disk der Festphasenextraktion	Empore 3M	J.T.BAKER,

A.4 Liste der Geräte / FIA-Komponenten

Gerät	Typ	Firma
Peristaltikpumpe	Minipuls 3	GILSON, Frankreich
Mikrokolbenpumpe	TEC-S	LEE, Schweiz
Injektionsventil	Rheodyne 9010	COTATI, CA, USA
6-Wegeventil	Rheodyne 9060	COTATI, CA, USA
Magnetventil	30 PSI B	ASZO, Rating, BRD
Relaiskarte	ME 63	MEILHAUS, BRD
Elektromotor	RE 140	MABUCHI,
Fluorimeter	SMF 25	KONTRON, Milan, Italien
Integrator	D-2500	MERCK-HITACHI, Darmstadt, BRD
Autosampler	BIO 232-401	GILSON, Frankreich
Thermostat	UC-5B	JULABO, Seelbach, BRD
Spektropotometer	UVIS 200	LINEAR, Reno, Nevada, USA
Apparatur der SPE	SM 16306	SARTORIUS, Göttingen, BRD
24 V Gleichspannungsversorger		CONRAD-Elektronik, Puchheim, BRD

A.5 Iodometrische Titration

Reagenzien

R ₁	Stärke	1%	
	1g Stärke in 100 ml in kochendem Wasser auflösen.		
R ₂	I ₂ / KI	0.01 M / 0.1 M	
	2.538 g I ₂ und 16.6 g KI in 1 Liter 1 mM HCl lösen.		
R ₃	Thiosulfatlösung	0.01 M	(Ampulle)

Vorlage

- 5 ml Thioverbindungslösung
- 1 ml Stärkelösung

Titrieren mit I₂ / KI -Lösung bis zum Farbumschlag

A.6 Steuerprogramm

```

program timer;
{$M 16000,0,8000}
uses dos,tpcrt,tpdir;
type kanaltype = array [1..16] of string[3];
    nametype = array [1..16] of string[25];
    stringtype = string[40];

    timerfeldtype = array [1..2000] of record
        zeit: longint;
        steuerwort: word;
    end;

var relzeit, progdatei: stringtype;
    kanalarray : kanaltype;
    namearray  : nametype;
    i: integer;
    wahl: char;
{Variablen für Uhrzeit}
    st,min,sec, {timerzeit}
    hour0,minute0,second0,sec100, {absolute Zeit bei Start des timers}
    hour,minute,second : word; {aktuelle Rechnerzeit}

{Variablen für Zeitsteuerung}
    sekunden: longint;
    timerfeld : timerfeldtype;
    timerfeldlaenge: integer;

    test : boolean;
{*****}
procedure steuerbild(relzeit,zeit,progdatei: stringtype;kanalarray: kanaltype;namearray:nametype);
{leert Bildschirm und stellt aktuellen Status aller Kanäle dar}
var i: integer;
begin
    clrscr;
    textcolor(yellow);
    textbackground(blue);
    write(relzeit+' ');
    textcolor(green);
    write(zeit);
    textcolor(white); writeln(' Programm : ',progdatei);
    normvideo;
    writeln;
    for i:=1 to 16 do
    begin
        write(i:2,' ',namearray[i]:20,' ');
        if (kanalarray[i] = 'an') or (kanalarray[i] = 'An')
            or (kanalarray[i] = 'aN')
            or (kanalarray[i] = 'AN') then textcolor(red);
        writeln(kanalarray[i]:3); normvideo;
    end;
    writeln;
    Textcolor(black+blink);textbackground(red);
    if not test then
    begin
        write('TIMER L•UFT !');normvideo;
        writeln(' Abbruch mit jeder Taste');
    end else
    begin
        write('TIMERTEST !'); normvideo;
        writeln(' weiter mit "ENTER" ABRUCH mit "LEER"');
    end;
end;{procedure steuerbild}
{*****}
procedure namenlesen(var namearray:nametype);
{procedure liest Kanalnamen aus der Datei NAMEN.CFG}

var f:text;

```

```

        i: integer;
begin
assign(f, 'namen.cfg');
reset(f);
for i:=1 to 16 do readln(f, namearray[i]);
close(f);
end; {procedure namenlesen}
{*****}
procedure uhr(var st,min,sec:word); {Stopuhr}
begin
    st:=0;min:=0;sec:=0;
    gettime(hour0,minute0,second0,sec100);
end;

procedure getrelativeTime(var st,min,sec:word);
begin
    gettime(hour,minute,second,sec100);
    if second>=second0 then sec:=second-second0
    else
    begin
        sec:=60-(second0-second);
        minute:=minute-1;
    end;
    if minute>=minute0 then min:=minute-minute0 else min:=60-(minute0-minute);
    if hour>=hour0 then st:=hour-hour0 else st:=24-(hour0-hour);
end;

function relativetimestring: stringtype;
var stu, minu, secu:word;
    s1,s2:string;

begin
    getrelativetime(stu,minu,secu);
    s1:='';s2:='';
    str(stu:2,s1);s2:=s1+':';
    str(minu:2,s1);s2:=s2+s1+':';
    str(secu:2,s1);s2:=s2+s1;
    relativetimestring:=s2;
end;

function timestring: stringtype;
var stu,minu,secu,secu100:word;
    s1,s2:string;

begin
    gettime(stu,minu,secu,secu100);
    s1:='';s2:='';
    str(stu:2,s1);s2:=s1+':';
    str(minu:2,s1);s2:=s2+s1+':';
    str(secu:2,s1);s2:=s2+s1;
    timestring:=s2;
end;
{*****}
procedure status;
begin
    gotoxy(20,4);
    textcolor(black);
    textbackground(lightgray);
    write('Timer mit ME 63 BF 1993 Inst. f. Biot. ');
    gotoxy(50,15);
    textcolor(yellow+blink);
    textbackground(blue);
    writeln('AUSWAHL');
    gotoxy(1,24);
    textcolor(magenta);
    textbackground(lightgray);
    writeln('Programmdatei : ',progdatei);
    normvideo;
end;
{*****}
function programm_waehlen: string;
var ff: text;
name: string;

error: word;
begin

```

```

error := getfilename('c:\timer\*.prg',name);
programm_waehlen:=name;
end;

{*****}
procedure progedit;
begin
  if progdatei='' then
  begin
    textcolor(red);
    gotoxy(30,5);writeln('kein Programm gew"hlt !');
    sound(880);
    delay(400);
    nosound;
    delay(1000);
    normvideo;
    exit
  end;
  SwapVectors;
  exec('edit.com',progdatei);
  Swapvectors;
  delay(1000);
end;
{*****}
function zeileverarbeiten(zeile:string;var zeilenword:word;var zeilenzeit:longint):boolean;
var codeh,codem,codes,h,m,s: integer;
sh,sm,ss,st:string;
relnummer: integer;

function relword(relnummer:integer):word;
var j,k: integer;
begin
  k:=1;
  if relnummer=1 then
  begin
    relword:=1;
    exit;
  end
  else begin
    for j:=1 to relnummer-1 do k:=2*k;
    relword:=k;
  end;
end;

begin
  zeileverarbeiten:=false;
  sh:=zeile[1]+zeile[2];
  sm:=zeile[4]+zeile[5];
  ss:=zeile[7]+zeile[8];
  val(sh,h,codeh);
  val(sm,m,codem);
  val(ss,s,codes);
  if (codeh<>0) or (codem<>0) or (codes<>0) then
  begin
    exit;
  end;
  zeilenzeit:=3600*h+60*m+s; {Schaltzeit in s}
  delete(zeile,1,9);{Zeit und erstes Leerzeichen in der Zeile 1"schen}
  while length(zeile)>2 do
  begin
    if (zeile[5]='n') or(zeile[5]='N') then
    begin
      st:=zeile[1]+zeile[2];
      val(st,relnummer,codes);
      if (codes<>0) or (relnummer<1) or (relnummer>16) then exit;
      delete(zeile,1,6);
      zeilenword:=zeilenword or relword(relnummer);
    end
    else if (zeile[5]='u') or (zeile[5]='U') then
    begin
      st:=zeile[1]+zeile[2];
      val(st,relnummer,codes);
      if (codes<>0) or (relnummer<1) or (relnummer>16) then exit;
      delete(zeile,1,7);
      zeilenword:=zeilenword and not relword(relnummer);
    end;
  end;
end;

```

```

        end
        else exit;
    end;
    zeileverarbeiten:=true;
end;

{*****}
procedure programm_reinziehen(datei:stringtype);
var f: text;
    i : integer;
    zeile: string; {aktuelle Zeile der Datei}
    zeilenword: word; {}
    zeilenzeit: longint;

begin
    zeilenword:=0;
    assign(f,progdatei);
    reset(f);
    timerfeldlaenge:=0; {Laufvariable}
    while not EOF(f) do
    begin
        timerfeldlaenge:=timerfeldlaenge+1;
        readln(f,zeile);
        if not zeileverarbeiten(zeile,zeilenword,zeilenzeit) then
        begin
            gotoxy(30,5);textcolor(red);
            writeln('Fehler in Zeile ',timerfeldlaenge:3,' korrigieren !');
            normvideo;
            delay(3000);
            exit;
        end;
        timerfeld[timerfeldlaenge].zeit:=zeilenzeit;
        timerfeld[timerfeldlaenge].steuerwort:=zeilenword;
    end;
end;

{*****}
procedure steuern(wort:word);
var i: integer;
    w: word;
    function power2(i:integer): word;
    var j:integer;
    begin
        w:=1;
        if i=0 then power2:=1
        else
            if i=1 then power2:=2
            else
                begin
                    for j:=1 to i do w:=2*w;
                    power2:=w;
                end;
            end;
    end;

begin
    for i:=1 to 16 do
    begin
        kanalarray[i]='aus';
        if (wort and power2(i-1))<>0 then kanalarray[i]='an';
        port[$301]:=lo(wort);
        port[$302]:=hi(wort);
        sound(60);delay(7);nosound;
    end;
end;

{*****}

procedure timerstart;
var aktsec: word;
    aktzeit: longint;
    ii:integer;
begin

```

```

{keine Programmdatei ausgew"hlt}
if progdatei='' then
begin
textcolor(red);
gotoxy(30,5);writeln('kein Programm gew"hlt !');
sound(880);
delay(400);
nosound;
delay(1000);
normvideo;
exit
end;
end;
repeat
{Uhr stellen}
uhr(st,min,sec);
aktzeit:=0;
aktsec:=0;
ii:=1;
repeat
begin
getrelativeTime(st,min,sec);

if aktsec<> sec then
begin
{hier ist eine sekunde um}
aktzeit:=aktzeit+1;
if timerfeld[ii].zeit=aktzeit then
begin
steuern(timerfeld[ii].steuerwort);
ii:=ii+1;
end;
steuerbild(relativetimestring,timestring,progdatei,kanalarray,namearray);
end;
aktsec:=sec;
end;
until (ii=timerfeldlaenge+1) or keypressed;
until keypressed;
end;

{*****}
procedure timertest;
var i: integer;
c: char;
s,s1: string;
h,m,se : integer;
zeit :longint;

begin

{keine Programmdatei ausgew"hlt}
if progdatei='' then
begin
textcolor(red);
gotoxy(30,5);writeln('kein Programm gew"hlt !');
sound(880);
delay(400);
nosound;
delay(1000);
normvideo;
exit
end;
end;

test:=true;
for i:=1 to timerfeldlaenge do
begin
zeit:= timerfeld[i].zeit;
h:=trunc(zeit/3600);
m:=trunc((zeit-h*3600)/60);
se:=zeit-h*3600-m*60;
str(h:2,s1);
s:=s1;
str(m:2,s1);
s:=s+':'+s1;

```

```

    str(se:2,s1);
    s:=s+' '+s1;
    steuern(timerfeld[i].steuerwort);
    steuerbild(s,timestring,progdatei,kanalarray,namearray);
    repeat until keypressed;
    if keypressed then c:=readkey;
    if c= ' ' then exit;
end;
test:=false;
end;
{*****}
procedure init;
var i:integer;
begin
test:=false;
progdatei:='';

for i:=1 to 16 do kanalarray[i]:='aus';
    namenlesen(namearray);
end;

procedure hauptmenu;
begin
    clrscr;
    textcolor(green);
    gotoxy(10,10);writeln('1 Programm w"hlen');
    gotoxy(10,12);writeln('2 Programm "ndern');
    gotoxy(10,14);writeln('3 Timer starten ');
    gotoxy(10,16);writeln('4 Timertest ');
    gotoxy(10,18);writeln('5 Kanalnamen');
    gotoxy(10,20);writeln('8 Ende');
    normvideo;
    status;
end;
{*****}
begin {Hauptprogramm}
    init;
    repeat
        hauptmenu;
        wahl:=readkey;
        case wahl of
            '1' :begin
                progdatei:=programm_waehlen;
                programm_reinziehen(progdatei);
            end;
            '2' :begin
                progedit;
                programm_reinziehen(progdatei);
            end;
            '3' :begin
                timerstart;
            end;
            '4' :begin
                timertest;
            end;
            '5' :begin
                exec('c:\timer\edit.com','namen.cfg');
            end;
        end;
    end;

    until wahl='8';
end.

```

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von 1994-1997 in der Arbeitsgruppe Biosensoren des Instituts für Biotechnologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Priv. Doz. Dr. habil. Uwe Spohn, für die Überlassung des interessanten Themas. Sein stets förderndes Interesse hat wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Bodo Fuhrmann möchte ich für seine tatkräftige Unterstützung bei der Entwicklung der elektronischen Meßtechnik sowie der dazu benötigten Software danken.

Ich danke Frau Riis für die Ermöglichung eines 8-monatigen Forschungsaufenthalt auf dem Gebiet optoelektronischer Meßtechniken am Institut „Medizinisches Labor-Engineering“ Radebeul Dresden und die Förderung meiner Arbeit.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Gübitz, der einen 2-monatigen Forschungsaufenthalt am „Institut für pharmazeutische Analytik“ in Graz, Österreich ermöglichte.

Herrn Reese und seinen Kollegen aus der Werkstatt des Fachbereichs Chemie danke ich für die außerordentlich präzise Anfertigung der benötigten mechanischen FIA-Bauelemente, wodurch die Exaktheit der in der Arbeit vorgestellten Messungen gewährleistet werden konnte.

Herrn Heinrich von der Max-Planck-Gruppe für Enzymologie der Peptidbindung (Werkstatt) danke ich für die erwiesene weitere technische Unterstützung.

Mein Dank gilt allen Fachbereichsangehörigen, die am Zustandekommen der Arbeit Anteil hatten.