



Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5905

Entwicklung eines optischen Biosensors für die toxikologische Notfalldiagnostik von Salicylat

W. Andlauer

Institut für Instrumentelle Analytik

April 1997

Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 5905

**Entwicklung eines optischen Biosensors für die
toxikologische Notfalldiagnostik von Salicylat**

Wolfgang Andlauer

Institut für Instrumentelle Analytik

von der Fakultät für Chemie der Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
1997

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

ISSN 0947-8620

Entwicklung eines optischen Biosensors für die toxikologische Notfalldiagnostik von Salicylat

Aufgrund der leichten Zugänglichkeit von Acetylsalicylsäure (Aspirin®) spielen Salicylat-Vergiftungen mit jährlich mehreren tausend Fällen in der Bundesrepublik eine bedeutende Rolle in der klinischen Toxikologie. Acetylsalicylsäure ist das am häufigsten verwendete Schmerzmittel. Nach der Einnahme wird der größte Teil sehr schnell zu Salicylat hydrolysiert. Von Salicylatvergiftungen betroffen sind vor allem Kinder: Bereits zwei bis drei Tabletten können bei Kleinkindern tödlich sein. Neben der im klinischen Labor eingesetzten sehr zeitaufwendigen Analytik ist eine schnellere und handlichere Meßmethode für Salicylat im Blut dringend erforderlich.

Im Salicylatbiosensor wird ein für Biosensoren neues Nachweisprinzip verwendet, das auf der Absorptionsänderung beruht, die bei der Enzym-Substrat-Komplexbildung zwischen Salicylathydroxylase und Salicylat entsteht.

Für den Aufbau des Biosensors werden nach einer Vorauswahl mehrere Immobilisierungsmethoden für Enzyme auf ihre Verwendbarkeit untersucht. Als besonders brauchbar stellte sich die Immobilisierung mittels Hohlfaser heraus, die im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelt wurde. Sie ermöglicht gute Diffusionsbedingungen bei gleichzeitig guten optischen und mechanischen Eigenschaften. Durch Aufkonzentrierung in der Hohlfaser werden hohe Enzymdichten erreicht, die den Aufbau eines miniaturisierten Sensorsystems zulassen, welches nur geringste Mengen an Enzym benötigt.

Im miniaturisierten Sensorsystem wird die Absorptionsänderung mit einem Mikrospektral-photometer und einer Licht emittierenden Diode (LED) gemessen.

Für die Salicylatbestimmung mittels Biosensor wird nur noch ein einziges, kleines Meßgerät benötigt. Der Verzicht auf Probenvorbereitung und die Kalibrationsfreiheit ermöglichen eine einfache und sichere Handhabung des Biosensors. Die sehr kurze Analysendauer, die sich auf die Meßzeit der Probe beschränkt, liefert den in der Notfalldiagnostik entscheidenden Zeitvorteil.

Längerfristig liegt neben dem niedrigen Preis der Biosensoren der wichtigste Vorteil in der einfachen Ausbaufähigkeit des Systems auf weitere Analyten. Der Biosensor eignet sich deshalb auch für den Einsatz in Arztpraxen oder kleineren Krankenhäusern, wo bisher auf Grund des fehlenden, teuren Fachpersonals keine entsprechende Analytik durchgeführt werden kann.

Development of an optical biosensor for the toxicological emergency diagnosis of salicylate

Because of the ready availability of acetylsalicylic acid (Aspirin[®]), salicylate poisoning plays a significant role in clinical toxicology, with several thousand cases per year in Germany. Acetylsalicylic acid is the most commonly used pain killer. Following ingestion, most of the dosage is rapidly hydrolyzed to salicylate. Children are especially at risk through salicylate poisoning. As few as two or three tablets can be lethal for small children. A faster and handier method for the determination of salicylate in blood is urgently needed as a supplement for the more time-consuming clinical laboratory methods.

The salicylate biosensor makes use of new principle of detection, based on the absorption changes occurring on formation of a complex between salicylate hydroxylase and salicylate.

For the construction of the biosensor, the applicability of a number of methods of enzyme immobilization was investigated. Immobilization in hollow fibres, which was newly developed in the course of this work, was found to be particularly advantageous. This method combines favourable diffusion conditions with good optical and mechanical properties. High enzyme densities could be achieved by concentration within the hollow fibres, thus enabling the construction of a miniaturized sensor system requiring minimal amounts of enzyme.

Absorption changes are measured in the miniaturized sensor system with a microspectrophotometer and a light-emitting diode (LED).

Salicylate determination with the biosensor requires a single, small instrument. The elimination of sample preparation and calibration-free operation allow simple and secure operation of the biosensor. The very short duration of analysis, consisting only of the time needed to measure the sample, provides the decisive advantage in clinical emergency diagnosis.

In the longer term, the most important advantage of the biosensor – other than its low price – lies in the fact that the system can readily be extended to other analytes. The biosensor is thus also suitable for use in medical practices or in smaller hospitals, where the absence of expensive trained personnel currently prevents the performance of the required chemical analyses.

1. EINLEITUNG	5
2. EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK	7
2.1 Methoden der Salicylatanalytik	7
2.2 Biosensoren	10
2.2.1 Definition und Klassifizierung	10
2.2.2 Optische Biosensoren	13
2.2.3 Neues Wirkprinzip für optische Biosensoren	16
2.3 Immobilisierung von Enzymen	19
2.3.1 Immobilisierungsmethoden	19
2.3.2 Immobilisierung in Polyacrylamid-Gelen	21
2.3.3 Immobilisierung mit Proteinen über Quervernetzung	22
2.3.4 Immobilisierung durch den Sol-Gel-Prozeß	23
2.3.5 Immobilisierung in Hohlfasern	26
3. PRAKTISCHE ARBEITEN UND ERGEBNISSE	28
3.1 Messungen in Lösung	28
3.2 Immobilisierungsmethoden	28
3.2.1 Immobilisierung in Polyacrylamid-Gelen	28
3.2.2 Immobilisierung mit Proteinen über Quervernetzung	30
3.2.3 Immobilisierung von Enzymen durch Sol-Gel-Verfahren	31
3.2.4 Immobilisierung in Hohlfasern	34
3.3 Meßbedingungen	41
3.4 Fehlerbetrachtung	41
4. MEßERGEBNISSE UND DISKUSSION	44
4.1 Untersuchungen in Lösung	44
4.1.1 Fluoreszenzspektren von Salicylathydroxylase	45
4.1.2 Absorptionsspektren von Salicylathydroxylase verglichen mit Glucoseoxidase und FAD	47
4.1.3 Differenzspektren von Salicylathydroxylase in Abhängigkeit der Salicylatkonzentration	51
4.1.4 Dosis-Wirkungskurve für Salicylat	52
4.1.5 pH-Wert-Einfluß	54
4.1.6 Temperatureinfluß	55
4.1.7 Schlußfolgerungen zu den Ergebnissen der Küvettenversuche für den Bau eines Biosensors unter Verwendung von Salicylathydroxylase	56

4.2 Orientierende Untersuchungen zur Auswahl einer geeigneten Immobilisierungsmethode	57
4.2.1 Immobilisierung in Polyacrylamid (PAA)	57
4.2.2 Immobilisierung mit Proteinen über Quervernetzung	64
4.2.3 Immobilisierung von Enzymen durch Sol-Gel-Verfahren	65
4.2.4 Immobilisierung in Hohlfasern	69
4.3 Charakterisierung des Hohlfasersensors in Lösung	72
4.3.1 Geschwindigkeit des salicylatinduzierten Signals	72
4.3.2 Einfluß der Sensorgestaltung auf die Reaktionsgeschwindigkeit	74
4.3.3 Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeit des Signals von 0,5 mM Salicylat	75
4.3.4 pH-Abhängigkeit des Signals	76
4.3.5 Temperaturabhängigkeit des Signals	78
4.3.6 Reversibilität und Reproduzierbarkeit der Messungen	80
4.3.7 Beschleunigte Regenerierung mit NADH	81
4.3.8 Reproduzierbarkeit der Sensoren	82
4.3.9 Normierung der Sensorsignale	83
4.3.10 Reproduzierbarkeit der Sensoren innerhalb einer Herstellungsladung	86
4.3.11 Lagerstabilität der Sensoren	87
4.3.12 Absorptionsänderung von Salicylathydroxylase bei höheren Salicylatkonzentrationen	89
4.3.13 Dosis-Wirkungskurve bei Hohlfaser-Immobilisierung	90
4.3.14 Auswertung der Dosis-Wirkungskurve bei zwei verschiedenen Wellenlängen	92
4.3.15 Auswertung der Spektren	93
4.4 Charakterisierung des Hohlfasersensors in Blut	96
4.4.1 Messung in verdünntem Blut	96
4.4.2 Messung unter Blutzellenausschluß	98
4.4.3 Blutinduzierte Signaländerung	99
4.4.4 Chloridinduzierte Absorptionsänderungen	100
4.4.5 Hemmung des Salicylatsignals in Abhängigkeit von der Chloridkonzentration	101
4.4.6 Chlorideinfluß auf die Geschwindigkeit des Signals von 0,5 mM Salicylat	102
4.4.7 Dosis-Wirkungskurve für Chlorid	103
4.4.8 Auswertung der Dosis-Wirkungskurve mit Hilfe des Absorptionsspektrums nach der Beprobung	104
4.4.9 Vereinfachter Sensoreinsatz durch eine neue Auswertungsmethode	106
4.4.10 Dosis-Wirkungskurve in Gegenwart von 100 mM Chlorid	107
4.4.11 Messungen in Vollblut	109
4.5 Störungen und Querempfindlichkeiten	111
4.5.1 Bilirubinabsorption in der Durchflußküvette ohne Hohlfaser	111
4.5.2 Störung der salicylatinduzierten Absorptionsänderung ohne aufgesetzte Lichtleiter	112
4.5.3 Eliminierung von Störeinflüssen durch aufgesetzte Lichtleiter	114

4.5.4 Querempfindlichkeiten	116
4.5.5 Vergleich von herkömmlicher Salicylatanalytik und Salicylatbestimmung mittels Biosensor	118
5. AUSBLICK	120
5.1 Anpassung des Lampenspektrums mit Hilfe von Fluoreszenzfiltern	120
5.2 Aufbau eines Sensorstäbchens	121
5.3 Meßküvette für Sensorstäbchen	122
6. ZUSAMMENFASSUNG	123
7. LITERATURVERZEICHNIS	126
8. ANHANG	132
8.1 Verbrauchsmaterial und Chemikalien	132
8.2 Meßgeräte und Ausstattung	133
8.3 Zusammensetzung von Immobilisierungsmischungen	134
8.3.1 Immobilisierung in Polyacrylamid-Gelen	134
8.3.2 Immobilisierung mit Proteinen über Quervernetzung	134
8.3.3 Immobilisierung von Enzymen durch Sol-Gel-Verfahren	134
8.3.4 Immobilisierung in Hohlfasern	135

Abkürzungsverzeichnis:

A	Absorption
a.u.	arbitrary units (willkürliche Einheiten)
BIS	N,N'-Methylenbis(acrylamid)
ΔA	Absorptionsänderung
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid (oxidierte Form)
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinucleotid (reduzierte Form)
GC	Gaschromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
I	Intensität
LED	Licht emittierende Diode
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (reduzierte Form)
ox.	oxidiert
PAA	Polyacrylamid
Puf	Puffer
red.	reduziert
RSA	Rinderserumalbumin
Sal	Salicylat
T _{1/2}	Halbwertszeit (Die Zeit, in der eine Reaktion 1. Ordnung zur Hälfte abläuft)
TMOS	Tetramethoxysilan
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1. Einleitung

In vielen Krankenhäuser werden bis heute die toxikologischen Analysen nicht selbst durchgeführt, da die herkömmlichen Analysemethoden zum einen sehr kostenintensiv sind und zum anderen Bedienung durch qualifiziertes Personal erfordern.

Die Notwendigkeit einer einfach zu handhabenden, schnellen Analytik für die klinisch-toxikologische Diagnostik in Krankenhäusern geht aus Denkschriften der Deutschen Forschungsgemeinschaft [DFG, 1983; DFG, 1989] besonders deutlich hervor.

„Man schätzt, daß bei uns etwa 200 000 Vergiftungsfälle pro Jahr - meist als Notfälle - in die Krankenhäuser eingeliefert werden und sofortiger gezielter ärztlicher Hilfe und rascher Entgiftungsmaßnahmen bedürfen.

Diese Patienten müssen auf bloßen Verdacht hin, teilweise mit invasiven, nicht ungefährlichen Verfahren, symptomatisch behandelt werden, da gewöhnlich toxikologische Analysen in den Krankenhäusern nicht möglich sind.

Bei etwa einem Viertel aller Vergiftungen wurde jedoch nicht das vermutete, sondern ein ganz anderes Gift aufgenommen, wie entsprechende Untersuchungen an Kliniken ergeben haben.“

Aufgrund der leichten Zugänglichkeit von Acetylsalicylsäure (Aspirin®) spielen Salicylat-Vergiftungen mit jährlich mehreren tausend Fällen in der Bundesrepublik eine bedeutende Rolle in der klinischen Toxikologie [DFG, 1983]. Acetylsalicylsäure ist das am häufigsten verwendete Schmerzmittel. Nach der Einnahme wird der größte Teil sehr schnell zu Salicylat hydrolysiert [Faith et al., 1989]. Von Salicylatvergiftungen betroffen sind vor allem Kinder: Bereits zwei bis drei Tabletten können bei Kleinkindern tödlich sein [Mutschler, 1975]. Eine Besonderheit der Salicylat-Vergiftung bei Kindern ist das plötzliche Auftreten von Erkrankungszeichen erst mehrere Stunden nach Einnahme einer Überdosis. Dann eingeleitete Entgiftungsmaßnahmen, wie z. B. eine Magenspülung, erfolgen meist zu spät [Goodman, Gilman, 1984]. Neben der im klinischen Labor eingesetzten sehr zeit-aufwendigen Analytik ist also eine schnellere und handlichere Meßmethode für

Salicylat im Blut dringend erforderlich. Diese könnte sowohl für einen ersten, nur qualitativen Giftnachweis, als auch zur Kontrolle des therapeutischen Erfolges von Entgiftungsmaßnahmen eingesetzt werden [Yip et al., 1994]. Darüber hinaus wird bei der Behandlung von akutem rheumatischem Fieber auf Grund der sehr hohen verwendeten Dosen, besonders für ältere Patienten, eine ständige Überwachung von Salicylat-Blutspiegeln empfohlen [Netter et al., 1985; Mutschler, 1975].

Ziel dieser Arbeit ist die *Entwicklung eines optischen Biosensors für die toxikologische Notfalldiagnostik von Salicylat.*

Der Salicylatbiosensor verwendet ein für Biosensoren neues Nachweisprinzip, das auf der Absorptionsänderung beruht, die bei der Enzym-Substrat-Komplexbildung zwischen Salicylathydroxylase und Salicylat entsteht [White-Stevens, Kamin, 1972a]. Für den Aufbau des Biosensors muß zunächst eine geeignete, lichtdurchlässige Immobilisierungsmatrix für das verwendete Enzym gefunden werden.

Anschließend erfolgt eine umfassende Charakterisierung und der Test des Biosensors an Blutproben.

2. Einführung in die Thematik

2.1 Methoden der Salicylatanalytik

Zur Salicylatbestimmung wurde eine Vielzahl an Methoden entwickelt. Die Vor- und Nachteile der gängigsten werden hier kurz dargestellt.

Photometrische Bestimmung mit der Trinder-Reaktion

Salicylat wird traditionell mit der Trinder-Reaktion gemessen. Die Methode beruht auf der Reaktion von Salicylat mit Eisen(III)ionen. Der entstehende rote Farbstoff wird photometrisch vermessen. Dies ist ein sehr preiswerter Nachweis, der sich mit entsprechenden Geräten auch automatisieren läßt [Hallbacher, Guder, 1991]. Der wesentliche Nachteil der Reaktion ist ihre geringe Spezifität für Salicylat, wodurch Querempfindlichkeiten auftreten [Kang et al., 1983]. Die Probenvorbereitung schließt die Gewinnung von Serum oder Plasma mit ein, da sich mit Vollblut sehr hohe Nullwerte ergeben würden. Weiterhin sind einige Pipettierschritte und die Zeitnahme notwendig. Die Kalibration erfolgt über eine Salicylatstandardlösung [Trinder, 1954].

Photometrische Bestimmung über enzymatische Katalyse

Zur Bestimmung über die enzymatische Katalyse wird das Enzym Salicylat-hydroxylase verwendet. Salicylathydroxylase katalysiert die Reaktion von Salicylat zu Catechol unter stöchiometrischem Verbrauch an O_2 und NADH. Hierbei dient die Abnahme der Absorption des NADH bei 340 nm als Meßgröße für die Salicylatbestimmung (vgl. 2.2.3 Neues Wirkprinzip für optische Biosensoren).

Gegenüber der Trinder-Reaktion zeichnet sich die Salicylatbestimmung über die enzymatische Katalyse durch eine höhere Spezifität aus. Dennoch kommt es auch hier zu störenden Querempfindlichkeiten (vgl. 4.5.4 Querempfindlichkeiten). Wie bei der Trinder-Reaktion erfolgt die Messung mit Serum oder Plasma, das zunächst noch auf eine geeignete Konzentration verdünnt wird. Während der Messung müssen

Temperatur und Zeitangaben exakt eingehalten werden. Die Kalibration wird mit Salicylatstandardlösung durchgeführt.

Elektrochemische Bestimmungen

In der Literatur werden verschiedene elektrochemische Methoden beschrieben. Sie basieren ebenfalls auf der durch Salicylathydroxylase katalysierten Umwandlung von Salicylat zu Catechol. Je nach Methode wird die Sauerstoffkonzentration [Rahni et al., 1986; You, 1985], die Kohlendioxidkonzentration [Fonong, Rechnitz, 1984] oder Catechol [Neumayr et al., 1995] als Maß für die Salicylatkonzentration bestimmt. Störungen können hierbei durch interferierende Redoxreaktionen auftreten. Da die Reaktion sauerstoffabhängig ist und Sauerstoff im Blut sehr leicht an Hämoglobin bindet, wird auch hier in Serum oder Plasma gemessen [You, 1985]. Nach Verdünnen der Serumprobe und Zusatz von NADH erfolgt die Messung unter exakter Temperierung und Zeitmessung. Höherer Probendurchsatz kann durch Automatisierung der Methoden erreicht werden [Neumayr et al., 1995].

Salicylatbestimmung mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Salicylat wird mit einem organischen Lösungsmittel, das einen internen Standard enthält, aus Serum extrahiert. Der konzentrierte Extrakt wird durch HPLC aufgetrennt und Salicylat über seine Absorption bei 248 nm detektiert. Die Kalibration erfolgt über einen Salicylatstandard [Baselt, 1980]. Der Hauptvorteil der Salicylatbestimmung mittels HPLC liegt in der Möglichkeit weitere relevante Substanzen in einem Meßvorgang zu bestimmen [Carlson et al., 1987]. Nach vorangegangener Probenvorbereitung ermöglicht auch diese Methode über eine Automatisierung einen hohen Probendurchsatz [Peng et al., 1978]. Eine mögliche Fehlerquelle ist die unspezifische Detektion im ultravioletten Bereich, die es nicht erlaubt Untergrundstörungen zu erkennen. Die Bestimmung ist sehr zeitaufwendig und benötigt eine teure apparative Ausstattung.

Salicylatbestimmung mittels Gaschromatographie (GC)

Die gaschromatographische Bestimmungsmethode für Salicylat ist spezifisch und empfindlich. Sie benötigt neben der üblichen Probenvorbereitung eine zusätzliche chemische Derivatisierung, wie etwa Silylierung, um Salicylat der Gaschromatographie zugänglich zu machen. Die chemische Derivatisierung ist sehr zeitaufwendig (bis zu 60 Minuten) und kann zu verschiedenen Produkten führen [Tam et al., 1979]. Wie bei der HPLC sind auch mit der Gaschromatographie Mehrkomponentenbestimmungen möglich. Der apparative Aufwand ist ebenfalls mit dem einer HPLC-Anlage vergleichbar [Peng et al., 1978].

Die beschriebenen Methoden benötigen alle eine zeitaufwendige Probenvorbereitung, die zumindest die Gewinnung von Serum oder Plasma und einige maßanalytische Schritte beinhaltet.

Besonders aufwendig ist die Probenvorbereitung für die Gaschromatographie und die HPLC. Beide Methoden erfordern eine teure Ausrüstung und ein hohes Maß an Fachkenntnis. Trotz ihrer Spezifität sind sie somit ungeeignet für die Notfalldiagnostik. [Chubb et al., 1986].

Die Probenvorbereitung für elektrochemische Bestimmungsmethoden ist nicht weniger aufwendig, als die für optische Methoden. Die elektrochemischen Methoden setzen jedoch mehr Fachkenntnis voraus, so daß in der Routineanalytik vor allem optische Methoden eingesetzt werden. Nach wie vor wird meist die wenig spezifische Trinder-Reaktion gegenüber der spezifischeren enzymatischen Bestimmung bevorzugt [You, Bittikofer, 1984], wobei aus preislichen Gründen die geringe Spezifität in Kauf genommen wird.

Eine Alternative zur herkömmlichen Salicylatanalytik könnten preiswerte, einfach zu handhabende Biosensoren sein, die eine schnelle Bestimmung ohne Probenvorbereitung ermöglichen.

2.2 Biosensoren

2.2.1 Definition und Klassifizierung

Schon seit vielen Jahren werden Enzyme in der analytischen Chemie eingesetzt. Die ihnen von der Natur gegebene Spezifität ermöglicht mittlerweile ihren routinemäßigen Einsatz zur Bestimmung von etwa 80 verschiedenen Substanzen [Scheller, Schubert, 1989].

Leland Clark begründete mit seiner Idee, Enzyme an Elektroden zu immobilisieren, eine neue Sensorgeneration, die *Biosensoren* [Clark, Lyons, 1962]. Biosensoren sind eine Untergruppe der Chemosensoren. Entsprechend gilt auch für sie die IUPAC-Definition (International Union of Pure and Applied Chemistry) aus dem Jahr 1991 [Hulanicki et al., 1991], wonach chemische Sensoren Meßwertaufnehmer sind, die eine chemische Information in ein analytisch auswertbares Signal umwandeln.

Chemische Sensoren bestehen aus zwei funktionellen Einheiten, dem Rezeptor (chemisch sensitive Schicht) und dem Transducer (Übertragungseinheit) (Abb. 2.1).

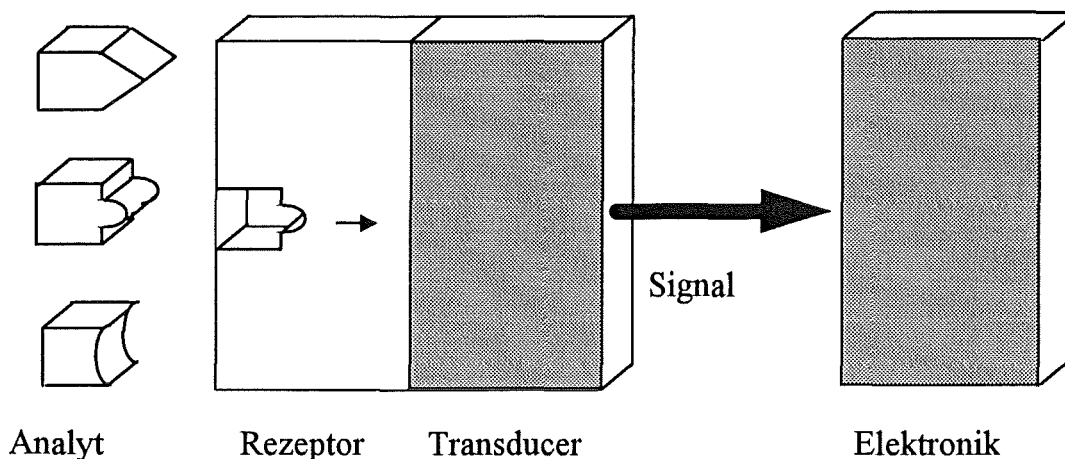


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau eines chemischen Sensorsystems

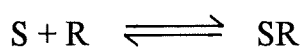
Als Rezeptor der Biosensoren dient eine matrixgebundene biologisch aktive Substanz. Meist handelt es sich dabei um Enzyme oder Antikörper, die Biosensoren eine hohe

Spezifität verleihen [Brooks, 1991]. Der Transducer, der selbst relativ unspezifisch sein kann, übersetzt die vom Rezeptor kommende chemische Information in ein elektronisch auswertbares Signal. Das Meßsignal wird verstärkt und in einer Auswerteeinheit zu einem Meßwert verarbeitet.

Die Biosensoren lassen sich nach der Art ihres sensitiven Elements oder nach der Art des verwendeten Transducers einteilen. Eine Einteilung nach dem stofferkennenden Sensorelement ist sinnvoll, wenn die selektive Bindungsfähigkeit im Vordergrund steht. Hierbei werden zwei Grundtypen unterschieden: Metabolismus- und Affinitäts-sensor [Newman, Turner, 1994]. Im Metabolismussensor ist die molekulare Erkennung von Substraten mit einer enzymkatalysierten chemischen Umsetzung zu den entsprechenden Produkten verbunden. Nach der katalytischen Umsetzung des Analyten liegt das Enzym wieder im Ausgangszustand vor. Detektiert wird die Konzentrationsänderung einer bei der Reaktion entstehenden oder verbrauchten Komponente [Danielsson et al., 1981]. Im Affinitätssensor wird die durch die Bindung eintretende physikalische Veränderung selbst überwacht. Nach dem Meßvorgang muß der Ausgangszustand durch Spalten der Bindung wieder hergestellt werden [Schultz et al., 1982] (Abb. 2.2).

Metabolismussensor

Affinitätssensor



Substratverbrauch und Produktbildung

Komplexbildung

S = Substrat, R = Rezeptor, P = Produkte

Abb. 2.2: Funktionsprinzipien von Biosensoren

Zum Vergleich der Nachweisgrenzen und Einsatzgebiete unterschiedlicher Sensoren ist eine Klassifizierung anhand der eingesetzten Transducer und deren Meßgrößen angeraten [Göpel et al., 1991; Cammann et al., 1991]. Einen Überblick über die unterschiedlichen Klassen von Sensoren gibt die Tabelle 2.1.

Tab. 2.1: Klassifizierung der Sensoren

Art des Transducers	Meßprinzip/Meßgröße
optisch	Absorption
	Fluoreszenz
	Lumineszenz
	Reflexion
elektrochemisch	Potentiometrie
	Amperometrie
	Voltammetrie
	Feldeffekt
elektrisch	Oberflächenleitfähigkeit
	Elektrolytleitfähigkeit
massensensitiv	Piezoelektrizität
	Oberflächenwellen (Surface Acoustic Wave, SAW)
thermisch	Reaktionswärme
	Absorptionswärme

Für den praktischen Einsatz müssen Biosensoren eine Reihe von Anforderungen erfüllen:

Selektivität:

Der Sensor sollte den zu erfassenden Analyten in der verwendeten Matrix möglichst ohne Querempfindlichkeiten auf andere Verbindungen detektieren.

Sensitivität:

Der Sensor sollte entsprechend seiner Anwendung hinreichend empfindlich auf die jeweilige Konzentration des zu messenden Analyten reagieren.

Reproduzierbarkeit:

Die Sensoren einer Herstellungsladung sollten unter gleichen Bedingungen in übereinstimmender Weise reagieren.

Stabilität:

Die Sensoren sollten möglichst lange lagerbar und dann ohne Neukalibrierung einsetzbar sein.

Reversibilität:

Wird der Sensor für kontinuierliche oder wiederholte Messungen eingesetzt, so sollte er nach Kontakt mit dem Analyten vollständig und schnell regenerierbar sein.

Ferner sollten Biosensoren aus Wirtschaftlichkeits- und Mobilitätsgründen eine möglichst minimale Größe aufweisen sowie geringe Herstellungskosten verursachen.

2.2.2 Optische Biosensoren

Optochemische Sensoren werden in Analogie zur Elektrochemie gelegentlich auch als Optoden [Luebbers, Opitz, 1975] oder Optroden (optische Elektroden) [Hirschfield et al., 1983] bezeichnet. Optische Biosensoren, die eine Untergruppe der optochemischen Sensoren darstellen, umfassen eine sehr heterogene Gruppe, bei der die Wechselwirkung eines immobilisierten, biologisch aktiven Materials mit Licht durch ein optoelektronisches Element erfaßt wird. Sie verfügen deshalb neben dem Transducerelement auch über eine Lichtquelle [Scheller, Schubert, 1989].

Allgemein bieten optochemische Sensoren gegenüber herkömmlichen elektrochemischen Sensoren eine Reihe von Vorteilen [Seitz, 1984; Janata, 1992]:

- Optische Sensoren benötigen kein Referenzelement. Es genügt, das Meßsignal in Relation zu einer Referenzintensität zu setzen, wie es sich beispielsweise unter Verwendung eines isosbestischen Punkts des Spektrums erhalten läßt.
- Die Empfindlichkeit der optischen Sensoren kann dem benötigten Meßbereich in weiten Grenzen durch Erhöhung der absorbierenden Rezeptorschicht angepaßt werden.

- Optische Signale werden nicht durch elektromagnetische Felder beeinflusst. Die Sensoren können daher auch ohne elektrische Abschirmung in elektromagnetisch störenden Umgebungen eingesetzt werden.
- Optische Meßgeräte können sich für „in vivo“ Messungen eignen, die mit elektrochemischen Sensoren oft nicht möglich sind, ohne die biologische Umgebung zu stören [Turner, 1993].
- Optische Sensoren können sehr stabil sein, wenn sie selbstkalibrierend gestaltet werden. Beispielsweise läßt sich ein hochstabiler pH-Sensor fertigen, in dem bei zwei verschiedenen Wellenlängen die Höhe der sauren bzw. basischen Form des Indikators gemessen wird. Der pH-Wert ergibt sich dann unabhängig von Austragsphänomenen aus dem Verhältnis der beiden Indikatorformen [Wolfbeis et al., 1984].
- Die Verwendung eines Spektralphotometers ermöglicht Multikomponentenanalysen, wenn sich die verschiedenen Rezeptoren in ihrem Absorptionsverhalten deutlich unterscheiden. So wurde von einem Sensor berichtet, der simultan auf O₂ und CO₂ anspricht [Opitz, Luebbers, 1976].
- Durch Messungen bei verschiedenen Wellenlängen können Signalstörungen erkannt und eliminiert werden. Außerdem lassen diese Messungen Rückschlüsse auf die Einsatzbereitschaft und den Austauschzeitpunkt des Sensors zu.

Im allgemeinen haben optische Sensoren folgende Nachteile:

- Beim Austausch der Rezeptorschicht muß die optimale Kopplung an den Transducer gewährleistet sein. Der Austausch von Rezeptor und Transducer, als Einheit - wie bei elektrochemischen Sensoren - ist aus Preisgründen nicht möglich.

- Die Messung kann unter Umständen durch Umgebungs- und Streulicht beeinträchtigt werden. Dies kann durch Lichtausschluß oder mit Hilfe von Modulationstechniken verhindert werden.
- Im Vergleich zu elektrochemischen Sensoren verfügen optische Sensoren oft über einen kleineren Meßbereich. So besitzt die pH-Elektrode einen Meßbereich größer als 12 Zehnerpotenzen, ein optischer pH-Sensor nur von zwei Zehnerpotenzen [Peterson et al., 1980].
- Die Miniaturisierung optischer Sensoren wird durch die Dicke der Rezeptorschicht begrenzt. Je dünner die Rezeptorschicht ist, um so geringer wird die Intensität des gemessenen Signals. Dies erschwert wiederum die Meßtechnik.
- Die Stabilität optischer Sensoren ist durch die Haltbarkeit der Rezeptorschicht begrenzt, die unter intensiver Lichteinwirkung geschädigt werden kann.
- Die für optische Sensoren benötigte Schichtdicke der Rezeptoren verlangsamt Stoffübergangsreaktionen und damit die Ansprechzeiten [Zhu, 1990; Beswick, 1988].

Die Nachteile optischer Sensoren verdeutlichen, daß ihr praktischer Nutzen entscheidend von der Entwicklung stabiler, möglichst dünner Schichten mit hohem Rezeptorgehalt abhängt [Czolk, 1990; Lumpp, 1992]. Für optische Biosensoren müssen die zur Detektion verwendeten Biomoleküle in einer Matrix immobilisiert werden, in der die biologische Aktivität erhalten bleibt [Sans, 1993].

2.2.3 Neues Wirkprinzip für optische Biosensoren

Ein neuartiges Wirkprinzip für optische Biosensoren beschränkt sich auf den spezifischen Schritt der enzymatischen Katalyse, der sogenannten Enzym-Substrat-Komplexbildung.

Zur Spezifität des Enzym-Substrat-Komplexes gibt es zwei verschiedene Theorien: Nach der bereits 1894 von Emil Fischer formulierten *Schlüssel-Schloß-Theorie* [Fischer, 1894], liegt das aktive Zentrum als starre, räumlich präformierte Matrix vor, die nur solche Substrate bindet, die zu ihrer Eigenstruktur wie ein Schlüssel zum Schloß passen. Eine modernere und zutreffendere Formulierung von Koshland ist als *Anpassungstheorie* (engl.: induced fit theory) [Koshland, 1958] bekannt geworden. Demnach sind Enzym und Substrat in der Lage, gegenseitige Strukturveränderungen (Konformationsänderungen) zu induzieren, die zu komplementären und im Sinne der Katalyse aktiveren Zuständen führen, während der Enzym-Substrat-Komplex ausgebildet wird [Römpp, 1995].

Als spezifisches Enzym für einen Salicylatbiosensor eignet sich die Salicylathydroxylase [EC 1.14.13.1]. Die Salicylathydroxylase, die auch als Salicylatmonooxygenase bezeichnet wird, ist ein Flavoenzym, das aus *Pseudomonas cepacia* [ATCC 29352], einem Bodenbakterium, isoliert wird. *Pseudomonas cepacia* wird hierzu auf einem Nährmedium kultiviert, das Salicylat als einziges kohlenstoffhaltiges Substrat enthält. Das Enzym besteht aus zwei Untereinheiten, mit je einem Molekül FAD. Seine Molmasse beträgt 91 000 [White-Stevens, Kamin, 1972a].

Die Salicylathydroxylase katalysiert die Reaktion von Salicylat unter Decarboxylierung und Hydroxylierung zu Catechol. Die Umsetzung erfolgt unter stöchiometrischem Verbrauch an NADH und Sauerstoff [White-Stevens, Kamin, 1972a] (Abb. 2.3).

Der Verbrauch an NADH führt zu einer Absorptionsabnahme bei 340 nm [Longenecker et al, 1984; You, Bittikofer, 1984], welche in enzymatischen Salicylat-Test-Kits als Meßgröße für die Salicylatbestimmung dient [GDS, 1995]. Ein Salicylat-Test-Kit beinhaltet alle Chemikalienlösungen (Enzym, NADH und

Salicylatstandard, jeweils in Puffer gelöst), die benötigt werden, um eine photometrische Bestimmung durchzuführen.

Die Reaktion ist so jedoch für einen Biosensor nicht geeignet, da das teure und vor allem instabile NADH vorgelegt werden muß. In der Literatur allerdings wird eine stabile Komplexbildung zwischen Salicylat und Salicylathydroxylase in Abwesenheit von NADH beschrieben, die sich sehr gut als Wirkprinzip für einen Affinitätsbiosensor eignet [White-Stevens, Kamin, 1972b]. Der Vorteil dieses Wirkprinzips liegt in der Einschränkung des Meßvorgangs auf den spezifischen biochemischen Schritt, die es ermöglicht, Störeinflüsse durch unerwünschte Redoxvorgänge zu minimieren [Moss, 1994].

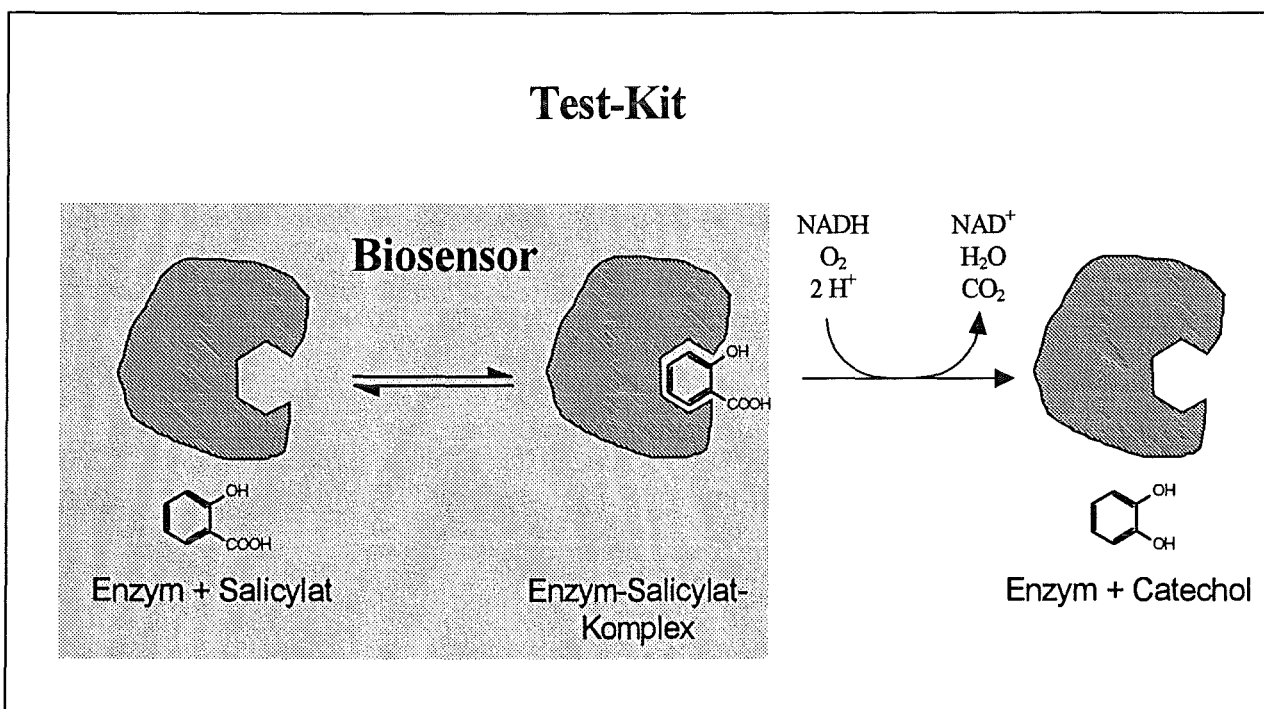


Abb. 2.3: Darstellung des Biosensorwirkprinzips und der gesamten enzymatischen Reaktion

Durch die Enzym-Substrat-Komplexbildung zwischen Salicylathydroxylase und Salicylat erfolgen Änderungen im Absorptionsspektrum der im Enzym enthaltenen Flavingruppe, die zur Quantifizierung des vorhandenen Salicylats verwendet werden können [White-Stevens, Kamin, 1972a]. Alternativ könnte auch die bei der

Komplexbildung veränderte Flavinfluoreszenz herangezogen werden [Wang et al., 1984].

Da Salicylathydroxylase aus Kostengründen nur in begrenzter Menge zur Verfügung steht, wird für Vorversuche die sehr preiswerte Glucoseoxidase [EC 1.1.3.4] verwendet. Die aus *Aspergillus niger* gewonnene Glucoseoxidase ist ein Dimer (Molmasse 168 000) mit zwei Molekülen FAD. Da auch Salicylathydroxylase ein flavinhaltiges Enzym ist, besitzen beide eine vergleichbare Absorptionscharakteristik. Die Glucoseoxidase katalysiert die Oxidation von β -D-Glucose unter Verbrauch von Sauerstoff (Abb. 2.4), wobei FAD zu FADH₂ reduziert wird. Diese Reduktion läßt sich mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie nachweisen [Belitz, Grosch, 1987].



Abb. 2.4: Enzymatische Katalyse der Oxidation von β -D-Glucose

2.3 Immobilisierung von Enzymen

2.3.1 Immobilisierungsmethoden

Für den Einsatz in Biosensoren werden Enzyme immobilisiert. Durch die Immobilisierung lassen sich Strömungs- und Handhabungsprobleme minimieren [Carr, Bowers, 1980]. In einigen Fällen können die Enzymeigenschaften (Aktivität und Stabilität) vorteilhaft verändert werden [Cabral, Kennedy, 1993].

An die Immobilisierungsmatrix werden folgende Anforderungen gestellt:

- Verhinderung von Enzymaustrag
- Erhalt der Aktivität während und nach der Präparation
- Chemische und mechanische Stabilität über einen längeren Zeitraum
- Schnelle Diffusion des Analyten durch die Matrix zum Akzeptor
- Ausschluß von Blutzellen aus dem Lichtstrahl
- Gute Transparenz und hohe Enzymdichte für optische Messungen

Drei grundsätzliche Methoden sind bei der Immobilisierung zu unterscheiden [Römpp, 1995]:

- Quervernetzung:
Die Quervernetzung der Enzyme erfolgt auf chemischem Wege, entweder untereinander oder mit anderen Polymeren, wie wasserunlösliche Polysaccharide oder hochmolekulare Proteine.
- Bindung an Träger:
Die Bindung an einen Träger erfolgt durch Adsorption, Ionenbindung oder kovalente Bindung.

- **Einschluß:**

Enzyme werden in eine semipermeable Membran in Form von Gelen, Mikrokapseln oder Hohlfasern immobilisiert.

Die durch Bindung an Träger erzielten Schichtdicken sind selten ausreichend für optische Messungen. Höhere Schichtdicken lassen sich mit Quervernetzungs- oder Einschlußmethoden erreichen. Ihre Eignung für eine bestimmte Zielstellung muß in der Regel empirisch ermittelt werden [Scheller, Schubert, 1989].

2.3.2 Immobilisierung in Polyacrylamid-Gelen

Polyacrylamid ist die zur Enzymimmobilisierung am meisten verwendete Polymermatrix. Einer der Gründe für diese Popularität ist der stark hydrophile Charakter, den die Polymere durch die primären Aminogruppen erhalten [Kennedy, Cabral, 1983]. Da die Gele nicht ionisch sind, werden die pH-Eigenschaften des freien Enzyms kaum verändert. Außerdem wird der Analyt weder akkumuliert noch von der Matrix abgestoßen. Die geringe Wechselwirkung zwischen Enzym und Matrix begünstigt jedoch Austragseffekte, die sich nur durch starke Quervernetzung der Gele vermeiden lassen [Kierstan, Coughlan, 1985]. Für einen hohen Vernetzungsgrad ist neben der Menge an Quervernetzermolekülen auch der Sauerstoffausschluß entscheidend. Nachteil des hohen Vernetzungsgrads sind verschlechterte Diffusionsbedingungen. Dies macht sich besonders bei höhermolekularen Analyten bemerkbar [Kierstan, Coughlan, 1991].

Das Verfahren zur Herstellung von Polyacrylamid-Gelen ist vergleichbar mit dem, das zur Herstellung von Elektrophoresegelen verwendet wird [Raymond, Nakamichi, 1962]. Diese Methode basiert auf einer radikalischen Polymerisierung von Acrylamid in wäßriger Lösung, die das gelöste Enzym und einen Quervernetzer, meist N,N'-Methylenbis(acrylamid) (BIS) enthält.

Die Polymerisierung erfolgt in Stickstoffatmosphäre, um Störungen durch Sauerstoff zu verhindern. Da die Reaktion stark exotherm ist, muß das Enzym durch Eiskühlung vor Denaturierung geschützt werden. Gestartet wird die Polymerisierung mit Kaliumperoxodisulfat ($K_2S_2O_8$) oder Riboflavin. Als Katalysator dient entweder β -Dimethylaminopropionitril (DMAPN) oder N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) [Kennedy, Cabral, 1983]. Die entstehenden Polyacrylamid-Gele sind vollständig wasserunlöslich, transparent und chemisch stabil [Fawcett, Morris, 1966]. Nach dem Waschen können sie entweder in Lösung oder gefriergetrocknet gelagert werden [Goldstein, Manecke, 1976].

2.3.3 Immobilisierung mit Proteinen über Quervernetzung

Enzymmoleküle können direkt miteinander vernetzt werden. Diese Vernetzung ermöglicht zwar eine höhere Enzymdichte, ist jedoch sehr ineffizient, da ein Teil des Enzyms hauptsächlich als Matrix dient, wodurch sich die Enzymaktivität stark verringert [Barker, 1987].

Als Matrix besser geeignet sind Proteine wie Albumin, Gelatine oder Collagen [Kennedy, Cabral, 1987]. Meist wird hierfür Rinderserumalbumin (RSA) verwendet, dessen hoher Lysingehalt gute Vernetzung ermöglicht [Gupta, Mattiasson, 1992]. Die so immobilisierten Enzyme sind widerstandsfähiger gegen proteolytische und thermische Inaktivierung [Cohenford et al., 1986]. Zu starke Vernetzung kann die Aktivität der Biomoleküle verringern. Dies wird durch intramolekulare Vernetzung und Veränderung bzw. Blockierung der aktiven Seite der Biomoleküle verursacht. Aktivitätsverluste lassen sich durch Verwendung niedriger Biomolekül- und Vernetzerkonzentrationen gering halten [Taylor, 1991].

Die Immobilisierung von Enzymen in Albumin-Polymeren ist eine Methode, die die Vorteile des Geleinschlusses mit denen der kovalenten Kopplung an eine Matrix vereint. Diese Methode beruht auf der Vernetzung des Enzymproteins mit der Matrix durch bi- oder multifunktionelle Reagenzien. Glutaraldehyd ist hierfür das gebräuchlichste Vernetzermolekül [Yeung et al., 1979; Cohenford et al., 1983]. Mit seinen beiden Aldehydgruppen kann Glutaraldehyd, unter Bildung Schiffscher Basen, zwischen Aminogruppen der Matrix und des Enzymproteins Brücken bilden (Abb. 2.5) [Chibata, 1978].

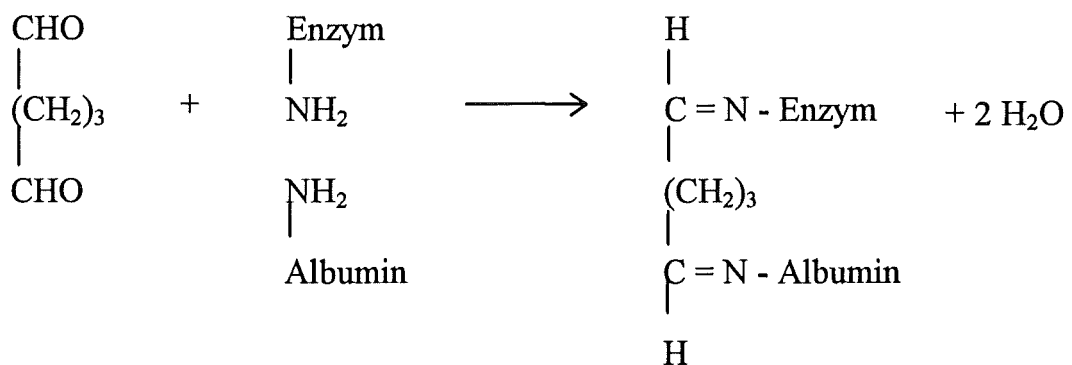


Abb. 2.5: Vernetzung durch Glutaraldehyd [Guilbault et al., 1991]

2.3.4 Immobilisierung durch den Sol-Gel-Prozeß

In der Literatur [Braun, Shtelzer, 1994] wird die Immobilisierung von Enzymen mit Hilfe eines Sol-Gel-Prozesses beschrieben. Als Sol-Gel-Prozeß wird ein Verfahren bezeichnet, bei dem aus einer flüssigen Eduktmischung, dem sogenannten Sol, bestehend aus einem Alkoxysilan (z. B. Tetramethoxysilan), Wasser und weiteren Komponenten, durch Polykondensationsreaktionen ein Gel entsteht [Colomban, 1989; Inoue et al., 1992]. Durch anschließende Trocknung kann das Gel in ein poröses Glas überführt werden (Abb. 2.6).

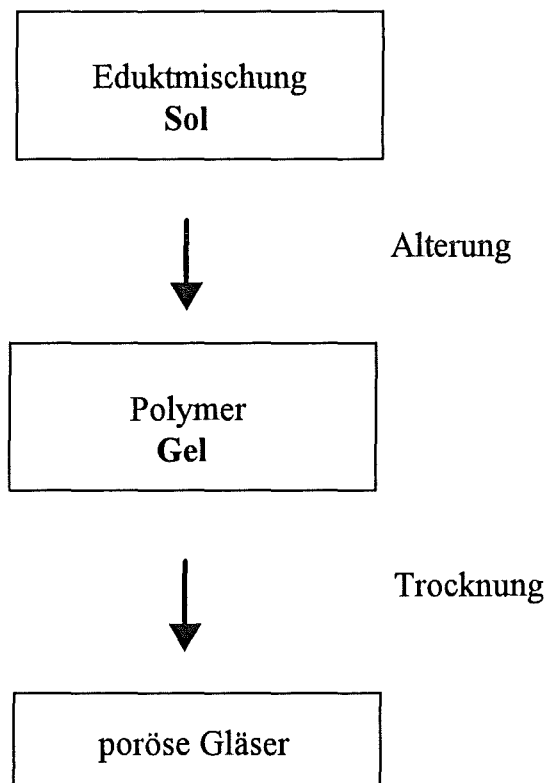


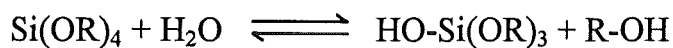
Abb. 2.6: Schematischer Ablauf des Sol-Gel-Prozesses

Reaktionsmechanismus

Der Reaktionsmechanismus des Sol-Gel-Prozesses kann in zwei Schritte unterteilt werden: die Hydrolyse und die anschließende Kondensationsreaktion.

Im Sol findet, beschleunigt durch einen Katalysator (Säure oder Base), zunächst eine Hydrolyse der Alkoxygruppen des Alkoxysilans statt, die folgenden Polykondensationsreaktionen führen zur Bildung polymerer Strukturen mit unterschiedlichen Si-O-Si-Bindungsanteilen (Abb. 2.7).

1. Hydrolyse



Der Hydrolysegrad des Si(OR)_4 hängt vom Wasseranteil und den Katalysatoren in der Eduktmischung ab.

2. Kondensation (Beispiele)



oder



mit R = Methyl- für Tetramethoxysilan

Abb. 2.7: Reaktionsschritte im Sol-Gel-Prozeß [Brinker et al., 1990]

Im Sol-Gel-Prozeß ist der pH-Wert für die Beschaffenheit der Gelstruktur von besonderer Bedeutung, da für die Katalyse der Gelbildung entweder Protonen oder Hydroxidionen benötigt werden [Arroyo et al., 1993; Brunet, Cabane, 1993]:

Ein saures Medium steigert die Hydrolyserate und behindert die Kondensationsreaktion. Dadurch bilden sich verstärkt lineare Oligomere aus, die zu kleineren Kolloidteilchen kondensieren, die sich ihrerseits im weiteren Verlauf der Reaktion zu einem besonders kleinporigen Gel verdichten. In Gegenwart von Hydroxidionen verhält es sich umgekehrt. Hier wird die Hydrolyse verlangsamt und der Kondensationsschritt katalysiert, wodurch sich stark verzweigte Cluster bilden, die zu großen Kolloiden kondensieren und ein großporiges Gel mit lockerer Netzstruktur erzeugen.

Vorteile des Sol-Gel-Prozeß für die Enzymimmobilisierung

Die mittels Sol-Gel-Verfahren hergestellten Gele zeichnen sich durch gute Transparenz und mechanische Stabilität aus. Da sowohl die Gelbildung als auch die Trocknung bei tiefen Temperaturen erfolgen kann, eignet sich das Verfahren besonders zur Immobilisierung sehr empfindlicher Biomoleküle [Dave, 1994]. Als Alkoxysilan wird hierfür meist Tetramethoxysilan verwendet, weil das bei der Reaktion freigesetzte Methanol weniger denaturierend wirkt wie andere Alkohole.

Da die Gele zur Immobilisierung von Biomolekülen nur sehr schwach getrocknet werden, ist die Matrix nicht als Glas, sondern eher als getrocknetes Gel mit einem gewissen Restgehalt an Wasser zu betrachten [Kraus, 1995].

Die so herstellbaren enzymhaltigen Gele sind chemisch und thermisch (Glucoseoxidase bis 70 °C) stabil [Braun, Shtelzer, 1994].

2.3.5 Immobilisierung in Hohlfasern

Hohlfasern haben viele Anwendungsgebiete, wie z. B. in der Dialyse [Klein et al., 1976], Umkehrosmose [Rosevear, 1984], Ultrafiltration [Porter, Nelson, 1972] oder Immobilisierung von Enzymen [Porter, 1972] und Zellen [Inloes et al., 1983; Chung, Chang, 1987]. Die bevorzugte Hohlfaser ist anisotrop, d. h. sie besteht aus einer engporigen inneren Haut, umgeben von einer „schwammartigen“ äußeren Stützstruktur. Die innere Haut ist die aktive Membran, welche das Ausdiffundieren großer Moleküle, wie Enzyme, verhindert während kleinen Molekülen der Durchgang möglich ist. So können auch die kleinen Substratmoleküle in das Innere der Faser eindiffundieren und mit dem immobilisierten Enzym reagieren. Es handelt sich bei dieser Art der Immobilisierung um einen Einschluß der Enzymmoleküle in den inneren Teil der Hohlfaser [Breslau, Kilcullen, 1974]

Im Vergleich zu anderen gebräuchlichen Immobilisierungsmethoden haben Hohlfasern folgende Vorteile [Tharakan, Chau, 1986; Rony, 1971; Wandrey, 1982]:

- Kein Aktivitätsverlust durch die Immobilisierung.
- Die Hohlfaser verfügt im Verhältnis zum Faservolumen über eine sehr große Membranoberfläche, was das Eindringen des Analyten begünstigt.
- In Hohlfasern mit geringem Durchmesser ist der Diffusionsweg gering, so daß recht kurze Reaktionszeiten erzielt werden.
- Hohlfasern sind sehr leicht mit jeglicher Art an Enzymlösung zu befüllen, die die Fasermembran nicht angreift.
- Die Enzymlösung aus der Hohlfaser kann gereinigt und wiederverwendet werden.
- Hohlfasern können sehr preiswert und in hoher Qualität hergestellt werden.
- Die Selektivität der Membran ermöglicht einem niedermolekularen Analyten den freien Zugang bei gleichzeitigem Ausschluß höhermolekularer Störsubstanzen.

- Die hohen Enzymdichten, die sich durch Konzentrieren in der Hohlfaser erreichen lassen, bieten zusammen mit der guten Transparenz der Membran ideale Voraussetzungen für optische Messungen.
- Die einheitliche Beschaffenheit der aktiven Membran verhindert den Austrag des Enzyms.

3. Praktische Arbeiten und Ergebnisse

3.1 Messungen in Lösung

Die fluorimetrischen Messungen werden mit dem Shimadzu Fluorimeter RF-5001 PC in HELMA Präzisions-Küvetten aus Quarzglas SUPRASIL (10 mm * 3 mm) durchgeführt. Die Anregung bei 450 nm erfolgt hierbei entlang des längeren optischen Weges (10 mm).

Für die Absorptionsspektroskopie wird ein Diodenarray-Spektrometer X-DAP der Firma Polytec und als Anregungslichtquelle eine Diaprojektorlampe (12 V, 50 W Xenophot HCX) verwendet. Es werden dieselben Küvetten wie für fluorimetrische Messungen eingesetzt (Weglänge 10 mm).

3.2 Immobilisierungsmethoden

3.2.1 Immobilisierung in Polyacrylamid-Gelen

Zur Herstellung von Polyacrylamid-Gelen wird zunächst die Acrylamidmonomer/ N,N' -Methylenbis(acrylamid)lösung mit der Enzymlösung unter Eiskühlung gemischt. Danach wird der Sauerstoff durch sorgfältiges Begasen mit Stickstoff entfernt. Die Zugabe einer frisch bereiteten Kaliumperoxodisulfatlösung startet die Polymerisierungsreaktion, die durch N,N,N',N' -Tetramethyldiamin weiter beschleunigt wird. Anschließend wird die Polymerisierungsmischung mit einer Pipette möglichst schnell in eine vorgekühlte Teflongießform eingespritzt. Die weitere Polymerisierung erfolgt für eine Stunde im Kühlschrank (4 - 8 °C) um Schäden des Enzyms durch die exotherme Polymerisierungsreaktion zu vermeiden [Wheatley, Phillips, 1983]. Die so präparierten Gele sind nach gründlichem Spülen mit Phosphatpuffer (pH = 6,88) für Messungen einsetzbar.

Durchflußküvette mit Doppelkammersystem

Zu Meßzwecken wird das PAA-Gel in eine spezielle Durchflußküvette (Abb. 3.1) überführt, die das Beprobieren des Gels von beiden Seiten ermöglicht.

Die Fixierung des Gels erfolgt durch Einklemmen zwischen den beiden Teilen der Durchflußküvette. Die Formgebung der Küvette ermöglicht den Einsatz in einer optischen Bank. Dort wird das von einer Xenonlampe kommende Licht direkt auf das Gel fokussiert und anschließend in einem Spektralphotometer vermessen.

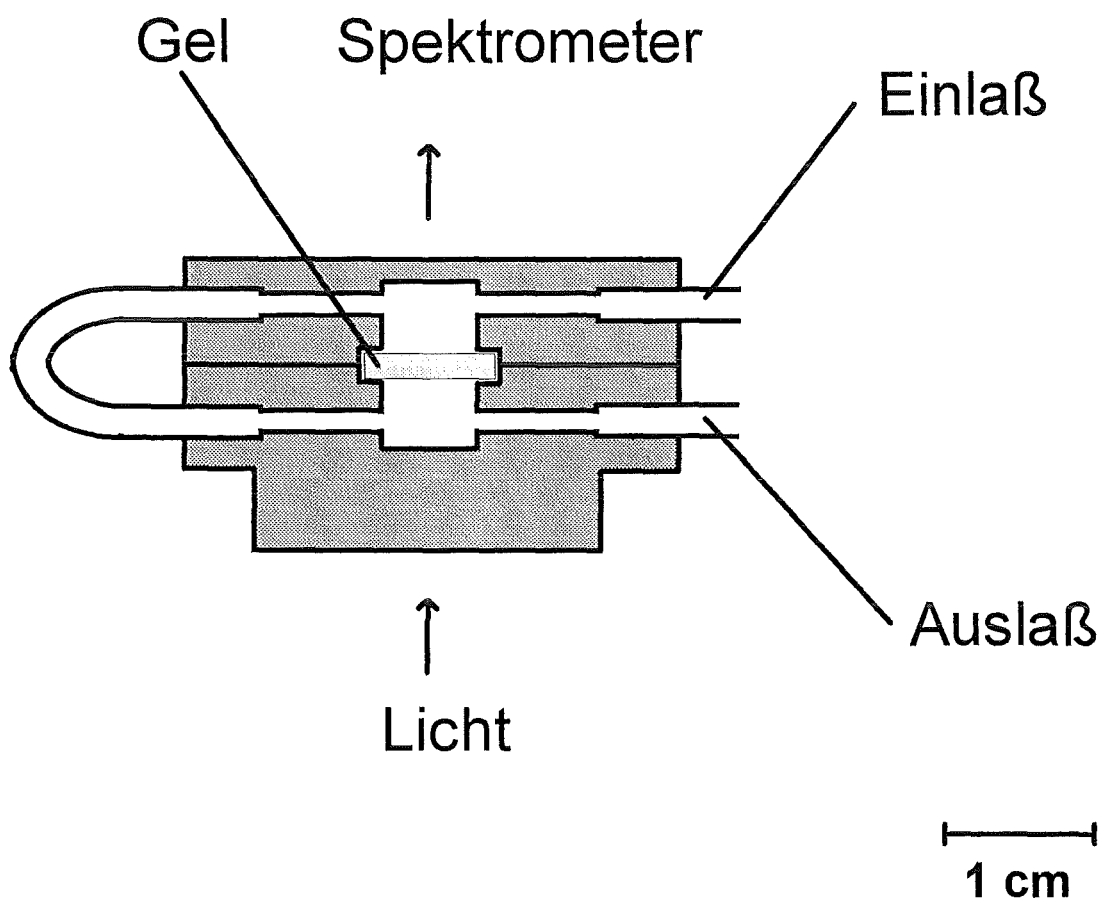


Abb. 3.1: Aufbau einer Durchflußküvette mit Doppelkammersystem zur Vermessung von enzymhaltigen Gelen

3.2.2 Immobilisierung mit Proteinen über Quervernetzung

Zur Herstellung der Protein-Gele wird zunächst die Enzymlösung mit Rinderserumalbumin gemischt und in einer Hohlfiber konzentriert. Das stark viskose Konzentrat wird anschließend in den Hohlraum einer direkt vor der Lichtleiterstirnfläche befestigten Metallhülse überführt. Da das Zumischen von Glutaraldehydlösung auf Grund der geringen Dimensionen nicht mehr möglich ist, wird die Quervernetzung durch einminütiges Eintauchen des Sensors in Glutaraldehydlösung erreicht (Abb. 3.2). Nach gründlichem Spülen wird der Sensor über Nacht im Kühlschrank (4 - 8 °C) in Phosphatpufferlösung gelagert, um Reste des überschüssigen Glutaraldehyds zu entfernen. Am anderen Tag ist der Sensor einsatzbereit.

Der Meßaufbau ist derselbe wie bei der Immobilisierung des Enzyms in einer an der Stirnfläche des Lichtleiters fixierten Hohlfiber (Abb. 3.7).

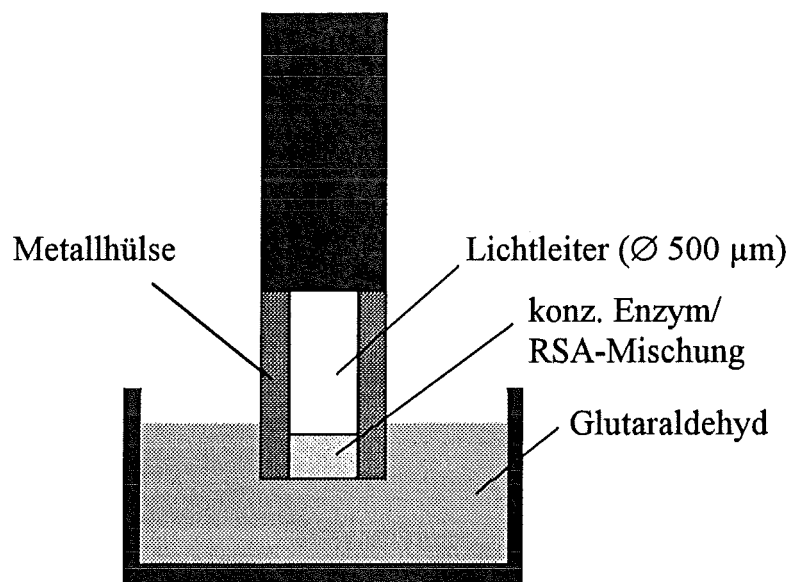


Abb. 3.2: Sensorpräparation

3.2.3 Immobilisierung von Enzymen durch Sol-Gel-Verfahren

Pionierarbeiten zur Enzymimmobilisierung mit Hilfe des Sol-Gel-Verfahrens wurden von Dr. Braun beim Nachweis von Glucose mittels Glucoseoxidase durchgeführt [Braun, Shtelzer, 1994]. Wie bei der Salicylathydroxylase handelt es sich auch bei der Glucoseoxidase um ein Flavoenzym, so daß es naheliegend ist, die Methode auf dieses Enzym zu erweitern. Zur Einarbeitung in die Methode werden die ersten Versuche mit Glucoseoxidase durchgeführt. Um mechanisch stabile Gele ohne Rißbildung zu erhalten, wird die Ausführung der Methode leicht verändert. Die Änderungen sind in der folgenden Tabelle 3.1 dargestellt.

Tab. 3.1: Immobilisierung von Enzymen mittels Sol-Gel-Verfahren

nach Braun, Shtelzer, 1994	veränderte Methode
Ausgangslösung	Ausgangslösung
Tetramethoxysilan (124 µL)	Tetramethoxysilan (124 µL)
Wasser (40 µL)	0,1 M TRIS-Puffer pH = 10 (116 µL)
0,1 M TRIS-Puffer pH = 10 (76 µL)	
Durchführung	Durchführung
3 min bei 0 °C gemixt	max. 1 min bei 0 °C gemixt
Enzymzugabe (40 µL)	Enzymzugabe (40 µL)
Polymerisierung bei 0 °C	Polymerisierung bei 0 °C
5 h Trocknung bei 30 °C	2 Tage Trocknung bei 4 °C
Rückbefeuchtung: keine Angabe	vorsichtiges Rückbefeuchten

Enzymkonzentration: Salicylathydroxylase original GDS Test-Kit bzw. für
Glucoseoxidase 100 mg mL⁻¹

TRIS = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Die so hergestellten Gele werden in einer optischen Bank, in der schon für Polyacrylamid-Gele verwendeten Durchflußküvette, vermessen (vgl. Abb. 3.1).

Präparation nach Sol-Gel-Verfahren mit Alginatzusatz

Für die Herstellung von Gelen mit Alginatzusatz werden die unten aufgeführten Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge unter Eiskühlung gemischt. Nach der Zugabe von Tetramethoxysilan wird noch zwei Minuten weiter gemischt, um eine gleichmäßige Vorpolymerisierung zu gewährleisten. Anschließend wird die Mischung sofort in Gießformen überführt. Vier Stunden später werden die fertigen Gele entnommen, gespült und bei Präparation 1 eine Woche naß, bei Präparation 2 sieben Wochen trocken, jeweils bei Raumtemperatur gelagert.

Immobilisierung von Salicylathydroxylase nach optimiertem Sol-Gel-Verfahren

Für das optimierte Sol-Gel-Verfahren zur Immobilisierung von Salicylathydroxylase wird zunächst Tetramethoxysilan auf Eis für eine Minute vorpolymerisiert. Die Vorpolymerisierung erfolgt unter basischer Katalyse mit 0,1 M TRIS-Puffer (pH = 10). Nach der Zugabe des Enzyms wird noch eine weitere Minute gemischt und anschließend sofort auf eine Teflonunterlage aufgetropft. Die ausgehärteten Tropfen werden nach 5 min direkt in eine Feuchtekammer überführt (Abb. 3.3), wo sie in nahezu 100 %iger Luftfeuchtigkeit im Verlauf von 19 h im Kühlschrank (4 - 8 °C) weiter aushärten können.

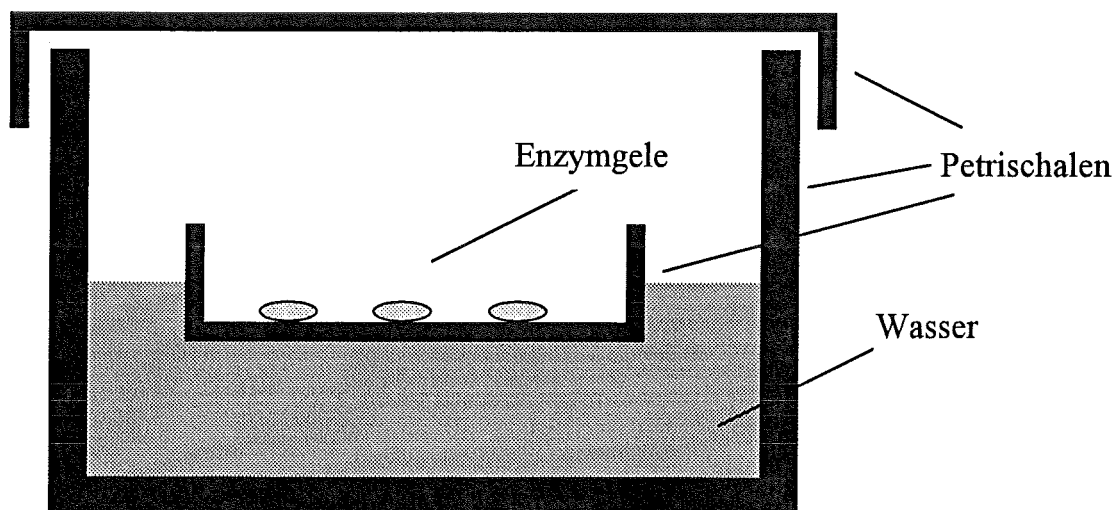


Abb. 3.3: Feuchtekammer für die Aushärtung von enzymhaltigen Gelen

Präparation des Sensors

Die fertig ausgehärteten Gele werden unter dem Mikroskop mit einem Skalpell zurechtgeschnitten und dann mit Silikonkleber auf die Stirnfläche eines Lichtleiters geklebt (Abb. 3.4).

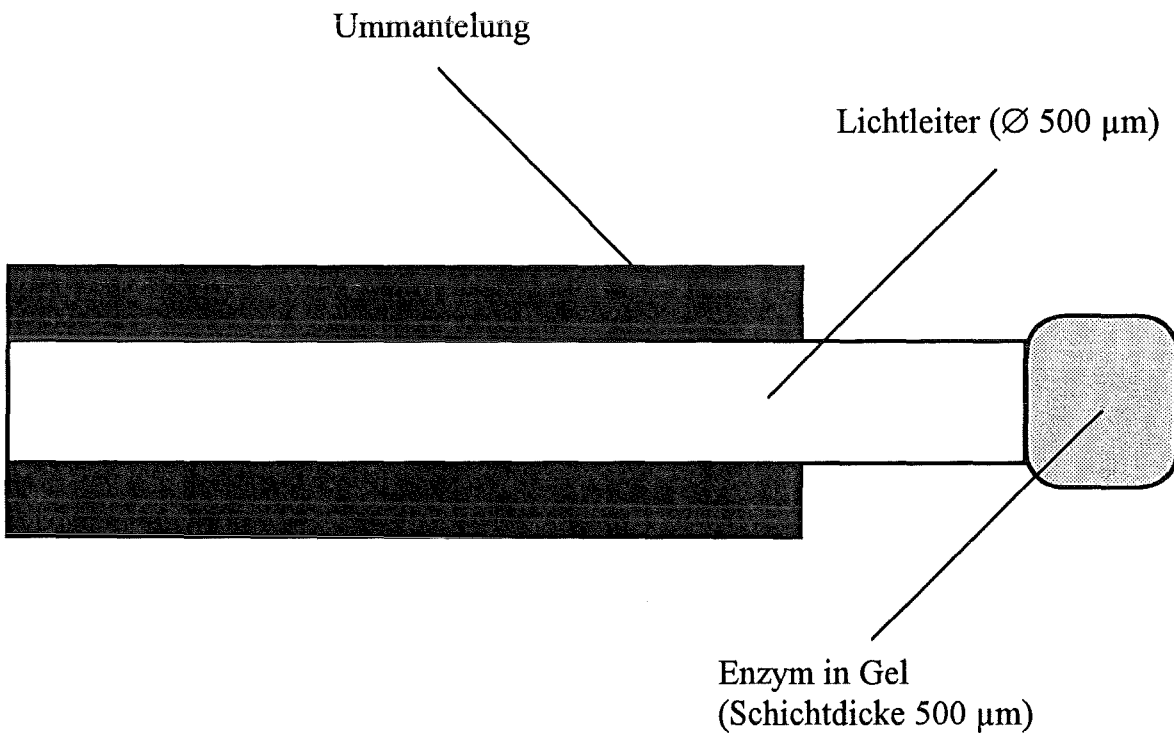


Abb. 3.4: Sensor mit nach Sol-Gel-Verfahren immobilisiertem Enzym

Zur Messung wird derselbe miniaturisierte Aufbau auf der Basis von Lichtleitern verwendet wie bei der Immobilisierung des Enzyms in einer an der Stirnfläche des Lichtleiters fixierten Hohlfaser (Abb. 3.7).

3.2.4 Immobilisierung in Hohlfasern

Präparation der Enzymlösung

Zunächst wird die Enzymlösung (Salicylathydroxylase original GDS Test-Kit) für 20 Minuten bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit (4000 g) zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen.

Die überstehende Enzymlösung wird abpipettiert und in Microcon-Gefäßen (Molmassenausschluß 30 000) von Amicon auf das 10fache konzentriert. Um das Enzym in einen bekannten Puffer zu überführen, wird 200 µL Merck Titrisol Phosphatpufferlösung (pH = 7,00) zugegeben, wieder auf das 10fache konzentriert, nochmals mit 200 µL Phosphatpufferlösung versetzt und schließlich auf die Endkonzentration konzentriert.

Zusätze zur Enzymlösung:

Glycerin: Glycerin schützt als Feuchthaltemittel das Enzym vor Schäden durch Austrocknung. Gleichzeitig bestimmt es die Viskosität der konzentrierten Enzymlösung und damit auch die Präparierbarkeit der Sensoren. Zuviel Glycerin verringert den Anteil des für die Komplexbildung verfügbaren Enzyms.

Phosphatpuffer: Phosphatpuffer dient wie Glycerin als Feuchthaltemittel. Sein Zusatz verbessert das Verhältnis von salicylatinduziertem Signal zur Flavinkonzentration. Hierbei darf der Sättigungspunkt nicht überschritten werden, da die auskristallisierenden Salze das Enzym schädigen.

Rinderserumalbumin: Rinderserumalbumin verhindert als Schutzprotein Schäden des Enzyms durch die Konzentrierung. Ohne Rinderserumalbuminzusatz kommt es zum Eintrüben der Enzymlösung während der Beprobung.

Enzymkonzentrierung

Die Hohlfaser wird mit Ethanol nach Herstellerangaben gewaschen, um den schützenden Myristinisopropylester zu entfernen [Spectrum, 1995]. Danach wird mit Wasser gewaschen, wobei sich die Poren öffnen. Diese Fasern werden bis zur weiteren Verwendung in Ethanol gelagert.

Vor der Enzymkonzentrierung werden die Hohlfasern durch Ausblasen mit Stickstoff von Ethanol befreit. Die so vorbereiteten, auf 4 cm zugeschnittenen Hohlfaserstücke werden mittels Pipette mit je 2,5 μL der gut gemischten Enzymlösung befüllt. Durch Kapillarkräfte wird das Wasser aus dem Faserinneren nach außen gezogen, wo es verdunstet. Dadurch konzentriert sich die Enzymlösung selbsttätig, bis auf eine Endkonzentration, die im wesentlichen durch den Anteil an Feuchthaltemittel (Glycerin, Puffer) bestimmt wird. Gleichzeitig bewirkt das Verdunsten des Wassers eine gleichmäßige, schonende Kühlung der Enzymlösung (Abb. 3.5). Die Zeit bis zum Erreichen der Endkonzentration beträgt ca. 5 min (bei 23 °C und 25 % Luftfeuchtigkeit). Das Enzym erreicht hierbei ca. das 50fache der ursprünglichen GDS Test-Kit-Konzentration. Bis zum Meßeinsatz werden die enzymbefüllten Hohlfasern trocken, in einem verschlossenen Gefäß, im Kühlschrank (4 - 8 °C) aufbewahrt.

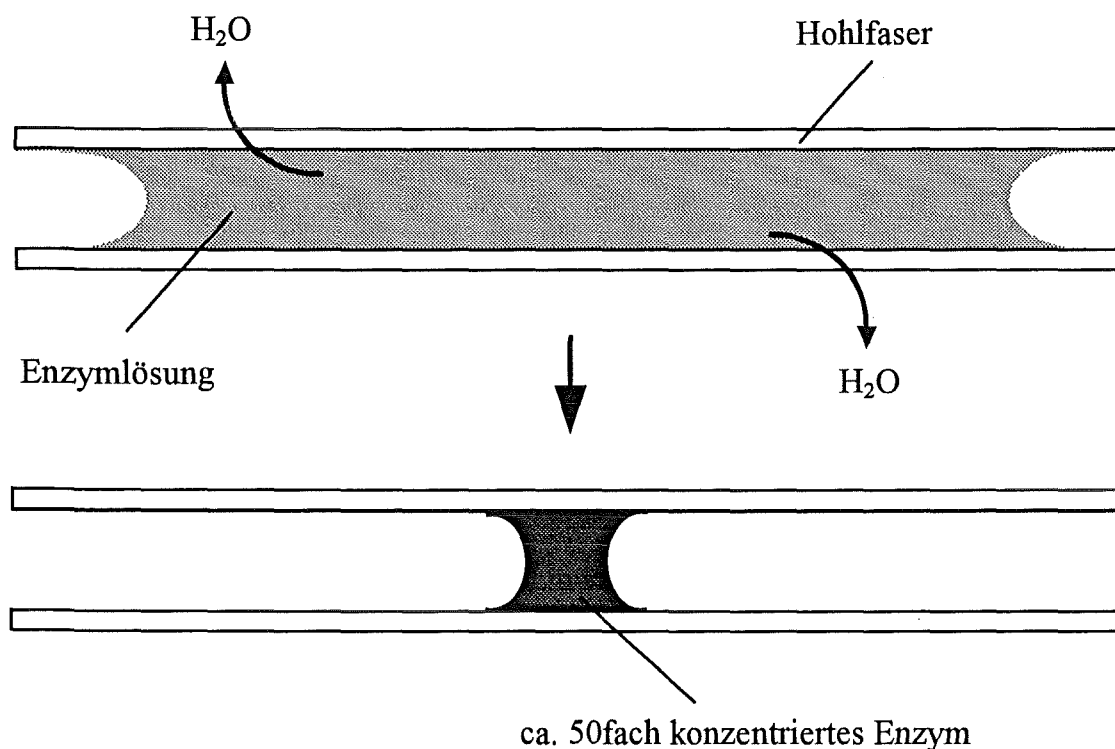


Abb. 3.5: Enzymkonzentrierung

Präparation der Sensoren auf Hohlfaserbasis

Die Enden einer Hohlfaser werden jeweils an der Seite eines Lichtleiters mit Leim fixiert, so daß der mit hochkonzentrierter Enzymlösung (ca. 1 mM) gefüllte Teil der Hohlfaser die Stirnseite des Lichtleiters bedeckt. Zur weiteren Stabilisierung wird über Lichtleiter und Hohlfaser ein Metallröhrchen geleimt (Abb. 3.6). Da quer durch die Hohlfaser gemessen wird, beträgt die optische Weglänge in der Hohlfaser weniger als 0,2 mm.

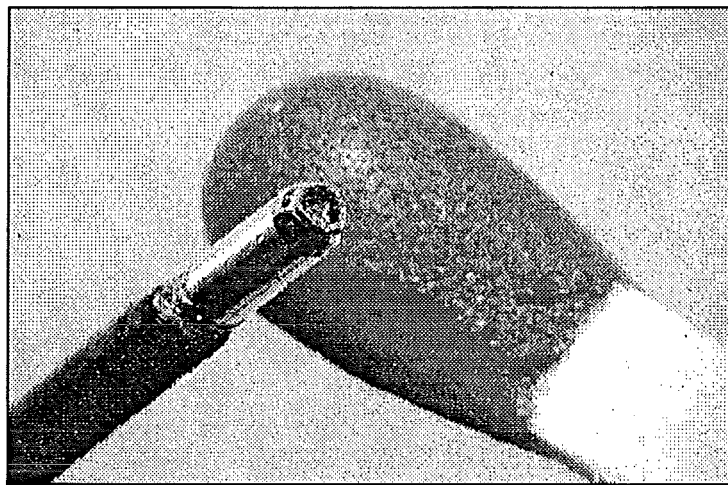


Abb. 3.6: Sensor auf Hohlfaserbasis

Optischer Aufbau

Zu Meßzwecken wird der Sensor (Abb. 3.6) in eine Miniaturdurchflußküvette eingebaut. Das an der Stirnseite eines Lichtleiters (\varnothing 500 μ m) immobilisierte Enzym wird mit einer blauen Leuchtdiode (Emissionsmaximum bei 450 nm) angeregt und die dabei erhaltene Transmission mit Hilfe eines Miniaturspektralphotometers gemessen (Abb. 3.7).

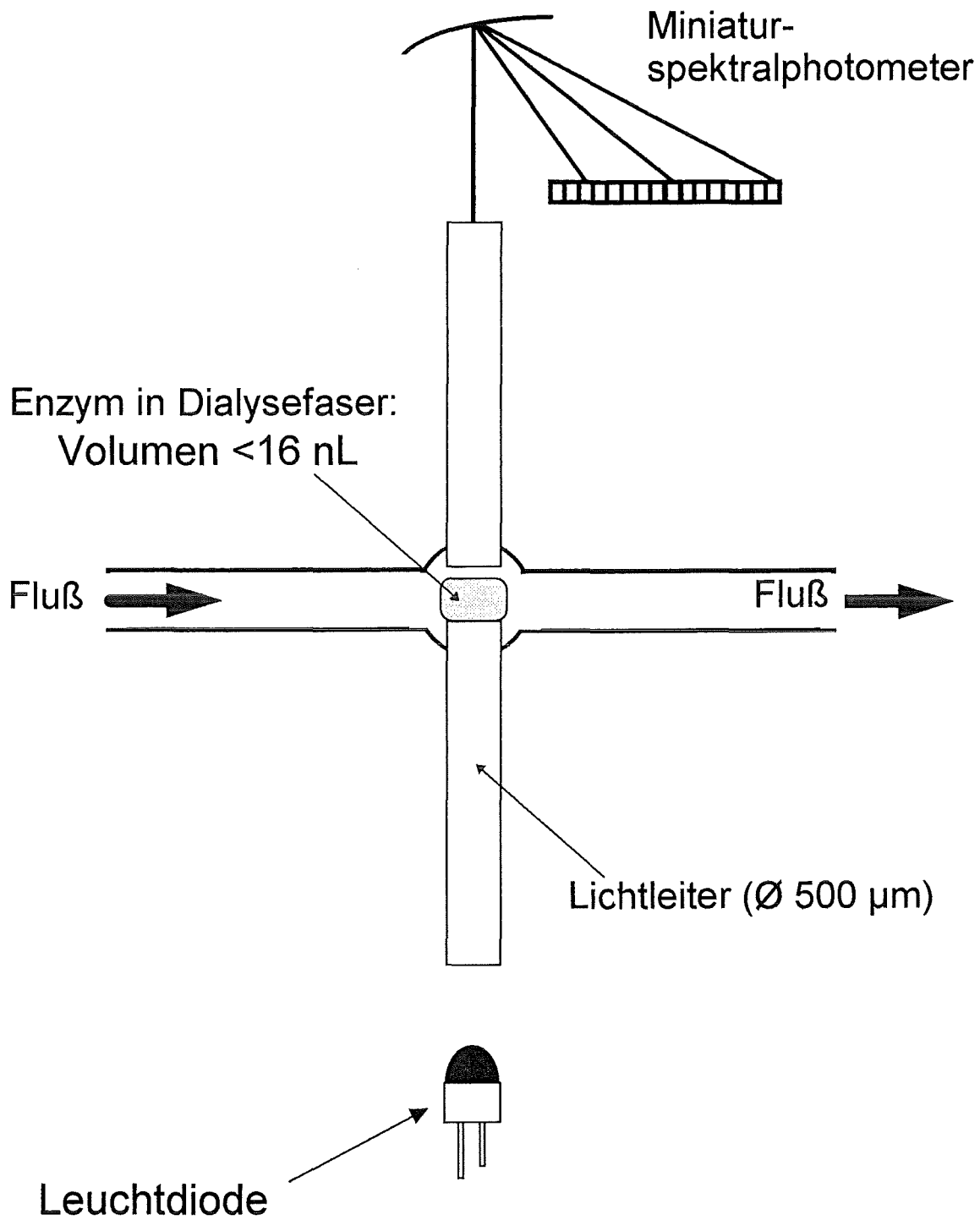


Abb. 3.7: Optischer Aufbau

Klemmküvette für Hohlfasern

Die Herstellung einzelner Sensoren wird auf Grund ihrer geringen Dimensionen unter dem Mikroskop durchgeführt. Da dies sehr zeitaufwendig ist und einer großen Geschicklichkeit bedarf, wird im Laboralltag ein einfacheres System verwendet, welches den schnellen Austausch der Hohlfaser ermöglicht.

Als Halterung für die enzymbefüllten Hohlfasern dient eine Küvette aus Plexiglas (Abb. 3.8). In der symmetrisch aufgebauten Küvette wird die Hohlfaser von zwei identisch gearbeiteten Klemmteilen beidseitig gehalten, so daß sie frei im Beprobungskanal aufgehängt ist und gut umspült werden kann. Die Beprobung erfolgt quer zum Lichtweg. Um auch hier optimale Lichtausbeuten erzielen zu können, wird das Licht wiederum mit einem Lichtleiter direkt an die Hohlfaser herangeführt und mit einem zweiten Lichtleiter zum Spektrometer weitergeleitet.

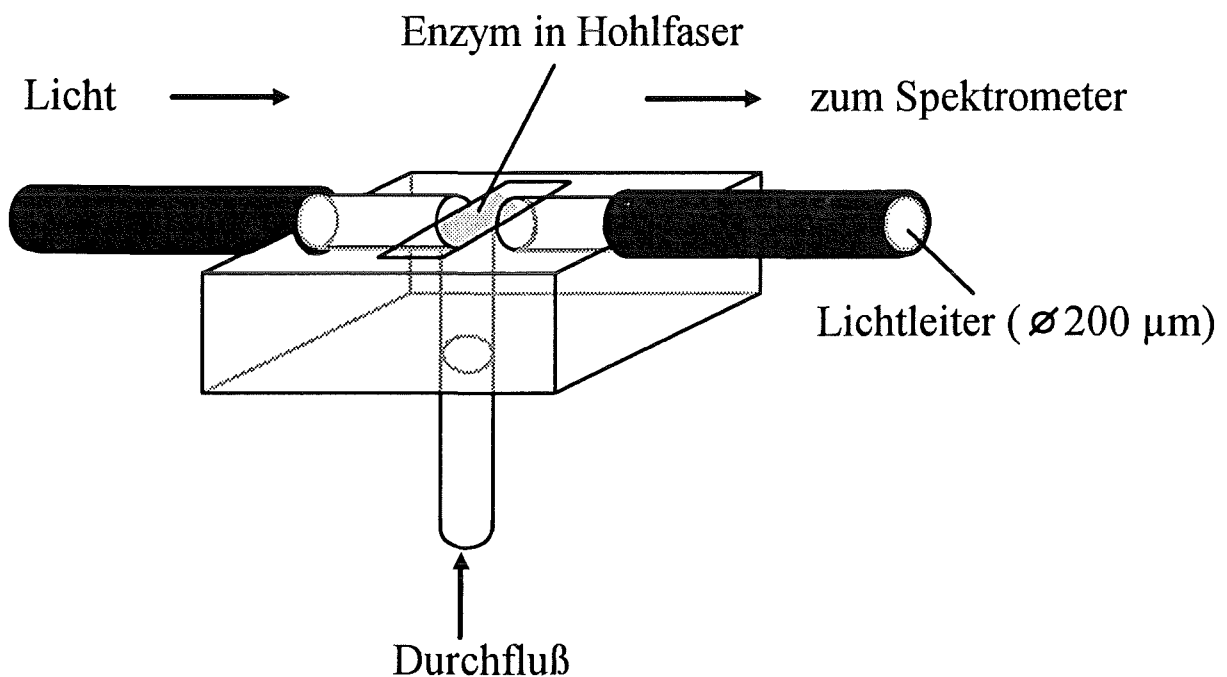


Abb. 3.8: Klemmküvette für Hohlfasern

Prinzip des Blutzellenausschlusses

Das Prinzip des Blutzellenausschlusses läßt sich am ehesten beim Betrachten der „schwammartigen“ Oberflächenstruktur der Hohl-faser verstehen. Diese „schwammartige“ Beschaffenheit ermöglicht den Lichtleitern beim Aufsetzen ein Stück weit in die Oberfläche der Hohl-faser einzudringen (Abb. 3.9). Dabei schmiegt sich die Hohl-faser auch an den Rändern so dicht an die Lichtleiter an, daß nicht einmal mehr Blutzellen eindringen können. Es werden lediglich die Stoffe im Lichtstrahl erfaßt, die in die Hohl-faser eindringen können (Molmassenausschluß: 19 000). Da der Lichtweg nun nur noch direkt durch die Hohl-faser verläuft, werden gleichzeitig wesentlich höhere Absorptionswerte erzielt. Der minimierte Lichtweg führt zu geringerem Lichtverlust. Die dadurch verkürzten Meßzeiten des Spektralphotometers ermöglichen präzisere Messungen, zum einen weil sie rauschärmer und zum anderen weil sie in derselben Zeit öfter wiederholbar sind.

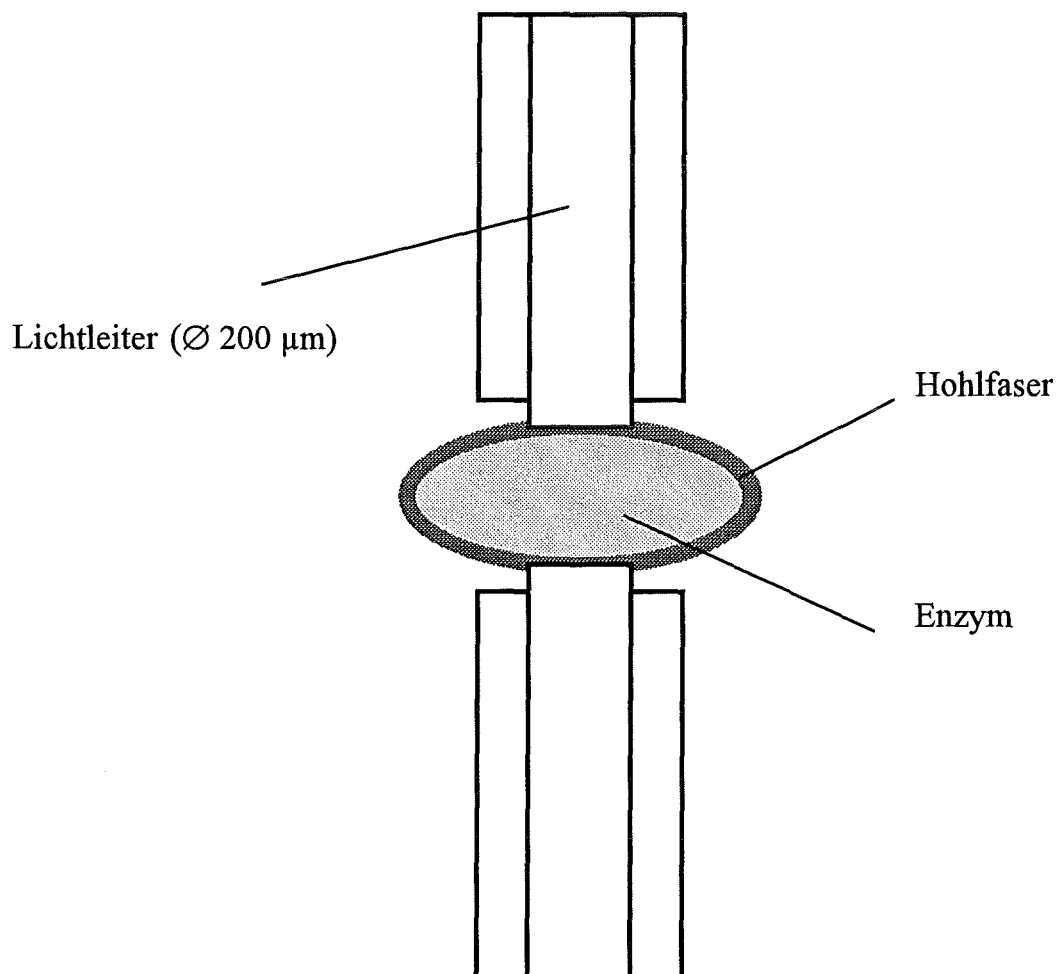


Abb. 3.9: Prinzip des Blutzellenausschlusses

Küvette mit Silikonkautschukdichtung für den Blutzellenausschluß

Um das Aufsetzen der Lichtleiter auf die Hohlfaser möglichst schonend zu gestalten, wird eine sehr weiche Silikonkautschukdichtung verwendet. Beim Schließen der Küvette verformt sich der Silikonkautschuk unter dem auf ihn ausgeübten Druck. Dadurch wird die enzymhaltige Hohlfaser zusätzlich aufgebläht und schmiegt sich fest an die Lichtleiter an (Abb. 3.10). Gleichzeitig erfolgt hierbei nochmals eine Konzentrierung des Enzyms, da Glycerin-Puffer-Gemisch aus der Hohlfaser entweicht.

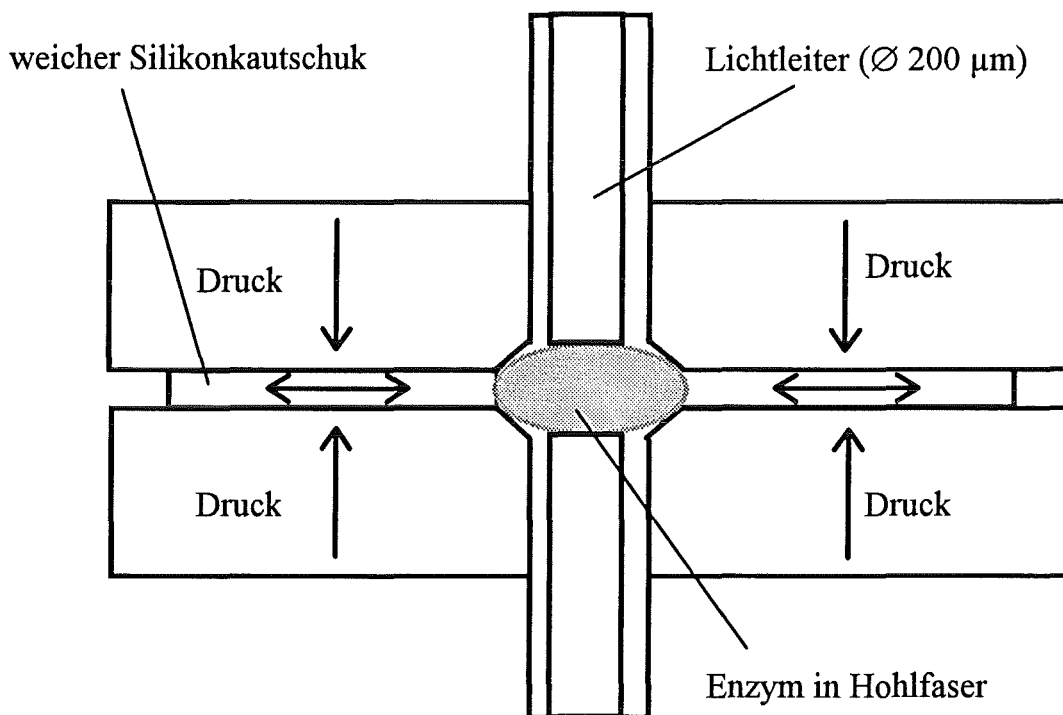


Abb. 3.10: Küvette mit Silikonkautschukdichtung

3.3 Meßbedingungen

Sofern nicht anders angegeben wird als Lösungsmittel entmineralisiertes Wasser verwendet und die Versuche bei 23 °C durchgeführt. In Durchflußküvetten beträgt der Durchfluß $1,2 \cdot 10^{-8} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$.

3.4 Fehlerbetrachtung

In diesem Abschnitt werden kurz mögliche Fehlerquellen angesprochen. Weiterhin wird erläutert, wie die erhaltenen Meßwerte mittels statistischer Verfahren interpretiert werden können, um sinnvolle Fehlergrenzen zu erhalten.

Allgemeine Fehler:

Allgemeine Fehler liegen meist in der Probenvorbereitung. Ungenauigkeiten bei der Einwaage, bei der Pipettierung und anderen Arbeitsgängen führen zu geringen Ergebnisfehlern. Ebenso auch Abweichungen bei der Qualität der verwendeten Reagenzien und Chemikalien. Diese Fehler sind überwiegend zufälliger Natur und vernachlässigbar klein.

Photometer-Fehler:

Das Grundlinien-Rauschen des Photometers kann bei sehr kleinen Absorptionen den Meßwert verfälschen. Bei sehr großen Absorptionen können nicht mehr alle Moleküle im Strahlengang vollständig zur Absorption beitragen, da bereits auf den ersten Teilstücken des optischen Wegs ein beträchtlicher Teil des Meßlichts absorbiert wird.

Ermittlung von Fehlergrenzen:

Die Standardabweichung S wird nach der folgenden Formel ermittelt [Bartsch, 1987]:

$$S = +\sqrt{\frac{1}{n-1} * \sum_{i=1}^n (x_i - x')^2}$$

mit x_i = Meßwert

x' = arithmetischer Mittelwert der Meßwerte

n = Anzahl der Meßwerte

Fehlerfortpflanzung

In dieser Arbeit werden häufig Differenzen von Absorptionen und Differenzen von Differenzen berechnet. Dies könnte wegen Fehlerfortpflanzung zu Ungenauigkeiten führen. Um dies zu vermeiden werden Absorptionsdifferenzen bei einer einzelnen Wellenlänge nicht durch Subtraktion berechnet, sondern wie folgt:

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

$$A' = \log \frac{I_0}{I'}$$

$$\Delta A = A' - A$$

$$= \log \frac{I_0}{I} - \log \frac{I_0}{I'}$$

$$= \log \frac{I'}{I}$$

Auf diese Weise werden sowohl Absorptionen als auch Absorptionsänderungen aus je zwei Intensitätswerten berechnet, so daß keine Anhäufung von Fehlern zustande kommt.

Bei Subtraktion von Absorptionsdifferenzen bei zwei verschiedenen Wellenlängen kann keine der Intensitäten wie oben eliminiert werden. Statt dessen geht man wie folgt vor:

$$\begin{aligned}\Delta\Delta A &= \Delta A_{\lambda_1} - \Delta A_{\lambda_2} \\ &= \log \frac{I'_{\lambda_1}}{I_{\lambda_1}} - \log \frac{I'_{\lambda_2}}{I_{\lambda_2}} \\ &= \log \frac{I_{\lambda_2}}{I_{\lambda_1}} - \log \frac{I'_{\lambda_2}}{I'_{\lambda_1}}\end{aligned}$$

Das Verhältnis der zwei Referenzintensitäten im zweiten Term stellt bei gegebenen Referenzzusammensetzungen und gegebener Lichtquelle einen Konstantwert dar, der vor der eigentlichen Messung zu beliebiger Genauigkeit bestimmt werden kann.

4. Meßergebnisse und Diskussion

4.1 Untersuchungen in Lösung

Bevor das spektrale Verhalten des für den Salicylatnachweis verwendeten Enzyms Salicylathydroxylase im immobilisierten Zustand untersucht wird, erfolgt zunächst eine Charakterisierung in Lösung.

Bei diesen Untersuchungen soll ermittelt werden, welche der beiden spektralen Analysemethoden Fluorimetrie oder Absorptionsspektroskopie sich besser für den praktischen Einsatz eignet. Weiterhin gilt es abzuklären, inwieweit die Empfindlichkeit der Nachweisreaktion den analytischen Anforderungen entspricht und die Grenzen der Einsatzfähigkeit des Enzyms bezüglich pH und Temperatur zu bestimmen.

Bei der Fluorimetrie wird die Probe bei einer festen Wellenlänge angeregt und die emittierte Lichtintensität in Abhängigkeit der Emissionswellenlänge detektiert. Die Emissionsintensität wird in willkürlichen Einheiten (a.u.) angegeben.

Bei der Absorptionsspektroskopie wird die Intensität (I) des durch die Probe transmittierten Lichts als Funktion der Wellenlänge ermittelt. Zur Quantifizierung wird die gemessene Intensität mit der durch eine geeignete Referenz transmittierten Intensität in Beziehung gebracht.

$$A = \log \frac{I_{\text{Referenz}}}{I_{\text{Probe}}}$$

Als Logarithmus hat die Absorption keine Einheit.

4.1.1 Fluoreszenzspektren von Salicylathydroxylase

Das Fluoreszenzspektrum von Salicylathydroxylase zeigt bei der Anregungswellenlänge 450 nm ein für Flavin typisches Emissionsmaximum bei 525 nm (Abb. 4.1.). Der Vergleich zum freien Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) macht deutlich, daß das enzymgebundene FAD, bei gleicher Absorption (bei 450 nm) weniger fluoreszenzfähig ist.

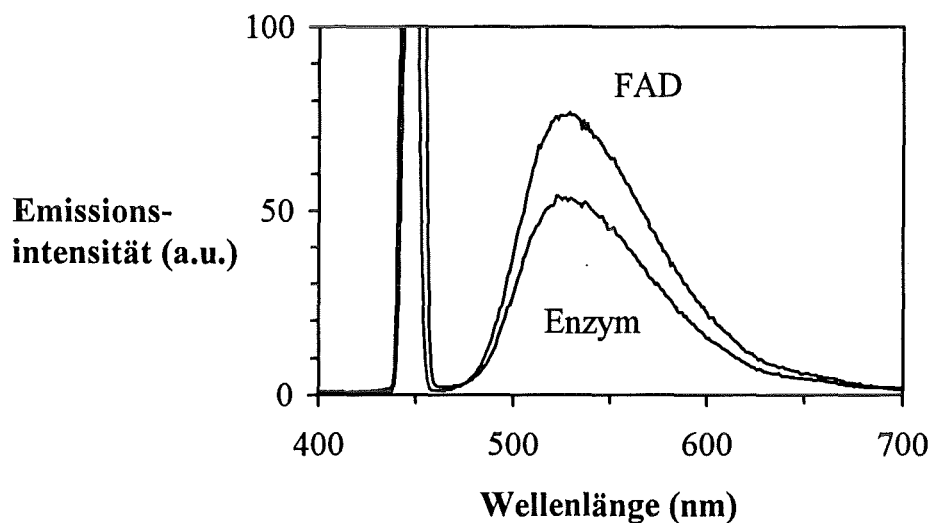


Abb. 4.1: Fluoreszenzspektren von Salicylathydroxylase und FAD – die verwendete GDS-Enzymlösung wird mit Phosphatpuffer (pH = 6,88) auf das Vierfache verdünnt und FAD im selben Puffer gelöst, bis zum Erreichen desselben Absorptionswertes (bei 450 nm).

Betrachtet man das Emissionsspektrum von Salicylathydroxylase vor und nach der Zugabe von Salicylat (Abb. 4.2), so beobachtet man beim Enzym-Substratkomplex unter gleichen Bedingungen einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Salicylat selbst zeigt bei der Anregungswellenlänge 450 nm keine Eigenfluoreszenz.

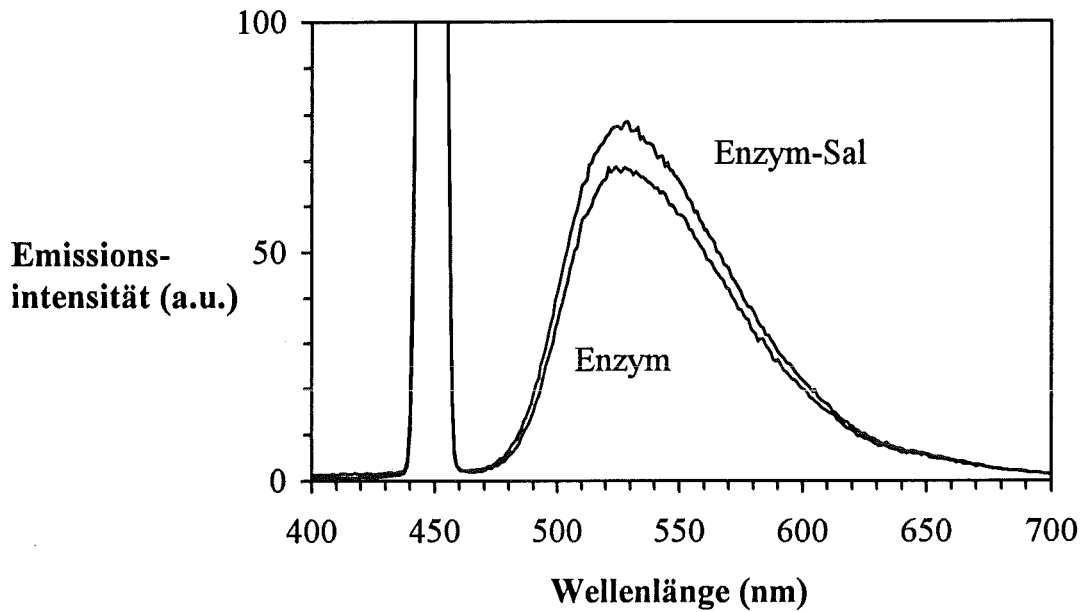


Abb. 4.2: Vergleich Salicylathydroxylase vor und nach der Salicylatzugabe (Sal) – die verwendete GDS-Enzymlösung wird mit Phosphatpuffer (pH = 6,88) auf das Vierfache verdünnt, die Salicylatkonzentration beträgt 0,25 mM.

Nachteilig bei der Fluoreszenzmessung als Maß für die Salicylatkonzentration ist, daß es sich nicht um ein geändertes Emissionsspektrum sondern lediglich um eine Intensitätszunahme handelt. Somit sind eventuell auftretende Matrixeffekte, wie z. B. die Absorption des Anregungslichts, schwer zu eliminieren. Außerdem ist die Zunahme der Emissionsintensität gering.

4.1.2 Absorptionsspektren von Salicylathydroxylase verglichen mit Glucoseoxidase und FAD

Das freie FAD mit seinen charakteristischen Absorptionsmaxima bei 370 nm und 450 nm besitzt eine intensive gelbe Farbe, welche durch Reduktion zum FADH₂ verloren geht (Abb 4.3). Die Absorption wird im folgenden mit A abgekürzt.

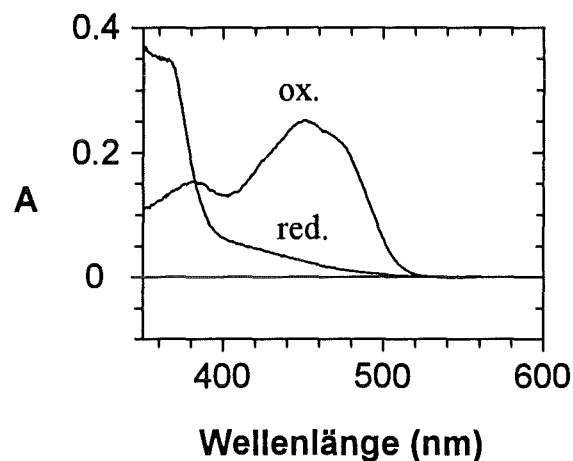


Abb 4.3: Vergleich FAD in oxidiertem (ox.) und reduziertem (red.) Zustand – die FAD-Konzentration beträgt 20 μ M, Dithionit wird in fester Form bis zur vollständigen Reduktion zugegeben.

FAD ist auch für die Farbe der Flavoenzyme verantwortlich, wo es als prosthetische Gruppe dient. Das wohl bekannteste flavinhaltige Enzym ist die Glucoseoxidase. Auf Grund ihrer mit Salicylathydroxylase vergleichbaren Absorptionscharakteristik, bei gleichzeitig niedrigerem Preis, wird sie in dieser Arbeit oft für Vorversuche eingesetzt. Unter anaeroben Bedingungen lässt sich Glucoseoxidase mit Glucose reduzieren. Dabei kommt es, wie schon bei der Reduktion von FAD, zu einem Ausbleichen des Flavinspektrums (Abb. 4.4).

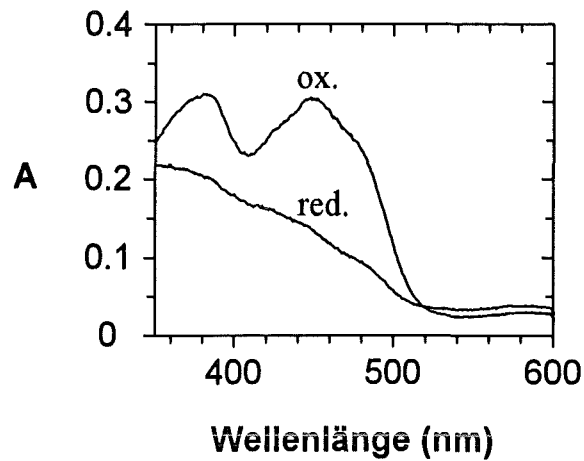


Abb. 4.4: Vergleich Glucoseoxidase in oxidiertem (ox.) und reduziertem (red.) Zustand – die Glucoseoxidasekonzentration beträgt $12 \mu\text{M}$, die Reduktion erfolgt mit $1,5 \text{ mM}$ Glucose.

Wenn man das Absorptionsspektrum der oxidierten von dem der reduzierten Glucoseoxidase subtrahiert, erhält man ein mit steigender Glucosekonzentration abnehmendes Flavinspektrum (Abb. 4.5).

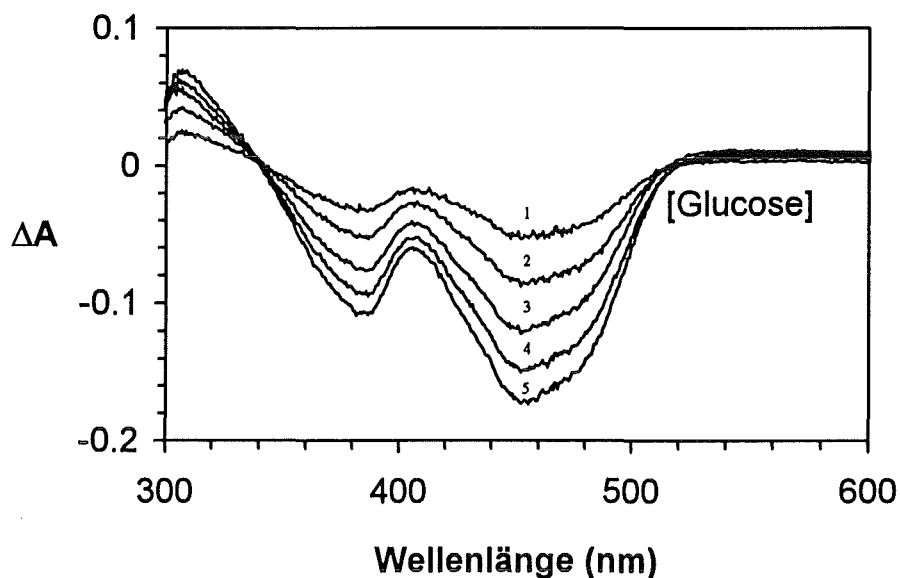


Abb. 4.5: Glucoseinduzierte Differenzspektren von Glucoseoxidase – die Glucoseoxidasekonzentration beträgt $12 \mu\text{M}$, in Phosphatpuffer ($\text{pH} = 6,88$) $c_{\text{Glucose}}/\text{mM} = 0,5$ (1); $0,75$ (2); 1 (3); $1,25$ (4); $1,5$ (5).

Die Salicylathydroxylase hat in oxidiertem Zustand im Absorptionsspektrum, wie alle Flavoproteine, die charakteristischen Absorptionsmaxima bei 370 nm und 450 nm. Betrachtet man jedoch das Absorptionsspektrum des freien Flavins, so erkennt man beim enzymgebundenen Flavin sowohl bei der Salicylathydroxylase als auch bei der Glucoseoxidase jeweils eine Verschiebung im Verhältnis der beiden Absorptionsmaxima zueinander.

Die Salicylathydroxylase lässt sich in wässriger Lösung mit Dithionit leicht reduzieren, wobei die Flavinfarbe ebenfalls verbleicht (Abb. 4.6). Die starke Absorption unter 400 nm im reduzierten Spektrum wird durch die Eigenabsorption von Dithionit verursacht.

Spektren in Lösung:

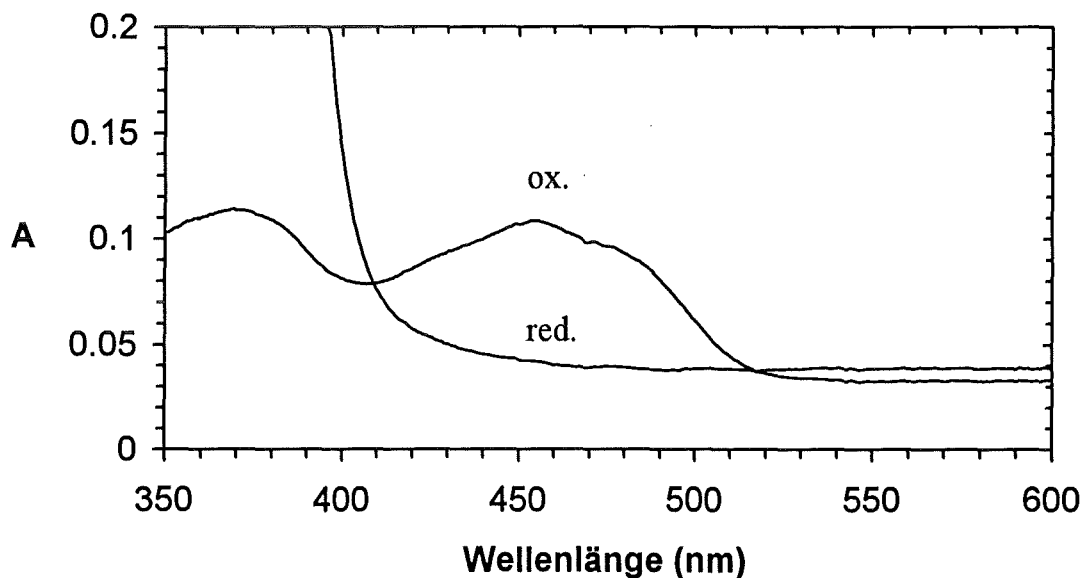


Abb. 4.6: Vergleich Salicylathydroxylase in oxidiertem (ox.) und reduziertem (red.) Zustand – die GDS-Enzymlösung wird mit Phosphatpuffer (pH = 6,88) auf die halbe Konzentration verdünnt. Dithionit wird in fester Form bis zur vollständigen Reduktion zugegeben.

Bei der Salicylatzugabe findet keine Reduktion der Salicylathydroxylase statt, wie dies bei der Glucoseoxidase, nach Zugabe von Glucose geschieht. Die Komplexbildung zwischen Enzym und Salicylat führt jedoch zu einer Verschiebung und Vergrößerung der Bande um 450 nm (Abb. 4.7).

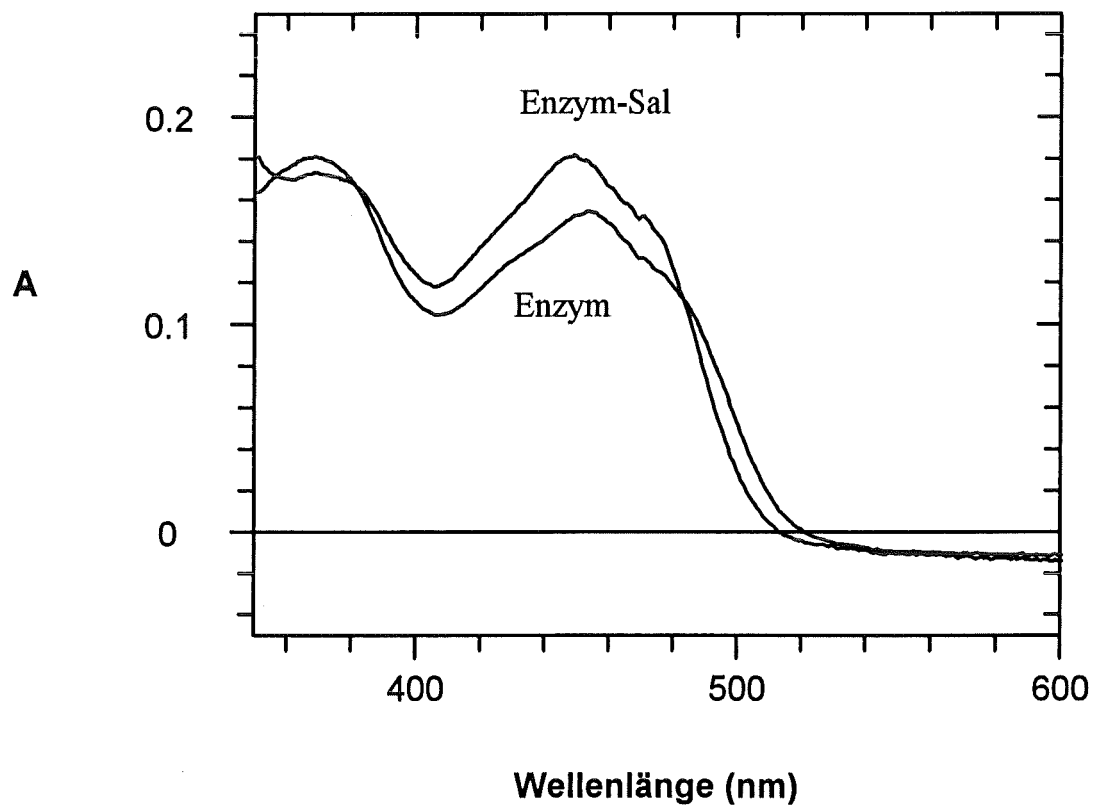


Abb. 4.7: Vergleich Salicylathydroxylase vor und nach der Salicylatzugabe (Sal) – die GDS-Enzymlösung wurde unverändert eingesetzt, (Enzymkonzentration = 6 μ M; Salicylatkonzentration = 20 mM).

4.1.3 Differenzspektren von Salicylathydroxylase in Abhängigkeit der Salicylatkonzentration

Die salicylatinduzierte spektrale Änderung erhält man durch Subtraktion des Absorptionsspektrum des Enzyms von dem des Komplexes. Die Konzentrationsabhängigkeit des daraus resultierenden Differenzspektrums ist in der folgenden Abbildung (Abb. 4.8) dargestellt.

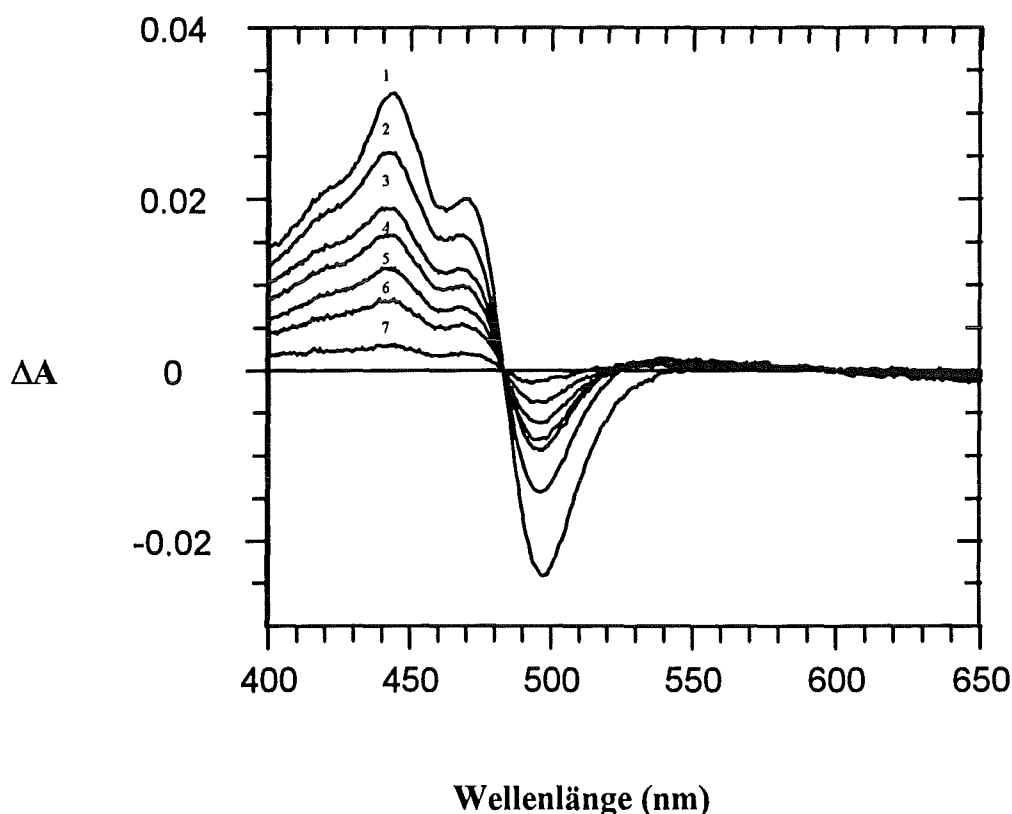


Abb. 4.8: Die salicylatinduzierte Änderung des Absorptionsspektrums von 6 μM Salicylathydroxylase – Salicylathydroxylase original GDS-Enzymlösung, bei folgenden Salicylatkonzentrationen:

$c_{\text{Salicylat}}/\text{mM} = 20$ (1); 1,0 (2); 0,52 (3); 0,41 (4); 0,28 (5); 0,16 (6); 0,05 (7).

Die salicylatinduzierte Änderung des Absorptionsspektrums von Salicylathydroxylase äußert sich mit zunehmender Salicylatkonzentration in einem einheitlichen Wachsen der Differenzspektren. Der isosbestische Punkt bei 484 nm ermöglicht es, bei Bedarf Untergrundkorrekturen vorzunehmen, um Störeinflüsse zu korrigieren.

4.1.4 Dosis-Wirkungskurve für Salicylat

Die Differenz vom Minimum (bei 497 nm) zum benachbarten Maximum (bei 470 nm) des Differenzspektrums, als Funktion der Salicylatkonzentration aufgetragen, ergibt die Dosis-Wirkungskurve (Abb. 4.9). Die Verwendung der Differenz vom größeren Maximum bei 443 nm zum Minimum würde zwar zu größeren Signalen führen, hätte jedoch den Nachteil, daß beim Auftreten einer Untergrundstörung mit schrägem Verlauf auch der Fehler sehr viel größer wäre.

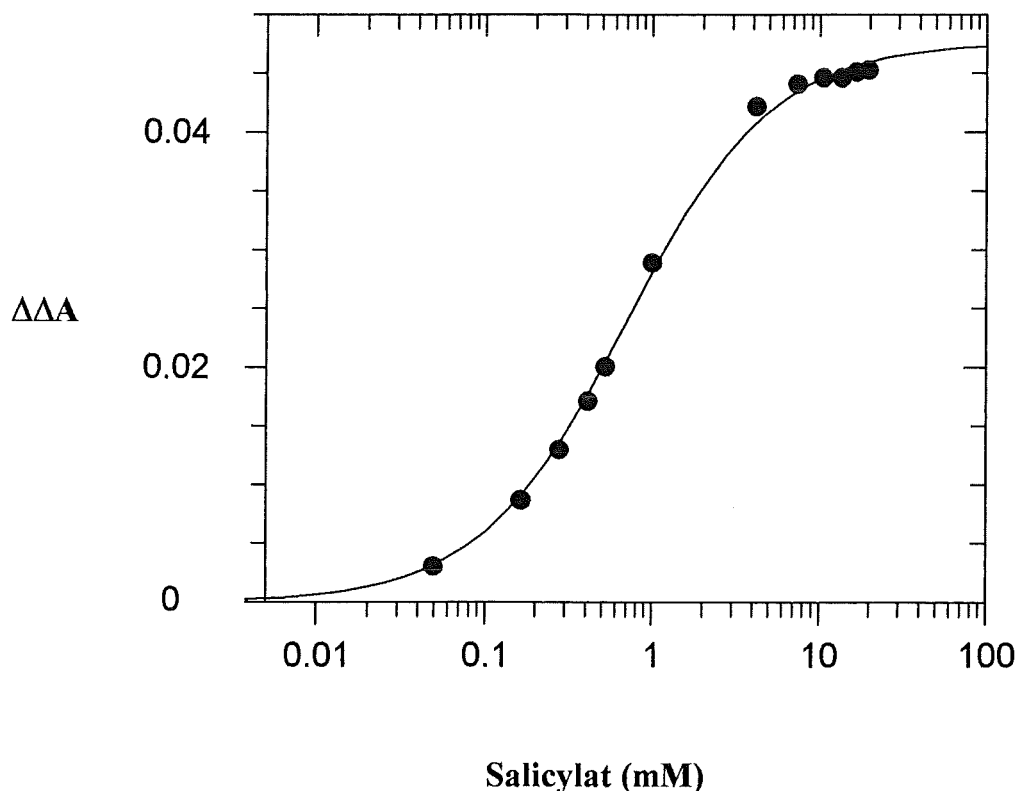


Abb. 4.9: Differenz ($\Delta\Delta A = \Delta A_{470 \text{ nm}} - \Delta A_{497 \text{ nm}}$) von 6 μM Salicylathydroxylase in Abhängigkeit von der Salicylatkonzentration – Salicylathydroxylase original GDS-Enzymlösung

Aus der Dosis-Wirkungskurve ist ersichtlich, daß die Nachweisreaktion sehr empfindlich auf Salicylat anspricht und einen weiten Bereich an Salicylatkonzentrationen abdeckt. Dies sind wichtige Voraussetzungen für den Einsatz der Nachweisreaktion in einem Biosensor.

Die Abhängigkeit der Differenz ($\Delta\Delta A$) von der Salicylatkonzentration läßt sich mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes beschreiben.

Kurve:
$$\Delta\Delta A = \frac{\Delta\Delta A_{\max}}{1 + \frac{K_d}{[\text{Salicylat}]}}$$

Der K_d -Wert ist die Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes. Ein Kurvenanpassungsprogramm (GraFit 2.0; Erithacus Software Ltd, Staines, U.K., 1989, 1990) ergibt für den K_d -Wert:

Regression:
$$K_d = 0,54 \text{ mM}$$

Mit Hilfe des K_d -Werts ist es möglich ein kalibrationsfreies Meßsystem zu bauen.

Die Absorptionsspektroskopie besitzt also gute spektrale Änderungen, mit einem isosbestischen Punkt, der es ermöglicht Störungen des Salicylatsignals zu korrigieren. Somit bietet diese Meßmethode gute Voraussetzungen für den Einsatz in einem Biosensor.

Die nächste wichtige Frage ist, in welchem Bereich sich der Einfluß des pH-Werts und der Temperatur auf die Absorptionsänderung des Enzyms bei der Beprobung mit Salicylat bemerkbar macht.

4.1.5 pH-Wert-Einfluß

Ein pH-Wert von 4,66 führt zur Denaturierung des Enzyms und Eintrübung der Lösung. Im Bereich $5 \leq \text{pH} \leq 11,5$ läßt sich das gewohnte salicylatinduzierte Differenzspektrum beobachten. Bei einem pH-Wert von 12,50 stellt sich im Verlauf von etwa 2,5 h eine leichte Veränderung im Differenzspektrum ein, die jedoch nicht mehr salicylatspezifisch ist (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Beprobung der Salicylathydroxylase mit Salicylat bei unterschiedlichen pH-Werten – die Einstellung des jeweiligen pH-Werts erfolgt mit Essigsäure bzw. Natronlauge, insgesamt wird die GDS-Enzymlösung auf $\frac{1}{4}$ der ursprünglichen Konzentration verdünnt, die Salicylatkonzentration beträgt 20 mM.

pH-Wert	Beobachtung	Reaktionszeit
4,66	Eintrübung der Lösung	-
5,00		
5,50		
6,33		
6,88	Normales Differenzspektrum	< 5 s
7,00		
8,00		
9,00		
11,50		
12,50	Verändertes Spektrum	~2,5 h

4.1.6 Temperatureinfluß

Bei niedriger Temperatur ist eine Verlängerung der Reaktionszeit zu erwarten. Dies ist aber unter den gegebenen Bedingungen selbst bei 10 °C noch nicht meßbar. Bei 50 °C kommt es dann zur Denaturierung und Eintrübung der Lösung (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Beprobung der Salicylathydroxylase mit Salicylat bei unterschiedlichen Temperaturen – die GDS-Enzymlösung wird mit Phosphatpuffer (pH = 6,88) auf $\frac{1}{4}$ der ursprünglichen Konzentration verdünnt, die Salicylatkonzentration beträgt 20 mM.

Temperatur	Beobachtung	Reaktionszeit
10 °C	Normales Differenzspektrum	< 5 s
20 °C		
30 °C		
40 °C		
50 °C	Eintrübung der Lösung	-

Die Messungen in Lösung lassen für den praktischen analytischen Einsatz des Enzyms eine ausreichende pH- und Temperaturstabilität erwarten.

4.1.7 Schlußfolgerungen zu den Ergebnissen der Küvettenversuche für den Bau eines Biosensors unter Verwendung von Salicylathydroxylase

Als Meßmethoden für den Salicylatnachweis eignen sich sowohl die Fluorimetrie, als auch die Absorptionsspektroskopie. Die Absorptionsspektroskopie bietet mit dem charakteristischen Maxima-Minimaverlauf des Differenzspektrums und einem isosbestischen Punkt jedoch mehr Möglichkeiten, im praktischen Einsatz das richtige Signal von Störungen zu unterscheiden, als die einfache Fluoreszenzerhöhung in Anwesenheit von Salicylat und entspricht somit besser den Anforderungen eines Biosensors.

Die Messungen in Lösung lassen für den praktischen analytischen Einsatz des Enzyms eine ausreichende pH- und Temperaturstabilität erwarten.

Weiterhin zeigt sich, daß sich das Gleichgewicht der Nachweisreaktion schnell einstellt und von der Dosis-Wirkungskurve ein weiter Bereich an Salicylatkonzentrationen abgedeckt wird.

Damit sind gute Voraussetzungen für den Bau eines Biosensors gegeben.

4.2 Orientierende Untersuchungen zur Auswahl einer geeigneten Immobilisierungsmethode

Der zweite Teil der Arbeit befaßt sich mit den Ergebnissen der Enzymimmobilisierung.

4.2.1 Immobilisierung in Polyacrylamid (PAA)

Vergleich der Absorptionen des PAA-Gels mit und ohne Glucoseoxidase

Vorversuche zur Immobilisierung in PAA werden mit Glucoseoxidase als Enzym durchgeführt, da es in größerer Menge zur Verfügung steht und als Flavoenzym eine vergleichbare Absorptionscharakteristik wie Salicylathydroxylase aufweist. Die optisch guten Eigenschaften von PAA-Gelen zeigen sich im direkten Vergleich der Absorption von PAA-Gelen mit und ohne Glucoseoxidase. Im relevanten Meßbereich haben die PAA-Gele keine Eigenabsorption (Abb. 4.10).

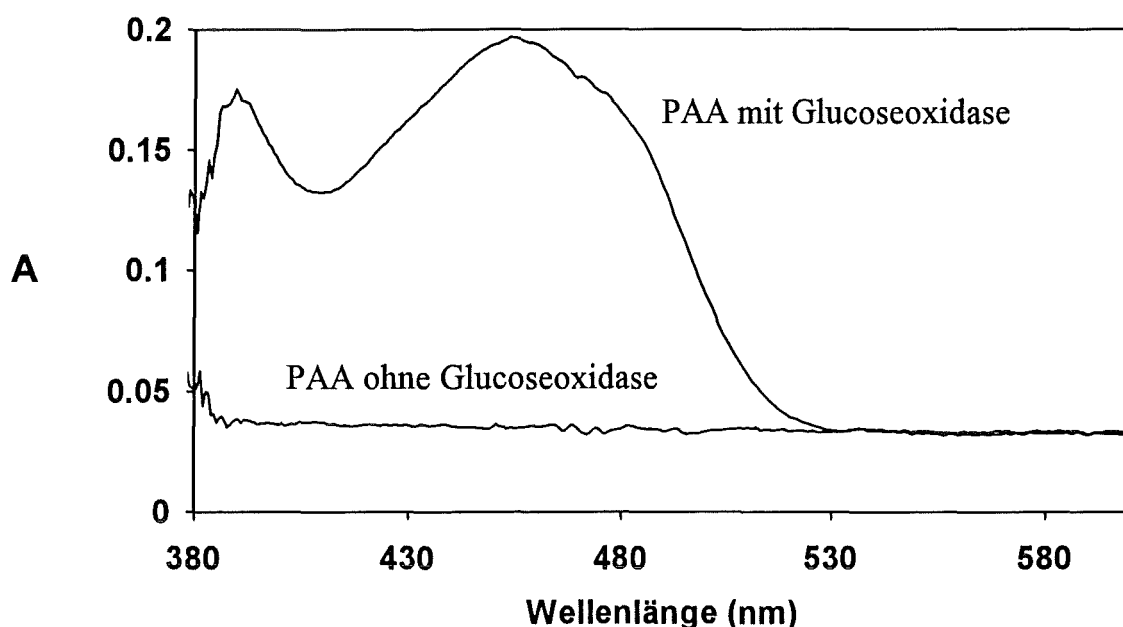


Abb. 4.10: Vergleich der Absorptionen des PAA-Gels mit und ohne Glucoseoxidase – beide Gele werden mit Phosphatpuffer (pH = 6,88) gespült.

Glucoseinduzierte Differenzspektren von Glucoseoxidase

Nach Zugabe von 100 mM Glucoselösung zeigt das in PAA immobilisierte Enzym eine Absorptionsänderung, die der in Lösung gemessenen Absorptionsänderung entspricht (Abb. 4.11). Das Enzym bleibt voll reduzierbar.

Die Absorptionsänderung im PAA-Gel weist jedoch im Vergleich zu Versuchen in Lösung, wo sich das Gleichgewicht innerhalb weniger Sekunden einstellt, selbst bei 100 mM Glucosekonzentration eine deutlich langsamere Reaktionsgeschwindigkeit auf.

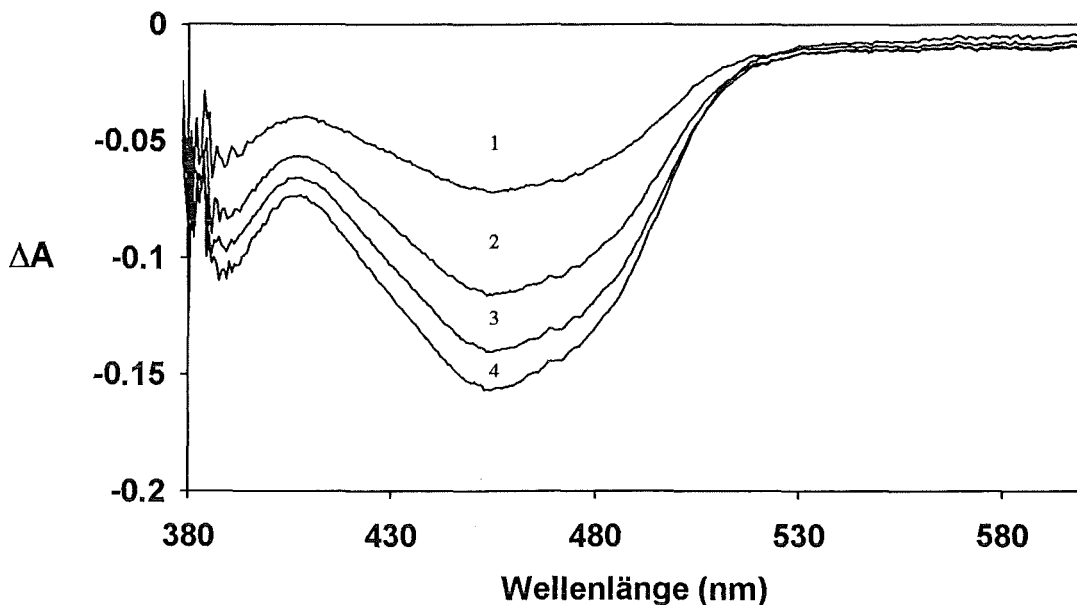


Abb. 4.11: Geschwindigkeit der Absorptionsänderung von Glucoseoxidase in PAA bei der Zugabe von Glucose – 100 mM Glucose in Phosphatpuffer (pH = 6,88); t/min = 1 (1); 2 (2); 3 (3); 4 (4).

Absorptionsspektren von Glucoseoxidase in PAA nach der Gefriertrocknung

Nach der Präparation müssen die PAA-Gele in Puffer gelagert werden. Da sie sehr viel Wasser enthalten, schrumpfen sie beim Trocknen (23 °C und 25 % Luftfeuchte) bis auf 20 % ihrer ursprünglichen Dicke. Beim Wiedereinbringen in Lösung quellen sie zum einen nur noch unvollständig, und zum anderen wird auch die Enzymaktivität bei dieser Art der Trocknung in Mitleidenschaft gezogen. Eine Möglichkeit die Gele dennoch trocken zu lagern bietet die Gefriertrocknung.

Die Gefriertrocknung ist eine etablierte Methode zur Haltbarmachung von Enzymen, welche es ermöglicht, PAA-Gele zu trocknen und gleichzeitig die Enzymaktivität voll zu erhalten. In dieser Form sind die PAA-Gele gut lagerbar. Sie behalten ihre ursprüngliche Form und können bei Bedarf sehr schnell rehydriert werden.

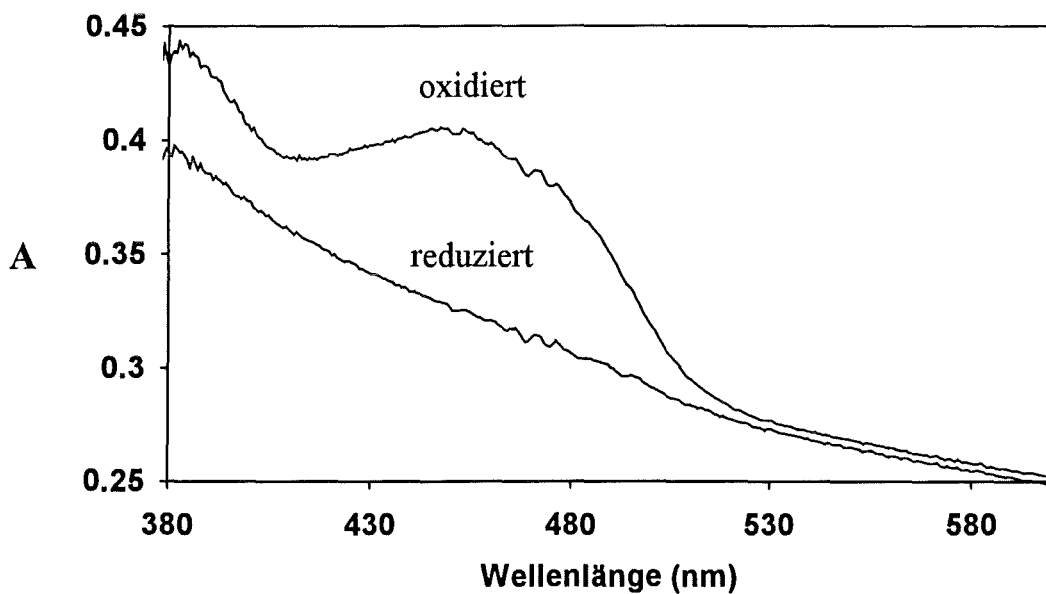


Abb. 4.12: Verhalten von gefriergetrockneten, glucoseoxidasehaltigen PAA-Gele bei der Beprobung mit Glucose – 100 mM Glucose in Phosphatpuffer (pH = 6,88)

Auch nach der Gefriertrocknung bleiben die glucoseoxidasehaltigen PAA-Gele mit Glucose vollständig reduzierbar. Die guten optischen Eigenschaften der PAA-Gele verschlechtern sich, was eine erhöhte Lichtstreuung zur Folge hat (Abb. 4.12).

Austragsverhalten des glucoseoxidasehaltigen PAA-Gels

Obwohl es sich bei der PAA-Methode um eine Einschlußimmobilisierung handelt, ist das Enzym in PAA gut eingebunden. Nach fünf Tagen Einspülphase ist kein Austrag mehr feststellbar (Abb. 4.13).

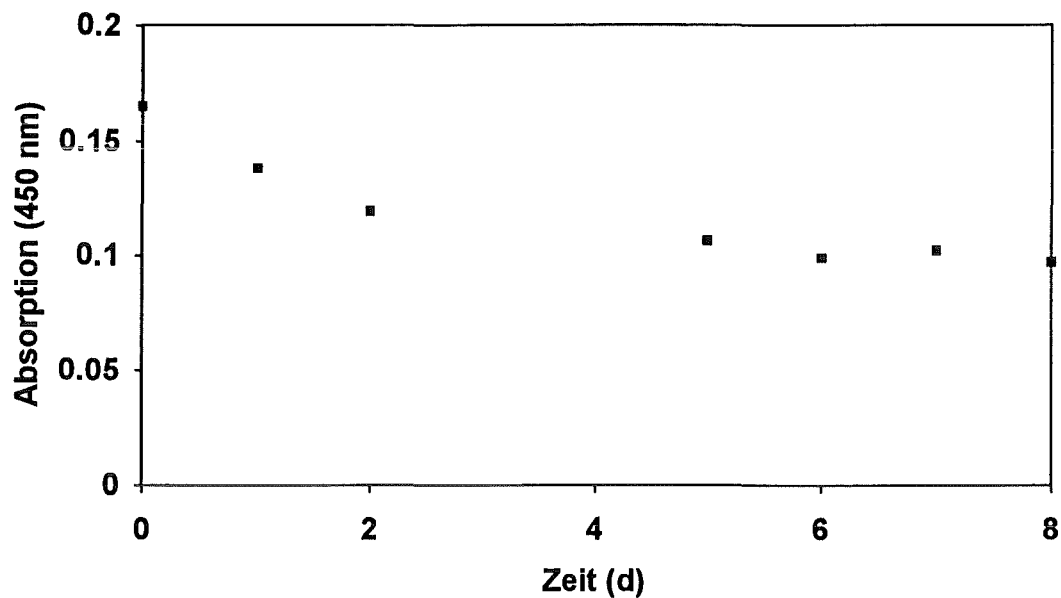


Abb. 4.13: Austragsverhalten des glucoseoxidasehaltigen PAA-Gels

Die Vorversuche mit Glucoseoxidase, bei denen die Enzymaktivität bei gleichzeitig gutem Austragsverhalten erhalten bleibt, zeigen die Eignung der PAA-Gele zur Enzymimmobilisierung. Weitere Versuche werden nun mit Salicylathydroxylase durchgeführt.

Eigenabsorption des PAA-Gels im Vergleich mit Salicylathydroxylase in PAA

Der Vergleich von PAA-Gelen mit und ohne Salicylathydroxylase zeigt, daß die PAA-Gele im relevanten Meßbereich keine Eigenabsorption haben (Abb. 4.14). Sie eignen sich daher gut für optische Messungen.

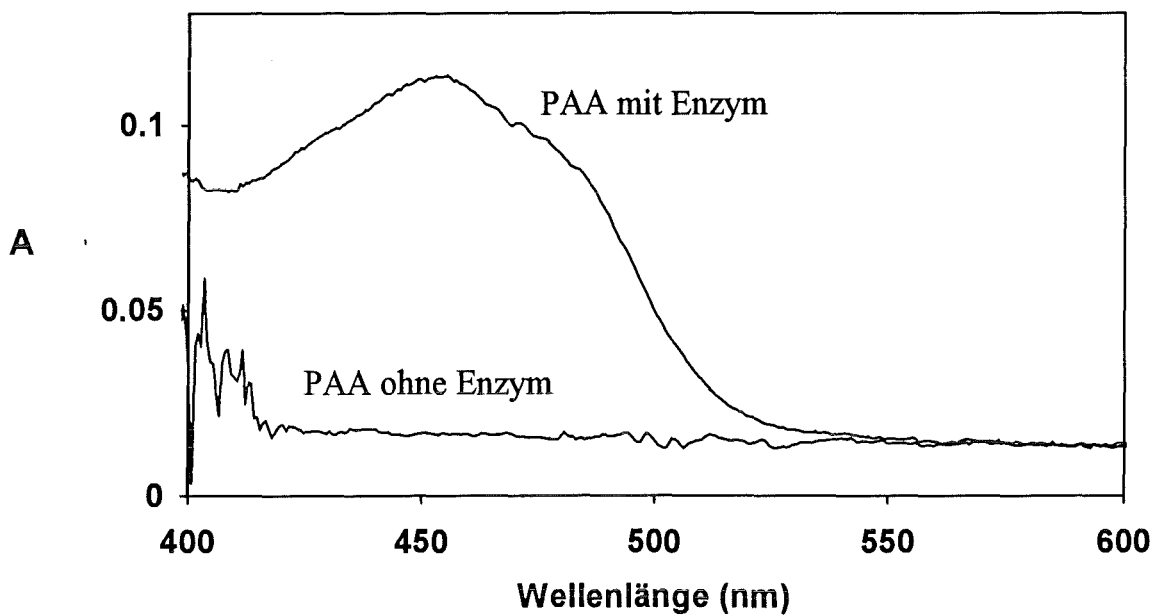


Abb. 4.14: Vergleich der Absorptionen des PAA-Gels mit und ohne Salicylathydroxylase – beide Gele werden mit Phosphatpuffer (pH = 6,88) gespült.

Absorptionsspektren der Salicylathydroxylase

Die salicylathydroxylasehaltigen Gele entsprechen in ihren physikalischen Eigenschaften den glucoseoxidasehaltigen Gelen. Sie sind ebenfalls von weicher Beschaffenheit und zeichnen sich durch gute Transparenz aus. Wie schon bei der Glucoseoxidase gelingt auch hier der Substratnachweis. So zeigt das in PAA immobilisierte Enzym nach der Zugabe von 0,5 mM Salicylatlösung deutliche Absorptionsänderungen (Abb. 4.15).

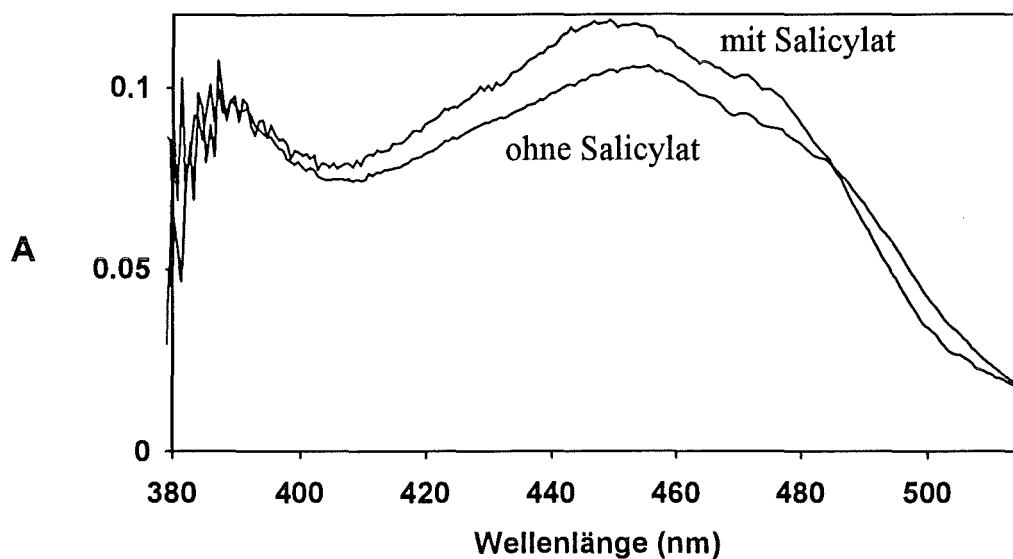


Abb. 4.15: Salicylathydroxylase in PAA vor und nach der Beprobung mit Salicylat – Beprobung mit 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88)

Salicylatinduzierte Absorptionsänderung von Salicylathydroxylase

Der ausgeprägte Maxima-Minimaverlauf des Differenzspektrums (Abb. 4.16) entspricht der für Salicylathydroxylase aus Messungen in Lösung bekannten Absorptionsänderung (vgl. Abb. 4.8). Geringfügige Abweichungen sind auf die Verwendung unterschiedlicher Puffer zurückzuführen.

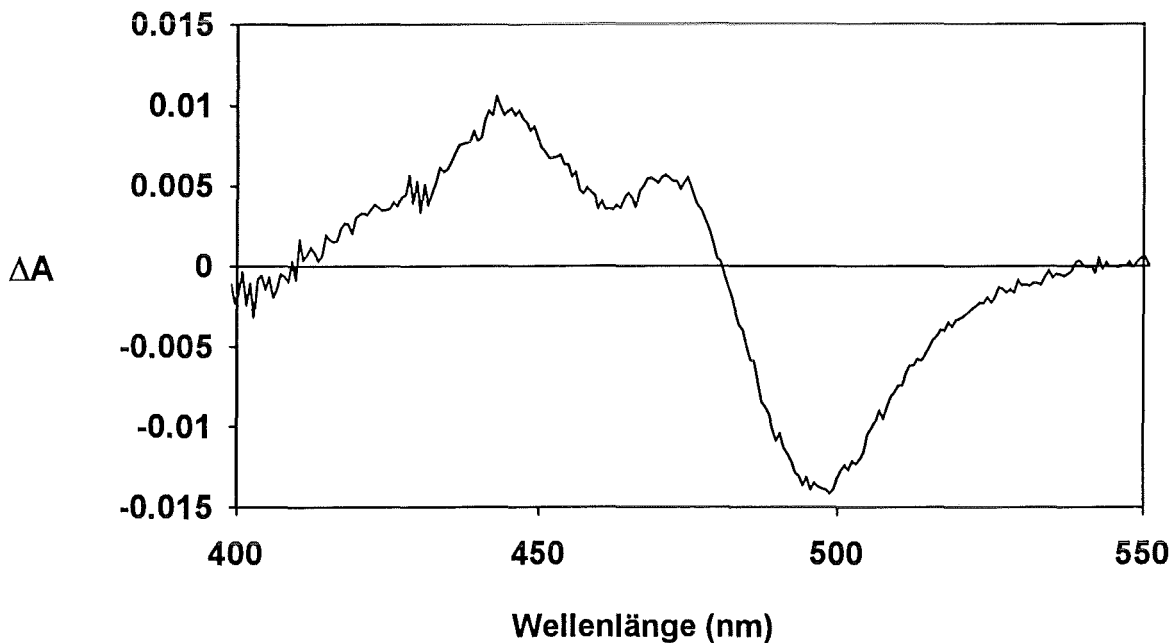


Abb. 4.16: Differenzspektrum der Salicylathydroxylase in PAA, aus der Absorption vor und nach der Beprobung mit Salicylat – Beprobung mit 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88)

Der Salicylatnachweis gelingt auch nach der Immobilisierung des Enzyms in PAA. Das Enzym ist aber so locker eingebunden, daß es nach etwa 4 Tagen Lagerung in Puffer vollständig ausgetragen ist. Dies läßt sich auf den Unterschied der Molmassen von Glucoseoxidase (168 000) und Salicylathydroxylase (91 000) zurückführen. Nach Erhöhung des Vernetzungsgrads durch höheren BIS-Anteil kommt es zur Eintrübung der Gele, so daß die optisch guten Eigenschaften verloren gehen.

4.2.2 Immobilisierung mit Proteinen über Quervernetzung

Die Miniaturisierung der Sensorpräparation ermöglicht es bei der Immobilisierung in quervernetzten Protein-Gelen auf Vorversuche mit Glucoseoxidase zu verzichten. Versuche die Enzymmoleküle direkt miteinander über Glutaraldehyd zu vernetzen, führen zu völligem Aktivitätsverlust. Erst der Zusatz von Rinderserumalbumin, ermöglicht es die Enzymaktivität zu erhalten. Dies führt zu sehr weichen, transparenten Gelen, die auch ohne Enzymzusatz schon eine leicht gelbliche Färbung aufweisen. Nach der Herstellung werden die Gele über Nacht mit Phosphatpuffer pH = 6,88 gespült, wodurch es zu einer leichten Quellung kommt. Die Absorptionsänderung in RSA-Gelen benötigt selbst bei hohen Salicylatkonzentrationen im Vergleich zu Versuchen in Lösung eine deutlich längere Zeit bis zum Erreichen der maximalen Signaländerung (Abb. 4.17).

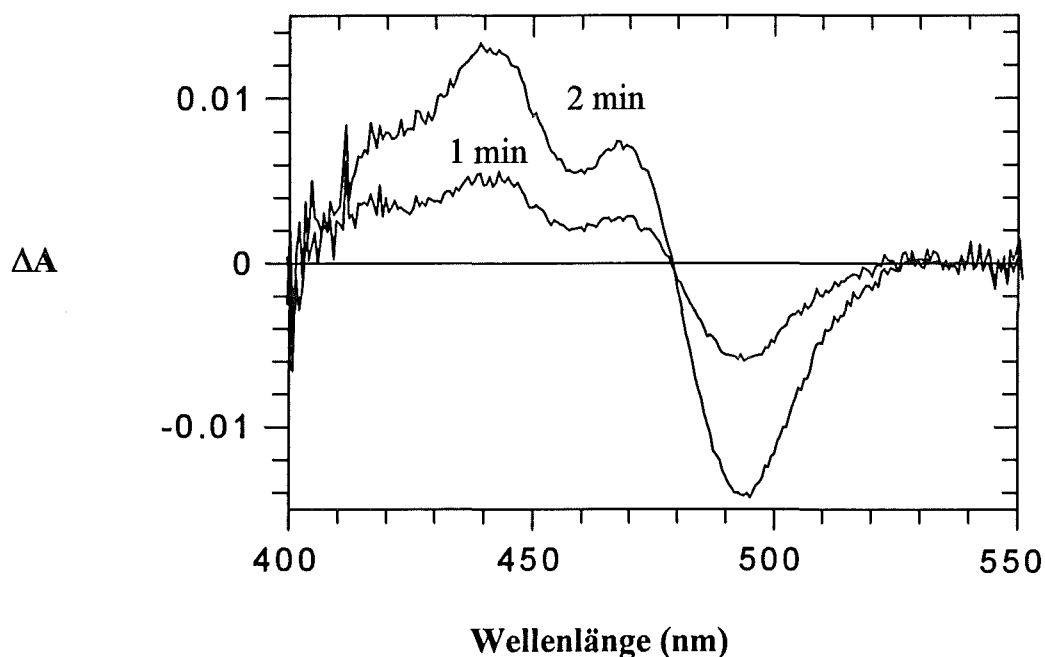


Abb. 4.17: Absorptionsänderung von Salicylathydroxylase im RSA-Gel bei der Beprobung mit Salicylat – 20 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88)

4.2.3 Immobilisierung von Enzymen durch Sol-Gel-Verfahren

Nach dem Sol-Gel-Verfahren zur Glucoseoxidaseimmobilisierung [Braun, Shtelzer, 1994] wird versucht, Salicylathydroxylase zu immobilisieren. Zur Einarbeitung in die Methode wird zunächst die Immobilisierung von Glucoseoxidase nach Literaturangaben reproduziert.

Nach geringfügiger Variation der Methode lassen sich mechanisch stabile, intensiv gelb gefärbte, klare Gele herstellen.

Glucoseinduzierte Differenzspektren von Glucoseoxidase

Wird die so immobilisierte Glucoseoxidase mit Glucose (100 mM) reduziert, so ist das gleiche abnehmende Flavinspektrum zu sehen (Abb. 4.18) wie in wäßriger Lösung (vgl. Abb. 4.5). Im immobilisierten Zustand spricht das Enzym allerdings deutlich langsamer auf Salicylat an.

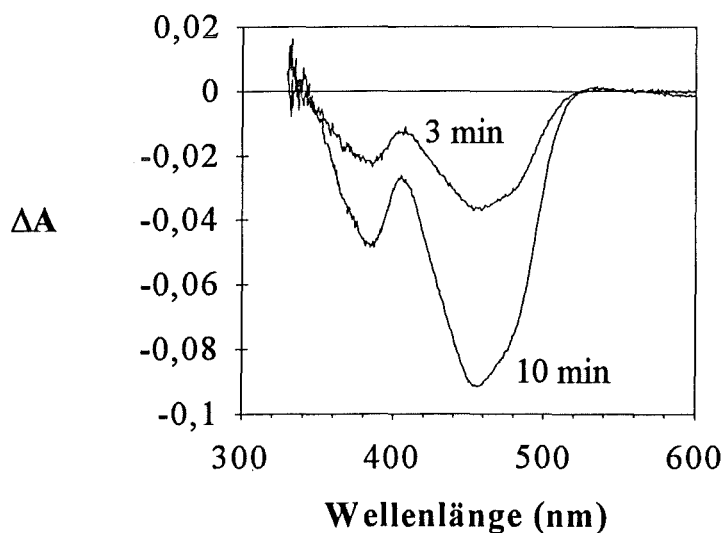


Abb. 4.18: Geschwindigkeit der Absorptionsänderung der mittels Sol-Gel-Verfahren immobilisierten Glucoseoxidase bei der Beprobung mit Glucose – 100 mM Glucose in Phosphatpuffer (pH = 6,88)

Spektren von Salicylathydroxylase in Lösung und in einer Sol-Gel-Matrix

Die Immobilisierung der Salicylathydroxylase unter gleichen Bedingungen wie für Glucoseoxidase führt ebenfalls zu mechanisch stabilen Gelen mit guten optischen Eigenschaften. Nach der Immobilisierung bleibt die Flavingruppe in gleicher Weise (Abb. 4.19) wie in Lösung reduzierbar (vgl. Abb. 4.6).

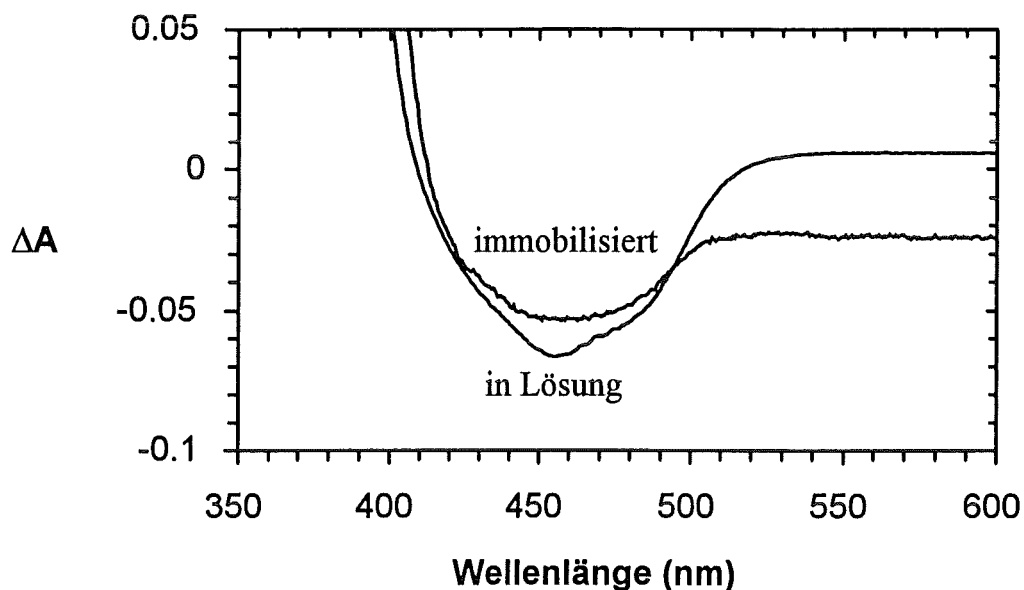


Abb. 4.19: Reduktion von Salicylathydroxylase mit Dithionit, in Lösung und im Gel
– 10 mg Dithionit auf 1 mL Phosphatpuffer (pH = 6,88)

Eine salicylatspezifische Absorptionsänderung kann, selbst bei hoher Salicylatkonzentration (20 mM), auch nach zwei Stunden noch nicht beobachtet werden. Dies läßt sich mit einer zu engen Einbindung in der Gelmatrix erklären, wodurch Salicylat nicht mehr an die spezifische Bindestelle gelangen kann.

Weitere Immobilisierungsversuche mit dem Sol-Gel-Verfahren

Das Ziel weiterer Immobilisierungsversuche mit dem Sol-Gel-Verfahren ist es, die Enzymaktivität über die Herstellung einer lockeren Gelmatrix zu erhalten. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, bietet der Zusatz von Alginat zur Ausgangsmischung. Der Einbau von Alginatmolekülen in die Gelmatrix führt zu einer starken Eintrübung der Gele. Diese schlechteren optischen Eigenschaften lassen eine Auswertung der salicylatinduzierten Absorptionsänderung nicht mehr zu. Um dennoch eine Aussage über die Enzymaktivität machen zu können, wird die Abnahme der NADH-Absorption bei 340 nm in Gegenwart des immobilisierten Enzyms nach der Zugabe von Salicylat gemessen.

Vorversuch:

In einem Vorversuch wird die Enzymaktivität nach der Sol-Gel-Immobilisierung mittels Test-Kit-Reaktion getestet [GDS, 1995].

Tab. 4.3: Test der Enzymaktivität

Zusammensetzung				A _{340 nm}
Enzym (Sol-Gel)	Enzym (Lösung)	NADH	Salicylat	(Endpunkt)
		x	x	1,09
		x	x	1,28
x		x		1,24
x		x		1,26
	x	x	x	0,489
	x	x	x	0,584
x		x	x	0,392 ¹
x		x	x	0,554 ²

¹ eine Woche alt, naß gelagert bei RT

² sieben Wochen alt, trocken gelagert bei RT

Die Versuche mit alginathaltigen Gelen bestätigen, daß es möglich ist, auch unter den Bedingungen des Sol-Gel-Verfahrens die Enzymaktivität zu erhalten (Tab. 4.3).

Immobilisierung von Salicylathydroxylase nach optimiertem Sol-Gel-Verfahren

Eine bessere Möglichkeit Gele mit lockerer Struktur herzustellen, ist es, die Schrumpfung der Gele bei der Trocknung zu verhindern. Hierzu werden die Gele nach der Präparation direkt in eine Feuchtekammer überführt, wo sie in nahezu 100 %iger Luftfeuchtigkeit im Verlauf von 19 h aushärten können. Zur Messung wird ein miniaturisierter Aufbau auf der Basis von Lichtleitern verwendet. Die Zugabe von Salicylat bewirkt die gewohnte Absorptionsänderung mit langsamer Reaktionsgeschwindigkeit. Der Gleichgewichtszustand wird bei Beprobung mit einer 0,5 mM Salicylatlösung nach 5 Minuten erreicht (23 °C) (Abb. 4.20).

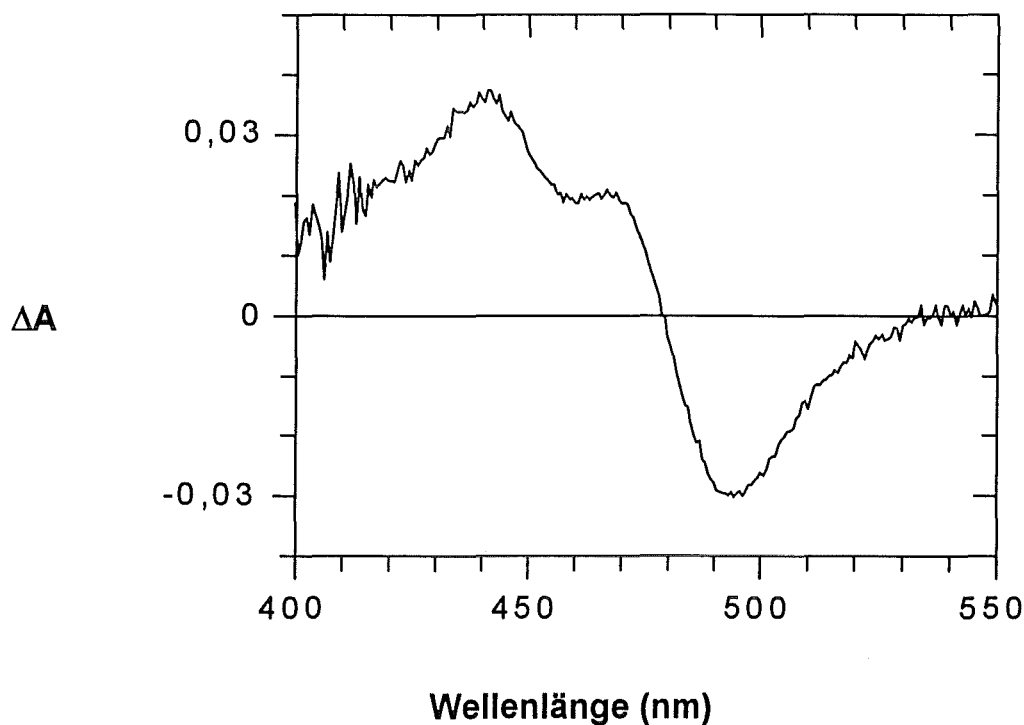


Abb. 4.20: Differenzspektrum der immobilisierten Salicylathydroxylase – 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88)

Dieser Versuch belegt, daß sich auch mit dem Sol-Gel-Verfahren mechanisch stabile, transparente, salicylathydroxylasehaltige Gele herstellen lassen, die den Salicylatnachweis ermöglichen.

4.2.4 Immobilisierung in Hohlfasern

Vorversuch mit Dialysemembranen

Die Immobilisierung von Enzymen mit Hilfe von Dialysemembranen ist eine vor allem in der Enzymreinigung etablierte Methode [Spectrum, 1995]. Dialysemembranen bieten gute Diffusionsbedingungen und damit auch kurze Ansprechzeiten bei gleichzeitig guter mechanischer Stabilität. Ihre einheitliche Beschaffenheit verhindert den Enzymaustrag. Erste Versuche, die Immobilisierung mit Dialysemembranen auch für optische Systeme zugänglich zu machen, werden mit Hilfe einer mit zwei Dialysemembranen bespannten Durchflußküvette durchgeführt, wobei der Zwischenraum zwischen den beiden Membranen mit Enzymlösung befüllt wird. Die anschließende Beprobung führt zur salicylatinduzierten Absorptionsänderung (Abb. 4.21).

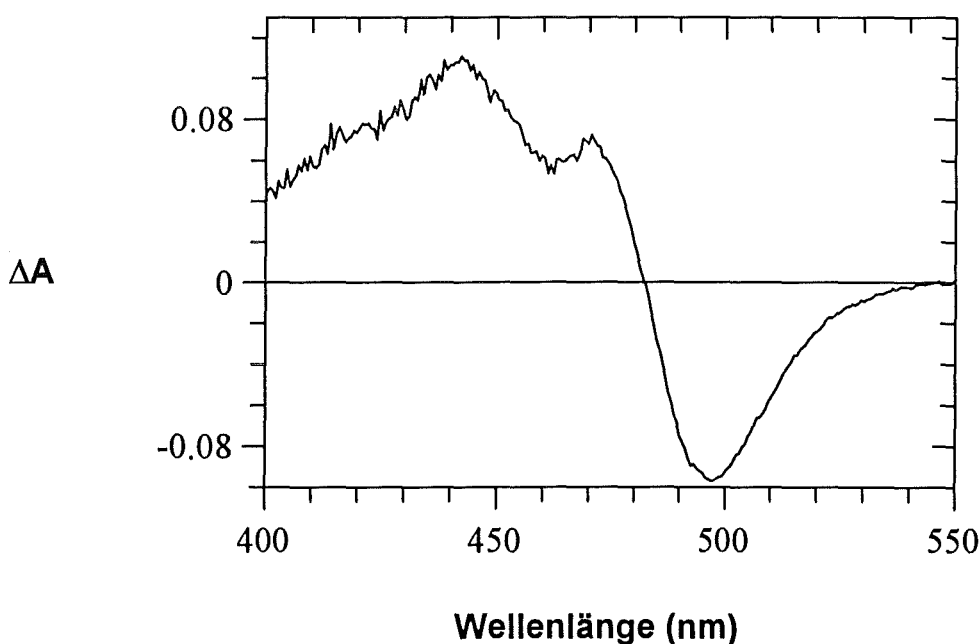


Abb. 4.21: Differenzspektrum der zwischen Dialysemembranen immobilisierten Salicylathydroxylase – 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88)

Diese Art der Immobilisierung benötigt große Enzymmengen (0,5 mL GDS Enzymlösung), und die Einstellung des Gleichgewichtes erfolgt für 0,5 mM Salicylat erst nach einer halben Stunde.

Immobilisierung in Hohlfasern

Eine neue, im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Immobilisierungsmethode auf Basis von Hohlfasern ermöglicht auf Grund ihrer Miniaturisierung sehr kurze Ansprechzeiten unter Verwendung minimalster Enzymmengen. Durch Heranführen der Lichtleiter bis an die Hohl-faser lassen sich gute, rauschfreie Signaländerungen erhalten.

Nach Zugabe von Salicylat zeigt das in der Hohl-faser immobilisierte Enzym die für den Salicylatnachweis nötige Absorptionsänderung (Abb. 4.22).

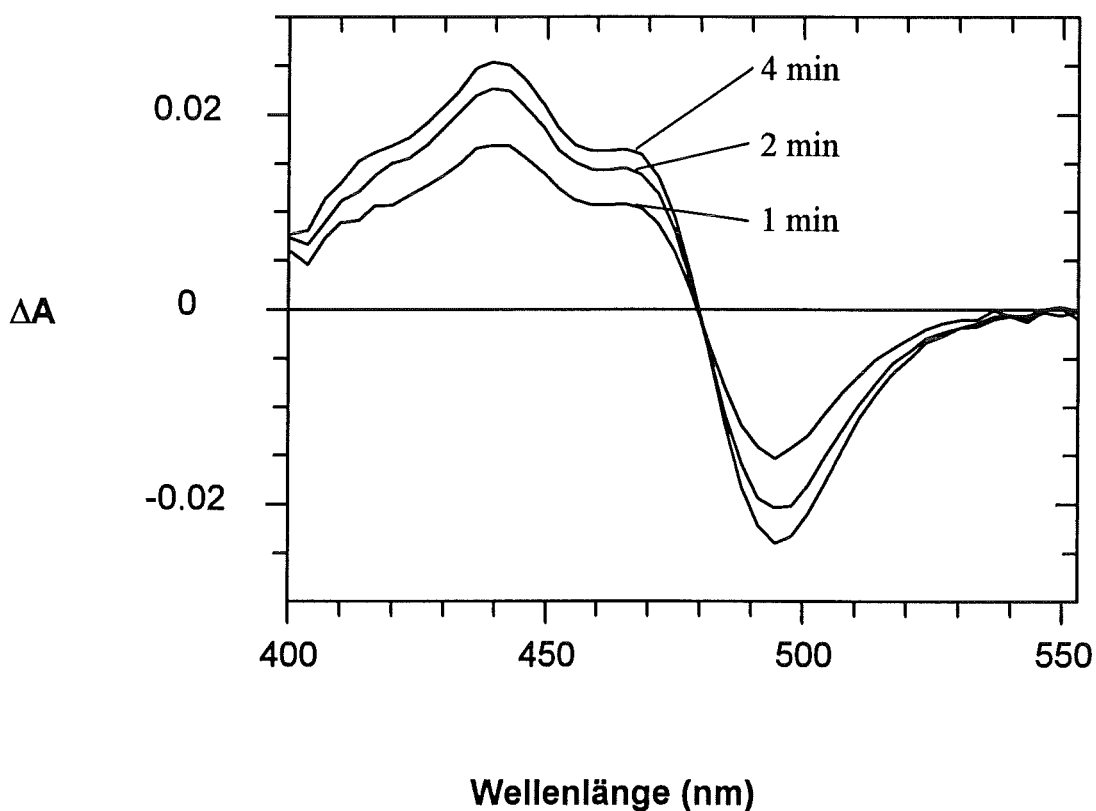


Abb. 4.22: Geschwindigkeit der Absorptionsänderung der in einer Hohl-faser immobilisierten Salicylathydroxylase – 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88)

Die Absorptionsänderung des in einer Hohl-faser immobilisierten Enzyms weist im Vergleich zu Versuchen in Lösung eine langsamere Reaktionsgeschwindigkeit auf.

4.2.5 Beurteilung der Immobilisierungsmethoden

Immobilisierung in PAA-Gelen

Zur Immobilisierung von Glucoseoxidase sind PAA-Gele sehr gut geeignet. Für Salicylathydroxylase machen sich starke Austragseffekte bemerkbar, da das Enzym wesentlich kleiner ist, als Glucoseoxidase. Versuche eine höhere Quervernetzung zu erreichen, führen zu trüben Gelen, die sich nicht mehr für optische Messungen eignen. Die optischen Messungen können durch Quellung der Gele beeinträchtigt werden.

Immobilisierung in RSA-Gelen

In RSA-Gelen wird das Enzym kovalent gebunden und damit sehr beständig immobilisiert. Es treten keine Austragseffekte auf. Dafür verlängert der feste Einschluß die Meßzeit. Ein weiterer Nachteil sind Veränderungen durch Quellung der Gele, die optische Messungen beeinträchtigen.

Immobilisierung mittels Sol-Gel-Verfahren

Die starre Gelmatrix verhindert das Auftreten von Störungen durch Quellungseffekte. Nachteilig wirkt sich aus, daß nicht alle Enzymmoleküle für die Enzym-Substrat-Komplexbildung verfügbar sind.

Immobilisierung in Hohlfasern

Die Form ist durch die Faserdimensionen vorgegeben, so daß sich Quellungseffekte nicht bemerkbar machen. Die schonende Aufkonzentrierung in der Hohlfaser ermöglicht sehr hohe Enzymdichten, wobei die Enzymmoleküle wie in Lösung für Salicylat zugänglich sind. Die einheitliche Beschaffenheit der aktiven Membran verhindert einen Austrag des Enzyms.

Im Vergleich mit den anderen Methoden besitzt die Immobilisierung in Hohlfasern wesentliche Vorteile für den Aufbau eines Biosensors. Ein wichtiger Vorteil liegt in der einfachen Möglichkeit der Erweiterung der Methode auf weitere Analyten unter Verwendung des jeweils spezifischen Enzyms, wodurch die Entwicklung eines Multianalysensors für die Notfalldiagnostik ermöglicht wird.

4.3 Charakterisierung des Hohlfasersensors in Lösung

4.3.1 Geschwindigkeit des salicylatinduzierten Signals

Im Vergleich zu Messungen in Lösung, ist die Gleichgewichtseinstellung der Nachweisreaktion im Biosensor stark verzögert.

Der zeitliche Verlauf des Sensorsignals ergibt sich durch Auftragen der Differenz ($\Delta\Delta A = \Delta A_{468 \text{ nm}} - \Delta A_{492 \text{ nm}}$) gegen die Zeit. Dabei stellt sich auch nach wiederholter Beprobung mit derselben Salicylatkonzentration, der gleiche Kurvenverlauf, mit der gleichen Halbwertszeit ein (Abb. 4.23; Abb. 4.24). Bei 0,5 mM Salicylatlösung liegt sie bei etwa 40 s. Die Abbildungen (Abb. 4.23; Abb. 4.24; Abb. 4.25) zeigen den Verlauf des Sensorsignals des ersten Hohlfasersystems (vgl. unter 3.2.4 Immobilisierung in Hohlfasern).

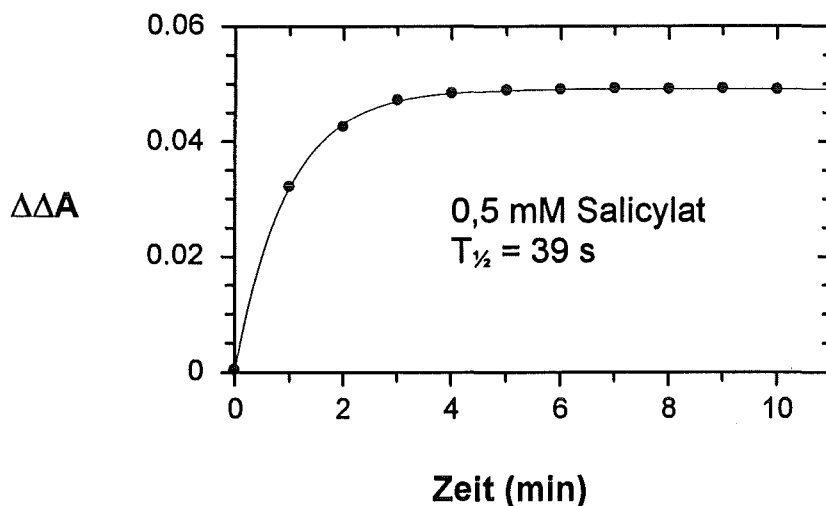


Abb. 4.23: Geschwindigkeit des salicylatinduzierten Signals – 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88), Temperatur 23 °C

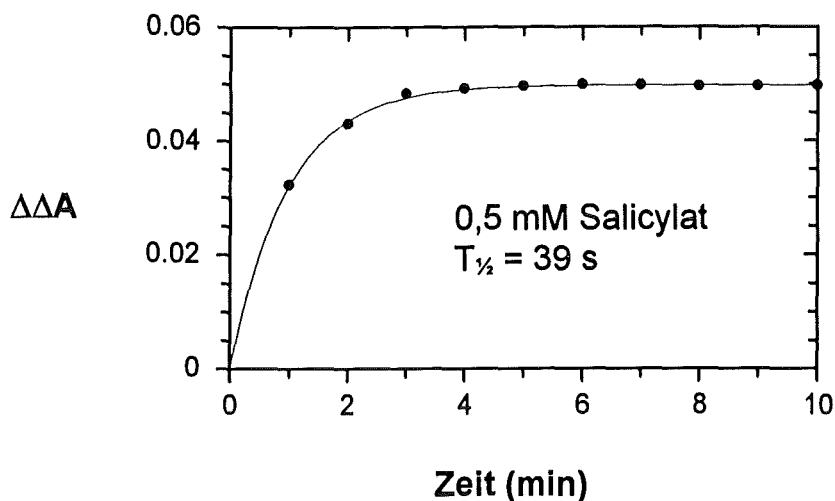


Abb. 4.24: Geschwindigkeit des salicylatinduzierten Signals bei wiederholter Beprobung – 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88), Temperatur 23 °C

Wird mit einer Salicylatlösung niedrigerer Konzentration beprobt, so führt dies zu einem flacheren Kurvenverlauf und einer längeren Halbwertszeit (Abb. 4.25).

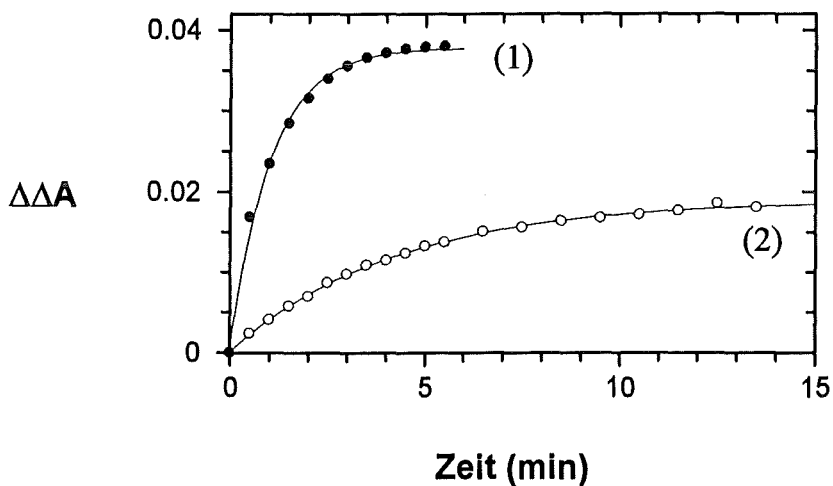


Abb. 4.25: Vergleich der Geschwindigkeit des salicylatinduzierten Signals bei zwei verschiedenen Salicylatkonzentrationen – Temperatur 23 °C
 (1) 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88); $T_{1/2} = 43 \text{ s}$
 (2) 0,05 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88); $T_{1/2} = 176 \text{ s}$

4.3.2 Einfluß der Sensorgestaltung auf die Reaktionsgeschwindigkeit

Wesentlich kürzere Reaktionsgeschwindigkeit lassen sich unter Verwendung einer Klemmküvette für Hohlfasern (vgl. 3.2.4 Immobilisierung in Hohlfasern, Abb. 3.8) erzielen. Die Bauart der Klemmküvette verbessert die Umströmung der Hohlfaser, wodurch der Substrataustausch begünstigt wird und sich das Gleichgewicht schneller einstellt (Abb. 4.26). Aus diesem Grund werden alle weiteren Versuche mit einer Klemmküvette durchgeführt.

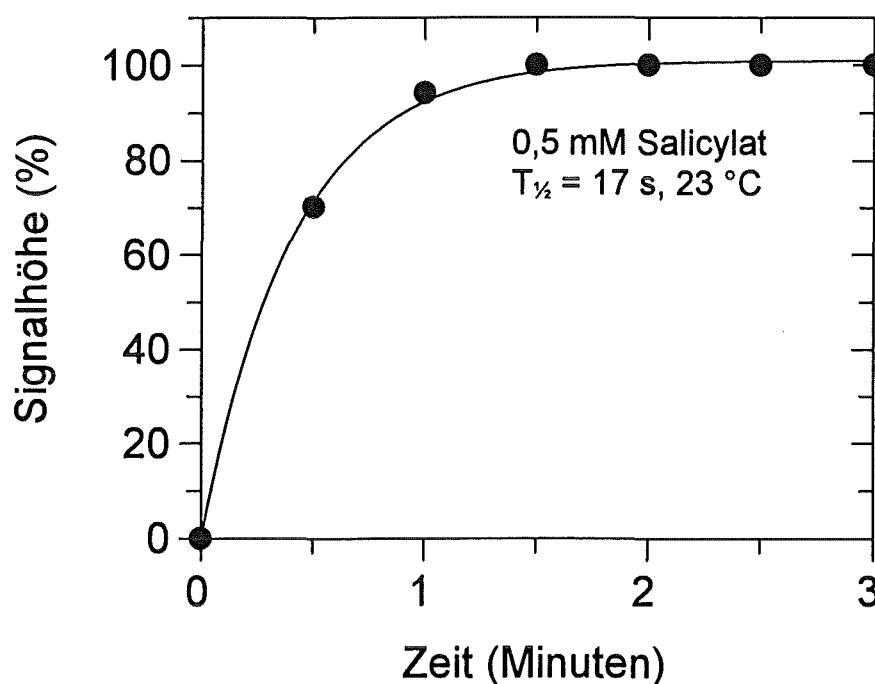


Abb. 4.26: Geschwindigkeit des salicylatinduzierten Signals bei 23 °C in einer Klemmküvette – 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88), Halbwertszeit: 17 s
100 % Signalhöhe stellt den Endpunkt der Reaktion dar.

4.3.3 Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeit des Signals von 0,5 mM Salicylat

Im Vergleich zu Messungen im Gleichgewichtszustand weist die Geschwindigkeit des salicylatinduzierten Signals eine deutliche Temperaturabhängigkeit auf. So verlängert sich die Halbwertszeit von 17 s bei Raumtemperatur (23 °C) auf 37 s bei 10 °C (Abb. 4.27). Diese Temperaturabhängigkeit schränkt die Verwendung von Geschwindigkeitsmessungen zur Salicylatbestimmung stark ein.

Der Gleichgewichtszustand wird auch bei 10 °C mit 0,5 mM Salicylat, einer Konzentration die unterhalb des toxikologisch relevanten Bereichs liegt, schon nach etwa 90 s erreicht.

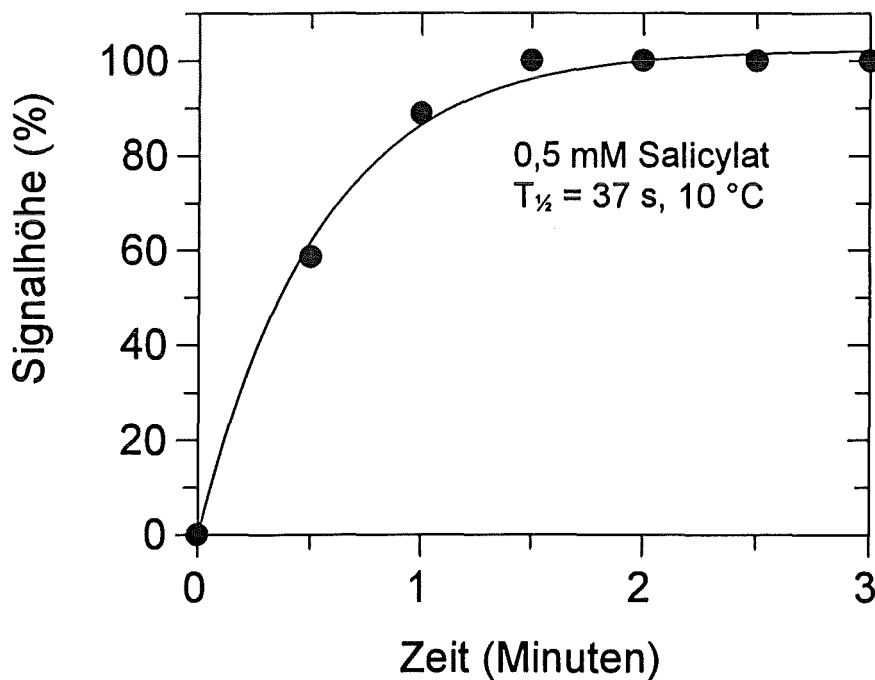


Abb. 4.27: Geschwindigkeit des salicylatinduzierten Signals bei 10 °C – 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88), Verwendung einer Klemmküvette, Halbwertszeit: 37 s
100 % Signalhöhe stellt den Endpunkt der Reaktion dar.

4.3.4 pH-Abhängigkeit des Signals

Im Blut ist der pH-Wert normalerweise durch ein Hydrogencarbonat-Puffersystem sehr gut bei 7,4 gepuffert. In Folge von Salicylatvergiftungen kommt es meist zu einer Acidose d. h. zu einer Verschiebung des pH-Werts in den sauren Bereich [Gaudreault et al., 1982; Gabow et al., 1978]. Diese Verschiebung kann über eine verstärkte Atmungsaktivität und damit verbundene CO₂-Abgabe wieder kompensiert werden (kompensierte Acidose). Wird aber in Folge von Hyperventilation, was vor allem bei Kleinkindern auftritt [Snodgrass et al., 1981] zuviel CO₂ ausgeatmet, so verschiebt sich der pH-Wert in den basischen Bereich [Harper et al., 1987].

Eine Änderung des pH-Werts kann auch eine Änderung des Meßsignals bewirken. So können mit zunehmendem pH-Wert mehr OH⁻-Ionen mit Salicylat um die Bindestelle konkurrieren. Dies hat eine Abnahme des Salicylatsignals zur Folge.

Dieser Effekt ist jedoch im relevanten pH-Bereich zu gering, um das Meßsignal wesentlich zu beeinflussen (Abb. 4.28, Abb. 4.29).

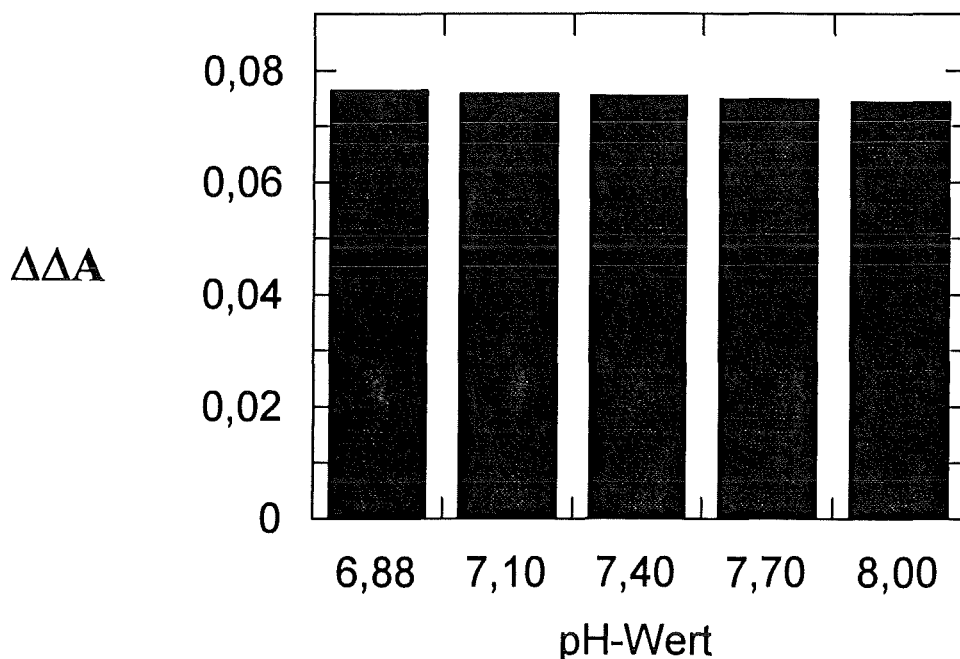


Abb. 4.28: Einfluß des pH-Werts auf die Signalthöhe von 0,5 mM Salicylat – 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88), auf den jeweiligen pH-Wert mit Natronlauge eingestellt, Signal = $\Delta A_{468 \text{ nm}} - \Delta A_{492 \text{ nm}}$

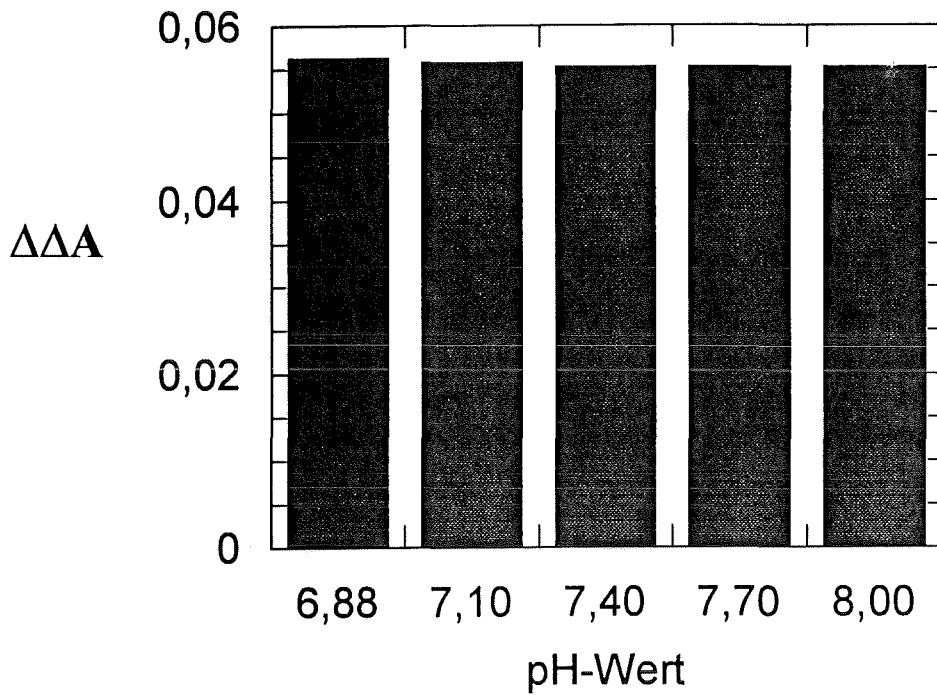


Abb. 4.29: Einfluß des pH-Werts auf die Signalhöhe von 5 mM Salicylat – 5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88), auf den jeweiligen pH-Wert mit Natronlauge eingestellt, Signal = $\Delta A_{468 \text{ nm}} - \Delta A_{492 \text{ nm}}$

4.3.5 Temperaturabhängigkeit des Signals

Für die unterhalb des toxikologisch relevanten Salicylatbereichs liegende Salicylatkonzentration von 0,5 mM, ergibt sich für den getesteten Bereich von $10\text{ °C} \leq T \leq 40\text{ °C}$ eine leichte Temperaturabhängigkeit, die für den in der Praxis relevanten Bereich von 20 bis 30 °C nur 3 % beträgt (Abb. 4.30).

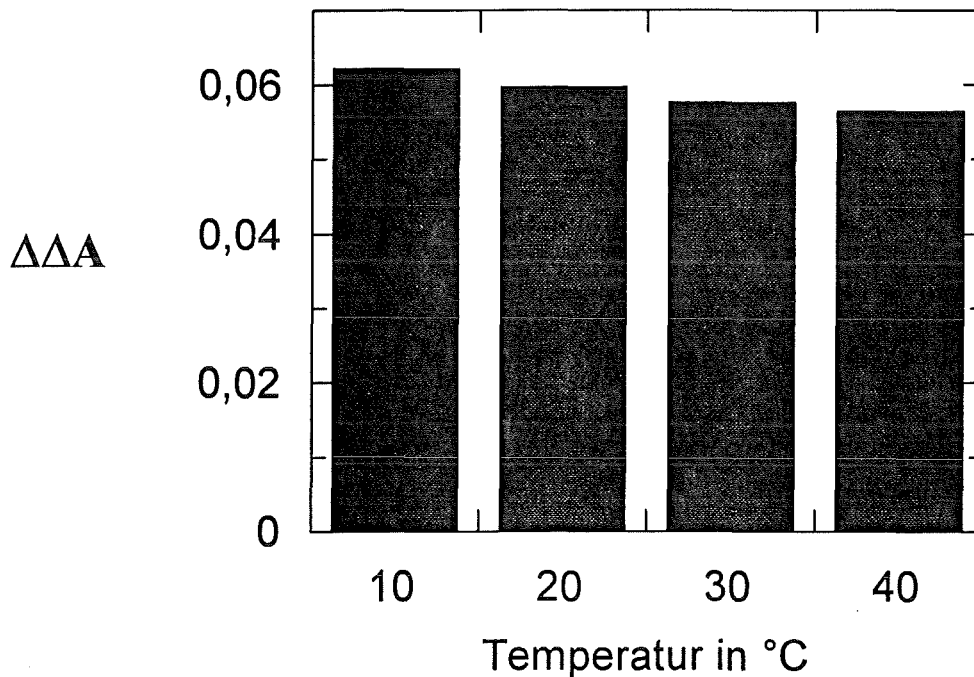


Abb. 4.30: Einfluß der Temperatur auf die Signalhöhe von 0,5 mM Salicylat – 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88), auf die jeweilige Temperatur eingestellt, $\text{Signal} = \Delta A_{468\text{ nm}} - \Delta A_{492\text{ nm}}$

Im oberen toxikologisch relevanten Konzentrationsbereich (hier bei 5 mM Salicylat dargestellt, Abb. 4.31) läßt sich über den gesamten Testbereich keine Abhängigkeit von der Temperatur feststellen.

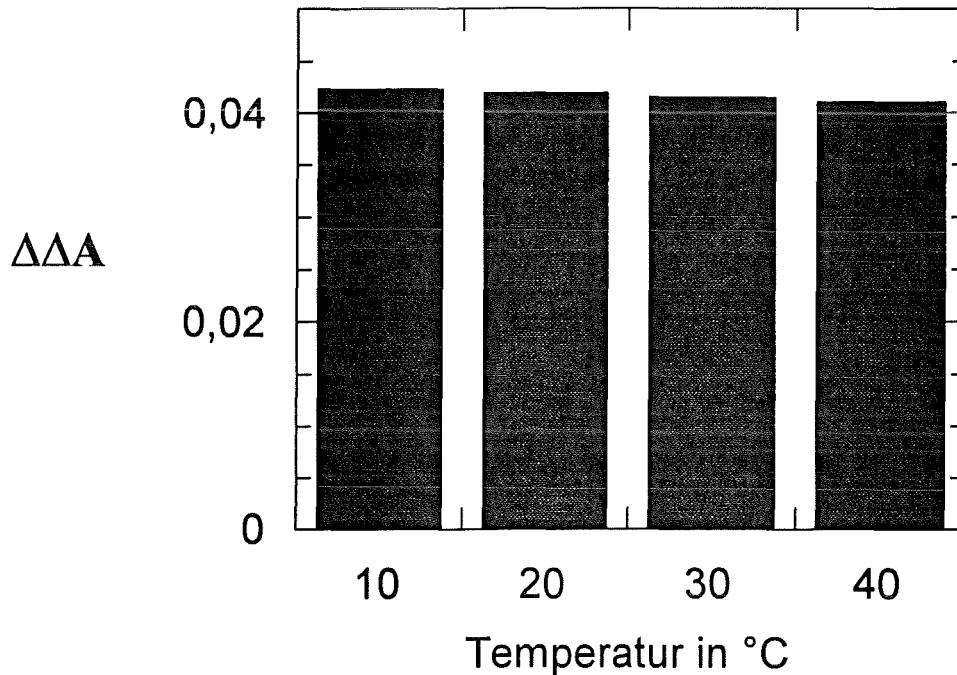


Abb. 4.31: Einfluß der Temperatur auf die Signalhöhe von 5 mM Salicylat – 5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88), auf die jeweilige Temperatur eingestellt, $\text{Signal} = \Delta A_{468 \text{ nm}} - \Delta A_{492 \text{ nm}}$

Sofern nicht in extremen Temperaturbereichen gemessen wird, sind für den praktischen Einsatz des Sensors keine wesentlichen Störungen des Signals zu erwarten.

4.3.6 Reversibilität und Reproduzierbarkeit der Messungen

Die Grundvoraussetzung für die Mehrfachverwendung von Sensoren ist die Reproduzierbarkeit der Messung. Um Meßergebnisse reproduzieren zu können, müssen Sensoren vollständig reversibel sein.

Die Regenerierung der Salicylatbiosensoren erfolgt durch Spülen mit Phosphatpufferlösung (pH = 6,88). Dabei zeigt sich, daß die Reaktion zwar langsam, aber dennoch vollständig reversibel ist. Beim erneuten Beprobieren mit derselben Salicylatkonzentration läßt sich die Differenz ($\Delta\Delta A = \Delta A_{468 \text{ nm}} - \Delta A_{492 \text{ nm}}$) gut reproduzieren (Abb. 4.32).

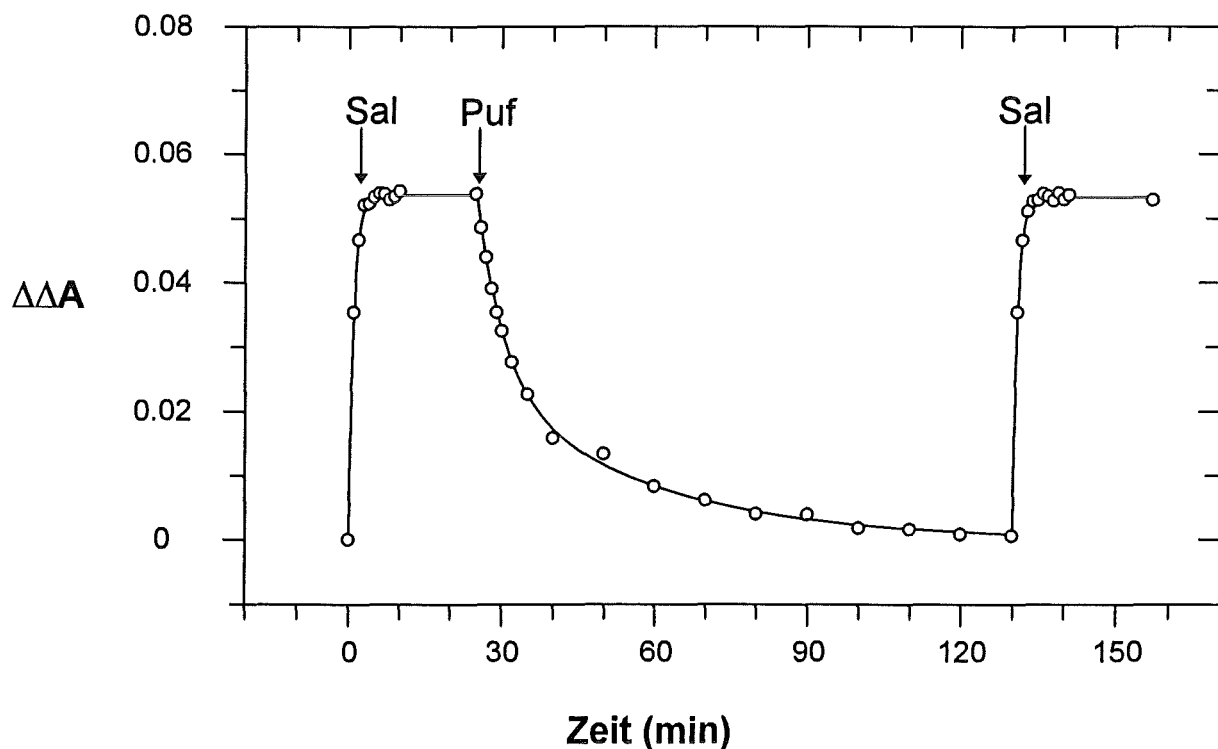


Abb. 4.32: Reversibilität und Reproduzierbarkeit der Messungen – Sal = Zugabe von 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88), Puf = Zugabe von Phosphatpuffer (pH = 6,88)

4.3.7 Beschleunigte Regenerierung mit NADH

Eine schnellere Regenerierung des Biosensors wird durch Zugabe von NADH erreicht. Hierbei wird über die enzymatische Katalyse Salicylat zu Catechol umgewandelt (Test-Kit-Reaktion), wodurch innerhalb kürzester Zeit der Ausgangszustand des unbeprobten Enzyms wieder hergestellt ist. Überschüssiges NADH wird durch kurzes Spülen mit Puffer entfernt. Die jeweilige Differenz ($\Delta\Delta A = \Delta A_{468 \text{ nm}} - \Delta A_{492 \text{ nm}}$) ist in Abb. 4.33 dargestellt.

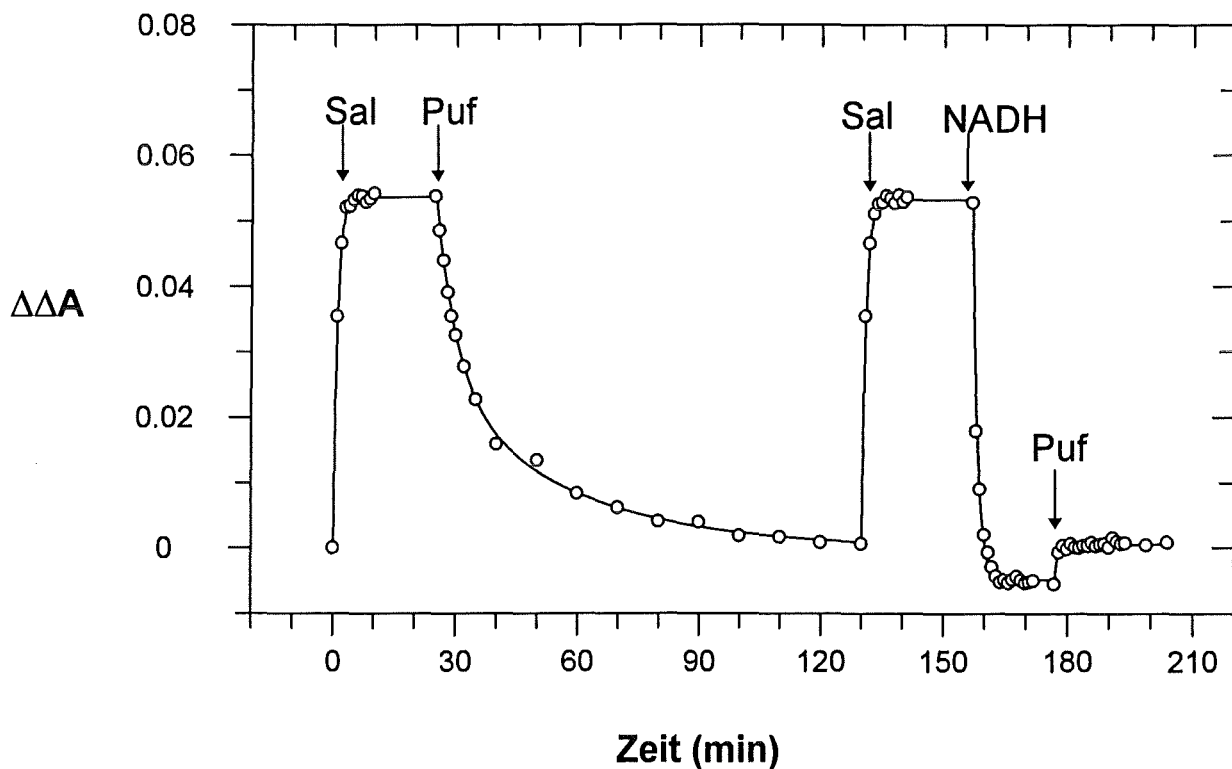


Abb. 4.33: Reversibilität und Reproduzierbarkeit der Messungen – Sal = Zugabe von 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88), Puf = Zugabe von Phosphatpuffer (pH = 6,88), NADH = Zugabe von GDS NADH-Lösung (0,3 mM)

4.3.8 Reproduzierbarkeit der Sensoren

Die einzelnen salicylatinduzierten Differenzen können je nach Sensorpräparation starke Unterschiede aufweisen, was auf verschiedene Enzymkonzentrationen zurückzuführen ist. Dies macht eine sinnvolle Quantifizierung unmöglich.

Die Streuung der Differenzen ($\Delta\Delta A = \Delta A_{468 \text{ nm}} - \Delta A_{492 \text{ nm}}$) ist in der folgenden Abbildung zu erkennen (Abb. 4.34).

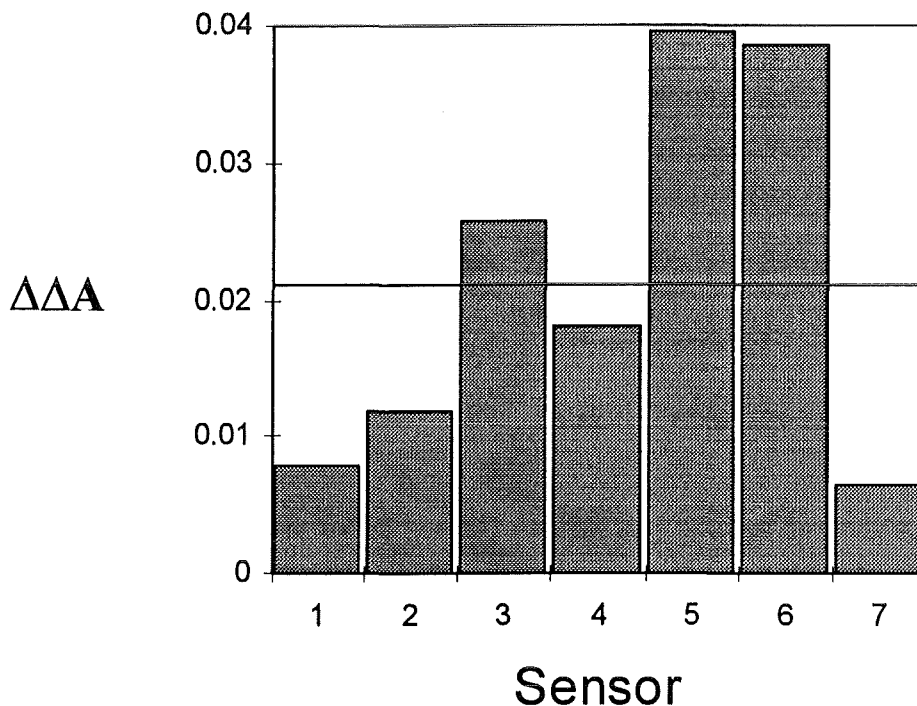


Abb. 4.34: Streuung der salicylatinduzierten Absorptionsänderung bei 0,5 mM Salicylat

Das Erstellen von Eichgeraden ist sehr aufwendig und kostet Zeit, die in der Notfalldiagnostik sehr knapp bemessen ist. Weiterhin wäre die Normierung über nur einen Salicylateichwert denkbar. Beides setzt stabile Salicylatlösungen voraus. Die Praxis zeigt, daß sich Salicylatlösungen auch bei Lagerung im Kühlschrank (4 - 8 °C) stark verändern. Nach einem halben Jahr sind die Lösungen gelb verfärbt und ergeben im Vergleich zu frischen Salicylatlösungen viel zu geringe Signale.

4.3.9 Normierung der Sensorsignale

Eine einfache Möglichkeit der Kalibration bietet die Normierung auf die Enzymkonzentration, die sich mit Hilfe der Flavinabsorption bestimmen läßt.

Da nicht selbstverständlich davon ausgegangen werden kann, daß die in der Durchflußküvette aus den Spektren mit und ohne enzymbefüllte Hohlfaser ermittelte Absorption auch wirklich ausschließlich der des Flavins entspricht, wird diese zunächst aus dem durch Reduktion mit Dithionit berechneten Differenzspektrum ermittelt.

Bei der anschließenden Normierung wird das salicylatinduzierte Signal, durch den mit Hilfe der Dithionitreduktion ermittelten Wert für die Enzymkonzentration dividiert. Dieser Wert ergibt sich aus dem Betrag des Differenzspektrums, indem der Mittelwert von $A_{540\text{ nm}}$ bis $A_{600\text{ nm}}$ vom Maximalwert $A_{450\text{ nm}}$ subtrahiert wird.

Die Normierung führt zu den angestrebten einheitlichen Werten (Abb. 4.35). Je nach Herstellungscharge kommt es noch zu geringfügigen Abweichungen, die innerhalb einer Charge nicht mehr auftreten (vgl. 4.3.8 Reproduzierbarkeit der Sensoren innerhalb einer Herstellungscharge).

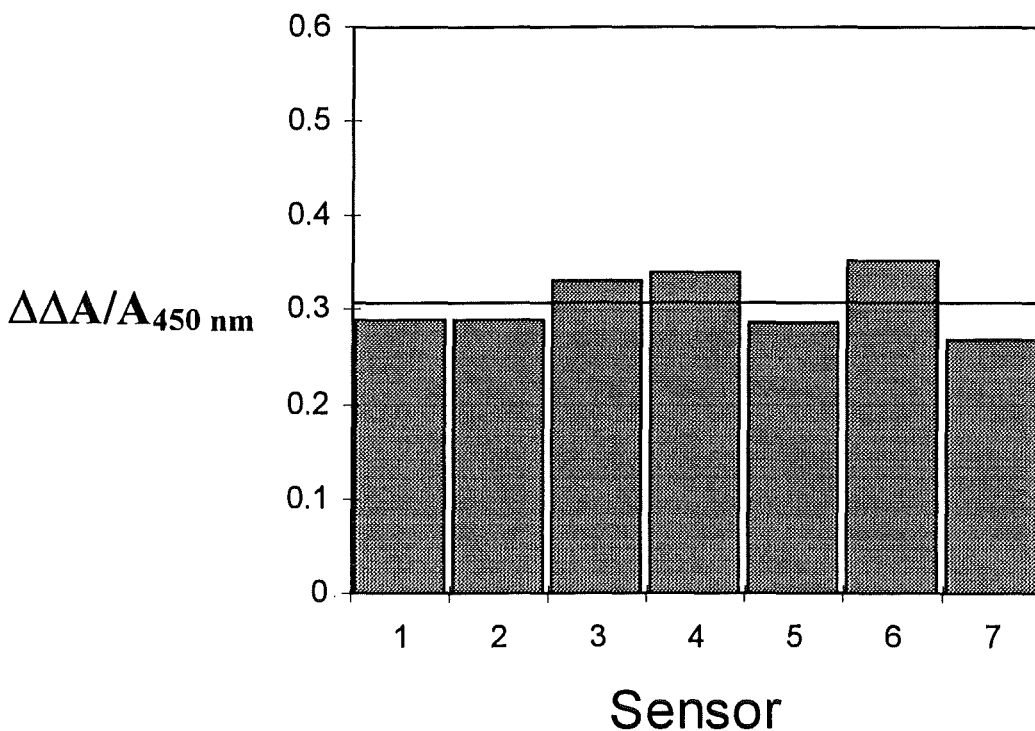


Abb. 4.35: Signale auf Enzymkonzentration (Dithionitreduktion) normiert

Die Verwendung des mit Dithionit induzierten Differenzspektrums als Wert für die Flavinabsorption ist für die Praxis ungeeignet, da die Dithionitlösung sehr instabil ist und deshalb jeweils frisch hergestellt werden muß. Um ein kalibrationsfreies Meßsystem aufzubauen, müßte sich das in der Durchflußküvette erhaltene „Absorptionsspektrum“ des Enzyms direkt für die Normierung verwenden lassen. Beim Betrachten läßt sich dieses von dem in Lösung erzielten Absorptionsspektrum nicht unterscheiden.

Im Vergleich mit dem dithionitinduzierten Differenzspektrum liegen die Werte des Absorptionsspektrums im Bereich niedriger Wellenlängen aber deutlich höher (Abb. 4.36).

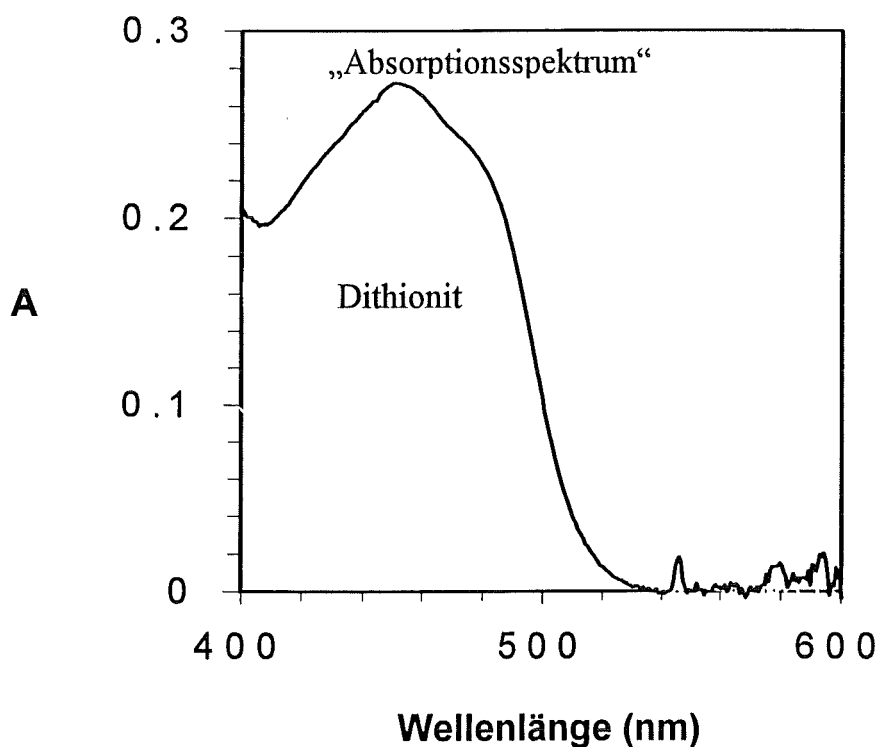


Abb. 4.36: Das mit Dithionit induzierte Differenzspektrum im Vergleich zum „Absorptionsspektrum“ im Biosensor

Den Beweis, daß sich das „Absorptionsspektrum“ dennoch für die Normierung eignet, ergibt sich, wenn der Absorptionswert gegen die mit Dithionit induzierte Differenz aufgetragen wird (Abb. 4.37). Der Absorptionswert wird hierzu in gleicher Weise wie die mit Dithionit induzierte Differenz bestimmt.

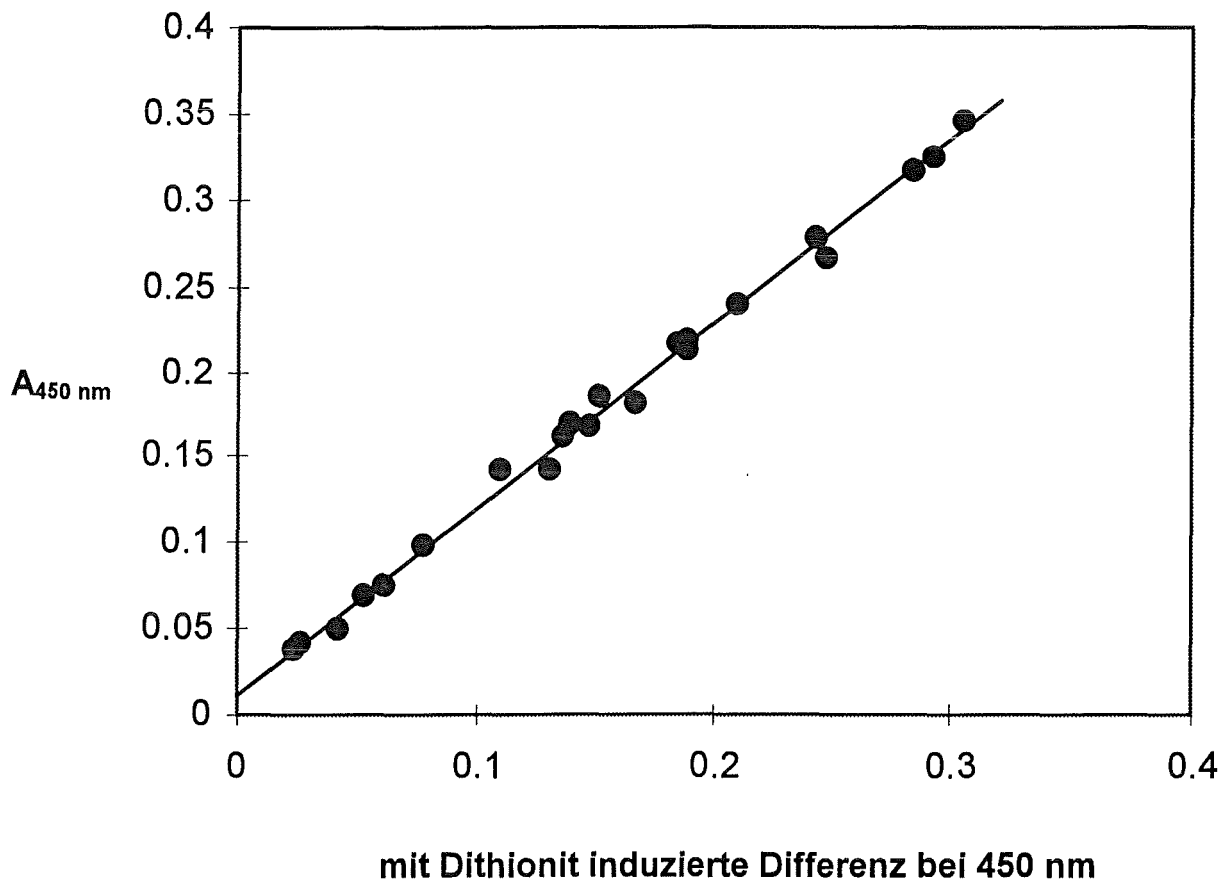


Abb. 4.37: Richtigkeit der Enzymkonzentrationsmessung

Die gegeneinander aufgetragenen Meßwerte liegen auf einer Geraden, was beweist, daß die Proportionalität zwischen beiden Meßwerten über einen weiten Bereich gegeben ist. Diese einfache Normierung auf die Enzymkonzentration mit Hilfe des „Absorptionsspektrums“ ist eine wichtige Voraussetzung für den kalibrationsfreien Einsatz der Sensoren.

4.3.10 Reproduzierbarkeit der Sensoren innerhalb einer Herstellungsladung

Die Normierung führt zu sehr einheitlichen Werten. Je nach Herstellungsladung kann es trotz Normierung noch zu Abweichungen kommen (vgl. 4.3.7 Normierung der Sensorsignale).

Innerhalb einer Ladung sind diese Abweichungen zu vernachlässigen. So ergibt sich für drei Sensoren, die aus einer Hohlfasern präpariert werden, eine relative Standardabweichung des normierten Signals (0,5 mM Salicylat) von 0,47 %. Für drei Sensoren, die aus verschiedenen Hohlfasern präpariert werden, beträgt die relative Standardabweichung des normierten Signals (0,5 mM Salicylat) 1,2 %. Die relativen Standardabweichungen liegen somit im Rahmen des erwarteten Meßfehlers.

4.3.11 Lagerstabilität der Sensoren

Die Lagerstabilität ist eine Grundvoraussetzung für den praktischen Einsatz der Sensoren. Für die Lagerung bei Raumtemperatur (23 °C) ist eine Abnahme der Signalhöhe mit der Zeit sichtbar (Abb. 4.38). Die Halbwertszeit beträgt 21 Tage. Der Sensor kann somit höchstens einen Tag bei Raumtemperatur mitgeführt werden.

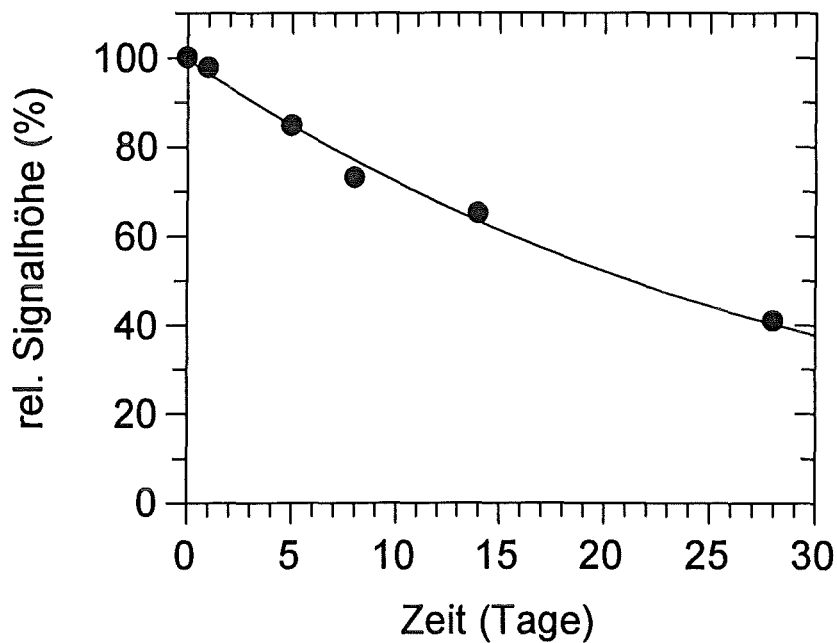


Abb. 4.38: Lagerstabilität der Sensoren bei Raumtemperatur (23 °C) – relative Signalhöhe in Bezug auf das Anfangssignal bei 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88), Halbwertszeit: 21 Tage

Die Lagerung im Kühlschrank bei 4 - 8 °C verlängert den kalibrationsfreien Einsatz auf über 6 Monate (Abb. 4.39).

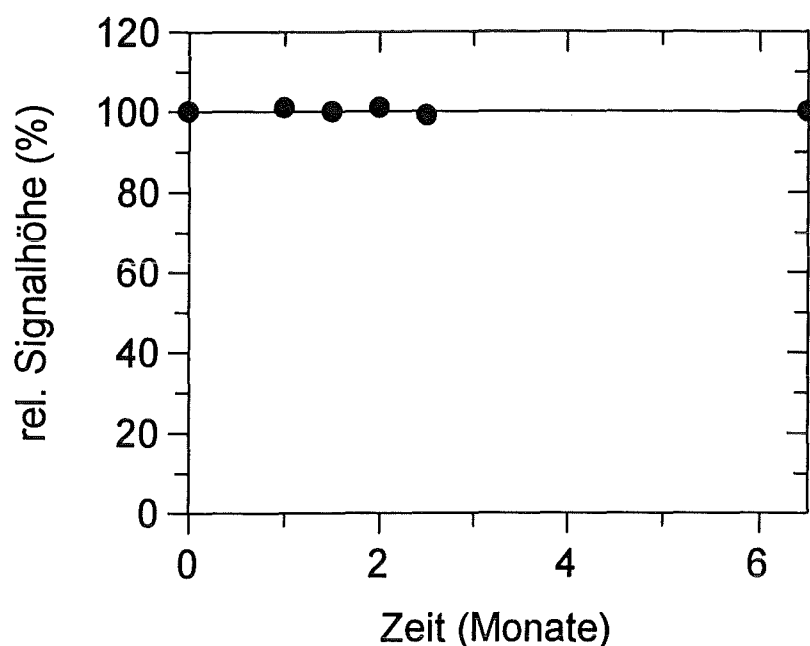


Abb. 4.39: Lagerstabilität der Sensoren im Kühlschrank (4 - 8 °C) – relative Signalthöhe in Bezug auf das Anfangssignal bei 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88)

Die Temperaturerniedrigung beeinflusst verschiedene Reaktionen, die für die Lagerstabilität der Sensoren eine Rolle spielen. So werden chemische Reaktionen verlangsamt und der für die enzymatische Katalyse optimale Temperaturbereich unterschritten. Auch die Diffusion von Sauerstoff ist verzögert [Belitz, Grosch, 1987].

4.3.12 Absorptionsänderung von Salicylathydroxylase bei höheren Salicylatkonzentrationen

Die Zugabe von Salicylat in ansteigender Konzentration führt zunächst zu einheitlich wachsenden Veränderungen im Differenzspektrum. Über 0,3 mM Salicylat kommt es mit zunehmender Salicylatkonzentration zu einer Verschiebung im Verhältnis der beiden Maxima (bei 439 nm und 468 nm) zueinander, bedingt durch eine stärkere Abnahme der Absorptionsänderung bei 439 nm als bei 468 nm. Das Minimum um 492 nm verringert sich ebenfalls deutlich. Gleichzeitig werden die beiden Maxima, das Minimum, sowie der isosbestische Punkt mit zunehmender Salicylatkonzentration bathochrom verschoben.

Trotz dieser Veränderungen gibt es eine Wellenlänge bei 472 nm, die bei der Beprobung mit höheren Salicylatkonzentrationen jeweils den gleichen Differenzwert aufweist (Abb. 4.40).

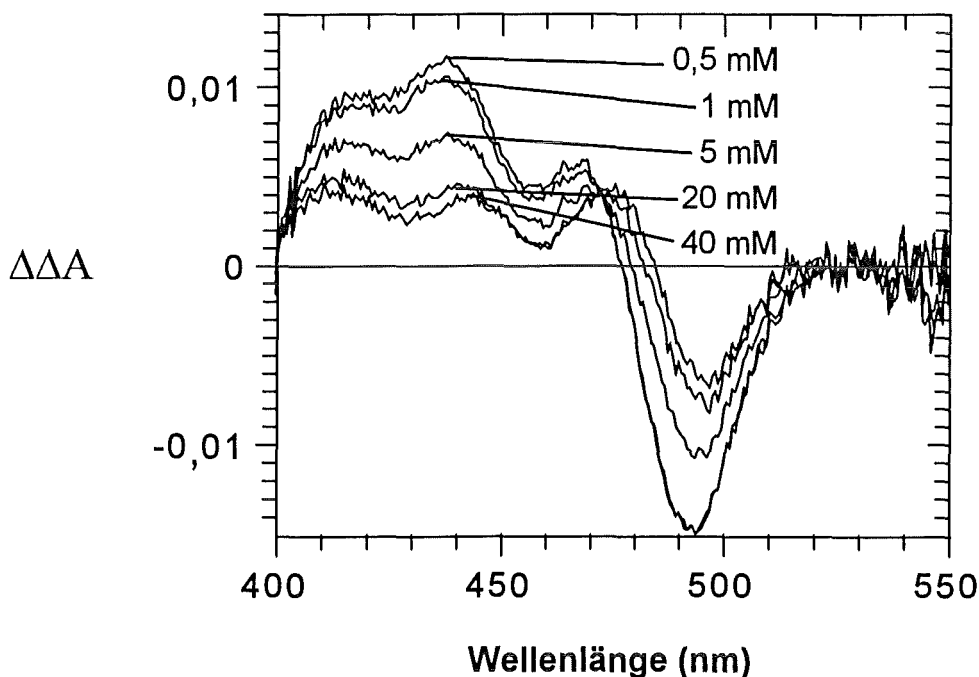


Abb. 4.40: Absorptionsänderung von Salicylathydroxylase bei höheren Salicylatkonzentrationen – verschiedene Salicylatkonzentrationen in Phosphatpuffer (pH = 6,88)

4.3.13 Dosis-Wirkungskurve bei Hohl-faser-Immobilisierung

Durch Auftragen der auf Flavinabsorption (450 nm) normierten Differenz ($\Delta\Delta A = \Delta A_{468 \text{ nm}} - \Delta A_{492 \text{ nm}}$) gegen die Salicylatkonzentration ergibt sich die Dosis-Wirkungskurve.

Im Bereich kleiner Salicylatkonzentrationen bis 0,3 mM Salicylat verläuft die Kurve sigmoid, dann knickt sie ab und nimmt einen asymptotischen Verlauf (Abb. 4.41).

Das „Abknicken“ der Kurve entsteht durch eine Substratinhibition [Belitz, Grosch, 1987]. Dies kann bei hohen Salicylatkonzentrationen vorkommen, wenn ein Enzym-Salicylat-Komplex mit zwei Salicylatmolekulen gebildet wird. Der dabei entstehende, sogenannte unproduktive Komplex bewirkt geringere und etwas andere Absorptions-Änderungen, wie die Komplexbildung mit einem Salicylatmolekül.

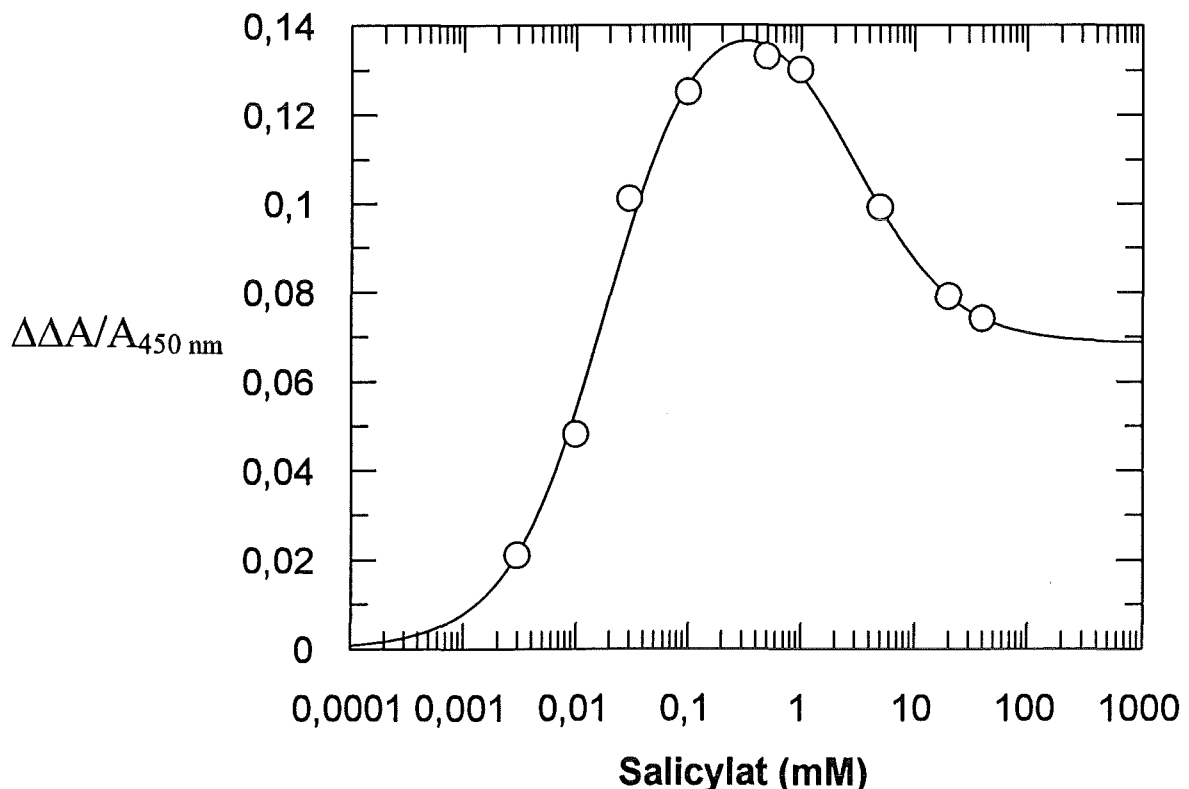


Abb. 4.41: Dosis-Wirkungskurve mit Hohl-faser-Immobilisierung – Differenz ($\Delta\Delta A = \Delta A_{468 \text{ nm}} - \Delta A_{492 \text{ nm}}$) auf Flavinabsorption (450 nm) normiert

Die Abweichungen zu Versuchen in Lösung lassen sich dadurch erklären, daß dort das Enzym in der original von GDS eingesetzten Pufferlösung verwendet wird. Über die Zusammensetzung konnten von der Herstellerfirma keine Informationen erhalten werden. Solche Veränderungen werden durch Anionen hervorgerufen, die mit Salicylat um die aktive Stelle des Enzyms konkurrieren, wie das Beispiel der Chloridionen belegt (vgl. 4.4.5 Hemmung des Salicylatsignals in Abhängigkeit von der Chloridkonzentration).

Es handelt sich folglich hierbei um keinen für die Hohlfaserimmobilisierung spezifischen Effekt, wie auch ein Vergleich mit dem nach dem Sol-Gel-Verfahren immobilisierten Enzym zeigt, ergibt sich hier ebenfalls die gleiche Form der Dosis-Wirkungskurve (Abb. 4.42). Die unterschiedlichen Höhen der normierten Signale sind durch die Immobilisierungsart bedingt. Während in der Hohlfaser alle aktiven Enzymmoleküle für die Komplexbildung mit Salicylat zur Verfügung stehen, ist bei der Immobilisierung nach dem Sol-Gel-Verfahren, auf Grund der festen Einbindung nur ein Teil der Enzymmoleküle für die Komplexbildung zugänglich.

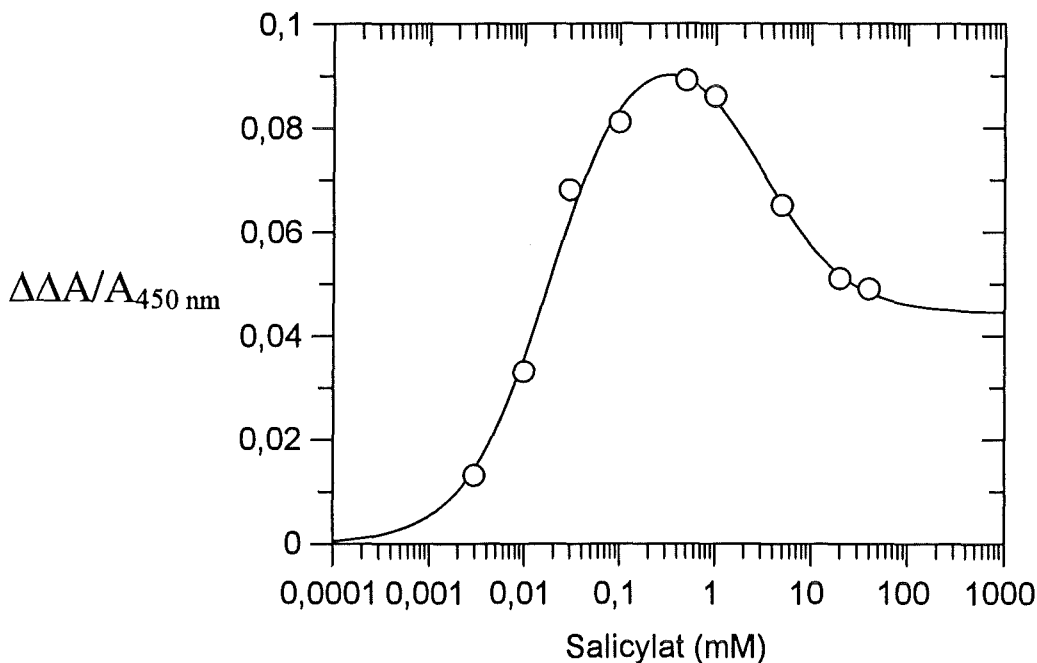


Abb. 4.42: Dosis-Wirkungskurve mit Sol-Gel-Immobilisierung – Differenz ($\Delta\Delta A = \Delta A_{468 \text{ nm}} - \Delta A_{492 \text{ nm}}$) auf Flavinabsorption normiert

4.3.14 Auswertung der Dosis-Wirkungskurve bei zwei verschiedenen Wellenlängen

Die Auswertung bei zwei verschiedenen Wellenlängen ermöglicht es, zwei Salicylatkonzentrationen, welche sich nach der bisherigen Auswertung ($\Delta A_{468 \text{ nm}} - \Delta A_{492 \text{ nm}}$ auf Flavinabsorption normiert) in ihrer Signalhöhe nicht unterscheiden, mit Hilfe einer zweiten Auswertung doch eindeutig zuzuordnen (Abb. 4.43).

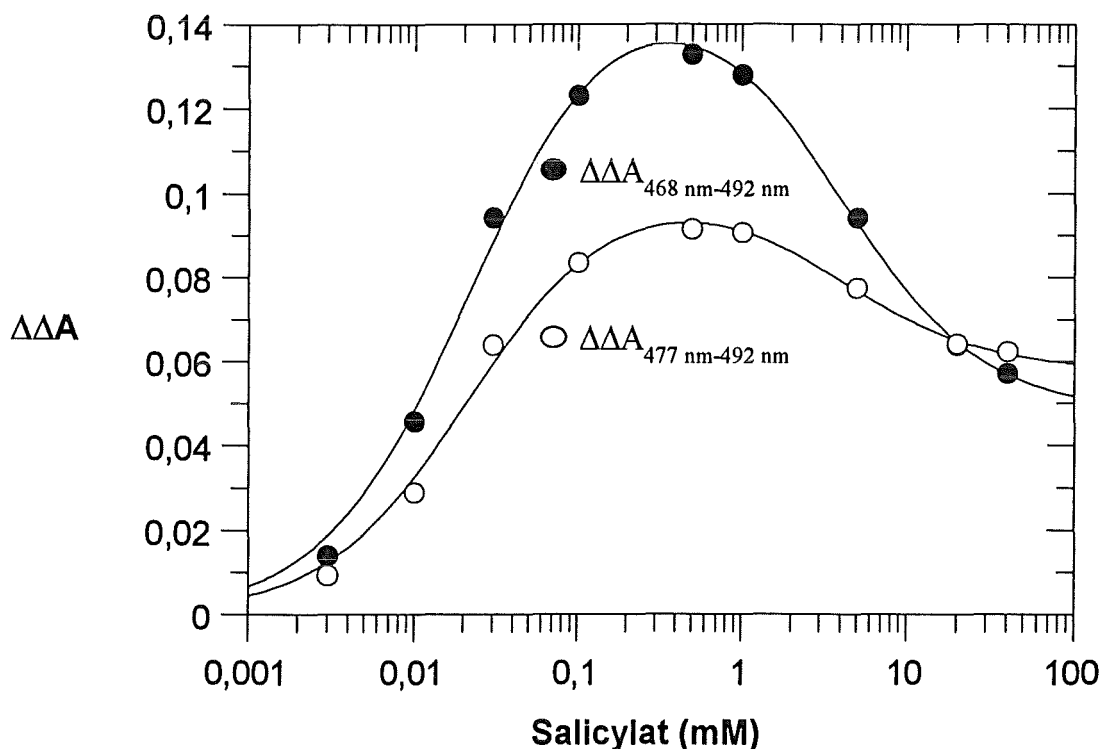
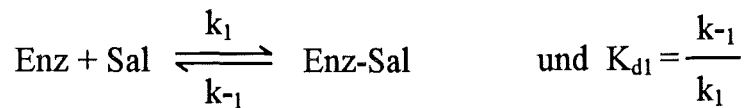


Abb. 4.43: Auswertung der Dosis-Wirkungskurve nach zwei verschiedenen Wellenlängen – $\Delta\Delta A_{468 \text{ nm}-492 \text{ nm}}$ = Differenz ($\Delta\Delta A = \Delta A_{468 \text{ nm}} - \Delta A_{492 \text{ nm}}$) auf Flavinabsorption normiert, $\Delta\Delta A_{477 \text{ nm}-492 \text{ nm}}$ = Differenz ($\Delta\Delta A = \Delta A_{477 \text{ nm}} - \Delta A_{492 \text{ nm}}$) auf Flavinabsorption normiert

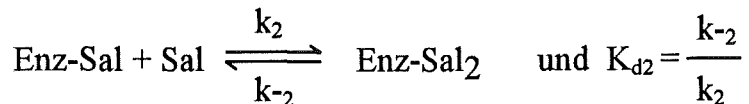
Für die zweite Auswertung wird die Absorptionsänderung bei 477 nm minus 492 nm, auf Flavinabsorption normiert, verwendet. Die Absorptionsänderung bei 477 nm eignet sich hierfür besonders gut, da im Bereich höherer Salicylatkonzentrationen hier die maximale Veränderung in der Absorption stattfindet, wohingegen bei 468 nm gleichzeitig eine Abnahme erfolgt. Dadurch ergibt sich in diesem Bereich eine geringere Signalabnahme, die es zusammen mit der ursprünglichen Auswertung ermöglicht, Salicylatkonzentrationen korrekt zu bestimmen.

4.3.15 Auswertung der Spektren

Für die Komplexbildung mit einem Salicylatmolekül gilt die folgende Gleichgewichtsreaktion:



Für die Bildung des unproduktiven Komplexes mit zwei Salicylatmolekülen gilt:



Bei beiden Auswertungen setzt sich das salicylatinduzierte Signal aus einem Anteil des Komplexes mit einem Salicylatmolekül und einem Anteil des unproduktiven Komplexes zusammen.

$$\Delta\Delta A_{468 \text{ nm}-492 \text{ nm}} = a * [\text{Enz-Sal}] + b * [\text{Enz-Sal}_2] \quad [1]$$

$$\Delta\Delta A_{477 \text{ nm}-492 \text{ nm}} = c * [\text{Enz-Sal}] + d * [\text{Enz-Sal}_2] \quad [2]$$

$$\text{wobei} \quad [\text{Enz-Sal}] = \frac{1}{1 + K_{d1}/[\text{Sal}]} \quad [3]$$

$$[\text{Enz-Sal}_2] = \frac{1}{1 + K_{d2}/[\text{Sal}]} \quad [4]$$

Ein Kurvenanpassungsprogramm (GraFit 2.0; Erithacus Software Ltd, Staines, U.K., 1989, 1990)

ergibt: $K_{d1} = 0,018 \text{ mM}$, $K_{d2} = 2,8 \text{ mM}$

und Werte für die Konstanten a, b, c und d

Zur Bestimmung der Salicylatkonzentration wird folgendermaßen vorgegangen:

1. Messen von $\Delta\Delta A_{468 \text{ nm}-492 \text{ nm}}$ und $\Delta\Delta A_{477 \text{ nm}-492 \text{ nm}}$

2. Lösung der Simultangleichungen 1 u. 2,

dies ergibt Werte für [Enz-Sal] und [Enz-Sal₂]

3. Berechnung der [Sal] erfolgt entweder nach 3 oder 4:

Benutzung von Gleichung 3, wenn [Enz-Sal₂] < 10 %

Benutzung von Gleichung 4, wenn [Enz-Sal₂] > 10 %

Diese Auswertung wird in der Praxis von einem Computerprogramm mit fest integrierter Dosis-Wirkungskurve vorgenommen, so daß die Meßwerte sehr schnell ermittelt werden können.

Werden die gemessenen Salicylatwerte gegen die Salicylateinwaage aufgetragen, dann ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung, wie die minimale Streuung der Meßpunkte erkennen läßt (Abb. 4.44). Dies belegt die Anwendbarkeit der Auswertemethode.

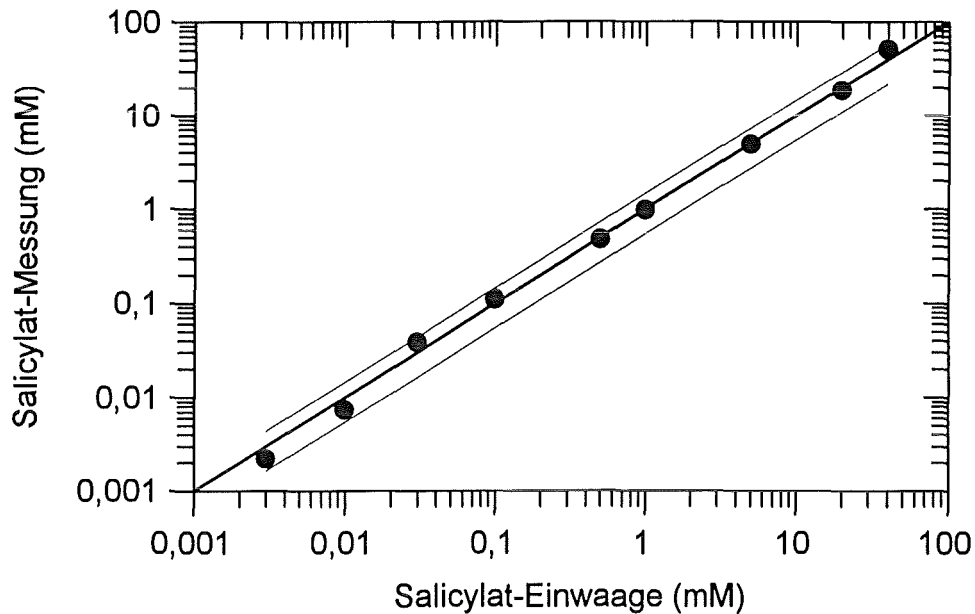


Abb. 4.44: Vergleich der Salicylat-Messung mit der Salicylat-Einwaage
– fette Linie = theoretische Eichgerade
dünne Linien = 95 %ige Vertrauensgrenzen

Aus der Standardabweichung der Meßwerte werden mittels der t-Verteilung die 95 %igen Vertrauensgrenzen der theoretischen Eichgerade berechnet [McCormick, Roach, 1987].

4.4 Charakterisierung des Hohlfasersensors in Blut

4.4.1 Messung in verdünntem Blut

Die Absorptionsmessungen lassen sich normalerweise nur mit verdünntem Blut durchführen, da mit unverdünntem Vollblut die Transmission zu klein ist, um noch sinnvolle Absorptionsspektren erhalten zu können. Obwohl sich bei Messungen in verdünntem Vollblut ein abnehmendes Hämoglobinabsorptionsspektrum der sich senkenden roten Blutkörperchen zeigt, wird dennoch die salicylatbedingte Absorptionsänderung des Enzyms sichtbar (Abb. 4.45).

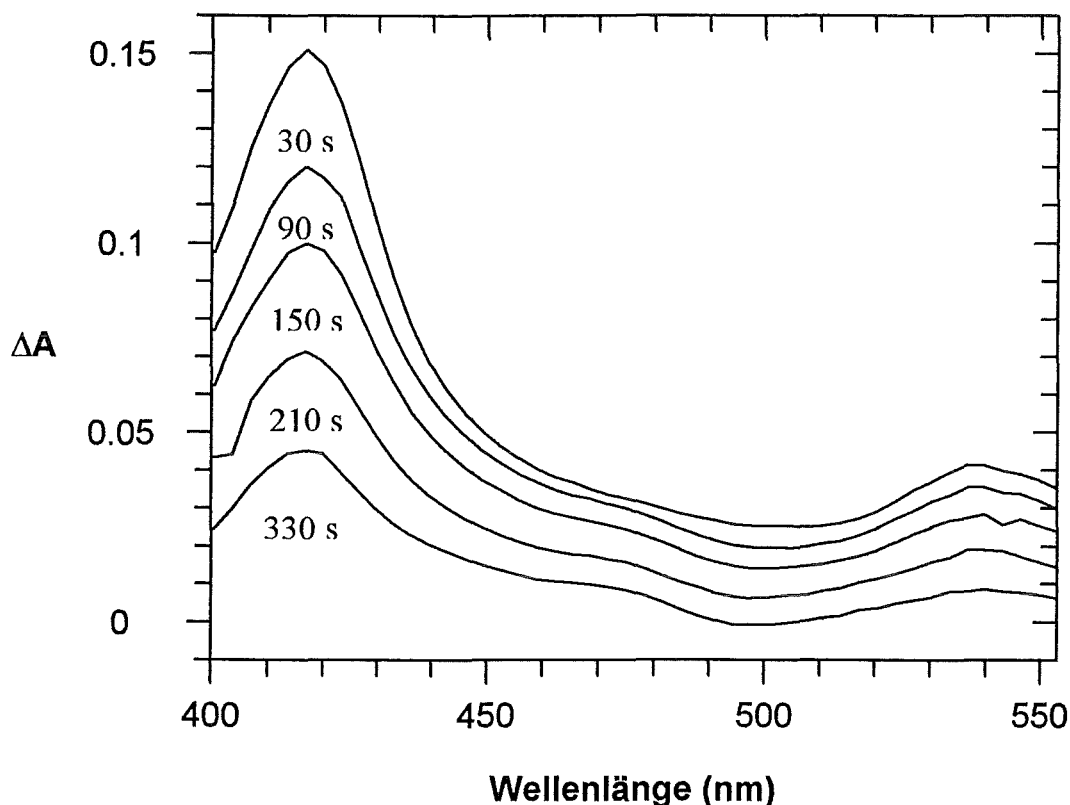


Abb. 4.45: Messung in verdünntem Blut – 5 μL Vollblut auf 1 mL 50 μM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88)

Eine einfache Untergrundkorrektur an Hand des isosbestischen Punkts ermöglicht es, die salicylatinduzierte Differenz ($\Delta\Delta A = \Delta A_{468 \text{ nm}} - \Delta A_{492 \text{ nm}}$) zu berechnen. Wird diese Absorptionsänderung gegen die Zeit aufgetragen, so zeigt die daraus resultierende

Kurve denselben Verlauf, wie der einer Salicylatstandardlösung gleicher Konzentration (Abb. 4.46).

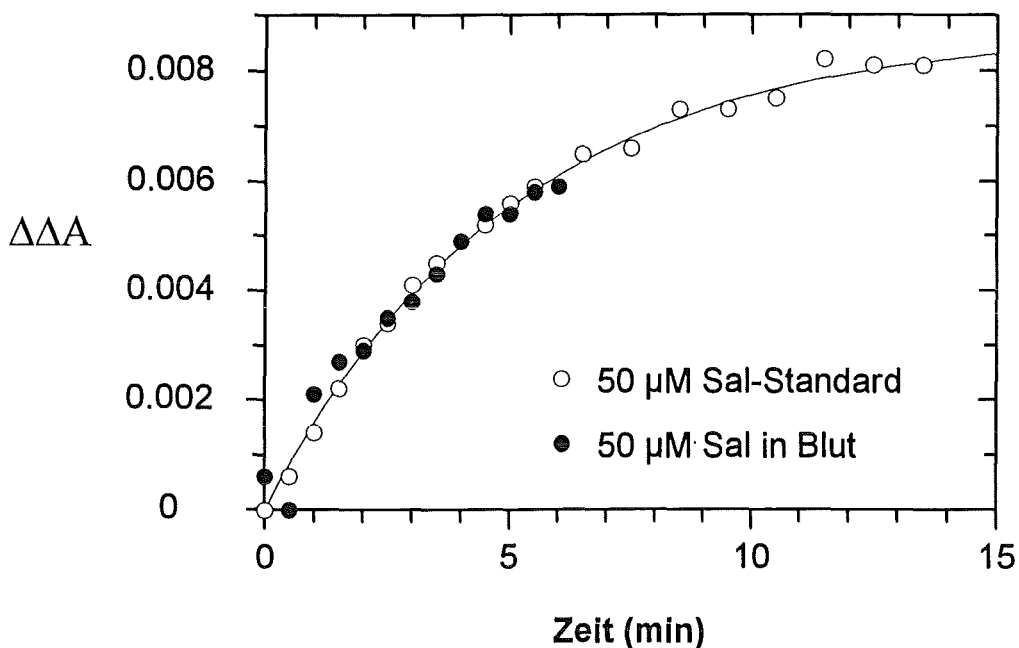


Abb. 4.46: Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeit in verdünntem Blut und in Standardsalicylatlösung gleicher Konzentration – 5 μL Vollblut auf 1 mL 50 μM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88) bzw. 50 μM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88), Temperatur 23 °C

Damit ist die Salicylatbestimmung zwar möglich, die für diese Bestimmungsmethode benötigte Blutverdünnung ist jedoch zeitaufwendig und kompliziert den Meßvorgang. Auch die Verwendung von Blutserum bietet hier keine Abhilfe. Die Gewinnung von Serum ist ebenfalls zeitaufwendig, und obwohl Serum keine lichtabsorbierenden roten Blutkörperchen mehr enthält, bleibt dennoch die Absorption von Bilirubin um 450 nm (vgl. 4.5.1 Bilirubinabsorption in der Durchflußküvette ohne Hohlfaser), die auf Grund des von Blutprobe zu Blutprobe schwankenden Gehaltes jeweils neu korrigiert werden muß.

Für den praktischen Einsatz ist ein Sensorsystem vorzuziehen, das direkt mit unverdünntem Vollblut, ohne jegliche Aufbereitung oder Maßanalytik, zu Ergebnissen führt.

4.4.2 Messung unter Blutzellenausschluß

Das direkte Aufsetzen der Lichtleiter auf die Hohlfaser soll Störungen durch Blutzellen im Meßlichtstrahl verhindern (vgl. 3.2.4 Immobilisierung in Hohlfasern, Abb. 3.9).

Die Eignung dieser Methode wird zunächst mit verdünntem salicylathaltigem Blut getestet.

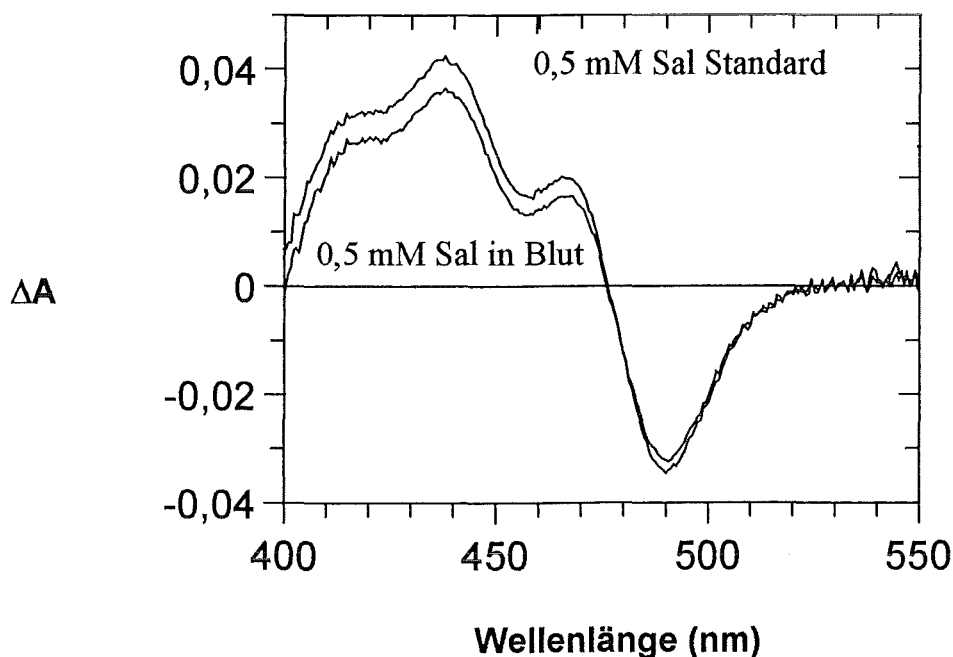


Abb. 4.47: Vergleich der Absorptionsänderungen in verdünntem Blut und in Standardsalicylatlösung gleicher Konzentration – 0,5 mM Salicylat in mit Phosphatpuffer (pH = 6,88) auf 10 % verdünntes Vollblut (0,5 mM Sal in Blut) bzw. 0,5 mM Salicylatstandard in Phosphatpuffer (pH = 6,88) (0,5 mM Sal Standard), Temperatur 23 °C

Die bei der Beprobung mit verdünntem Blut entstehende Absorptionsänderung läßt keine Störung durch Blutzellen erkennen (Abb. 4.47). Sie ist aber im Vergleich mit einer Standardsalicylatlösung gleicher Konzentration deutlich geringer, da im Blut ein Teil des Salicylats an Albumin bindet und somit nicht mehr für die Messung verfügbar ist [Riggs et al., 1987].

4.4.3 Blutinduzierte Signaländerung

Die Beprobung des Sensors mit Vollblut führt sehr rasch zu einer unbekanntem Signaländerung (Abb. 4.48). Es stellt sich die Frage, wodurch dieses Signal verursacht wird und ob es zu Störungen der Salicylatmessung führt.

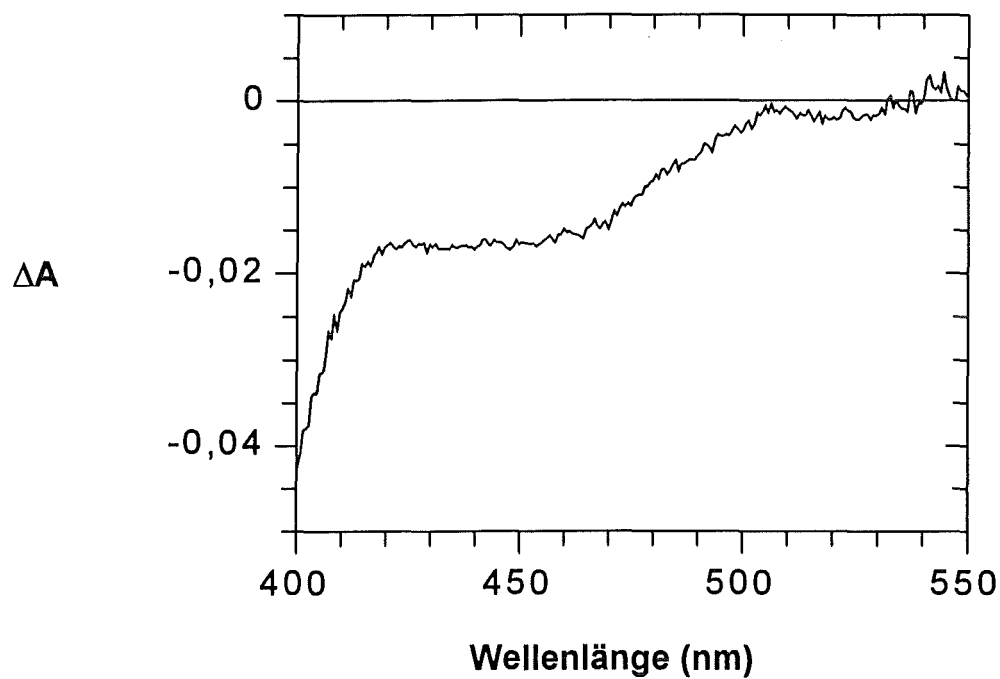


Abb. 4.48: Absorptionsänderung in Vollblut

4.4.4 Chloridinduzierte Absorptionsänderungen

Tests mit einigen in Vollblut enthaltenen Substanzen zeigen, daß die Beprobung mit Chlorid vergleichbare Absorptionsänderungen hervorruft wie sie auch in Vollblut auftreten (Abb. 4.49). Chlorid kommt im Blut mit einer sehr konstanten Konzentration von etwa 100 mM vor. Die Schwankungsbreite liegt zwischen 98 und 106 mM [Harper et al., 1987].

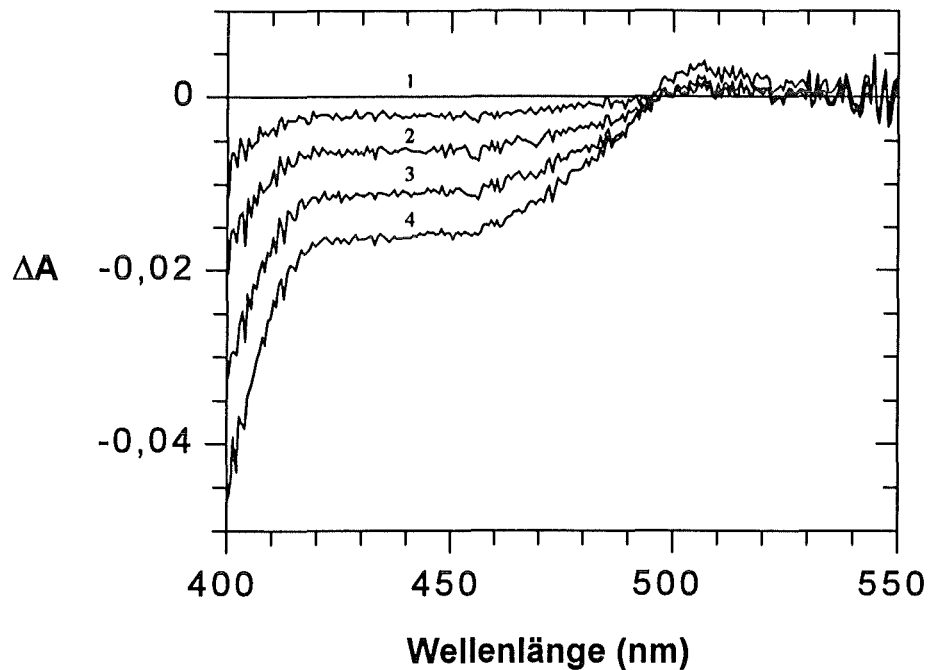


Abb. 4.49: Chloridinduzierte Absorptionsänderungen – verschiedene Chloridkonzentrationen in Phosphatpuffer (pH = 6,88)
 $c_{\text{Chlorid}}/\text{mM} = 0,05$ (1); 0,1 (2); 0,5 (3); 5 (4)

4.4.5 Hemmung des Salicylatsignals in Abhängigkeit von der Chloridkonzentration

Die Wechselwirkung des Chloridanions mit dem Enzym führt zu einer Hemmung des Salicylatsignals. Es handelt sich hierbei um eine sogenannte kompetitive Hemmung, d. h. mit zunehmender Chloridkonzentration wird auch das Salicylatsignal zunehmend gehemmt. Signale niedriger Salicylatkonzentrationen (hier am Beispiel 0,03 mM Salicylat) werden so schon im Bereich der Blutchloridkonzentration von 100 mM vollständig gehemmt (Abb. 4.50). Signale von relativ hohen Salicylatkonzentrationen werden dafür aber selbst in Gegenwart von 100 mM Chlorid kaum bzw. nicht mehr beeinflusst (vgl. 4.4.10 Dosis-Wirkungskurve in Gegenwart von 100 mM Chlorid).

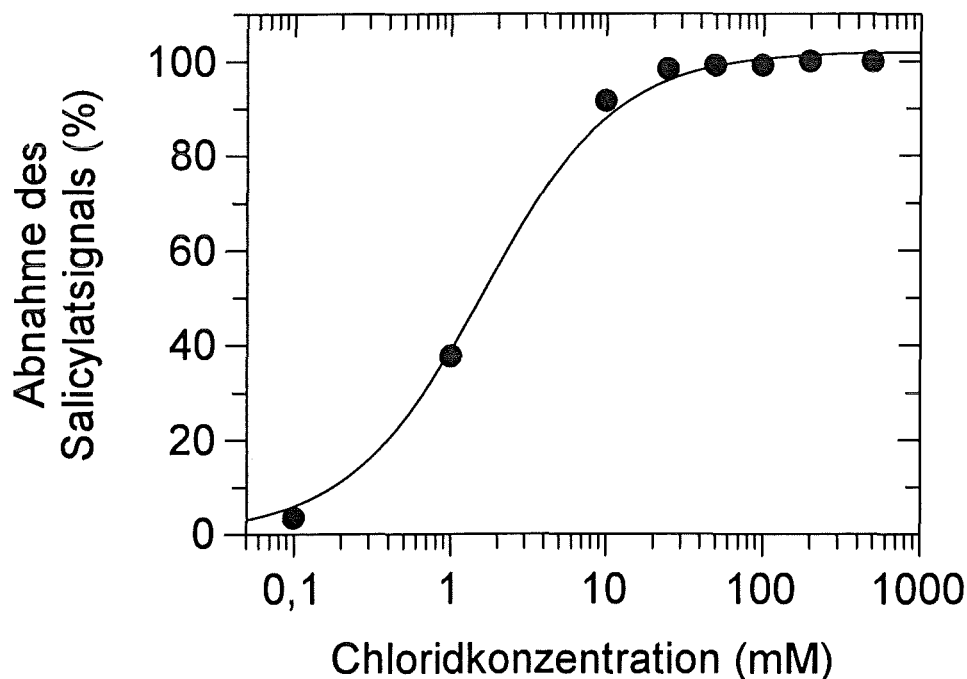


Abb. 4.50: Hemmung des Salicylatsignals von 0,03 mM Salicylat in Abhängigkeit von der Chloridkonzentration – 0,03 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88) mit der jeweiligen Chloridkonzentration, halbmaximale Hemmung bei 1,61 mM Chlorid
100 % entspricht vollständiger Hemmung

4.4.6 Chlorideinfluß auf die Geschwindigkeit des Signals von 0,5 mM Salicylat

Die Gegenwart von Chlorid beeinflusst ebenfalls die Geschwindigkeit des salicylatinduzierten Signals. So ist die Geschwindigkeit zu Beginn deutlich herabgesetzt, da die kleinen Chloridanionen schneller als Salicylatanionen in die Hohlfaser hineindiffundieren, wo sie an die Bindestelle des Enzyms gelangen und somit zunächst ein geringeres Salicylatsignals bewirken.

Nach Einstellung des Chloridgeleichgewichts in der Hohlfaser nimmt dann das Salicylatsignal stärker zu, so daß in Gegenwart von 100 mM Chlorid der Gleichgewichtszustand nach etwa 90 s erreicht wird (Abb. 4.51).

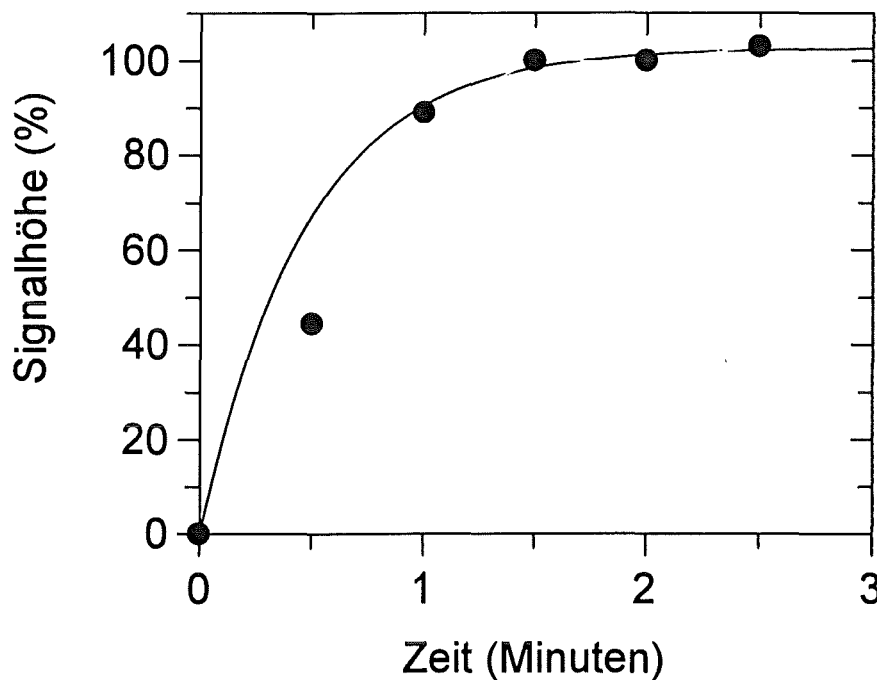


Abb. 4.51: Chlorideinfluß auf die Geschwindigkeit des Signals von 0,5 mM Salicylat – 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88) mit 100 mM Chlorid, Temperatur 23 °C
100 % Signalhöhe stellt den Endpunkt der Reaktion dar.

4.4.7 Dosis-Wirkungskurve für Chlorid

Durch Auftragen der Differenz ($\Delta\Delta A = \Delta A_{450 \text{ nm}} - \Delta A_{540 \text{ nm}}$) in Abhängigkeit der Chloridkonzentration ergibt sich die Dosis-Wirkungskurve für Chlorid (Abb. 4.52). In der logarithmischen Darstellung läßt sie sich gut durch eine sigmoide Kurve beschreiben. Der Sensor ist auch für relativ geringe Chloridkonzentrationen sehr empfindlich und erreicht schon weit unterhalb der in Vollblut relevanten Konzentration von 100 mM seinen Sättigungspunkt.

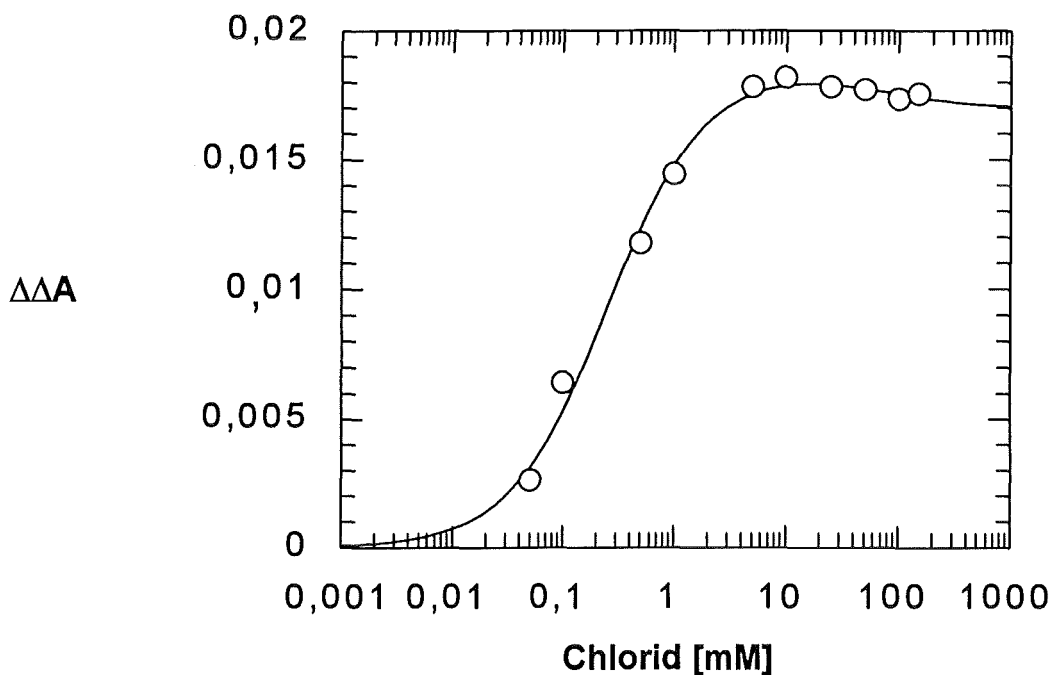


Abb. 4.52: Dosis-Wirkungskurve für Chlorid – Differenz ($\Delta\Delta A = \Delta A_{450 \text{ nm}} - \Delta A_{540 \text{ nm}}$) in Abhängigkeit der Chloridkonzentration, halbmaximales Signal bei 0,25 mM Chlorid

4.4.8 Auswertung der Dosis-Wirkungskurve mit Hilfe des Absorptionsspektrums nach der Beprobung

Bisher erfolgt die Auswertung aus dem Differenzspektrum der Absorption vor und nach der Beprobung. Dies kompliziert in der Praxis den Meßvorgang. Im folgenden wird nun eine verbesserte Auswertung dargestellt, für die nur das Absorptionsspektrum nach der Beprobung verwendet wird. Damit werden Störungen vermieden, die beispielsweise durch Veränderung der Enzymkonzentration im Lichtstrahl entstehen können. Diese Auswertungsmethode ermöglicht es außerdem, einen Sensor in Form eines Sensorstäbchens (vgl. 5.2 Aufbau eines Sensorstäbchens) außerhalb des Meßgeräts zu beproben und erst anschließend zu vermessen.

Für die Normierung wird nur noch die Absorption bei einer einzelnen Wellenlänge (520 nm) als Nullwert verwendet, da im Bereich größer 520 nm, bedingt durch die abnehmende Lichtintensität, das Grundrauschen stark zunimmt. Dies führt zu geringeren Fehlern, wie die Verwendung eines Mittelwerts der Absorption zwischen 530 nm und 600 nm extrapoliert zu 450 nm.

Als Maß für die Flavinkonzentration nach der Beprobung, dient der um den Nullwert korrigierte Absorptionswert des isosbestischen Punktes bei 477 nm. Obwohl sich der isosbestische Punkt bei höheren Salicylatkonzentrationen zu höheren Wellenlängen verschiebt, ist der dabei entstehende Fehler so gering, daß er keinen merkbaren Einfluß auf die Richtigkeit des Meßergebnisses hat.

Anstatt Absorptionsänderungen werden hier die Absorptionswerte des beprobten Spektrums bei den entsprechenden Wellenlängen verwendet (Abb. 4.53). Ansonsten erfolgt die Auswertung analog der bisher verwendeten Methode (vgl. 4.3.14 Auswertung der Dosis-Wirkungskurve bei zwei verschiedenen Wellenlängen).

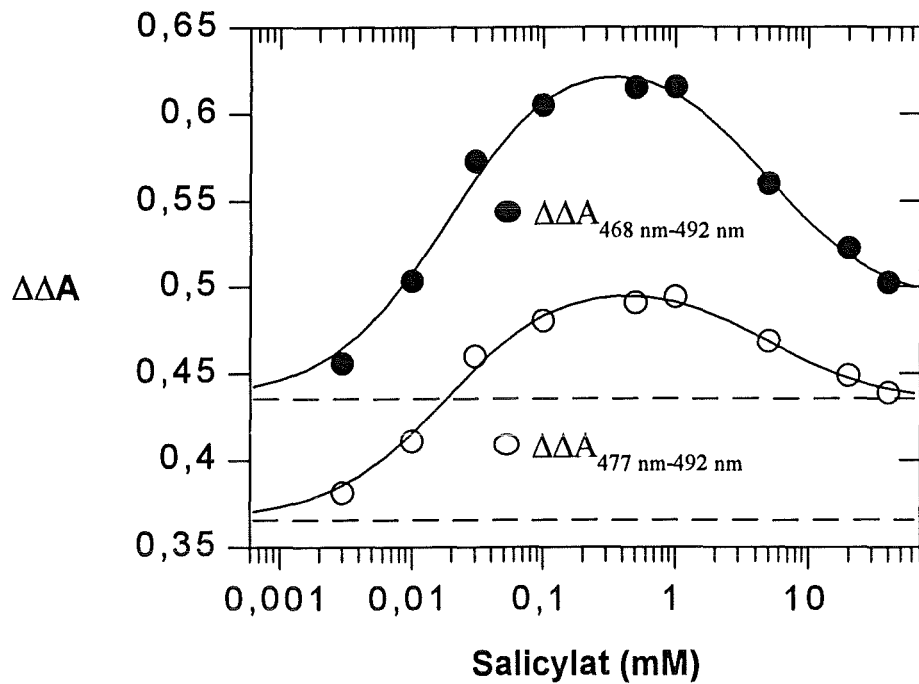


Abb. 4.53: Dosis-Wirkungskurve anhand unterschiedlicher Wellenlängen ausgewertet
 – $\Delta\Delta A_{468\text{ nm}-492\text{ nm}}$ = Differenz ($\Delta\Delta A = \Delta A_{468\text{ nm}} - \Delta A_{492\text{ nm}}$) auf Flavinabsorption normiert,
 $\Delta\Delta A_{477\text{ nm}-492\text{ nm}}$ = Differenz ($\Delta\Delta A = \Delta A_{477\text{ nm}} - \Delta A_{492\text{ nm}}$) auf Flavinabsorption normiert

Werden die gemessenen Salicylatwerte gegen die Salicylateinwaage aufgetragen, dann ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung, wie die minimale Streuung der Meßpunkte erkennen läßt (Abb. 4.54). Dies belegt die Anwendbarkeit der neuen Auswertemethode.

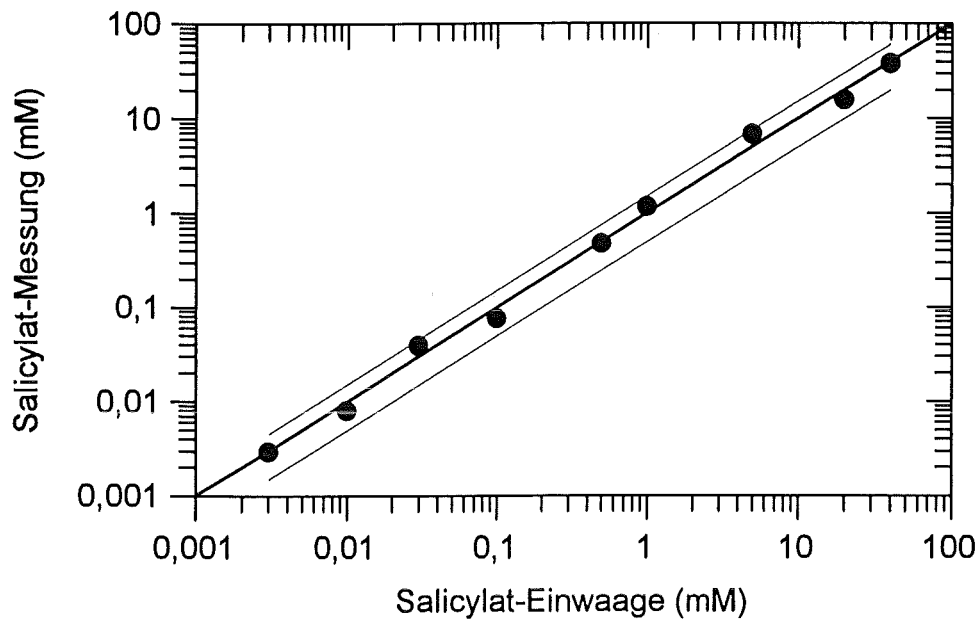


Abb. 4.54: Vergleich der Salicylat-Messung mit der Salicylat-Einwaage

– fette Linie = theoretische Eichgerade

dünne Linien = 95 %ige Vertrauensgrenzen

4.4.9 Vereinfachter Sensoreinsatz durch eine neue Auswertungsmethode

Bisher werden die Sensoren zuerst vorgespült, bis die Flavinabsorption konstant bleibt. Hierbei verursacht zunächst die Anwesenheit von Glycerin und konzentriertem Phosphatpuffer ein etwas verändertes Absorptionsspektrum. Nach 90 s Spülzeit ist diese Störung beseitigt. Bis die Flavinabsorption konstant bleibt, wird mindestens 5 min weitergespült.

Mit der neuen Auswertungsmethode, die nur das Absorptionsspektrum des beprobten Enzyms verwendet, kann auf das Vorspülen der Sensoren verzichtet werden. Sie ermöglicht es, ohne Berücksichtigung schwankender Flavinabsorptionen den Sensor direkt zur Beprobung einzusetzen und dann 1,5 - 2 min zu warten, bis sich ein konstantes Meßsignal ergibt. Damit lassen sich die für die klinische Notfalldiagnostik benötigten kurzen Meßzeiten erreichen.

4.4.10 Dosis-Wirkungskurve in Gegenwart von 100 mM Chlorid

Die Auswertung mit Hilfe des Absorptionsspektrums nach der Beprobung lässt sich auch zur Bestimmung der Dosis-Wirkungskurve in Gegenwart von 100 mM Chlorid, entsprechend der Blutkonzentration, ohne Änderungen direkt verwenden.

Die kompetitive Hemmung in Gegenwart von Chlorid verursacht im Bereich geringer Salicylatkonzentrationen einen flacheren Kurvenverlauf, wobei Signale kleiner 0,01 mM Salicylat vollständig gehemmt werden. Im Bereich höherer Salicylatkonzentrationen macht sich die 100 mM Chloridkonzentration kaum mehr bemerkbar (Abb. 4.55).

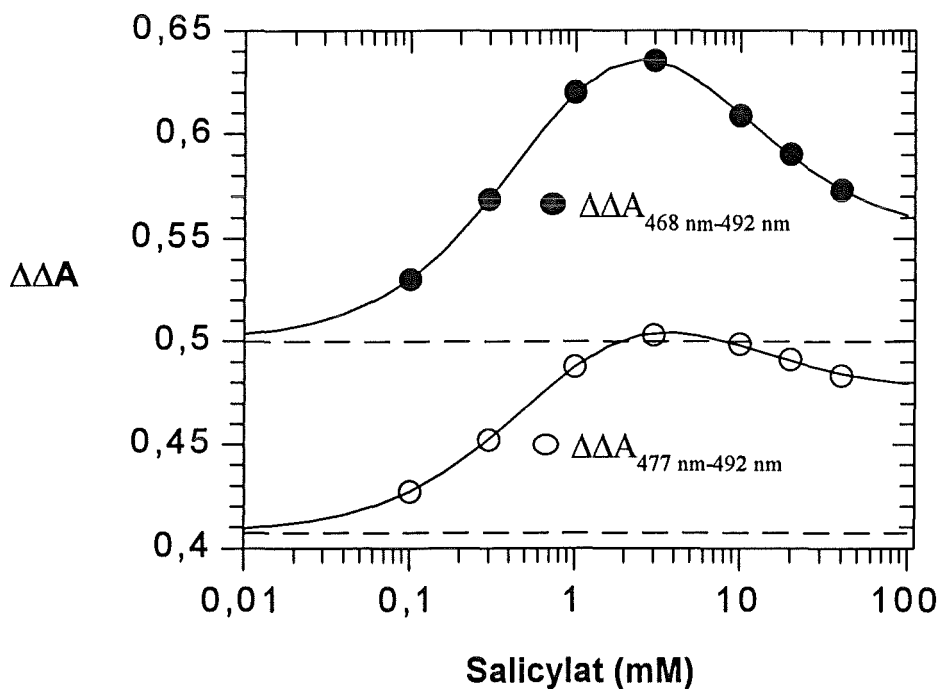


Abb. 4.55: Dosis-Wirkungskurve in Gegenwart von 100 mM Chlorid
– $\Delta\Delta A_{468\text{ nm}-492\text{ nm}}$ = Differenz ($\Delta\Delta A = \Delta A_{468\text{ nm}} - \Delta A_{492\text{ nm}}$) auf Flavinabsorption normiert, $\Delta\Delta A_{477\text{ nm}-492\text{ nm}}$ = Differenz ($\Delta\Delta A = \Delta A_{477\text{ nm}} - \Delta A_{492\text{ nm}}$) auf Flavinabsorption normiert

Der toxikologisch relevante Bereich beginnt gemäß Literaturangabe bei 2,2 mM Salicylat in Serum. Serumkonzentrationen größer 4,4 mM Salicylat werden normalerweise als tödlich angesehen [GDS, 1995]. Eine andere Literaturstelle gibt für tödlich verlaufende Salicylatvergiftungen eine Anfangsserumkonzentration von größer 12 mM an [Yip et al., 1994]. Der Vergleich mit der Dosis-Wirkungskurve zeigt, daß dieser Bereich durch den Salicylatbiosensor (auch bei der Blutchloridkonzentration von 100 mM) voll abgedeckt wird.

Werden die gemessenen Salicylatwerte gegen die Salicylateinwaage aufgetragen, dann ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung, wie die minimale Streuung der Meßpunkte erkennen läßt (Abb. 4.56). Dies belegt die Anwendbarkeit der Auswertemethode.

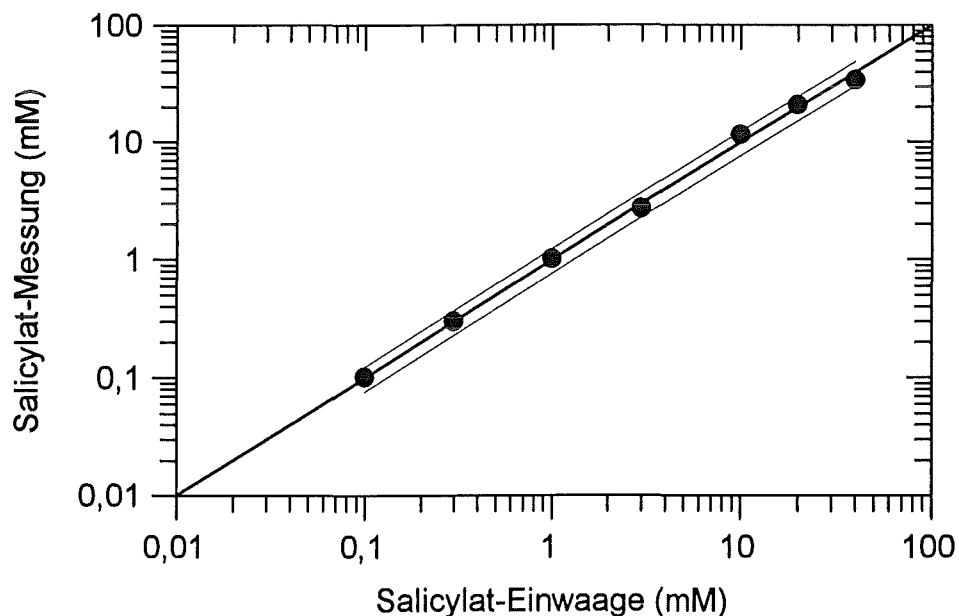


Abb. 4.56: Vergleich der Salicylat-Messung mit der Salicylat-Einwaage

– fette Linie = theoretische Eichgerade

dünne Linien = 95 %ige Vertrauensgrenzen

4.4.11 Messungen in Vollblut

In Vollblut ohne Salicylatzusatz zeigt der Sensor kein Salicylatsignal, die Höhe des Meßwerts entspricht dem Grundrauschen (Tab. 4.4).

Tab. 4.4: Blut ohne Zusatz

Messung:	Salicylat (mM)
1,5 min	0,01
10 min	0,02

Mit Salicylat auf 0,1 mM aufgestocktes Vollblut ergibt ebenfalls ein Signal, das dem Grundrauschen entspricht (Tab. 4.5), obwohl gemäß der Dosis-Wirkungskurve ein deutliches Signal zu erwarten wäre. Die Ursache dafür liegt in der Anlagerung des Salicylats an Serumalbumin, welches dann nicht mehr für die Messung zugänglich ist [Riggs et al., 1987].

Tab. 4.5: Blut mit 0,1 mM Salicylat

Messung:	Salicylat (mM)
1,5 min	-0,01
10 min	0,02

Eine weitere Aufstockung auf 1 mM Salicylat ergibt ein deutliches Signal, da bei höheren Salicylatkonzentrationen ein geringerer Teil des Salicylats an Protein gebunden ist [Curry, 1992]. Dieses Signal ist immer noch stark vermindert und entspricht in seiner Höhe 0,2 mM freiem Salicylat (Tab. 4.6).

Tab. 4.6: Blut mit 1 mM Salicylat

Messung:	Salicylat (mM)
1,5 min	0,19
10 min	0,21

Erst bei der Aufstockung auf 10 mM Salicylat ergibt sich ein nur noch geringfügig verringertes Signal, welches im Vergleich von Blutproben dreier verschiedener Patienten sehr gut übereinstimmt. Wie der Vergleich der Meßwerte zu zwei verschiedenen Zeitpunkten zeigt, läßt sich schon nach 15 s ein auswertbares Meßsignal erhalten, das sich auch nach 10 min noch als stabil erweist (Tab. 4.7).

Tab. 4.7: Blut mit 10 mM Salicylat

Messung:	Salicylat (mM)		
	Probe 1	Probe 2	Probe 3
15 s	7,6	8,7	10,6
10 min	9,2	10,0	8,7

Die Genauigkeit der Meßwerte entspricht den Anforderungen der klinischen Notfalldiagnostik. Die Anlagerung von Salicylat an Serumalbumin hat keine Bedeutung für die Einsatzfähigkeit des Sensors, da sich auch die Angaben für Vergiftungen nur auf freies Salicylat beziehen.

4.5 Störungen und Querempfindlichkeiten

4.5.1 Bilirubinabsorption in der Durchflußküvette ohne Hohlfaser

Im Vollblut ist neben dem Hämoglobin der Erythrozyten auch das gelbfarbene Abbauprodukt des Häms, Bilirubin, geeignet, auf Grund seiner Eigenabsorption optische Messungen zu beeinflussen (Abb. 4.57). In der Praxis wird dies bei Salicylatmessungen im Hohlfasersystem nicht beobachtet, obwohl Bilirubin mit einer Molmasse von 485 sehr leicht in die Hohlfaser mit Molmassenausschluß von 18 000 diffundieren und in den Lichtstrahl gelangen könnte.

Der Grund liegt in der Bindung des Bilirubins an Serumalbumin mit einer Molmasse von etwa 60 000, wodurch auch Bilirubin aus dem Lichtstrahl ausgeschlossen wird. Freies Bilirubin kommt auf Grund der geringen Löslichkeit kaum im Blut vor. Schon bei Konzentrationen von etwa 1 mg dL^{-1} kommt es zu Einlagerungen in das Gewebe, was als Gelbsucht bezeichnet wird [Harper et al., 1987].

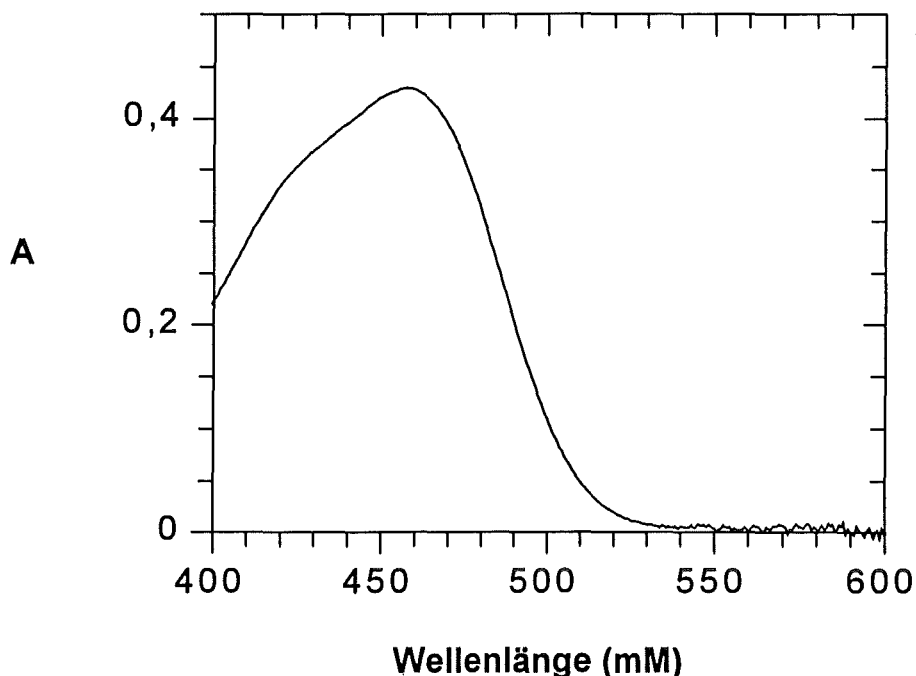


Abb. 4.57: Absorption von Bilirubin – 19,1 mg Humanbilirubin in 1 dL Ethylenglykol, da schwer wasserlöslich; in Klemmküvette gemessen, in der sich keine Hohlfaser befindet

4.5.2 Störung der salicylatinduzierten Absorptionsänderung ohne aufgesetzte Lichtleiter

Die Meßsignale müssen im praktischen Einsatz verlässlich sein. Dies ist in miniaturisierten Meßsystemen oft schwerer realisierbar als in Makrosystemen, da schon einfache Staubpartikel oder kleinste Luftbläschen Störungen zur Folge haben können. Die Störungen verursachen Lichtstreuung bzw. verändern den Lichtweg, wodurch die Meßsignale verfälscht werden.

Befinden sich Fasern im Lichtstrahl, so vergrößert sich, bedingt durch Lichtstreuung, die Differenz der Absorptionsspektren. Da die Lichtstreuung wellenlängenabhängig ist, wirkt sich dies im Bereich kürzerer Wellenlängen sehr viel stärker aus, wodurch größere Meßsignale vorgetäuscht werden (Abb. 4.58).

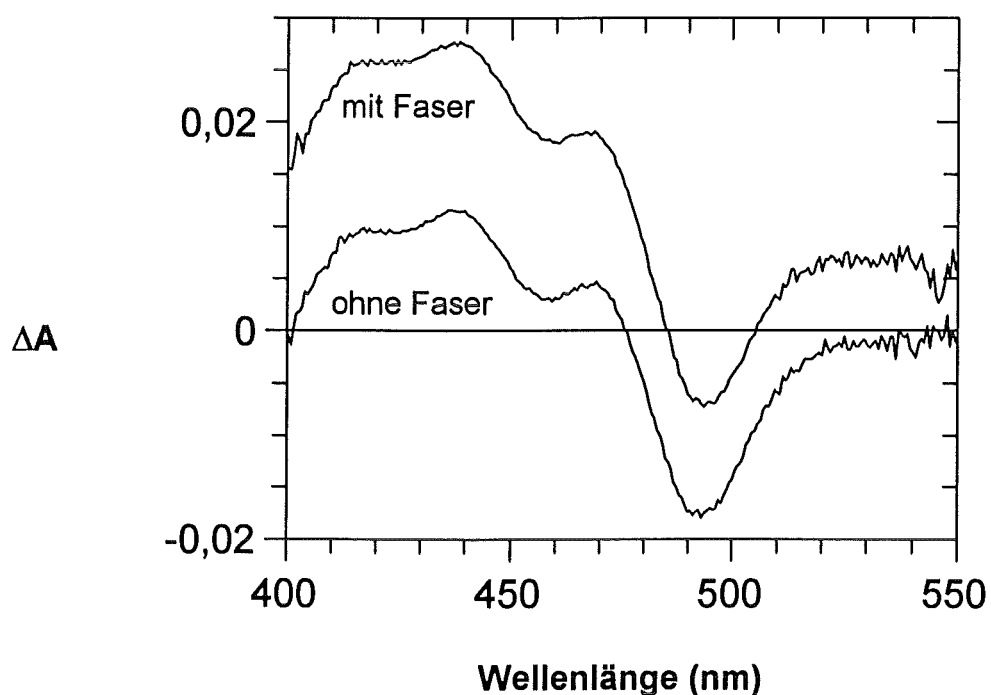


Abb. 4.58: Störung durch Fasern im Lichtstrahl – 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88)

Kommen Luftbläschen in den Lichtstrahl, so nimmt die Enzymabsorption durch den veränderten Lichtweg zu. Die zusätzliche Flavinabsorption überlagert das salicylatinduzierte Differenzspektrum, wodurch eine sinnvolle Auswertung stark erschwert wird (Abb. 4.59).

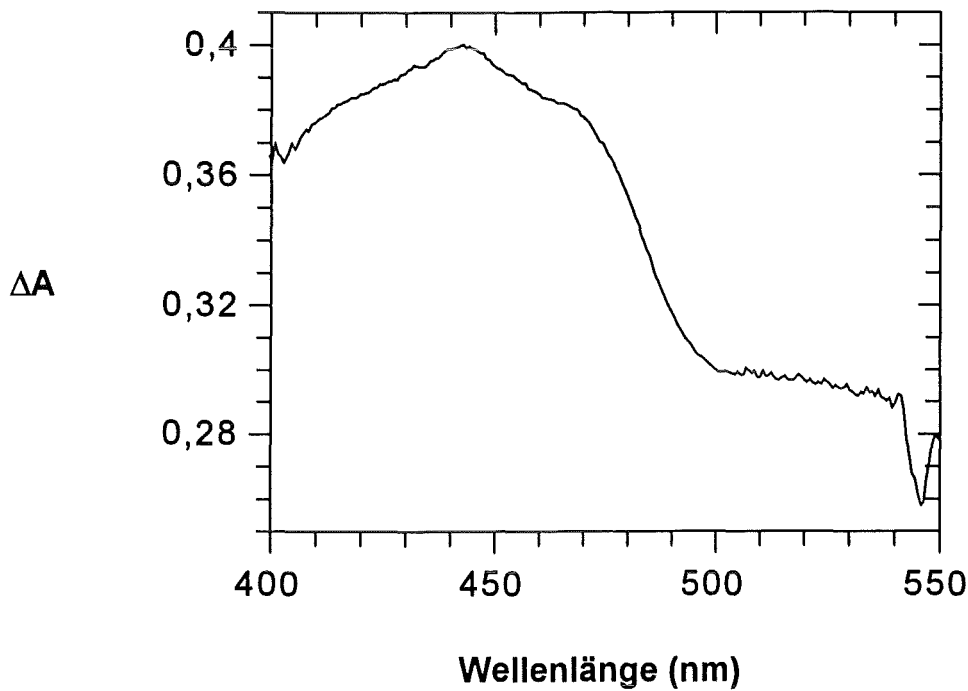


Abb. 4.59: Störung durch Luftbläschen im Lichtstrahl – 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88)

Miniaturisierte Meßsysteme sind zum Teil störanfälliger, als Makrosysteme, und wenn Störungen auftreten, so sind ihre Auswirkungen, wie hier dargestellt, auch oft gravierender, so daß eine Miniaturisierung nicht in jedem Falle sinnvoll ist.

Im folgenden soll nun gezeigt werden, wie sich mit Hilfe einer vorteilhaft gestalteten Miniaturisierung die gezeigten Störungen vermeiden lassen.

4.5.3 Eliminierung von Störeinflüssen durch aufgesetzte Lichtleiter

Durch das Aufsetzen der Lichtleiter auf die Hohlfaser geht der Lichtweg nur noch direkt durch die Hohlfaser. Somit ist gewährleistet, daß Staubpartikel keine Störungen mehr verursachen können. Gleiches gilt auch für Luftblasen. Hier sorgen die aufgesetzten Lichtleiter dafür, daß selbst bei großen Luftblasen der optische Weg nur durch Flüssigkeit verläuft und damit auch ein kurzzeitiges „Trockenlaufen“ des Sensors zu keinem veränderten Signal führt.

Wird das Differenzspektrum des unbeprobten Sensors aus der Absorption vor und nach der Zugabe von Luft gebildet, so zeigt sich keine über das Grundrauschen hinausgehende Veränderung (Abb. 4.60).

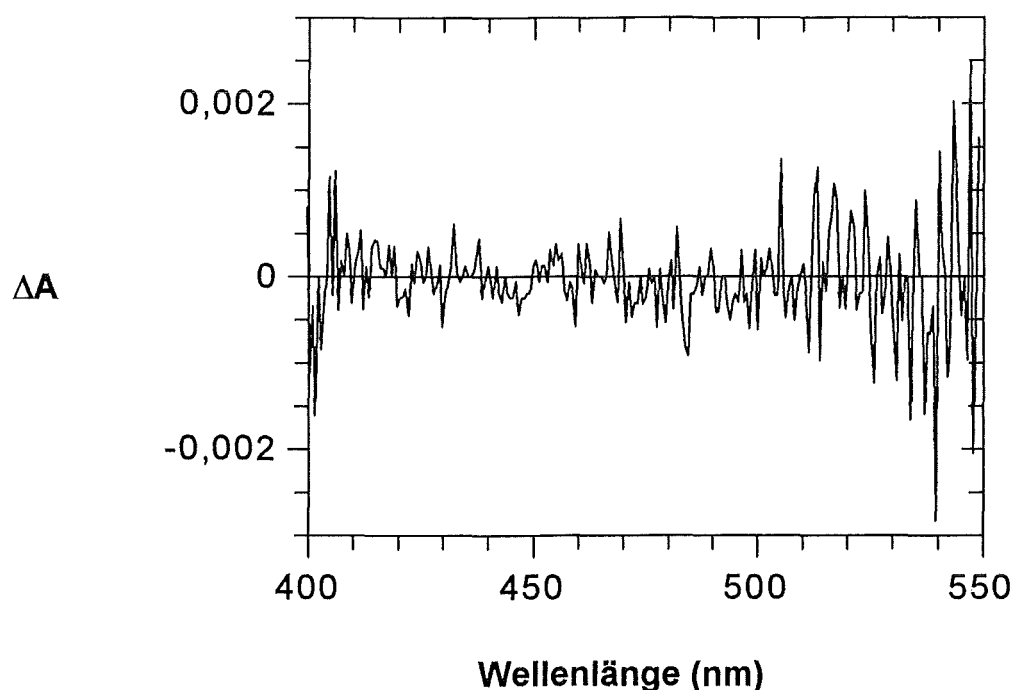


Abb. 4.60: Luftblase im unbeprobten Sensor – Phosphatpuffer (pH = 6,88) bzw. Luft

Während der Beprobung mit Salicylat ergibt sich durch das Auftreten einer Luftblase ebenfalls keine Veränderung im Differenzspektrum, wie die Deckungsgleichheit der salicylatinduzierten Differenzspektren beweist (Abb. 4.61).

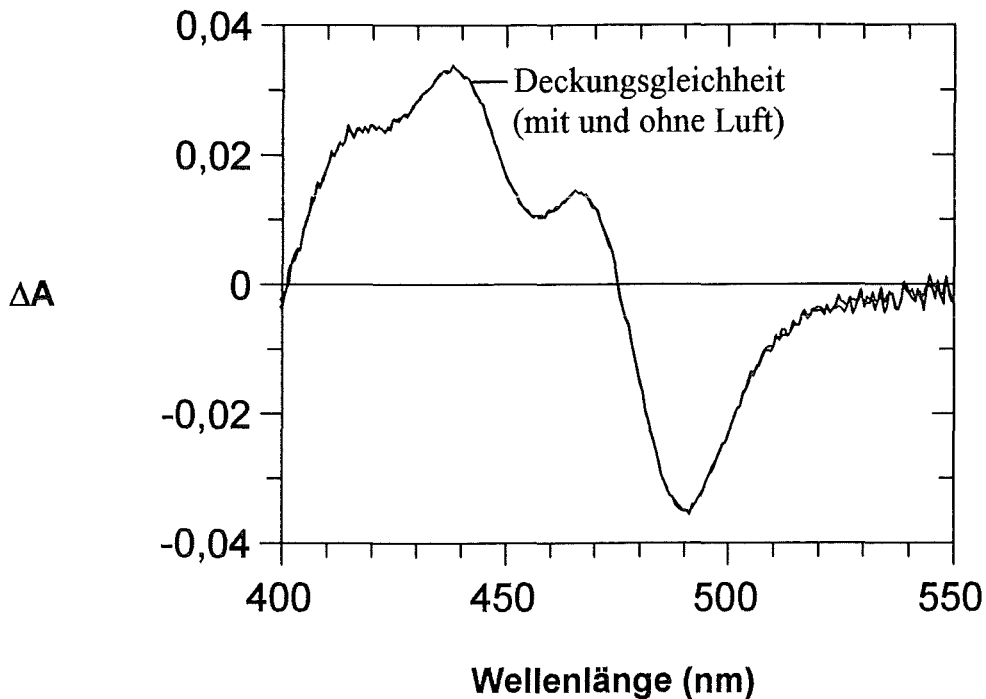


Abb. 4.61: Luftblase während der Beprobung mit Salicylat – 0,5 mM Salicylat in Phosphatpuffer (pH = 6,88), anschließend Luft, Absorptionsänderungen sind deckungsgleich

Durch das Aufsetzen der Lichtleiter auf die Hohlfasern ist es gelungen allfällige Störungen, die in Makrosystemen häufig auftreten, bei der Miniaturisierung des Meßsystems auszuschließen.

4.5.4 Querempfindlichkeiten

Die Auswahl der möglichen Störsubstanzen erfolgt entsprechend den Angaben eines kommerziell erhältlichen Salicylat-Test-Kits [GDS, 1995]. Es werden die dort angegebenen Konzentrationsverhältnisse eingehalten. Bei den zu untersuchenden Substanzen handelt es sich im wesentlichen um Medikamente, Stoffwechselprodukte, Zusätze zur Blutkonservierung und mit Salicylat strukturverwandte Stoffe (Tab. 4.8).

Tab. 4.8: Test auf Querempfindlichkeiten

Störsubstanz jeweils in 1L 0,03 mM Salicylatlösung gelöst		Signalhöhe in % (0,03 mM Salicylatlösung = 100 %)
Acetaminophen (Paracetamol)	7,5 mg	100
Acetylsalicylsäure (Aspirin)	7,5 mg	104
EDTA Dinatriumsalz	7,5 mg	102
Ibuprofen	7,5 mg	103
α -Ketobuttersäure	7,5 mg	101
Methylsalicylat	7,5 mg	101
Phenol	7,5 mg	100
Salicylamid	7,5 mg	100
Natriumbenzoat	7,5 mg	101
Natriumoxalat	7,5 mg	101
Theophyllin	7,5 mg	97
Harnsäure	7,5 mg	100
Ethanol	0,8 ‰	100
Heparin	215 u	98
Hämoglobin	$A_{540 \text{ nm}} = 0,03$	100
Natriumcitrat	57 mg	100
Natriumfluorid	37,5 mg	101
Oxalsäure	30 mg	100

Tab. 4.9: Querempfindlichkeiten im Biosensor im Vergleich mit der enzymatischen Test-Kit-Reaktion

Störsubstanz jeweils in 1L 0,03 mM Salicylatlösung gelöst		Signalhöhe in % (0,03 mM Salicylatlösung = 100 %)
p-Aminosalicylsäure	7,5 mg	106 (215)*
2,5-Dihydroxybenzoesäure	7,5 mg	98 (123)*
2,5-Dihydroxyphenyllessigsäure	7,5 mg	100 (119)*

*Wiederfindung mit enzymatischer Test-Kit-Reaktion
[GDS, 1995]

Für die getesteten Substanzen ergeben sich bei der Messung mit dem Salicylatbiosensor keine relevanten Querempfindlichkeiten, auch nicht für die zuletzt aufgeführten drei Substanzen (Tab. 4.9), die mit der enzymatischen Test-Kit-Reaktion Probleme bereiten. Diese drei Substanzen sind, obwohl sie auf Grund ihrer Strukturverwandtschaft mit Salicylat für die Test-Kit-Reaktion eine hohe Pseudo-substrataktivität aufweisen, bei den angegebenen Konzentrationsverhältnissen kaum in der Lage, wie Salicylat Absorptionsänderungen des Enzyms hervorzurufen. Dieser wesentliche Nachteil der Salicylatbestimmung über den NADH-Verbrauch wird durch die NADH-Oxidaseaktivität der Salicylathydroxylase verursacht, die durch einige mit Salicylat verwandte Substanzen stimuliert wird, deren Hydroxylierung aber nicht stöchiometrisch mit der NADH-Oxidation verläuft. Dieses Phänomen wird in der Literatur als „uncoupling“ bezeichnet [White-Stevens, Kamin, 1972a]. Die Coenzym-oxidaseaktivität der Salicylathydroxylase bewirkt sogar in Abwesenheit von Salicylat und verwandten Substanzen eine langsame NADH-Oxidation. Eine weitere Fehlerquelle ist die Anwesenheit von Dehydrogenasen und deren Substrate in Serumproben, wodurch der NADH-Verbrauch erhöht wird. So kann gezeigt werden, daß salicylatfreies Serum mit hoher Lactatdehydrogenaseaktivität und hoher Pyruvatkonzentration eine signifikante NADH-Oxidation verursacht [Chubb et al., 1986].

4.5.5 Vergleich von herkömmlicher Salicylatanalytik und Salicylatbestimmung mittels Biosensor

Der neu entwickelte Salicylatbiosensor weist gegenüber herkömmlicher Analytik viele Vorteile auf:

Tab. 4.10: Vorteile des neu entwickelten Salicylatbiosensors gegenüber herkömmlicher Analytik zum Nachweis von Salicylat

Eigenschaft	herkömmliche Salicylatanalytik	neu entwickelter Salicylatbiosensor
Größe des Meßgeräts	große, nicht transportable Laborgeräte	der Einsatz von blauer LED und Miniaturspektralphotometer ermöglicht den Aufbau eines kleinen, tragbaren Meßgeräts
zusätzliche Geräte	z.B. Zentrifuge, Temperiergerät	keine
benötigte Fachkenntnis des Anwenders	allgemein hoch, bis sehr hoch für HPLC und GC	gering, von ungeschultem Personal nach kurzer Einweisung verwendbar
Probenvorbereitung	Gewinnung von Serum, Plasma oder Extrakt und Maßanalytik, für GC zusätzlich Derivatisierung	keine, da Messung in Vollblut möglich
Meßzeit für Probe	≥ 5 Minuten	< 2 Minuten
Analysendauer	Zeit für Probenvorbereitung + Meßzeit für Probe + Meßzeit für Standard	entspricht der Meßzeit für Probe
Kalibration	über Salicylatstandard	über ein halbes Jahr kalibrationsfrei
Spezifität für Salicylat	HPLC und GC: geringe Querempfindlichkeiten; Farbreaktion nach Trinder sehr unspezifisch	keine relevanten Querempfindlichkeiten
Meßbereich	für HPLC und GC Anreicherung nötig, sonst Verdünnung der Probe notwendig	entspricht gut dem klinisch relevanten Bereich
Mehrkomponentenbestimmungen	zum Teil möglich (HPLC und GC)	System läßt sich auf andere Analyten erweitern

Für die Salicylatbestimmung mittels Biosensor wird nur noch ein einziges, kleines Meßgerät benötigt. Der Verzicht auf Probenvorbereitung und die Kalibrationsfreiheit ermöglichen eine einfache und sichere Handhabung des Biosensors. Die sehr kurze Analysendauer, die sich auf die Meßzeit der Probe beschränkt, liefert den in der Notfalldiagnostik entscheidenden Zeitvorteil. Wie der weit verbreitete Einsatz der sehr unspezifischen Trinder-Reaktion verdeutlicht, spielt der Preis für die praktische Verwendung einer Methode eine entscheidende Rolle. Auch hier ist der Biosensor konkurrenzlos gut, denn bei gleichzeitig hoher Spezifität wird für die Herstellung eines Biosensors weniger als 10 % der Enzymmenge, die für eine enzymatische Salicylatbestimmung notwendig wäre, benötigt.

Langfristig liegt neben dem Preis der größte Vorteil der Biosensormethode in der einfachen Ausbaufähigkeit des Systems auf weitere Analyten. Der Biosensor eignet sich deshalb auch für den Einsatz in Arztpraxen oder kleineren Krankenhäusern, wo bisher auf Grund des fehlenden, teuren Fachpersonals keine entsprechende Analytik durchgeführt werden kann.

5. Ausblick

5.1 Anpassung des Lampenspektrums mit Hilfe von Fluoreszenzfiltern

Die verwendete blaue LED zeichnet sich gegenüber anderen Lichtquellen bei gleicher Lichtleistung durch geringere Größe und geringeren Energieverbrauch aus. Dies macht sie zur idealen Lichtquelle für miniaturisierte Meßgeräte. Obwohl sie einen stark eingeschränkten Emissionsbereich besitzt, bietet sie ausreichend Intensität über den gesamten Meßbereich von 468 - 520 nm. Das Intensitätsmaximum liegt um 450 nm. Im Bereich um 500 nm jedoch beträgt die Intensität nur noch ein Bruchteil davon. Ideal wäre eine Umverteilung der Intensität von 450 nm in den Bereich um 500 nm. Diese Umverteilung läßt sich mit Hilfe von Fluoreszenzfiltern erreichen. Hierbei wird ein Teil des Lichtes um 450 nm absorbiert und als Licht im Bereich um 500 nm wieder emittiert (Abb. 5.1).

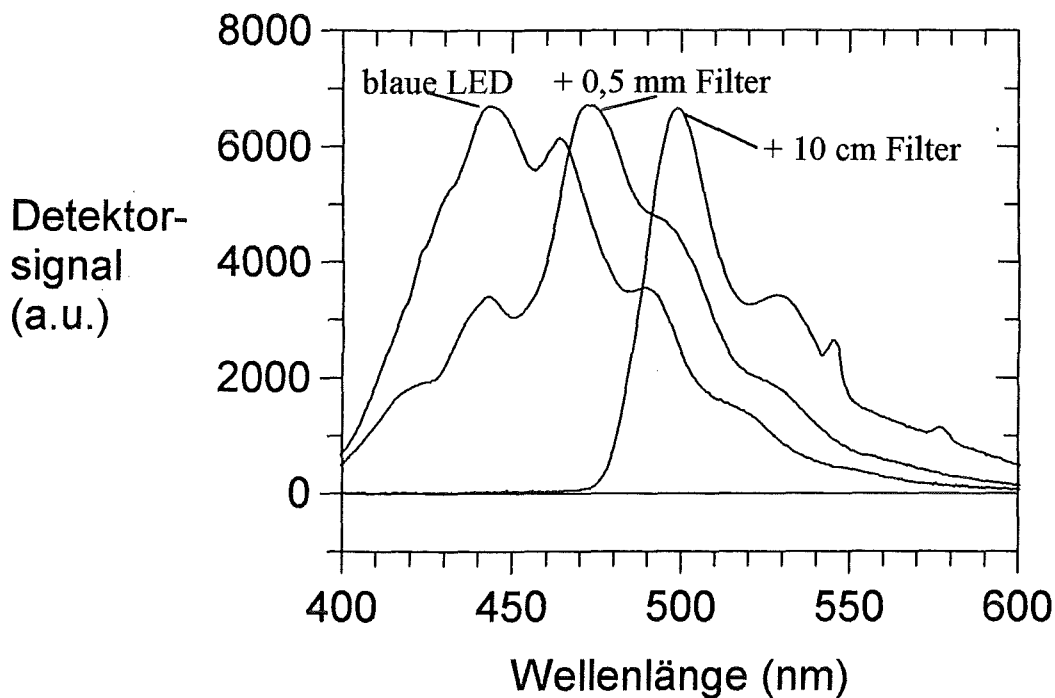


Abb. 5.1: Anpassung des Lampenspektrums mit Hilfe von Fluoreszenzfiltern

5.2 Aufbau eines Sensorstäbchens

Das Prinzip des Blutzellenausschlusses durch auf die Hohl-faser aufgesetzte Lichtleiter läßt sich auf ein Sensorstäbchen übertragen, indem die Lichtleiter durch aufliegende Acrylglaswände ersetzt werden. Die Hohl-faser wird an beiden Seiten fest in das Meßstäbchen eingeklemmt, so daß durch die freibleibenden Ecken eine Beprobung in Längsrichtung möglich bleibt (Abb. 5.2).

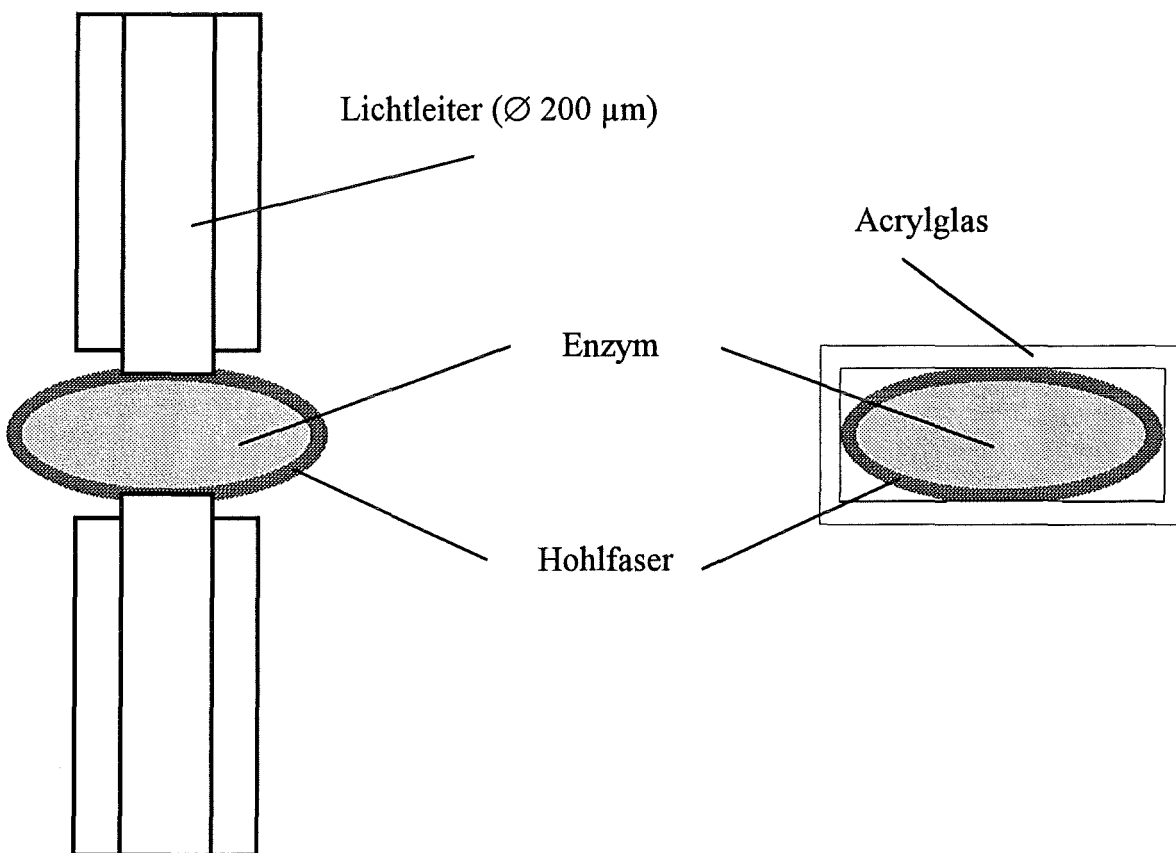


Abb. 5.2: Prinzip des Blutzellenausschlusses, übertragen auf ein Sensorstäbchen

Eine Fixierung in einer Meßküvette sorgt für die richtige Positionierung des Sensorstäbchens im Lichtstrahl.

5.3 Meßküvette für Sensorstäbchen

In der Meßküvette dient eine fest integrierte blaue LED als Anregungslichtquelle. Nach Absorption in der Hohlleiter wird das transmittierte Licht mit Hilfe eines Lichtleiters in ein Mikrospektralphotometer weitergeleitet oder, sofern dies möglich ist, ohne Lichtleiter direkt in das Spektralphotometer eingekoppelt (Abb. 5.3).

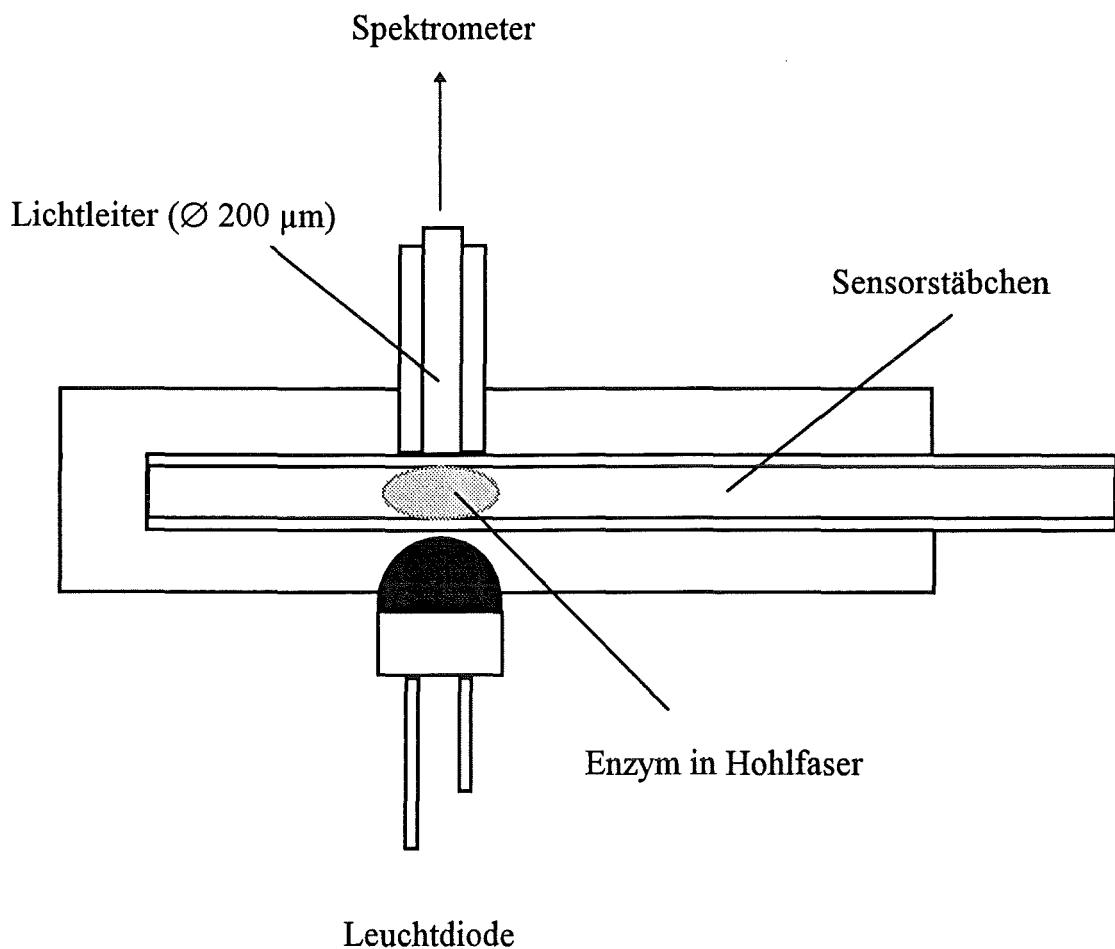


Abb. 5.3: Meßküvette für Sensorstäbchen

Neben der sehr einfachen Handhabung ermöglicht dieses System außerdem einen hohen Probendurchsatz, da für die Blutproben mehrere Sensorstäbchen verwendet werden können und diese anschließend nacheinander mit demselben Meßgerät vermessen werden können.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die *Entwicklung eines optischen Biosensors für die toxikologische Notfalldiagnostik von Salicylat*.

Die Eignung der Enzym-Substrat-Komplexbildung zwischen Salicylathydroxylase und Salicylat als Nachweisprinzip für Salicylat wurde zunächst mit Vorversuchen in Lösung abgeklärt. Hierbei erwies sich die Absorptionsspektroskopie als spezifische Meßmethode, die gegenüber der Fluoreszenzmessung den Vorteil besitzt, daß das Differenzspektrum aus der Absorption vor und nach der Beprobung wesentlich mehr Möglichkeiten bietet, Störungen zu eliminieren.

Für den Aufbau des Biosensors wurden nach einer Vorauswahl mehrere Immobilisierungsmethoden für Enzyme auf ihre Verwendbarkeit untersucht. Als besonders brauchbar stellte sich die Immobilisierung mittels Hohlfaser heraus, die im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelt wurde. Sie ermöglicht gute Diffusionsbedingungen bei gleichzeitig guten optischen und mechanischen Eigenschaften. Durch Aufkonzentrierung in der Hohlfaser wurden hohe Enzymdichten erreicht, die den Aufbau eines miniaturisierten Sensorsystems zulassen, welches nur geringste Mengen an Enzym benötigt.

Der Hauptvorteil des neuen Biosensorsystems liegt in der Möglichkeit der Erweiterung auf zusätzliche Analyten unter Verwendung des jeweils spezifischen Enzyms. Dies läßt den Ausbau zu einem Multianalysystem zu, wie es für die toxikologische Notfalldiagnostik wünschenswert ist.

Die mit Hilfe der Immobilisierung mittels Hohlfaser hergestellten Salicylatbiosensoren wurden umfassend charakterisiert. Die Sensoren waren vollständig regenerierbar und zeigten bei wiederholter Beprobung übereinstimmende Meßergebnisse, wodurch eine Mehrfachverwendung der Sensoren möglich ist. Die geringen Herstellungskosten

erlauben es jedoch auch, den Sensor als Einwegsystem zu verwenden, wie dies in der klinischen Diagnostik zur Vermeidung eines Infektionsrisikos üblich ist.

Während die Geschwindigkeit des salicylatinduzierten Signals sehr stark von der Temperatur abhängt, sind Störungen durch Schwankung der Temperatur oder des Blut-pH-Werts bei Messung im Gleichgewichtszustand der Reaktion nicht zu erwarten.

Die Gleichgewichtseinstellung erfolgt durch die guten Diffusionsbedingungen des miniaturisierten Sensorsystems so rasch, daß sich Analysenzeiten von deutlich weniger als 2 Minuten erreichen lassen.

Der Test möglicher Störsubstanzen, deren Auswahl entsprechend den Angaben eines kommerziell erhältlichen Salicylattests [GDS, 1995] erfolgte, ergab keine relevanten Querempfindlichkeiten, auch nicht für die Substanzen, die den kommerziell erhältlichen Salicylattest selbst empfindlich beeinflussen.

Dies ist eine wichtige Voraussetzung zur Vermeidung sogenannter falsch positiver oder falsch negativer Meßergebnisse, die in der Praxis schwerwiegende Fehlbehandlungen des Patienten zur Folge hätten.

Durch eine Selbstkalibrierung der Sensoren wird eine besonders einfache und schnelle Handhabung des Systems ermöglicht. Sie wird über die Normierung der Sensorsignale auf die Enzymkonzentration erreicht. Die so normierten Sensoren liefern identische Werte.

Für die Auswertung wird nur das Absorptionsspektrum nach der Salicylatzugabe verwendet. Die Salicylatkonzentration läßt sich über das Verhältnis der Absorptionswerte mehrerer Wellenlängen und die Enzymkonzentration anhand einer Wellenlänge mit gleichbleibender Absorption, an einem sogenannten isosbestischen Punkt, bestimmen. Dies hat den Vorteil, daß Störungen durch Veränderungen der Enzymkonzentration im Meßlichtstrahl vermieden werden und der Sensor auch außerhalb des Meßgeräts ohne vorheriges Eichen direkt eingesetzt werden kann.

Anhand einer einmalig bestimmten Dosis-Wirkungskurve, die den klinisch-toxikologischen Bereich voll abdeckt, läßt sich mit Hilfe eines Mikrochips im Meßgerät das richtige Ergebnis sofort ermitteln.

Die Sensoren sind im Kühlschrank bei 4 bis 8 °C über ein halbes Jahr lagerbar, ohne neu kalibriert werden zu müssen.

Der Test des Biosensors an Blutproben führte zu reproduzierbaren Ergebnissen, obwohl optische Messungen in Vollblut aufgrund störender Blutzellen normalerweise nicht durchführbar sind. Der spezielle Aufbau des miniaturisierten Sensorsystems ermöglicht es jedoch, Blutzellen und sogar das gelbfarbene Bilirubin vollständig aus dem Meßlichtstrahl auszuschließen, so daß Messungen ohne jegliche Probenvorbereitung durchführbar sind.

Durch die spezielle Sensorgeometrie werden darüber hinaus Störungen durch Luftblasen oder Staubpartikel vermieden.

7. Literaturverzeichnis

- Arroyo, R., Rodríguez, R., Salinas, P. (1993), Master behavior for gelation in a sol-gel process under different temperature and pH conditions, *J. Non-Cryst. Solids* 163, 90-96
- Barker, S. A. (1987), Immobilisation of the biological component, in: *Biosensors, fundamentals and applications*, Turner, A. P. F., Karube, I., Wilson, G. S., eds., Oxford University Press, Oxford, 85-99
- Bartsch, H.-J. (1987), *Taschenbuch mathematischer Formeln*, Verlag Harri Deutsch, Frankfurt a.M.
- Baselt, R. C. (1980), Analytical procedures for therapeutic drug monitoring and emergency toxicology, *Biomedical Publ.*, 261-262, Davis, Cal.
- Belitz, H.-B., Grosch, W. (1987), *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, Springer Verlag Heidelberg
- Beswick, R. B., Pitt, C. W. (1988), Optical detection of toxic gases using fluorescent porphyrin Langmuir-Blodgett films, *Journal of Colloid and Interface Science*, 124, 1, 146-155
- Braun, S., Shtelzer, S. (1994), An optical biosensor based upon glucose oxidase immobilized in sol-gel silicate matrix, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 19, 293-305
- Breslau, B. R., Kilcullen, B. M. (1974), Hollow fiber enzymatic reactors: an engineering approach, in: *Enzyme Engineering 3*, Pye, E. K. and Weetall, H. H., eds., New York, Academic Press, 179-190
- Brinker, C. J., Scherer, G. W. (1990), *Sol-Gel-Science. The physics and chemistry of sol-gel processing*, Academic Press, London
- Brooks, S. L., Higgins, I. J., Newman, J. D., Turner, A. P. F. (1991), Biosensors for process control, *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 946-955
- Brunet, F., Cabane, B. (1993), Populations of oligomers in sol-gel condensation, *J. Non-Cryst. Solids* 163, 211-225
- Cabral, J. M. S., Kennedy, J. F. (1993), Immobilization techniques for altering thermal stability of enzymes, in: *thermostability of enzymes*, Gupta, M. N., ed., Springer Verlag, Berlin, 162-179
- Cammann, K., Lemke, U., Rohen, A., Sander, J., Wiken, H., Winter, B. (1991), Chemo- und Biosensoren-Grundlagen und Anwendungen, *Angew. Chem.* 103, 519-541
- Carlson, M., Thompson, R. D. (1987), Determination of p-aminobenzoic and salicylic acid salts in pharmaceuticals by High Performance Liquid Chromatography, *J. Liquid Chromatogr.* 10(5), 997-1009
- Carr, P. W., Bowers, L. D. (1980), *immobilized enzymes in analytical and clinical chemistry*, Wiley & Sons, Inc., New York
- Chibata, I. (1978), Preparation of immobilized enzymes and microbial cells, in: *immobilized enzymes*, Chibata, I., ed., Wiley & Sons, Inc., New York, 9-92
- Chubb, S. A. P., Campbell, R. S., Ramsay, J. R., Hammond, P. M., Atkinson, T., and Price, C. P. (1986), An enzyme mediated, colorimetric method for the measurement of salicylate, *Clinica Chimica Acta*, 155, 209-220

- Chung, B. H., Chang, H. N. (1988), Aerobic fungal cell immobilization in a dual hollow-fiber bioreactor: continuous production of a citric acid, *Biotechnol. Bioeng.* 32, 205-212
- Clark, L. C., Lyons, C. (1962), Elektrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann. NY Acad. Sci.* 102, 29-45
- Cohenford, M. A., Santoro, P. F., Urbanowski, J. C., Dain, J. A. (1986), Effect of immobilization on the physical and kinetic properties of soluble and insoluble trypsin-albumin polymers, *Biotechnol. Bioeng.* 28, 736-740
- Cohenford, M. A., Urbanowski, J. C., Dain, J. A. (1983), Effect of immobilization on stability and kinetic properties of α -L-Fucosidase from *Turbo cornutus*, *Biotechnol. Bioeng.* 15, 1501-1508
- Colomban, P. (1989), Gel technology in ceramics, glass-ceramics and ceramic-ceramic composites, *Ceramics international* 15, 23-50
- Curry, S. C. (1992), Salicylates, in: emergency medicine, ed. Tintinalli, J. E., New York, 589-592
- Czolk, R. (1990), Untersuchungen an immobilisierten Porphyrinderivaten zur Entwicklung Cadmium-sensitiver Schichten für einen optisch-chemischen Sensor, Dissertation Universität Karlsruhe (TH)
- Danielsson, B., Mattiasson, B., Mosbach, K. (1981), Enzyme thermistor devices and their analytical applications, *Appl. Biochem. Bioeng.* 3, 97-143
- Dave, B. C., Dunn, B., Silverstone, J. S., Zink, J. I. (1994), Sol-gel encapsulation methods for biosensors, *Analyt. Chem.* 66, 1120A-1127A
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (1983), *Klinisch-toxikologische Analytik: Lage und Ausbaunotwendigkeit*, Verlag Chemie, Weinheim
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (1989), *Klinisch-toxikologische Analytik bei akuten Vergiftungen und Drogenmißbrauch*, Verlag Chemie, Weinheim
- Faith, M. W., Wynne, H., Woodhouse, K. W., Rawlins, M. D. (1989), Plasma aspirin esterase: the influence of old age and frailty, *Age and Aging* 18, 39-42
- Fawcett, J. S., Morris, C. J. O. R. (1966), Molekular-sieve chromatography of proteins on granulated polyacrylamide gels, *Sep. Sci.* 1, 9-26
- Fischer, E. (1894), Einfluß der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme, *Ber. Deut. Chem. Ges.* 27, 2985-2993
- Fonong, T., Rechnitz, G. A. (1984), Enzyme electrode for the determination of salicylate, *Analytica Chimica Acta* 158, 357-362
- Gabow, P. A., Anderson, R. J., Potts, D. E., Schrierer, R. W. (1978), Acide-base disturbances in the salicylate-intoxicated adult, *Arch. Intern. Med.* 138, 1481-1484
- Gaudreault, P., Temple, A. R., Lovejoy, F. H. (1982), The relative severity of acute versus chronic salicylate poisoning in children: a clinical comparison, *Pediatr.* 70, 566-569
- GDS (1995), Test-Kit Beschreibung, GDS Diagnostics 25235 Leer Drive, P.O. Box 473, Elkhart, IN 46515
- Goldstein, L., Manecke, G. (1976), The chemistry of enzyme immobilization, in: applied biochemistry and bioengineering, Wingard, L. G., Katchalski-Katzir, E., Goldstein, L., ed., Academic Press, Inc., London, 23-110

- Goodman, L. S., Gilman, A. (1984), *The pharmacological basis of therapeutics*, Macmillan, New York, S. 312-344
- Göpel, W., Hesse, J., Zemel, J. N. (1991), *Sensors, a comprehensive survey Vol. 2 & 3*, Verlag Chemie, Weinheim
- Guilbault, G. G., Kauffmann, J.-M., Patriarche, G. J. (1991), Immobilized enzyme electrodes as biosensors, in: *protein immobilization: fundamentals and applications*, Taylor, R. F., ed., Dekker, Inc., New York, 209-262
- Gupta, M. N., Mattiasson, B. (1992), Unique applications of immobilized proteins in bioanalytical systems, in: *bioanalytical applications of enzymes 36*, Suelter, C. H., ed., Wiley & Sons, Inc., New York, 1-34
- Hallbacher, J., Guder, W. G. (1991), Mechanized toxicological serum tests in screening hospitalized patients, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 29, 537-547
- Harper, A. H., Martin, D. W., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. (1987), *Medizinische Biochemie, zweite, korrigierte Auflage*, Springer Verlag Heidelberg
- Hirschfield, T., Deaton, T., Milanovich, F., Klainer, S. (1983), Feasibility of using fiber optics for monitoring groundwater contaminants, *Opt. Eng.* 22, 527-531
- Hulanicki, A., Glab, S., Ingman, F. (1991), Chemical sensors - definition and classification, *Pure and Appl. Chem.* 63, 1247-1250
- Inloes, D. S., Smith, W. J., Taylor, D. P., Cohen, S. N., Robertson, C. R. (1983), Hollow-fiber membrane bioreactors using immobilized *E. coli* for protein synthesis, *Biotechnol. Bioeng.* 25, 2653-2681
- Inoue, H., Iwamoto, T., Makishima, A., Ikemoto, M., Horie, K. (1992), Preparation and properties of sol-gel thin films with porphins, *J. Opt. Soc. Am. B* 9, 516-518
- Janata, J. (1992), Chemical sensors, *Anal. Chem.*, 64, 196R-219R
- Kang, E. S., Todd, T. A., Capaci, M. T., Schwenger, K., Jabbour, J. T. (1983), Measurement of true salicylate concentration in serum from patients with Reye's Syndrome, *Clin. Chem.* 29, 1012-1014
- Kennedy, J. F., Cabral, J. M. S. (1983), Immobilized enzymes, in: *solid phase biochemistry: analytical and synthetic aspects*, Scouten, W. H., ed., Wiley & Sons, Inc., New York, 253-392
- Kennedy, J. F., Cabral, J. M. S. (1987), Enzyme immobilization, in: *biotechnology*, Kennedy, J. F., ed., Verlag Chemie, Weinheim, 347-404
- Kierstan, M. P. J., Coughlan, M. P. (1985), Immobilization of cells and enzymes by gel entrapment, in: *immobilized cells and enzymes*, Woodward, J., ed., IRL Press, Oxford, 39-48
- Kierstan, M. P. J., Coughlan, M. P. (1991), Immobilization of proteins by noncovalent procedures: principles and applications, in: *protein immobilization: fundamentals and applications*, Taylor, R. F., ed., Dekker, Inc., New York, 13-72
- Klein, E., Holland, F., Lebeouf, A., Donnaud, A., Smith, J. K. (1976), Transport and mechanical properties of hemodialysis hollow fibers, *J. Membrane Sci.* 1, 371-396
- Koshland, D. E. Jr. (1958), Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44, 98-104
- Kraus, S. (1995), *Xerogelstrukturen als Sensormatrices-Eignungsuntersuchungen durch Immobilisierungen pH-sensitiver Indikatoren*, Dissertation Universität Karlsruhe (TH),

- Longenecker, R. W., Trafton, J. E., Edwards, R. B. (1984), A tableted enzymic reagent for salicylat, for use in a discrete multiwavelength analytical system (Paramax[®]), *Clin. Chem.* 30, 1369-1371
- Luebbers, D. W., Opitz, N. (1975), The pCO₂-/pO₂-optode. New probe for measurement of partial pressure of carbon dioxide or partial pressure of oxygen in fluids and gases, *Z. Naturforsch., C: Biosci.* 30c, 532-533
- Lump, R. (1992), Entwicklung eines optisch-chemischen Sensors zur kontinuierlichen Nitratbestimmung in Trink- und Grundwasser, Dissertation Universität Karlsruhe (TH)
- McCormick, D., Roach, A. (1987), Measurement, statistics and computation, Chapman, N. B., ed., Wiley & Sons, Inc., London
- Moss, D. A. (1994): Auf dem Weg zur elektronischen Nase - Entwicklung von Biosensoren, *KfK-Nachr. Jahrg.* 26, 1/94, 53-57
- Mutschler, E. (1975), Arzneimittelwirkungen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- Netter, P., Faure, G., Regent, M. C., Procknal, J. A., Levy, G. (1985), Salicylate kinetics in old age, *Clin. Pharmacol. Ther.* 38, 6-11
- Neumayr, M., Sontag, G., Pittner, F. (1995), Enzymatic sensor coupled to a flow-injection analysis system for the determination of salicylate, *Analytica Chimica Acta* 305, 26-31
- Newman, J. D., Turner, A. P. F. (1994), Biosensors - The analysts dream?, *Chemistry and Industry* 10, 374-378
- Opitz, N., Luebbers, D. W. (1976), Simultaneous measurement of blood gases by means of fluorescence indicators, *Pluegers Arch.* 362, R52
- Peng, W.G., Gadalla, M.A.F., Smith, V., Peng, A., Chiou, W., L. (1978), Simple and rapid High-Pressure Liquid Chromatographic simultaneous determination of aspirin, salicylic acid, and salicyluric acid in plasma, *J. Pharm. Sci.* 65, 710-712
- Peterson, J. I., Goldstein, S. R., Fitzgerald, R. V., Buckhold, D. K. (1980), Fiber optic pH probe for physiological use, *Anal. Chem.* 52, 864-869
- Porter, M. C. (1972), Applications of membranes to enzyme isolation and purification, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 3, 115-144
- Porter, M. C., Nelson, L. (1972), Ultrafiltration in the chemical, food processing, pharmaceutical, and medical industries, in: recent developments in separation science II, Li, N. N., ed., CRC Press, Cleveland, OH, 227-267
- Rahni, M. A. N., Guilbault, G. G., de Oliveira, G. N. (1986), Immobilized enzyme electrode for the determination of salicylate in blood serum, *Analytica Chimica Acta* 181, 219-225
- Raymond, S., Nakamichi, M. (1962), Elektrophoresis in synthetic gels. I. Relation of gel structure to resolution, *Anal. Biochem.* 3, 23-30
- Riggs, B. S., Kulig, K., Rumack, B. H. (1987), Current status of aspirin and acetaminophen intoxication, *Pediatr. Ann.* 16, 886-898
- Römpp Chemie Lexikon (1995), Thieme Verlag Stuttgart
- Rony, P. R. (1971), Multiphase catalysis. II. hollow fiber catalysts, *Biotechnol. Bioeng.* 13, 431-447

- Rosevear, A. (1984), Immobilized biocatalysts, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 34B, 127-258
- Sans, J. (1993), Hämoglobin als Rezeptorkomponente in einem Biosensor zur Detektion von Cyanwasserstoff, Diplomarbeit Universität Karlsruhe (TH)
- Scheller, F., Schubert, F. (1989), *Biosensoren*, Birkhäuser Verlag, Basel
- Schultz, J. S., Mansouri, S., Goldstein, I. J. (1982), Affinity sensors: a new technique for developing implantable sensors for glucose and other metabolites, *Diabetes care* 5, 245-253
- Seitz, W. R. (1984), Chemical sensors based on fiber optics, *Anal. Chem.* 56, 16A
- Snodgrass, W., Peterson, R. G., Holbrook, M. L. (1981), Salicylate toxicity following therapeutic doses in young children, *Clin. Toxicol.* 18(3), 247-259
- Spectrum (1995): Fleaker[®] Hollow Fiber Concentration System, Firma SPECTRUM 1100 Rankin Road Houston Texas 77073-4716
- Tam, Y. K., Au, D. S. L., Abbott, F. S. (1979), Improved GLC flame ionisation detection assay of acetylsalicylic and salicylic acids, *J. Chromatogr.* 174, 239-244
- Taylor, R. F. (1991), Immobilized antibody- and receptor-based biosensors, in: protein immobilization: fundamentals and applications, Taylor, R. F., ed., Dekker, Inc., New York, 263-304
- Tharakan, J. P., Chau, P. C. (1986), Operation and pressure distribution of immobilized cell hollow fiber bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.* 28, 1064-1071
- Trinder, P. (1954), Rapid determination of salicylate in biological fluids, *Biochem. J.* 57, 301-303
- Turner, A. P. F. (1993), *Advances in Biosensors*, Suppl. 1. Chemical sensors for in vivo monitoring, JAI Press Ltd, London
- Wandrey, R., Wichman, R., Jandel, A.-S. (1982), Multi enzyme systems in membrane reactors, *Enzyme Engineering* 6, Weetall, H. H., ed., New York, Academic Press, 61-68
- Wang, L. H., Tu, S. C., Lusk, R. C. (1984), Apoenzyme of pseudomonas cepacia Salicylate Hydroxylase, *J. Biol. Chem.* 259, 1136-1142
- Wheatley, M. A., Phillips, C. R. (1983), Temperature effects during polymerization of polyacrylamide gels used for bacterial cell immobilization, *Biotechnol. Bioeng.* 25, 623-626
- White-Stevens, R. H., Kamin, H. (1972a), Studies of a Flavoprotein, Salicylate Hydroxylase, *J. Biol. Chem.* 247, 2358-2370
- White-Stevens, R. H., Kamin H. (1972b),. Studies of a Flavoprotein, Salicylate Hydroxylase, *J. Biol. Chem.* 247, 2371-2381
- Wolfbeis, O. S., Offenbacher, H., Kroneis, H., Marsoner, H. (1984), A fast responding fluorescence sensor for oxygen, *Mikrochimica Acta*, 153-158
- Yeung, K. K., Owen, A. J., Dain, J. A. (1979), Effect of immobilization on stability and properties of N-Acetyl- β -D-Hexosaminidase from Turbo cornutus, *Carbohydrate Research* 75, 295-304
- Yip, L., Dart, R. C., Gabow, P. A. (1994), Concepts and controversies in salicylate toxicity, *Am. J. Emerg. Med.* 12, 351-364
- You, K. (1985), Polarographic quantification of salicylate in serum by Salicylate Hydroxylase, *Clinica Chimica Acta* 149, 281-284

- You, K. S., Bittikofer, J. A. (1984), Quantification of salicylate in serum by use of Salicylate Hydroxylase, *Clin. Chem.* 30, 1549-1551
- Zhu, D. G., Petty, M. C., Harris, M. (1990), An optical sensor for nitrogen dioxide based on a copper phthalocyanine Langmuir-Blodgett film, *Sensors and Actuators B*, 2, 265-269

8. Anhang

8.1 Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Alle Grundchemikalien, die nicht in der nachstehenden Liste aufgeführt sind, sowie organische Lösungsmittel (p.A.-Qualität) wurden von Sigma, Deisenhofen bezogen.

Eppendorf, Hamburg:

Pipetten und Zubehör

Merck, Darmstadt:

Phosphatpuffer (pH = 6,88); Titrisol Pufferlösung (pH = 7,00)

Amicon, Lexington Massachusetts:

Microcon-Gefäße (30 000) zur Enzymaufkonzentrierung

Wacker, München:

Silikonkautschuk (Wacker RTV-2 E 604 A)

Beckman, Fullerton, CA:

Ultimate[®] Bilirubin Kalibrator C20

GDS Diagnostics, Elkhart, IN:

Test-Kit: GDS Enzymatic Salicylate Reagent

Serva, Heidelberg:

BSA Albumine bovine Fraktion V, receptorgrade; Dialyseschläuche

Blutproben: Frisches Blut wurde dem Autor dieser Arbeit entnommen,

weitere Blutproben wurden vom Uniklinikum Freiburg bezogen

8.2 Meßgeräte und Ausstattung

Optische Bank-Bauteile, Spindler&Hoyer

Anregungslichtquelle Diaprojektorlampe 12 V, 50 W Xenophot HCX

LED blau: New Super Bright Blue LED, L200CWB14, LEDTronics Inc., Torrance, CA, USA

Lichtleiter, Oriel, BTO, Laser Components

Optische Plastikfaser, PFU-CD 501, Laser Components

Diodenarray-Spektrometer X-DAP, Polytec

Mikrospektralphotometer MMS1, Zeiss

Fluorimeter, Shimadzu RF-5001 PC

Küvetten: HELLMA Präzisions-Küvetten aus Quarzglas SUPRASIL (10 mm * 3mm)

Vortex Genie 2, Bender&Hobein

Pumpe: MS REGLO, Ismatec Sa

Zentrifuge, kühlbar Omnifuge 2.ORS, Heraeus Sepatech

pH-Elektrode: pH Meter 632, Metrohm

Hohlfasern: Spektra/Por[®] RC, Hollow Fiber Bundles,

MWCO:18000, Fiber ID: 200 µm, SPECTRUM

Auflichtmikroskop: M3B, Wild

Gefriertrocknungsanlage:

Lyovac GT 2 Grundanlage mit kleiner Trockenkammer, Finn Aqua

mit Druckwächter

Pumpe Vakubrand RZ 8

Kryostat Haake F3-K

8.3 Zusammensetzung von Immobilisierungsmischungen

8.3.1 Immobilisierung in Polyacrylamid-Gelen

Zusammensetzung der Polymerisierungsmischung:

28,0 μL 40 %ige Acrylamid/ N,N'-Methylenbis(acrylamid)lösung 19:1

50,8 μL Enzymlösung (Salicylathydroxylase original GDS Test-Kit bzw. für
Glucoseoxidase 100 mg mL^{-1})

1,8 μL 5 %ige frische Kaliumperoxodisulfatlösung (Starter)

1,8 μL N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (Beschleuniger)

8.3.2 Immobilisierung mit Proteinen über Quervernetzung

Präparation des Sensors:

10 μL Enzymlösung (Salicylathydroxylase original GDS Test-Kit)

+ 3 μL RSA (Rinderserumalbumin) (10 mg mL^{-1})

in Hohlfaser aufkonzentrieren

Eintauchen in 1,25 %ige wäßrige Glutaraldehydlösung

8.3.3 Immobilisierung von Enzymen durch Sol-Gel-Verfahren

Präparation nach Sol-Gel-Verfahren mit Alginatzusatz

Präparation 1

80 μL 2,5 %ige Natriumalginatlösung (mittlere Dichte)

30 μL entmineralisiertes Wasser

10 μL 0,1 M TRIS-Puffer (pH = 10)

20 μL Enzymlösung (Salicylathydroxylase original GDS Test-Kit)

20 μL Tetramethoxysilan

Präparation 2

20 μL 2,5 %ige Natriumalginatlösung (mittlere Dichte)

80 μL entmineralisiertes Wasser

50 μL Phosphatpuffer (pH = 6,88)

10 μL 0,1 M TRIS-Puffer (pH = 10)

20 μL Enzymlösung (Salicylathydroxylase original GDS Test-Kit)

20 μL Tetramethoxysilan

Immobilisierung von Salicylathydroxylase nach optimiertem Sol-Gel-Verfahren

Präparation

35 μL Tetramethoxysilan

20 μL 0,1 M TRIS-Puffer (pH = 10)

35 μL Enzymlösung (Salicylathydroxylase original GDS Test-Kit auf das 10fache
konzentriert)

8.3.4 Immobilisierung in Hohlfasern

Zusammensetzung der Enzymlösung:

29,5 μL Salicylathydroxylase (das 21,8fache der GDS Test-Kit-Konzentration in
Merck Titrisol Phosphatpufferlösung (pH = 7,00))

32,1 μL Rinderserumalbumin (10 mg in 1 mL unverdünnter Merck Titrisol Phosphat-
pufferlösung)

14,3 μL unverdünnte Merck Titrisol Phosphatpufferlösung

8 μL Glycerin (87 %)