

MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

Entwicklung eines neuen optischen Enzymsensors zum Nachweis
von Pestiziden in Obst und Gemüse auf Basis
nanoporöser Monolithe

DISSERTATION

zur Erlangung des Akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät II- Chemie und Physik
der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg

von Frau
Dipl.- Chem. Kathleen Hobritz
geboren am 17. April 1983 in Lutherstadt Eisleben

Gutachter: 1. Prof. Dr.-Ing. Thomas Hahn
2. Prof. Dr. Heiner Kaden

Disputation: 27. Februar 2014

Meinem Sohn Finn

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom September 2007 – Mai 2013 an der Naturwissenschaftlichen Fakultät II, Institut für Chemie, Bereich Technische Chemie und Makromolekulare Chemie an der Martin Luther Universität angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn

Prof. Dr. Dirk Enke

für die Überlassung des interessanten Themas, für seine umfassende fachliche Beratung, die vielen wertvollen Diskussionen und die Unterstützung bei der Auswertung der Messergebnisse.

Herrn **Prof. Dr.-Ing. Thomas Hahn** danke ich für die weitere Betreuung meiner Arbeit, nach der Berufung von Herrn Prof. Enke an die Universität Leipzig. Des Weiteren danke ich Ihm für die Möglichkeit zur Durchführung der Permeationsuntersuchungen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Bienias für die Unterstützung bei der Anfertigung der porösen Glasmembranen und für die Durchführung der Porositätsuntersuchungen.

Herrn R. Schlosser möchte ich für die Anfertigung der benötigten Extraktionskörbe und anderer Spezialteile danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Anders für die sorgfältige Fortführung der praktischen Arbeiten während meiner Schwangerschaft und Elternzeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Reinhardt bedanken, da er sich die Zeit nahm meine Arbeit zu lesen, mit mir zu diskutieren und dass er mich mit viel Humor und ein wenig Sarkasmus nach manch schlechtem Tag wieder aufbaute.

Weiterhin möchte ich meiner Familie danken, dass sie stets Zeit für meine Probleme hatte und mich nach manchem nicht so erfolgreichen Tag wieder aufbaute und mich immer in meinem Tun und Handeln bestärkte.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Problemstellung	1
2 Stand der Forschung	7
2.1 Poröse Gläser	7
2.1.1 Herstellung und Formgebung	7
2.1.2 Oberflächeneigenschaften und Möglichkeiten der Modifizierung	9
2.2 Biosensoren via Enzymhemmung	13
2.2.1 Enzymhemmung	13
2.2.2 Anfänge der enzymatischen Pestizidbestimmung	14
2.2.3 Biosensoren auf Basis von porösen Gläsern	17
2.2.4 Biosensoren auf Basis von Polymeren	19
2.2.5 Biosensoren auf Basis von Sol-Gel	25
2.2.6 Biosensoren auf Basis von Chitosan	28
2.2.7 Biosensoren auf Basis von nicht-porösen Materialien	31
2.3 Immobilisierung von pH-sensitiven Farbstoffen	35
3 Experimenteller Teil	39
3.1 Herstellung des Ausgangsglases	39
3.2 Herstellung der Glasmembranen	40
3.2.1 Thermobehandlung	40
3.2.2 Formgebung	41
3.2.3 Generierung der Porenstruktur	44
3.3 Oberflächenfunktionalisierung	45
3.3.1 Aminosilanisierung	45
3.3.2 Anbindung von Glutardialdehyd	46
3.3.3 Enzymimmobilisierung	
3.4 Charakterisierung	47
3.4.1 Charakterisierung der Eigenschaften der nativen Membranen	47
3.4.1.1 Quecksilber-Intrusion	47
3.4.1.2 Permeabilitätsuntersuchung	48
3.4.1.3 Mechanische Festigkeitsprüfung	49

3.4.1.4 Elektronenmikroskopie	50
3.4.2 Charakterisierung der Oberflächenmodifizierung	51
3.4.2.1 Bestimmung der Aminogruppendichte	51
3.4.2.2 Bestimmung der Enzymaktivität	53
3.4.2.2.1 Messungen am freien Enzym	53
3.4.2.2.2 Messung am immobilisierten Enzym	53
3.4.2.2.3 Inhibierungsmessungen am immobilisierten Enzym	54
3.4.2.2.4 Langzeitstabilitätstest der Enzym-Membran-Komplexe	54
4 Ergebnisse und Diskussion	56
4.1 Charakterisierung der Glasmembranen	56
4.1.1 Quecksilber-Intrusion	56
4.1.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	59
4.2 Oberflächenmodifizierungen mit Aminosilanen	61
4.2.1 Aminosilanisierung mit γ -Aminopropyltriethoxysilan (γ -APTS)	61
4.2.1.1 Einfluss der Temperatur	61
4.2.1.2 Einfluss der Zeit	61
4.2.1.3 Reproduzierbarkeit der Aminosilanisierung mit γ -APTS	62
4.2.1.4 Effekt einer thermischen Nachbehandlung	63
4.2.1.5 Leaching-Test an aminosilanisierten Membranen	63
4.2.2 Diskussion der Ergebnisse	64
4.2.3 Oberflächenmodifizierung mit γ -Aminopropyltrimethoxysilan (γ -APTMS)	72
4.3 Modifizierungen mit Glutardialdehyd	73
4.4 Enzymimmobilisierung	77
4.4.1 Untersuchungen mit der nativen Acetylcholinesterase	77
4.4.2 Untersuchungen mit der immobilisierten Acetylcholinesterase	81
4.4.2.1 Aktivitätsbestimmung der immobilisierten Acetylcholinesterase	81
4.4.2.1.1 Einfluss der Reinheit des Enzyms	81
4.4.2.1.2 Einfluss der Dauer der Enzymimmobilisierung	84
4.4.2.2 Inhibierungsmessungen	85
4.5 Optimierungen bezüglich des Enzym-Membran-Komplexes	88
4.5.1 Erreichen einer niedrigen Nachweisgrenze	88
4.5.2 Fehlerbetrachtung zu den erhaltenen Nachweisgrenzen sowie Einordnung in den Stand der Technik	95
4.5.3 Untersuchungen zur Lagerstabilität	98
4.5.3.1 Lagerung in Puffer und auf puffergetränktem Filterpapier	98
4.5.3.2 Lagerung auf puffergetränkten Celluloseactat-Plättchen	101
4.5.3.3 Einfluss von Lagerungstemperatur und -atmosphäre	105
4.6 Messungen mit vermindertem Reaktionsvolumen	111

4.7 Diskussion der Ergebnisse zu den Untersuchungen der Enzym-Membran-Komplexe	114
5 Aufbau und Funktionsweise des Gesamtsensors	118
5.1 Aufbau	118
5.2 Durchführung der Messung im Labor	120
5.3 Durchführung der Messung im späteren Gebrauch	122
6 Zusammenfassung	124
7 Ausblick	128
Literaturverzeichnis	I
Anhang	
I Abkürzungsverzeichnis	
II Abbildungsverzeichnis	
III Tabellenverzeichnis	
Eidesstattliche Erklärung	

1. Einleitung und Problemstellung

„Lebensmittelkontrollen mangelhaft! Die Kontrolle unserer Lebensmittel auf Pestizidrückstände ist in deutschen Landen langwierig und nicht effizient. Von Bundesland zu Bundesland wird sie anders gehandhabt: bis die Daten da sind, sind die Waren bereits verzehrt. Und längst nicht alle Pestizide werden gemessen, nur auf ca. 100 bis 150 untersuchen die meisten Landesämter. Für viele Wirkstoffe gibt es keine Analysevorschrift, oder sie werden nicht in die Untersuchung einbezogen, weil sie in Deutschland ohnehin verboten sind...“ [1].

Auf Schlagzeilen wie diese trifft man häufig in den Medien. Pestizide, auch als Pflanzenschutzmittel bezeichnet, sind chemische oder biologische Substanzen, welche zum Schutz von Nutzpflanzen gegen Schädlinge eingesetzt werden. Als Schädlinge gelten neben den Insekten auch Pilze und Unkräuter. Je nach Einsatzgebiet werden die Pflanzenschutzmittel in Herbizide (gegen Unkräuter), Fungizide (gegen Pilze) und Insektizide (gegen Insekten) unterteilt.

Zu den Pilzerkrankungen zählen z. B. die bei Tomaten häufig auftretende Braunfäule und der bekannte Echte Mehltau. Eine Pilzerkrankung wird durch überwinterte Sporen bzw. befallene Pflanzen übertragen. Eine hohe Luftfeuchtigkeit und Wärme fördern die Ausbreitung einer solchen. Die natürlichen Bedingungen können im Freiland nicht beeinflusst werden, somit kommt es bei Befall zum Einsatz von kurativen Fungiziden.

Herbizide werden meist präventiv verwendet, d. h. sie wirken vorbeugend gegen das vermehrte Wachstum von Unkräutern.

Die häufigste Ursache für Pflanzenschädigungen stellen die Insekten dar. Sie bilden den artenreichsten Teil des gesamten Tierreichs, aber nur ein geringer Teil wirkt im Lebensraum des Menschen. Bestimmte Eigenschaften einiger Insektenarten, wie das Übertragen von Krankheiten (Malaria durch die weibliche Anophelesmücke) oder übermäßig starkes Vermehren unter günstigen Bedingungen (Heuschrecken, Maden, Raupen), führen zu Epidemien und Ernteaussfällen. Aufgrund des vielseitigen Entwicklungszyklus der Insekten, bei dem jedes einzelne Stadium (Ei, Larve, Puppe, usw.) und die damit verbundene Lebensweise sich zum Teil stark voneinander unterscheiden, bestehen verschiedene Möglichkeiten zur Bekämpfung. So wurden präventive Insektizide entwickelt, also diejenigen, welche vorsorglich eingesetzt werden. Diese halten den Schädling fern bzw. verhindern eine starke Vermehrung. Im Gegensatz dazu werden kurative Insektizide

dann eingesetzt, wenn der Schädlingsbefall schon stattgefunden hat. Die Aufnahme der insektiziden Wirkstoffe kann auf verschiedene Weisen erfolgen:

- in Form von Fressködern: Resorption über den Magen-Darm-Trakt
- als Kontaktgift: Aufnahme über die Haut

Weiterhin gibt es Insektizide, die speziell gegen Eier bzw. Larven wirken [2].

Die Problematik des Schädlingsbefalls von landwirtschaftlichen Produkten (Getreide, Obst, Gemüse) war vom Beginn des Ackerbaus an vorhanden. Die damaligen Völker beteten zu den Göttern und baten diese um Hilfe. Die ersten Überlieferungen zur Verwendung von chemischen und biologischen Substanzen zur Schädlingsbekämpfung stammen aus den Jahren um 900 v.Chr. Damals wurde mit Schwefel geräuchert bzw. mit bestimmten Pflanzenextrakten getränkt, um Schädlinge fernzuhalten [2].

In den folgenden Jahrhunderten entdeckte man die insektizide Wirkung von Metallen und Metallsalzen, wie Kupfer(II)-sulfat. Dieses wurde beispielsweise zur Bekämpfung von Ackersenf eingesetzt und findet auch heute noch Anwendung im Pflanzenschutz [2]. Zu Beginn des 19. Jahrhunderts verschob sich der Forschungsschwerpunkt zu synthetischen Pflanzenschutzmitteln. 1882 meldete Bayer das erste synthetische Pflanzenschutzmittel Antinonin zum Patent an [2].

Ab 1950 nahm die Entwicklung von Pflanzenschutzmitteln rasant zu. Auch heute noch sind das Interesse und der Markt für Pflanzenschutzmittel immens.

Doch die Wirkung der Pflanzenschutzmittel beschränkt sich nicht nur auf das Abtöten bzw. auf das Verhindern einer starken Vermehrung von Schädlingen, sondern beeinflussen das Ökosystem und somit auch den Menschen negativ. Erfolgt eine Aufnahme von Pflanzenschutzmitteln über die Nahrung, so sind es meist nur geringe Mengen. Diese führen zwar zu keiner akuten Vergiftung, aber es kann direkt nach dem Verzehr zu allergischen Reaktionen, wie Hautausschlag, Juckreiz usw., kommen.

Werden jedoch geringe Mengen über einen längeren Zeitraum aufgenommen, so kann dies zu Veränderungen des Erbgutes und damit auch zur Förderung der Entstehung bestimmter Krebsarten, wie Leukämie und Lymphdrüsenkrebs, führen [3]. Neben dem Einfluss auf die genetischen Informationen wirken Pestizide direkt auf das zentrale Nervensystem [4]. Die Informations- bzw. Reizweiterleitung von Nerv zu Nerv bzw. Nerv zu motorischer Endplatte (Muskelkontraktion) verläuft über chemische Botenstoffe, den Neurotransmittern, wie z.B. Acetylcholin. Diese werden in den Nervenzellen gebildet, in Vesikeln vorgehalten und dienen zur chemischen Übertragung eines elektrischen Impulses von einem Nerv zum anderen. Erfolgt ein elektrischer Impuls, so werden die mit Acetylcholin gefüllten Vesikel an die präsynaptische Membran transportiert. Dort kommt es zur Verschmelzung der Vesikel mit der Membran. Dabei öffnen sich die Vesikel und das Acetylcholin wird in den synaptischen Spalt abgegeben. Trifft es dann auf die Rezeptoren an der postsynaptischen Membran, erfolgt eine Spaltöffnung durch lokale Depolarisation der Membran. Die normalerweise für Natrium-Ionen undurchlässige Membran wird durch die Spaltöffnung kurzzeitig durchlässig. Das führt zu einem Aktionspotential durch die plötzliche Konzentrationserhöhung an Natrium-Ionen. Nach dem Eintreffen am Rezeptor wird das Acetylcholin sofort durch Acetylcholinesterase hydrolysiert, um

die Rezeptoren für eine erneute Anregung freizuschalten [5]. Diese Abläufe sind in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt.

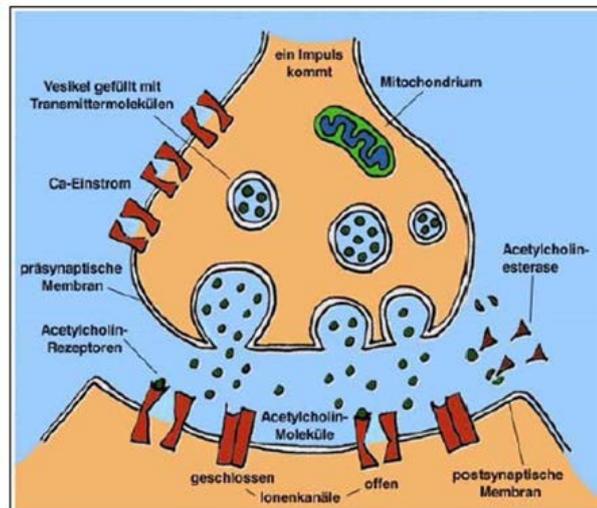


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Impulsweiterleitung [6]

Wird die Acetylcholinesterase durch einen Inhibitor, wie die als Pflanzenschutzmittel verwendeten Organophosphate, gehemmt, so kann das Acetylcholin nicht abgebaut werden. Daraus resultiert eine Daueranregung der postsynaptischen Membranen und es kommt zu Störungen sämtlicher Funktionen des Organs, was wiederum zu Krämpfen mit Übelkeit und Erbrechen führen kann. Im schlimmsten Fall können die Funktionen der Organe ganz außer Kraft gesetzt werden [7].

Heutzutage beziehen sich die Forschungen auf das Reduzieren der Nebenwirkungen der Pflanzenschutzmittel, d.h. sie sollen die Schädlinge abtöten bzw. fernhalten, aber den nützlichen Insekten, wie Hummeln und Bienen nicht schaden. Des Weiteren sollten sie gut abbaubar sein, um eine Anreicherung im Boden und damit den Übergang in die Nahrungskette zu verhindern [8].

Doch das Engagement der großen Konzerne bezüglich umweltverträglicherer Pflanzenschutzmittel allein reicht nicht aus. Denn gerade bei Importen aus Entwicklungsländern kommt es häufig vor, dass die Pestizidbelastung sehr hoch ist. Zum Teil befinden sich, aufgrund ihrer Giftigkeit in Europa verbotene Pestizide in den Lebensmitteln. Deshalb kam es zu einer gesetzlichen Regelung über die zugelassene Höchstmenge an in Lebensmitteln enthaltenen Pestizidrückständen. Diese Grenzwerte sind in der EU-Pestizidverordnung verankert, welche seit dem 1. September 2008 in Kraft ist [9]. Durch regelmäßige Kontrollen von staatlich geprüften Laboratorien soll die Einhaltung der Grenzwerte gewährleistet werden. Derzeit erfolgt die Bestimmung von Pestizidrückständen mit Hilfe von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Massenspektrometrie (MS) und Gaschromatographie (GC). Die Analysemethoden wurden von der Senatskommission für Pflanzenschutz-, Pflanzenbehandlungs- und Vorratsschutzmittel [10] ausgearbeitet und gelten in zertifizierten Laboratorien als Grundlage für die Bestimmung von Pestizidgehalten. Um den Rückstand von Pflanzenschutzmitteln in Lebensmitteln bestimmen zu können, ist es notwendig, die Probe aufzuarbeiten. Das Pflan-

zenschutzmittel wird mit definierten Mengen an organischen Lösungsmitteln, welche zum Teil stark toxisch sind, aus der Probe extrahiert. Dieses pestizidhaltige Extrakt wird über mehrere Schritte mit Hilfe von weiteren Lösungsmitteln und Säulen gereinigt. Das gereinigte Extrakt wird mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bis auf wenige Milliliter eingeeengt und anschließend in einer definierten Menge an organischem Lösungsmittel aufgenommen. Die aufbereitete Probe kann mit Hilfe der HPLC, MS bzw. GC analysiert werden. Trotz moderner Analysengeräte, welche automatisiert mehrere Proben gleichzeitig untersuchen und mit Hilfe der Software die Pestizidgehalte ausrechnen, bleibt die Probenaufbereitung erhalten. Diese verursacht aufgrund der zum Teil toxischen Lösungsmittel und der Personalausgaben einen Großteil der Kosten.

Anhand einer Broschüre eines Schweizer Analyselaboratoriums [11] können die Kosten für bestimmte Messungen mit Zahlen belegt werden. Die Angaben sind in Schweizer Franken und wurden für die Kostenaufstellung in Euro umgerechnet. Für ein Pestizidscreening mittels Gaschromatografie und Flüssigkeitschromatografie fallen Kosten je 100 g Probe in Höhe von ca. 310 € an. Für die Bestimmung einzelner Pestizide werden je 20 g Probe mindestens 120 € berechnet.

Aufgrund der langen Analysendauer und den damit verbundenen hohen Aufwendungen durch Personal-, Geräte- und Materialkosten ist es von großer Bedeutung, einen einfach handhabbaren, kostengünstigen Pestizidsensor zu entwickeln. Mit diesem soll den Lebensmittelkontrolleuren ermöglicht werden, direkt vor Ort, z. B. im Hafen, die Ware auf Pestizidrückstände durch ein grobes Screening auf den Gesamtrückstand an Pestizid zu untersuchen. Bei Überschreitung der gesetzlichen Grenzwerte kann die Ware konfisziert und einer ausführlichen Analyse unterzogen werden. Liegt die Konzentration im Normbereich, kann die Ware in den Handel überführt werden.

Mehrere Arbeitsgruppen haben sich mit der Problematik der Entwicklung eines Pestizidsensors auseinandergesetzt und verschiedene Varianten von Sensoren entwickelt, welche zum Teil auf sehr unterschiedlichen Messverfahren basieren [12-34]. Jedes Verfahren weist Vor- und Nachteile auf. Die Nachweisgrenzen schwanken in einem sehr großen Bereich. Bei einigen Verfahren liegt die Detektionsgrenze nahe dem maximalen gesetzlichen Grenzwert.

Eine Möglichkeit stellt die Detektion von Pflanzenschutzmitteln mit Hilfe von Enzymen, z. B. der Acetylcholinesterase dar. Die Acetylcholinesterase kommt unter anderem im zentralen Nervensystem des Menschen vor. Für Forschungszwecke werden meist die Cholinesterasen von Insekten bzw. anderen Kleintieren verwendet.

Acetylcholinesterase hydrolysiert Acetylcholin zu Essigsäure und Cholin. Aufgrund der Deprotonierung der entstehenden Essigsäure in wässrigen Lösungen kommt es zu einer pH-Wertsenkung. Diese kann mit Hilfe von Indikatoren bzw. einem pH-Meter verfolgt werden. Erfolgt eine Inhibierung des Enzyms, so bleibt die pH-Wertänderung aus. Diese Inhibierungsreaktion kann genutzt werden, um Pflanzenschutzmittel, wie z. B. Carbamate und Organophosphate, nachzuweisen.

Um einen effektiven Sensor auf Basis von Enzymen herstellen zu können ist es notwendig, diese an eine Matrix zu immobilisieren. Als Matrizen können natürliche oder synthetische Polymere dienen [12-16]. Weitere Möglichkeiten wären der Einschluss des Enzyms in Lipide [21] oder eine Immobilisierung an poröse Gläser [17-20]. Die porösen Gläser werden seit einigen Jahrzehnten schon vielseitig in der Festphasenbiochemie und in der Chromatographie eingesetzt. In der Festphasenbiochemie dienen sie als Matrix für immobilisierte Enzyme, welche für lebensmitteltechnisch relevante, biochemische Reaktionen von großer Bedeutung sind. Ein Beispiel ist die Gewinnung von Glucose mit Hilfe der Glucoamylase [35-38].

Poröse Gläser zeigen viele vorteilhafte Eigenschaften, welche natürliche und synthetische Polymerträger nicht aufweisen. Sie lassen sich reproduzierbar mit definierter Textur, d.h. großen Oberflächen, Porengrößen im Bereich von 1-1000 nm sowie mit enger Porengrößenverteilung herstellen. Die reaktive, hydrophile Oberfläche kann funktionalisiert werden und ist regenerierbar. Des Weiteren sind die porösen Gläser resistent gegenüber einem mikrobiellen Angriff und stabil in organischen Lösungsmitteln. Außerdem sind sie preisgünstig im großen Maßstab herstellbar [39].

Auf den Erfahrungen der Immobilisierung aufbauend, kann Acetylcholinesterase an einer porösen Glasmembran immobilisiert und als Teil eines Sensors genutzt werden. Für die Immobilisierung muss die Oberfläche der Membran zunächst funktionalisiert werden. Hierbei werden die Oberflächensilanolgruppen mit γ -Aminopropyltriethoxysilan umgesetzt, so dass an der Oberfläche reaktive Aminogruppen gebunden sind. Um ein Enzym anzubinden zu können, wird noch ein sogenannter Spacer bzw. "Linker" benötigt. Dafür werden bifunktionelle Reagenzien wie Dialdehyde verwendet. Glutardialdehyd ist ein häufig genutztes Reagenz [40-43].

Um eine gleichzeitige Verfolgung der pH-Wertänderung zu ermöglichen, ist aufgrund der Verwendung von immobilisierter Acetylcholinesterase ein immobilisierter pH-sensitiver Farbstoff denkbar. Auch hierfür wären die porösen Gläser als Matrix gut geeignet. Da die Farbstoffe modifiziert werden können ist es möglich, die reaktive Gruppe des Farbstoffes und die der Oberfläche der porösen Glasmembran aufeinander abzustimmen [44-48].

Für die Entwicklung des Pestizidsensors auf der Basis poröser Gläser war es erforderlich, folgende Teilproblemstellungen zu bearbeiten.

1. - Optimierung der Textur und Struktureigenschaften der porösen Glasmembranen auf die geforderte Anwendung, der Immobilisierung des Enzyms Acetylcholinesterase und des pH-sensitiven Farbstoffes
- Anpassung der geometrischen Form an die spätere Sensorkonstruktion

2. - Entwicklung anwendungstechnisch optimaler Enzym-Membran-Komplexe einschließlich der Untersuchungen zur erreichbaren Aminogruppendichte durch zwei verschiedene Modifizierungssubstanzen:
 - i. γ -Aminopropyltriethoxysilan, dem am häufigsten verwendeten Reagenz zur Aminosilanisierung
 - ii. γ -Aminopropyltrimethoxysilan.
- Ermitteln der optimalen Arbeitsparameter (pH-Wert, Temperatur) des Enzyms
- Bestimmung der unteren Nachweisgrenze für das Modellpestizid Carbofuran
- Untersuchung zur Langzeit- und Leachingstabilität bei unterschiedlichen Lagerbedingungen
3. - Immobilisierung verschiedener pH-sensitiver Farbstoffe und Bestimmung des geeigneten Farbstoffes nach definierten Auswahlkriterien
- Bestimmung der optimalen Immobilisierungs- und Lagerungsparameter
4. - Integration der enzym- bzw. farbstoffbeladenen Membranen in ein Gesamtkonzept des Pestizidsensors

2 Stand der Forschung

2.1 Poröse Gläser

2.1.1 Herstellung und Formgebung

Als poröse Gläser werden die Extraktionsprodukte von phasentrennten Alkaliborosilikatgläsern bezeichnet, welche mehr als 96% SiO_2 enthalten. Aufgrund der geschichtlichen Entwicklung werden poröse Gläser in der Literatur meist als poröses VYCOR-Glas bzw. Controlled Pore Glass (CPG) bezeichnet. Der VYCOR-Glas Prozess läuft nach folgendem Schema ab. Als erstes wird das Grundglas erschmolzen, dessen Zusammensetzung im Bereich 55–75 Ma-% SiO_2 , 20–35 Ma-% B_2O_3 und 5–10 Ma-% Na_2O liegt [49]. Danach erfolgt die Formgebung durch Gießen, Ziehen oder Pressen. Der dritte Schritt ist eine Temperaturbehandlung im Bereich zwischen der unteren und oberen kritischen Temperatur. Anschließend erfolgt die Extraktion mit Waschung und Trocknung, welche für die Porenbildung von Wichtigkeit ist. Im VYCOR-Prozess folgt weiterhin die Sinterung, welche zu einem Kieselglas mit quarzglasähnlichen Eigenschaften führt [49].

1936 wurde von NORDBERG und HOOD [50] entdeckt, dass sich Alkaliborosilikatgläser einer definierten Zusammensetzung, im Bereich der Borsäureanomalie, durch thermische Behandlung im Bereich von 480°C , der unteren kritischen Temperatur, und 760°C , der oberen kritischen Temperatur, in eine lösliche und eine unlösliche Phase separieren. Dabei entsteht eine zusammenhängende Durchdringungsstruktur. Die lösliche Phase ist eine natriumreiche Boratphase, welche durch Extraktion mit Mineralsäuren, wie Salzsäure, herausgelöst werden kann. Es verbleibt die unlösliche Phase, das SiO_2 -Gerüst, zurück. Je weiter sich die Temperatur der Thermobehandlung der oberen Entmischungsgrenze nähert, desto höher ist die Entmischung, die durch das Diffusionswachstum bewirkt wird. Dieser Prozess ist nicht nur temperatur-, sondern auch zeitabhängig. Die höhere Entmischung resultiert letztlich in einer Porenvergrößerung. Weiterhin kommt es zu einer zunehmenden Löslichkeit des Gerüst- SiO_2 in der natriumreichen Boratphase. Das führt bei der anschließenden Extraktion zu einer Koagulation des gelösten SiO_2 , welches sich dann als feindisperses SiO_2 in den Poren niederschlägt und durch eine alkalische Nachbehandlung herausgelöst werden kann.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Temperatur und Zeit, Zusammensetzung und die Extraktionsbedingungen wichtige Parameter zur Steuerung der Textur und Struktur der porösen Gläser sind. Die Zusammensetzung bestimmt das Porenvolumen. Die Temperatur der Phasentrennung, deren Dauer und die Extraktionsbedingungen be-

stimmen Form und Größe der Poren [51]. Durch die genauen Erkenntnisse der Wirkung dieser Parameter können poröse Gläser reproduzierbar und mit enger Porenverteilung hergestellt werden. In den letzten Jahren gab es Untersuchungen zur Porenausrichtung [52] und zur Entwicklung von Sintergläsern mit hierarchischer Porenstruktur [53,54]. Ein weiterer Vorteil des VYCOR-Glases ist die Möglichkeit der Herstellung von Formkörpern, wie Rohren, Platten, Stäben oder Granulat.

Poröse Gläser gibt es in verschiedenen Formen, als Fasern, als Kapillaren, flache und ultradünne Membranen (plattenförmig). Poröse Glasfasern werden durch das Düsenziehverfahren [55] hergestellt. Dabei wird die Glasschmelze durch Düsen am Boden eines beheizten Behälters gezogen. Die Bohrungsgröße und die Abziehggeschwindigkeit bestimmen die Faserdicke.

Die porösen Glaskapillaren können nach dem Vertikalverfahren hergestellt werden. Bei diesem Verfahren wird die Glaskapillare aus der Glasschmelze nach oben durch einen rotierenden Trog gezogen, wobei Luft eingeblasen wird. Durch dieses Einblasen wird die Kapillarform erreicht [55].

Die porösen Membranen in Plattenform wurden erstmals von RASCHKE ¹ hergestellt. Zunächst wurden aus dem Ausgangsglasblock Platten einer Dicke von 5-8 mm mittels Diamantsäge hergestellt [56]. Anschließend wurden diese beidseitig auf eine Dicke von 1-1,5 mm geschliffen. Über besondere Trenntechniken lassen sich mit Hilfe von Diamantkreis- und Diamantbandsägen sehr dünne planparallele Formkörper mit beliebiger Dicke herstellen [57].

Eine andere Möglichkeit der Formkörperpräparation ist das Laserschneiden. Es ist ein thermisches Trennverfahren für plattenförmige Materialien und 3-dimensionale Körper. Diese Art der Formgebung ermöglicht es, auch sehr dünne Materialien zu bearbeiten und sehr feine Formen zu erhalten. Mit einem geeigneten Laser, meist Festkörperlaser, lassen sich auch Nichtmetalle, wie z.B. Glas, Kunststoff, Keramiken und Folien, verarbeiten [58].

Der Vorgang des Laserschneidens besteht aus zwei parallel ablaufenden Teilvorgängen. Zum einen absorbiert der Laserstrahl an der Schneidfront die für den Schneidevorgang notwendige Energie. Zum anderen stellt die konzentrisch zum Laser ausgerichtete Schneiddüse das Prozessgas zur Verfügung. Dieses schützt die Fokussieroptik vor Dämpfen und Spritzern und treibt abgetragenes Material aus der Schneidfuge.

Je nach Aggregatzustand des angetriebenen Werkstoffs wird in

- Laserstrahlschmelzschnitten,
- Laserstrahlsublimierschnitten,
- Laserstrahlbrennschnitten unterteilt.

Beim Laserstrahlschmelzschnitten verflüssigt sich der Werkstoff an der Schmelzkante und wird mit Hilfe eines inerten Gases abgetragen. Wohingegen beim Laserstrahlsublimierschnitten der Feststoff in den gasförmigen Aggregatzustand übergeht und vom Prozessgas ausgeblasen wird. Dies verhindert eine Kondensation in der Schnittfuge.

¹A.Raschke, *Diplomarbeit*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1990.

Als Laserstrahlbrennschneiden wird der Schneidvorgang bezeichnet, bei dem der Werkstoff auf Entzündungstemperatur erhitzt und dann mit Hilfe eines Sauerstoffstroms verbrannt wird. In der Abbildung 2.1 ist das Prinzip des Laserschneidens schematisch dargestellt.

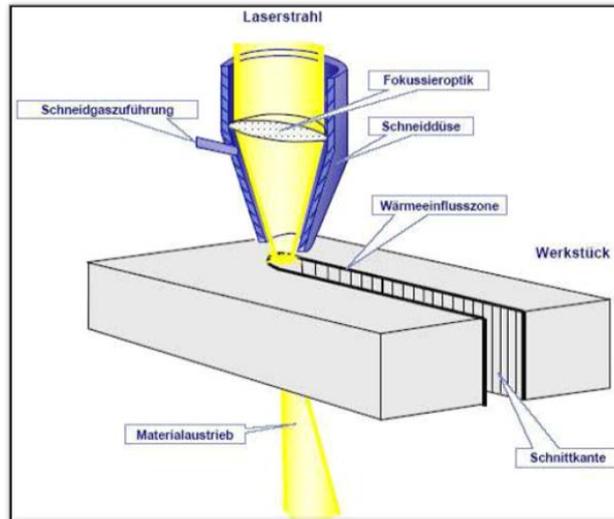


Abb. 2.1 Schematische Darstellung des Laserschneidens [59]

Für die Konfektionierung der porösen Glasmembranen wurde das Verfahren des Laserschmelzscheidens eingesetzt. Dabei wurde für die 0,2 mm dicken Membranen ein NdY-Laser und bei den 1 mm starken Membranen ein leistungsstärkerer UV-Laser verwendet. Während des Schneidvorgangs kam es zum Verschmelzen des Randbereiches und somit zum Verschluss der Poren nach außen.

Dieses Verfahren wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals getestet. Die Membranen aus dieser Formgebung wurden für spätere Untersuchungen verwendet [Kapitel 3.2.3ff].

2.1.2 Oberflächeneigenschaften und Möglichkeiten der Modifizierung

Charakteristisch für die Oberfläche der porösen Gläser sind die durch Auslaugung erhaltenen SiOH- und BOH-Gruppen. Es existieren verschiedene Spezies an der Oberfläche (Abb. 2.2):

- isolierte SiOH und BOH-Gruppen
- geminale Si(OH)₂-Gruppen
- H-gebundene SiOH-Gruppen
- Siloxane Si-O-Si, B-O-B und B-O-Si-Gruppen [49]

Bei Raumtemperatur ist die Oberfläche vollständig hydrolysiert und mit physisorbiertem Wasser bedeckt. Sie besteht hauptsächlich aus isolierten, H-gebundenen und geminalen SiOH-Gruppen. Aufgrund der geringen Restkonzentration an Bor, sind nur sehr geringen Mengen an B-OH-Spezies an der Oberfläche vorhanden. Bei einer Temperaturbehandlung von 200-600°C kommt es zur Dehydroxylierung der SiOH-Gruppen. Das dabei entstehende Wasser führt zur Hydrolyse der B₂O₃-Spezies und deren Migration

durch Temperaturerhöhung an die Oberfläche. Somit erhöht sich die Anzahl an BOH-Gruppen an der Oberfläche bei einer Temperaturbehandlung.

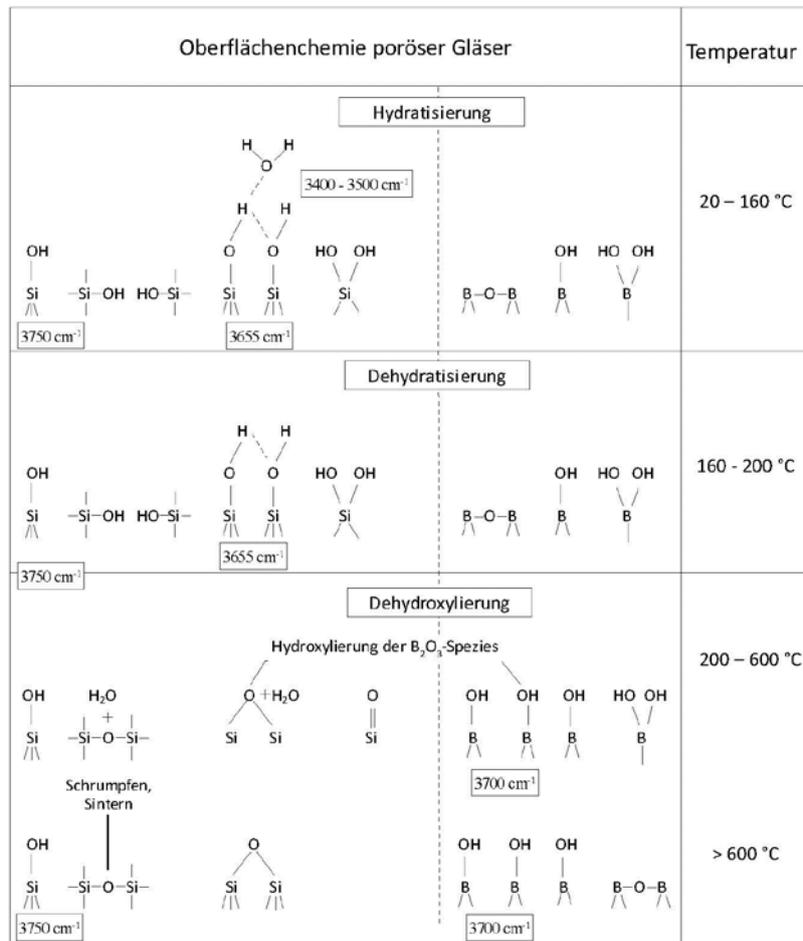


Abb. 2.2 Schematische Darstellung der Oberflächenhydroxylgruppen poröser Gläser nach [60]

Wie in Abbildung 2.2 dargestellt, stehen die Oberflächenhydroxylgruppen für chemische Reaktionen zur Verfügung und ermöglichen aufgrund ihrer hohen Reaktivität vielfältige Oberflächenmodifizierungen. Je nach Anwendung ist es notwendig, z.B. die Lewis-aciden-Zentren (B_2O_3 , BOH-Gruppen) zu entfernen, da diese zu einer unspezifischen Adsorption führen. Außerdem besteht die Möglichkeit, die Oberfläche der porösen Gläser zu hydrophobieren. Um den Anforderungen gerecht zu werden, stehen unterschiedlichste Modifizierungen mit verschiedenen organischen und anorganischen Verbindungen zur Verfügung (Abb.2.3)

Für die anorganische Modifizierung gibt es z.B. folgende Möglichkeiten:

- der Ionenaustausch
- die Reaktion der Silanolgruppen mit Metall- und Fluorverbindungen
- Immobilisierung von Metallkomplexen
- Dehydroxylierung durch Chlorierung oder Fluorierung [49].

Die organischen Modifizierungsmöglichkeiten sind z.B. folgende:

- die Umsetzung der Silanolgruppen mit Alkyl- bzw. Arylgruppen,

- die Umsetzung der Hydroxylgruppen mit Organosilanen und mit Grignardverbindungen. z.B. Hydrophobierung mit Hexamethyldisilazan

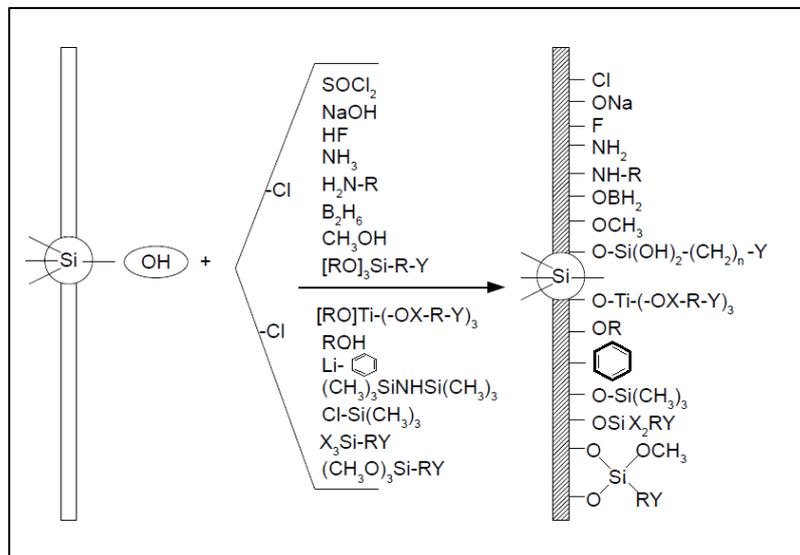
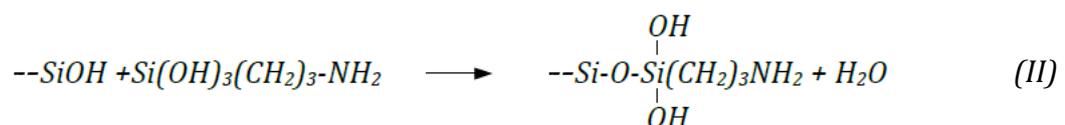


Abb. 2.3 Möglichkeiten der chemischen Oberflächenmodifizierung poröser Gläser nach ²

Eine der wichtigsten Oberflächenmodifizierungen ist die Aminosilanisierung, z.B. mit γ -Aminopropyltriethoxysilan (γ -APTS). Die aminofunktionalisierten Alkoxyasilane weisen eine oder mehrere Aminogruppen auf. Diese sind für das spezifische, chemische Reaktionsverhalten und die hohe Reaktivität der Aminosilane verantwortlich. Die elektronenreiche Aminogruppe kann über Wasserstoffbrückenbindungen mit Wasserstoffdonatoren, wie Hydroxyl- oder weiteren Aminogruppen, Wechselwirkungen eingehen. Aufgrund ihres basischen Charakters kann die Aminogruppe leicht protoniert werden. Wird ein Aminosilan zu einem Kieselgel bzw. zu porösem Glas gegeben, erfolgt eine schnelle Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Oberflächenhydroxylgruppe und der Aminogruppe. In wässriger Lösung kommt es vor einer Bindung erst zu einer Hydrolyse der Alkoxygruppe des Aminosilans, wie im Fall von γ -Aminopropyltriethoxysilan. Diese Reaktion ist in Gleichung (I) dargestellt.



Der Hydrolyse (Gl. I) folgt die Kondensation (Gl. II) zwischen Oberflächensilanolgruppen und der Si-OH Gruppe des hydrolysierten Aminosilans [60].



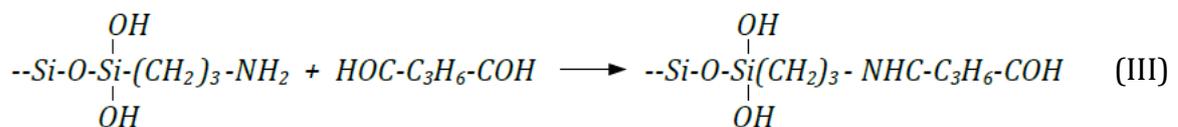
² D. Enke: Vorlesungsskript poröse Materialien, Technische Chemie Halle, 2005.

Es bestehen mehrere Möglichkeiten zur Durchführung der Aminosilanisierung. Zum einen kann sie in organischen Lösungsmitteln und zum anderen in Wasser durchgeführt werden [61]. JANOWSKI und HEYER [61] und weitere [62-66] beschäftigten sich intensiv mit der Aminosilanisierung und der Charakterisierung der entstandenen Oberflächen.

Dennoch ist die Stöchiometrie und Struktur der modifizierten Oberflächen bis heute nicht völlig geklärt.

So zum Beispiel sind nicht alle analytisch erfassbaren Aminogruppen für eine Weitermodifizierung verfügbar. Die Ursachen dafür sind sterische Hinderungen und entstandene Multischichten. Die bei der Aminosilanisierung entstehende Oberflächenstruktur hängt von den Reaktionsbedingungen ab. JANOWSKI *et al.* [63,66] berichteten, dass eine Aminosilanisierung im wässrigen Medium zu einer Monoschicht und einer hydrolytisch stabilen Oberfläche führt. Wohingegen die Durchführung in organischen Lösungsmitteln die Ausbildung einer Multischicht bewirkt.

Die Aminogruppen, welche nach der Modifizierung an der Oberfläche des porösen Glases vorhanden sind, können chemisch beispielsweise zu Diazoniumsalzen, Thiocyanaten und Hydrazinen umgesetzt werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit der Immobilisierung von Enzymen. Dazu ist es notwendig einen Linker bzw. Spacer wie Glutardialdehyd anzubinden (Gleichung III) [40-44].



Die gute Eignung des Glutardialdehyds ist auf seine hohe Reaktivität, die kommerzielle Verfügbarkeit und die niedrigen Kosten zurückzuführen. Bei pH= 7 reagiert es sehr schnell mit den Aminogruppen und bildet dabei thermisch und chemisch stabile Verbindungen.

Die mit Glutardialdehyd modifizierten Oberflächen können zur Immobilisierung von Enzymen eingesetzt werden, wie in Abbildung 2.4 dargestellt. Die Reaktionsbedingungen müssen dabei den physiologischen Bedingungen, wie Temperatur, pH-Wert und Puffersystem sehr ähnlich sein.

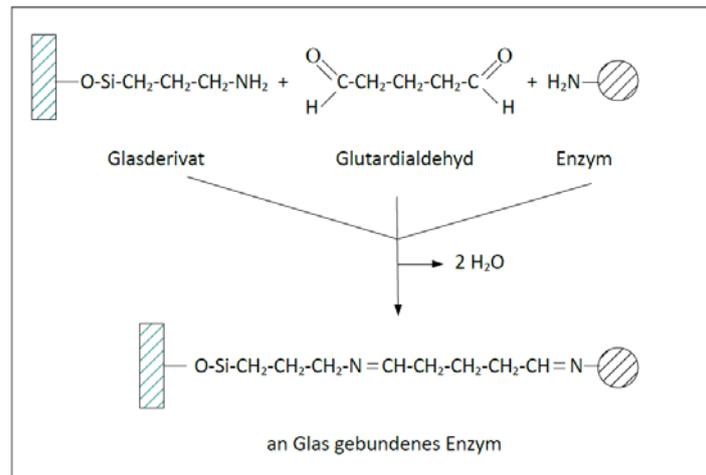


Abb. 2.4 Umsetzung der aminosilanisierten porösen Glasmembran mit Glutardialdehyd und Enzym nach [40]

2.2 Biosensoren via Enzymhemmung

2.2.1 Enzymhemmung

Inhibitoren sind Substanzen, welche die Reaktivität eines Enzyms so beeinflussen, dass die Reaktionen verlangsamt, gehemmt oder verhindert werden. Sie werden in reversible und irreversible Inhibitoren unterteilt. Bei den reversiblen Inhibitoren gibt es weitere Unterkategorien:

- kompetitive Inhibitoren
- nicht-kompetitive Inhibitoren
- unkompetitive Inhibitoren (z.B.: Substrat) [67]

In der Abbildung 2.5 ist die Inhibierung eines Enzyms schematisch dargestellt.

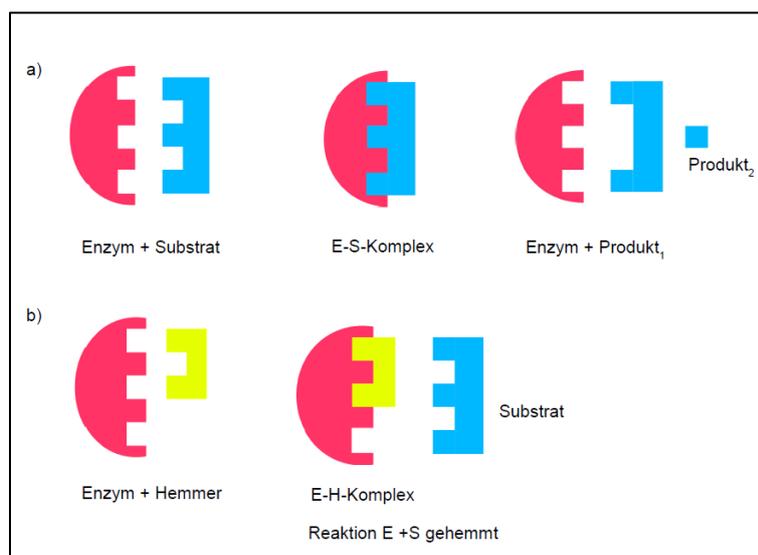


Abb. 2.5 schematische Darstellung der Enzymhemmung nach [67]

- a) enzymkatalysierte Reaktion: Das Enzym passt zum Substrat wie der Schlüssel zum Schloss.
 E-S = Enzym-Substrat. Das Enzym bleibt unverändert; es entstehen hier zwei Produkte.
- b) Hemmung. Ein dem spezifischen Substrat ähnlicher Stoff blockiert die Enzym-Substrat-Reaktion

Bei der kompetitiven Hemmung ist der Inhibitor dem Substrat strukturell sehr ähnlich. Daher konkurrieren beide um die Anbindung an das aktive Zentrum. Kommt es zur Anbindung des Inhibitors, ist ein Ablösen durch eine Erhöhung der Substratkonzentration möglich. Doch sollte diese einen für jedes Enzym eigenen Grenzwert nicht überschreiten, da dies zu einer unkompetitiven Hemmung führt. In diesem Fall ist der Inhibitor das Substrat selbst. Bei einer zu hohen Konzentration bindet ein zweites Substrat an den Enzym-Substrat-Komplex. Es entsteht der sogenannte Dead-End-Komplex, welcher katalytisch unwirksam ist. Um diese Inhibierung zu beenden, muss die Konzentration an Enzym erhöht werden, damit das überschüssige Substrat schnellstmöglich abgebaut werden kann.

Bei der nicht-kompetitiven Hemmung erfolgt die Aufhebung der Enzymaktivität durch das Substrat wie bei der kompetitiven, doch ist hierbei der Inhibitor nicht am aktiven Zentrum gebunden. Er bewirkt durch seine Anbindung eine Konformationsänderung des Enzyms und unterbindet dadurch die Substratumsetzung teilweise oder ganz [68].

Bei der irreversiblen Inhibierung bindet der Inhibitor kovalent an das Enzym und ein Entfernen ist nicht möglich. Diese Hemmstoffe werden in spezifische und in nichtspezifische Inhibitoren unterteilt. Unspezifische Inhibitoren binden außerhalb des aktiven Zentrums kovalent an und beeinträchtigen dabei die Aktivität des Enzyms. Zu den spezifischen Inhibitoren zählen die active-site-directed Inhibitoren und Selbstmordsubstrate [69]. Erstere zeichnen sich durch ihre substrat- bzw. coenzymähnliche Struktur und ihre reaktiven Gruppen aus, mit denen sie an das aktive Zentrum anbinden.

Bei Selbstmordsubstraten kommt es bei der katalytischen Reaktion zur Bildung eines sehr reaktiven Intermediates, welches zur kovalenten Modifizierung des aktiven Zentrums führt. Somit stellt das Enzym seinen eigenen Inhibitor her und vergiftet sich sozusagen selbst [70].

Bei der Aufnahme von Pflanzenschutzmitteln, wie Carbamaten und Phosphorsäureestern, über die Nahrung kommt es immer zu einer Hemmung der Enzyme im menschlichen Organismus. Je nach Typ des Pflanzenschutzmittels gibt es Therapiemöglichkeiten, um eine Hemmung aufzuheben [70]. Dies ist aber nur möglich, wenn das inhibierende Pflanzenschutzmittel bekannt ist. Außerdem werden die Folgen durch die Aufnahme von geringen Mengen, wie es bei verseuchten Lebensmitteln der Fall ist, erst nach vielen Jahren deutlich. Dann sind die Nervenzellen bereits irreparabel geschädigt und eine Therapie ist nicht mehr möglich [71].

2.2.2 Anfänge der enzymatischen Pestizidbestimmung

Schon Mitte des 20. Jahrhunderts wurde auf dem Gebiet der Pestizidanalyse mit Hilfe von Enzymen geforscht. GUILBAULT *et al.* [22-24] gehörten zu den ersten Arbeitsgruppen, welche sich sehr intensiv mit diesem Thema auseinandersetzten.

Sie befassten sich unter anderem mit der Immobilisierung von Acetylcholinesterase, um diese mehrfach und über einen längeren Zeitraum nutzen und somit den Kostenfaktor reduzieren zu können.

Dafür immobilisierten sie Acetylcholinesterase unter anderem mit Hilfe von Stärkepads in Urethanschaum und Polyacrylamid-Gel [22]. Beide Methoden wurden hinsichtlich der Herstellung, Lager- und Langzeitstabilität verglichen. Die Immobilisierung an die Stärkepads war eine sehr einfache Methode. Während der Immobilisierung ging nur sehr wenig Enzym verloren, im Vergleich zur Immobilisierung an das Polyacrylamid. Bei dieser Form der Immobilisierung wurden bis zu 25% des Enzyms durch die Reaktionsbedingungen der Polymerisation inaktiv. Jedoch war die Acetylcholinesterase an die Stärkepads so schwach angebunden, dass ca. 80% bei der Lagerung und Untersuchungen durch Auswaschen verloren gingen. Das Enzym, welches in Polyacrylamid immobilisiert war, war sowohl bei der Nasslagerung in Puffer als auch bei Trockenlagerung über einen längeren Zeitraum stabil. Jedoch war die Lagerstabilität im TRIS-Puffer höher und betrug ca. 80 Tage.

Aufgrund der hohen Langzeitstabilität ist die Immobilisierung an Polyacrylamid die Bessere der zwei untersuchten Methoden.

Des Weiteren führten GUILBAULT *et al.* [23] eine Studie über das Inhibierungsverhalten von Acetylcholinesterasen verschiedener Tierarten gegenüber unterschiedlichen Pestiziden durch. Die Enzyme wurden aus der Leber von Kaninchen, Taube, Huhn, Schaf und Schwein gewonnen. Zuerst wurde das Hydrolyseverhalten aller Enzyme gegenüber Butyrylcholinester und Acetylcholinester untersucht. In Tabelle 2.1 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Es wird deutlich, dass fast alle der verwendeten Acetylcholinesterasen Butyrylcholinester schneller hydrolysieren als Acetylcholinester. Die Ausnahme war die Cholinesterase aus der Hühnerleber. Sie hydrolysierte beide Substrate gleichermaßen.

Tab. 2.1 Relative Aktivität von Lebercholinesterase verschiedener Herkunft gegenüber Acetyl- und Butyrylcholinestern nach [23]

Herkunft des Enzyms	Protein (mg/ml)	μM hydrolysierter Cholinester/min		relative spezifische Aktivität (U/mg)	
		Acetyl-	Butyryl-	Acetyl-	Butyryl-
Schaf	0.44	1.00	1.60	2.27	3.64
Schwein	0.67	1.90	2.82	2.83	4.21
Taube	1.10	2.62	3.26	2.38	2.96
Huhn	0.68	1.98	1.98	2.91	2.91
Kaninchen	0.56	0.67	2.50	1.20	4.46

Nach der Bestimmung des Hydrolyseverhaltens erfolgten Untersuchungen zum Inhibierungsverhalten durch verschiedene Pestizide. Diese Ergebnisse wurden mit den Testergebnissen der Pferdecholinesterase verglichen, da diese bis dahin am häufigsten für die Pestizidbestimmung genutzt wurde. Vor den Messungen wurden die reinen gelösten Enzyme mit einer Lösung, welche eine definierte Menge vom jeweiligen Pestizid enthielt, versetzt und für eine definierte Zeit inkubiert. Dann erfolgte die Substratzugabe

und die Hydrolyse wurde verfolgt. Die Ergebnisse der hydrolytischen Untersuchungen sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Dabei wurden die ermittelten I_{50} -Werte der einzelnen Cholinesterasen verglichen, welche durch unterschiedliche Inhibierungen erhalten wurden. Der I_{50} -Wert gibt an welche Stoffmenge des einzelnen Inhibitors notwendig ist, um 50% des Enzyms zu inhibieren.

Tab. 2.2 Vergleiche der I_{50} -Werte der verschiedenen Cholinesterasen durch die Inhibierung diverser Inhibitoren nach [23]

Pestizid	I_{50} (M)					
	Pferd	Kaninchen	Taube	Huhn	Schaf	Schwein
Paraoxon	$1.5 \cdot 10^{-6}$	$2.4 \cdot 10^{-8}$	$5.2 \cdot 10^{-8}$	$7.5 \cdot 10^{-8}$	$6.0 \cdot 10^{-8}$	
Dichlorvos	$4.0 \cdot 10^{-5}$	$8.4 \cdot 10^{-8}$	$9.8 \cdot 10^{-8}$	$9.2 \cdot 10^{-8}$	$9.5 \cdot 10^{-8}$	$8.3 \cdot 10^{-7}$
Parathion	$3.0 \cdot 10^{-5}$	$8.4 \cdot 10^{-7}$	$6.4 \cdot 10^{-7}$	$5.3 \cdot 10^{-7}$	$9.7 \cdot 10^{-7}$	$5.6 \cdot 10^{-6}$
Methylparathion	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$4.5 \cdot 10^{-6}$	$1.8 \cdot 10^{-6}$	$9.3 \cdot 10^{-7}$	$6.2 \cdot 10^{-6}$	$9.7 \cdot 10^{-6}$
Sevin	$8.2 \cdot 10^{-6}$	$1.8 \cdot 10^{-5}$		$8.0 \cdot 10^{-6}$		$7.9 \cdot 10^{-6}$

Es wird deutlich, dass jede einzelne Cholinesterase unterschiedlich stark von den einzelnen Pestiziden inhibiert wurde. Für den Nachweis von Paraoxon und Dichlorvos war die Cholinesterase vom Kaninchen die Geeignete. Die niedrigste Nachweisgrenze von Methylparathion erreichte die Cholinesterase vom Huhn. Um Sevin nachzuweisen, war wiederum die Cholinesterase vom Kaninchen die Geeignetste. Zusammenfassend ist in der Studie eine gewisse Selektivität bei den Cholinesterasen erkennbar.

In einer weiteren Studie untersuchten GUILBAULT *et al.* [24] die Möglichkeiten zur Spurenanalyse verschiedener Pestizide mit Hilfe von verschiedenen Insektencholinesterasen. Die Acetylcholinesterasen stammten von der Feuerameise, der Kakerlake, dem Rüsselkäfer und zwei verschiedenen Arten der Hausfliege, wovon eine resistent gegenüber Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT-resistent) war.

Die verschiedenen Acetylcholinesterasen wurden zuerst hinsichtlich ihrer Hydrolysefähigkeit gegenüber verschiedener Substrate untersucht. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tab. 2.3 Hydrolyserate ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) von Insektencholinesterase verschiedener Herkunft gegenüber Acetyl-, Propionyl-, Benzoyl- und Butyrylcholinestern nach [24]

Substrat	Feuerameise	Hausfliege (DDT-resistent)	Hausfliege	Kakerlake	Rüsselkäfer
Acetylcholinchlorid	0.12	0.56	0.37	1.98	0.12
Propionylcholinchlorid	0.63	1.03	0.84	1.76	0.11
Butyrylcholinchlorid	0.98	2.12	1.11	0.84	0.02
Benzoylcholinchlorid	0.23	0.76	0.31	0.02	0.00

Es ist zu erkennen, dass es Unterschiede im Hydrolyseverhalten der einzelnen Cholinesterasen gibt. Die Feuerameisen-Cholinesterase und die Hausfliegen-Cholinesterase hyd-

rolysieren Butyrylcholinchlorid besser, als die Cholinesterasen des Rüsselkäfers und der Kakerlake.

Das unterschiedliche Verhalten der Cholinesterasen lässt sich darauf zurückführen, dass die Cholinesterasen, welche von der Hausfliege und von der Feuerameise stammen, Pseudo- bzw. Butyrylcholinesterasen sind, wogegen es sich bei den Esterasen des Rüsselkäfers und der Kakerlake um Acetylcholinesterasen handelt.

Weiterhin wurde die Stabilität der einzelnen Enzyme untersucht. Am stabilsten war das Enzym der Kakerlake, obwohl dieses innerhalb von 3 Tagen bei 4°C 25% seiner Aktivität verlor.

Bei der Selektivität gegenüber den verschiedenen Pestiziden gab es folgende Untersuchungsergebnisse: getestet wurde mit Dichlorvos, Parathion, Methylparathion, Paraoxon, Aldrin, Captan, Dalapon, Dichlordiphenyltrichlorethan, Dieldrin, 2,4-D-Acid, Heptachlor, Lindan, Mirex, Methoxychlor und Sevin in Konzentrationen bis 10^{-6} M.

Das Enzym der Feuerameise wurde speziell von Dichlorvos und Methylparathion inhibiert. Auch Parathion bewirkt einen kleinen Inhibierungseffekt. Die anderen Pestizide führten zu keiner Inhibierung.

Die Cholinesterase der Hausfliege reagierte spezifisch auf Dichlorvos und Sevin. Das Rüsselkäferenzym war gut geeignet für den Nachweis von geringen Konzentrationen (ca. 10^{-6} M) an Dichlorvos.

Da die Cholinesterasen verschiedener Herkunft unterschiedliche Effekte auf die Inhibitoren zeigten, war eine selektive Bestimmung von Pestiziden möglich.

2.2.3 Biosensoren auf Basis von porösen Gläsern

LEON-GONZALEZ *et al.* [17] nutzten CPG als Matrix für AChE, um Paraoxon nachzuweisen. Dazu wurde das CPG mit γ -APTS und Glutardialdehyd behandelt. Anschließend wurde AChE immobilisiert. Das modifizierte CPG wurde bei 4°C in Phosphatpuffer gelagert. Für die Aktivitätsbestimmung wurde ein Nitrobenzendiazoniumsalz der Substratlösung aus α -Naphthylacetat zugesetzt. Das Salz reagierte mit dem Zersetzungsprodukt des α -Naphthylacetats. Das dabei entstehende Produkt absorbierte das Licht bei 500 nm. Die Intensität der Absorption ohne Pestizidzugabe wurde bestimmt und im Anschluss die Absorptionen bei verschiedenen Pestizidkonzentrationen gemessen. Es wurden zwei Verfahren der Messung angewendet, zum einen das Beschriebene und zum anderen die flow-injection-Methode. Das Ergebnis zahlreicher Untersuchungen ist, dass die Nachweisgrenze für **Paraoxon** bei der normalen Messung bei $4 \cdot 10^{-7}$ M \equiv 110 μ g/l und für die flow-injection-Methode wesentlich niedriger bei $8 \cdot 10^{-9}$ M \equiv **2,2 μ g/l** war.

Nach TRETTNAK *et al.* [18] wurde das aminosilanisierte Glas zum einen mit Glutardialdehyd und zum anderen mit Carbodiimid behandelt. Anschließend wurde die AChE-Immobilisierung durchgeführt. Die immobilisierten Enzyme wurden in einen Reaktor mit 70 μ l Reaktionsvolumen überführt und verschlossen. Die Reaktoren wurden bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert. Um die Aktivität zu bestimmen, wurde das Substrat 2-acetoxy-5-methyl-phenylazo-*N*-methyl-1,3-thiazolium-methosulfat verwendet, wel-

ches in wässriger Lösung gelb ist und Licht der Wellenlänge 390 nm absorbierte. Das Produkt der enzymatischen Reaktion war blau und absorbierte Licht der Wellenlänge 580 nm. Ist das Enzym inhibiert, so entsteht weniger Produkt, d.h. der Absorptionspeak bei 580 nm ist kleiner, als bei der Reaktion ohne Inhibierung. Die Reaktionen wurden einmal mittels UV-vis-Spektroskopie und einmal mittels Glasfaserphotometer verfolgt (Abb. 2.6). Die Nachweisgrenze für **Paraoxon** mittels Spektrometer lag bei 10 nM \equiv **2,8 $\mu\text{g/l}$** und mittels Glasfaserphotometer bei 0,2 μM \equiv **55,1 $\mu\text{g/l}$** . Der Vorteil des Glasfaserphotometers ist, dass Messungen über Distanzen von bis zu 100 m möglich sind; aber die Nachweisgrenze ist aufgrund der Streuverluste in der Glasfaserleitung bedeutend höher, als die des üblichen UV-vis-Spektrometers.

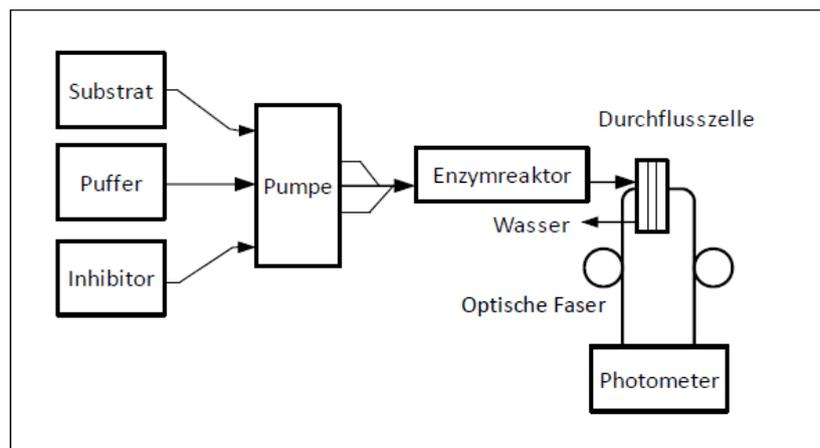


Abb. 2.6 experimenteller Aufbau des Inhibierungsexperiment nach [18]

Der von ANDRES *et al.* [19] entwickelte Sensor bestand sowohl aus einem mit Isothiocyanat modifizierten und mit AChE immobilisierten Glas als auch aus einem aminosilanisierten Glas, an dem Thymolblau angebunden war. Beide Gläser wurden in einer dünnen Schicht auf einen zweikanaligen Glasfaserkopf aufgebracht. Die Glasfaser dient zur Anregung des Farbstoffes und gleichzeitig zur Rückleitung des reflektierten Lichts zum Spektrometer. Der Sensorkopf wurde in eine Durchflusszelle integriert. Als erstes wurde die Aktivität des Enzyms mit Hilfe des reinen, in Phosphatpuffer gelösten, Substrates Acetylcholin aus Extinktionsmessungen bestimmt. Dann erfolgte die Extinktionsmessung nach Inhibierung mit verschiedenen Pestizidkonzentrationen. Die bestimmten Nachweisgrenzen für **Paraoxon** und **Carbofuran** lagen bei 24,7 ppb \equiv **24,7 $\mu\text{g/l}$** und 3,1 ppb \equiv **3,1 $\mu\text{g/l}$** .

XAVIER *et al.* [20] entwickelten einen Sensor basierend auf CPG-Kugeln und Glasfaser- messtechnik. Das CPG wurde erst aminosilanisiert und anschließend erfolgte die Immobilisierung von AChE. Die modifizierten CPG-Kugeln wurden bis zur Durchführung der Messungen in Puffer bei 4°C gelagert. Ein Teil der aminosilanisierten CPG-Kugeln wurde mit Dithionitlösung behandelt und anschließend der Farbstoff Chlorphenolrot angebunden. Der Farbstoff ändert seine Farbe von Gelb hin zu Blau. Diese Farbänderung entsteht durch eine Verringerung der pH-Wertes. Die Aktivitätsbestimmung der immobilisierten Enzyme erfolgte mit Hilfe von Ellmann's Reagenz im Spektrometer. Dazu wurde

die Substratlösung, Acetylcholin, mit Ellmann's Reagenz und einer bestimmten Menge des immobilisierten Enzyms versetzt. Für die Inhibierungsmessungen wurde das mit Farbstoff beladene CPG in eine Durchflusszelle eingebracht. Ein optisches Faserkabel wurde zur Anregung des Farbstoffs und zur Rückleitung des reflektierten Lichts zum Spektrophotometer verwendet. Die Enzym-CPGs wurden ebenfalls in einer flow-injection-Zelle platziert und mit Hilfe eines Thermostaten auf 36°C gebracht. Zuerst wurde die reine Acetylcholin-Lösung eingefüllt und die Reaktion verfolgt. Dann erfolgten Messungen bei denen unterschiedliche Mengen an Carbaryl bzw. Propoxur zugesetzt wurden. Je stärker die Enzymhemmung ist, desto weniger Produkt entsteht und desto geringer ist die Farbänderung des immobilisierten Chlorphenolrots. Die Nachweisgrenze des beschriebenen Sensors lag bei **8 µg/l** für **Propoxur** und bei **500 µg/l** für **Carbaryl**.

2.3.4 Biosensoren auf Basis von Polymeren

AVRAMESCU *et al.* [12] entwickelten einen Biosensor auf der Basis von Acetylcholinesterase.

Sie verwendeten ein Polymer, welches unter Lichteinwirkung vernetzenden Polyalkohol und Styrylpyridiniumgruppen in der Betainstruktur enthält (PVA-SbQ). An diesem wurde Aldehyddehydrogenase (ALDH) und Acetylcholinesterase (AChE) immobilisiert. Ein Teil des Polyalkohols wurde mit ALDH versetzt und anschließend dünn auf Acrylplatten aufgebracht und an einer Platinelektrode befestigt. Ein weiterer Teil des Polyalkohols wurde mit AChE modifiziert und auf die Platinelektroden aufgetragen.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte amperometrisch. Für Aktivitätsmessungen von ALDH wurde eine Spannung von 100 mV zwischen der modifizierten und einer weiteren Platinelektrode aufgebaut. Die Elektroden wurden in eine Lösung aus Phosphatpuffer, Kaliumhexacyano-(III)ferrat und dem Coenzym NADH getaucht. Nach 2 min wurde das Substrat Propionaldehyd zugegeben und die Spannungsänderung durch die Reaktion im Zeitverlauf aufgezeichnet. Dann erfolgten Messungen bei denen verschiedene Mengen Paraoxon zugegeben und unterschiedlich lang inkubiert wurden, bevor das Substrat zugesetzt wurde. Bei einer Inkubationszeit von 2 min lag die Nachweisgrenze bei 7,4 ppb \equiv **7,4 µg/l**.

Um die Aktivität der Acetylcholinesterase zu bestimmen, wurde zwischen der mit Acetylcholinesterase beladenen Platinelektrode, der Arbeitselektrode, und der Kalomelektrode, der Referenzelektrode, eine Spannung von 410 mV angelegt. Anhand der Stärke des bei der Reaktion (Oxidation von Thiocholin) fließenden Stroms wurde die Aktivität bestimmt. Bei einer Inhibierung nahm die Stärke des entstehenden Stroms ab. Die Nachweisgrenze bei einer Inkubationszeit von 5 min lag bei 10^{-5} mol/l \equiv **2,75 µg/l Paraoxon**.

In einer weiteren Studie verglichen NUNES *et al.* [13] vier verschiedene Modifikationen der Acetylcholinesterase. Zwei Natürliche, die Acetylcholinesterase des Zitteraals (AChE (ee)), die Acetylcholinesterase der Obstfliege (AChE (dros)) und zwei Mutanten

der Acetylcholinesterase der Obstfliege (AChE (dros)). Dafür wurde ein 1-Kanal-2-Elektroden Sensorelement auf PVC gedruckt. Die Arbeitselektrode bestand aus einer graphitüberzogenen Silberplatte, der Isolierschicht, und einer mit AChE-modifizierten PVA-SBQ-Schicht als aktive Oberfläche. Die Konzentration der Acetylcholinesterase betrug für AChE (ee) und beide Mutanten 2 mU. Für AChE (dros) wurde die Konzentration 1 mU gewählt, um eine Übersättigung zu vermeiden. Als Referenzelektrode wurde eine Silber/Silberchlorid-Elektrode verwendet.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte amperometrisch. Dazu wurde in einer Phosphatpufferlösung des pH-Werts 7 eine definierte Menge Thiocholin zugefügt und der Verlauf der Reaktion aufgezeichnet. Für die anschließende Inhibierungsmessung wurde das Enzym in einer wässrigen Lösung mit einer definierten Konzentration an Methamidophos für eine bestimmte Zeit inkubiert. Die Ergebnisse der Inhibierungsmessung sind in der Abbildung 2.7 dargestellt. Dabei wurden die relativen Inhibierungen in Abhängigkeit zur Inkubationszeit der verschiedenen Acetylcholinesterasen miteinander verglichen.

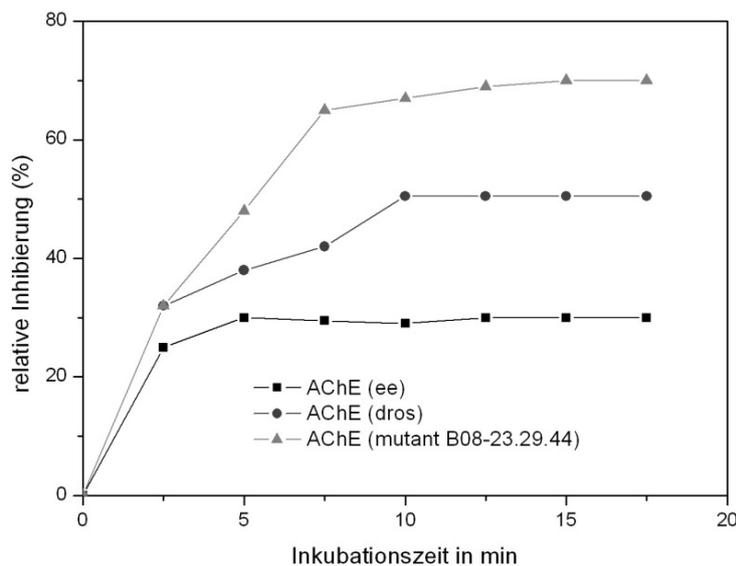


Abb. 2.7 Relative Inhibierung in Abhängigkeit zur Inkubationszeit nach [13]

Das beste Ergebnis, also den größten Inhibierungseffekt innerhalb kürzester Zeit, zeigte der Mutant der AChE (dros). Auch bei den Nachweisgrenzen (Tab. 2.4) ist deutlich zu erkennen, dass der Mutant auf die niedrigste Konzentration reagierte und einen Inhibierungseffekt zeigte.

Tab. 2.4 Detektionsgrenzen der einzelnen Acetylcholinesterasen nach [13]

	<i>AChE (ee)</i>	<i>AChE (dros)</i>	<i>AChE(dros) -B08</i>
<i>in M</i>	$3.70 \cdot 10^{-7}$	$3.40 \cdot 10^{-8}$	$9.93 \cdot 10^{-9}$
<i>in ppb</i>	53	4.8	1.4

Die niedrigste Nachweisgrenze erzielte der Dros-Mutant-B08 mit einer Konzentration an **Methamidophos** von nur 1,4 ppb \equiv **1,4 μ g/l**.

VALDES-RAMIREZ *et al.*[14] entwickelten einen amperometrischen Biosensor auf der Basis eines Photopolymers zur Quantifizierung der Pestizide Carbofuran, Cabaryl, Para-oxon und Dichlorvos.

Es wurden 3 verschiedene Biosensoren mit unterschiedlichen Enzymen präpariert. Als Enzyme wurden die Acetylcholinesterase vom Zitteraal (ee-AChE), ein Mutant der ee-Acetylcholinesterase (B394) und der Wild-type der *Drosophila melongaster* ausgewählt.

Diese wurden jeweils an das Photopolymer PVA-AWP (AWP = Asahi Water washable Plate) immobilisiert und dann auf eine mit Cobalt(II)-phthalocyanin modifizierte Elektrode gebracht. Der Aufbau des entwickelten Biosensors ist in Abb. 2.8 schematisch dargestellt.

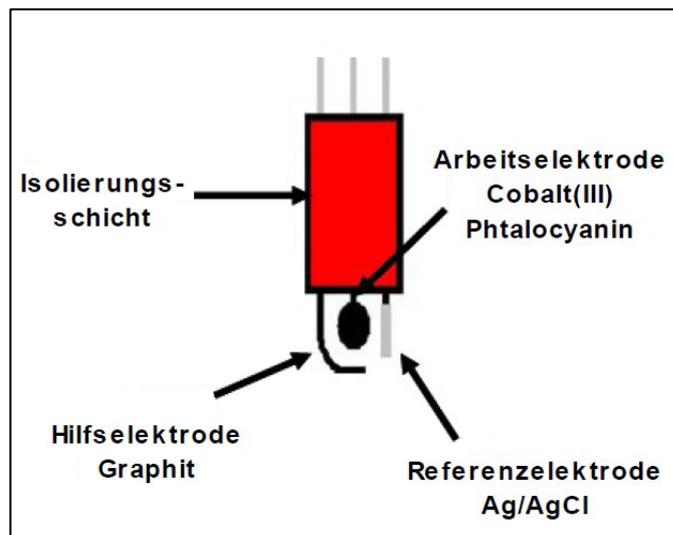


Abb. 2.8 Schematische Darstellung des Biosensors nach [14]

Die Aktivität der einzelnen Biosensoren wurde amperometrisch gegen eine Silber-/Silberchlorid Elektrode bestimmt. Dazu wurden die Elektroden im Phosphatpuffer mittels Thermostat auf 30°C erwärmt. Dann erfolgte die Zugabe von Acetylthiocholinchlorid. Um die Sättigung an Substrat in Lösung zu ermitteln, wurden unterschiedliche Mengen an Acetylthiocholinchlorid zugegeben, bis das Signal konstant blieb. Für die Bestimmung der Inhibierung wurde die Elektrode in einer Phosphatpufferlösung mit einer definierten Menge an Pestizid inkubiert und im Anschluss vermessen.

Die Nachweisgrenze wurde für diese Untersuchungen bei einer Inhibierung von 10% des Enzyms festgesetzt. Sie betrug für **Carbofuran** mit dem Enzym B1 $4,5 \cdot 10^{-9} \text{ M} \equiv 0,9 \mu\text{g/l}$, für **Dichlorvos** mit Enzym B394 $9,6 \cdot 10^{-11} \text{ M} \equiv 0,02 \mu\text{g/l}$ und **Paraoxon** ebenfalls mit dem Enzym B394 $2,6 \cdot 10^{-9} \text{ M} \equiv 0,7 \mu\text{g/l}$.

ANDREESCU *et al.* [15] untersuchten verschiedene Immobilisierungsarten.

Die erste Variante war der Einbau in ein vernetztes PVA-SbQ Photopolymer. Dabei wurde eine Acetylcholinesteraselösung zu einer 30%-igen PVA-SbQ- Lösung gemischt und auf eine modifizierte Graphitelektrode gedruckt. Diese war die Arbeitselektrode für folgende amperometrische Messungen zur Bestimmung der Aktivität und den anschlie-

ßenden Messungen zum Inhibierungsverhalten. Die Arbeitselektrode wurde unter Neonlicht bei 4°C für 3 h gelagert, um die Polymerisation zu ermöglichen.

Bei der zweiten Variante fand ein Einkapseln in ein poröses Glas statt. Dazu wurde ein Sol aus TMOS, MTMOS, Salzsäure, Wasser und Precursor hergestellt und geliert. Nach der Gelierung erfolgte die Zugabe der Enzymlösung. Dieses Gel wurde auf eine modifizierte Graphitelektrode aufgesprüht und diente dann als Arbeitselektrode für die anschließenden Messungen.

Auch bei der Variante 3 (in der Legende als Affinität bezeichnet) wurde eine Lösung auf eine modifizierte Graphitelektrode aufgebracht. Als erstes wurde eine Schicht bestehend aus Silika-NTA-Ni aufgedruckt. Silika-NTA ist ein Komposit bestehend aus einem silikatischen Sol-Gel und Nitrilotriessigsäure. Die Nitrilotriessigsäure dient als Chelatbildner für das anzubindende Nickel(II)-Ion. Anschließend erfolgte der Aufdruck der Enzymlösung. Abschließend wurde eine Carbonschicht aufgedruckt. Voraussetzung für diese Methode war die Metall-Chelat-Affinität von histidinrestenthaltenden Peptiden und Proteinen.

Die Messung der Aktivität erfolgte amperometrisch. Als Referenzelektrode diente eine Ag/AgCl-Elektrode. Für die Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden zehn Elektroden gleichartig gefertigt und vermessen. Weiterhin wurde die Langzeitstabilität untersucht. Dazu wurden fünf gleichartig gefertigte Elektroden unter identischen Bedingungen gelagert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten vermessen. Für die Pestizidbestimmung wurden die Elektroden, nachdem ihre Aktivität bestimmt wurde, mit einer Pestizidlösung inkubiert und anschließend vermessen. Dabei wurde die Konzentration des Pestizids variiert.

Die Ergebnisse sind im Folgenden kurz zusammengefasst. Die Lagerungsstabilität betrug bei der PVA-SbQ-Elektrode bei 4°C acht Monate.

Die in Sol-Gel eingekapselten Enzyme wurden bei -20°C im Vakuum gelagert und waren so bis zu sechs Monaten stabil. Die Metall-Chelat-Elektroden hatten eine wesentlich kürzere Haltbarkeit, jedoch war die Regenerierung ohne größeren Aufwand möglich. Das Inhibierungsverhalten der Enzyme der einzelnen Immobilisierungsvarianten ist in Abbildung 2.9 dargestellt.

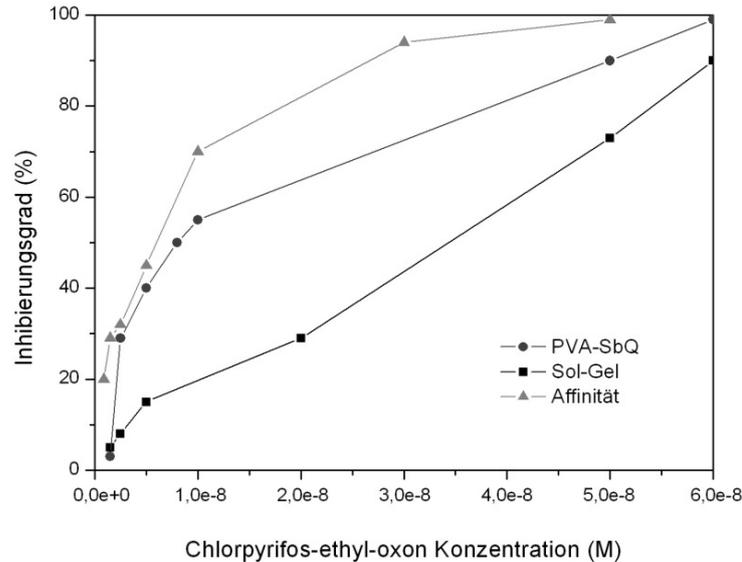


Abb. 2.9 Inhibierungskurven von immobilisierten Acetylcholinesterasen nach [15]

Die Detektionsgrenzen der einzelnen Enzyme von verschiedenen Pestiziden sind in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 2.5) im Vergleich zum freien Enzym aufgelistet.

Tab. 2.5 Detektionsgrenzen der einzelnen Matrix-Enzym-Komplexe für verschiedene Pestizide nach [15]

Pestizid	PVA-SbQ (I_{20} , M)	Sol-Gel (I_{20} , M)	Affinität (I_{20} , M)
Paraoxon	$4,9 \cdot 10^{-8}$	$2,4 \cdot 10^{-8}$	$1,7 \cdot 10^{-8}$
Dichlorvos	$1,5 \cdot 10^{-9}$	$1,5 \cdot 10^{-8}$	$4,1 \cdot 10^{-9}$
Chlorpyrifosethyloxon	$2,3 \cdot 10^{-9}$	$1,12 \cdot 10^{-8}$	$6,0 \cdot 10^{-11}$

Als Nachweisgrenze wurde der I_{20} -Wert angenommen. Bei dieser Menge an Pestizid sind 20% des Enzyms inhibiert.

Die höchste Empfindlichkeit gegenüber Chlorpyrifosethyloxon und Paraoxon hatte die chelatgebundene Acetylcholinesterase, sie liegt für **Chlorpyrifos** bei $6 \cdot 10^{-11}$ M \equiv **0,02 μ g/l** und für **Paraoxon** bei $1,7 \cdot 10^{-8}$ M \equiv **4,6 μ g/l**. Auf **Dichlorvos** reagierte das Enzym, welches im Polymer vernetzt wurde, am empfindlichsten. Die Detektionsgrenze betrug $4,1 \cdot 10^{-9}$ M \equiv **0,9 μ g/l**.

Aufbauend auf vorangegangene Forschungsergebnisse veröffentlichten ALONSO *et al.* [16] in Zusammenarbeit mit VALDES-RAMIREZ [14] 2011 eine neuartige Entwicklung eines Biosensors zur Detektion von Organophosphaten, wie Chlorpyrifos-Oxon, Chlorfenvinfos und Azinphos-methyl-oxon. Dieser beruhte auf einem Drei-Elektroden-System (Arbeits-, Referenz- und Hilfselektrode). Die Grundlage waren jeweils Karbonelektroden, welche entsprechend modifiziert wurden. Die Oberfläche der Referenzelektrode wurde mit einer Silber-Silberchlorid-Paste bestrichen. Wohingegen die Arbeitselektrode mit dem Photopolymer AWP nach VALDES-RAMIREZ *et al.* [72] modifiziert wurde. In dem Polymer war das Enzym Acetylcholinesterase eingeschlossen.

Die Analysen erfolgten mit Hilfe des sogenannten Multi-Commutated Flow Analysis. Der Aufbau ist schematisch in der Abbildung 2.10 dargestellt.

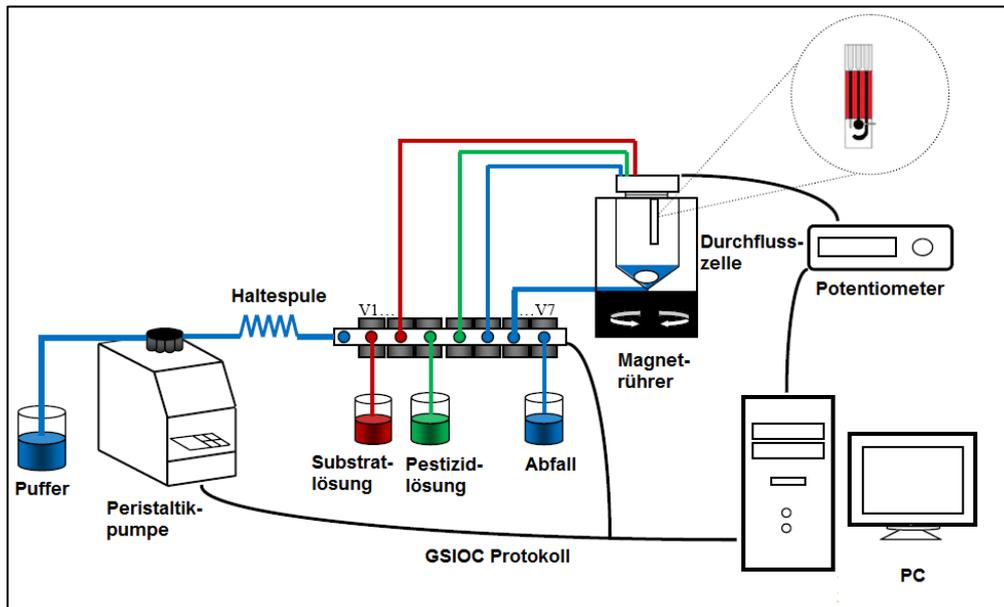


Abb. 2.10 schematische Darstellung des MCFA nach [16]

Die Untersuchungen bezüglich der Aktivität und des Inhibierungsverhaltens der immobilisierten Acetylcholinesterase erfolgten amperometrisch. Dazu wurde der Sensor in eine Messzelle mit Acetylcholinchlorid überführt. Das bei der Hydrolyse von AChCl entstehende Stromsignal wurde aufgezeichnet. Nach wenigen Minuten war der stationäre Zustand erreicht. In diesem erfolgte für die Charakterisierung des Inhibierungsverhaltens die Zugabe der Pestizidlösung. Dabei kam es zur Abnahme des Stromsignals, wie in Abbildung 2.11 sichtbar wird.

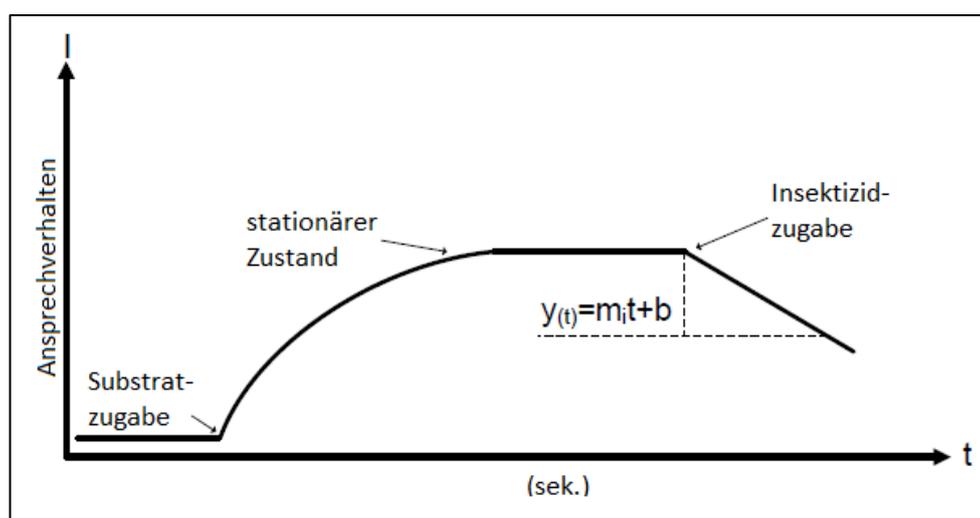


Abb. 2.11 Darstellung der Veränderungen des Stromsignals bei der Zugabe von Substrat bzw. Insektizid nach [16]

Die ermittelten Nachweisgrenzen lagen für **Chlorpyrifos-Oxon** bei $1,24 \cdot 10^{-9} \text{ M} \equiv 0,43 \text{ } \mu\text{g/l}$, für **Chlorfenvinphos** bei $1,26 \cdot 10^{-6} \text{ M} \equiv 453 \text{ } \mu\text{g/l}$ und für **Azinphos-methyl-oxon** bei $1,48 \cdot 10^{-8} \text{ M} \equiv 4,5 \text{ } \mu\text{g/l}$.

2.2.5 Biosensoren auf Basis von Sol-Gel

BUCUR *et al.* [25] untersuchten das Inhibierungsverhalten vier verschiedener Acetylcholinesterasen gegenüber unterschiedlichen Pestiziden. Es wurden die Reaktionen des Wildtyps und drei weiterer genetisch modifizierter AChE der *Drosophila melongaster* analysiert. Die Enzyme wurden in eine Sol-Gel-Matrix immobilisiert und auf eine mit Tetracyanoquinodimethan(TCQN)-modifizierte Graphitelektrode mittels Siebdruck aufgedruckt. Die entstandene Elektrode diente als Arbeitselektrode. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten amperometrisch. Die Referenzelektrode war eine Ag/AgCl-Elektrode. Zuerst wurde die Aktivitätsbestimmung durchgeführt. Im Anschluss wurde die jeweilige Elektrode in einer der Pestizidlösungen für 20 min inkubiert. Zum Schluss erfolgte die Bestimmung der resultierenden Aktivität.

Die Untersuchungen brachten folgendes Ergebnis: die genetisch modifizierten Enzyme hatten unterschiedliche Ansprechverhalten gegenüber den Pestiziden Carbaryl, Pirimicarb und Carbofuran. Mit dem Enzym **Dm-Y370A** wurde die niedrigste Detektionsgrenze für **Carbaryl** mit $1 \cdot 10^{-8} \text{ M} \equiv 2,0 \text{ } \mu\text{g/l}$ erreicht. Die niedrigste Detektionsgrenze für **Carbofuran** wurde durch das Enzym **Dm-I161V** erzielt und lag bei $8 \cdot 10^{-10} \text{ M} \equiv 0,2 \text{ } \mu\text{g/l}$. Das Enzym **Dm-E69W** erreichte ein Detektionslimit von $2 \cdot 10^{-8} \text{ M} \equiv 4,76 \text{ } \mu\text{g/l}$ für **Pirimicarb**.

DANDOI *et al.* [26] berichteten auch über den Einfluss verschiedener organischer Lösungsmittel auf die Aktivität von Acetylcholinesterase. Außerdem beschrieben sie den Einfluss der Lösungsmittel auf die Inhibierung der Enzyme durch Pestizide. Des Weiteren untersuchten sie die Möglichkeit, die Pestizide aus Proben herauszulösen. Für die Untersuchungen wurden die Enzyme in eine Sol-Gel-Matrix immobilisiert und auf eine modifizierte Graphitelektrode aufgebracht. Die Messungen erfolgten amperometrisch. Als erstes wurde der Einfluss von Alkoholen (Ethanol, Methanol) und Acetonitril untersucht. Dazu wurde die Aktivität des Enzyms mit einer Standardsubstratlösung bestimmt. Dann wurden jeweils verschiedene Volumina von dem jeweiligen organischen Lösungsmittel der Standardsubstratlösung zugesetzt und die Aktivität erneut bestimmt. Der Verlauf der Aktivitätskurve blieb unverändert, wies jedoch nach der Zugabe von Ethanol eine minimale Aktivitätserhöhung und nach der Zugabe von Acetonitril und Methanol eine Aktivitätsverringerng auf (Abbildung 2.12).

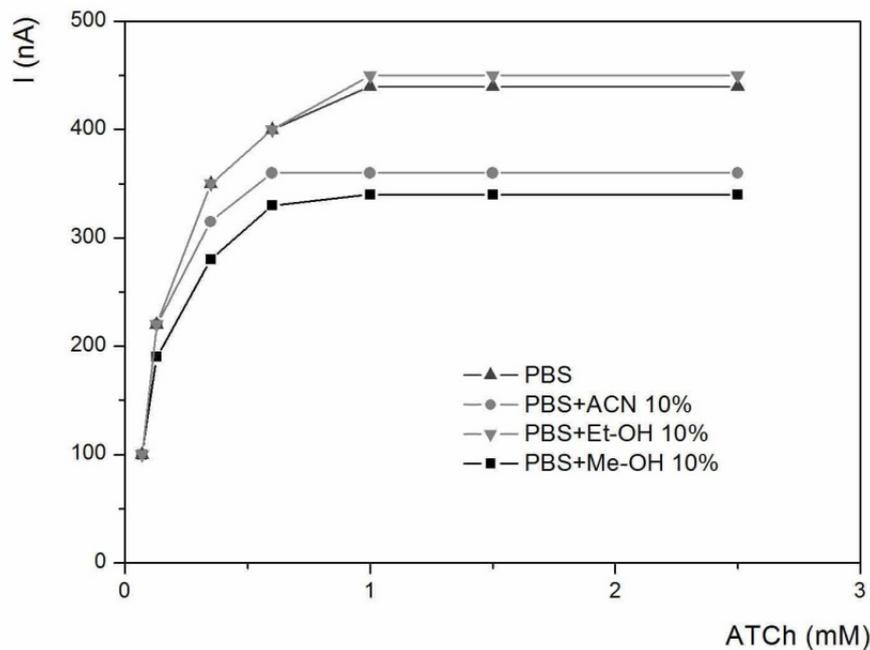


Abb. 2.12 Einfluss von Ethanol, Methanol und Acetonitril auf die Aktivität des gebundenen Enzyms nach [26]

Das Inhibierungsverhalten wurde mit Dichlorvos und Paraoxon getestet. Dabei wurde unter anderen die Methode der Vorkonzentration genutzt. Wie eingangs beschrieben, wurde hierbei erst die Aktivität des Enzyms bestimmt. Im Anschluss erfolgten die 10-minütige Inkubation mit dem jeweiligen Pestizid und die Bestimmung der konzentrationsabhängigen resultierenden Aktivität.

In diesen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass sich mittels Vorkonzentration die Nachweisgrenze deutlich verringern lässt. 50% der Pestizidkonzentration führten zum identischen Grad der Inhibierung gegenüber den Analysen ohne Vorkonzentration.

Nach den Inhibierungsversuchen, erfolgten die Untersuchungen zum Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf die Inhibierung. Dabei wurde den einzelnen Lösungen, bestehend aus der Standardpestizidlösung, verschiedene Volumina an Ethanol, Methanol bzw. Acetonitril zugesetzt. Es erfolgte eine Inkubation der einzelnen Elektroden in der jeweiligen Lösung. Im Anschluss wurden diese vermessen. Im Ergebnis zeigte sich, dass mit steigender Menge Lösungsmittel bei gleichbleibender Pestizidkonzentration der Grad der Inhibierung abnimmt.

Zum Abschluss wurde das Extraktionsvermögen der Lösungsmittel auf pestizidhaltige Proben untersucht. Dazu wurden 50 ml einer 10^{-7} M Paraoxonlösung durch eine Säule geleitet. Dann erfolgte mit 5 ml Fraktionen des jeweiligen Solvent die Extraktion aus der Säule. Die Fraktionen wurden auf 10 ml mit Phosphatpuffer verdünnt und mit dem Biosensor getestet bis der Messwert unter den LOD sank.

Es war nur eine Fraktion, also 5 ml, Acetonitril notwendig, um das Pestizid vollständig zu extrahieren. Von Ethanol wurden zwei und von Methanol drei Fraktionen zur vollständigen Extraktion benötigt. Trotz des Herabsetzens der Aktivität des gebundenen Enzyms, ist Acetonitril die beste Wahl, wenn organische Lösungsmittel in der Biosensorik benötigt werden.

WON *et al.* [27] entwickelten in Zusammenarbeit mit ANDREESCU [27] einen Biosensor basierend auf einem biomagnetischen porösen Glas. Der Magnetismus wurde durch Eisennanopartikel bewirkt. Diese wurden nach der Methode von PARK *et al.* [73] generiert. Mit Hilfe des Sol-Gel-Prozesses wurde jeder Nanopartikel mit einer porösen Silikathülle umgeben. In der Abbildung 2.13 ist sowohl der Herstellungsprozess des biomagnetischen Glases als auch der Messaufbau schematisch dargestellt.

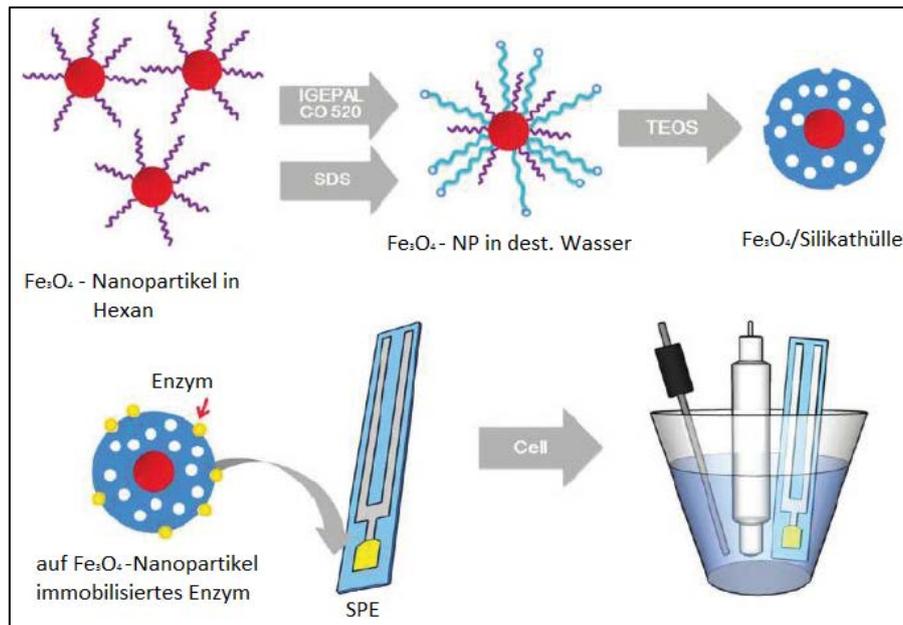


Abb.2.13 schematische Darstellung des biomagnetischen Glases und des Messaufbaus nach [27]

Die ummantelten und mit Acetylcholinesterase beladenen Nanopartikel wurden auf eine Arbeitselektrode aufgebracht. Für die Charakterisierung wurde ein Drei-Elektroden-System verwendet. Es bestand aus der Arbeitselektrode, der Silber/ Silberchlorid-Elektrode als Referenzelektrode und einem Platinkabel als Hilfselektrode. Die Untersuchungen zum Ansprech- und Inhibierungsverhalten des Sensors erfolgten amperometrisch. Dafür wurde der Stromfluss, welcher bei der Hydrolyse des Substrates Acetylcholin durch die immobilisierte Acetylcholinesterase entstand, aufgezeichnet. Nach der Bestimmung der Aktivität des immobilisierten Enzyms erfolgten die Untersuchungen zum Inhibierungsverhalten. Dazu wurde eine Elektrode, welche bereits vermessen wurde, mit der Paraoxonlösung einer festgelegten Konzentration für eine definierte Zeit inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine erneute Messung des aus der Hydrolyse resultierenden Stromflusses.

Die erhaltene Nachweisgrenze für den von WON *et al.* [27] entwickelten Biosensor lag für **Paraoxon** bei $5 \cdot 10^{-9} \text{ M} \equiv 1,4 \mu\text{g/l}$.

2.2.6 Biosensoren auf Basis von Chitosan

GONG *et al.* [28] stellten ein nanoporöses CaCO_3 -Chitosan-Komposit als Matrix für die Immobilisierung von Acetylcholinesterase in einem einstufigen elektrochemischen Prozess her. Chitosan ist ein Biopolymer, welches durch alkalische bzw. enzymatische Deacetylierung aus Chitin gewonnen wird. Dieses kommt in Pilzen und den Stützskeletten von Gliedertieren (z.B. Panzer von Krebstieren) vor [73].

In einer Lösung mit NH_4HCO_3 und Chitosan wurde durch das Anlegen einer Spannung zunächst Wasser zu Wasserstoff reduziert, der im weiteren Verlauf am formgebenden Prozess beteiligt war. Durch einen lokalinduzierten pH-Anstieg kam es zu einer Verschlechterung der Löslichkeit des Chitosans und einer Ablagerung von CaCO_3 (Abb.2.14).

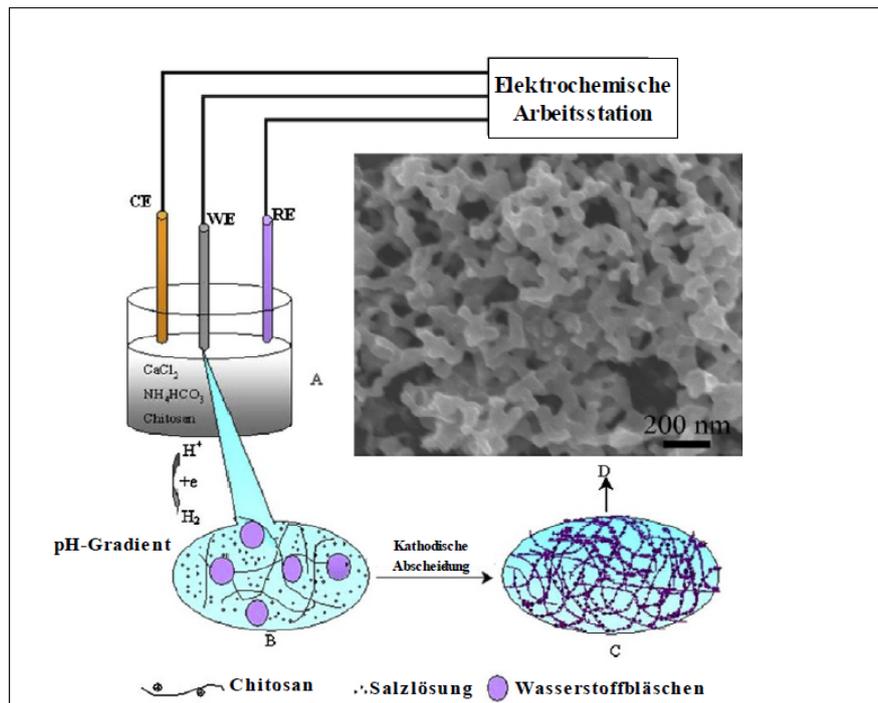


Abb. 2.14 Illustration der Bildung des CaCO_3 -Chitosan-Komposits (A-C) und elektronenmikroskopische Aufnahme des Komposits auf der GCE (D) [28]

Beide Komponenten bildeten dadurch eine Art Film auf einer vorbereiteten Glas-Karbon-Elektrode (GCE). Die bei der Reduktion des Wassers entstandenen Wasserstoffgasblasen führten dabei zur Ausbildung der nanoporösen Struktur des CaCO_3 -Chitosan-Komposits, welche als Beschichtung der GCE diente. Die Beladung mit Acetylcholinesterase erfolgte durch 30-minütige Inkubation in 6 μl Enzymlösung bei 25°C. Die Inhibierung des Enzyms erfolgte durch eine 10-minütige Lagerung in einer Methyl-Parathionlösung. Der Inhibierungsgrad wurde an Hand von zyklischer Voltametrie vor und nach der Inhibierung bestimmt, so dass ein Nachweis des Pestizids bis zu einer Grenze von ca. 1 $\mu\text{g/l}$ möglich war. Um die Wiederverwendung des Biosensors zu erreichen, reaktivierten GONG *et al.* [28] das gehemmte Enzym mit Pralidoximiodid, welches reversibel an Acetylcholinesterase bindet und damit Organophosphate verdrängen kann, ohne selbst das Enzym zu hemmen.

Einen ähnlichen Ansatz verfolgten auch DAN DU *et al.* [29], indem sie ein Chitosan-Sol-Gel-Komposit herstellten, das zur Beschichtung einer GCE verwendet wurde. Ihre Lösung aus Tetraethoxysilan, Chitosan, Ethanol und Goldnanopartikeln reagierte zu einem Chitosan-Silica-Sol-Gel-Komposit mit eingeschlossenen Goldnanopartikeln. Nachdem das Komposit auf die GCE aufgebracht worden war, erfolgte die Beladung mit 4 μl Acetylcholinesterase nach GONG *et al.*[28]. Über die zyklische Voltametrie wurde der Oxidationspeak von Thiocholin (Produkt der durch Acetylcholinesterase katalysierten Reaktion) zu Dithiobischolin erfasst. Aus dem Vergleich der Peaks vor und nach der Hemmung des Enzyms konnte die Inhibierung in Prozent berechnet werden. Ziel dieser Forschungsarbeit war allerdings nicht die Pestiziddetektion, sondern die Untersuchungen bezüglich der Effektivität bei der Acetylcholinesterasehemmung von Medikamenten gegen Alzheimer.

DAN DU *et al.* [30] entwickelten in einer weiteren Studie einen Sensor auf Basis von Kohlenstoff-Nanotubes. Die Kohlenstoff-Nanotubes wurden unter Rückfluss in Salpetersäure gekocht. In vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich, dass diese Behandlung zur vollständigen Segmentation und Carboxylierung führte. Für die Arbeitselektrode wurde zunächst Chitosan in Essigsäure gelöst und mittels Natronlauge auf pH=5 eingestellt. Anschließend wurde Glutardialdehyd der Chitosanlösung hinzugefügt. Die Mischung wurde mit den Nanotubes zu einer homogenen Suspension verarbeitet. Diese wurde auf eine gereinigte Glas-Carbon-Elektrode (GCE) aufgebracht. Nach Beendigung der Reaktionszeit wurde die GCE abgespült und es folgte die Immobilisierung der Acetylcholinesterase. Die Lagerung der modifizierten GCE erfolgte bei 4°C

Die Messung der Aktivität der GCE erfolgte amperometrisch mit Hilfe einer Kalomelreferenzelektrode und einer zusätzlichen Platinelektrode. Für die Messungen wurde AChCl-Pufferlösung in eine Messzelle gegeben und ein Voltogramm zwischen 0,1- 1,0 V aufgenommen. Dann erfolgten Messungen unter Zugabe verschiedener Pestizidkonzentrationen.

Aus zahlreichen Messungen ergab sich als resultierende Nachweisgrenze bei einer Inkubationszeit von 8 min für **Carbaryl** von $1,3 \cdot 10^{-8} \text{ mol/l} \equiv 2,61 \mu\text{g/l}$.

XIA SUN *et al.* [31] verglichen zwei Methoden, um Acetylcholinesterase an eine Glas-Carbon-Elektrode (GCE) zu binden. Hierfür verwendeten sie zum einen die Sol-Gel-Methode und zum anderen die Vernetzung mit Hilfe von Glutardialdehyd. Bei beiden Varianten wurde Acetylcholinesterase zunächst an Chitosan-Membranen immobilisiert. Die verwendeten Chitosan-Membranen wurden wie folgt hergestellt: Chitosan-Pulver wurde mit Essigsäure für 10 min vermischt und anschließend zentrifugiert. Die vorbereiteten porösen Cellulosenitrat-Membranen wurden für 12 h in das entstandene Sol eingelegt. Anschließend wurden sie gewaschen und getrocknet.

- *Immobilisierung mittels Glutardialdehyd:* In eine Lösung aus Phosphatpuffer, Acetylcholinesterase und Glutardialdehyd wurde ein Teil der Chitosan-Membranen für 8 h bei 4°C eingelegt und im Anschluss mit Puffer gewaschen und getrocknet.

- *Immobilisierung mittels Sol-Gel-Methode:* In einem Becherglas wurden TEOS, Ethanol, Salzsäure und Wasser gemischt. Dem Gemisch wurde Acetylcholinesterase hinzuge-

geben und homogenisiert. Dann wurden die restlichen Chitosan-Membranen hineingegeben und für 8 h bei 4°C inkubiert. Abschließend wurden die Membranen mit Phosphatpuffer gewaschen und getrocknet.

Die Messungen der Aktivität des gebundenen Enzyms erfolgte elektrochemisch. Die GCE wurde gereinigt und jeweils eine Membran an ihr befestigt. Diese Elektrode war die Arbeitselektrode; als Referenzelektrode diente eine Kalomelektrode. Diese wurden in eine Pufferlösung mit einer definierten Menge an Acetylthiocholinchlorid gegeben und die Änderungen des Stromflusses aufgezeichnet.

Für die Messungen mit Inhibitor, hier Dichlorvos, wurden die Arbeitselektroden jeweils in eine Lösung definierter Dichlorvoskonzentration gegeben und für 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung des Stromflusses in einer Acetylthiocholinchloridlösung. In den Abbildungen 2.15 und 2.16 sind die Stromflüsse beider Elektroden ohne Inhibitor dargestellt.

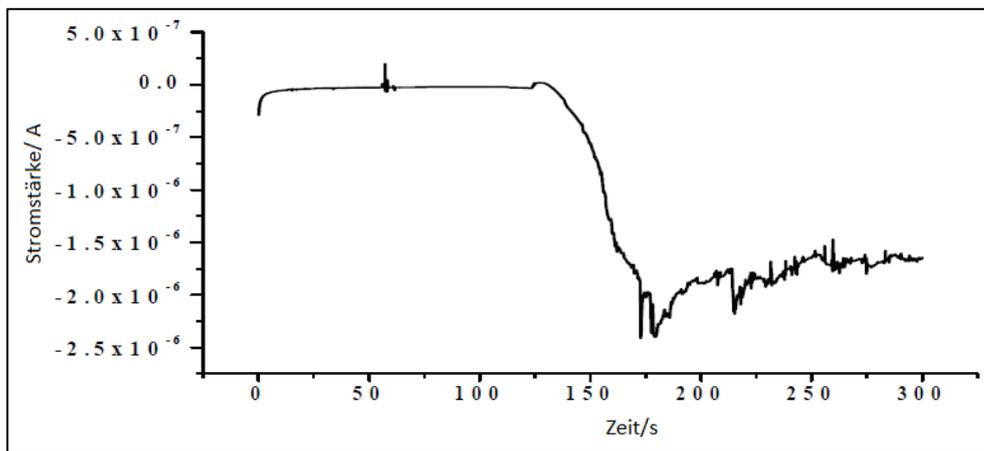


Abb. 2.15 Katalytische Reaktion von Acetylcholinesterase-GCE nach der Glutardialdehyd-Methode nach [31]

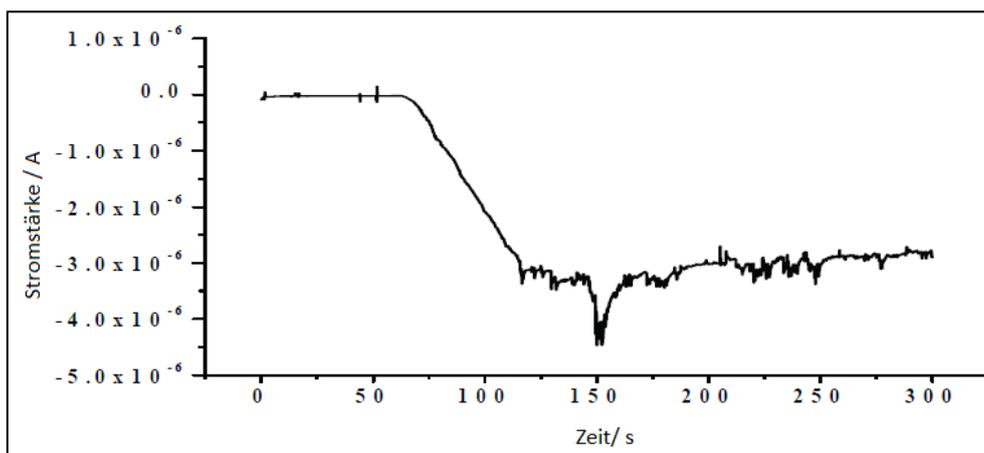


Abb. 2.16 Katalytische Reaktion von Acetylcholinesterase-GCE nach der Sol-Gel-Methode nach [31]

Im Vergleich der beiden Kurvenverläufe sind Unterschiede im Verlauf erkennbar. Bei der Glutardialdehydmethode fand ein Absinken der Stromstärke erst verzögert, dann innerhalb kürzester Zeit statt. Wohingegen bei der Sol-Gel-Methode, schon kurz nach

der Zugabe des Acetylcholinchlorids der Stromabfall begann, doch sie benötigte mehr Zeit bis der Minimalwert erreicht wurde. Bei beiden Methoden wurde der Minimalwert nach ca. 150 s erreicht. Dieser war bei der Sol-Gel-Methode niedriger als bei der Glutaraldehyd-Methode. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Reaktivität der Acetylcholinesterase bei der Sol-Gel-Methode höher ist als bei der Glutaraldehyd-Methode. Des Weiteren erfolgten Inhibierungsmessungen mit Dichlorvos, um die Nachweisgrenzen der einzelnen Methoden zu bestimmen.

Die Detektionsgrenze von **Dichlorvos** der Acetylcholinesterase-GCE nach der **Sol-Gel-Methode** liegt bei **5 µg/l** und bei der Acetylcholinesterase-GCE nach der **Glutaraldehyd-Methode** bei **10 µg/l**.

2.2.7 Biosensoren auf Basis von nicht-porösen Materialien

In Zusammenarbeit mit XI HUANG [32] entwickelte DAN DU [32] einen amperometrischen Biosensor bestehend aus Avidin-beschichteten Silber-Nanopartikeln, an welche Biotin-markierte Acetylcholinesterase angebunden wurde. Die so modifizierten Silber-Nanopartikel wurden an eine oberflächenmodifizierte Goldelektrode immobilisiert. In der Abbildung 2.17 ist der Aufbau der Goldelektrode schematisch dargestellt.

Die Elektrode wurde elektrochemisch charakterisiert, d.h. die Aktivität des gebundenen Enzyms wurde bestimmt. Dazu wurde die Pufferlösung bzw. eine Pufferlösung, welche Acetylcholin enthält, in eine elektrochemische Messzelle überführt und zyklische Voltamogramme von 0,3–1,0 V aufgezeichnet.

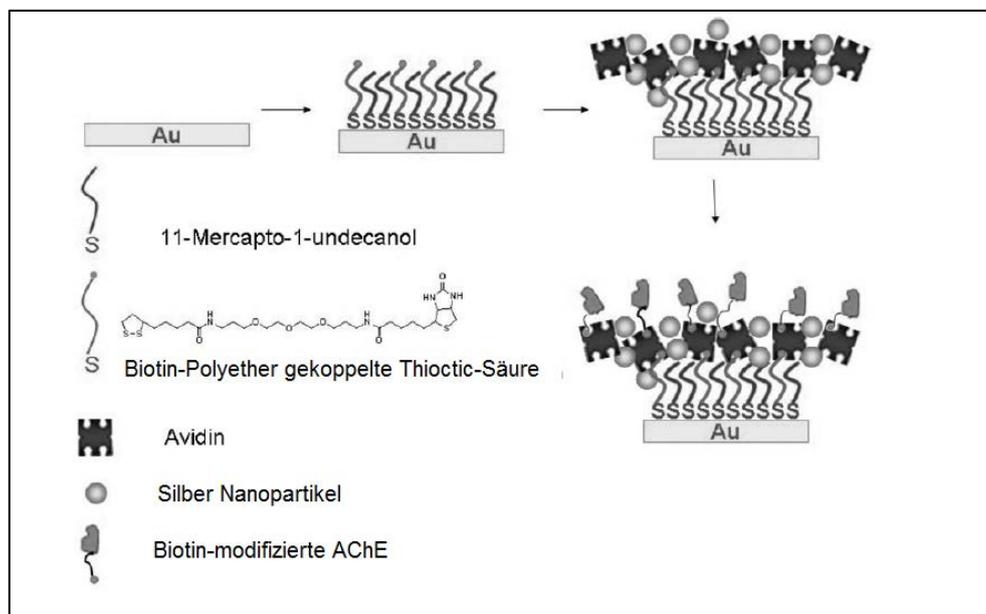


Abb. 2.17 Schematische Darstellung des Kompositfilms auf der Goldelektrode nach [32]

Für die Bestimmung des Pestizids Dimethoat wurden die Elektroden jeweils in verschiedenen konzentrierte Dimethoat-Pufferlösungen gegeben und für eine definierte Zeit inkubiert.

Anschließend erfolgte die Zugabe einer Elektrode in die Acetylcholin enthaltende Pufferlösung und das elektrochemische Ansprechverhalten wurde mittels zyklischer Voltammetrie aufgezeichnet.

Als Detektionsgrenze legten XI HUANG *et al.* den Punkt fest, an dem das Messsignal 10% kleiner war, als bei der Messung ohne Dimethoat. Dieser lag bei $0,01 \mu\text{M} \equiv 2,3 \mu\text{g/l}$.

LASCHI *et al.* [33] entwickelten einen elektrochemischen carbonmodifizierten 'Einweg'-Biosensor. Dieser bestand aus einer Graphitelektrode, welche mit Hilfe des Siebdrucks mit Cobalt(II)-phthalocyanin modifiziert wurde. Danach erfolgte die Immobilisierung von Acetylcholinesterase an dieser Elektrode. Dazu wurde eine Enzymlösung bestehend aus bovinem Serumalbumin, Nafion, Glutardialdehyd und Acetylcholinesterase hergestellt. Die Mischung enthielt 7,5 U/ml Acetylcholinesterase und wurde über die Elektrode gegossen. Nachdem die Enzymschicht getrocknet war, erfolgte eine Versiegelung, indem die Elektroden für 30 min in eine Glycinlösung getaucht wurden. Nach diesem Prozess wurden mehrere Elektroden hergestellt. Diese wurden bis zur Untersuchung bei 4°C gelagert. Die Messungen der Aktivität des immobilisierten Enzyms erfolgten in einer Pufferlösung, welche unterschiedliche Konzentrationen von dem Substrat Dithiothreitol enthielt bei einer Spannung von -0,6 bis 0,3 V. Die resultierenden Stromflüsse wurden aufgezeichnet.

Für die Inhibierungsmessungen wurde eine Lösung aus Puffer, Acetylcholinesterase und in Acetonitril gelöstes Carbofuran präpariert. Die Konzentration von Carbofuran variierte zwischen 10^{-11} und 10^{-6} M. Die Elektrode wurde in die Lösung getaucht und für 10 min inkubiert. Nach der Zugabe von Acetylthiocholinchloridlösung wurde die Messung gestartet und der Stromfluss aufgezeichnet.

Ab Konzentrationen größer 10^{-6} M betrug die Inhibierung 100%. Die Detektionsgrenze wurde bei einer Inhibierung von 8% durch **Carbofuran** festgelegt und betrug $4,9 \cdot 10^{-8}$ M $\equiv 10,8 \mu\text{g/l}$.

SINHA *et al.* [34] entwickelten einen hochsensiblen Biosensor zur Detektion von Organophosphaten auf Basis von Nickel-Nickeloxid-Nanopartikeln. An diese wurde mit Histidin modifizierte Acetylcholinesterase immobilisiert. Die Nickel-Nanopartikel wurden galvanisch aus einer Nickelsalzlösung auf eine Elektrode abgeschieden. Die Oxidation zu Nickeloxid erfolgte elektrochemisch. Für die Immobilisierung der (His-)6-Acetylcholinesterase wurde diese mit bovinem Serumalbumin und Phosphatpuffer gemischt. Die Lösung wurde auf die Nickeloxid-modifizierte Elektrode aufgesprüht. Nach mehrstündiger Trocknung bei Raumtemperatur war die Elektrode einsatzbereit. In der Abbildung 2.18 ist die Modifizierung der Elektrode schematisch dargestellt.

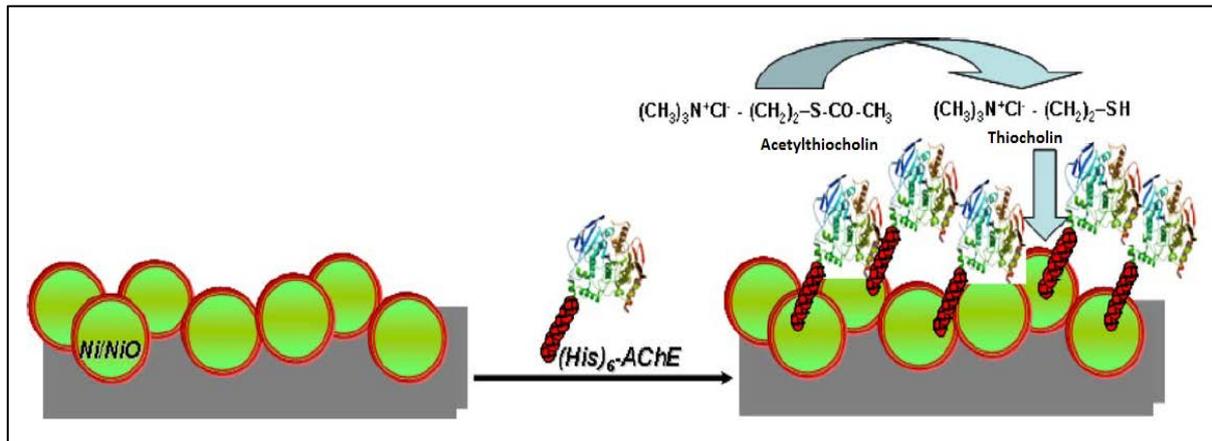


Abb.2.18 schematische Darstellung der Immobilisierung der modifizierten Acetylcholinesterase an die NiO-Nanopartikel nach [34]

Die Charakterisierung erfolgte mit Hilfe zyklischer Voltametrie wie von ANDREESCU *et al.* [75] beschrieben gegen eine Silber/Silberchlorid-Elektrode. Dabei wurde die Stromstärke, die bei der Oxidation von Thiocholin entstehenden Stroms, gemessen. Thiocholin entsteht bei der Hydrolyse von Acetylthiocholin durch die Acetylcholinesterase.

Nach der Bestimmung der Aktivität der immobilisierten Acetylcholinesterase erfolgten Inhibierungsversuche mit dem Modellpestizid Paraoxon. Dazu wurde eine bereits gemessene Elektrode mit einer Paraoxonlösung definierter Konzentration für eine festgelegte Zeit inkubiert. Anschließend wurde die Elektrode erneute mit Hilfe der zyklischen Voltametrie getestet und die resultierende Aktivität der Acetylcholinesterase bestimmt. Im Ergebnis konnte festgestellt werden, dass die AChE bei einer Konzentration von 10^{-8} M Paraoxon vollständig inhibiert war. Die Nachweisgrenze wurde mit dem I_{20} -Wert definiert. Dieser lag bei dem entwickelten Sensor für **Paraoxon** bei 10^{-12} M $\equiv 2,74 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{g/l}$.

VAMVAKAKI [21] und CHANIOTAKIS [21] entwickelten einen Nanobiosensor auf Basis von Liposomen. Liposome sind kugelförmige Gebilde aus oberflächenaktiven Molekülen, meist Phospholipiden. Werden diese in einer dünnen Schicht in Wasser suspendiert, ordnen sie sich dem hydrophilen Rest nach außen und dem hydrophoben bzw. lipophilen Rest nach innen zu einer Kugel an.

Vamvakaki und Chaniotakis kapselten Acetylcholinesterase und den Fluoreszenzfarbstoff Pyranin in Phosphatidylcholin, bekannt als Lecithin, ein. Dafür mischten sie Phosphatidylcholin mit Porin, Phosphatpuffer, Acetylcholinesterase und Pyranin. Porin diente hierbei als Transportprotein. Während mehrerer Gefrier-Auftau-Zyklen entstanden die Liposomen, welche Acetylcholinesterase und Pyranin enthielten. Die entstanden Liposomen wurden mittels Filter klassifiziert, damit für die Messungen Liposome einheitlicher Größe zur Verfügung standen.

Die Aktivität der Acetylcholinesterase wurde mit Hilfe der Ellman-Methode [76] bestimmt. Das Ellman-Prinzip beruht auf der Messung der Produktionsrate von Thiocholin während der Hydrolyse einer 1 mM Acetylthiocholinlösung. Dabei reagiert das Thiocholin mit 5,5'-dithio-bis-nitro-Benzoesäure, welches im Ellman-Reagenz enthalten ist.

Es entsteht ein gelbes Anion, 5-thio-2-nitro-Benzoat. Die Aktivität der Acetylcholinesterase ist gleich der Absorptionsänderung, welche gegen die Zeit aufgetragen wird.

Neben der Aktivitätsbestimmung der Acetylcholinesterase in den oben beschriebenen Liposomen, wurden Vergleichsmessungen mit Liposomen durchgeführt, welche kein Porin enthielten. Bei den Liposomen ohne Porin erfolgte keine Hydrolyse des Acetylcholins. Somit findet eine kontrollierte Diffusion des Substrates durch die Lipidmembran durch das Porin statt und führte damit zur Entstehung von Essigsäure und damit zu einer pH-Wertsenkung in der Nano-Umgebung im Inneren des Liposoms. Diese pH-Wertabnahme zeigte sich im Abfall des Fluoreszenzsignals. Die Messungen der inhibierten Acetylcholinesterase erfolgten nach einer 15-minütigen Inkubation mit einer Lösung, welche Paraoxon bzw. Dichlorvos enthielt. VAMVAKAKI [21] und CHANIOTAKIS [21] legten die Nachweisgrenze bei einer Inhibierung von 25% des Enzyms fest. Die Nachweisgrenze für **Dichlorvos** lag bei $2,0 \cdot 10^{-10} \text{ M} \equiv 0,04 \text{ } \mu\text{g/l}$ und für **Paraoxon** bei $6,7 \cdot 10^{-10} \text{ M} \equiv 0,2 \text{ } \mu\text{g/l}$.

2.3 Immobilisierung pH-sensitiver Farbstoffe

Die Messung von pH-Werten ist eine der wichtigsten analytischen Methoden nicht nur in chemischen Laboratorien, sondern auch im medizinischen Bereich und der Industrie. Der pH-Wert ist zum einen ein Parameter für die Qualität von Lebensmitteln (Milch, Fleisch) [77,78], für die Sauberkeit von Industrieabwässern [79] und ein Kriterium für den „Zustand“ des Blutes [80] und weiteren Körperflüssigkeiten (Urin usw.) [81]. Zum anderen ist er ein wichtiger Kontrollparameter für die optimalen Bedingungen von biochemischen Prozessen [82]. Aber auch enzymatische Reaktionen, wie die Umsetzung von Acetylcholin durch Acetylcholinesterase, können mit Hilfe der pH-Wertmessung verfolgt werden. Acetylcholin wird zu Essigsäure und Cholin hydrolysiert. Dabei dissoziiert die Essigsäure in der wässrigen Lösung und es kommt zum Absenken des pH-Wertes. Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich mit der Thematik der Immobilisierung von pH-sensitiven Farbstoffen an silikatischen Matrizen [44-48] befasst.

GUPTA *et al.* [44] überzogen ein Kunststoff-Silicagel-Verbundfaserkabel mit einem sehr dünnen Silicagel-Film, welcher die Farbstoffe Bromphenolblau, Cresolrot und Chlorphenolrot enthielt.

Die Charakterisierung erfolgte in der in Abbildung 2.19 dargestellten Apparatur.

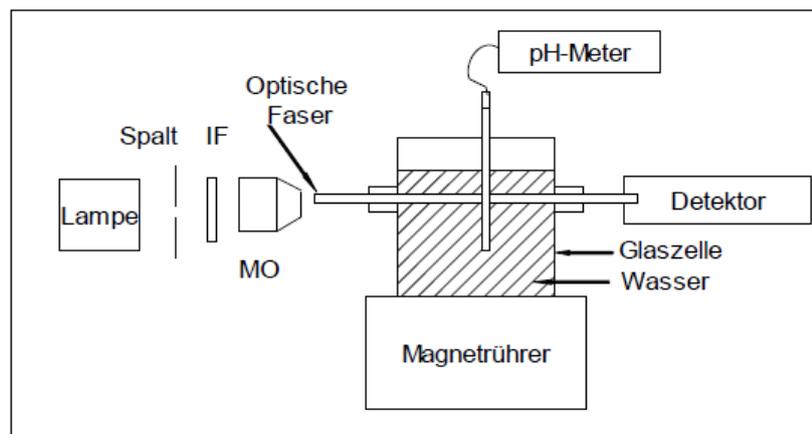


Abb. 2.19 Messapparatur zur Charakterisierung des pH-Sensors nach [44]

Für die Messungen ist das Licht einer Halogenlampe mit einem Filter verwendet worden. Die Messzelle wurde mit deionisiertem Wasser befüllt und mit einem Magnetrührer versehen. Um den pH-Wert des Wassers zu variieren, erfolgte die Zugabe von Natronlauge bzw. Salzsäure. Des Weiteren wurde eine pH-Elektrode zur Kontrolle des pH-Werts eingesetzt.

Nachdem die optimale Wellenlänge der Farbstoffabsorption bestimmt wurde, erfolgten Mehrfachbestimmungen des pH-Werts mit Hilfe des immobilisierten Farbstoffes. Im Ergebnis der Messungen konnte dargestellt werden, dass es unter Verwendung mehrerer Farbstoffe möglich ist, einen Sensor zu entwickeln, der einen großen pH-Bereich messtechnisch erfassen kann.

SCHULZ-EKLOFF *et al.* [45] untersuchten das Verhalten verschiedener Farbstoffe in porösen Silikaten. Diese weisen eine höhere Migrations- und Photostabilität im Vergleich zu organischen Polymermatrizen auf. Die porösen Silikate wurden über den Sol-Gel-Prozess mit dem Precursor TEOS hergestellt.

Die kovalente Bindung des Farbstoffes erfolgte über zwei Varianten. Zum ersten über die Oberflächenmodifizierung mit γ -Aminopropyltriethoxysilan (γ -APTS) und der anschließenden Anbindung des funktionalisierten Farbstoffes. Dies ist in Abbildung 2.20 dargestellt.

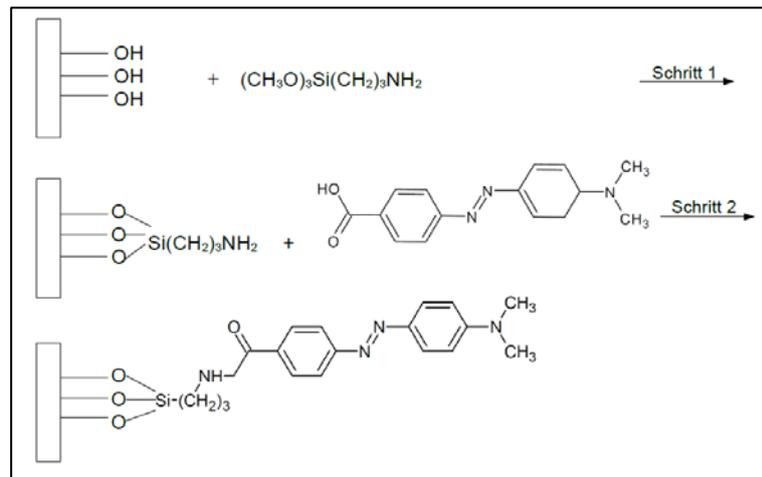


Abb. 2.20 Schematische Darstellung der kovalenten Anbindung mit Hilfe von γ -APTS nach [45]

Die zweite Variante ist die sogenannte Co-Kondensation. Dabei wird ein Triethoxysilan-Derivat des Chromophores verwendet. Dieser kondensiert dann beispielsweise mit TEOS, so wie in Abbildung 2.21 dargestellt.

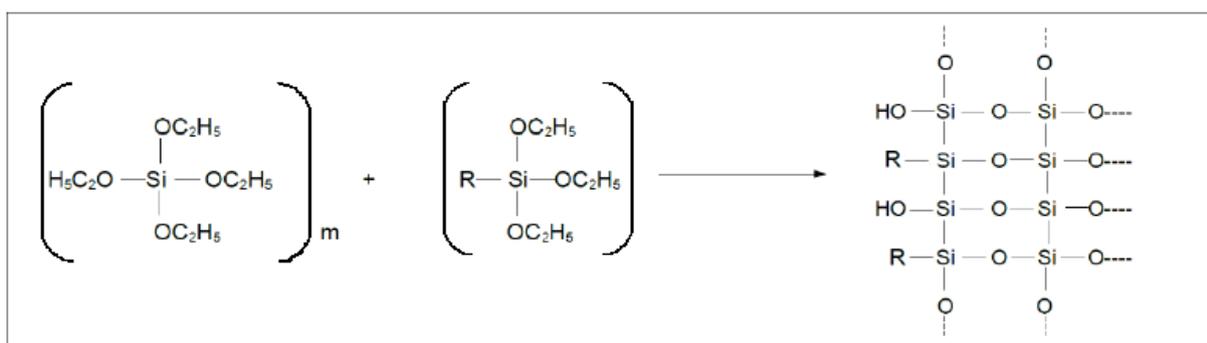


Abb. 2.21 Schematische Darstellung der Co-Kondensation des Triethoxysilan-Derivates des Chromophores nach [45]

Die mit Farbstoff modifizierten Silikate können in unterschiedlichsten Bereichen zum Einsatz kommen. Zum Beispiel als Sensor für die Bestimmung von Ammoniak, als pH-Sensor und Sauerstoffsensor. Es besteht die Möglichkeit, die farbstoffmodifizierten Silikate als Laserkomponente oder optische Schaltungen zu verwenden.

SOTOMAYOR *et al.* [46] entwickelten einen optischen pH-Sensor, welcher auf einem mit Polyanilin modifizierten porösen Vycor-Glas-Komposit basiert. Für das Komposit wurden Vycor-Glasplatten mit den Maßen 10x10x1,5 mm mit einem Porendurchmesser von 8 nm verwendet. Nach der Reinigung in Salzsäure erfolgte eine Aktivierung. Anschließend wurden die Platten gewaschen und für 30 min in einer Lösung aus Salzsäure und Persulfat wiederholt aktiviert. Im Anschluss wurden die modifizierte Platte am Ende eines Glasfaserkabels fixiert.

Die Farbe des Glases hängt von der Konjugation des Polyanilins ab. Entscheidend ist, ob die protonierte oder deprotonierte Form vorliegt. Beide Konjugationen haben unterschiedliche spektrale Eigenschaften. In der Abbildung 2.22 ist ein Reflexionsspektrum bei verschiedenen pH-Werten dargestellt.

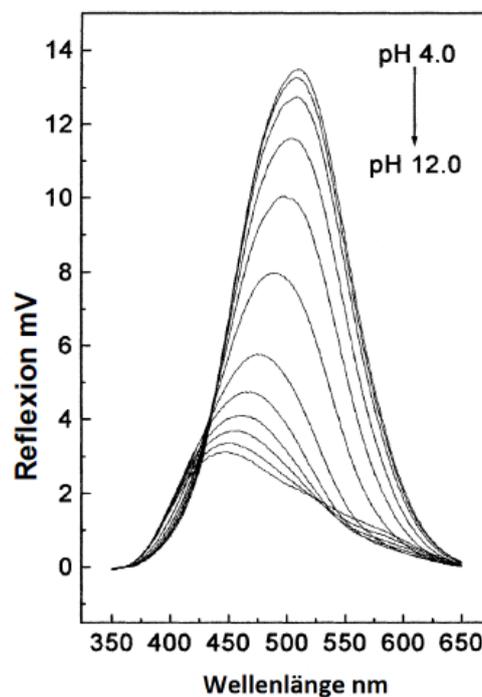


Abb. 2.22 Reflexionsspektrum des Polyanilin-porösen Vycor-Glas Komposits in Lösung verschiedener pH-Werte nach [46]

Für die Untersuchungen des Einflusses der Ionenstärke auf das Polyanilin wurden Messungen in Pufferlösungen mit unterschiedlichen Salzen und Salzkonzentrationen durchgeführt. Im Ergebnis dieser Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Ionenstärke keinen nennenswerten Einfluss hat.

Die Langzeitstabilität des Sensors wurde über einen Zeitraum von fünf Monaten bestimmt. Dazu erfolgte die Lagerung des Sensors in 1 M Salzsäure. Nach jeweils vier Wochen wurden Messungen durchgeführt und die daraus resultierenden Messkurven erstellt. In den fünf Monaten der Lagerung nahm die Intensität der Reflexion nur geringfügig ab. Somit wurde ein stabiler Sensor entwickelt, welcher über einen großen pH-Bereich einsetzbar war.

MILED *et al.* [47] entwickelten einen pH-Sensor, welcher auf einem Farbstoff-dotierten mesostrukturiertem Silikat basierte.

Dabei wurden an eine optische Faser farbstoffenthaltende Silikatplättchen fixiert. Das Silikat wurde mit Hilfe des Sol-Gel-Prozesses generiert. Vor der Gelierung wurde Bromthymolblau zugesetzt. Die Charakterisierung erfolgte mit Hilfe eines UV-vis-Spektrometers in wässrigen Lösungen unterschiedlicher pH-Werte.

Die Absorptionsmessungen zeigten, dass immobilisiertes Bromthymolblau pH-aktiv ist. Da der Porendurchmesser an das Bromthymolblau-Molekül angepasst wurde, bestand kein Leaching-Problem bei Langzeituntersuchungen.

MÜLLER [48] führte Untersuchungen mit immobilisierten acidochromen Farbstoffen durch. Dabei bestimmte er den Einfluss der Ionenstärke der umgebenden Lösung auf das Ansprechverhalten. Als Farbstoffe wurden Styrylacridinabkömmlinge verwendet, welche an porösen Glasmembranen, Hydrogelen und PVC-Flüssigmembranen immobilisiert wurden.

Die porösen Gläser und die Hydrogele stellten eine hydrophile und die PVC-Flüssigmembran eine hydrophobe Mikroumgebung dar. Vor der Immobilisierung des Farbstoffes an den porösen Glasmembranen wurden diese einer Aminosilanisierung unterzogen. Nach der Beladung erfolgten spektrometrische Untersuchungen unter Variation der Ionenstärke. Des Weiteren wurden Untersuchungen zur Langzeitstabilität durchgeführt. Nach einer Lagerung von 112 Tagen wurde eine Sensitivität von 79% relativ zur Ausgangsmessung festgestellt. Außerdem stellte sich anhand der zahlreichen Messungen heraus, dass die Ionenstärke einen starken Einfluss auf die Extinktion in Abhängigkeit vom pH-Wert hat und die Einstellzeiten mehrere Minuten betragen.

3 Experimenteller Teil

3.1 Herstellung des Ausgangsglases

Für die Generierung der porösen Glasmembranen diente ein thermisch phasensepariertes Ausgangsglas der Zusammensetzung:

70 Ma.-% SiO_2 : 23 Ma.-% B_2O_3 : 7 Ma.-% Na_2O

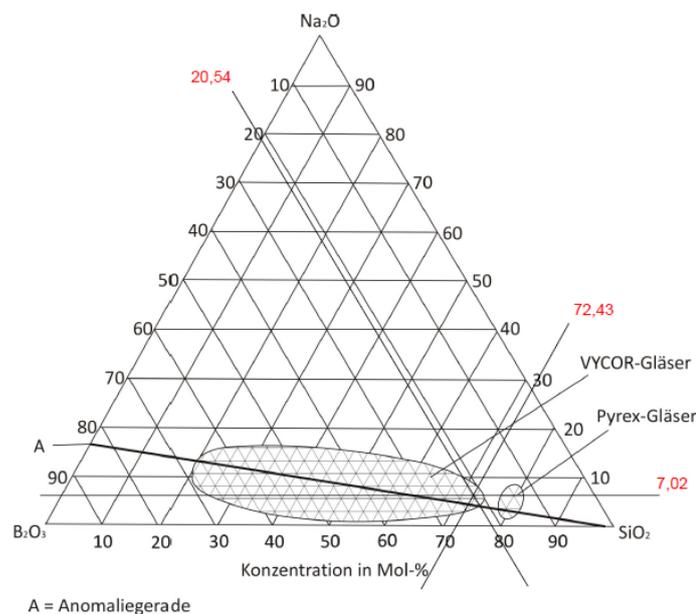


Abb. 3.1 Phasendiagramm des ternären Systems Na_2O - B_2O_3 - SiO_2 nach [83]

Die Verhältnisse der Rohstoffe wurden in oben dargestellter Zusammensetzung gewählt, um die Zug- und Druckspannungen während des Extraktionsprozesses so gering wie möglich zu halten. Bei einer Ausgangsglaszusammensetzung, die sich auf der Anomaliegeraden (Abb.3.1) befindet, erhält man eine maximale, fast spannungsfreie Entmischung [84]. Die verwendete Zusammensetzung liegt nahe der Anomaliegeraden und ist mit roten Zahlen in dem Diagramm in der Abbildung 3.1 gekennzeichnet. Die Abbildung ist in Mol-% dargestellt. Dies war zur genauen Berechnung der Rohstoffeinwaagen erforderlich. Die Rohstoffmischung bestehend, aus Quarzmehl, Bortrioxid und Natriumcarbonat, wurde aufgeschmolzen. Anschließend wurde die Glasschmelze in eine plattenartige Form gegossen und einer optischen Feinkühlung unterzogen. Für die optische Feinkühlung wurde die Platte in einen Ofen mit einer Temperatur von 450°C überführt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Durch die hohe Wärmekapazität des Glases

erhöhte sich die Ofentemperatur unmittelbar nach dem Einbringen des Glasblocks auf 570°C.

Nach ca. 13 Stunden wurde eine Temperatur von 500°C im Glas erreicht. Diese Temperatur stellt die untere Grenze für die strukturbildenden Prozesse dar. Das Abkühlen führt zu einem Temperaturgradienten, welcher zu einer Erhöhung des Netzwerk-SiO₂-Anteils in der natriumreichen Boratphase führt. Das stellt sich in Form einer Trübung des Glases (vom Rand zur Mitte) dar. Die Platte wurde in Blöcke (6-15 cm Kantenlänge) zerteilt (Abbildung 3.2).



Abb. 3.2 Ausgangsglasblock

Foto: Technische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

3.2 Herstellung der Glasmembranen

3.2.1. Thermobehandlung

Die generierten Ausgangsglasblöcke wurden mit Hilfe der Diamantkreissäge *SAW 15* (Firma Logitech) in kleinere Blöcke (z.B. 10x 15x 30 mm) gesägt. Diese Zerteilung war erforderlich, um eine homogene Temperaturverteilung innerhalb des Blocks während der Temperaturbehandlung zu erzielen. Für die Temperaturbehandlung wurden die Glasblöcke in kleine Porzellanschalen gestellt und mittig in einem Muffelofen (Typ MLW LM 112.10) platziert.

Je nach gewünschter späterer Porengröße wurde der Ofen auf eine Temperatur zwischen 660°C und 690°C aufgeheizt und die Temperatur für 24 Stunden gehalten. Die notwendigen Temperaturen sind in der Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Nach 24 Stunden erfolgte eine schnelle Abkühlung auf unter 500°C. Das Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte dann langsam über einen Zeitraum von ca. 24 Stunden.

Die Thermobehandlung ist notwendig, um die Entmischungsbereiche zu vergrößern, welche für eine spätere Porengröße der Membranen entscheidend sind.

Tab. 3.1 Zusammenfassung der notwendigen Temperaturen

<i>geforderter Porendurchmesser</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeitdauer</i>	<i>resultierende Bezeichnung</i>
50 nm	630°C	24 h	630/24
65 nm	660°C	24 h	660/24 ³
75 nm	660°C	24 h	660/24 ³
100 nm	690°C	24 h	690/24

³ Die unterschiedlichen Porendurchmesser ergeben sich aufgrund der späteren Nachbehandlung (Kapitel 3.2.3)

3.2.2 Formgebung

Um aus den getemperten Glasblöcken Platten der Abmessung 10x10x1 mm herzustellen, wurden diese mit Hilfe eines Thermoklebstoffes auf einem Träger fixiert, welcher in die Innenlochsäge *ANNULAR 55* (Firma Logitech) eingespannt wurde. Dort erfolgte das halbautomatische Sägen in planparallele Platten mit einer von Dicke 1 mm. Im letzten Schritt wurden die Platten mit Hilfe einer umgebauten und mit Diamantsägeband ausgerüsteten

SAW 15, vom ursprünglichen Block getrennt und dabei auf das exakte Maß von 10x 10x 1 mm gebracht.

Neben den eckigen Glasmembranen wurden für Sensorstrukturen auch runde Glasmembranen mit einem Durchmesser von 10 mm und den Dicken 0,2 mm, 0,5 mm und 1 mm getestet. Um diese zu generieren, wurden drei verschiedene Möglichkeiten untersucht.

1. Variante: manuelles Verrunden

Das Ausgangsglas wurde mittels Diamantkreissäge in kleine Quader geschnitten, deren Grundfläche dem späteren Durchmesser der Membranen entspricht. Danach erfolgte das manuelle Verrunden der Glasquader mittels Bandschleifmaschine.

2. Variante: Kernbohrung

Bei diesem Verfahren wurden die runden Stäbe direkt aus dem Ausgangsglas ausgebohrt. Firma Knopp hat dazu wassergekühlte Kernbohrer (Abb.3.3) entwickelt. Diese wurden in eine Tischbohrmaschine gespannt und ermöglichten die Generierung von Glasstäben mit einem Durchmesser von 10 mm in variabler Länge (Abb.3.4).



Abb. 3.3 Kernbohrer der Firma Knopp

Foto: Technische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



Abb. 3.4 runde Glasstäbe

3. Variante: Formgebung mittels Laserschneiden

Diese Art der Formgebung erfolgte an fertig generierten viereckigen porösen Glasmembranen, d.h. die Porenstruktur war schon vollständig ausgebildet.

Für die Konfektionierung der porösen Glasmembranen wurde das Laserstrahlschmelzschnitten eingesetzt. Bei den 1 mm dicken Membranen wurde ein UV-Laser verwendet. Im Ergebnis des Schneidvorganges sind die Randbereiche der kreisförmigen Glasmembranen verschmolzen und die Poren nach außen verschlossen. Für den Schneidvorgang mussten die Prozessparameter: Laserleistung, Vorschubgeschwindigkeit, Prozessgasstrom, strahlgeometrische Parameter u.a. aufeinander abgestimmt und optimiert werden (Abbildung 3.5). Außerdem spielte die Wahl der Unterlage eine maßgebliche Rolle, wobei für die hier verwendeten Glasmembranen eine Keramikunterlage als günstigste Lösung bestimmt wurde.

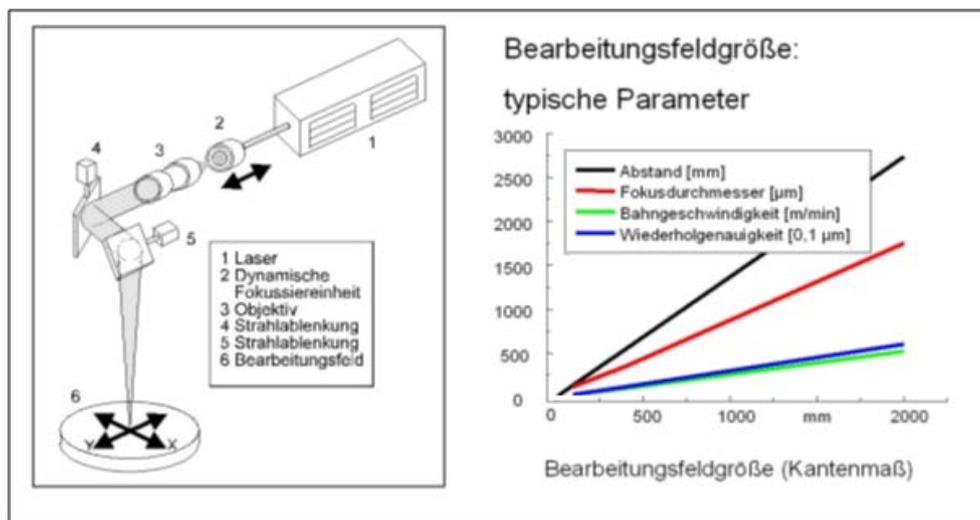


Abb. 3.5 Laserstrahlbearbeitung mittels Scanner und Laser [59]

Während des Schneidvorganges müssen alle Prozessparameter so geführt werden, dass ein möglichst optimaler Kompromiss für die wichtigsten Kenngrößen gefunden wird. Im Einzelnen ist die gemittelte Rauftiefe die bestimmende Rauigkeitskennzahl für die bearbeitete Oberfläche. Die Rauigkeit von Laserschnitten kann in Abhängigkeit des Messortes verschiedene Werte annehmen. Um dennoch die Vergleichbarkeit sicherzu-

stellen, wird der R_z -Wert bei $2/3$ der Materialdicke (von oben gemessen) bestimmt. Die Grathaftung ist ein Maß für den Anteil des anhaftenden Grates an der Materialunterseite. Die Grathöhe gibt die gemittelte Höhe des anhaftenden Grates an. Der Anschmelzradius ist der Radius der sich an der Schnittoberseite ausbildenden Rundung. Die Wärmeeinflusszone kennzeichnet die durch Wärmeeinfluss in ihren Eigenschaften veränderte Zone des Werkstücks.

Die Schnittfugenbreite wird an der breitesten Stelle der Schnittfuge bestimmt. Hierbei ist zu beachten, dass für die hohe Maßhaltigkeit der fertigen Glasmembranen die halbe Schnittfugenbreite bei der Führung der Laserstrahlmitte zu berücksichtigen ist. Der Flankenwinkel gibt die Flankensteilheit der Schnittkante an (gemessen wird die Abweichung der Flanke von der Senkrechten).

Bei den bearbeiteten Glasmembranen muss der örtliche Gradient der Wärmeeinwirkung möglichst gering gehalten werden, da ansonsten Materialrisse im Glasmaterial die Folge sind. Die Wärmeeinflusszone ist bei den bearbeiteten Glasmembranen dadurch zu erkennen, dass in diesem Bereich die ansonsten poröse Glasmasse zu einem verschlossenen Glaskörper verformt wird.

Um aus denen nach Variante 1 und 2 gewonnen Glasstäben (Abb.3.4) Membranen zu erhalten, wurden diese in Epoxidharz eingebettet. Dafür wurde aus Pappe eine Form gefertigt. In diese wurde eine Schicht Epoxidharz von ca. 1 cm gegeben und ausgehärtet (Abb. 3.6). Anschließend wurde der Glasstab mittig auf dem entstandenen Sockel in der Form platziert und die Form mit Epoxidharz aufgefüllt. Nach dem vollständigen Aushärten des Epoxidharzes wurde die Pappform abgelöst. Der so erhaltene Block (Abb.3.7) wurde mit Hilfe eines Thermoklebstoffes auf einen Träger fixiert, welcher in die Innensäge *ANNULAR 55* (Firma Logitech) eingespannt wurde. Dort erfolgte das halbautomatische Sägen in planparallele Platten der Dicke 0,2 mm, 0,5 mm bzw. 1 mm. Im letzten Schritt wurden die Membranen vereinzelt in dem sie aus dem Epoxidharz herausgelöst wurden.

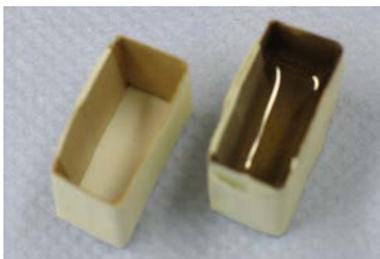


Abb. 3.6 Pappform (links)
Form mit erster Schicht Epoxidharz



Abb. 3.7 ausgehärteter Epoxidharzblock

Foto: *Technische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*

3.2.3 Generierung der Porenstruktur

Die Erzeugung der Porenstruktur erfolgte durch eine Extraktion mit Salzsäure und einer alkalischen Nachbehandlung mit Natronlauge. Die Extraktion wurde mit 3 N Salzsäure in einem speziell dafür hergestellten Korb mit Trennwänden aus Teflon (Abb.3.8) durchgeführt. Zuerst wurde die Salzsäure auf 35°C erhitzt und danach der Korb mit den Membranen eingehängt. Die Salzsäure wurde weiter auf 90°C erhitzt und der Korb kontinuierlich mit Hilfe eines kleinen Rührmotors gedreht. Die Zeitmessung begann mit dem Erreichen der Temperatur von 90°C. Je nach geforderter Porengröße und der Dicke der Membran wurde die Zeitdauer der Extraktion variiert. Die genauen Zeitangaben mit der entsprechenden Porengröße sind in der Tabelle 3.2 zusammengefasst.

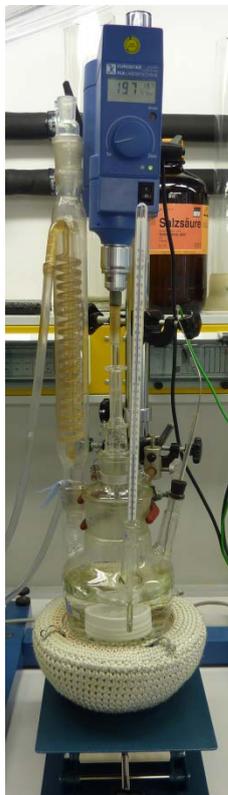


Abb. 3.8 Extraktionsanlage

Abb. 3.9 Anlage zur alkalischen Nachbehandlung

Foto: Technische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Nach Ablauf der definierten Zeit wurden die extrahierten Glasplatten aus der Salzsäure entfernt und mit destilliertem Wasser gewaschen. Dann erfolgte die alkalische Nachbehandlung mit 0,5 N Natronlauge bei Raumtemperatur in einem speziellen Kunststoffkorb (Abb. 3.9). Die Dauer der alkalischen Nachbehandlung richtete sich nach der gewünschten Porengröße und der Dicke der Membran. Die Angaben sind der Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Der alkalischen Nachbehandlung folgte mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser und eine anschließende Trocknung.

Tab. 3.2 Zusammenfassung der Bedingungen zur Porengenerierung

Porengröße (Plattendicke)	Temperbedingungen	Extraktion	Alkalische Nachbehandlung
50 nm (0,2mm dick)	630°C für 24 h	3 N HCl für 1 h	0,5 N NaOH für 1 h
65 nm (0,2mm dick)	660°C für 24 h	3 N HCl für 2 h	0,5 N NaOH für 3 h
75 nm (1mm dick)	660°C für 24 h	3 N HCl für 4 h	0,5 N NaOH für 4 h
100 nm (0,2mm dick)	690°C für 24 h	3 N HCl für 2 h	0,5 N NaOH für 3 h

3.3 Oberflächenfunktionalisierungen

3.3.1 Modifizierung mit Aminosilanen

Nach der Generierung der Porenstruktur wurden die Glasmembranen durch einstündiges Kochen in 5%-iger Salpetersäure gereinigt. Anschließend wurden sie mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet.

Dann erfolgte die Oberflächenmodifizierung mit Aminosilanen. In dieser Arbeit wurden γ -Aminopropyltriethoxysilan (γ -APTS) und γ -Aminopropyltrimethoxysilan (γ -APTMS) verwendet. Die Durchführung der Oberflächenmodifizierung war für beide Aminosilane identisch.

Für die Oberflächenmodifizierung wurden mehrere Membranen so in eine Petrischale gelegt, dass jede frei und ohne Überlappungen liegen konnte. Es erfolgte die Zugabe der frisch hergestellten wässrigen (1 Ma-%) Aminosilanlösung (je Membran 1 ml). Die mit der Lösung bedeckten Membranen wurden anschließend für 1 bzw. 2 Stunden bei Raumtemperatur im Vakuum bei 600 mbar belassen. Dies war notwendig, um eine vollständige Füllung des Porensystems zu realisieren. Damit die Reaktion der Oberflächen-silanolgruppen mit dem entsprechenden Aminosilan optimal verlaufen konnte, wurden die benetzten Membranen mit dem Deckel der Petrischale abgedeckt und für zwei bzw. vier Stunden bei 70°C im Trockenschrank belassen. Danach wurden die Membranen mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen, um das überschüssige Aminosilan zu entfernen.

Abschließend erfolgte die Trocknung der modifizierten Membranen bei 100°C. Die getrockneten Membranen wurden im Exsikkator über Trockenmittel abgekühlt.

Tab. 3.3 Probenbezeichnung

d_M in mm	t_V in h	t_T in h	T in °C	Probenbezeichnung
0,2	0,5	1	25	M _{0,2} 50-0,5-1-25
0,2	0,5	1	70	M _{0,2} 50-0,5-1-70
0,2	1	2	70	M _{0,2} 50-1-2-70
0,2	2	4	70	M _{0,2} 50-2-4-70
0,5	0,5	1	25	M _{0,5} 50-0,5-1-25
0,5	0,5	1	70	M _{0,5} 50-0,5-1-70
0,5	1	2	70	M _{0,5} 50-1-2-70
0,5	2	4	70	M _{0,5} 50-2-4-70

Die Probenbezeichnung der Membranen ergibt sich aus dem Porendurchmesser, der Dicke d_M und den Parametern der Aminosilanisierung (Zeitdauer der Unterdruckbehandlung t_V , Zeitdauer t_T und Temperatur T der Wärmebehandlung). Mit der tiefgestellten Ziffer ist die Dicke der Membran in mm gekennzeichnet. M steht für Membran und die Ziffer, hier 50, beschreibt den Porendurchmesser in nm.

Beispiel: **M_{0,2}50-0,5-1-25** bezeichnet eine 0,2 mm dicke Membran mit einem Porendurchmesser von 50 nm. Diese wurde mit 10 Ma%-iger γ -APTS für 0,5 h bei 400 mbar und für 1 h bei Normaldruck und 25°C behandelt.

Außerdem wurden die weiterführenden Modifizierungen wie Aktivierung und das Anbinden von Glutardialdehyd untersucht. Diese Proben haben ein **A** bzw. **G** am Ende des Namens.

3.3.2 Anbindung von Glutardialdehyd

Vor der Enzymimmobilisierung erfolgte eine Behandlung mit 2,5%-iger wässriger Glutardialdehydlösung für 1 Stunde bei 600 mbar. Das Glutardialdehyd diente als Spacer und ist notwendig, um das Enzym kovalent an die Membranoberfläche zu binden. Diese Behandlung führte zu einer rot-violetten Färbung der Membran (Abb. 3.11). Im Anschluss wurden die Membranen mehrmals mit Phosphatpuffer mit einem pH-Wert= 7 gewaschen.

Die modifizierten Membranen wurden im Phosphatpuffer bzw. auf mit Phosphatpuffer getränkten Celluloseacetat-Schwämmchen bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

3.3.3 Enzymimmobilisierung

Nach diesen Modifizierungsschritten war es möglich, die Acetylcholinesterase vom Ziterraal mit 350 U/mg bzw. 1000 U/mg anzubinden. Dies erfolgte mit Lösungen unterschiedlicher Enzymkonzentrationen bei 0°C auf Eis bei einem Unterdruck von 600 mbar. Dazu wurden mehrere mit γ -APTS und Glutardialdehyd modifizierte Membranen sich nicht überdeckend in Kristallisierschalen gelegt und mit je 1 ml der jeweiligen Puffer- Enzymlösung bedeckt. Die Kristallisierschalen wurden in einem Wasser-Eis-Gemisch für 3 Stunden bei 600 mbar gelagert. Abschließend wurden die Membranen mehrmals mit Puffer gewaschen und wiederum im Puffer bzw. auf puffergetränkten Celluloseacetat-Plättchen bei 4°C bis zur Vermessung aufbewahrt. Einige Membranchargen wurden zweimal mit einer Lösung der gleichen Konzentration behandelt, um zu untersuchen, ob es einen Aktivitätsunterschied zwischen einfach und doppelt behandelten Membranen gibt.

3.4 Charakterisierungen

3.4.1 Charakterisierung der Eigenschaften der nativen Membranen

Zur Bestimmung der Texturdaten wie Porendurchmesser, spezifische Oberfläche und spezifisches Porenvolumen wurden die Membranen nach dem Extraktionsprozess mittels Quecksilber-Intrusion charakterisiert. Durch Permeabilitätsuntersuchungen mit Hilfe von Stickstoff wurde die Durchlässigkeit der Membranen charakterisiert.

Durch mechanische Stabilitätstests konnte die dickennormierte Bruchfestigkeit der einzelnen Membranen bestimmt werden.

Die Elektronenmikroskopie diente der Veranschaulichung der Mikrostruktur der Membranen.

Für die Anwendung in der optischen Sensorik waren Analysen mit Hilfe eines UV-vis-Spektrometers von großer Bedeutung. Diese dienten der Ermittlung der Grundabsorption der einzelnen Membranen mit verschiedenen Porendurchmessern. Anhand der erhaltenen Ergebnisse wurden die Porengrößen für die Membranen festgelegt, welche für die Immobilisierung des Farbstoffes genutzt werden sollten.

3.4.1.1 Quecksilber-Intrusion

Zur Bestimmung der Texturwerte, wie Porenradius, Porenvolumen und Oberfläche ist die Quecksilber-Intrusion eine der häufig genutzten Methoden. Die Quecksilber-Intrusion basiert auf dem fortschreitenden Eindringen des Quecksilbers in die Porenstruktur der zu vermessenden Probe unter kontrolliertem Druck. Quecksilber ist eine nicht-benetzende Flüssigkeit, d.h. es kommt zu keinem spontanen Eindringen in die Poren. Erst durch Anlegen eines äußeren Druckes gelangt das Quecksilber in die Porenstruktur. Der dafür erforderliche Druck ist indirekt proportional zur Porengröße. Das bedeutet, dass für das Einpressen des Quecksilbers in Makroporen ein geringerer Druck notwendig ist als in Meso- und Mikroporen.

Vor der Messung wurden die jeweiligen Proben 24 Stunden bei 120°C in Luft ausgeheizt. Die Messungen erfolgten danach mit einem Gerät vom Typ PASCAL 440 der Firma ThermoFinnigan.

Bei der Messung wurde der Druck gegen das in die Pore intrudierende Quecksilbervolumen aufgezeichnet. Aus den erhaltenen Daten konnten das Porenvolumen und die Porengrößenverteilung bestimmt werden. Mit Hilfe der **Washburn-Gleichung** [87] (Gl.3.1) erfolgte Berechnung der Porengrößenverteilung unter Verwendung des zylindrischen Porenmodells.

$$r_p = \left(\frac{2\sigma}{p} \right) \cos \theta \quad (3.1)$$

θ = Kontaktwinkel

σ = Oberflächenspannung

Für den Kontaktwinkel von Quecksilber wurde ein Wert von $141,3^\circ$ und für Oberflächenspannung ein Wert von 484 mN/m angenommen.

Das kumulative Porenvolumen aller zugänglichen Poren mit einem Radius gleich oder größer des als nach Gleichung 3.1 berechneten, wurde durch das Volumen an Quecksilber V_i dargestellt, welches bei einem Druck p_i in die Poren intrudierte.

Die Repräsentation der Poren-Volumen-Verteilung erfolgte gegen eine logarithmische Porenachse. Dabei wurden die gemessenen Gesamtvolumina V_i gegen den $\log r_i$ aufgetragen. Weiterhin erfolgte eine Auftragung des Differentialquotienten (dV/dr_i) gegen den logarithmischen Mittelwert der Porenradien $\log [(r_i + r_{i+1})/2]$.

Die Berechnung der spezifischen Oberfläche erfolgte mit Hilfe der Annahme des zylindrischen Porenmodells über die Mantelflächen der Porenklassen $A = 2V_i/r_i$. Somit ergibt sich die spezifische Oberfläche aus der Summe der Mantelflächen aller Porenklassen [87].

3.4.1.2 Permeabilitätsuntersuchungen

Die Permeabilitätsuntersuchungen von Stickstoff durch die porösen Glasmembranen wurden mit einem einfachen, eigens dafür entwickelten, experimentellen Aufbau (Abb. 3.13) durchgeführt. Bei Permeabilitätsmessungen wird der Gasfluss durch poröse Membranen bei Anlegen einer Druckdifferenz bestimmt. Die Membranen wurden dazu mit Hilfe eines Mehrkomponentenklebstoffes auf eine Platte mit einer Bohrung (Durchmesser 1 bzw. 2 mm) geklebt (Abb. 3.12), die in einem speziellen Aufsatz an einer Turbomolekularpumpe der Firma Pfeiffer TMU 261 befestigt wurde (Abb. 3.13). Der Bereich oberhalb der Membran wurde bei einem Druck zwischen 1100 bis 1500 mbar (p_1) von einem leichten Stickstoffstrom überstrichen. Durch Anlegen eines Unterdrucks konnte bei Raumtemperatur der Gasstrom L_{Platte} ermittelt werden, indem das entstehende Vakuum (p_2) unterhalb der Membran mit Hilfe eines Ionisations-/Kaltkathodenmanometers vom Typ TPG 251 der Firma Pfeiffer gemessen wurden.

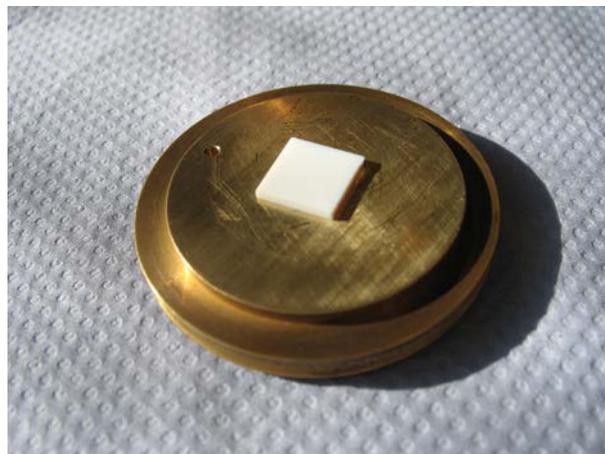


Abb. 3.12 Platte mit aufgeklebter Membran zur Bestimmung der Permeabilität
Foto: Technische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

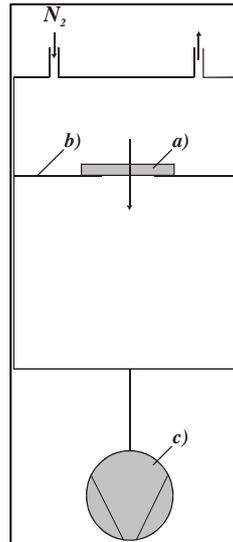


Abb. 3.13 Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Durchführung der Permeabilitätsmessungen [88]

- a) poröse Glasmembran
- b) speziell konstruierter Aufsatz
- c) Vakuumpumpe

$$L_{Platte} = \frac{S_p \cdot p_2}{(p_1 - p_2) \cdot A} \quad (3.2)$$

L_{Platte} = Gasfluss durch die Membran [cm/s]
 S_p = Saugleistung der Pumpe [210 l/s]
 p_1, p_2 = Druck oberhalb p_1 bzw. unterhalb p_2 der Membran
 [mit $p_1 \gg p_2$, $p_1 = 1100 \text{ mbar} - 1500 \text{ mbar}$]
 A = Lochfläche [cm²]

Mit Hilfe des nach Gleichung 3.2 ermittelten Gasflusses und der Membrandicke d konnte die Permeabilität P_{Mem} nach Gleichung 3.3 berechnet werden.

$$P_{Membran} = L_{Platte} \cdot d \quad (3.3)$$

$P_{Membran}$ = Permeabilität [cm²/s]
 d = Dicke der Membran [cm]

3.4.1.3 Mechanische Festigkeitsprüfungen

Zur mechanischen Festigkeitsprüfung wurde mit Hilfe einer Durchstoßeinrichtung die materialspezifische dickennormierte Bruchkraft F_B der porösen Glasmembranen bestimmt. Die Messungen erfolgten an der Universalmaterialprüfmaschine ZWICK 1120 (Firma Zwick). Die Membranen wurden auf eine Grundplatte mit einer Bohrung

(Durchmesser 4,4 mm) gelegt und von einem Stempel (Durchmesser 3,2 mm) durchstoßen. Dabei wurde die benötigte Kraft mit einem 200 N Kraftaufnehmer in Beziehung zum zurückgelegten Weg registriert. Die Prüfgeschwindigkeit des Stempels betrug 0,01 mm/min. Die Messung wurde nach einem Kraftabfall von 85% beendet.

3.4.1.4 Elektronenmikroskopie

Strukturelle Informationen zu den Membranen wurden mit Hilfe der Elektronenmikroskopie erhalten. Die Aufnahmen ermöglichten eine dreidimensionale Ansicht der porösen Glasstruktur.

Die Aufnahmen erfolgten mit einem Rasterelektronenmikroskop des Typs ESEM XL 30 FEG (Feldemission) der Firma Philips. Damit konnte eine bis zu 200.000-fache Vergrößerung erreicht werden. Die Proben wurden an einer frischen Bruchfläche untersucht. Die Untersuchungen wurden bei einer Spannung von 12 kV, einem Probenabstand von 5 mm und einem Druck von 1 Torr in einer Wasserdampf-atmosphäre durchgeführt. Mit Hilfe eines scharf fokussierten Elektronenstrahls wird die Probe rasterförmig abgetastet. Dabei kommt es zu Rückstreu- und Sekundärelektronen.

Die Sekundärelektronen werden von der Probenoberfläche erzeugt und zeichnen sich durch ihre geringe Energie aus. Die zurückgestrahlten Elektronen stammen aus tiefer gelegenen Bereichen der Probe und geben Informationen über die Zusammensetzung. Schwere Elemente streuen stärker und erscheinen somit heller im Bild.

Die Bildkontraste hängen von der Orientierung der einzelnen Oberflächenstrukturen ab. Strukturen, welche parallel zum Detektor liegen, werden im Bild heller dargestellt, als anders orientierte Flächen [89].

In der Abbildung 3.14 ist der Aufbau eines Elektronenmikroskops schematisch dargestellt.

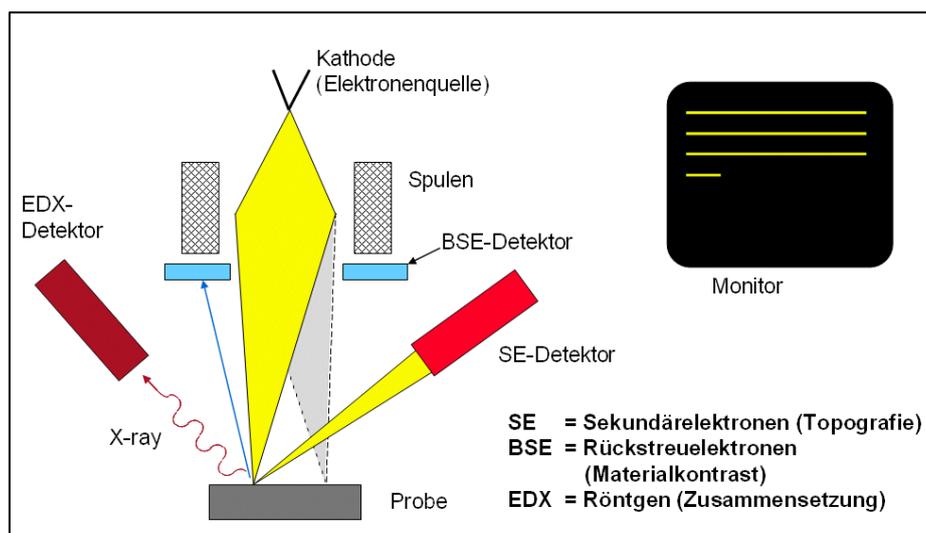


Abb. 3.14 Schematische Darstellung eines Elektronenmikroskops [89]

3.4.2 Charakterisierung der Oberflächenmodifizierungen

3.4.2.1 Bestimmungen der Aminogruppendichte

Ein Teil der Membranen, welche mit γ -Aminopropyltriethoxysilan (γ -APTS) modifiziert wurden, wurde für Leaching-Tests verwendet. Dafür wurden je 2 Membranen in ein verschließbares Gläschen gelegt und mit Puffer bedeckt und im Kühlschrank gelagert. Im frischen Zustand, nach 1 Tag, 1 Woche, 2 Wochen, 3 Wochen und 4 Wochen wurde eine Bestimmung der Aminogruppen nach der Methode von VOROSILOVA [90] vorgenommen. Dazu wurden die Membranen aus dem Puffer genommen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden sie mit 20 ml 0,01 N Salzsäure bedeckt, gerührt und für 20 min ruhen gelassen. Während der Inkubationszeit wurde die Titerbestimmung der 0,01 N NaOH vorgenommen. Dazu wurden 3 Proben 0,01 N HCl zu je 5 ml in Erlenmeyerkolben überführt und mit 0,01 N NaOH gegen Phenolphthalein von farblos zu schwach rosa titriert.

Aus den erhaltenen Werten wurde der Mittelwert gebildet und der Titer nach folgender Gleichung 3.5 berechnet.

$$f = \frac{V_{\text{theoretisch}}}{V_{\text{praktisch}}} \quad (3.4)$$

Nach 20 Minuten wurde die Lösung dekantiert und in Proben zu je 5 ml in Erlenmeyerkolben überführt. Die Lösungen wurden mit 0,01 N NaOH gegen Phenolphthalein titriert. Anhand der erhaltenen Werte und den Gleichungen 3.6 und 3.7 wurde die Anzahl der Aminogruppen berechnet.

$$c_{\text{HCl}} = \frac{c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}} \cdot f_{\text{NaOH}}}{V_{\text{HCl}}} \quad (3.5)$$

$$n_{\text{NH}_2} = \frac{V \cdot (c_0 - c_{\text{HCl}})}{m} \quad (3.6)$$

f = Titer der Natronlauge
 c_{HCl} = Konzentration der Salzsäure nach der Reaktion [mol/l]
 V_{NaOH} = Volumen an Natronlauge [l]
 c_{NaOH} = Konzentration der Natronlauge (0,01 mol/l)
 V_{HCl} = Volumen an Salzsäure [l]
 n_{NH_2} = Menge der Aminogruppen [mol/g]
 c_0 = Ausgangskonzentration der Salzsäure (0,01 mol/l)
V = Gesamtvolumen der Salzsäure [l]
m = Masse an modifizierten Glas [g]

Die auf diese Weise berechnete Stoffmenge pro Gramm kann mit Hilfe der Avogadro-Konstante in eine konkrete Teilchenzahl pro Gramm umgerechnet werden:

$$\text{Anzahl der Teilchen} = n_{\text{NH}_2} \cdot N_A \quad (3.7)$$

N_A = Avogadro-Konstante

Bezieht man zudem die Teilchenzahl pro Gramm auf die spezifische Oberfläche, die mittels Quecksilberintrusion bestimmt wurde, erhält man die Teilchenzahl für die Fläche von einem Quadratnanometer:

$$A_o = \frac{4V}{d} \quad (3.8)$$

V = Porenvolumen [m^3/g]

d = mittlerer Porendurchmesser der betrachteten Größenklasse [m]

$$\text{Teilchen}/\text{nm}^2 = \frac{n_{\text{NH}_2} \cdot N_A}{A_o} \quad (3.9)$$

A_o = spezifische Oberfläche [m^2/g]

Neben den Bestimmungen mittels Titration ist eine Untersuchung mit Hilfe der Elementaranalyse möglich. Bei dieser wird die Probe exakt ausgewogen und wenn notwendig nach einer elementspezifischen Methode aufgeschlossen. Im Anschluss erfolgt die Verbrennung mit reinem Sauerstoff. Die entstandenen Gase werden mit Hilfe eines Trägergases über heiße Kupferkontakte geleitet. Dabei werden die Stickoxide zu reinem Stickstoff reduziert. Anschließend wird das Gasgemisch im GC separiert, detektiert und quantifiziert. Anhand der erhaltenen Mengen an CO_2 , H_2O und N_2 kann die Menge an gebundenem Stickstoff, Kohlenstoff und Wasserstoff ermittelt werden. Aus den erhaltenen Werten lässt sich mit folgenden Gleichungen die Anzahl der Stickstoffmoleküle bzw. der Aminogruppen berechnen:

$$m_N = m_E \cdot \eta \cdot 1/100 \quad (3.10)$$

$$n_N = \frac{m_N}{M_N} \quad (3.11)$$

m_N = Masse an Stickstoff [g]

m_E = Einwaage der Probe [g]

η = Masseprozent Stickstoff [Ma.-%]

M_N = molare Masse Stickstoff [g/mol]

n_N = Anzahl der Stickstoffmoleküle [mol]

Die Anzahl der Stickstoffmoleküle ergeben sich dann analog zu den Gleichungen 3.9 und 3.10, wobei in der letzten Gleichung noch die eingewogene Masse berücksichtigt werden muss, um die Teilchenzahl pro Gramm zu erhalten.

Mit Hilfe der Gleichung 3.8 können die Moleküle pro Gramm auf die Oberfläche bezogen werden.

3.4.3 Bestimmung der Enzymaktivität

3.4.3.1 Messungen am freien Enzym

Dafür wurden 20 ml AChCl- Lösung verschiedener Konzentrationen auf 25°C temperiert. Anschließend erfolgte die Einstellung des pH-Wertes mit 2-3 Tropfen 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatlösung. Nach der Zugabe von 2 ml Enzym-Puffer-Lösung $c_{\text{Enzym}} = 0,03 \text{ mg/ml}$ (1 mg Enzym in 30 ml Phosphatpuffer gelöst) startete die Reaktionsverfolgung mittels pH-Meter. Alle Vorgänge erfolgten unter stetigem Rühren mit einem Magnetrührer.

3.4.3.2 Messungen am immobilisierten Enzym

Für die Durchführung der Enzymtests wurden anfangs 20 ml später 4 bzw. 2 ml Acetylcholinchloridlösung mit einer Konzentration von 0,2 mol auf 25°C bzw. 37°C temperiert und mit einer Dinatriumhydrogenphosphatlösung der Konzentration 0,05 mol bzw. 0,2 mol auf den pH= 7 bzw. 8 eingestellt. Die Lösung wurde mit Hilfe eines Magnetrührers stetig gerührt (Abb. 3.15). Die Änderung des pH-Wertes wurde mittels des pH-Messgerätes *Mettler Toledo Inlab 410* verfolgt. Um die Messungen mit diesem durchführen zu können, ist ein Mindestvolumen von 4 ml erforderlich.

Vor Beginn der Messung wurde am PC, an welchem das pH-Meter angeschlossen war, das Programm Terra Term Pro und ein Textfile mit der entsprechenden Bezeichnung geöffnet. Terra Term zeichnete den pH-Wert in einem Zeitintervall von einer Sekunde auf.

Die entsprechende Membran wurde in die Lösung gegeben und die Aufzeichnung der pH-Werte wurde gestartet. Nach einer Messdauer von 10-15 min wurde die Aufzeichnung beendet. Die Membran wurde aus der Messlösung entfernt und bis zur weiteren Vermessung in Phosphatpuffer bei 4°C gelagert.



Abb. 3.15 Messapparatur zur Bestimmung der Enzymaktivität
 Foto: Technische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

3.4.3.3 Inhibierungsmessungen am immobilisierten Enzym

Herstellung der Carbofuran-Lösung:

Ausgehend von dem gesetzlichen Grenzwert der Gesamtmasse an Pestiziden im Trinkwasser (0,0005 mg/l [91]) und in Lebensmitteln (0,02 mg/kg [9]) wurde eine Lösung von 1 mg Carbofuran auf 1000 ml destilliertem Wasser hergestellt.

Die enzymladenen Membranen wurden nach der Aktivitätsbestimmung mit Carbofuran inhibiert. Dafür wurden zwei Varianten der Inhibierung getestet. Zum einen wurde die Carbofuranlösung in verschiedenen Volumina (0,5 μ l- 2 μ l) mit der Konzentration 1 mg/l direkt in die Acetylcholinchloridlösung gegeben und zum anderen fand die Inhibierung vor der Vermessung in 4 ml destillierten und mit Carbofuran versetzten Wasser statt. Hierbei wurden wieder 4 ml Acetylcholinchloridlösung auf 25°C temperiert und auf den erforderlichen pH= 7 bzw. 8 eingestellt. Aufgrund der Verdünnung der geringen Volumina an Carbofuran-Lösung durch die Substratlösung war es möglich, den Grenzwert für Obst und Gemüse [9] mit Hilfe der hergestellten Carbofuran-Lösung zu unterschreiten.

Beispiel: Stammlösung Carbofuran $c = 1 \text{ mg/l}$

$V_{\text{Carbofuran}} = 0,5 \mu\text{l}$ Carbofuranlösung enthalten $5 \cdot 10^{-7} \text{ mg}$ Carbofuran

diese werden $V_{\text{Substrat}} = 4 \text{ ml}$ Substratlösung hinzugefügt

somit ergibt sich eine Endkonzentration von $c = 0,125 \mu\text{g/l}$

3.4.3.4 Langzeitstabilitätstests der Enzym-Membran-Komplexe

Für die Tests der Langzeitstabilität wurden je 20 Membranen mit Immobilisierungslösungen unterschiedlicher Konzentration (0,1 mg, 0,3 mg, 1 mg, 1,5 mg, 2 mg Enzym in je

20 ml Phosphatpuffer) behandelt. Die enzymbeladenen Membranen wurden dann auf dem mit Puffer getränkten Filterpapier bzw. später auf den mit Puffer getränkten Celluloseacetat-Plättchen gelagert. Von den 20 Membranen pro Konzentration wurden jeweils 3 Stück nach verschiedenen Lagerungszeiträumen (frisch, 1 Tag, 4 Tage, 7 Tage, 14 Tage, 21 Tage, 28 bzw. 30 Tage) vermessen. Außerdem erfolgten Untersuchungen zur Lagerungsstabilität bei verschiedenen Umgebungstemperaturen (0°C, 4°C, 20°C und 40°C) und unterschiedlichen Umgebungsbedingungen (Stickstoff als Schutzgas, Vakuum, Normalbedingungen) über einen Zeitraum von 1 Woche.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Charakterisierungen der Glasmembranen

Die für die Anwendungen im Pestizidsensor vorgesehenen porösen Glasmembranen wurden bezüglich ihrer strukturellen und mechanischen Eigenschaften umfassend untersucht. Die Bestimmungen der Porengrößen- und Oberflächen erfolgte mittels Quecksilber-Intrusion (Abschnitt 3.3.1). Weiterhin wurden die Bruchfestigkeit und die Permeabilität bestimmt. In den nachfolgenden Abschnitten erfolgt die detaillierte Darstellung der Ergebnisse für jede verwendete Porengröße.

4.1.1 Quecksilber-Intrusion

Neben der Stickstoff-Tiefemperatur-Adsorption stellt die Quecksilber-Intrusion eine der bedeutendsten Methoden zur Texturcharakterisierung dar. Die in dieser Arbeit verwendeten porösen Glasmembranen wurden mit Hilfe der Quecksilber-Intrusion hinsichtlich der Textureigenschaften untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tab. 4.1 Texturdaten der verwendeten Membranen

<i>Textureigenschaften</i>	<i>M 50</i>	<i>M 65</i>	<i>M 75</i>	<i>M 100</i>
<i>mittlerer Porendurchmesser</i>	<i>49 nm</i>	<i>66 nm</i>	<i>76 nm</i>	<i>97 nm</i>
<i>spezifisches Porenvolumen</i>	<i>0,4 cm³/g</i>	<i>0,5 cm³/g</i>	<i>0,6 cm³/g</i>	<i>0,5 cm³/g</i>
<i>spezifische Oberfläche</i>	<i>31 m²/g</i>	<i>30 m²/g</i>	<i>26 m²/g</i>	<i>21 m²/g</i>

Beim Vergleich der erhaltenen Texturdaten sind systematische Veränderungen mit zunehmender Porengröße erkennbar. Mit größer werdendem Porendurchmesser kam es zur Verringerung der spezifischen Oberfläche mit gleichzeitiger Zunahme des Porenvolumens bis zu einem Maximalwert von 0,6 cm³/g.

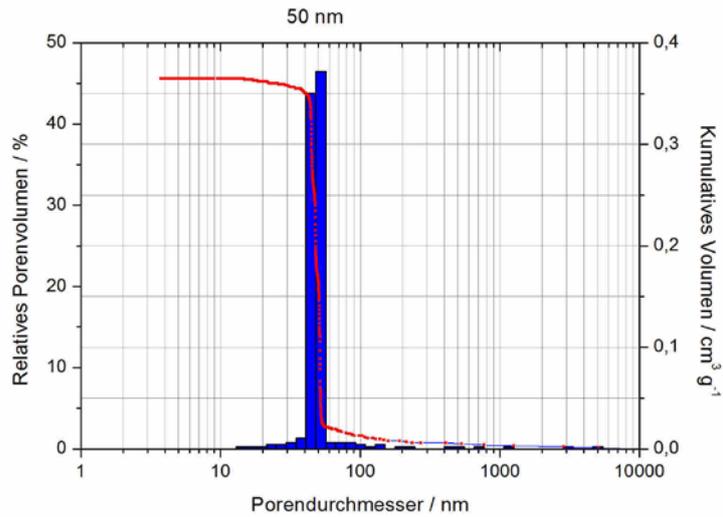


Abb. 4.1a grafische Darstellung der Porenverteilungen der Membran M50

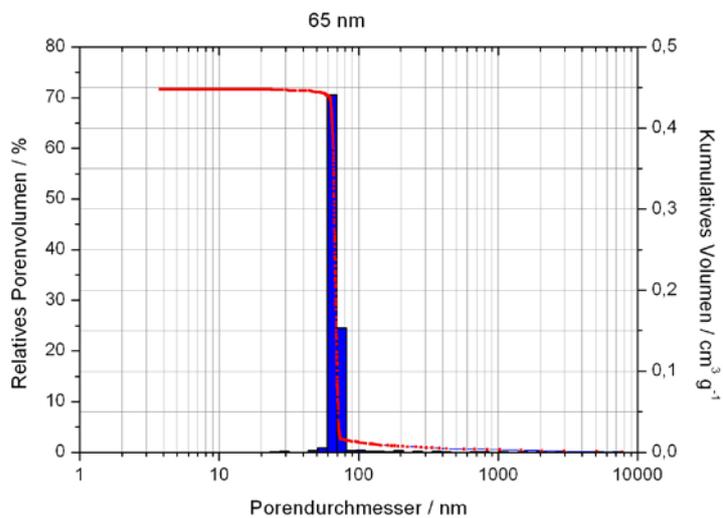


Abb. 4.1b grafische Darstellung der Porenverteilungen der Membran M65

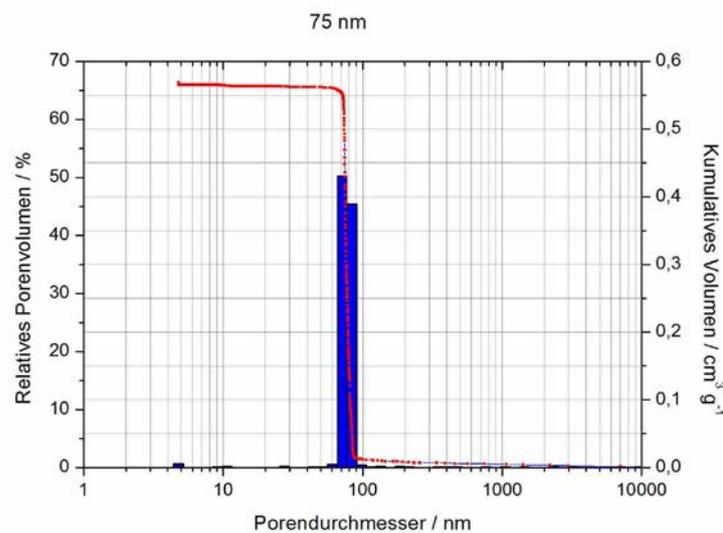


Abb. 4.1c grafische Darstellung der Porenverteilungen der Membran M75

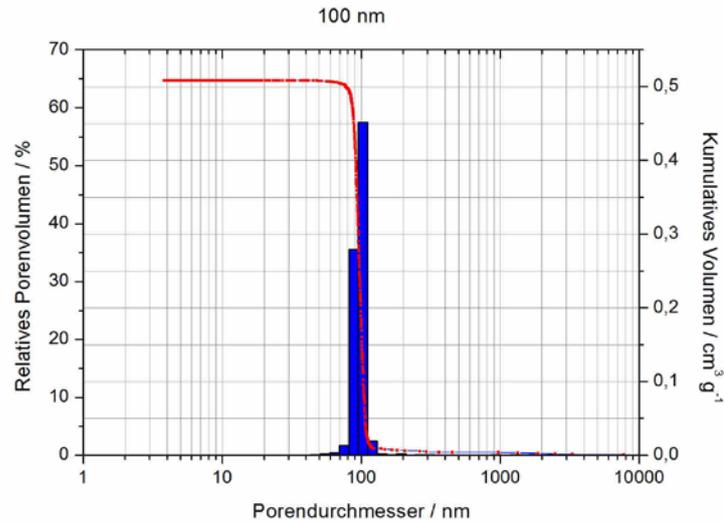


Abb. 4.1d grafische Darstellung der Porenverteilungen der Membran M100

Die Porenradien der porösen Glasmembranen sind über die Washburn-Gleichung [88] mit den entsprechenden Intrusionskurven verknüpft. Somit lassen sich aus diesen die Porenradienverteilungen ermitteln. In den Abbildungen 4.1a–4.1d sind die jeweiligen Porenradienverteilungen grafisch dargestellt.

Bei allen untersuchten Glasmembranen spiegelt sich die enge Porenverteilung in dem steilen Anstieg der Intrusionskurve wider.

Werden Parameter wie die Temperatur der Thermobehandlung zur Phasenseparation (Tab. 3.1) in die vergleichende Betrachtung einbezogen, so wird deutlich, dass eine höhere Temperatur bei gleicher Behandlungsdauer zu einem größeren Entmischungsbereich führt. Es entsteht die natriumreiche Boratphase und die SiO_2 -Phase. Durch die saure Extraktion wird die Boratphase entfernt. Dabei kommt es zur Abscheidung von feindispersen Silikat. Dieses löst sich bei der Thermobehandlung aus der Natriumboratphase und kann durch die alkalische Nachbehandlung entfernt werden.

Die Proben M65 und M75 konnten aus einem thermobehandelten Block generiert werden. Hierbei wurde die Dauer der sauren Extraktion und der alkalischen Nachbehandlung verlängert. Dies führte zu einem Materialabtrag an den Porenwänden und führte so zu einem größeren Porendurchmesser.

Für die späteren Untersuchungen wurden mehrere Blöcke benötigt, um die Anzahl der notwendigen Membranen zu generieren. Dabei erfolgten regelmäßige Kontrollen des Porendurchmessers und es konnte festgestellt werden, dass die Eigenschaften der porösen Glasmembranen reproduzierbar sind.

4.1.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Elektronenmikroskopie ist prinzipiell gut für die Charakterisierung der Hohlraumstruktur von porösen Glasmembranen geeignet. Durch diese Untersuchungen können Parameter wie:

- Homogenität der Mikrostruktur
- Porenform
- Verzweigungsgrad
- Wandstärke
- Porosität usw.

bestimmt werden. Diese Methode wurde in dieser Arbeit lediglich zur Bestätigung der durch andere Techniken ermittelten Parameter (enge Porenradienverteilung) verwendet. Wird die Elektronenmikroskopie als alleinige Methode zur Charakterisierung verwendet, so müssen verschiedene Aufnahmen an unterschiedlichen Stellen der Oberfläche und einer Bruchfläche vorgenommen werden. Diese Aufnahmen werden anschließend statistisch ausgewertet.

In den nachfolgenden Abbildungen sind elektronenmikroskopische Aufnahmen der Membranen M50, M65 und M75 dargestellt.

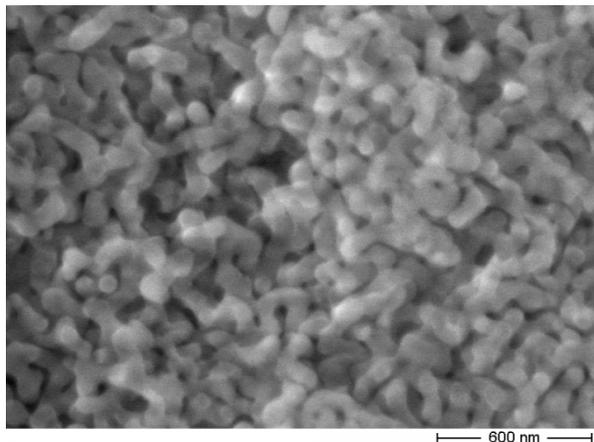


Abb. 4.2a elektronenmikroskopische Aufnahmen der Membran M50

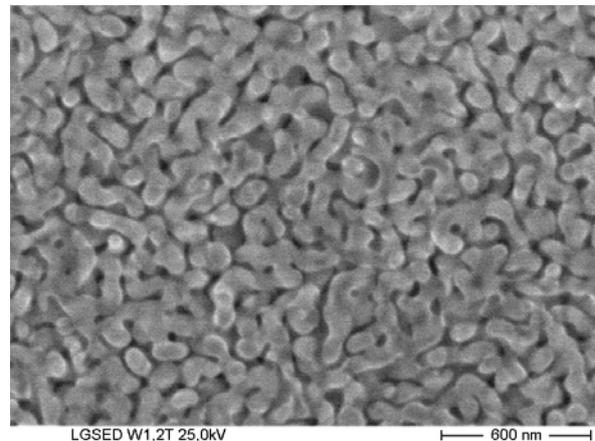


Abb. 4.2b elektronenmikroskopische Aufnahme der Membran M65

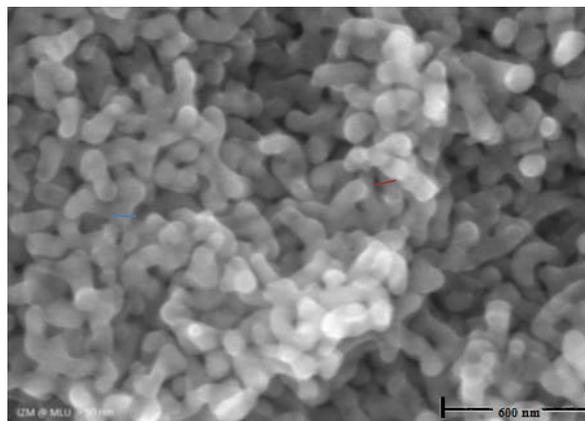


Abb.4.2c elektronenmikroskopische Aufnahme der Membran M75

Es ist deutlich eine homogene und isotrope Mikrostruktur der untersuchten porösen Glasmembranen zu erkennen. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigen die mit Hilfe der Quecksilber-Intrusion bestimmten engen Porengrößenverteilungen. Außerdem wird die hohe Porosität und einheitliche Porenform mit hohem Verzweigungsgrad (interconnected structure) der porösen Glasmembran deutlich.

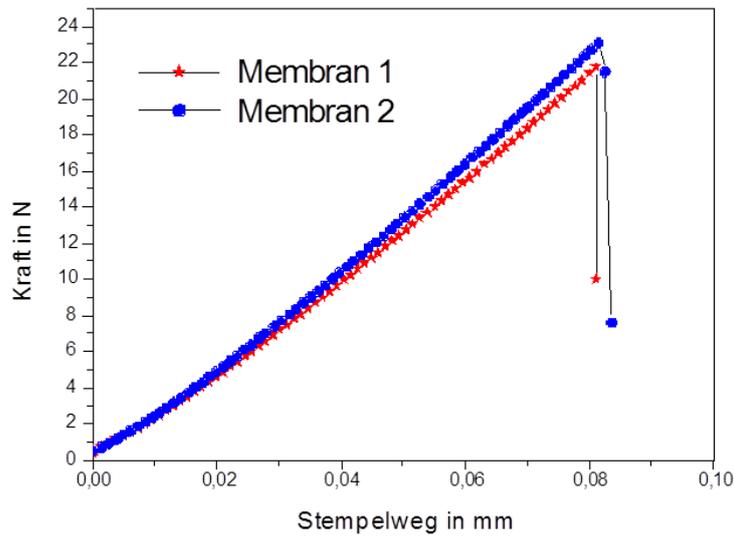


Abb. 4.3 Kraft-Weg-Diagramm poröser Glasmembranen mit einem Porendurchmesser von 75 nm

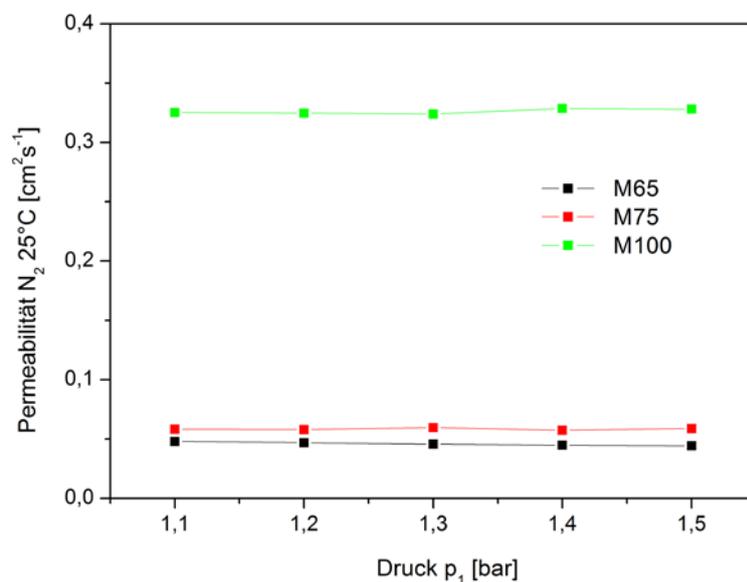


Abb. 4.4 Abhängigkeit der Permeabilität für Stickstoff vom anliegenden Druck p_1 bei M65-, M75- und M100-Membranen

Mit Hilfe der Bruchfestigkeit (Abb.4.3) und der Permeationsmessung (Abb.4.4) wurde überprüft, ob die Glasmembranen rissfrei waren und eine homogene Porenstruktur besaßen.

4.2 Oberflächenmodifizierungen mit Aminosilanen

4.2.1 Aminosilanisierung mit γ -Aminopropyltriethoxysilan (γ -APTS)

Für die Optimierung der Aminosilanisierung wurden $M_{0,250}$ und $M_{0,550}$ Membranen verwendet. Diese wurden wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben mit γ -APTS oberflächenmodifiziert. Dabei wurden die Parameter Zeit und Temperatur variiert. Die Variation der Zeit erfolgte sowohl bei der Vakuum-, als auch bei der Temperaturbehandlung. Die Bestimmung der erhaltenen Aminogruppenanzahl erfolgte mittels Elementaranalyse und Titration.

4.2.1.1 Einfluss der Temperatur

Die Aminosilanisierung erfolgte in zwei Schritten:

1. Vakuumbehandlung bei Raumtemperatur
2. Reaktion bei 70°C.

Im zweiten Reaktionsschritt erfolgte eine Variation der Temperatur zur Untersuchung des entsprechenden Einflusses. In der Tabelle 4.2 sind die Ergebnisse der sowohl durch Titration als auch durch die Elementaranalyse bestimmten Aminogruppenanzahlen pro nm^2 aufgelistet.

Tab. 4.2 Aminogruppendichten bei Variation der Temperatur

Probenbezeichnung	\emptyset Aminogruppendichte ($1/\text{nm}^2$) Titration	\emptyset Aminogruppendichte ($1/\text{nm}^2$) Elementaranalyse
<i>$M_{0,250-0,5-1-25}$</i>	1,7	1,7
<i>$M_{0,250-0,5-1-70}$</i>	1,4	2,4
<i>$M_{0,550-0,5-1-25}$</i>	1,1	2,1
<i>$M_{0,550-0,5-1-70}$</i>	1,9	2,4

Beim Vergleich der bestimmten Aminogruppen je nm^2 mittels Titration ist keine eindeutige Tendenz erkennbar. Die Erhöhung der Temperatur führte bei den 0,2 mm dicken Membranen zu einer Verringerung der Anzahl der Aminogruppen. Dagegen führte dies bei den 0,5 mm dicken Membranen zu einer Erhöhung.

Werden aber die Ergebnisse der Elementaranalyse betrachtet, so ist hier eine deutliche Tendenz erkennbar. Mit steigender Reaktionstemperatur kommt es zu einer höheren Aminogruppendichte.

4.2.1.2 Einfluss der Zeit

Auch die Zeitdauer der einzelnen Modifizierungsschritte wurde sowohl bei den 0,2 mm als auch bei 0,5 mm dicken Membranen variiert. Die ermittelten Aminogruppendichten sind in der Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Tab. 4.3 Aminogruppendichten bei Variation der Zeit

Probenbezeichnung	$\bar{\phi}$ Aminogruppendichte (1/nm ²) Titration	$\bar{\phi}$ Aminogruppendichte (1/nm ²) Elementaranalyse
<i>M_{0,2}50-0,5-1-70</i>	1,4	2,4
<i>M_{0,2}50-1-2-70</i>	1,6	1,1
<i>M_{0,2}50-2-4-70</i>	1,4	2,5
<i>M_{0,5}50-0,5-1-70</i>	1,9	2,4
<i>M_{0,5}50-1-2-70</i>	1,3	4,3
<i>M_{0,5}50-2-4-70</i>	1,2	4,6

Die Dauer der Behandlungsschritte wurde variiert. Eine Verlängerung der Dauer um das doppelte führte anhand der Titrationsergebnisse bei den Proben der 0,2 mm dicken Membranen zu einer geringen Erhöhung der Anzahl der Aminogruppen pro nm². Jedoch kam es bei einer weiteren Verlängerung wieder zur Verringerung der Aminogruppendichte. Bei den 0,5 mm dicken Membranen nahm die Aminogruppendichte mit Verlängerung der Zeitdauer stark ab.

Bei der Betrachtung der ermittelten Anzahl der Aminogruppen mit Hilfe der Elementaranalyse ist bei 0,5 mm dicken Membranen eine deutliche Erhöhung der Aminogruppendichte erkennbar. Jedoch bei den 0,2 mm dicken Membranen kam es nur zu einer geringen Erhöhung der Aminogruppendichte bei einer viermal längeren Behandlung.

4.2.1.3 Reproduzierbarkeit der Aminosilanisierung mit γ -APTS

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Aminosilanisierung wurden drei Membranchargen unter gleichen Bedingungen aminosilaniert und anschließend der Elementaranalyse und der Titration unterzogen. Zur Unterscheidung wurden sie mit a, b und c in der Probenbezeichnung gekennzeichnet.

Anhand der erhaltenen Stickstoffwerte bzw. der verbrauchten Natronlauge konnte die Aminogruppendichte (Teilchen pro nm²) über die Gleichungen 2.3 - 2.8 berechnet werden.

Die berechneten Aminogruppendichten aus den erhaltenen Werten der Elementaranalyse und der Titration sind in der Tabelle 4.4 gegenüber gestellt.

Tab. 4.4 Reproduzierbarkeit der Aminosilanisierung

Probenbezeichnung	$\bar{\phi}$ Aminogruppendichte (1/nm ²) Titration	$\bar{\phi}$ Aminogruppendichte (1/nm ²) Elementaranalyse
<i>M_{0,2}50-0,5-1-25 a</i>	1,7	2,5
<i>M_{0,2}50-0,5-1-25 b</i>	1,7	2,3
<i>M_{0,2}50-0,5-1-25 c</i>	1,5	2,3

Es wird deutlich, dass die verwendete Methode der Aminosilanisierung reproduzierbar ist und unter den angegebenen Bedingungen eine durchschnittliche Aminogruppendichte von 2,4 bzw. 1,6 Teilchen pro nm² vorlag. Doch die erhaltenen Ergebnisse beider Ana-

lysemethoden wichen stark voneinander ab. Diese Abweichungen lassen sich darauf zurückführen, dass bei der Elementaranalyse alle und bei der Titration nur die frei zugänglichen Aminogruppen erfasst werden.

4.2.1.4 Effekte einer thermischen Nachbehandlung

Es wurde nicht nur der Einfluss der direkten Parameter, wie Konzentration, Dauer der Temperaturbehandlung usw., bestimmt, sondern auch der Einfluss einer thermischen Nachbehandlung im Anschluss an die Aminosilanisierung. Dazu wurden zwei Proben ausgewählt, Charge **M_{0,2}50-1-2-70** und **M_{0,5}50-1-2-70**. Diese wurden vor der Titration zwei Stunden bei 100°C aktiviert. Die aktivierten Proben sind durch ein A im Probennamen gekennzeichnet.

Tab. 4.5 Aminogruppendichten nach der Aktivierung bestimmt durch Titration

<i>Probenbezeichnung</i>	<i>Ø Aminogruppendichte in 1/nm²</i>
M_{0,2}50-1-2-70	1,6
M_{0,2}50-1-2-70-A	2,0
M_{0,5}50-1-2-70	1,4
M_{0,5}50-1-2-70-A	1,5

Vergleicht man die Werte der Aminogruppendichte vor und nach der Aktivierung (Tab. 4.5), so wird deutlich, dass die thermische Nachbehandlung zur Erhöhung der frei zugänglichen Aminogruppen führte. Dieser Effekt war bei den 0,2 mm dicken Membranen deutlicher ausgeprägt als bei den 0,5 mm dicken Membranen.

4.2.1.5 Leaching-Tests an aminosilanisierten Membranen

Für die spätere Anwendung im Sensor ist es von großer Bedeutung, dass bei der Lagerung der Membranen über einen längeren Zeitraum (mehrere Wochen bis Monate) die Enzymaktivität erhalten bleibt. Ein Verlust der Aktivität kann durch das sogenannte Leaching hervorgerufen werden. Dabei werden die an die Oberfläche gebundenen funktionellen Gruppen ab- bzw. ausgespült. Um zu bestimmen, ob das Problem des Leachings besteht, erfolgte die Lagerung von aminosilanisierten Membranen in je 2 ml Puffer pH=7 über einen Zeitraum von fünf Wochen. Nach verschiedenen Lagerungszeiten wurden die Aminogruppen mittels Titration bestimmt. In der Tabelle 4.6 sind die Aminogruppendichten der verschiedenen Lagerungszeiträume zusammengefasst. Für die Untersuchungen wurden die Membranen **M_{1,0}75-1-2-70** verwendet.

Tab. 4.6 Anzahl der Aminogruppen pro nm²

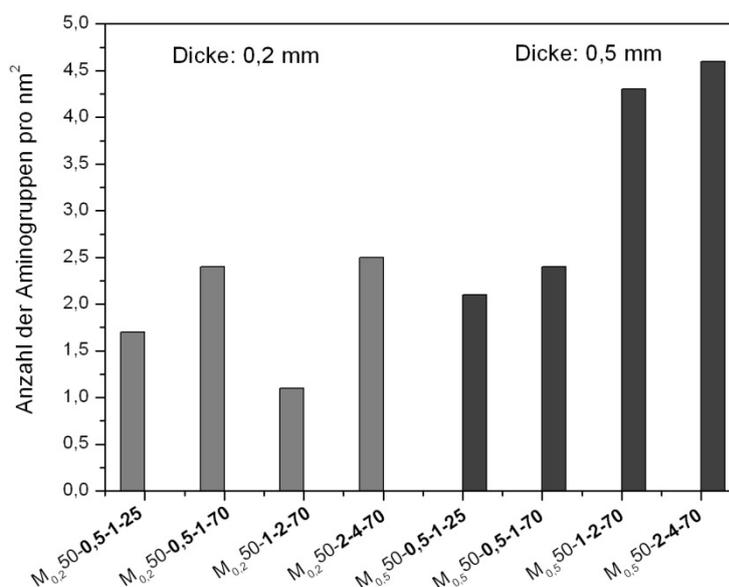
Lagerdauer	Ø Aminogruppendichte in 1/nm ²
frisch	2,50
1 Tag	2,10
3 Tage	1,60
5 Tage	1,50
7 Tage	1,20
14 Tage	0,80
21 Tage	0,50
28 Tage	0,44
35 Tage	0,40

Aufgrund der erhaltenen Werte der Aminogruppendichten nach verschiedenen Lagerungszeiträumen, wird deutlich sichtbar, dass die Anzahl der Aminogruppen unter den gegebenen Lagerungsbedingungen abnahm. Es ist somit wichtig, die Lagerungsbedingungen der späteren Enzym-Membran-Komplexe bzw. die Aminosilanisierung zu optimieren.

4.2.2 Diskussion der Ergebnisse

Bei der Bestimmung der Aminogruppendichte mit Hilfe der Elementaranalyse werden prozentuale Gewichtsanteile der Elemente Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff erhalten.

Anhand dieser Werte können mit Hilfe der in 3.5.3.1 beschriebenen Gleichungen (Gl. 3.7-3.11) die Aminogruppendichten pro nm² berechnet werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Abbildung 4.5 grafisch dargestellt.

**Abb. 4.5** Ergebnisse der Bestimmung der Aminogruppendichte mittels Elementaranalyse

In der Probenreihe der 0,2 mm dicken Membranen weist die Probe $M_{0,2}50-2-4-70$ die größte Aminogruppendichte auf. Vergleicht man die Proben $M_{0,2}50-0,5-1-25$ und $M_{0,2}50-0,5-1-70$, in Variation der Temperatur, könnte man annehmen, dass eine höhere Temperatur eine größere Aminogruppendichte bewirkt. Zieht man einen Vergleich aus den weiteren Proben, bei denen die Zeit im Vakuum und Trockenschrank variiert wurde, so lässt sich eine Tendenz erkennen, mit Ausnahme der Probe $M_{0,2}50-1-2-70$. Somit steigt die Aminogruppendichte mit der Zeitdauer der Behandlung,.

Die Tendenz lässt sich ohne Einschränkung auch auf die Proben der 0,5 mm dicken Membranen übertragen. Auch hier weist die Probe $M_{0,5}50-2-4-70$ die höchste Aminogruppendichte auf. Die niedrigste Aminogruppendichte wurde bei 0,5 mm dicken Membranen für die Proben bestimmt, deren Modifizierung bei 25°C erfolgte.

Die Anzahl der Aminogruppen ist bei den 0,5 mm dicken Membranen, vor allem bei den Proben $M_{0,5}50-1-2-70$ und $M_{0,5}50-2-4-70$ besonders hoch. Dieser Effekt lässt sich mit Hilfe der Dicke der Membranen erklären. Die Membranen werden nach der Modifizierung mit destilliertem Wasser gewaschen, jedoch erfolgte dies hauptsächlich an den äußeren Oberflächen. Somit können im Inneren der Membran noch Reste der Lösung enthalten sein. Diese können bei der anschließenden Trocknung weiter reagieren. Je dicker die Membran ist, desto größer ist der Lösungsrest und somit die Anzahl der enthaltenen gebundenen Aminosilane.

Da bei der Elementaranalyse alle vorhandenen Aminogruppen, auch nicht frei zugängliche, erfasst werden, kann die Zahl der Aminogruppen pro nm^2 größer sein, als für weitere Reaktionen tatsächlich zur Verfügung stehen.

Bei der Betrachtung der bestimmten Aminogruppendichten mit Hilfe der Titration, welche in der Abbildung 4.6 dargestellt sind, zeichnete sich für die Probenreihe der 0,2 mm dicken Membranen keine eindeutige Tendenz ab.

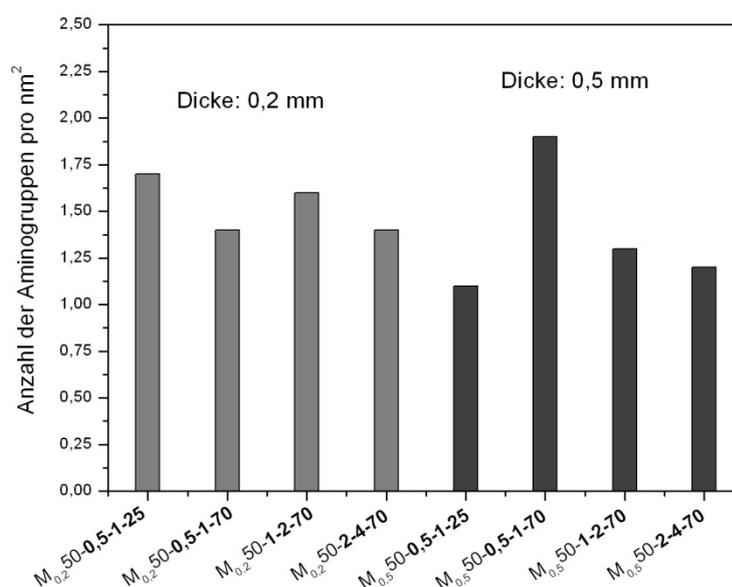


Abb. 4.6 Ergebnisse der Bestimmung der Aminogruppendichte mittels Titration

Die höchste Aminogruppendichte wies die Probe bei Probe $M_{0,550-0,5-1-70}$ auf, die geringste Probe $M_{0,250-0,5-1-25}$. Bei einer Reaktionstemperatur von 70°C nimmt die Aminogruppendichte mit steigender Dauer ab. Die Ergebnisse der Elementaranalyse zeigen eine andere Tendenz auf.

Vergleicht man die Proben gleicher Dauer aber unterschiedlicher Temperatur, $M_{0,250-0,5-1-25}$ und $M_{0,250-0,5-1-70}$, so bewirkte eine höhere Temperatur eine höhere Aminogruppendichte. Diese Schlussfolgerung kann auch nach der Elementaranalyse gezogen werden.

Die mit Hilfe der Titration bestimmte Zahl der Aminogruppen pro nm^2 weichen stark von denen mittels Elementaranalyse bestimmten ab. Dies ergibt sich aufgrund der unterschiedlichen Messprinzipien. Bei der Titrationsmethode werden die aminosilanisierten Substrate in eine definierte Menge Salzsäure, deren Konzentration exakt bestimmt wurde, überführt. Die auf der Glasmembran vorhandenen, frei zugänglichen und dadurch reaktiven Aminogruppen reagieren mit der Salzsäure. Anhand der bei der Reaktion verbrauchten Säure kann die Anzahl der *reaktiven* Aminogruppen bestimmt werden.

Wohingegen bei der Elementaranalyse aufgrund des Verfahrens *alle* auf dem Substrat befindlichen Aminogruppen bestimmt werden.

Hinsichtlich einer Vielzahl an Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen ergab sich, dass bei einer Menge von $3 \mu\text{mol}$ Aminogruppen pro m^2 Substrat, was einer Anzahl von zwei Aminogruppen pro nm^2 entspricht, von einer Bedeckung durch eine Monoschicht Aminosilan ausgegangen werden kann [38,63,93]. In der Tabelle 4.7 sind die Molmengen an Aminogruppen in μmol pro m^2 aufgelistet.

Tab. 4.7 Menge an Aminogruppen μmol pro m^2

<i>Probe</i>	<i>Titration</i>	<i>Elementaranalyse</i>
$M_{0,250-0,5-1-25}$	2,8	2,8
$M_{0,250-0,5-1-70}$	2,3	3,9
$M_{0,250-1-2-70}$	2,7	1,8
$M_{0,250-2-4-70}$	2,3	4,1
$M_{0,550-0,5-1-25}$	1,8	3,5
$M_{0,550-0,5-1-70}$	3,1	3,9
$M_{0,550-0,5-1-70}$	2,1	7,1
$M_{0,550-0,5-1-70}$	1,9	7,6

Aufgrund der durch die Titration bestimmten Mengen an Aminogruppen könnte von einer Monolage an Aminosilan auf der Membranoberfläche ausgegangen werden. Doch werden die Werte der Elementaranalyse in die Betrachtungen mit einbezogen so wird deutlich, dass die Molmengen an Aminogruppen zum Teil mehr als doppelt so hoch sind wie für eine Monolage bestimmt wurde.

Mit der Problematik des Reaktionsmechanismus von Aminosilanen an silikatischen Oberflächen und der Bestimmung ob eine Monoschicht oder eine Multischicht an Aminosilanen die Substratoberfläche bedecken, haben sich verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigt.

EVANS [92] und HAIR [93] ermittelten die Menge an Aminogruppen, welche typisch für eine Monoschicht an Aminosilanen ist. Wie weitere Arbeitsgruppen aufgrund zahlreicher Untersuchungen herausfanden, ist die Bildung einer Monoschicht an Aminosilanen nur unter wasserfreien Reaktionsbedingungen, also z. B. in extra trockenem Toluol und unter Schutzgas [94], möglich. Die Reaktion wird durch die Aminogruppe intramolekular katalysiert [95]. Sobald Wasser im Reaktionsgemisch enthalten ist, kommt es zur Polymerisation [96]. Erfolgt die Anbindung von Aminopropyltriethoxysilan ausschließlich in Wasser, so ist Polymerisation nicht kontrollierbar.

Zunächst soll die Reaktion des Aminopropyltriethoxysilans mit der Oberfläche der porösen Glasmembran genauer betrachtet werden.

Die Anzahl der Oberflächensilanolgruppen beträgt bei vollständiger Hydroxylierung 5-7 pro nm^2 . Für die Bedeckung mit einer Monoschicht wurde ermittelt, dass sich nach der Modifizierung zwei Aminogruppen auf einem nm^2 befinden. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass nicht alle Oberflächenhydroxylgruppen umgesetzt werden [38].

Anhand von Untersuchungen mittels IR-Spektroskopie und Elementaranalyse entwickelten KONDO *et al.* [97] folgendes Monoschicht-Modell (Abb. 4.7) der Anbindung von APTS an das Glassubstrat. Weiterhin stellten sie fest, dass die Monolayer mit einer Polymerschicht bedeckt ist. Diese Erkenntnisse wurden in nachfolgenden Jahren durch IR-Untersuchungen von VANSANT *et al.* [98] ^{13}C - und ^{29}Si -NMR von DE HAAN *et al.* [99] bzw. XPS Untersuchungen durch KALLURY *et al.* [100] bestätigt.

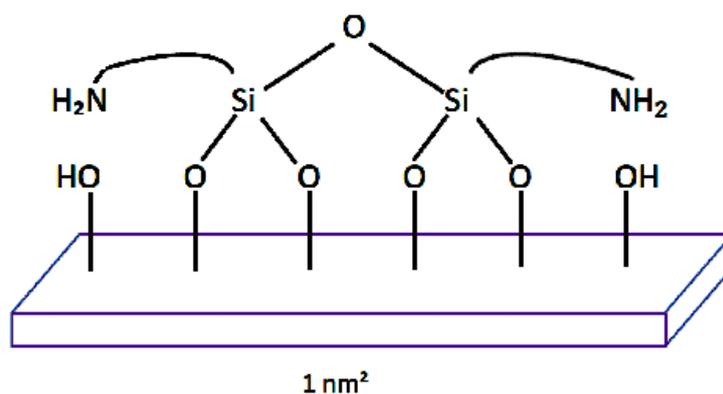


Abb. 4.7 Struktur des Aminosilans auf der Oberfläche einer porösen Glasmembran nach [66]

Die Reaktion der Oberflächensilanolgruppen des porösen Glases mit dem Aminosilan im wässrigen Lösungsmittel verläuft nach folgenden Schritten [101-103]:

1. Die Ethoxygruppen werden in der wässrigen Lösung hydrolysiert.

2. Nach Zugabe des Substrates, der porösen Glasmembran, kommt es zur schnellen Adsorption des Aminosilans an dessen Oberfläche durch Interaktionen – Wasserstoffbrückenbindungen – der Aminogruppen mit den Oberflächensilanolgruppen.
3. Durch die Temperaturbehandlung während der Modifizierung kommt es zur Kondensation von je drei Oberflächensilanolgruppen mit den jeweils zwei Silanolgruppen des Aminosilans und somit zur Ausbildung der Siloxanbindung.

Innerhalb dieser Arbeit wurde der Einfluss der Temperatur auf die Anzahl der Aminogruppen untersucht.

Bei den Proben **M_{0,2}50-0,5-1-25** und **M_{0,2}50-0,5-1-70** bzw. **M_{0,5}50-0,5-1-25** und **M_{0,5}50-0,5-1-70** wurde die Temperatur von 25°C auf 70°C erhöht. Diese Erhöhung bewirkte bei Betrachtung der Ergebnisse der Elementaranalyse sowohl bei den 0,2 mm dicken als auch bei 0,5 mm dicken Glasmembranen eine Erhöhung der Anzahl der Aminogruppendichte. Jedoch entspricht das Ergebnis der Titration bei den 0,2 mm dicken Glasmembranen nicht dieser Tendenz.

CARJAVAL *et al.* [104] wiesen nach, dass eine Erhöhung der Temperatur einen höheren Grad an kovalenten Bindungen des Aminosilans mit der Oberfläche der Glasmembran und mit benachbarten bzw. adsorbierten Aminosilanen bewirkt. Das wiederum führt zu einer Oligomerisierung. Die Erkenntnisse werden durch Untersuchungen weiterer Arbeitsgruppen gestützt. VRANCKEN *et al.* [101] nahmen IR-Spektren unter verschiedenen Bedingungen aminosilanisierter Substrate auf. Die Abwesenheit von CH₃-Schwingungsbanden, die Form der Si-O-Si-Schwingungsbande und die Lage der NH₂-Schwingungsbande der in wässriger Lösung modifizierten Substrate ließen den Schluss zu, dass es bei der Immobilisierung zu einer Oligo- bzw. Polymerisation gekommen sein muss.

ZHU *et al.* [105] analysierten die Parameter zur Präparation einer reproduzierbaren, homogenen und hydrolytisch stabilen Aminosilanschicht auf Silikaten.

Dabei bestätigten sie die bisherigen Ergebnisse der Polymerisation des APTS in wässriger Lösung auf der Silikatoberfläche. Aufgrund der vielseitigen Reaktionsmöglichkeiten der APTS-Moleküle, sowohl intra- als auch intermolekular, entsteht eine strukturell unregelmäßige Aminosilanschicht auf der Oberfläche. Die unterschiedlichen Interaktionen und die daraus entstehenden Strukturen sind in der Abbildung 4.8 grafisch zusammengefasst.

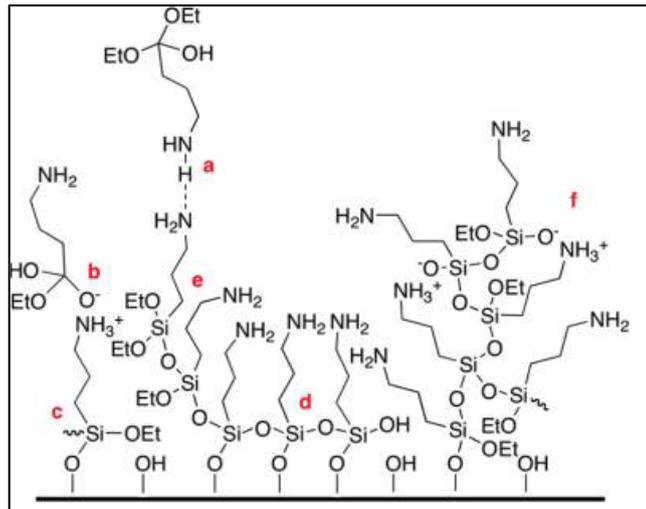


Abb. 4.8 Darstellung einer γ -APTS-Schicht mit strukturellen Unregelmäßigkeiten [105]

- Wasserstoffbrückenbindungen
- elektrostatische Anziehung
- kovalente Bindung mit dem Substrat
- horizontale Polymerisation mit dem benachbarten Silan
- vertikale Polymerisation mit dem benachbarten Silan
- Reaktionen/ Interaktionen der Oligomere/Polymere mit funktionellen Gruppen an der Grenzfläche

Aufgrund der vielen Untersuchungen und Ergebnisse von weiteren Arbeitsgruppen kann bei den in dieser Arbeit erhaltenen Werten von einer Multischicht an Aminosilanen auf der Oberfläche der porösen Glasmembran ausgegangen werden. Die Vernetzung der einzelnen gebundenen Aminosilane untereinander und die Reaktion mit weiteren adsorbierten Molekülen werden durch die Erhöhung der Temperatur und einer Verlängerung der Reaktionszeit bei 70°C unterstützt.

Diese Vernetzung und Stabilisierung erfolgt auch bei einer thermischen Nachbehandlung zwischen 80°C und 200°C. Bei dem Nachvernetzen kondensieren die Silanolgruppen des Silans mit einer Silanolgruppe eines benachbarten kovalent angebondenen und/oder über Wasserstoffbrückenbindungen interagierenden Silans. Da jedes Aminopropyltriethoxysilan nach der Hydrolyse drei freie Silanolgruppen besitzt, kann es durch Ausbildung von Siloxanbindungen mit drei weiteren Silanen vernetzen.

Des Weiteren werden die physisorbierten Moleküle chemisorbiert. Die nicht gebundenen Si-OH-Gruppen des Silans bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit der Oberfläche. Dies führt zur Oligomerisierung und zum Aufrichten der Aminogruppen [97].

Neben den Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur, Zeit und der thermischen Nachbehandlung erfolgte die Bestimmung der hydrolytischen Stabilität. Die aminosilanierten Glasmembranen lagerten unter Lichtausschluss in einer Phosphatpufferlösung über einen Zeitraum von 35 Tagen. An unterschiedlichen Tagen erfolgte die Bestimmung der Aminogruppendichte mit Hilfe der Titration. In der Abbildung 4.9 ist der Verlauf grafisch dargestellt.

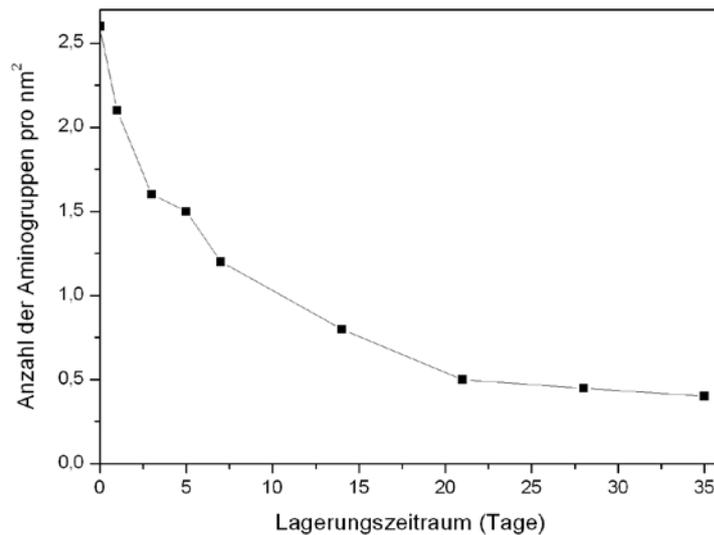


Abb. 4.9 Verlauf des Leaching der aminosilanisierten Glasmembran nach [98]

Aufgrund der erhaltenen Werte der Aminogruppendichten nach verschiedenen Lagerungszeiträumen wird deutlich sichtbar, dass die Menge an Aminogruppen über einen Zeitraum von 35 Tagen stark abnahm.

In den ersten Tagen erfolgt ein stärkerer Verlust der Aminogruppen. Nach vier Wochen ist das Minimum von 0,3 Aminogruppen pro nm² erreicht.

WADELL *et al.* [106] führten Untersuchungen zur hydrolytischen Stabilität von immobilisierten Aminosilanen in Ethanol durch und verglichen dabei Mono-, Di- und Trialkoxysilane.

Schon nach wenigen Sekunden der Lagerung kam es zum schnellen Ablösen einiger Aminosilane. Diese Silane waren nicht kovalent gebunden, sondern interagierten über Wasserstoffbrückenbindungen mit der Oberfläche. Im weiteren Verlauf wurde der Abbau weiterer Silane langsamer, da hierbei die kovalenten Bindungen zwischen den Silanen bzw. den Silanen und der Oberfläche hydrolysiert wurden. Nach sechs Tagen war ein Verlust von 15% der Aminogruppen zu verzeichnen. Weiterhin stellten WADELL *et al.* [106] fest, dass Tri- und Dialkoxysilane eine sehr ähnlich Solvolyserate haben, welche sich sehr von den Monoalkoxysilanen unterscheidet. Dieses Phänomen deutet auch darauf hin, dass γ -APTS keine langen Polymere bildet. Es ist bekannt, dass Dialkoxysilane nur Dimere ausbilden.

Die Hydrolysestabilität war bei der Modifizierung durch γ -APTS im Vergleich zu den Di- bzw. Monoalkoxysilanen am höchsten, was darauf zurückzuführen ist, dass es beim Lösen in Wasser drei reaktive Ethoxygruppen ausbildet, welche sowohl kovalente Bindungen mit den Silanolgruppen der Substratoberfläche, als auch mit den benachbarten Silanen ausbilden können.

ZHU *et al* [105] bestätigen als Ursache die intramolekularen Wechselwirkungen, welche bereits durch UNGER *et al* [107] analysiert wurden. Denn γ -APTS bildet einen intramo-

lekular stabilisierten 5-Ring (Abb. 4.10), woraus gleichzeitig abgeleitet werden kann, dass in der Lösung keine Polymerisation erfolgt.

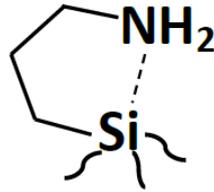


Abb. 4.10 intramolekular stabilisierter 5-Ring des γ -Aminopropylethoxysilan nach [105]

Durch die Anbindung verändert sich die Charakteristik der Wechselwirkungen. Die Aminogruppe katalysiert in wässriger Lösung sowohl die Kondensation der Alkoxygruppe des Silans mit der Oberfläche, als auch die Hydrolyse der Siloxanbindung [106]. Dies kann sowohl intra- als auch intermolekular erfolgen, wie in der Abbildung 4.11 dargestellt. Bei der intramolekularen Katalyse bildet sich bereits vor dem Ablösen als Intermediat der stabilisierte 5-Ring.

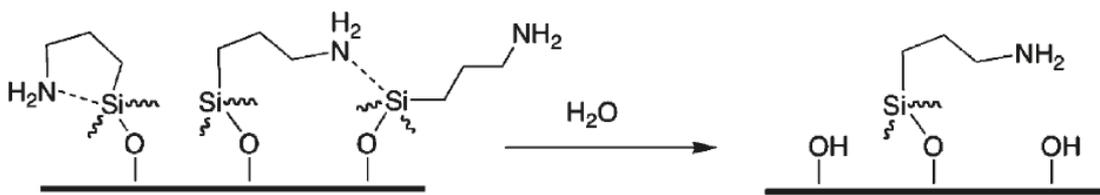


Abb. 4.11 Hydrolyse des immobilisierten Alkoxy silan nach [106]

JANOWSKI *et al.* [63] untersuchten wie sich eine Substratvorbehandlung mit TEOS auf die Hydrolysestabilität auswirkt. Dabei konnten sie feststellen, dass eine vorherige Anbindung von TEOS zu einer Erhöhung der Stabilität der immobilisierten γ -Aminopropyltriethoxysilane gegenüber wässrigen Medien führte.

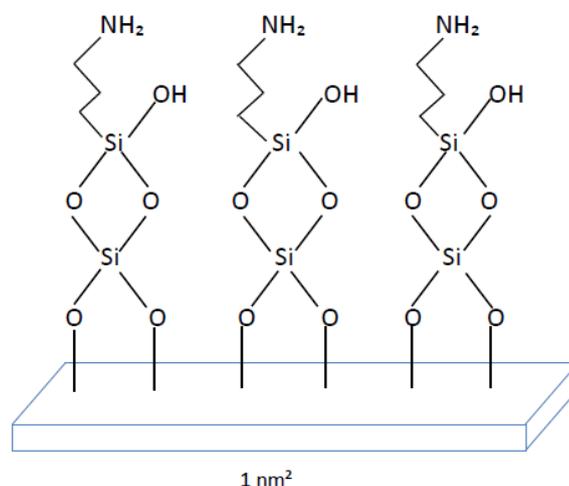


Abb. 4.12 Struktur des γ -APTS auf einer mit TEOS vorbehandelten Oberfläche des porösen Glases nach [63]

Die höhere Hydrolysestabilität der gebundenen Aminogruppen kann auf den „Regenschirmeffekt“ zurückgeführt werden, welcher durch die Polysiloxanschicht entsteht (Abb. 4.12).

Eine weitere Variante zur Erhöhung der hydrolytischen Stabilität ist die thermische Nachbehandlung. VANSANT *et al.* [98] stellten fest, dass dies zum Kondensieren und somit zum Anbinden von nicht chemisch gebundenen Molekülen führt. Die Kondensation und die gleichzeitig erfolgende Oligomerisierung führen zur Stabilisierung der gebundenen Moleküle.

4.2.3 Modifizierung mit APTMS

Neben den Untersuchungen mit γ -APTS wurden auch analoge Modifikationen und Analysen mit γ -APTMS durchgeführt. Zur Kennzeichnung des Unterschiedlichen wurde im Probennamen ein Apostroph verwendet, z.B. M'_{0,250}-0,5-1-25.

Die Ergebnisse der Titration und der Elementaranalyse der mit γ -APTMS modifizierten Membranen sind in der nachfolgenden Tabelle 4.8 zusammengefasst. In Klammern wurde die Aminogruppendichte nach der Modifizierung mit γ -APTS zum Vergleich angegeben.

Tab. 4.8 Aminogruppendichte nach APTMS-Modifizierung

Probenbezeichnung	\emptyset Aminogruppendichte in 1/nm ² (Titration)	\emptyset Aminogruppendichte in 1/nm ² (Elementaranalyse)
M' _{0,250} -0,5-1-25	1,6 (1,1)	2,5 (2,1)
M' _{0,250} -0,5-1-70	1,5 (1,9)	1,9 (2,4)
M' _{0,250} -1-2-70	1,6 (1,3)	2,8 (4,3)
M' _{0,250} -2-4-70	1,7 (1,2)	2,9 (4,6)

Auch nach der Oberflächenmodifizierung mit γ -APTMS lässt sich keine Tendenz erkennen. Beim Vergleich der frei zugänglichen Aminogruppen (Aminogruppendichte bestimmt durch Titration) wird deutlich, dass γ -APTMS keine Erhöhung bewirkte. Trotz einer Konzentrationserhöhung beträgt die Anzahl der frei zugänglichen Aminogruppen ca. 1,6 pro nm².

ZHU *et al.* [105] untersuchten das Verhalten von Mono-, Di- und Trialkoxysilanen. Dafür wurden aus jeder Gruppe jeweils zwei Verbindungen untersucht. Für die Trialkoxysilane wurden γ -APTMS und γ -APTS getestet. Anhand der Ergebnisse stellten sie fest, dass die Hydrolyse der Alkoxygruppen den Aufbau der Siloxanbindungen bestimmt. Da Methoxygruppen schneller hydrolysieren als Ethoxygruppen, kommt es bei gleicher Reaktionszeit zur Ausbildung einer größeren Anzahl von Siloxanbindungen als bei γ -APTS. Es werden Silanschichten von hoher Variabilität der Struktur erzeugt. Außerdem sind diese Silanschichten hydrolyseempfindlicher als jene, welche durch γ -APTS erzeugt wurden.

Die Ergebnisse der Elementaranalyse spiegeln nicht die Ergebnisse von ZHU *et al.* wieder und bestätigen nicht die Annahme der höheren Reaktivität von Methoxygruppen und die daraus resultierende größere Anzahl an Siloxanbindungen.

In dieser Arbeit wurde als Lösungsmittel destilliertes Wasser verwendet, wohingegen ZHU *et al.* [105] wasserfreie organische Lösungsmittel nutzten, denen sie definierte Mengen an Wasser zusetzten. Somit kam es bei ZHU *et al.* [105] zur kontrollierten Hydrolyse einer festgelegten Anzahl von Alkoxygruppen. Eine Reaktionszeit wurde hierbei nicht angegeben. Ist diese jedoch gering, so lassen sich Unterschiede zwischen den Reaktivitäten der einzelnen Aminosilane erkennen.

Die Reaktionszeit betrug in der vorliegenden Arbeit mehrere Stunden, so dass bei beiden Silanen eine vollständig Umsetzung der Alkoxygruppen und Anbindung an die SiOH-Gruppen der Glasoberfläche stattgefunden haben.

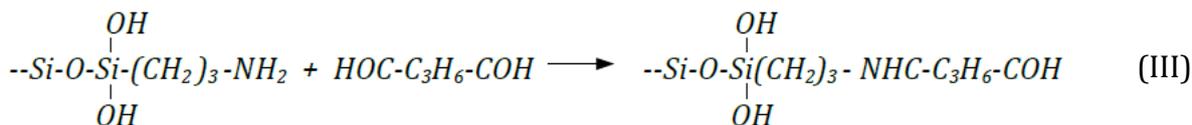
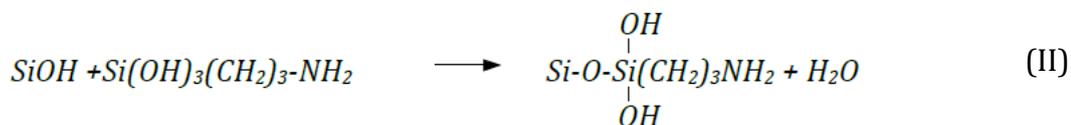
4.3 Modifizierungen mit Glutardialdehyd

Wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, ist für die Anbindung von Enzymen an die porösen Glasmembranen nach der Aminosilanisierung noch die Anbindung eines Spacers notwendig. In dieser Arbeit wurde Glutardialdehyd verwendet. Um festzustellen, welche Menge an Glutardialdehyd angebonden wurde, erfolgten Untersuchungen mittels Elementaranalyse. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 4.9 aufgelistet.

Tab. 4.9 Ergebnisse der Elementaranalyse für Stickstoff und Kohlenstoff

Probenbezeichnung	Ø % N	Ø % C
M _{0,2} 50-0,5-1-25-G	0,080	1,78
M _{0,2} 50-0,5-1-70-G	0,100	1,48
M _{0,2} 50-1-2-70-G	0,095	1,58
M _{0,2} 50-2-4-70-G	0,150	1,49
M _{0,5} 50-0,5-1-25-G	0,120	1,40
M _{0,5} 50-0,5-1-70-G	0,135	1,58
M _{0,5} 50-1-2-70-G	0,120	1,19
M _{0,5} 50-2-4-70-G	0,145	1,21

Das Zufügen weiterer Kohlenstoff-, Sauerstoff- und Wasserstoffatome durch Glutardialdehyd führte zur prozentualen Verschiebung des Stickstoffgehaltes. Unter der Annahme, dass jede Aminogruppe ein Molekül Glutardialdehyd bindet, ist der Stickstoffanteil nach der Aminosilanisierung (Gleichung 4.1 und 4.2) um den Faktor 1,7 höher als nach der Weitermodifizierung mit Glutardialdehyd (Gleichung 4.3). Diese Theorie kann auch auf den prozentualen Kohlenstoffgehalt übertragen werden. Das Verhältnis der molaren Massen von Stickstoff zu Kohlenstoff beträgt 7 zu 6.



Demnach müsste der Gehalt an Kohlenstoff 9,33-mal höher sein als der Stickstoffgehalt. Tabelle 4.11 zeigt jedoch ein anderes Bild. Die Anbindung des Glutarialdehyds erfolgte hier an die frei zugänglichen Aminogruppen. Diese wurden wie bereits erwähnt mit Hilfe der Titration ermittelt. Mit Hilfe dieser Aminogruppendichten können die theoretischen Stickstoff- und Kohlenstoffgehalte nach der Glutarialdehydmodifizierung berechnet werden (Tab. 4.10).

Tab. 4.10 theoretische Stickstoff- und Kohlenstoffanteil nach der Glutarialdehydmodifizierung berechnet anhand der Titrationsergebnisse

Probenbezeichnung	\emptyset Aminogruppendichte in $1/nm^2$ (Titration)	Stickstoffanteil (%)	Kohlenstoffanteil (%)
M _{0,250} -0,5-1-25-G	1,7	0,058	0,30
M _{0,250} -0,5-1-70-G	1,4	0,049	0,25
M _{0,250} -1-2-70-G	1,6	0,056	0,28
M _{0,250} -2-4-70-G	1,4	0,049	0,25
M _{0,550} -0,5-1-25-G	1,1	0,038	0,20
M _{0,550} -0,5-1-70-G	1,9	0,066	0,34
M _{0,550} -1-2-70-G	1,3	0,045	0,33
M _{0,550} -2-4-70-G	1,2	0,042	0,21

Wird dabei von einer 1:1 Umsetzung, also je Aminogruppe ein Glutarialdehyd ausgegangen, so können die theoretischen Anteile für Kohlenstoff nach der Umsetzung berechnet werden.

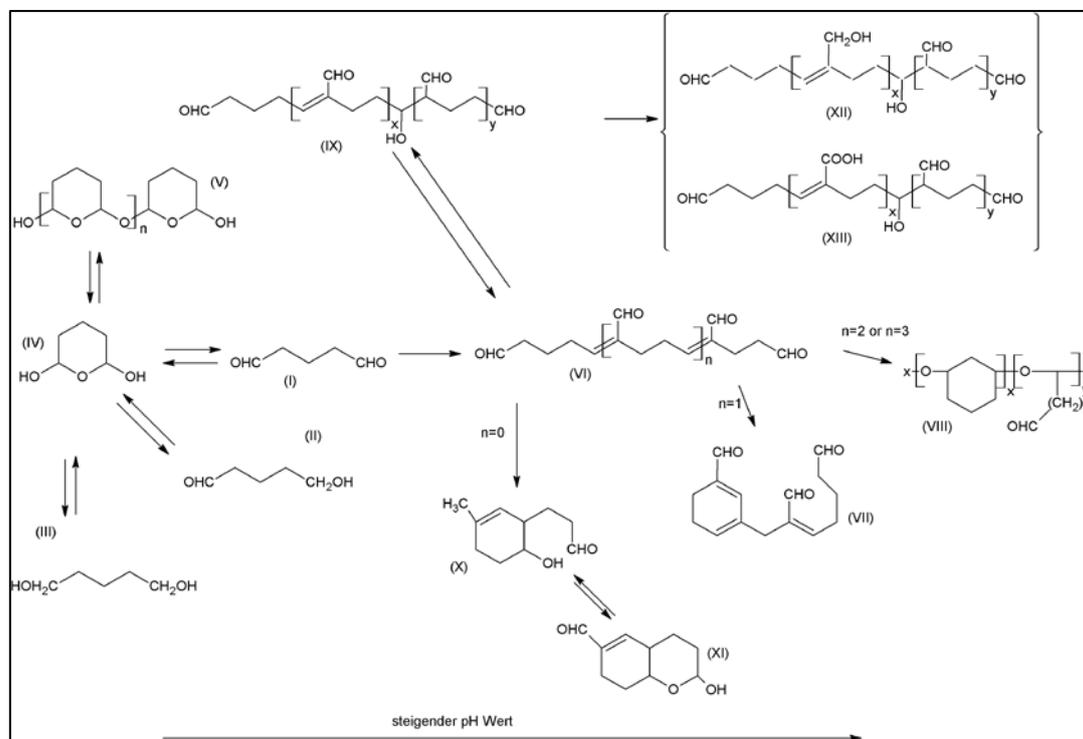
In der Tabelle 4.11 sind die so bestimmten theoretischen Kohlenstoffgehalte den praktisch erhaltenen Kohlenstoffgehalten gegenüber gestellt.

Tab. 4.11 Vergleich der berechneten und der mittels Elementaranalyse bestimmten Kohlenstoffanteile

Probenbezeichnung	Ø Kohlenstoffanteil (%) (theoretisch)	Ø Kohlenstoffanteil (%) (praktisch)	Faktor
M _{0,2} 50-0,5-1-25-G	2,79	1,78	1,6
M _{0,2} 50-0,5-1-70-G	2,33	1,48	1,6
M _{0,2} 50-1-2-70-G	2,60	1,58	1,6
M _{0,2} 50-2-4-70-G	2,33	1,49	1,6
M _{0,5} 50-0,5-1-25-G	1,86	1,40	1,3
M _{0,5} 50-0,5-1-70-G	3,16	1,58	2,0
M _{0,5} 50-1-2-70-G	3,07	1,19	2,6
M _{0,5} 50-2-4-70-G	1,95	1,21	1,6

Beim Vergleich der theoretischen und der praktisch bestimmten Stickstoff- und Kohlenstoffgehalte wird deutlich sichtbar, dass die Umsetzung der Aminogruppen mit Glutardialdehyd nicht 1:1 erfolgte. Die theoretischen Werte sind bei allen vermessenen 0,2mm dicken Membranen um den Faktor 1,6 größer. Bei 0,5mm dicken Membranen unterscheiden sich die Faktoren aller vermessenen Membranen. Die Größenordnung reicht von 1,3 bis 2,6. Hierbei ist keine Tendenz erkennbar. Die Ursache der Abweichung zwischen theoretischer und praktischer Umsetzung liegt in der Reaktivität des Glutardialdehyds.

Seit Jahrzehnten beschäftigen sich Wissenschaftler mit der Aufklärung der Struktur und des Reaktionsverhaltens von Glutardialdehyd.

**Abb. 4.13** mögliche Strukturen des Glutardialdehyds nach [108]

ASO und AITO [109] untersuchten die Polymerisation von Glutardialdehyd unter Einfluss eines kationischen Katalysators. Dabei fanden sie heraus, dass diese der spontanen

Polymerisation, welche durch Zugabe von Wasser bei Raumtemperatur erfolgt, sehr ähnlich ist. Die von ihnen publizierte Struktur entspricht der Struktur VIII in der Abbildung 4.13.

Anhand von $^1\text{H-NMR}$ Untersuchungen bestimmten RICHARD und KNOWLES[110], dass eine wässrige Lösung von Glutardialdehyd eine Mischung aus Dimeren, Trimeren und cyclischen Oligomeren ist. Gerade kommerzielle Lösungen enthalten neben den großen Mengen an Oligomeren noch α,β -ungesättigte Aldehyde (Struktur VI Abb.4.12), welche in der Lage sind, durch Aldolkondensation cyclische Strukturen (Struktur VII Abb. 4.12) auszubilden.

HARDY *et al.* [111] bestätigten aufgrund ihrer Ergebnisse von $^1\text{H-NMR}$ und UV-vis-Spektroskopie, dass die Glutardialdehydlösung α,β -ungesättigte Aldehyde enthält, jedoch nur in geringen Mengen. Neben den kommerziellen Lösungen erfolgten Untersuchungen einer aufgereinigten Lösung mittels $^1\text{H-Spektroskopie}$. Das erhaltene $^1\text{H-Spektrum}$ entsprach dem für Monomere erwarteten. Weiterhin bestätigten sie die von ASO und AITO [109] publizierte Annahme der schnellen Hydratation von Glutardialdehyd in Wasser und stellten die Glutardialdehydlösung als eine Mischung aus Struktur I, II und III (zu variablen Anteilen) dar.

Diese Annahme wurde durch die Ergebnisse der UV-Absorptions- und Lichtbrechungsuntersuchungen von KORN *et al.* [112] bestätigt.

MARGEL und REINBAUM [113] postulierten, dass in wässriger Lösung eine Aldolkondensation des Glutardialdehyds erfolgt. Deshalb wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Kondensation untersucht. Anhand der erhaltenen Ergebnisse durch spektroskopische und elektrochemische Analysen konnte festgestellt werden, dass die vorliegende Grundstruktur IX sei, welche in Abhängigkeit von den Polymerisationsbedingungen eine unterschiedliche Anzahl an Hydroxyl- und Carboxylgruppen (Struktur XII und XIII) enthält.

KAWAHARA *et al.* [114] bestätigten, dass kommerzieller Glutardialdehyd eine Mischung aus vielen verschiedenen Strukturen wie Polymeren, cyclische Verbindungen darstellt. Daher bestehen verschiedenste Reaktionsmöglichkeiten in wässriger Lösung. Die Polymere des Glutardialdehyds zersetzen sich langsam zu Monomeren, wobei sich die Varianten an monomeren und polymeren Strukturen in der Lösung erhöhten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Glutardialdehyd in vielen Formen in der Lösung vorliegt und es bis heute nicht vollständig geklärt ist, welche Reaktionen ablaufen.

Aus diesem Grund lässt sich nur vermuten, dass Glutardialdehyd auf der Membranoberfläche als Monoschicht angebunden ist, welche zum Teil zwei Aminogruppen mit einem Glutardialdehyd vernetzt. Das wirkt sich negativ auf die möglichen Bindungsstellen des Enzyms aus, da somit weniger Enzym immobilisiert werden kann.

4.4 Enzymimmobilisierungen

4.4.1 Untersuchungen mit nativer Acetylcholinesterase

Um einen Vergleich der Aktivitäten des Enzyms Acetylcholinesterase in freier und in immobilisierter Form zu erhalten war es notwendig, Aktivitätsbestimmungen des freien Enzyms durchzuführen. Ein weiteres Ziel dieser Messungen war es zu bestimmen, ob die Aktivität des Enzyms den geplanten Anforderungen, wie kurze Ansprechzeiten, hohe Substratumsetzung und große Sensibilität gegenüber Pestiziden, gerecht wurde. Im Folgenden wird Acetylcholinesterase (AChE) Enzym genannt.

Vor den ersten Messungen war das Problem der pH-Werteinstellung zu lösen. Die wässrige Acetylcholinchlorid (AChCl)-Lösung hat einen pH-Wert zwischen 4,5 und 5,5. In der Literatur [14,16-18, 30, 32, 33] wurde AChCl in einem Phosphat-Puffer pH=7 bzw. pH= 8 gelöst. Doch für eine Aktivitätsbestimmung über die Messung der pH-Wertänderung ist das klassische Puffersystem, aufgrund seiner grundlegenden Eigenschaft der pH-Wertkonstanz, ungeeignet.

Somit musste die pH-Werteinstellung mit Hilfe einer Base vorgenommen werden. Dazu wurden drei verschiedene Basen getestet. Es wurden hohe Konzentrationen verwendet, damit geringe Mengen ausreichten und es nicht zur Verfälschung der Konzentration der AChCl-Lösung kam. Die Einstellung des pH-Werts mit Natronlauge war nicht möglich. Sie ist aufgrund des pK_B - Werts von -1,74 eine zu starke Base. Im Gegensatz dazu war Natriumhydrogencarbonat eine zu schwache Base für die Einstellung des pH-Werts. Der pK_B -Wert beträgt 7,48. Um den pH-Wert einstellen zu können, war eine Base mit einem pK_B -Wert notwendig, welcher zwischen diesen beiden liegt. Deshalb wurden wässrige Dinatriumhydrogenphosphatlösungen verschiedener Konzentrationen getestet. Der pK_B -Wert von Dinatriumhydrogenphosphat beträgt 6,8. Eine 0,1 molare Lösung wurde als optimal für die pH-Werteinstellung von 20 ml AChCl-Lösung bestimmt. Der eingestellte pH-Wert blieb über eine Stunde konstant. Diese pH-Wertstabilität ist für das geplante Sensorkonzept ausreichend.

Weiterhin wurde die optimale Substratkonzentration bestimmt. Dabei waren der pH-Wert, die Temperatur und die Enzymkonzentration konstante Parameter. Die Messungen wurden jeweils bei pH= 7 bzw. pH= 8,5 und 25°C bzw. 37°C durchgeführt. Die Bedingungen pH= 8,5 und 37°C sind dabei die Standardbedingungen zur Bestimmung der Aktivität des Enzyms Acetylcholinesterase (AChE). Die Aktivität wird in Units pro Milligramm (U/mg) angegeben. Ein Unit AChE hydrolysiert in einer Minute 1 μ M Acetylcholin zu Cholin und Essigsäure [115].

Für die Bestimmung der optimalen Substratkonzentration wurde eine Acetylcholinesterase des Zitteraals mit der Aktivität von 350 U/mg verwendet.

Die Ergebnisse sind grafisch in den Abbildungen 4.14- 4.17 dargestellt. Diese sind in der Reihenfolge geordnet, in welcher die Messreihen durchgeführt wurden. Bei den ersten beiden Messreihen, also pH= 7 und pH= 8,5 bei 25°C, wurden variable Testkonzentrationen vermessen. Schon nach den ersten Messergebnissen war anhand der Tendenzen zu

erkennen, dass die Konzentrationen 0,01 M und 0,02 M am geeignetsten sind (Abb. 4.14 und 4.15). Bei den Konzentrationen 0,01 M, 0,02 M, 0,03 M und 0,05 M ändert sich der pH-Wert innerhalb von 600 s bis zu 2,5 pH-Einheiten bei einem Start-pH-Wert= 7 und bis zu einer pH-Einheit bei einem Start-pH-Wert= 8,5. Die Konzentrationen 0,01 M, 0,02 M und 0,03 M wurden dann bei pH= 7 bzw. pH= 8,5 und 37°C vermessen, um die optimale Konzentration festlegen zu können (Abb.4.16 und 4.17). Mit der Konzentration 0,05 M wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt, da die pH-Wertänderung innerhalb von 600 s annähernd der von 0,03 M bei pH= 7 und gleich der von 0,03 M bei pH= 8,5 war.

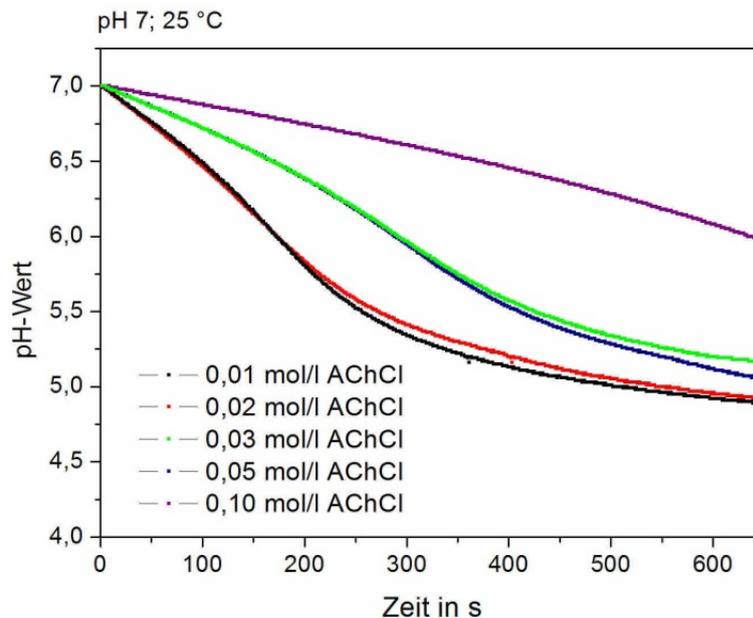


Abb.4.14 Abhängigkeit der pH- Wertänderung von der AChCl-Konzentration bei 25°C und pH-Wert_{start} =7

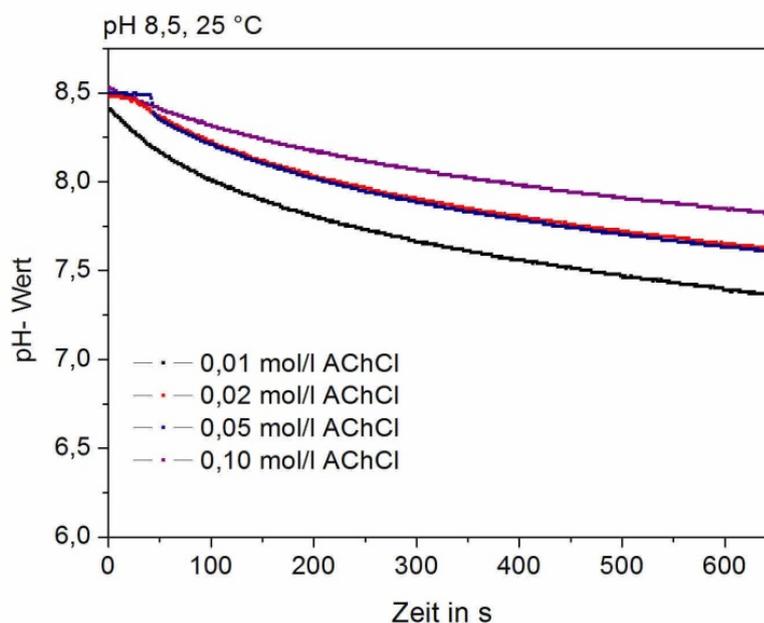


Abb.4.15 Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der AChCl-Konzentration bei 25°C und pH-Wert_{start} = 8

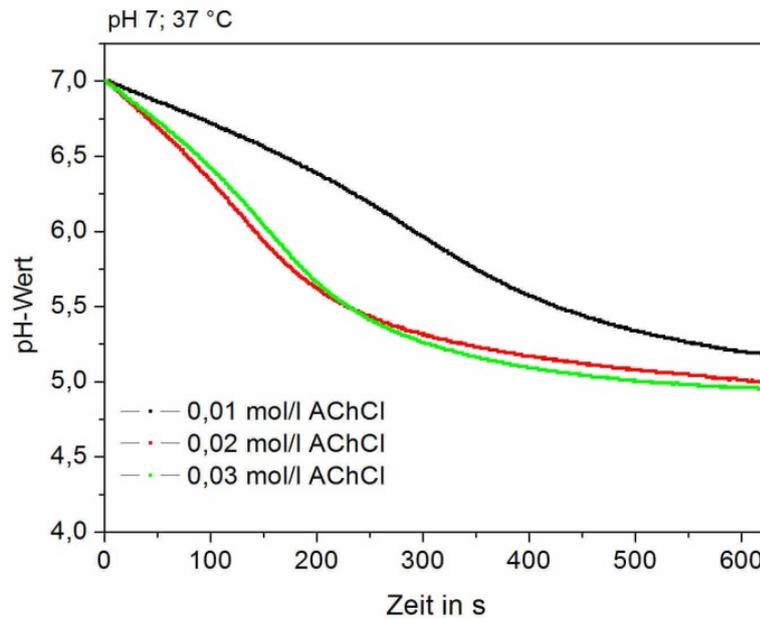


Abb.4.16 Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der AChCl-Konzentration bei 37°C und pH-Wert_{start} = 7

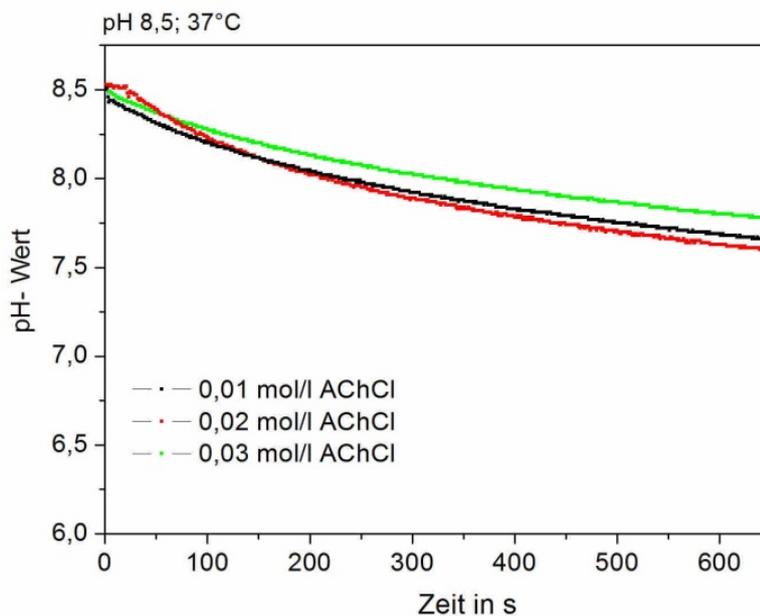


Abb.4.17 Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der AChCl-Konzentration bei 37°C und einem pH-Wert_{start} = 8,5

Als Schlussfolgerung aus den Untersuchungen wurde für die weiteren Messungen die Konzentration der Substratlösung mit 0,02 M festgelegt, da bei dieser Konzentration bei allen vier untersuchten Bedingungen gute Umsätze verzeichnet wurden. Die pH-Wertänderung war für die Konzentrationen 0,01 M und 0,02 M bei einem Start-pH-Wert von 7 gleich groß. Bei höheren Substratkonzentrationen waren die pH-Wertänderungen über den Zeitraum von 600 s geringer. Die Verringerung der pH-Wertänderung bei höherer Konzentration tritt in Folge einer Substratüberschusshemmung auf [70]. Dieser

Hemmtyp ist daran erkennbar, dass die Reaktionsgeschwindigkeit bei hohen Substratkonzentrationen nicht einer Maximalgeschwindigkeit (große pH-Wertänderung innerhalb kurzer Zeit) zustrebt, sondern absinkt. Das ist damit zu erklären, dass sich ein zusätzliches Substratmolekül an das Enzym bindet und dadurch die Reaktion hemmt. Wohingegen bei zu niedrigen Konzentrationen nicht genügend Substrat zur Hydrolyse vorhanden ist, um eine große pH-Wertänderung hervorrufen zu können.

Es wurde festgelegt, dass die weiteren Messungen bei 25°C und einem Start-pH-Wert von 7 durchgeführt werden, da bei diesen Bedingungen die größten pH-Wertänderungen innerhalb von 600 s nachgewiesen werden konnten. Die Festlegung des pH-Wertes von 7 wurde getroffen, da hierbei sowohl bei 25°C als auch bei 37°C gute Substratumsetzungen erfolgten. Als Temperatur wurde 25°C gewählt, da diese in der Praxis ohne besonderen Aufwand zu realisieren ist.

Nach der Bestimmung der Substratkonzentration erfolgte die Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration. Dazu wurden Lösungen verschiedener Enzymkonzentrationen hergestellt:

- 0,6 mg AChE in 6 ml Puffer (pH= 7) 350 U/mg
- 0,8 mg AChE in 6 ml Puffer (pH= 7) 350 U/mg
- 1,0 mg AChE in 6 ml Puffer (pH= 7) 350 U/mg
- 0,1 mg AChE in 6 ml Puffer (pH= 7) 1000 U/mg

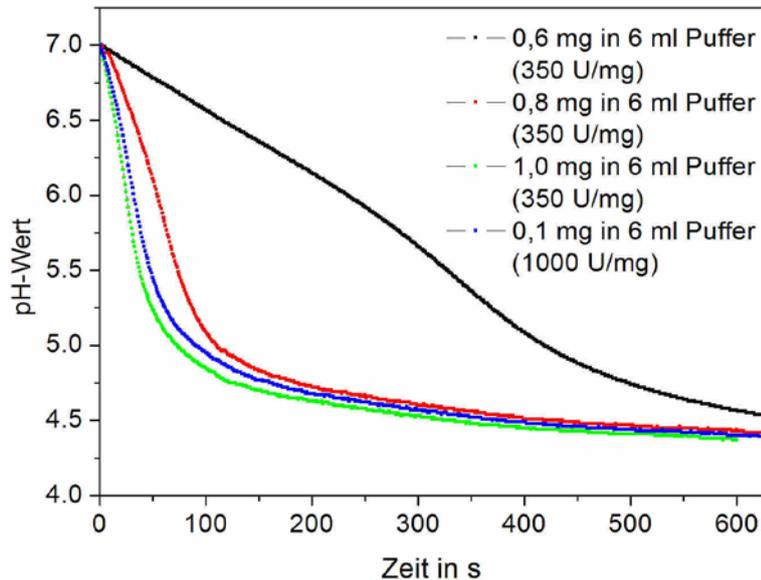


Abb.4.18 Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der Enzymkonzentration bei einer Substratkonzentration von 0,02 M

Die in Abbildung 4.18 dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass hohe Konzentrationen (0,8 mg bzw. 1 mg) der 350 U/mg Acetylcholinesterase bzw. geringe Konzentrationen (0,1mg) der reineren Acetylcholinesterase (1000 U/mg) zu einem schnellen vollständigen Umsatz des Substrates führten.

Innerhalb von 100 s kam es zu einer pH-Wertänderung von mehr als 2 pH-Einheiten. Danach sank der pH-Wert sehr langsam und ab 250 s blieb er konstant. In dieser Zeit kam es zur vollständigen Hydrolyse des Substrates.

Bei der AChE-Lösung, geringerer Konzentration, verlief die Umsetzung des Substrates, zeitlich betrachtet, anders. Die pH-Wertänderung verlief wesentlich langsamer, was am flachen Abfall der Kurve deutlich. Der vollständige Umsatz war erst nach 550 s erreicht. Dies kann auf die geringere Konzentration an AChE zurückgeführt werden.

Die Voruntersuchungen dienten der Bestimmung der Arbeitsparameter, wie Konzentration, Temperatur und Start-pH-Wert. Außerdem wurden unterschiedlich reine AChEs untersucht. Die Reinheit des Enzyms ist über die Units pro mg definiert und steht damit im direkten Zusammenhang zur Aktivität.

Die Annahme, dass das Enzym der größeren Reinheit, hier AChE 1000 U/mg, einen größeren Substratumsatz bei den als optimal bestimmten Operationsparametern $\text{pH}=7$, $T=25^\circ\text{C}$ und $c_{\text{AChCl}}=0,02\text{mol/l}$ erzielt, bestätigte sich.

Mit beiden AChEs erfolgten Untersuchungen zum Verhalten in immobilisierter Form. Die Ergebnisse werden in den nachfolgenden Abschnitten dargestellt und diskutiert.

4.4.2 Untersuchungen mit immobilisierter Acetylcholinesterase

4.4.2.1 Aktivitätsbestimmungen der immobilisierten Acetylcholinesterase

4.4.2.1.1 Einfluss der Reinheit des Enzyms

Nach den Messungen am freien Enzym wurden verschiedene Mengen des Enzyms an porösen Glasmembranen immobilisiert. Bei diesen Messungen sollte lediglich untersucht werden, ob das Enzym in immobilisierter Form aktiv ist. Die verwendeten Membranen wiesen nicht dieselben Abmaße und nicht dieselbe Dicke, aber die gleiche Porengröße auf.

Je vier Membranen wurden mit derselben Immobilisierungslösung behandelt. Innerhalb einer Konzentration waren die Membranen von gleichen Abmaßen.

Für die Messungen wurden jeweils 20 ml AChCl-Lösung temperiert und anschließend auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Dann erfolgte die Zugabe des Membran-Enzym-Komplexes. Die Lösung wurde während der gesamten Messung gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels pH-Meter verfolgt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.19 grafisch dargestellt.

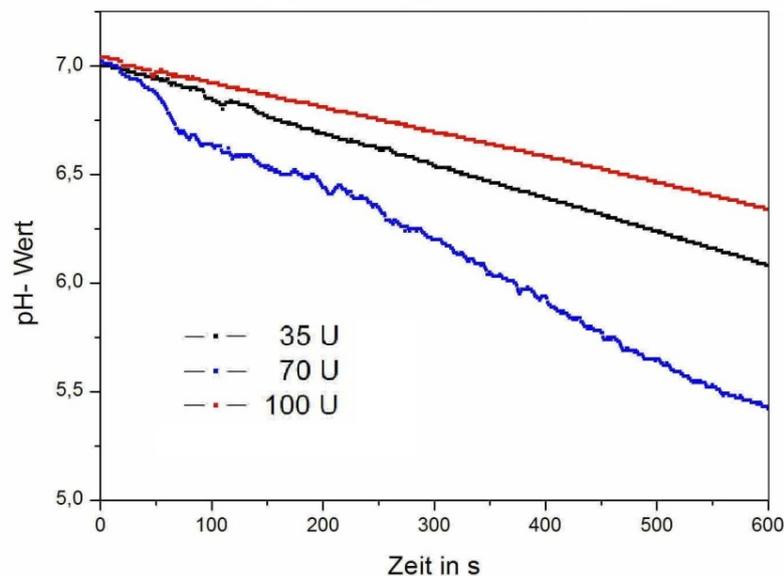


Abb. 4.19 Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der theoretischen Anzahl der immobilisierten AChE

Anhand der grafischen Darstellung der pH-Wertänderungen gegen die Zeit sind Unterschiede zwischen den drei verschiedenen beladenen Membranen erkennbar. Der Enzym-Membran-Komplex, welcher zweimal mit der Suspension *0,1 mg AChE Aktivität 350 U/mg* (entspricht der theoretischen Anzahl von 70 U auf der gesamten Membranoberfläche) behandelt wurde, bewirkte den größten Substratumsatz innerhalb von 600 s. Das wird anhand der pH-Wertänderung von über eineinhalb pH-Einheiten deutlich. Die Membranen, welche nur einmal mit der Suspension *0,1 mg AChE Aktivität 350 U/mg* (entspricht der theoretischen Anzahl von 35 U auf der gesamten Membranoberfläche) beladen wurden, erzeugte eine pH-Wertänderung von einer pH-Einheit in 600 s. Die geringste pH-Wertänderung und somit auch den geringsten Substratumsatz bewirkte der Enzym-Membran-Komplex, welcher mit einer Suspension *0,1 mg AChE Aktivität 1000 U/mg* (entspricht der theoretischen Anzahl von 100 U auf der gesamten Membranoberfläche) beladen wurde.

Tab. 4.12 Zusammenfassung der Abmaße und Enzymkonzentration der Immobilisierungssuspension

Maße der Membran (mm)	Oberfläche der Membran (m ²)*	Anzahl der möglichen immobilisierten Units pro m ²
¹ 20 x 10 x 1,0	11	3,5 (0,1 mg 350 U/mg)
¹ 20 x 20 x 0,5	11	7,0 (2 x 0,1 mg 350 U/mg)
² 20 x 20 x 0,2	4	25 (0,1 mg 1000 U/mg)

*Berechnung: $A_0 = 30 \text{ m}^2/\text{g}$ (bestimmt mit Hilfe der Quecksilber-Intrusion)

$m =$ ² $0,12 \text{ mg}$ bzw. ¹ $0,36 \text{ mg}$

$A_{(MX)} = 30 \text{ m}^2/\text{g} \cdot m_{(MX)}$

Bei den Untersuchungen nativer AChE unterschiedlicher Aktivität (Abb.4.18) erzeugte das Enzym mit einer Aktivität von 1000 U/mg den größten Substratumsatz, jedoch in immobilisierter Form den geringsten. Dieser Unterschied lässt sich nicht durch die unterschiedlich großen Oberflächen der verwendeten Membranen erklären. Die Membranen, an welche einfach bzw. doppelt das Enzym der Aktivität 350 U/mg immobilisiert

wurde, weisen eine gleichgroße Oberfläche auf (Tab.4.14). Dadurch war der Aktivitätsunterschied zwischen der einfach und der doppelt immobilisierten Membran-Enzym-Komplexe nachvollziehbar. Bei gleicher Oberfläche war es theoretisch möglich, durch zweimalige Immobilisierung doppelt so viel Enzym anbinden. Dagegen entsprach die Oberfläche der Membranen, an die das Enzym der Aktivität 1000 U/mg immobilisiert wurde, 45% der anderen. Aber die Anzahl der möglichen angebotenen Units ist um ein Vielfaches höher. Somit müssen andere Ursachen für den starken Aktivitätsverlust vorliegen.

Es gibt eine Vielzahl von Einflussfaktoren, welche die Aktivität des Enzyms im immobilisierten Zustand beeinflussen. Immobilisierte Enzyme weisen gegenüber der gleichen Menge nativer Enzyme eine bedeutend geringere Aktivität auf. Die Aktivität im immobilisierten Zustand beträgt nur noch 20-70% der ursprünglichen Aktivität [67].

Es gibt mehrere Ursachen für diesen Aktivitätsverlust [68]:

- sterische Hinderung

Die aktiven Zentren werden durch die Abschirmungseffekte des Trägers in ihrer Zugänglichkeit beeinträchtigt.

- Veränderung der Proteinkonformation

Aufgrund der Bindungsbildung zwischen Enzym und Träger ist eine Verzerrung der räumlichen Anordnung des aktiven Zentrums möglich.

- chemische Effekte

Durch Bindungsbildung kann es zur Veränderung der ionischen Gruppen im aktiven Zentrum kommen. Dadurch ist eine Verschiebung des pH-Optimums des Enzyms möglich.

- Einflüsse der Trägerumgebung

Diese indirekten Einflüsse des Trägers auf die kinetischen Parameter sind möglich, wenn Wechselwirkungen zwischen der Trägeroberfläche und den löslichen Reaktanden der Enzymreaktion auftreten. Diese Wechselwirkungen führen zu geänderten Verteilungsgleichgewichten. Die Konzentrationen an der Trägeroberfläche sind nicht mehr mit denen der ungebundenen Enzymsuspension identisch.

Diese Effekte treffen auf alle immobilisierten Enzyme unabhängig von der Art und des Reinheitsgrades zu.

Daher war es möglich, dass die Einflüsse bei dem reineren Enzym stärker zur Ausprägung kamen, was zur verminderten Aktivität im immobilisierten Zustand führte.

Als Resultat der erhaltenen Messergebnisse bezüglich der Aktivität des immobilisierten Enzyms wurden die weiteren Untersuchungen mit AChE 350 U/mg durchgeführt.

4.4.2.1.2 Einfluss der Dauer der Enzymbeladung

Neben den Untersuchungen des Einflusses der Enzymkonzentration wurde der Einfluss der Zeitdauer der Immobilisierung untersucht. Dafür wurden Membranen M_{1,0}75-2-4-70-G für 1,5 h und 3 h mit einer Suspension aus 1 mg AChE (350 U/mg) in 20 ml Puffer behandelt.

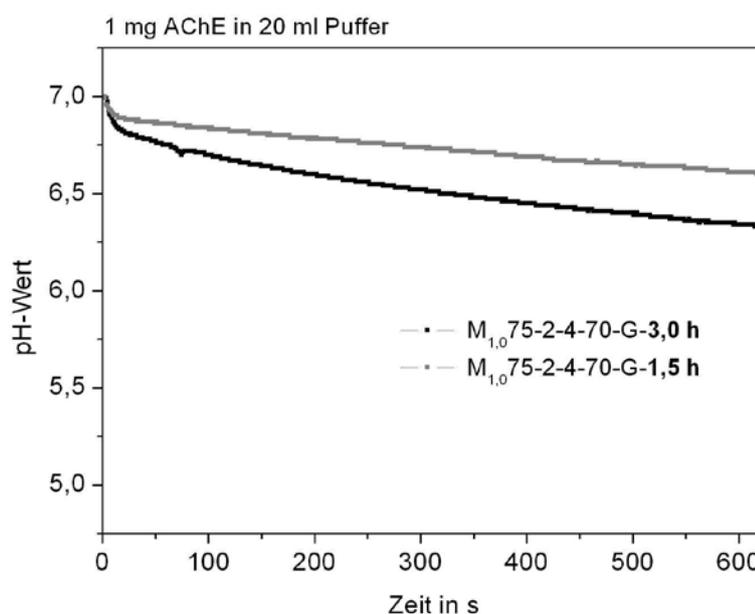


Abb. 4.20 Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der Immobilisierungsdauer

In Abbildung 4.20 wird deutlich, dass der Enzym-Membran-Komplex, welcher für 3 h immobilisiert wurde, einen höheren Substratumsatz aufwies, als jener, welcher nur 1,5 h in der Immobilisierungssuspension verweilte. Die Reaktion der kovalenten Anbindung im Inneren des Porensystems wurde durch leichten Unterdruck unterstützt, so dass von Beginn an gewährleistet war, dass das Enzym auch an die reaktiven Aldehydgruppen der inneren Oberfläche anbinden kann. In der überstehenden Lösung befanden sich weitere freie Enzyme. Diese diffundierten an die Membranoberfläche und ins Innere der Membran. Es kann davon ausgegangen werden, dass erst alle freien Aldehydgruppen an der äußeren Oberfläche mit einem Enzym reagierten und später die Anbindung im Inneren erfolgte. Aufgrund der sterischen Hinderungen durch die bereits angebondenen Enzyme, wurde die Diffusion erschwert und somit wurde die Reaktionsdauer für jede weitere Anbindung im Membraninneren länger. Daraus und aus dem erhaltenen Ergebnis lässt sich ableiten, dass nach einer Reaktionszeit von 1,5 h die höchstmögliche Beladungsdichte noch nicht ausgeschöpft war. Als Schlussfolgerung für weitere Untersuchungen sollte die Immobilisierungsdauer mindestens 3 h betragen.

4.4.2.2 Inhibierungsmessungen

Der zu entwickelnde Sensor soll unter anderem zur Detektion von Carbamaten genutzt werden. Als Modellpestizid wurde in dieser Arbeit Carbofuran verwendet. Carbofuran ist ein in Deutschland nicht mehr zugelassenes Pestizid. Dennoch gelangt es über den Import von Lebensmitteln in den Handel und damit anschließend beim Konsumenten. Die Mengen an Carbofuran bzw. anderen Carbamaten überschreiten häufig die zulässigen Grenzwerte. Carbamate und auch Phosphorsäureester wirken als Inhibitoren für die Acetylcholinesterase. Sie verhindern bzw. verringern die Umsetzung des Substrates z.B. Acetylcholinchlorid.

Vor der Inhibierungsmessung wurde jede Membran vermessen, um die Anfangsaktivität zu bestimmen. Beide Messungen, vor und nach der Inhibierung, wurden zusammen in einer Grafik dargestellt.

Für die Messungen wurden 20 ml AChCl-Lösung ($c = 0,02\text{M}$) in einem Messgefäß auf 25°C temperiert und auf $\text{pH} = 7$ eingestellt. Bei der Inhibierungsmessung erfolgte zuerst die Zugabe eines definierten Volumens an Carbofuranlösung ($c = 1\text{ mg/l}$) ehe die Membran vollständig eingetaucht wurde. In den Abbildungen (Abb.4.21-4.23) ist zum besseren Vergleich die Endkonzentration unter Berücksichtigung des Volumens an Substratlösung und des Volumens an Carbofuranlösung angegeben. Das Volumen der zugegebenen Carbofuranlösung richtete sich nach Anzahl immobilisierten Units. Je höher die Anzahl an angebindenem Enzym war, desto größer war das zugegebene Volumen an Carbofuranlösung.

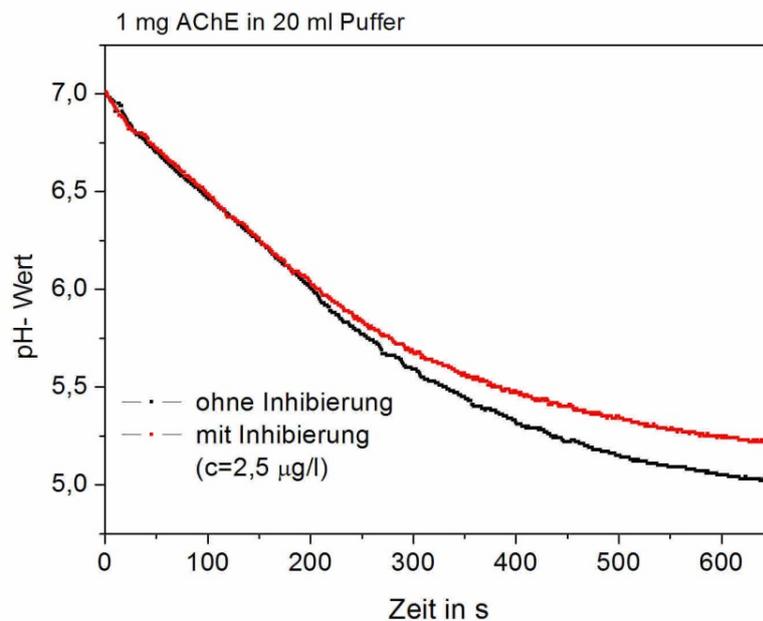


Abb. 4.21 Abhängigkeit der pH-Wertänderung nach der Zugabe von $10\ \mu\text{l}$ Carbofuranlösung eines mit 1 mg AChE in 20 ml Puffer behandelten Membran-Enzym-Komplexes

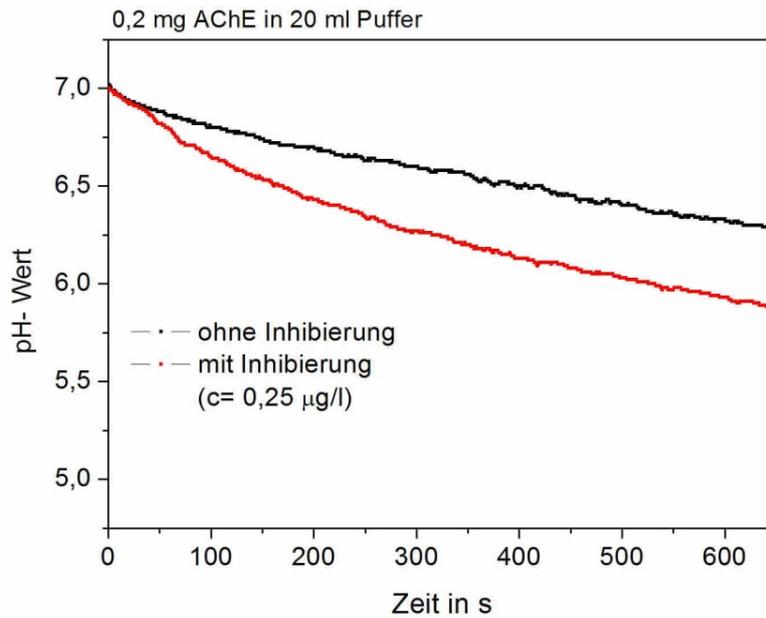


Abb. 4.22 Abhängigkeit der pH-Wertänderung nach der Zugabe von 1 µl Carbofuranlösung eines mit 0,2mg AChE in 20 ml Puffer behandelten Membran-Enzym-Komplexes

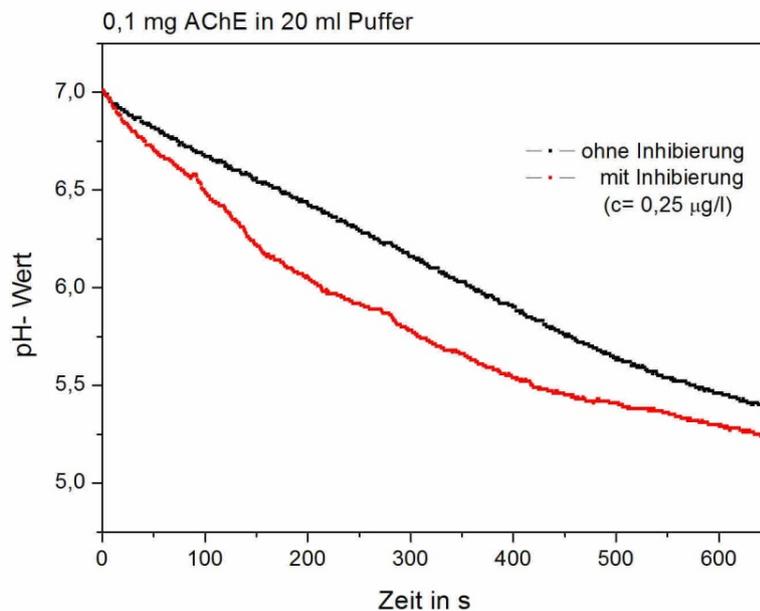


Abb. 4.23 Abhängigkeit der pH-Wertänderung nach der Zugabe von 1 µl Carbofuranlösung eines mit 0,1 mg AChE in 20 ml Puffer behandelten Membran-Enzym-Komplexes

Bereits nach der ersten Messung (Abb.4.21) war eine Inhibierung des Enzyms durch Carbofuran, anhand der pH-Wertdifferenz zwischen den beiden Messungen, zu erkennen.

Bei einer Inhibierung wird das aktive Zentrum durch den Inhibitor, hier Carbofuran, blockiert so, dass das Substrat nicht mehr anbinden und umgesetzt werden kann. Je mehr Inhibitor zugesetzt wird, desto mehr aktive Zentren werden blockiert. Im Grenzfall der vollständigen Inhibierung ist keine pH-Wertänderung mehr messbar. Schlussfol-

gernd wird für eine niedrige Nachweisgrenze eine geringe Enzymmenge benötigt. Aus diesem Grund erfolgten Inhibierungsmessungen mit Enzym-Membran-Komplexen, welche mit 0,1 mg bzw. 0,2 mg AChE in 20 ml Puffer behandelt wurden (Abb. 4.22 und 4.23). Bei beiden Inhibierungsmessungen kam es durch die Zugabe von Carbofuran zu einer Aktivierung. Dieser Effekt, der Aktivierung, ist bei Enzymen nicht untypisch; er wird als allosterische Aktivierung bezeichnet und durch allosterische Effektoren hervorgerufen. Diese Effektoren wirken nicht im aktiven Zentrum, sondern an einer anderen Stelle, wobei sie die Raumstruktur des Enzyms so verändern, dass es zu einer erhöhten Substratumsetzung führen kann [69,116].

Bei der Messung in Abbildung 4.21 wurde für die Immobilisierung mehr Enzym verwendet als bei der Messung in Abbildung 4.22. Beide Enzym-Membran-Komplexe wurden mit derselben Menge Carbofuran versetzt. Der allosterische Effekt tritt bei der Messung mit 0,2mg (Abb. 4.22) stärker hervor. Dies lässt sich auf die Menge an Enzym zurückführen. Eine größere Menge an AChE bewirkt einen größeren Umsatz als eine kleinere. Erfolgt dann noch eine Aktivierung ist der Umsatz noch höher und somit die gemessene pH-Wertänderung.

Normalerweise wirkt das Carbofuran im aktiven Zentrum als Inhibitor. Dabei blockiert es nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip das aktive Zentrum, dass kein Substrat mehr anbinden und umgesetzt werden kann. Dieser Effekt ist bei der in Abbildung 4.21 dargestellten Messung deutlich sichtbar. Der allosterische Effekt kann aber auch bei dieser Messung nicht ausgeschlossen werden, jedoch überwiegt in diesem Fall die Inhibierung.

Die erhaltenen Ergebnisse dienten als Grundlage für die Optimierungen des Enzym-Membran-Komplexes, denn das Ziel dieser Arbeit war es mit Hilfe der immobilisierten AChE eine niedrige Nachweisgrenze bezüglich des Modellpestizides Carbofuran zu erreichen. Im folgenden Kapitel 4.5 sind die durchgeführten Optimierungen und die erhaltenen Ergebnisse dargestellt.

4.5 Untersuchungen am Enzym-Membran-Komplex

Die weiteren Untersuchungen zum Herabsetzen der Nachweisgrenze am immobilisierten Enzym bauen auf den Ergebnisse der Voruntersuchungen auf. Die Membranen hatten in den folgenden Untersuchungen eine einheitliche geometrische Form (10mm x 10mm x 1mm). Der mittlere Porendurchmesser betrug 75 nm. Die optimale Konzentration der Substratlösung war 0,02 M. Als optimaler Start-pH-Wert wurde pH= 7 und eine Temperatur von 25°C bestimmt (Tab.4.13). Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse der ersten Inhibierungsuntersuchungen war es notwendig, die Methode der Inhibierung zu verändern.

Neben der niedrigen Nachweisgrenze ist eine hohe Langzeitstabilität von großer Bedeutung. Dafür wurden die Enzym-Membran-Komplexe unter unterschiedlichen Bedingungen über einen längeren Zeitraum gelagert.

Da das Messvolumen des zu entwickelnden Sensors nur wenige Mikroliter betragen soll, war es wichtig, das Volumen der Messlösung für die Untersuchungen so gering wie möglich zu halten. Das Volumen der Lösung betrug bei den Messungen 4 ml. Eine weitere Verminderung war im Rahmen der Dissertation nicht möglich.

Für das reduzierte Lösungsvolumen war die 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung zu hoch konzentriert. Für die pH-Werteinstellung genügte eine 0,05M Dinatriumhydrogenphosphatlösung. Um die Ionenstärke beizubehalten wurden der Lösung 0,05M Kaliumchlorid zugesetzt.

Tab. 4.13 Zusammenstellung der optimierten Parameter

<i>Parameter</i>	<i>optimaler Wert</i>
Temperatur	25°C
Start-pH-Wert	pH =7
Substratkonzentration	0,02 M
Konzentration der Dinatriumhydrogenphosphatlösung	0,05 M (+ 0,05 M Kaliumchlorid)

4.5.1 Erreichen einer niedrigen Nachweisgrenze

Bei den ersten Inhibierungsmessungen konnte festgestellt werden, dass die Zugabe von geringen Konzentrationen an Carbofuran nicht zum Herabsetzen der Aktivität, sondern zu einer Erhöhung führte (Abb. 4.25-4.26).

Um das Ziel einer niedrigen Nachweisgrenze zu erreichen, war eine Änderung der Inhibierung notwendig. Bei der bisherigen Methode erfolgte die Inhibierung in der Substratlösung, d.h. die Substratlösung wurde temperiert, es erfolgte die Zugabe des Carbofurans und des Enzym-Membran-Komplexes. Somit fanden Inhibierung und Substratumsatz gleichzeitig statt. Das führte dazu, dass erst nach einer gewissen Zeit der Messung ein Inhibierungseffekt erkennbar war. Anfangs waren 100% Enzym aktiv, da das Carbofuran erst die aktiven Zentren der AChE erreichen musste, um sich daran anzulagern. Je weniger Carbofuran in der Untersuchungslösung war, desto mehr Zeit wurde benötigt, um den Effekt der Inhibierung zu erreichen. Bei der Entwicklung des Sensors bestand

ein großes Interesse daran, dass die Ansprechzeit nur 5-10 min beträgt. Aus diesem Grund wurde die Inhibierungsmethode verändert. Bei der veränderten Methode fand die Inhibierung in einer separaten Lösung statt, d.h. ein definiertes Volumen an destilliertem Wasser wurde unter Rühren temperiert und mit einer definierten Menge an Carbofuran versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe des vorher vermessenen Enzym-Membran-Komplexes. Dieser wurde für 5 min unter stetigem Rühren inkubiert. In dieser Zeit wurde die Substratlösung temperiert und der pH-Wert eingestellt. Nach Ablauf der Zeit wurde der Enzym-Membran-Komplex der Inhibierungslösung entnommen und in die Substratlösung überführt und vermessen.

Um einen Vergleich der Effektivitäten der ursprünglichen und der veränderten Methode zu erhalten, wurden Membranen mit unterschiedlichen Mengen an Enzymen genutzt. Von jedem Enzym-Membran-Komplex wurde je einer nach der ursprünglichen und einer nach der veränderten Methode inhibiert und vermessen. Vor der Inhibierung wurde von jeder Membran die Aktivität bestimmt. Die Messergebnisse wurden grafisch aufgearbeitet und sind in folgenden Abbildungen dargestellt. Dabei wurden die Ergebnisse der ursprünglichen und modifizierten Methode zum besseren Vergleich (Abb. 4.24-4.25) in einer Grafik dargestellt.

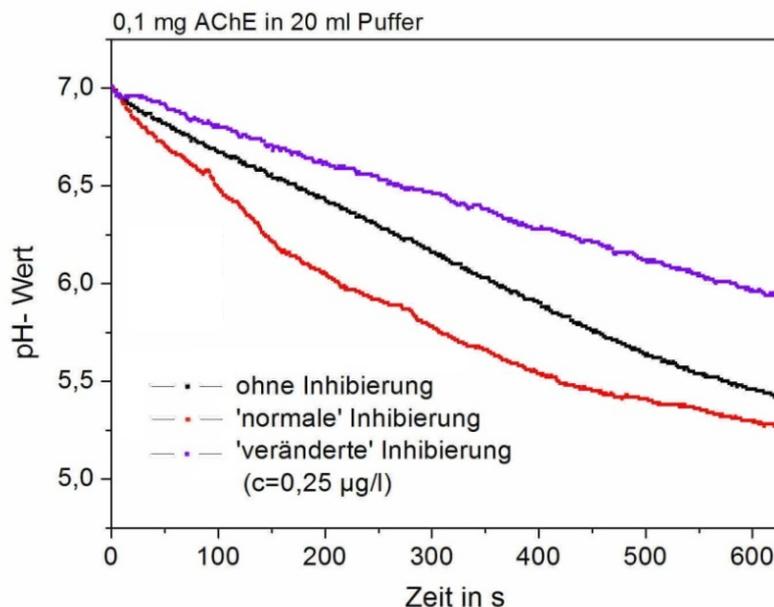


Abb. 4.24 Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der 'normalen' und der 'veränderten' Inhibierung des Enzym-Membran-Komplexes der Beladung mit 0,1 mg AChE in 20 ml Pufferlösung

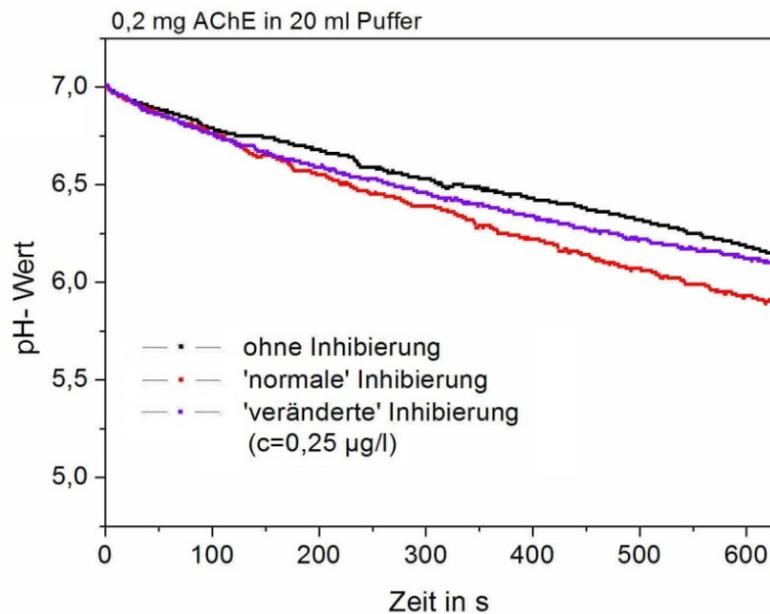


Abb.4.25 Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der 'normalen' und der 'veränderten' Inhibierung des Enzym-Membran-Komplexes der Beladung mit 0,2 mg AChE in 20 ml Pufferlösung

Beim Vergleich der beiden Methoden der Inhibierung wurden deutlich bessere Inhibierungseffekte durch die veränderte Methode erreicht. Bei Carbofuranmengen, bei denen ursprünglich keine oder nur minimale Inhibierungen erkennbar waren, führte die veränderte Methode zu erkennbaren Aktivitätsunterschieden zwischen dem inhibierten und dem nicht-inhibierten Enzym-Membran-Komplex.

Somit wurde diese Methode der Inhibierung für die weiteren Untersuchungen zum Erreichen einer niedrigen Nachweisgrenze genutzt. Doch die alleinige Änderung der Inhibierungsmethode war nicht ausreichend, um die Nachweisgrenze stark herabzusetzen. Eine weitere Überlegung war es, die Anzahl der aktiven Zentren zu reduzieren, d.h. die Menge an Enzym AChE in der Immobilisierungssuspension zu senken und damit weniger Enzym zu immobilisieren.

Zuerst wurde die Nachweisgrenze mit der bis dahin geringsten Enzymkonzentration (0,1 mg AChE in 20 ml Puffer) bestimmt. Dazu wurde die Aktivität von mehreren Enzym-Membran-Komplexen bestimmt. Anschließend erfolgte jeweils eine Inhibierung mit unterschiedlichen, geringer werdenden, Volumina an Carbofuranlösung (Abb. 4.26).

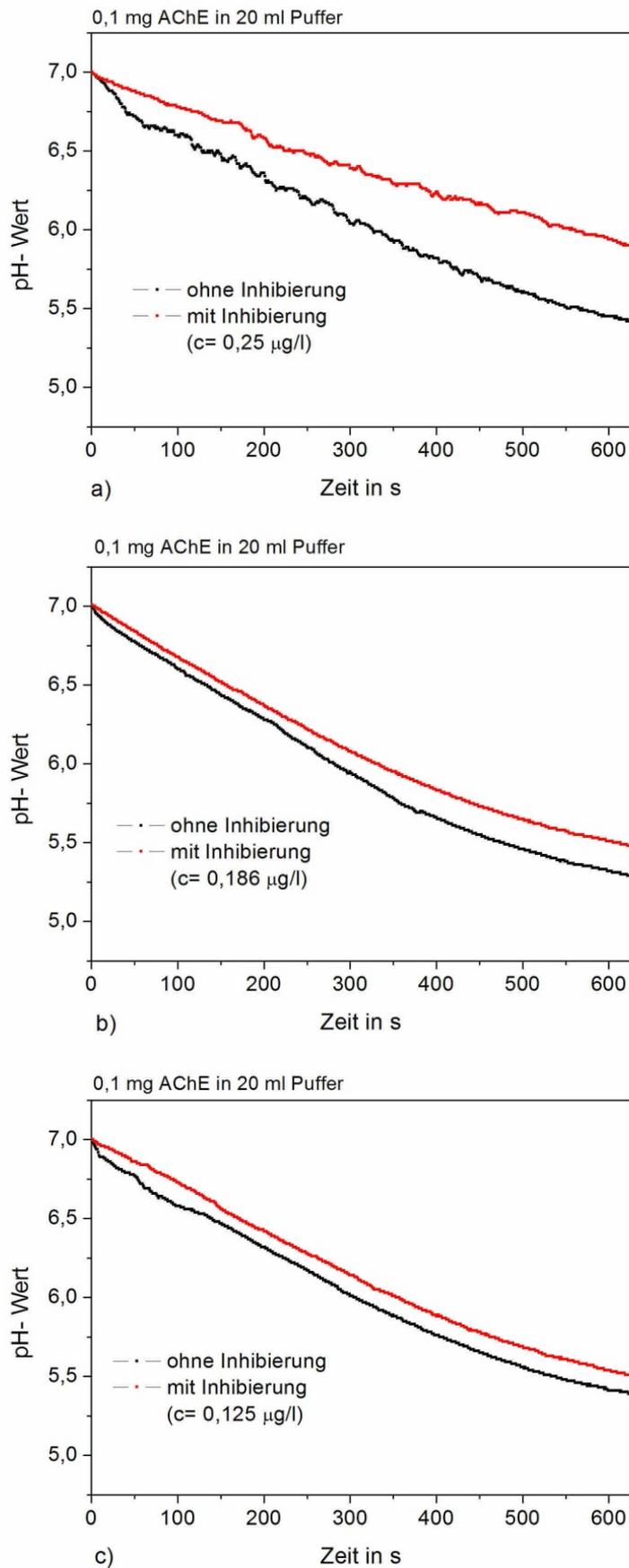


Abb. 4.26 Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der Carbofuranmenge bei einer Immobilisierung mit 0,1 mg AChE in 20 ml Pufferlösung

Bei der Immobilisierung von 0,1 mg AChE in 20 ml Pufferlösung wurden Carbofuranmengen zugegeben, welcher einer Konzentration von 0,25 µg/l, 0,186 µg/l und 0,125 µg/l entsprachen. Es wurde deutlich sichtbar, dass eine geringere Carbofuranmenge zu einer verminderten pH-Wertdifferenz zwischen inhibierter und nicht-inhibierter Membran führte. Mit derselben Menge an immobilisierter AChE war es innerhalb derselben Zeitdauer (hier 600 s) möglich, dass die drei Membranen einen gleichen Substratumsatz erzielten. Die pH-Wertdifferenz der nichtinhibierten Membran-Enzym-Komplexe betrug ca. 1,75 pH-Einheiten. Nach der Inkubation mit 0,25 µg/l Carbofuranlösung (Abb.4.26a) war sehr deutlich der Effekt der Inhibierung erkennbar.

In den weiteren Versuchen wurde die zugegebene Menge an Carbofuran (Abb.4.26b-c) auf 0,186 µg/l bzw. 0,125 µg/l verringert. Das führte zu einer geringeren pH-Wert-Differenz zwischen dem nicht-inhibierten und inhibierten Enzym-Membran-Komplex. Diese Differenz betrug nach der Zugabe von 0,186 µg/l Carbofuran nur 0,1 pH-Einheiten. Eine so geringe Differenz kann mit dem pH-sensitiven Farbstoff nicht mehr erfasst werden (siehe Kapitel 4.8.3). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Nachweisgrenze bei einer Inhibierung von 10% (I_{10}) Acetylcholinesterase festgelegt. Daraus ergibt sich für die Membranen, welche mit einer Immobilisierungslösung von 0,1 mg AChE in 20 ml Puffer behandelt wurden, eine Nachweisgrenze von **0,186 µg/l**.

Um ein weiteres Herabsetzen der Nachweisgrenze zu ermöglichen, erfolgte eine Verringerung der Enzymkonzentration der Immobilisierungssuspension um 50% und 75% der Ausgangskonzentration. Diese Enzym-Membran-Komplexe wurden vermessen und anschließend mit unterschiedlichen Mengen an Carbofuran inhibiert.

Diese Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.27 und 4.28 grafisch dargestellt.

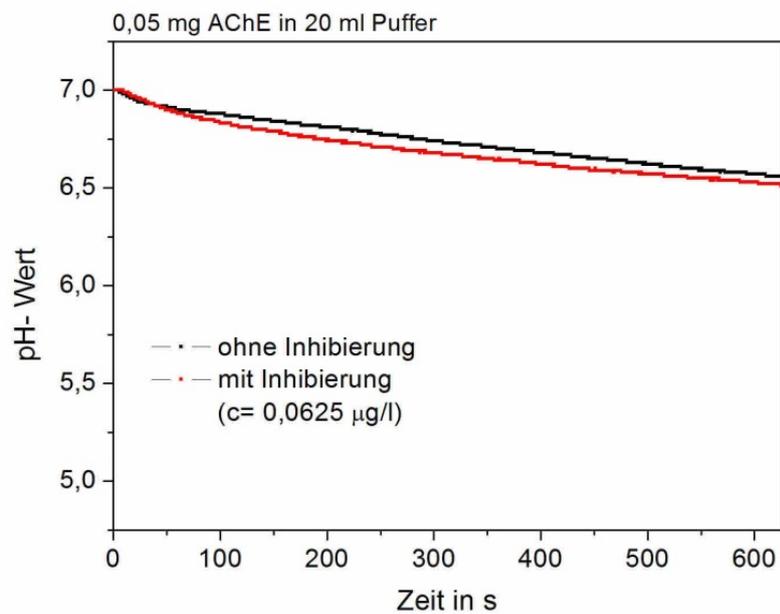
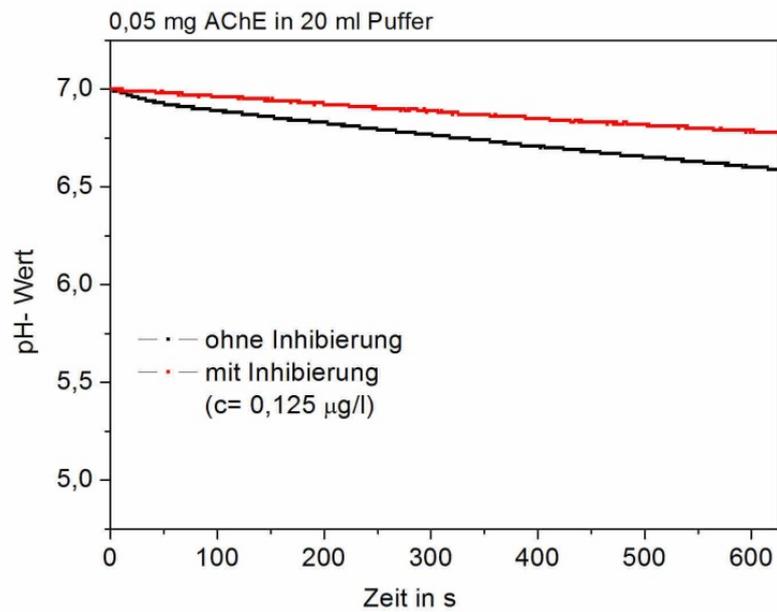


Abb. 4.27 Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der Carbofuranmenge bei einer Immobilisierung mit 0,05 mg AChE in 20 ml Pufferlösung

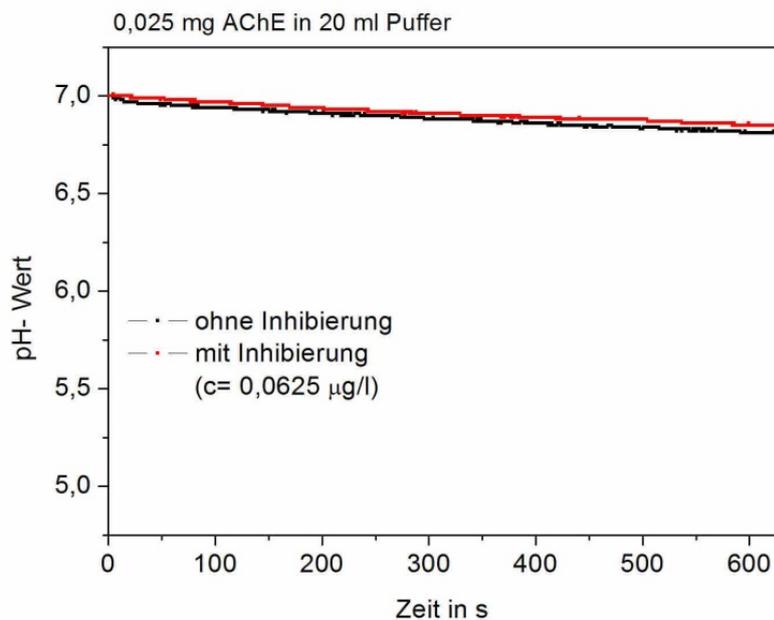
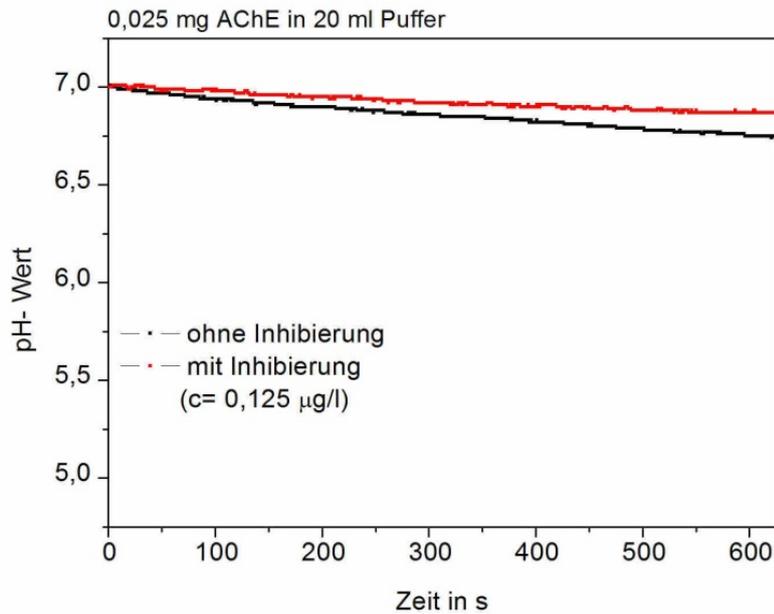


Abb. 4.28 Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der Carbofuranmenge bei einer Immobilisierung mit 0,025 mg AChE in 20 ml Pufferlösung

Durch die Verringerung der immobilisierten Menge an AChE war die pH-Wertänderung über den Zeitraum von 600 s deutlich geringer. Eine zu geringe Ausgangs-pH-Wertänderung ermöglicht keine Detektion des Inhibierungseffektes mehr. Aufgrund der geringen pH-Wertänderung bei den Untersuchungen stellte sich die Enzymmenge von 0,025 mg AChE in 20 ml als zu gering heraus.

Die geringste mögliche Enzymkonzentration der Immobilisierungssuspension ist 0,05 mg AChE auf 20 ml Pufferlösung. Die damit zu erreichende Nachweisgrenze (I_{10}) für Carbofuran beträgt **0,125 µg/l**.

Der zulässige Höchstwert an Carbofuran in Lebensmitteln ist mit 0,02 mg/kg festgelegt. Würde theoretisch ein Kilo Obst/Gemüse in einem Liter Wasser aufbereitet werden, so darf dieser Liter 0,02 mg (20µg/l) Carbofuran enthalten. Mit der immobilisierten AChE ist ein Nachweis dieser Menge bzw. deren Überschreitung gut realisierbar.

4.5.2 Fehlerbetrachtung zu den erhaltenen Nachweisgrenzen sowie Einordnung in den Stand der Technik

Die erhaltenen Nachweisgrenzen berechneten sich aus dem Volumen der Substratlösung und dem zugesetzten Volumen der Carbofuranlösung mit einer Massenkonzentration von 1 mg/l.

Alle Volumina wurden mit Hilfe von Pipetten der Firma Eppendorf entnommen und pipetiert. Die prozentualen Abweichungen und möglichen Fehlerquellen konnten der Broschüre von Eppendorf [117] entnommen werden, und die daraus resultierenden Abweichungen sind in der Tabelle 4.16 dargestellt.

Tab.4.14 mögliche Fehlerquellen beim Pipettieren [117]

<i>Einflussgröße</i>	<i>Auswirkung</i>	<i>Beeinflussbar durch</i>	<i>Feststellbar durch</i>
Abweichung der Dichte der zu pipettierenden Flüssigkeit von der Dichte des bei der Justierung verwendeten Wassers	bis 1%	Umjustieren der Pipette	Dichte der zu pipettierenden Flüssigkeit mit der Dichte von Wasser vergleichen
Abweichung des Dampfdrucks der zu pipettierenden Flüssigkeit zum Dampfdruck von Wasser bei der Justierung	bis 2%	Pipettenspitze ausreichende vorbenetzen, EN ISO 8655-6 beachten	Spitze tropft
Ungleichmäßiger Hubkraftverlauf	bis 0,5%	Gleichmäßiger Hubkraftverlauf, Kolben reinigen und fetten	Beachten der eigenen Pipettiertechnik
Ungleichmäßiger Rhythmus und Zeitabstand	bis 1,5%	Gleichmäßig pipettieren	Fehlergrenzen werden nicht eingehalten
Eintauchen der Pipettenspitze und Haltewinkel beim Pipettieren	bis 1%	Pipette senkrecht halten, EN ISO 8655-6 beachten	Optische Kontrolle der Eintauchtiefe und des Haltewinkels
Unterlassen des Vorbefeuchtens der Pipettenspitze	bis 2%	Pipettenspitze vorbenetzen	Fehlergrenzen werden nicht eingehalten
Nichtabstreifen der Pipettenspitze an der Gefäßwand	bis 3%	Abstreifen der Pipettenspitze an der Gefäßwand, EN ISO 8655-6 beachten	Fehlergrenzen werden nicht eingehalten
Undichte Pipettenspitze	0,5% bis 50%	Originale oder empfohlene Pipettenspitzen verwenden	Spitze tropft oder Fehlergrenzen werden nicht eingehalten

Die von der Firma Eppendorf angegebenen Fehlergrenzen wurden nach EN ISO 8566 [118] bestimmt. Dabei wurde in systematische und in zufällige Fehler unterschieden.

Die systematische Messabweichung ist die Abweichung des dosierten Volumens vom Nennvolumen oder vom gewählten Volumen des Kolbenhubgerätes. Sie wird durch Mittelwertbildung aus zehn Messungen ermittelt.

Dagegen ist die zufällige Messabweichung die Streuung der dosierten Volumina um den Mittelwert der dosierten Volumina. Sie wird durch Berechnung der Wiederholstandardabweichung von zehn Messungen ermittelt [118].

Grundsätzlich kann man sagen, dass jeder Messwert (X) sich aus einem hypothetischen "wahren" Wert (W) der gemessenen Größe und einer Fehlerkomponente (F) zusammensetzt.

$$X = W + F$$

Die Fehlerkomponente (F) selbst setzt sich aus dem Zufallsfehler F_{Zufall} und dem systematischen Fehler F_{system} zusammen

$$F = F_{\text{Zufall}} + F_{\text{system}}$$

Für die Entnahme von 4 ml Acetylcholinchlorid-Lösung, sind als Fehlergrenze für die systematischen Fehler $\pm 0,8\%$ und für den zufälligen Fehler $\pm 0,3\%$ zu berücksichtigen. Somit muss das Volumen mit **$4 \pm 0,044 \text{ ml}$** angegeben werden.

Bei der Entnahme der geringen Volumina von $0,5 \mu\text{l}$ sind sowohl für den systematischen als auch für den zufälligen Fehler $\pm 5\%$ mit einzurechnen. Daraus ergibt sich ein Volumen für die Carbofuranlösung von **$0,5 \pm 0,05 \mu\text{l}$** bzw. **$0,75 \pm 0,075 \mu\text{l}$**

Mit Hilfe dieser Werte können die berechneten Grenzwerte korrigiert werden.

- $0,05 \mu\text{l}$ enthalten $5 \cdot 10^{-5} \mu\text{g}$ Carbofuran

Somit waren $5 \cdot 10^{-4} \pm 5 \cdot 10^{-5} \mu\text{g}$ bzw. $7,5 \cdot 10^{-4} \pm 7,5 \cdot 10^{-5}$ Carbofuran in $4 \pm 0,044 \text{ ml}$ Acetylcholinchloridlösung enthalten.

Daraus ergibt sich dann eine Nachweisgrenze von **$0,125 \pm 0,014 \mu\text{g/l}$** bzw. **$0,186 \pm 0,016 \mu\text{g/l}$** .

Neben dem Pipettieren kamen als weitere Fehlerquellen das Einwägen des Enzyms und der Fehler durch die pH-Elektrode in Betracht. Zum Einwägen wurde eine Analysenwaage mit der Empfindlichkeit von $0,001 \text{ mg}$ verwendet. Somit ergibt sich ein Fehler durch die Einwaage von mindestens $0,001 \text{ mg}$. Das pH-Meter hat zwei Nachkommastellen an. Daraus ergibt sich ein Fehler von mindestens $0,01 \text{ pH-Einheiten}$.

Vergleicht man die realisierbare Nachweisgrenze mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen wird deutlich, dass diese in einem großen Bereich variieren.

Der von ANDRES *et al.* [20] publizierte Biosensor erreichte eine Nachweisgrenze für Carbofuran von 3,1 µg/l. Sie benutzten ein modifiziertes poröses Glas, Isothiocyanat-Glas, zur Immobilisierung der AChE. Weiterhin verwendeten sie für die Anbindung des Farbstoffes Thymolblau ein aminosilanisiertes poröses Glas. Die Untersuchungen zur Aktivität erfolgten über Extinktionsmessungen. Dafür wurden die modifizierten Gläser an ein Glasfaserkabel angebracht. Dieses diente sowohl zur Anregung des Farbstoffes als auch zur Aufnahme und Weiterleitung des reflektierten Lichts.

Das Grundprinzip des Aufbaus und der Messweise sind dem in dieser Arbeit verwendeten sehr ähnlich. Es ist somit ein guter Vergleich der erhaltenen Werte möglich. Der in dieser Arbeit erhaltene Wert für die Nachweisgrenze von 0,125 µg/l unterschreitet den von ANDRES *et al.* [20] ermittelten um ein Vielfaches.

VALDES-RAMIREZ *et al.* [14] entwickelten einen Biosensor auf der Basis eines Photopolymers. Als enzymatische Komponente untersuchten sie verschiedene Arten der Acetylcholinesterase unter anderem auch zwei genetisch veränderte. Mit Hilfe des Mutanten AChE-B1 erzielten VALDES-RAMIREZ *et al.* [14] für Carbofuran eine Nachweisgrenze von 0,9 µg/l.

QU *et al.* [119] erreichten mit einem Biosensor bestehend aus einer Multischichtelektrode eine Nachweisgrenze für Carbofuran von 0,88 µg/l. Die Elektrode wurde mit Hilfe der Layer-by-layer Methode beschichtet. Als Beschichtung dienten zwei Polyaniline, wobei in eines während der Polymerisation Acetylcholinesterase eingeschlossen wurde. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte elektrochemisch gegen eine Silber-Silber-chlorid-Elektrode.

Die Nachweisgrenze des von LASCHI *et al.* [33] entwickelten ‚Einweg‘-Sensors betrug 10,8 µg/l mit einem Fehler von 8%. Der Sensor bestand aus einer mit Cobalt(II)-phthalocyanin beschichtete Graphitelektrode. Mit Hilfe von Serumalbumin, Nafion und Glutardialdehyd erfolgte an diese die Immobilisierung von AChE. Das Prinzip dieses Sensors beruht auf amperometrischen Messungen zur Untersuchung der Hydrolyse des Substrates.

Die Nachweisgrenzen der einzelnen Biosensoren sind sehr verschieden, ebenso wie die Messprinzipien und der Aufbau der Sensoren. Jedes Messprinzip weist seine Vor- und Nachteile auf. Die in dieser Arbeit erhaltene Nachweisgrenze von 0,125 µg/l Carbofuran ist im Vergleich zu obig betrachteten publizierten Werten niedriger. Jedoch gab und gibt es sehr viele Arbeitsgruppen, welche sich mit der Entwicklung von Biosensoren beschäftigen, so dass die erhaltene Nachweisgrenze bereits unterschritten sein könnte und der Wert als gut zu betrachten ist, aber besser sein könnte. Die Vorteile der in dieser Arbeit untersuchten Methode sind die einfache Durchführung und die niedrige Nachweisgrenze von **0,125 µg/l** für das Modellpestizid Carbofuran.

Während der Untersuchungen stellte sich die Mindest-pH-Wertdifferenz zwischen dem inhibierten und dem nicht-inhibierten Enzym-Membran-Komplex als ein Nachteil heraus. Sie ist notwendig, damit die geplante Reaktionsverfolgung mittels eines pH-

sensitiven Farbstoffes erfolgen kann. Außerdem wirkt sich die Inkubation negativ auf die Gesamtmessdauer aus.

Eine weitere Schwierigkeit für die potentielle Anwendung stellt das exakte Einstellen des pH-Wertes der Messlösung dar. Im Großteil der veröffentlichten Arbeiten über Biosensoren verwendeten die entsprechenden Arbeitsgruppen Pufferlösungen als Reaktionsmedium. Das ist aufgrund des Messprinzips in diesem Fall nicht möglich.

4.5.3 Untersuchungen zur Lagerstabilität

Die Enzym-Membran-Komplexe sind als 'Einweg-Komponenten' konzipiert worden und die Herstellung vor Ort durch den späteren Anwender (Lebensmittelkontrolleur, Landwirt usw.) ist nicht realisierbar. Daher ist es notwendig, diese zentral zu produzieren und in die entsprechenden Messeinheiten abzapacken. Die gefertigten Enzymträger müssen so verpackt und gelagert werden, dass sie über einen längeren Zeitraum (mehrere Monate) stabil bleiben.

Unter der Stabilität immobilisierter Enzymderivate versteht man im weitesten Sinne den Erhalt der Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit, für die das Enzym definierten Bedingungen ausgesetzt ist. Bei der Arbeit mit immobilisierten Enzymen muss zwischen der Operations- und Lagerstabilität unterschieden werden.

Die Operationsstabilität bezeichnet die Stabilität des Enzyms, welche unter Reaktionsbedingungen vorliegt. Dagegen kennzeichnet die Lagerstabilität die Stabilität des Enzyms unter Lagerbedingungen [120].

Die Operations- bzw. Lagerbedingungen können sehr unterschiedlich sein. Eine hohe Operationsstabilität ist für den geplanten Sensor nicht notwendig, da die Enzymmembranen nur für eine Probenbestimmung verwendet werden sollen. Im Folgenden werden die Parameter für die optimalen Lagerungsbedingungen bestimmt.

4.5.3.1 Lagerungen in Puffer und auf puffergetränktem Filterpapier

Bei der ersten Variante erfolgte die Lagerung der enzymbeladenen Membranen in je 2 ml Puffer pH= 7 in kleinen verschließbaren Gläschen bei 4°C. Parallel dazu wurde je eine Membran auf mit Puffer getränktem Filterpapier in verschließbaren Gläschen bei 4°C gelagert. An verschiedenen Tagen wurde jeweils eine direkt in Puffer und eine auf getränktem Filterpapier gelagerte Membran vermessen.

Zur Verdeutlichung der Unterschiede in der Langzeitstabilität zwischen den verschiedenartig gelagerten Membranen wurden die Messkurven der jeweils gleichen Lagerungsdauer in eine Grafik gezeichnet (Abb. 4.29a-d).

Diese Messungen wurden bei pH 8 durchgeführt, da anfangs geplant war, dass die späteren Messungen des Sensors trotz der schlechteren Umsätze bei diesem pH-Wert durchgeführt werden sollten. Diese Entscheidung beruhte zu dieser Zeit auf den bis dahin erhaltenen Untersuchungsergebnissen bezüglich des pH-sensitiven Farbstoffes.

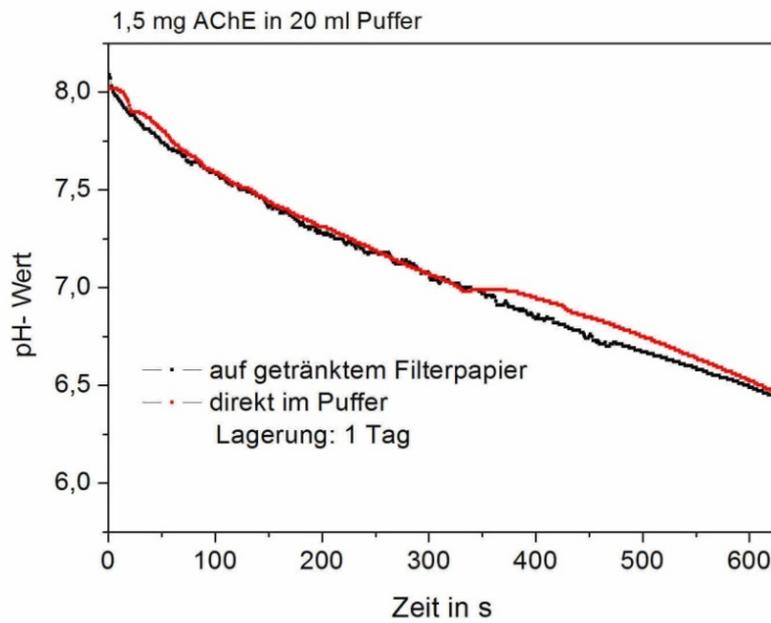


Abb. 4.29a Abhängigkeit der pH-Wertänderung von den Lagerungsbedingungen nach 1 Tag Lagerung

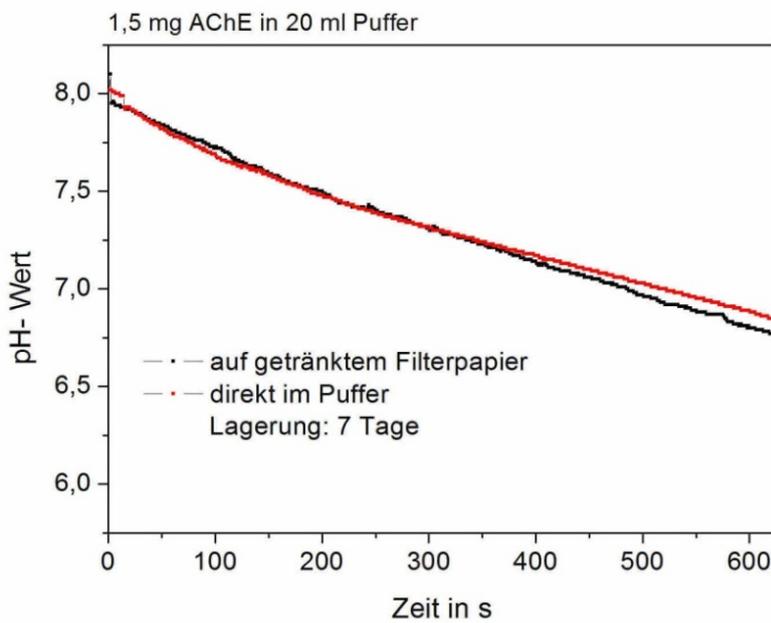


Abb. 4.29b Abhängigkeit der pH-Wertänderung von den Lagerungsbedingungen nach 7 Tagen Lagerung

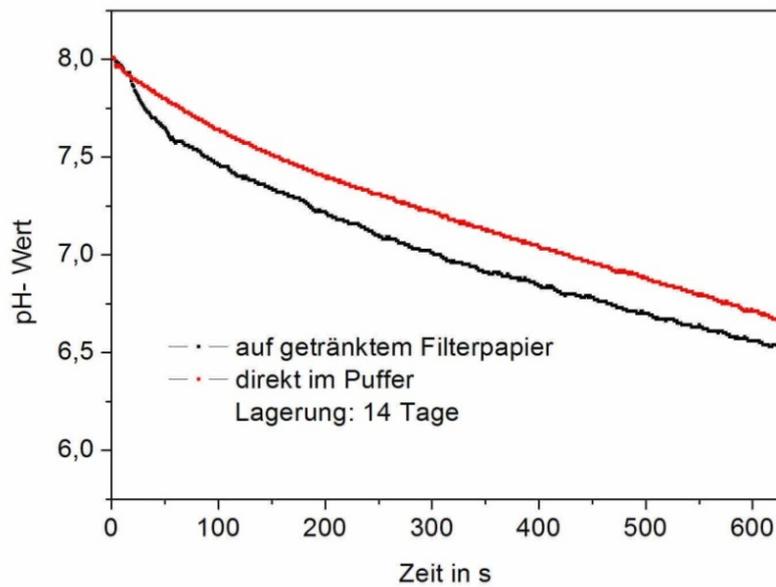


Abb. 4.29c Abhängigkeit der pH-Wertänderung von den Lagerungsbedingungen nach 14 Tagen Lagerung

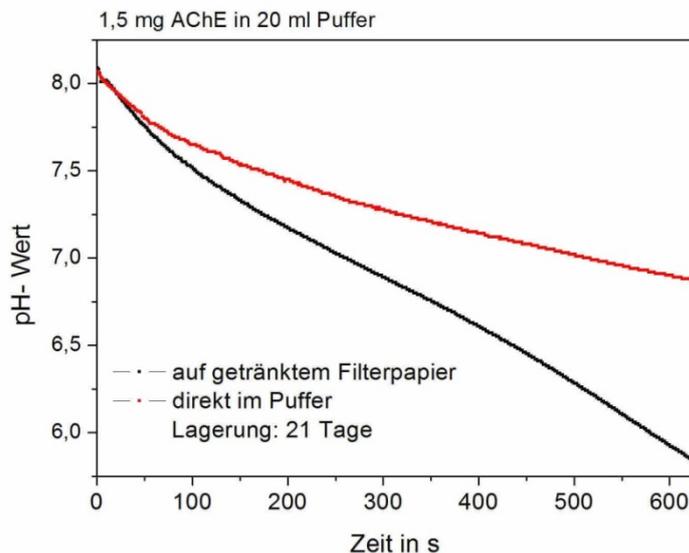


Abb. 4.29d Abhängigkeit der pH-Wertänderung von den Lagerungsbedingungen nach 21 Tagen Lagerung

Es ist ein deutlicher Aktivitätsunterschied zwischen den unterschiedlich gelagerten Enzym-Membran-Komplexen zu erkennen. Die Messkurve der Membran, welche für 21 Tage auf puffergetränktem Filterpapier lagerte, wies im Vergleich zu den in Puffer gelagerten Membranen einen veränderten Verlauf auf. Die Ursache wurde nicht weiter untersucht.

Der im Puffer gelagerte Enzym-Membran-Komplex wies im Vergleich zu dem auf dem Filterpapier gelagerten einen größeren Aktivitätsverlust auf. Die Ursachen für den Aktivitätsverlust von immobilisierten Enzymen sind noch nicht eindeutig geklärt.

In der Literatur erfolgte bei den Untersuchungen zur Langzeitstabilität von immobilisierten Enzymen immer der Vergleich zum nativen Enzym, so dass die Stabilisierung durch die Immobilisierung betrachtet wurde. Die Immobilisierung führt bewiesenermaßen zur Stabilisierung gegen den mikrobiellen und proteolytischen Abbau [121]. Die Immobilisierung bietet jedoch keinen 100 %-igen Schutz, so dass der proteolytische und mikrobielle Abbau als Ursachen für die Inaktivierung nicht auszuschließen sind. Weiterhin wurde bei Untersuchungen festgestellt, dass eine Immobilisierung die Autolyse verringert bzw. in Einzelfällen ganz verhindert. Bei der Autolyse kommt es zur Zersetzung und somit zur Inaktivierung des Enzyms ohne Fremdeinwirkung und dies ist im Fall der immobilisierten AChE nicht vollständig auszuschließen [122]. Auch eine Konformationsänderung z.B. Entfalten, kann eine Ursache für die Inaktivierung des Enzyms sein. Diese wird durch die Anbindung an ein Substrat gemindert, jedoch nicht vollständig eliminiert. Außerdem konkurrieren die reaktiven nicht umgesetzten Gruppen der Matrixoberfläche und die reaktiven Gruppen des Enzyms miteinander, so dass es trotz kovalenter Anbindung zur Inaktivierung durch Konformationsänderung kommen kann [121].

Diese Ursachen können sowohl bei den auf Filterpapier gelagerten als auch bei den direkt im Puffer gelagerten Proben zur Inaktivierung führen. Jedoch scheint dies stärker bei direkt im Puffer gelagerten aufzutreten. Leaching als Grund für die beobachtete Inaktivierung wird in der Literatur nur selten genannt. Die Abschnitt 4.2.1.5 dargestellten Untersuchungen zur Leachingstabilität von aminosilanisierten porösen Glasmembranen zeigten aber eine deutliche Abnahme der Aminogruppendichte mit voranschreitender Lagerungsdauer in der Pufferlösung. Ob dieser Effekt auch beim Enzym-Membran-Komplex auftritt und somit zur Inaktivierung beiträgt, konnte nicht geklärt werden.

Bei weiteren Lagerungen stellte sich heraus, dass es beim Lagern auf Filterpapier zu einem mikrobiellen Befall kam. Dieser äußerte sich in Form von Schimmelbildung nach ca. drei Wochen Lagerungsdauer. Die Schimmelsporen griffen auf die Membranen über. Diese mikrobielle Kontamination kann zu Aktivitätsverlusten bzw. unkontrollierten Abbauprozessen führen [120]. Um diesem negativen Einfluss entgegen zu wirken, erfolgten Überlegungen bezüglich einer weiteren Lagerungsmethode. Diese sollte dem Grundprinzip der 'Filterpapierlagerung' entsprechen. Die Membranen sollten stets mit Puffer benetzt sein, aber nicht in der Lösung "schwimmen". Somit war es notwendig ein Material zu finden, welches resistent gegen mikrobiellen Angriff ist. Weiterhin war es wichtig, dass es leicht zu bearbeiten und ein naturnahes Material, wie die Zellulose des Filterpapiers, ist.

4.5.3.2 Lagerungen auf puffergetränkten Celluloseacetat-Plättchen

Bei dieser Variante wurden Plättchen aus Celluloseacetat verwendet. Die Plättchen wurden mit einem Durchmesser von 2 cm aus handelsüblichen Celluloseacetat-Platten ausgestanzt. Vor der Verwendung wurden diese in destilliertem Wasser über einen Zeitraum von 30 min ausgekocht und anschließend getrocknet. Diese dritte Variante ist vom Prinzip gleich der Lagerung auf dem puffergetränkten Filterpapier. Hierbei wurden die

Membranen nur von einem dünnen Feuchtigkeitsfilm benetzt, so dass das Austrocknen verhindert und eine konstant feuchte Umgebung gewährleistet wurde.

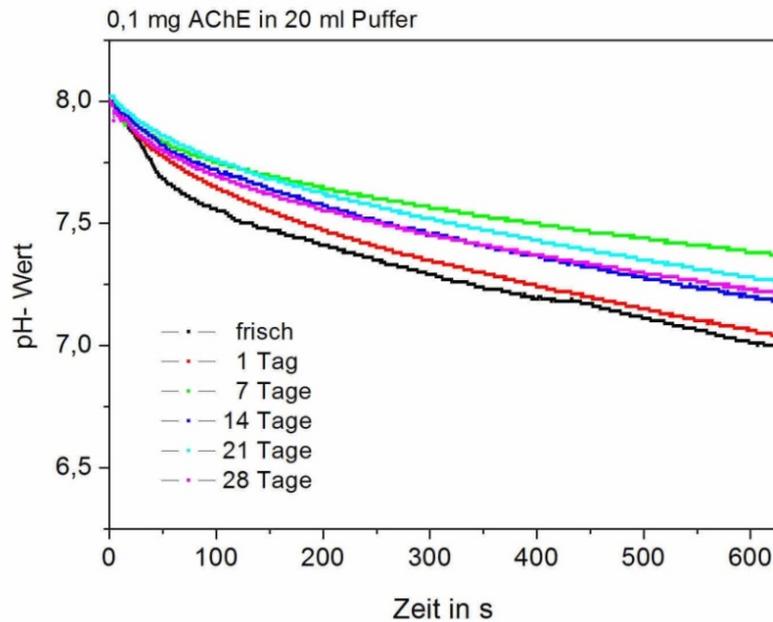


Abb.4.30 pH-Zeit-Abhängigkeit eines mit 0,1 mg in 20 ml Puffer immobilisierten Enzym-Membran-Komplexes von der Lagerungsdauer bei einer Lagerung auf getränkten Celluloseacetat-Plättchen

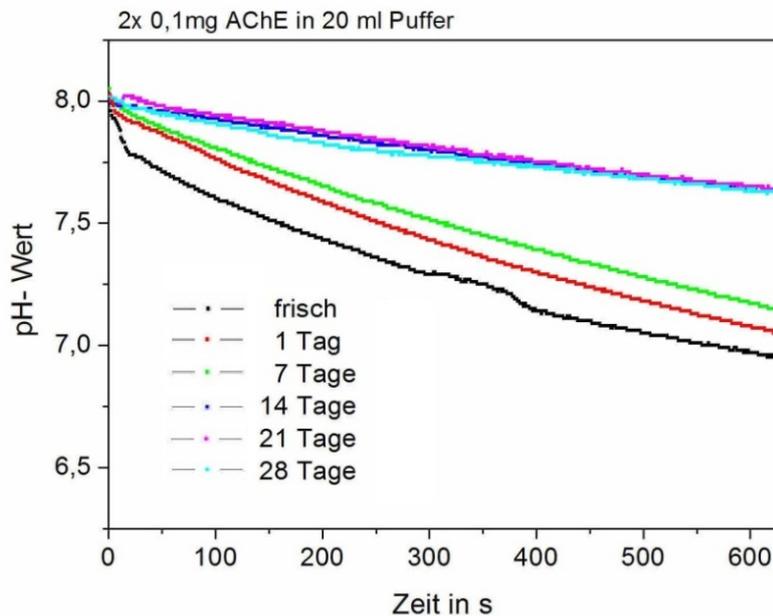


Abb.4.31 pH-Zeit-Abhängigkeit eines mit 2x0,1 mg in 20 ml Puffer immobilisierten Enzym-Membran-Komplexes von der Lagerungsdauer bei einer Lagerung auf getränkten Celluloseacetat-Plättchen

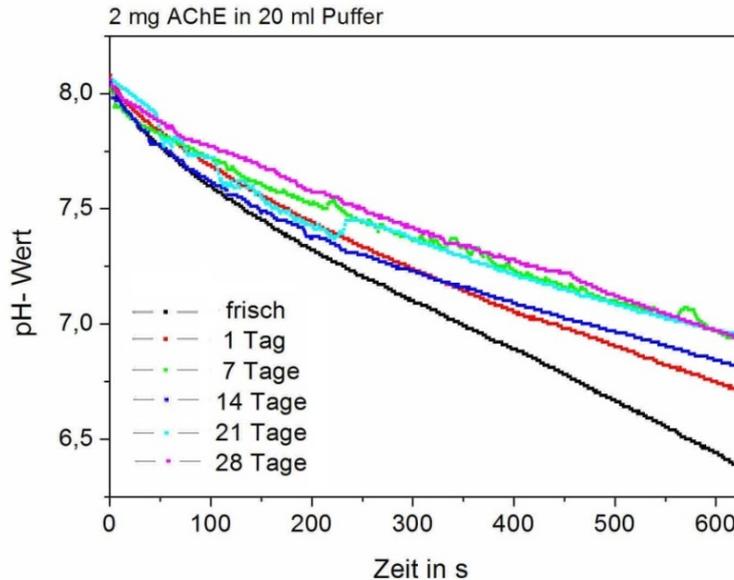


Abb.4.32 pH-Zeit-Abhängigkeit eines mit 2 mg in 20 ml Puffer immobilisierten Enzym-Membran-Komplexes von der Lagerungsdauer bei einer Lagerung auf getränkten Celluloseacetat-Plättchen

Bei allen drei mit unterschiedlich konzentrierten Enzymlösungen behandelten Membranen kam es in einem Zeitraum von 28 Tagen zu einem Aktivitätsverlust.

Anhand der Abbildungen 4.30-4.32 waren für die unterschiedlichen Immobilisierungen verschiedenstarke Aktivitätsverluste erkennbar.

Zur besseren Übersicht werden in den Teilabbildungen 4.33 a-c nur der Kurvenlauf der frischen und der für 28 Tage gelagerten Membranen der jeweiligen Konzentration eingezeichnet.

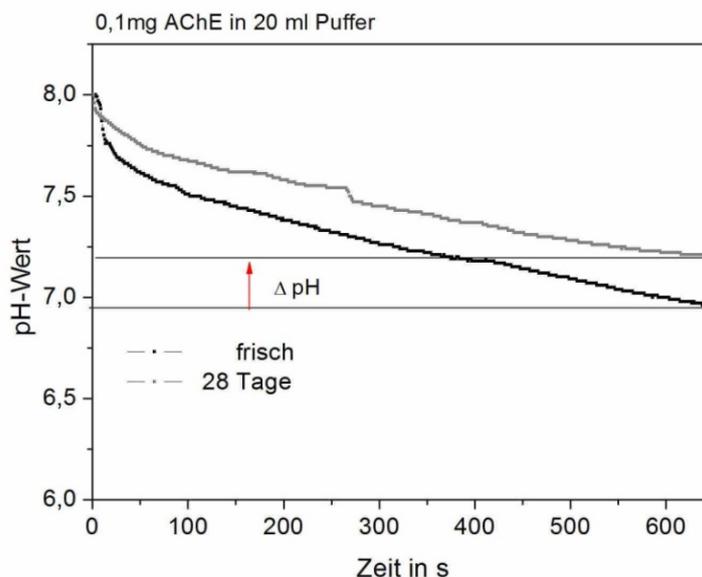


Abb. 4.33a Aktivitätsverlust nach 28 Tagen Lagerung eines einfach immobilisierten Enzym-Membran-Komplexes

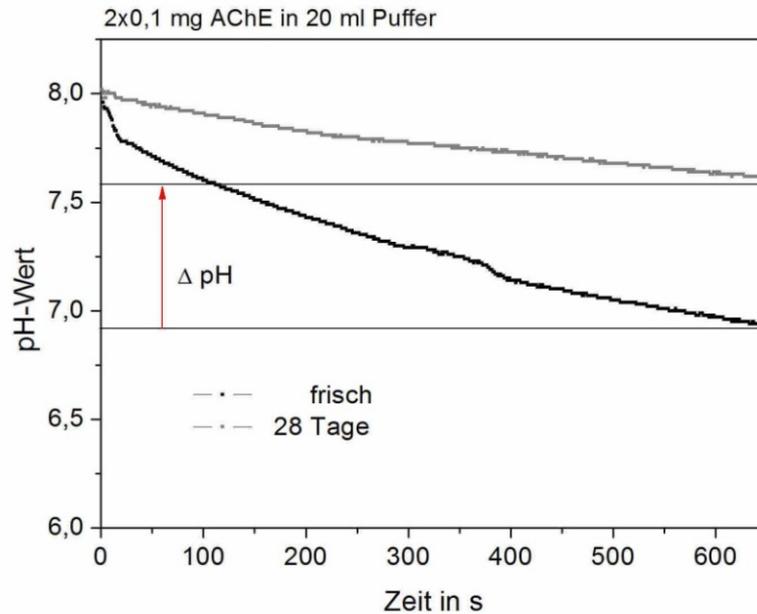


Abb. 4.33b Aktivitätsverlust nach 28 Tagen Lagerung eines zweifach immobilisierten Enzym-Membran-Komplexes

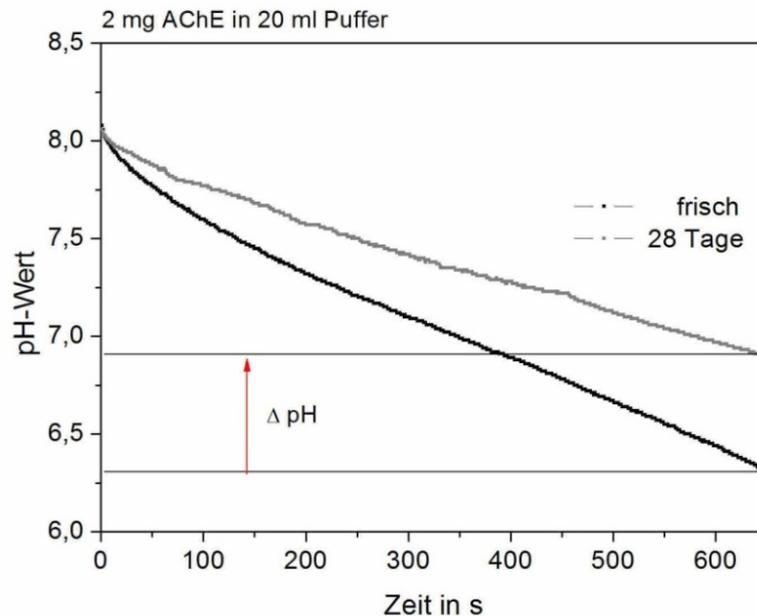


Abb. 4.33c Aktivitätsverlust nach 28 Tagen Lagerung einer einfach immobilisierten Membran

Mit Hilfe der Abbildungen 4.33a-c und den daraus ersichtlichen pH-Wertdifferenzen der frischen und der 28 Tage gelagerten Membranen, können die prozentualen Restaktivitäten angegeben werden. Wobei die erreichte pH-Wertdifferenz der frischen Membran 100% entspricht.

Als Restaktivitäten ergeben sich für die einfach mit 0,1mg AChE in 20 ml Puffer behandelte Membran 76%, für die einfach mit 2mg AChE in 20ml Puffer beladene Membran

61% und für die zweifach immobilisierte Membranen die geringste Restaktivität von 42%.

Anhand der Restaktivitäten könnte man annehmen, dass es bei einer zweifachen Immobilisierung zu einem höheren Aktivitätsverlust kommt, als bei einer Einfachen. Eine weitere Annahme aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wäre, dass eine höhere Konzentration und eine daraus resultierende größere Enzymdichte ebenso einen höheren Aktivitätsverlust durch die Lagerung aufweist.

Die unterschiedlichen Mengen an angebondenen Enzymen führten zu verschiedenen starken intermolekularen Wechselwirkungen und Wechselwirkungen mit der Glasoberfläche.

Eine Ursache für den starken Aktivitätsverlust der doppelt immobilisierten Membranen könnte eine vermehrte Anbindung durch intermolekulare Wechselwirkungen statt durch kovalente Bindungen sein. Durch die Lagerung in einem polaren Lösungsmittel kommt es zum Ablösen der nicht kovalent gebundenen Enzyme. Dieser Vorgang ist bereits nach 14 Tagen abgeschlossen, denn ab dem 14. Tag wiesen die Membranen eine konstante Aktivität auf.

Das könnte auch eine mögliche Ursache für die Membranen, welche mit der hochkonzentrierten Lösung behandelt wurden, sein. Jedoch kam es hierbei auch zu einer größeren Anzahl kovalenter Bindungen, so dass die Restaktivität noch bei über 60% lag.

Ein Vergleich der drei untersuchten Varianten der Lagerung zeigt, dass die Lagerung auf Celluloseacetat die vorteilhafteste Lösung ist. Die Enzym-Membranen wurden benetzt und es war nach vier Wochen Lagerung kein mikrobieller Befall erkennbar.

Um eine bestmögliche Lagerstabilität zu gewährleisten, galt es noch weitere Einflussfaktoren, wie Temperatur und umgebende Atmosphäre, zu untersuchen. Dafür wurden die Enzym-Membran-Komplexe, welche unter identischen Bedingungen generiert wurden bei unterschiedlichen Bedingungen auf puffergetränkten Celluloseacetat-Plättchen gelagert. Es wurde untersucht, wie sich Schutzgas bzw. Luftatmosphäre bei 600 mbar und Temperaturen von 0°C – 40°C auf die Lagerstabilität auswirken. Der große Temperaturbereich wurde gewählt, um zu bestimmen, ob gravierende Aktivitätsverluste auftreten würden, falls es beim Transport bzw. der Lagerung der späteren Sensorkomponente zu Unterbrechungen der Kühlkette kommen würde.

4.5.3.3 Einfluss von Lagerungstemperatur und -atmosphäre

Die Lagerung erfolgte sowohl unter Stickstoff, bei 600 mbar Unterdruck als auch bei normaler Raumluft. Weiterhin erfolgte eine Variation der Temperatur (0°C, 4°C, Raumtemperatur und 40°C). In den nachfolgenden Abbildungen 4.33a-d sind die Ergebnisse grafisch zusammengefasst.

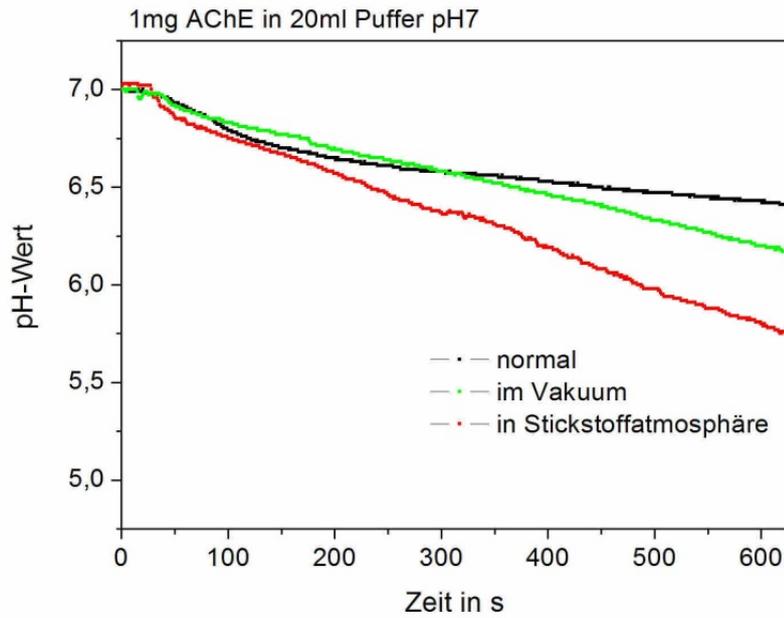


Abb.4.34a Abhängigkeit der pH-Wertänderung nach 1 Woche Lagerung bei 0°C

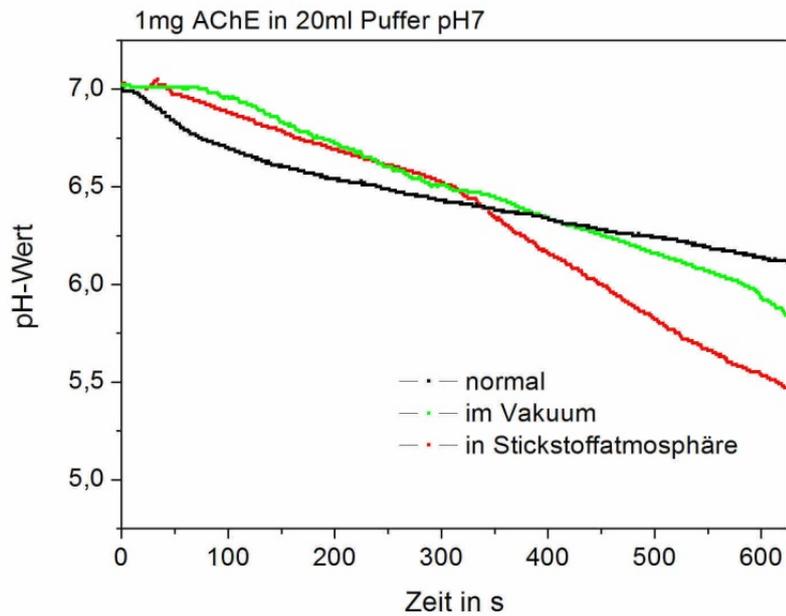


Abb.4.34b Abhängigkeit der pH-Wertänderung nach 1 Woche Lagerung bei 4°C

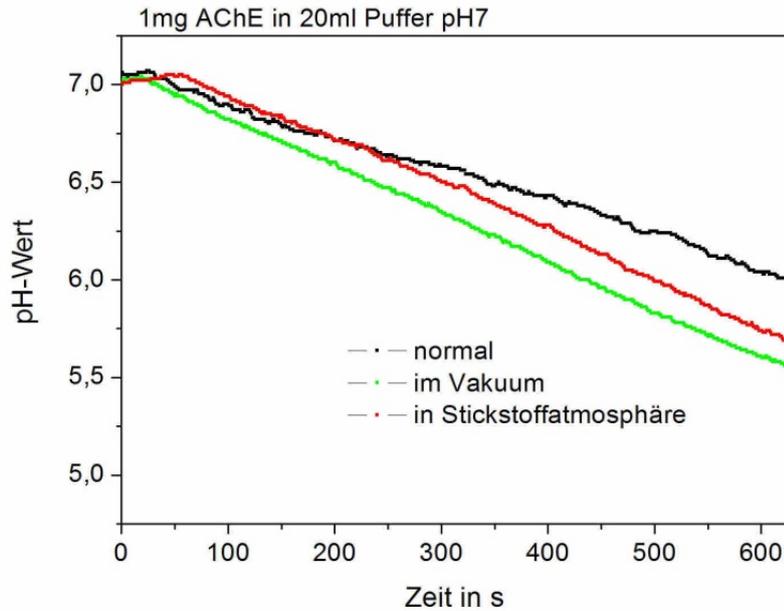


Abb.4.34c Abhängigkeit der pH-Wertänderung nach 1 Woche Lagerung bei Raumtemperatur

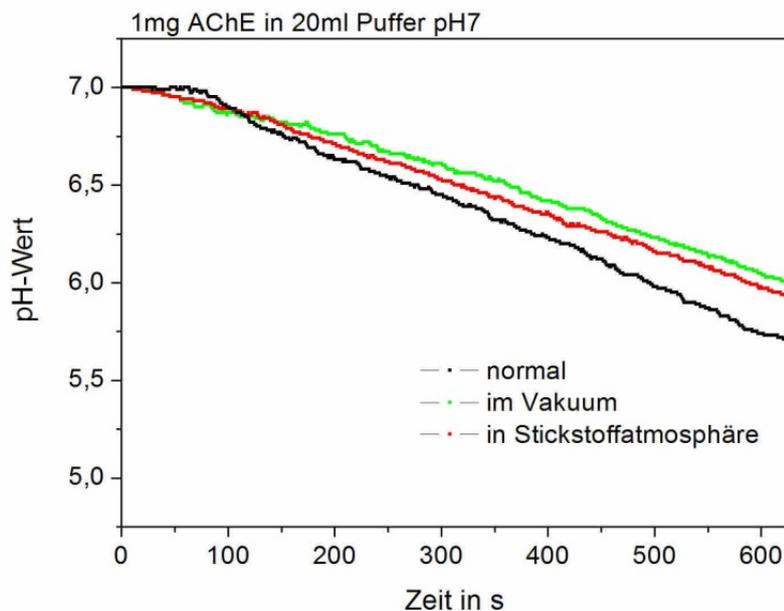


Abb.4.34d Abhängigkeit der pH-Wertänderung nach 1 Woche Lagerung bei 40°C

Für die Lagerung bei 0°C über einen Zeitraum von einer Woche stellte sich die Stickstoffatmosphäre als die effektivste der drei Untersuchten heraus.

Eine ähnliche Tendenz zeigte sich bei der Lagerung bei 4°C. Auch hier wiesen die Enzym-Membran Komplexe, welche bei Raumluft lagerten den geringsten Substratumsatz auf.

Bei der Lagerung bei Raumtemperatur zeigten die bei 600 mbar aufbewahrten Komplexe die größte Aktivität nach einer Woche. Auch hier erzeugten die bei Raumluft gelager-

ten Membranen die geringste pH-Wertänderung. Dagegen wiesen sie bei der Aufbewahrung bei 40°C über eine Woche den größten Substratumsatz auf.

Bei der Betrachtung aller aus diesen Bestimmungen erhaltenen Ergebnisse, ließ sich feststellen, dass die Lagerung unter Stickstoff bei allen in dieser Arbeit untersuchten Temperaturen zu guten Lagerstabilitäten führte.

Die möglichen Ursachen für die Unterschiede innerhalb der untersuchten Temperaturen und Atmosphären werden im Folgenden diskutiert.

Alle Messungen wurden unter gleichen, den als optimal bestimmten, 'Arbeitsbedingungen' durchgeführt. Daher können die Aktivitätsunterschiede allein auf die veränderten Lagerungsbedingungen zurückgeführt werden. Die Aktivitätsunterschiede zwischen denen unter Schutzgas bzw. bei 600 mbar gelagerten und jenen unter Raumluft (Abb.4.34a-c) könnten auf eventuell vorhandene Mikroorganismen zurückgeführt werden. In der Raumluft sind viele Mikroorganismen, sowohl schädliche (proteolytischer bzw. mikrobieller Abbau [120]) als auch unschädliche, enthalten.

Für Lagerung bei 600 mbar wird ein Teil der Luft abgesaugt, somit auch ein Teil der Mikroorganismen. Bei der Lagerung unter Stickstoff erfolgte ein Austausch von Luft gegen Stickstoff.

Jedoch korreliert diese Annahme nicht mit dem Ergebnis der Lagerung bei 40°C, denn hierbei war die Enzymmembran am aktivsten, welche bei Raumluft lagerte. Somit müssen andere Ursachen vorliegen. Jedoch sind diese wie bereits in den vorherigen Abschnitten bereits erwähnt noch nicht eindeutig geklärt. In Publikationen wird meist nur eine Lagerungsvariante des immobilisierten Enzyms mit dem freien Enzym verglichen. MORADZAGEDAN *et al.* [123], WHITE *et al.* [124] und NOROUZY *et al.* [125] untersuchten und verglichen die Stabilitäten von immobilisierter AChE bei unterschiedlichen Bedingungen.

MORADZAGEDAN *et al.* [123] immobilisierten AChE an Polyvinylacetat(PVA)-Nanofasern. Für die Untersuchungen zur Lagerstabilität wurden diese PVA-Nanofasern in Phosphatpufferlösung zum einen bei 4°C und zum anderen bei 30°C aufbewahrt. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten über einen Zeitraum von 100 Tagen. Die Messungen wurden in regelmäßigen Abständen durchgeführt.

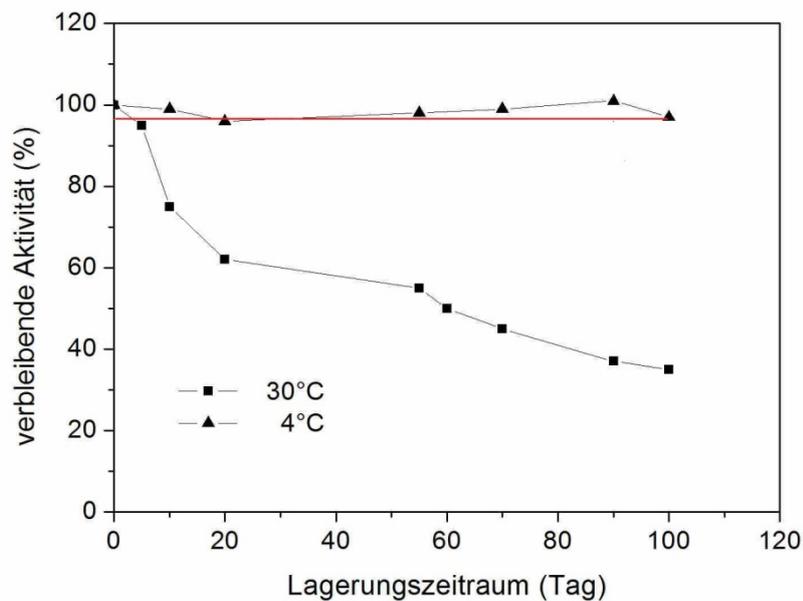


Abb. 4.35 Veränderung der Aktivität der immobilisierten AChE unter verschiedenen Bedingungen über einen Zeitraum von 100 Tagen nach [123]

Innerhalb von 100 Tagen kam es bei der immobilisierten AChE, die bei 30°C gelagert wurde, zu einem Aktivitätsverlust von mehr als 65%. Dagegen bewahrte die Lagerung bei 4°C eine Aktivität von mehr als 90% (Abb. 4.35).

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse der Lagerung bei 30°C von MORADZAGEDAN *et al.* [123] mit denen aus dieser Arbeit ist nicht möglich, da in dieser Arbeit die Temperaturen 25°C und 40°C untersucht wurden. Jedoch können die Tendenzen bei einer höheren Lagerungstemperatur erkannt werden. Bei MORADZAGEDAN *et al.* [123] zeichneten sich bei der Lagerung bereits nach einer Woche Differenzen in den Aktivitäten der unterschiedlich gelagerten immobilisierten Enzyme ab. Die immobilisierten Enzyme, welche bei 30°C gelagert wurden, wiesen eine geringere Aktivität auf als die bei 4°C aufbewahrten.

Diese Tendenz lässt sich in dieser Arbeit nicht erkennen. Hierbei waren die Aktivitäten der bei 4°C und 25°C ($\Delta \text{pH}=1$ pH-Einheit) gelagerten Enzymmembranen gleich. Jedoch die der immobilisierten Enzyme bei 40°C wesentlich größer ($\Delta \text{pH}=1,5$ pH-Einheiten).

NOROUZY *et al.* [125] immobilisierten AChE an makroporöses Silikat, welches octadecyl-modifiziert wurde. Die Träger wurden für bis zu 70 Tage in Phosphatpufferlösung bei 4°C und 25°C aufbewahrt.

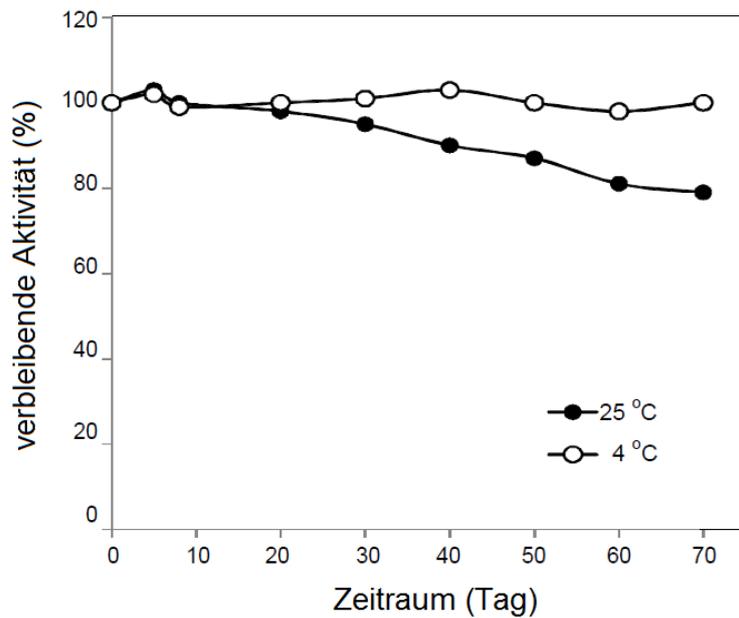


Abb. 4.36 verbleibende Aktivität der immobilisierten AChE nach 70 Tagen bei unterschiedlichen Lagerbedingungen nach [125]

Mit der Lagerung bei 4°C konnte die Aktivität von 100% über den gesamten Zeitraum erhalten werden. Dagegen kam es bei der Lagerung bei 25 °C über die Dauer von 70 Tagen zu einem Aktivitätsverlust von 20% (Abb. 4.35).

Vergleicht man die Ergebnisse von NOROUZY *et al.* [125] mit denen aus dieser Arbeit so sind die Tendenzen gleich. Die Komplexe, welche bei 4°C gelagerten wurden weisen einen geringeren Aktivitätsverlust auf, als die bei 25°C gelagerten.

WHITE *et al.* [124] modifizierte die AChE mit Tetraphenylporphyrinsulfit, so dass diese an Glasplättchen angebunden werden konnte. Die modifizierten Glasplättchen wurden sowohl bei Umgebungsbedingungen bzw. bei 25°C im Vakuum, als auch bei 4°C trocken und in Puffer von pH 9 bzw. pH 6 gelagert.

Als Tendenz aus den Untersuchungen von White *et al.* ließ sich feststellen, dass die Lagerung der Komplexe im Puffer mit dem pH-Wert 6 und bei 4°C zu einen hohen Aktivitätsverlust führte. Dagegen wies die immobilisierte AChE, welche bei 4°C und im Puffer des pH-Wertes 9 aufbewahrt wurden, eine höhere verbleibende Aktivität auf als die bei 25°C im Vakuum gelagerten Enzym-Glas-Komplexe.

Die Lagerstabilität der im Vakuum gelagerten Membranen begründen WHITE *et al.* [124] damit, dass überschüssiges Wasser entfernt wurde. Dies führe zu einer Stabilisierung der Matrixoberfläche und verhindere dadurch eine Konformationsänderung bzw. Entfaltung des Enzyms. Außerdem könnten durch das Absaugen des Wassers andere Reaktionen, welche zur Denaturierung des Enzyms führen, verhindert werden.

In dieser Arbeit erfolgten, wie in den Abbildungen 4.34a-d dargestellt, Untersuchungen zur Lagerstabilität im Vakuum, jedoch wurden die hierbei verwendeten Enzymmembranen auf puffergetränkten Celluloseacetat gelagert, so dass die Folgerungen von WHITE *et al.* [124] so nicht bestätigt werden können.

Zusammenfassend lässt sich anhand der erhaltenen Ergebnissen erkennen, dass für die spätere Anwendung eine Lagerung bei 4 °C unter Schutzgas praktikabel wäre, denn unter diesen Bedingungen wiesen die immobilisierten Enzyme nach einer Woche die größte Aktivität auf. Weiterhin sind diese Bedingungen gut realisierbar. Die Enzym-Membran-Komplexe könnten produziert und im Anschluss in den gewünschten Abpackungsgrößen unter Schutzgas eingeschweißt werden.

Ein weiteres positives Ergebnis ist, dass eine Unterbrechung der Kühlkette auch im Hochsommer zu keinen besonderen Aktivitätsverlusten führen würde. Denn auch bei der Aufbewahrung bei 40°C über einen Zeitraum von einer Woche wiesen die Membranen noch eine hohe Aktivität auf.

4.6 Messungen mit vermindertem Reaktionsvolumen

Unter Verwendung einer miniaturisierten pH-Elektrode (Abb. 4.37) ergab sich die Möglichkeit, Messungen mit einem reduzierten Lösungsvolumen von 2 ml durchzuführen. Der Aufbau der Messapparatur ist dem für das Messvolumen von 4 ml sehr ähnlich (Abb.4.38). Die ermittelten Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.39 und 4.40 grafisch dargestellt.



Abb. 4.37 Miniaturisierte pH-Elektrode



Abb. 4.38 Messapparatur

Foto: Technische Chemie Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg

Die Messungen wurden mit einer Membran durchgeführt, welche mit einer Immobilisierungslösung der Konzentration 0,1 mg AChE pro 20 ml Phosphat-Puffer behandelt wurde. Für diese Messungen wurde der Neutralisationslösung Natriumchlorid zugesetzt. Das Natriumchlorid dient dann bei der Anwendung im Sensor zur Stabilisierung des Indikators. Um den Einfluss des Natriumchlorids auf die Aktivität des Enzym-Membran-Komplexes zu testen, wurde dies während der Messung zugesetzt. Vor der Inhibierung wurde die Membran zweimal in AChCl-Lösung vermessen. Es ist gut zu erkennen, dass beide Kurvenverläufe identisch sind. Die Messergebnisse sind reproduzierbar.

Die Inhibierung wurde nach der zweiten Variante durchgeführt, d.h. die Membran wurde in einer separaten Lösung, die Carbofuran enthielt, inhibiert. Für die Inhibierung wurden 5 µl einer niedriger konzentrierten Carbofuranlösung ($c = 0,1 \text{ mg/l}$) 2 ml destilliertem Wasser zugesetzt. Dies entspricht einer Konzentration von $0,250 \text{ µg/l}$. Dann erfolgte die Zugabe der Membran. Diese wurde für 5 min in der Lösung belassen. In dieser Zeit wurden 2 ml der AChCl-Lösung temperiert und neutralisiert.

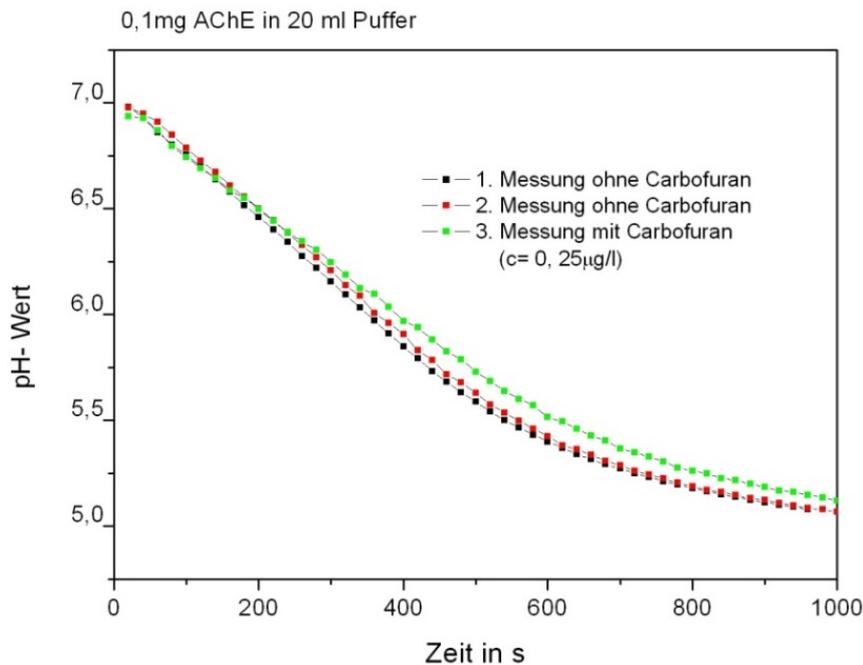


Abb. 4.39 Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der Carbofuranmenge

Das Messergebnis war bezüglich der pH-Wertdifferenz zwischen nicht-inhibierter und inhibierter AChCl-Hydrolyse nicht zufriedenstellend, da der Unterschied sehr gering ist. Eine Detektion von Carbofuran wäre nicht möglich.

Bei den Messungen, welche in 4 ml Lösung durchgeführt wurden, konnte eine größere pH-Wertdifferenz erzeugt werden. Inwieweit der Zusatz an Natriumchlorid störte und wie ein eventueller negativer Einfluss eliminiert werden kann, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Neben den Messungen unter dem Zusatz von Natriumchlorid wurden auch Messungen zur Reproduzierbarkeit durchgeführt. Dazu wurden zwei Membranen der gleichen Charge und mit derselben Immobilisierungskonzentration jeweils zweimal vermessen (Abb.4.40). Nach der Temperierungszeit wurde die Membran der vorbereiteten AChCl-Lösung zugesetzt und die Messung gestartet (Abb.4.40).

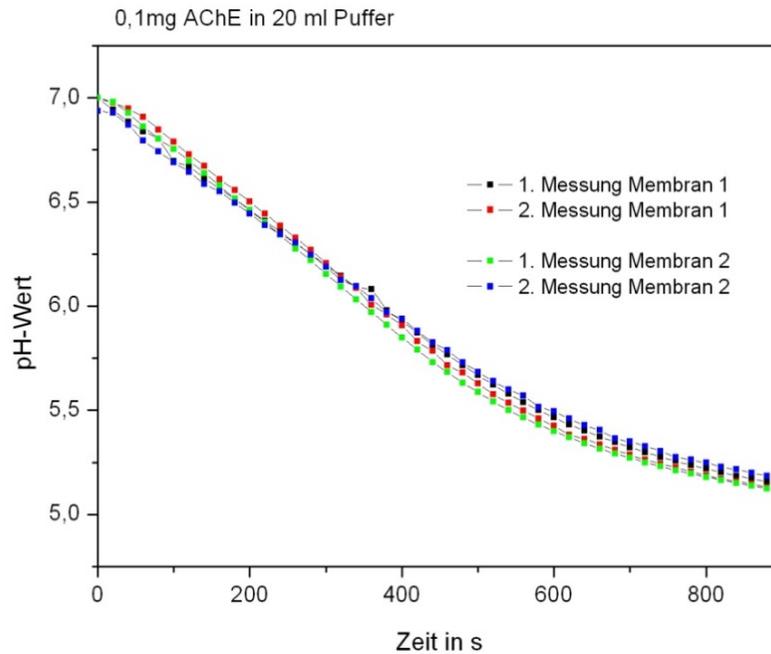


Abb. 4.40 Bestimmung der Reproduzierbarkeit

Die Messergebnisse zeigen deutlich, dass sowohl die Herstellung der Enzym-Membran-Komplexe als auch das Messverfahren in einem hohen Maß reproduzierbar sind. Auch die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen [12,14-16,18,21,26-28,30-34] konnten in Bezug auf die Reproduzierbarkeit der Herstellung und der Messungen als positiv bewertet werden.

ANDRES *et al.*[20] immobilisierten AChE an poröses Isothiocyanat-Glas. Die Reproduzierbarkeit Reaktion der immobilisierten AChE wurde durch die wiederholte Injektion von Acetylcholin untersucht. Die Anwendbarkeit des Acetylcholinesterase-basierten Sensors zur Pestizidbestimmung hängt von seinem reproduzierbaren Ansprechverhalten gegenüber der Substratlösung ab. Das Ansprechverhalten des optischen Sensors auf eine periodische Injektion von Acetylcholinchlorid ist in Abb. 4.41 dargestellt.

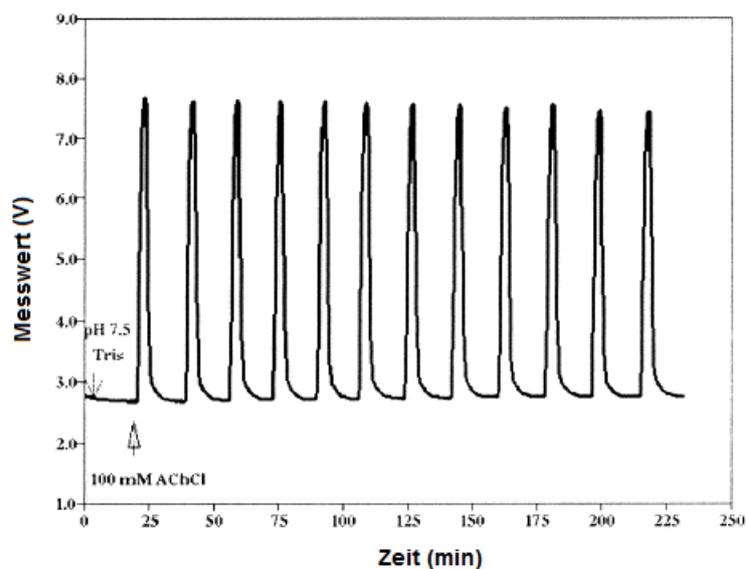


Abb. 4.41 Reproduzierbarkeit der Messung nach [20]

Das Ansprechverhalten des Sensors war reproduzierbar. Es kam lediglich zu einer kleinen Drift in den Höhen der einzelnen Peaks.

4.7 Diskussion der Ergebnisse zu den Untersuchungen der Enzym-Membran-Komplexe

Zu Beginn erfolgten Voruntersuchungen zur Aktivität unterschiedlich reiner Acetylcholinesterasen vom Zitteraal (AChE). Es bestätigte sich die Annahme, dass die AChE mit 1000 U/mg einen höheren Substratumsatz erzielte als die AChE 350 U/mg.

Jedoch wiesen die AChEs im immobilisierten Zustand eine inverse Aktivität auf, d.h. die AChE 350 U/mg erzeugte einen größeren Umsatz als die AChE mit 1000 U/mg. Diesem Aktivitätsunterschied können verschiedene Ursachen zugrunde liegen. Jedoch erfolgten im Rahmen dieser Arbeit keine Untersuchungen dazu. Aus der Literatur ist eine solche Problematik nicht bekannt, so dass im Folgenden nur mögliche Gründe betrachtet werden.

Die Aktivität des immobilisierten Enzyms wird von vielen Faktoren bereits während der Anbindung beeinflusst. Wichtige Faktoren sind die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Trägers, wie z.B. Porosität, Porengröße und Beschaffenheit der Oberfläche (Polarität, Oberflächengruppen) [127,128]. Bei den Untersuchungen hatten die porösen Glasmembranen zwar nicht dieselben Abmaße, aber sie wurden auf identische Weise generiert und modifiziert. Somit kann dieser Faktor als Ursache für den Aktivitätsverlust ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Faktor ist der Spacer bzw. Linker und dabei insbesondere die Art der Vernetzung und Bindung. Der Spacer bzw. Linker kann zu sterischen Hinderungen führen [129,130], aber auch zu einer fehlangepassten Orientierung des Enzyms [131], da das aktive Zentrum in die Bindung einbezogen wird.

Ein weiterer Grund für den starken Aktivitätsverlust kann die Konformation der Acetylcholinesterase sein. Hierbei ist es möglich, dass es bei der Anbindung des Enzyms zu einer Änderung der räumlichen Struktur kommt [132]. Eine Veränderung in der Konformation ist z. B. anhand eines Aktivitätsverlustes erkennbar, da das aktive Zentrum für das Substrat unzugänglich ist. Auf diese Ursache könnten die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse -des starken Aktivitätsverlustes- zurückgeführt werden.

Die wichtigsten Untersuchungen bezogen sich auf die Nachweisgrenze. Dafür wurden zum einen zwei verschiedene Methoden der Inhibierung und zum anderen unterschiedliche Konzentrationen der Immobilisierungslösung untersucht.

Zu Beginn erfolgte die Inhibierung durch die Zugabe von Carbofuran direkt zur Substratlösung. Dabei kam es bei geringen Konzentrationen an Carbofuran zu einer Erhöhung der Aktivität des Enzyms. Es ist möglich, dass Carbofuran in diesem Fall als allosterischer Aktivator fungierte [70]. Um diesen unerwünschten Effekt zu verhindern, erfolgten Untersuchungen bei denen die Enzym-Membran-Komplexe in einer wässrigen Lösung mit einer definierten Menge an Carbofuran inkubiert wurden. Die erhaltenen Ergebnisse waren positiv, d.h. es kam mit zunehmender Carbofurankonzentration zu einer stärkeren Inhibierung. Daraus folgt direkt, dass für eine niedrige Nachweisgrenze eine geringe Menge an immobilisiertem Enzym ausreichend ist.

Mit einer Immobilisierungslösung von 0,05 mg in 20ml Puffer wurde eine Nachweisgrenze mit diesen Enzym-Membran-Komplexen von 0,125 µg/l erreicht. Mit der erhaltenen Nachweisgrenze wurde zwar der gesetzliche Grenzwert und auch Nachweisgrenzen der in dieser Arbeit betrachteten publizierten Biosensoren unterschritten.

VALDES-RAMIREZ *et al.* [14] erzielten eine Nachweisgrenze von 0,9mg/l. Wohingegen die erhaltene Nachweisgrenze bei dem Biosensor von LASCHI *et al.* [33] bei 10,8 µg/l liegt. Jedoch gibt es noch sehr viel weitere Arbeitsgruppen, welche sich mit der Entwicklung von Biosensoren beschäftigen, so dass die erhaltene Nachweisgrenze bereits unterschritten sein könnte.

Für die spätere Anwendung als Sensorkomponente ist neben der Nachweisgrenze auch eine hohe Lagerstabilität von großer Bedeutung. Anhand der Untersuchungsergebnisse zur Stabilität der Enzym-Membran-Komplexe bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen erfolgte die Festlegung der optimalen Parameter. In der Literatur erfolgte die Lagerung der immobilisierten AChE meist direkt in einer Pufferlösung. Doch anhand der Ergebnisse hinsichtlich des Leachings an aminosilanisierten Glasmembranen (Kapitel 4.2.) wurde neben der direkten Lagerung in Puffer auch die Lagerung auf puffergetränkten Filterpapier untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass es bei der direkten Lagerung im Puffer zum einen zu einer starken Abnahme der Aktivität und zum anderen nach ca. 3 Wochen zu einer Schimmelbildung auf dem Filterpapier kam. Die Lagerung auf puffergetränkten Materialien ist prinzipiell positiv, jedoch das Material-Filterpapier aufgrund der Anfälligkeit gegenüber dem mikrobiellen Befall ungeeignet. Aus diesem Grund wurde die Lagerung der Enzym-Membran-Komplexe auf Celluloseacetat-Plättchen un-

tersucht. Diese erwiesen sich als mikrobiell resistent und ermöglichten ein konstant feuchtes Milieu.

Neben dem Einfluss des Mediums bei der Lagerung auf die Stabilität der Enzym-Membran-Komplexe wurden Versuche zur Wirkung unterschiedlicher umgebender Atmosphären bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Die Variation der Temperatur erfolgte im Bereich von 0°C bis 40°C. Der Einfluss der umgebenden Atmosphäre wurde sowohl im Vakuum und bei Raumluft als auch unter Stickstoff bestimmt.

Innerhalb dieser Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Komplexe, die über einen Zeitraum von einer Woche bei 40°C und Raumluft gelagert wurden, eine hohe verbleibende Aktivität aufwiesen. Dieses, nicht erwartete, Ergebnis steht im Gegensatz zu den aus ähnlichen Untersuchungen publizierten Resultaten [124, 128]. Bei diesen war bereits nach kurzer Zeit ein starker Aktivitätsverlust unter ähnlichen Lagerungsbedingungen beobachtet worden.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse kann die folgende Abpackungs- und Lagerungsvariante in Betracht gezogen werden: - auf puffergetränkten Celluloseacetat-Plättchen

- Temperatur: 4°C

- luftdicht verpackt unter Schutzgasatmosphäre

Eine eventuelle Unterbrechung der Kühlkette ist jedoch in Bezug auf die Stabilität unproblematisch, wie in den Untersuchungen gezeigt werden konnte.

Weitere wichtige Aspekte, die untersucht wurden, waren die Reproduzierbarkeit sowohl der Herstellung der Enzym-Membran-Komplexe als auch der Messergebnisse. Für die Untersuchungen, ob eine Reproduktion der Enzym-Membran-Komplexe gewährleistet werden kann, wurden Glasmembranen aus unterschiedlichen Glasblöcken an verschiedenen Tagen gefertigt und unter identischen Bedingungen (Konzentration, Reaktionsdauer, usw.) modifiziert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Aktivität der einzelnen Membranen. Anhand dieser Ergebnisse konnte verdeutlicht werden, dass die Herstellung der Enzym-Membran-Komplexe ein reproduzierbares Verfahren ist.

Die Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Messwerte erfolgte indem, von an unterschiedlichen Tagen gefertigte Membranen jeweils die Aktivität mehrfach vermessen wurde. Auch hier wiesen die identischen Messergebnisse auf eine sehr hohe Reproduzierbarkeit hin.

Diese Ergebnisse sind sehr ähnlich denen, welche von anderen Arbeitsgruppen publiziert wurden [12,14-16, 18, 21, 26-28, 30-34]. Denn auch sie erhielten mit ihren Methoden und Messprinzipien gute bis sehr gut reproduzierbare Ergebnisse.

Der erhaltene Wert für die Nachweisgrenze wurde aus dem Volumen der Substratlösung und dem zugesetzten Volumen der Carbofuranlösung mit der Konzentration von 1mg/l berechnet. Bei der Beurteilung der erhaltenen Werte sind verschiedene Fehlerquellen mit einzubeziehen, wie das Pipettieren und das Einwiegen. Dabei ist zwischen den menschlichen Fehlern, z.B. Haltewinkel der Pipette, und in den instrumentellen Fehlern z.B. letzte Stelle nach dem Komma bei der Waage, zu unterscheiden. Eine weitere Fehlerquelle ist das pH-Meter z.B. falscher pH-Wert wird angezeigt. Aufgrund der regelmäßigen Kalibrierung des pH-Meters und der Eichung der Waage wirken sich diese Ursa-

chen nur minimal auf den Gesamtfehler aus. Der persönliche Fehler beim Pipettieren kann durch die Beachtung der Bedienungsanleitung der Pipette ebenfalls als gering bezeichnet werden.

5 Aufbau und Funktionsweise des Gesamtsensors

Die Entwicklung des Sensors zur Detektion von Pestiziden erfolgte im Rahmen eines AiF-Forschungsprojektes³ in enger Kooperation mit einer weiteren Arbeitsgruppe, dem Kurt-Schwabe-Institut Meinsberg. Die systematischen Untersuchungen hinsichtlich der Textur, Aminosilanisierung der Glasmembranen und die Analysen mit den enzymimmobilisierten Membranen erfolgten am Institut für Chemie im Fachbereich Technische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Sowohl die Entwicklung des Sensorgehäuses und die Konstruktion des Gesamtsensors als auch die Untersuchungen bezüglich der Farbstoffkomponente lagen im Aufgabenbereich des Kurt-Schwabe-Institut Meinsberg. Hierfür wurden verschiedene Farbstoffe an die nach Kapitel 3.3.1 aminosilanisierten Glasmembranen in analoger Weise zur Enzymimmobilisierung angebunden. Zur Einordnung der vorliegenden Arbeit in einen Gesamtzusammenhang wird der entstandene Sensor im Folgenden näher beschrieben und mit Bildern veranschaulicht.

5.1 Aufbau

Der Gesamtsensor setzt sich aus der Enzymmesszelle, der Analytkammer und dem MORES™ zusammen.

Die Enzymmesszelle besteht im Einzelnen aus einer 1mm dicken Enzymmembran, einer 0,25 mm dicken Reflexionsmembran und der 0,25 mm dicken pH-Indikatormembran. Somit ergibt sich für die Enzymmembran unter Berücksichtigung der Membrandicke und der Porosität ein Volumen von 50 µl. Das Volumen der pH-Indikator-Membran beträgt 15 µl. Dadurch entsteht eine Reserve des Analyten von 35 µl. Zwischen der Enzymmembran und der pH-Indikator-Membran befindet sich eine Reflexionsmembran mit einem Porendurchmesser von 100 nm. Diese ist notwendig, um den Anteil des diffus gestreuten Lichtes maximal zu erhöhen.

In der Abbildung 5.1 ist der schematische Aufbau des Sensors dargestellt.

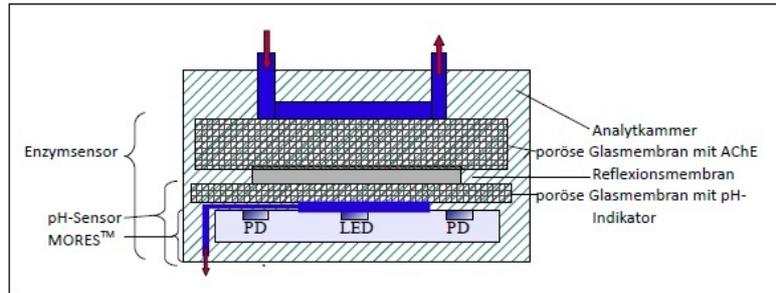


Abb. 5.1 Schematische Darstellung des Gesamtsensors

Für die Umsetzung des Sensors wurde für die optoelektronische Einheit das Prinzip des MORES™ [133] (Micro-optical-Reflexions-Sensor system) verwendet, welches vom CIS Erfurt zur Verfügung gestellt wurde. Hierbei ist es möglich, dass die Grundelemente, wie Lichtquelle, Absorptionsindikatorschicht, Signalempfänger und die Einheit zur Signalaufarbeitung dicht nebeneinander auf kleinem Raum angeordnet werden können. Das hat den Vorteil, dass am Ende bzw. um den Lichtwellenleiter eine immobilisierte Reaktionsschicht angebracht werden kann. In diesem Fall ist es der Enzym-Membran-Komplex. In der Abbildung 5.2 ist der schematische Aufbau des MORES™ dargestellt.

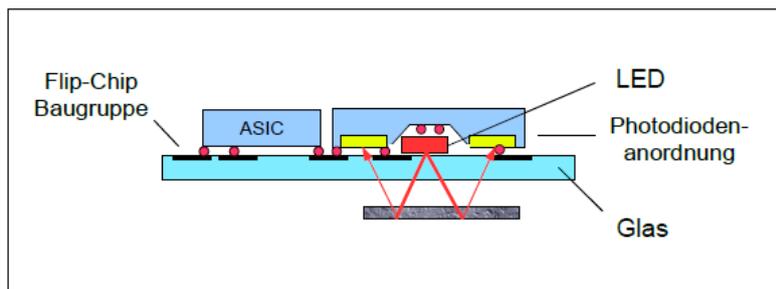


Abb. 5.2 schematischer Aufbau des MORES™ [133]

Die Grundlage bildet dabei ein Siliziumsubstrat, auf dem 2 Photodiodenarrays mittels Planartechnik aufgebracht sind. Bei der Planartechnik wird das Halbleitermaterial, hier Silizium, durch wiederholte fotochemische Prozesse mit Belichtungs- und Ätzmasken versehen, diese ermöglichen, an der Oberfläche ebene (planare) Strukturen mit unterschiedlicher Dotierungen herzustellen [134-136]. Es können bis zu drei verschiedenfarbige Leuchtdioden (LED) verwendet werden. Dafür ist mittig ein 200 µm tiefer Hohlraum enthalten. Im vorliegenden MORES wurden 3 LEDs mit den Wellenlängen 450 nm, 590 nm und 740 nm verwendet. Die Signalempfänger (Photodioden) und die LEDs wurden direkt ohne weitere Anschlussdrähte mit der aktiven Kontaktierseite nach unten auf einem Glassubstrat fixiert (Flip-Chip-Technik). Diese Technik ermöglicht eine störungsfreie Montage des signalverarbeitenden Elementes in der Nähe der Photodioden und reduziert dadurch Querempfindlichkeiten.

Mit Hilfe des MORES™ sind verschiedenartige Formen der Signalgewinnung möglich. Diese sind schematisch in der Abbildung 5.3 dargestellt.

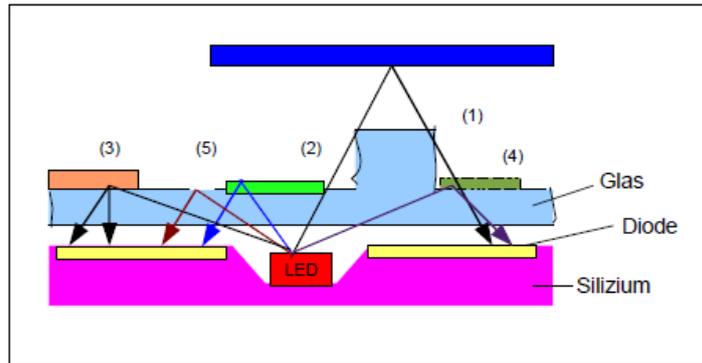


Abb. 5.3 Möglichkeiten der Signalgewinnung mit dem MOREST™ nach [133]

1. Reflexionsänderung an einem externen Objekt durch vertikalen bzw. horizontalen Versatz oder Neigung
2. Änderungen der spektralen Absorption (durch Einwirkung eines Analyten) in einer Indikatorschicht, der Strahl passiert diese zweimal
→ Reflexion durch Totalreflexion, aber auch an einer Spiegelschicht möglich.
3. Intensitätsänderung infolge von Streuung oder Reemission an einem aufliegenden Objekt
4. Änderung der Oberflächen-Reflexions-Interferenzen infolge einer Änderung der optischen Wellenlänge (Quellung/Brechzahländerung durch Analyteinwirkung)
5. Änderung der Totalreflexion an der Grenzschicht Glas/Umgebung durch Brechzahländerung der Umgebung

Im Sensor wurde die zweite Form der Signalerzeugung genutzt. Die LEDs sendeten Licht einer bestimmten Wellenlänge durch den Membranenkomplex hindurch aus, dabei kam es zur Absorption des Lichtes am Farbstoff. In der Reflexionsschicht kam es zur Reflexion des Lichts. Dieses passierte auf dem Weg zur Photodiode nochmals die Membran mit dem Farbstoff. Die reflektierte Strahlung wurde von der Photodiode erfasst und das erhaltene Signal in Absorptionswerten am Auslesegeräte ausgegeben.

5.2 Untersuchungen zur Funktionsweise des Sensorprototyps

Für die Untersuchungen zur Funktionsweise des Prototyps, wurde dieser in die Apparatur integriert, welche in Abbildung 5.5 dargestellt ist.

Der Stack (Abb.5.4) ist eine Kombination der drei zur Pestiziddetektion benötigten porösen Glasmembranen. Die oberste Membran ist die Enzymmembran. Diese ist mit γ -APTS und Glutardialdehyd modifiziert und AChE beladen. Die mittlere Membran ist die Reflexionsmembran. Diese ist notwendig, um die diffuse Streuung des Lichtes maximal zu erhöhen. An die unterste Glasmembran ist der pH-sensitive Farbstoff BS121-NHS

immobilisiert. Dieser stellte sich bei den Untersuchungen als der Geeignetesten bezüglich der geforderten Eigenschaften (Absorptionswellenlänge, Langzeitstabilität usw.) heraus. Die Membranen wurden mit Hilfe von Bienenwachs ummantelt, im Sensorkopf verklebt und abgedichtet.

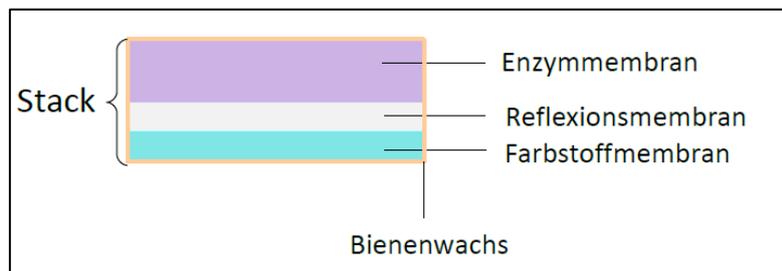


Abb. 5.4 schematische Darstellung des Stacks

Mit 1,0 mm beträgt die Dicke der Enzymmembran das 4-fache der pH-Indikatormembran (0,25 mm). Dadurch ergibt sich eine Reserve beim Überströmen des pH-modifizierten Analyten in die pH-Indikatormembran. Unter Berücksichtigung der Porosität steht somit dem Volumen der Enzymmembran von ca. 50 μL ein Volumen der pH-Indikatormembran von ca. 15 μL entgegen. Die überschüssige Reserve wird zur Spülung der Membran beim Analytwechsel benötigt. Die Volumenzugabe wird durch ein skaliertes Mikrolitergefäß, angekoppelt unmittelbar am Messzelleneinlass, kontrolliert (Abb. 5.5).

Neben dem kontrollierten Einlassen des Analyten ermöglichte die Apparatur durch die Ventile ein Umschalten zwischen den Modi Messen und Spülen. Beim Spülen wurden die Bereiche direkt über und unter der Membranenkombination (Stack) gespült. Wohingegen im Modus Messen die Lösung gegen den Strömungswiderstand durch die Poren der Membranenkombination gezogen wurde. Die U-Rohr-Kombination ermöglichte eine Begrenzung der Unterdruckdifferenzen gemäß der eingestellten Höhe der Wassersäule. Reproduzierbare Strömungsverhältnisse waren von 0 mm Wassersäule bis 1000 mm Wassersäule möglich. In Verbindung mit der Zeitmessung kann so die Durchflussgeschwindigkeit und Verweilzeit eines vorgegebenen Analytvolumens gesteuert werden. Lange Verweilzeiten wurden durch das zeitweilige Abschalten der Vakuumpumpe erreicht.

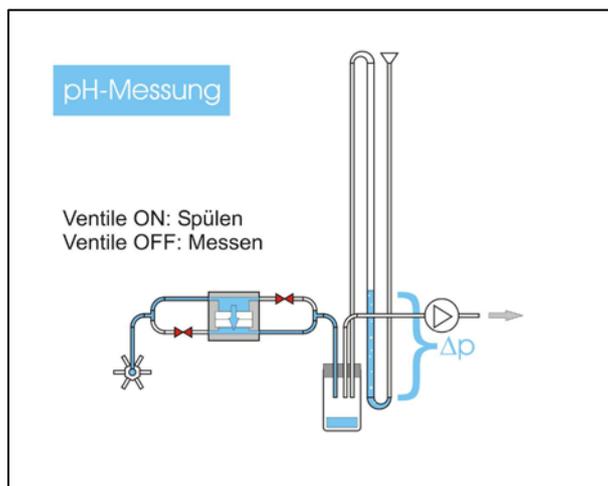


Abb. 5.5 Apparatur zur Untersuchung der Funktionsweise des integrierten Sensors

Die Gesamtmesszelle (Membrankombination und MORES) wurden in eine zweiteilige Konstruktion (Abb. 5.5) integriert. Im oberen Teil befand sich der Stack (Abb. 5.4) und im unteren Teil der MORES™. Diese Zweiteilung war notwendig, da die Membrankombination nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt ist und der MORES™ hingegen zum Dauergebrauch.

Der Stack wurde mit Hilfe von Bienenwachs so eingeklebt, dass dieser nach der Analyse durch leichtes Erwärmen, z.B. in einem Wasserbad, rückstandslos aus dem oberen Teil des Sensorkopfes entfernt und für den entsprechenden Kontrollversuch ein nicht-inhibierter Stack eingesetzt werden kann.

5.3 Durchführung der Messung im späteren Gebrauch

Der spätere Sensor soll klein und handlich sein. Die Enzymmembrankombination (Stack) wurde als Einmal-Komponente entwickelt. Der fertige Sensorkopf des Prototyps (Abb. 5.6) besteht aus zwei Teilen. Im unteren Teil ist der MORES™ verbaut und für die dauerhafte Verwendung bestimmt. Im oberen Teil befindet sich der mit Hilfe von Bienenwachs eingeklebte Stack. Nach dem Gebrauch kann der Stack durch ein 60°C warmes Wasserbad leicht gegen einen Neuen getauscht werden.

Die einfache Bedienung und der schnelle Austausch der gebrauchten Stacks ermöglicht den Lebensmittelkontrolleuren z. B. am Hafen eine schnelle unkomplizierte Messung. Im Folgenden werden die geplanten notwendigen Schritte für die Durchführung eines Screenings genauer erläutert.

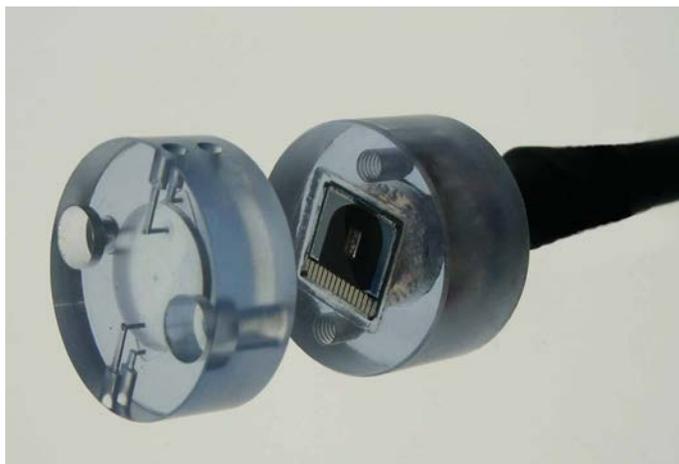


Abb. 5.6 Prototyp des Pestizidsensors

Probenaufbereitung:

Die Probenaufbereitung erfolgt in Anlehnung an der von Xavier et al. [137] beschriebenen Methode. Dabei werden 200g der jeweilige Obst- bzw. Gemüseprobe mit Hilfe einer Küchenmaschine zerkleinert und homogenisiert. Davon werden zweimal 2,5g entnommen und mit je 5ml Dinatriumhydrogenphosphatlösung vermengt. Dieses Gemisch wird für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wird die Probe zentrifugiert und die überstehende Lösung abdekantiert. Beide Lösungen werden vereint und mit Dinatriumhydrogenphosphatlösung aufgefüllt, um den pH-Wert auf 7,0 einzustellen.

Messung:

Die Membrankombination (Stack) wird der Verpackung entnommen und auf dem Sensor justiert. Nach dem Einkleben der Membranenkombination erfolgt die Bestimmung der Aktivität der immobilisierten Acetylcholinesterase. Dafür wird das System mit der Substratlösung Acetylcholin komplett gespült. Es erfolgt eine Reduzierung der Strömungsgeschwindigkeit, so dass die Verweilzeit der Substratlösung erhöht wird und eine Umsetzung durch die immobilisierte AChE erfolgen kann. Dafür werden ca. 50 μ l frisch hergestellte Acetylcholinchloridlösung auf die Sensoranordnung pipettiert. Durch definierte Saugimpulse wird die Lösung in die enzymbeladene Glasmembran eingezogen und verteilt. Nach einer festgelegten Einwirkzeit erfolgt wiederum durch einen definierten Saugimpuls die Übertragung der Lösung in die farbstoffbeladene Glasmembran. Die Umsetzung führt zu einer pH-Wertsenkung. Diese wird mit Hilfe des immobilisierten pH-Farbstoffes und dem MORES™ detektiert. Die Detektion erfolgt, indem das Licht der LED die Lösung durchstrahlt und die reflektierten Strahlen durch die Photodioden empfangen werden. Die erhalten Daten werden so umgewandelt, dass Absorptionswerte ausgegeben werden. Anhand dieser kann der pH-Wert bestimmt und auf die Umsetzung des Acetylcholins geschlossen werden. Der gemessene Absorptionswert wird als A_0 erfasst. Nach der Bestimmung der Aktivität im nicht-inhibierten Zustand erfolgt eine Spülung des Systems mit einer Pufferlösung. Anschließend wird die Prüflösung in die Membranenkombination überführt. Diese verweilt darin für eine definierte Zeit. Nach

Ablauf der Zeit erfolgt eine erneute Messung zur Umsetzung des Substrates. Diese wird mit Hilfe der pH-Wertänderung und der daraus resultierenden Absorption detektiert. Die Höhe der Aktivitätsänderung der immobilisierten AChE zeigt an, ob die gesetzlich zugelassene Höchstmenge an Pestizidrückständen in der Prüflösung überschritten ist oder im Normbereich liegt. Ist die zulässige Höchstmenge überschritten, werden Proben an ein Analytiklabor weitergeleitet und eine genaue Qualifizierung und Quantifizierung der Pestizide durchgeführt. Des Weiteren wird das pestizidbelastete Obst bzw. Gemüse nicht in den Handel gebracht.

Limitierungen:

Für dieses Sensorprinzip treten Limitierungen auf. Zum einen ist mit Hilfe der Acetylcholinesterase keine selektive Bestimmung möglich, denn alle Organophosphate (OP) und Carbamate acylieren es am nucleophilen Serin-Rest. Jedoch reagiert die Acetylcholinesterase auf jedes OP und Carbamat in einem unterschiedlich hohen Maß. Die Hemmkonstante jedes einzelnen hängt von der chemischen Struktur der Substituenten und der abgehenden Gruppe ab. Die Differenzen der Hemmkonstanten der unterschiedlichen Organophosphate und Carbamate betragen z.T. mehrere Hundert. Es kann nur die Gesamttoxizität der Probe bestimmt werden.

Diese Tatsache macht eine Kalibrierung für eine Messung von unbekanntem Proben nahezu unmöglich.

Ein Lösungsansatz für dieses Problem ist ein miniaturisierter Mehrfachsensor. Dieser besteht aus mehreren einzelnen Sensoren mit verschiedenen natürlichen und genetisch veränderten Acetylcholinesterasen, welche unterschiedliche Querempfindlichkeiten gegen verschiedene Hemmstoffe aufweisen.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden grundlegende Untersuchungen hinsichtlich der Entwicklung eines neuartigen Sensors zur Detektion von Pestiziden in Obst, Gemüse oder Wasser auf der Basis poröser Glasmembranen durchgeführt. Anhand der Ergebnisse wurde innerhalb eines AiF-Projektes gemeinsam mit einem Kooperationspartner ein vollkommen neues Sensorlayout entwickelt.

Der Sensorkopf besteht aus zwei Teilen: dem Stack, welcher die Membranen enthält, und dem MORES™, welcher die elektronischen Bauteile und die LEDs beinhaltet.

Für die Entwicklung waren eine Anpassung der Geometrie und eine systematische Anpassung der Membraneigenschaften notwendig. Aufgrund der Untersuchungen hinsichtlich der Größe und Abdichtung im Sensorkopf wurden runde Membranen mit einem Durchmesser von 10 mm für die spätere Anwendung gewählt. Die einzelnen Membranen unterscheiden sich in Bezug auf die Dicke und die Textureigenschaften:

- Enzymmembran: 1mm dick, Porendurchmesser 75 nm
- Reflexionsmembran: 0,25 mm dick, Porendurchmesser 100 nm
- Farbstoffmembran : 0,25 mm dick, Porendurchmesser 68 nm

Vor der Immobilisierung des Enzyms Acetylcholinesterase (AChE) an die porösen Glasmembranen sind zwei Modifizierungsschritte notwendig - zum einen die Aminosilanierung und zum anderen die Glutardialdehydanbindung.

Es wurden systematische Untersuchungen zur Anpassung der Aminogruppendichte für die folgenden Schritte der Enzymimmobilisierung durchgeführt. Dabei wurde neben γ -APTS auch γ -APTMS untersucht. Mit Hilfe der Titration nach VOROSILOVA [90] und der Elementaranalyse wurde die Aminogruppendichte der jeweiligen Membranen bestimmt. Bei diesen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass eine Modifizierung mit γ -APTMS zu keiner Erhöhung bzw. einer besser einstellbaren Aminogruppendichte führte.

Neben den Untersuchungen zur Aminogruppendichte wurden systematische Analysen zur Behandlung der aminosilanisierten Glasmembranen mit Glutardialdehyd durchgeführt. Glutardialdehyd dient als Linker und Spacer zwischen dem Enzym und der Oberfläche. Für die Untersuchungen wurden bereits aminosilanisierte Glasmembranen über unterschiedlich lange Zeiträume mit einer 2,5 %-igen Glutardialdehydlösung behandelt. Abschließend wurde mit Hilfe der Elementaranalyse der auf der Oberfläche vorhandene Kohlen-, Wasser- und Sauerstoffgehalt bestimmt. Anhand der erhaltenen Werte konnte die Menge an gebundenem Glutardialdehyd berechnet werden. Daraus ließ sich schlussfolgern, wie viele mögliche Bindungsstellen für das Enzym an der modifizierten Glas-

oberfläche vorhanden sind. Jedoch polymerisiert Glutardialdehyd in wässriger Lösung sehr schnell und die entstehenden Oligomere bzw. Polymere sind strukturell so vielfältig, dass eine eindeutige Aussage über die Bindungsverhältnisse nicht möglich ist. Dennoch konnte festgestellt werden, dass die Umsetzung nicht, wie theoretisch bestimmt, 1:1 erfolgt. Die Anzahl der bestimmten reaktiven Aminogruppen war höher, als nach der Weiterbehandlung mit Glutardialdehyd tatsächlich umgesetzt wurden.

Für die Erzeugung anwendungstechnisch optimal angepasster Enzym-Membran-Komplexe wurden neben den Parametern Temperatur, pH-Wert, Reinheit des Enzyms, auch die optimale Substratkonzentration am nativen Enzym bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden für den Enzym-Membran-Komplex genutzt und der Einfluss weiterer Parameter untersucht:

- Untersuchungen mit Hilfe unterschiedlich konzentrierter Immobilisierungslösungen
- Erreichen einer möglichst niedrigen Nachweisgrenze für das Modellpestizid Carbofuran
- Untersuchungen hinsichtlich der Langzeitstabilität der Enzym-Membran-Komplexe mit Definition der optimalen Bedingungen.

Die folgenden Parameter zur Modifizierung der porösen Glasmembranen mit Acetylcholinesterase vom Zitteraal stellten sich als gut geeignet im Hinblick auf eine niedrige Nachweisgrenze und eine hohe Lagerstabilität heraus:

- pH = 7 und T = 25°C
- Reinheit = 350 Units/mg
- 0,02 M Acetylcholinchloridlösung
- für eine hohe Lagerstabilität: Lagerung der beladenen Membranen auf puffergetränkten Celluloseacetat-Plättchen unter Schutzgas bei 4°C ist am besten geeignet.

Die Enzym-Membran-Komplexe, welche nach vorherigen Parametern mit einer Immobilisierungslösung der Konzentration $c_{ACHE} = 1,25 \mu\text{g/ml}$ modifiziert, gelagert und vermessen wurden, ermöglichten eine Nachweisgrenze von $0,125 \mu\text{g/l}$ Carbofuran.

Zum Abschluss der Entwicklung des Sensors erfolgte der Bau eines Prototyps des Sensorkopfes beim Kooperationspartner. Dieser bestand aus zwei Teilen im unteren Teil befand sich der MORES™ und im oberen Teil die Membran-Einheit bestehend aus Farbstoff-, Reflexions- und Enzymmembran.

Einen limitierenden Faktor für dieses Sensorprinzip stellt die unspezifische Hemmung der Acetylcholinesterase dar. Aufgrund dieser ist nur die Bestimmung einer Summenhemmung möglich. Eine Kalibrierung auf ein spezifisches Pestizid ist mit dem derzeitigen Enzymaufbau nicht möglich, da zwischen den Hemmkonstanten der einzelnen Pestizide z.T. Differenzen von mehreren hundert liegen. Außerdem reagiert Acetylcholines-

terase unspezifisch, d.h. nicht nur ein spezielles Pestizid führt zur Hemmung, sondern viele Verschiedene.

Jedoch ist es möglich, den Sensor auf die Menge und die entsprechende Inhibierung zu kalibrieren, so dass die Möglichkeit eines Screening bezüglich der Überschreitung des gesetzlichen Grenzwertes des Gesamtrückstandes an Pestizid besteht.

7 Ausblick

Das zugrundeliegende Messprinzip in dieser Arbeit beruht auf Extinktionsmessungen eines an porösen Glasmembranen immobilisierten pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes. Auf dieser Basis ergeben sich Möglichkeiten für die Weiterentwicklung hinsichtlich der Materialeigenschaften der Matrix und des Messprinzips.

Das wesentliche Kriterium für die Optimierungen ist die Verkürzung der Ansprech- und Analysenzeiten. Zur Lösung dieser Problematik bestehen unterschiedliche Ansatzpunkte. Zum einen ist es möglich, die Materialeigenschaften zu modifizieren und zum anderen kann das Messprinzip verändert werden.

Die mögliche Variationen der Materialeigenschaften bestehen in

- Ausrichtung der Porenstruktur in eine Vorzugsrichtung
- hierarchisch strukturierte Sintergläser
- pseudomorphe Transformation

Die Vorzugsorientierung der Porenstruktur von porösen Gläsern konnte erstmals durch die Kombination aus thermisch initiiertes Phasenseparation und einem Reckprozess durch BARASCU *et al.* [52] erreicht werden. Speziell dafür wurde in Kooperation mit Industriepartnern eine Apparatur bestehend aus einem konventionellen Ofen und einer Reckvorrichtung entwickelt. Die ersten Untersuchungen zeigten in den porösen Glasmonolithen eine Vorzugsorientierung. In der Abbildung 7.1 sind die Porenstrukturen mit und ohne Ausrichtung dargestellt.

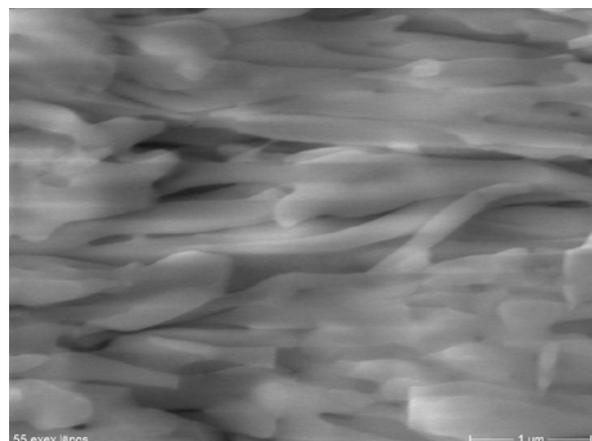
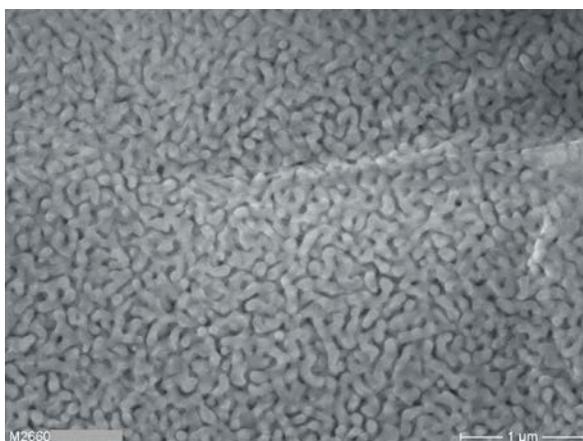


Abb.7.1 elektronenmikroskopische Aufnahmen von porösen Glasmembranen mit 55 nm Porendurchmesser
links: vor der Porenausrichtung rechts: nach der Porenausrichtung [52]

Die Ausrichtung der Poren in eine Vorzugsrichtung bewirkt eine Verringerung der Tortuosität des porösen Glases und damit eine Verbesserung der Diffusionseigenschaften. Diese führt zu einer kürzeren Ansprechzeit.

Poröse Gläser zeichnen sich durch eine monomodale Porenstruktur aus. Im Hinblick auf die Verbesserung der Analysen- und Ansprechzeiten kann ein weiteres Porensystem von großem Vorteil sein. Die Mikro- und Mesoporen dienen dabei aufgrund ihrer großen Oberfläche als Funktionsporen, da sich hier der größte Teil des immobilisierten Enzyms befindet. Dagegen fungieren die Makroporen als Transportporen und ermöglichen einen verbesserten Stofftransport.

Eine Möglichkeit zur Herstellung poröser Silikate mit einer bimodalen Porenstruktur bietet die Versinterung eines feinkörnigen Glaspulvers nach dem Füllstoffprinzip. Erste Untersuchungen hierzu auf der Basis phasenseparierbarer Gläser erfolgten durch REINHARDT *et al.* [53,54]. Dazu wurde Glasgranulat- bzw. -kugeln mit einem Füllstoff definierter Korngröße vermischt, verpresst und gesintert. Der Füllstoff wurde im Anschluss durch Herauslösung oder Kalzinieren entfernt. Die entstandenen Poren bilden das Makroporensystem. Die Generierung des Meso- bzw. Mikroporensystems erfolgt nach den Schritten der klassischen porösen Glasherstellung über die thermische Phasenseparation und die Extraktion.

Eine andere Variante der Gewinnung einer bimodalen Porenstruktur bietet die pseudomorphe Transformation [138]. Dabei wird an der silikatischen Oberfläche der porösen Gläser beispielsweise MCM generiert. Jedoch sind die Poren des MCM zu klein, um eine Enzymimmobilisierung vornehmen zu können, aber die bei der Generierung entstehende größere Oberfläche bietet mehr funktionelle Gruppe zur Anbindung von Enzymen. Für diesen Prozess ist es notwendig, dass das amorphe und fein disperse Siliziumdioxid gelöst wird. Die größte Löslichkeit von SiO_2 liegt im stark basischen pH-Bereich, weshalb häufig eine Tensid / Natriumhydroxidlösung für die Synthese verwendet wird. Hierbei fungiert das Templat CTA-OH als Lösungsmittel für das SiO_2 und als strukturdirigierendes Agens [139].

Neben der Beeinflussung der Analysenzeiten über die Matrix bestehen Möglichkeiten der Änderung des Messprinzips.

Eine potentielle Variante ist das Prinzip des Schwangerschaftstest. Bei diesem laufen Funktionalitätstest und die Untersuchung der Probe gleichzeitig ab. Diese parallele Durchführung der Teilschritte ermöglicht ein Verkürzen der Messdauer.

Auch die Mikrofluidik bietet die Möglichkeit der Verbesserung der Analysenzeit. Bei dieser Methode wird die Analytmenge auf wenige Mikroliter herabgesetzt. Für die Realisierung können miniaturisierte nanoporöse Glasmembranen in die Analysekommer integriert werden, welche aus mikrofluidischen Kanälen besteht. Neben den Änderungen der Größe sind hierbei auch Anpassungen hinsichtlich der Textur der Glasmembranen notwendig.

In beiden Varianten erfolgt eine Parallelbestimmung. Um das zu realisieren, ist es notwendig, dass der Farbstoff, welcher die Reaktion sichtbar macht, co-immobilisiert wird oder das Enzym, welches die Reaktion ermöglicht, mit dem Farbstoff modifiziert wird. Weiterhin besteht die Möglichkeit die Verfolgung der pH-Wertänderung nicht über Extinktionsmessungen, wie in dieser Arbeit, sondern mittels Fluoreszenzmessung vorzunehmen.

Nicht nur eine kürzere Analysenzeit ist von großem Interesse, sondern auch eine bessere Anpassung des Sensors an ein Zielpestizid, denn für viele Obst- und Gemüsesorten wird häufig nur ein Pestizid in stark erhöhter Konzentration beobachtet. Für diese Entwicklung ist es notwendig, dass die Enzyme bzw. die Farbstoff-Enzymkomplexe mit Hilfe der bekannten Hemmkonstanten an die gesetzlich zulässigen Höchstmengen des "Zielpestizids" angepasst werden.

Der denkbare Sensor wurde für die "Vor-Ort-Untersuchung" durch Lebensmittelkontrolleure und Landwirte. Er dient lediglich zur Bestimmung der Gesamtmenge an Pestizidrückständen. Bei einer Überschreitung des Grenzwertes erfolgt keine Überführung in den Handel. Es wird jedoch eine detaillierte Analyse in einem unabhängigen Laboratorium vorgenommen.

Den Landwirten bietet der Sensor die Möglichkeit zur Kontrolle des Pestizidrückstandes des Erntegutes zum Erntezeitpunkt bzw. des Pestizidgehaltes innerhalb einer bestimmten Zeit nach der Behandlung. Anhand der Ergebnisse kann über die Qualität der Ernte und die Auslieferung entschieden werden.

Literaturverzeichnis

- [1] <http://umweltinstitut.org/lebensmittel/pestizidruckstande-in-lebensmitteln/.Pestizidruckstande-in-lebensmitteln-157.html>. Stand: **12.12.2011**
- [2] E. Bartholomé, F. Ullmann: *Ullmann's Encyklopädie der Technischen Chemie*, Band 13, **1976**, Wiley VCH, 211-213.
- [3] Martin L. Pall :Ein Meilenstein in der Historie von MCS – Multiple Chemical Sensitivity, 23.09.2009. URL:<http://www.purenature.de/blog/neues-aus-medizin-und-wissenschaft/ein-meilenstein-in-der-historie-von-mcs-multiple-chemical-sensitivity/>, Stand: **18.05.2011**
- [4] Pressemitteilung: Parkinson durch Umweltgifte-21 Millionen für Forschung bewilligt, 16.09.2009 URL:<http://www.purenature.de/blog/neues-aus-medizin-und-wissenschaft/parkinson-durch-umweltgifte-21-millionen-fur-forschung-bewilligt/>Stand: **18.05.2011**
- [5] D. Doenecke, J. Koolman, G. Fuchs, W. Gerok: *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, **2005**, Georg Thieme Verlag, 15. Auflage, 722f.
- [6] Uni Düsseldorf, URL:<http://www.uni-duesseldorf.de/MathNat/Biologie/Didaktik/Claudia/bilder/synbesch.jpg>) Stand: **17.05. 2011**.
- [7] F. Hucho: *Einführung in die Neurochemie*, Verlag Chemie Weinheim, **1982**, 96ff.
- [8] K. Winnacker, L. Küchler: *Chemische Technik, Band 8*, Wiley-VCH-Verlag, Weinheim, **2006**, 216ff.
- [9] EU-Pestizidverordnung: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/Index/> Stand: **29.06.2011**
- [10] Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln; Mitteilung VI der Senatskommission für Pflanzenschutz-, Pflanzenbehandlungs- und Vorratsschutzmittel, Methodensammlung der Arbeitsgruppe Analytik, 11. Lieferung 1991, Wiley VCH
- [11] Interlabor Belp AG: Dienstleistungen 2010/11 S.6, URL:<http://www.interlabor.ch/?gclid=CMWv26-z8agCFci-zAadjFd6Cg>, Stand: **18.05.2011**.
- [12] A. Avramescu, T. Noguer, M. Avramescu, J.-L. Marty: *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 458, 203–213.
- [13] G. S. Nunes, T. Montesinos, P.B.O.Marques, D. Fournier, J.L. Marty: *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 434, 1-8.
- [14] G. Valdes-Ramirez, M. Cortina, M. T. Ramirez-Silva, J.-L. Marty: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2008**, 392, 699–707.

- [15] S. Andreescu, L. Berthelmebs, J.-L.Marty: *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 464, 171-180.
- [16] G.A. Alonso, R.B. Dominguez, J.L. Marty, R. Muñoz: *Sensors* **2011**, 11, 3791-3802.
- [17] M.E. Leon-Gonzalez, A. Townshend: *Analytica Chimica Acta*, **1990**, 236, 267-272.
- [18] W. Trettnak, F. Reininger, E. Zinterl, O.S. Wolfbeis: *Sensors & Actuators B*, Elsevier **1993**, 11, 87-93.
- [19] R.T. Andres, R. Narayanaswamy: *Talanta*, **1997**, 44, 1335-1352.
- [20] M. Xavier, B. Vallejo, M.D. Marazuela, M.C. Moreno-Dandi, F. Baldini, A.Falai : *Biosensors & Bioelectronics*, Elsevier **2000**, 14, 895-905.
- [21] V. Vamvakaki, N. A. Chaniotakis: *Biosensors and Bioelectronics*, **2007**, 22, 2650-2655.
- [22]. G.G. Guilbault, J. Das: *Analytical Biochemistry*, **1970**, 33, 341-355.
- [23] G.G. Guilbault, M.H. Sadar, S.S. Kuan, D. Casey: *Analytica Chimica Acta*, **1970**, 51, 83-93.
- [24] G.G. Guilbault, M.H. Sadar, S.S. Kuan, D. Casey: *Analytica Chimica Acta*, **1970**, 52, 75-82.
- [25] B. Bucur, D. Fournier, A. Danet, J.-L. Marty: *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 562, 115-121.
- [26] M.P. Dondoi, B. Bucur, A.F. Danet, C.N.Toader, L. Barthelmebs, J.-L. Marty: *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 578, 162-169.
- [27] Y.-H. Won, H. Seong Jang, S. Min Kim, E. Stach, M. Ganesana, S. Andreescu, L. A. Stanciu: *Langmuir*, **2010**, 26(6), 4320-4326.
- [28] J. Gong T. Liu, D. Song, X. Zhang, L. Zhang: *Electrochemistry Communications*, **2009**, 11, 1873-1876.
- [29] D. Du S. Chen, J. Cai, D. Song: *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2007**, 611, 60-66.
- [30] D. Du, X. Huang, J. Cai, A. Zhang, J. Ding, S. Chen: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2007**, 387, 1059-1065.
- [31] X. Sun, X. Wang, Z. Liu: *International Journal of Food Engineering*, **2008**, 4, 1-12.
- [32] X. Huang, D. Du: *Electroanalysis*, **2008**, 20, 402-409.
- [33] S. Laschi, D. Ogonczyk, I. Palchetti, M. Mascini: *Enzyme and Microbiological Technology*, **2007**, 40, 485-489.
- [34] R. Sinha, M. Ganesana, S. Andreescu, L. Stanciu: *Biosensors and Bioelectronics*, **2011**, 30, 43-48.
- [35] R. A. Messing: *Immobilized Enzymes for Industrial Reactors*, Academic Press, New York, **1974**, 63-77.
- [36] H. H. Weetall: *Research/ Development Dec.*, **1971**, 18-22.
- [37] G. Li, J. Huang, X. Kou Zhang: *Applied Biochemistry of Japan.*, **1982**, 7, 325-328.

- [38] O.V. Lomako, I. I. Menyibra, L. A. Nakhapetyan : *Enzyme and Microbiological Technology*, **1982**, 4, 89-92.
- [39] F. Janowski, W. Heyer: *Wissenschaftliche Zeitung der Universität Halle*, **1986**, 5, 30ff.
- [40] H.H. Weetall: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **1993**, 41, 167.
- [41] A.D. Russell: *Progress in Medicine and Chemistry* ,13, **1976**, 271 -301.
- [42] I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, K.C. Waldron: *BioTechniques*, **2004**, 37 (5), 790-802.
- [43] S.-O. Molin: *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **1978**, 26 (5), 412-414.
- [44] B.D. Gupta, S. Sharma: *Optics Communications*, **1998**, 154, 282–284.
- [45] G. Schulz-Ekloff, D. Wöhrle, B. van Duffel, R.A. Schooneheydt: *Microporous and Mesoporous Materials*, **2002**, 51, 91–138.
- [46] P.T. Sotomayor, I.M. Raimundo, A.J.G. Zarbin, J.J.R. Rohwedder, G.O. Neto, O.L. Alves: *Sensors and Actuators B*, **2001**, 74, 157-162.
- [47] O. Miled, D. Grosso, C. Sanchez, J. Livage: *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, **2004**, 65, 1751–1755.
- [48] R. Müller: *Dissertation „Optische pH-Messung unter Einsatz immobilisierter Styrylacridin-Farbstoffe“*, Magdeburg, **2004**.
- [49] F. Janowski, W. Heyer: *Poröse Gläser*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffchemie, Leipzig, **1982**, 15f.
- [50] H.P. Hood, M.E. Nordberg, *US 2 106 744*, **1934**.
- [51] D. Enke: *Habilitation „Über die anwendungsbezogene Charakterisierung von Katalysatorträgern“*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2005**.
- [52] A. Barascu, J. Kullmann, B. Reinhardt, T. Rainer, H. Roggendorf, M. Dubiel, D.Enke: *Journal of the American Ceramic Society*, **2012**, 95 (10), 3013-3015.
- [53] B. Reinhardt, D. Enke, G. Bienhaus: *Optica Applicata*, **2012**, 42 (2), 265-270.
- [54] B. Reinhardt, D. Enke, F. Syrowatka: *Journal of American Ceramic Society*, **2012**, 95 (2), 461-465.
- [55] E. Bartholome, E. Biekert, H.Hellmann, H. Ley, W. Weigert, E.Weise: *Ullmann's Encyklopädie der Technischen Chemie*, 4. Auflage
- [56] W. Heyer: *Dissertation B „Zur Thermostabilität poröser Gläser“*, Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg, **1977**, 65ff.
- [57] *DE 198 48 377 A1*, **2000**.
- [58] A.-M. Nagel, H. Exner: *Lasermagazin*, 5, **2000**,14.

- [59] URL: <http://www.wagnerlaser.de/laserschneiden>, **Stand: 18. Mai 2011**
- [60] F. Schüth, K.S.W. Sing, J. Weitkamp: *Handbook of Porous Solids, Volume 3*, Wiley-VCH, **2002**, 1488.
- [61] F. Janowski, W. Heyer: *Derivatisierung poröser Gläser*, UNI ZEITSCHRIFT, **1988**, 30f.
- [62] F.M. Richards, J.R. Knowles: *Journal of Molecular Biology*, **1968**, 37, 231-233.
- [63] F. Janowski, G. Fischer, W. Urbaniak, Z. Foltynowicz, B. Marciniec: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.*, **1991**, 10, 263-272.
- [64] H. Ishida, J.L. Koenig: *Journal of Colloid and Interface Science*, **1978**, 64 (3), 555-564.
- [65] H. Ishida: *Adhesion Aspects in polymeric Coatings*, K.W. Mitall, Plenum Press, New York, **1983**, 68-86.
- [66] Z. Foltynowicz, W. Urbaniak, B. Marciniec, F. Janowski, W. Heyer: *Glass Technology*, **1993**, 34, 206-209.
- [67] Urban & Fischer: *Roche Lexikon Medizin- Enzymhemmung*, **2003**, 5. Auflage.
- [68] A. Schellenberger: *Enzymkatalyse*, VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1989.
- [69] H. Bisswanger: *Enzymkinetik*, Wiley-VCH Verlag GmbH, **2000**, 99ff.
- [70] J. Lasch: *Enzymkinetik*, Springer Verlag Berlin, **1987**, 64f.
- [71] I. Stark: *Chemie in unserer Zeit*, Verlag Chemie GmbH, 18(3), **1994**, 96ff.
- [72] G. Valdés-Ramírez, M. Gutiérrez, M. Del Valle, M. Ramírez-Silva, D. Fournier, J. Marty: *Biosensors and Bioelectronics*, **2009**, 24, 1103-1108.
- [73] J. Park, K. An, J.-G. Park, H.-J. Noh, J.-Y. Kim, J.-H. Park, N.-M. Hwang, T. Hyeon : *Nature Materials Journal*, **2004**, 3, 891-895.
- [74] F. Shahidi, J. Synowiecki: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39 (8), **1991**, 1527-1532.
- [75] S. Andreescu, L. Barthelmebs, J. Marty: *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 464 (2), 171-180.
- [76] G.L. Ellmann, K.D. Courtney, V. Andres Jr., R.M Featherstone: *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7, 88-95.
- [77] J. H. Labuschagne: *South African Journal of Dairy Technology*, **1976**, 8(2), 87-91.
- [78] O. A. Young, R. D. Thomson, V. G. Merhtens, M. P. F. Loeffen: *Meat Science*, **2004**, 67(1), 107-112.
- [79] J. Bourilkov, M. Belz, W. Boyle, K. Grattan: *Proceedings of SPIE*, **1999**, 3538, 268-277.
- [80] C.-Y. Lin: *Journal of Scientific Instruments*, **1944**, 21-32.

- [81] Y. Badonnel, J. P. Crance, J. M. Bertrand, E. Panek.: *Pharmacies Biologiste (Paris)*, **1969**, 6(61), 149-154.
- [82] A. S. Jeevarajan S. Vani, T.D. Taylor, M.M. Anderson: *Biotechnology and Bioengineering*, **2002**, 78(4), 467-472.
- [83] W. Vogel: *Glaschemie*, Springer Verlag, Berlin, **1992**.
- [84] K. Kühne: *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, **1955**, 20, 204-208.
- [85] J. A. Coch Frugoni: *Gazz. Chim. Ital.*, **1957**, 87, 403-407.
- [86] B. M. Weidgans: *Dissertation „New Fluorescent Optical pH Sensors with Minimal Effects of Ionic Strength“*, Universität Regensburg, **2004**
- [87] E.W. Washburn: *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **1921**, 7, 115-116.
- [88] D. Enke, F. Friedel, F. Janowski, T. Hahn, W. Gille, R. Müller, H. Kaden: *Studies in Surface Science and Catalysis*, **2002**, 144, 347-354.
- [89] D. A. Skoog, J. J. Leary: *Instrumentelle Analytik*, Springer Berlin, **1996**, 575ff.
- [91] O.I. Vorosilova, A.V. Kiselev, Y.S. Nikitin: *Kolloid Zeitung (UdSSR)*, **1980**, 42, 223.
- [92] Trinkwasserverordnung: <http://www.dvgw.de/wasser/recht-trinkwasserverordnung/trinkwasserverordnung/anlage-2/> **Stand: 28. Juni 2011**
- [93] B. Evans, T.E. White, *Journal of Catalysis*, **1968**, 11, 336-341.
- [94] M.L. Hair, W. Hertl: *Journal of Physical Chemistry*, **1969**, 73(7), 2372-2378.
- [95] M.L. Hair, W. Hertl: *Journal of Physical Chemistry*, **1973**, 77, 1965-1968.
- [96] M.L. Hair, W. Hertl: *Colloid Interface Science*, **1977**, 60(1), 154-161.
- [97] M.L. Hair: *Silica Surfaces*, in Silanes, *Surfaces and Interfaces*, ed. D.E. Leyden, Gordon and Breach science publishers, **1985**, 40ff.
- [98] S. Kondo, T. Ishikawa, N. Yamagami, K. Yoshioka, Y. Nakahara: *Bullett of Chemical Society Japan*, **1987**, 60, 95-97.
- [99] E. F.Vansant, P. van Der Voort, K. C. Vrancken: *Studies in Surface Science and Catalysis*, **1995**, 93, Elsevier, 203-209.
- [100] J.W. De Haan, H.M. Van Den Bogaert, J.J. Ponjee, L.J.M. Van De Ven: *Journal of Colloid Interface Science*, **1986**, 110, 591-600.
- [101] K. M. R. Kallury, P.M. MacDonald, M. Thompson: *Langmuir*, **1994**, 10, 492.
- [102] K.C. Vrancken, L. De Coster, P. Van Der Voort, P.J. Gobet, E. F. Vansant: *Journal Colloid Interface Science*, **1995**, 170, 71-77.

- [103] K.C. Vrancken, P. Van Der Voort, I. Gillis-D'Hamers, E.F. Vansant, P. Grobet: *Journal Chemical Society Farraday Trans.*, **1992**, 88 (21), 3197-3200.
- [104] P. Van der Voort, K.C. Vrancken, E.F. Vansant: *Journal Chemical Society Farraday Trans.*, **1993**, 89 (12), 2037-2040.
- [105] G.S. Carajaval, D.E. Leyden, G.R. Quinting, G.E. Maciel: *Analytical Chemistry*, **1988**, 60, 1776-1786.
- [106] M. Zhu, M. Z. Lerum, W. Chen: *Langmuir*, **2012**, 28, 416-423.
- [107] T.G. Wadell, D.E. Leyden, M.T. DeBello: *Journal American Chemical Society*, **1981**, 103, 5303-5307.
- [108] K.K. Unger, K. K. Kinkel: *Journal N. J. Chromatography*, **1984**, 316, 193-200.
- [109] I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, K.C. Waldron: *Biotechniques*, **2004**, 37, 790-802.
- [110] C. Aso, Y. Aito: *Bullett of Chemical Society Japan*, **1962**, 35, 1426.
- [111] F. M. Richard; J. R. Knowles: *Journal Mol. Biol.*, **1968**, 37, 231ff.
- [112] P.M. Hardy, A.C. Nicholls, H.N. Rydon: *Journal Chemical Society Perkin Trans*, **1976**, 1, 958-962.
- [113] A. H. Korn, S.H. Fairheller, E.M. Filachione: *Journal of Mol. Biol.*, **1972**, 65, 525-529.
- [114] A. Rembaum, S. Margel, J. Levy: *Journal of Immunol. Methods*, **1978**, 24, 239-250.
- [115] J. Kawahara, T. Ohmori, T. Ohkubo, S. Hattori, M. Kawamura: *Analytical Biochemistry*, **1992**, 201, 94- 98.
- [116] H. Ruttloff: *Industrielle Enzyme*, Behr's Verlag, **1994**, 461ff.
- [117] K. Dose: *Biochemie*, Springer- Verlag , **1992**, 73.
- [118] Eppendorf: *Produktkatalog*, **2009**, 289ff.
- [119] DIN EN ISO 8655-1:2002-12
- [120] Y. Qu, Q. Sun, F. Xiao, G. Shi, L. Jin: *Bioelectrochemistry* , **2010**, 77 (2), 139-144.
- [121] C.J. Gray: *Mechanismen der Enzymkatalyse*, Akademie- Verlag Berlin, **1976**, 329f.
- [122] M. Naoi, M. Naoi, K. Yagi: *FEBS Letters*, 88, **1978**, 231-233.
- [123] A.M. Klibanov: *Analytical Biochemistry*, **1979**, 93, 1-25.
- [124] A. Moradzadegan, S.-O. Ranaei-Siadat, A. Ebrahim-Habibi, M. Barshan-Tashnizi, R. Jalili, S.-F. Torabi, K. Khajeh: *Engineer Life Science* **2010**, 10 (1), 57-64.
- [125] B. J. White, J. A. Legako, H. J. Harmon: *Biosensors and Bioelectronics* , **2003**, 18, 729-734.
- [126] A. Norouzy, M. Habibi-Rezaei, D. Qujeq, M. Vatani, A. Badii: *Bulletin of Korean Chemical Society*, **2010**, 31 (1), 157-161.

- [127] J. Aparicio, J.V. Sinisterra: *Journal of Molecular Catalysis*, **1993**, 80, 269-276.
- [128] A. Kotha, R.C. Raman, S. Ponrathnam, *Reactive and Functional Polymers*, **1996**, 28, 235-242.
- [129] K. Mosbach, P.O. Larsson: *Biotechnology and Bioengineering*, **1971**, 13, 393-398.
- [130] K.E. Taylor, S.C. Boss: *European Patent Application*, EP 345789, **1989**.
- [131] S.W. Park, S.Y. Choi, S.W. Kim: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2002**, 94, 218- 224.
- [132] D.S. Clark, J.E Bailey: *Biotechnology and Bioengineering*, **1983**, 25, 1027-1047.
- [133] H.-G. Ortlepp, D. Römhild, A. Steinke: Micro-optical Remissions/Reflection Sensor System (MORES) Opto 2002, Erfurt
- [134] J.A. Hoerni: *U. S. Patent 3,025,589*
- [135] J.A. Hoerni: *U.S. Patent 3,064,167*
- [136] J.A. Hoerni: *Fairchild Semiconductor Technical Paper*, **1961**, Book 3.
- [137] M.P. Xavier: *Biosensors & Bioelectronics* , **2000**, 14, 895–905.
- [138] A. Galarneau, J. Iapichella, K. Bonhomme, F. Di Renzo, P. Kooyman, O. Terasaki, F. Fajula: *Advanced Functional Materials*, **2006**, 16, 1657-1667.
- [139] M. F. Ottaviani, A. Moscatelli, D. Desplandier-Giscard, F. Di Renzo, P. J. Kooyman, B. Alonso, A. Galarneau, *Journal Physical Chemistry B*, 108, **2004**, 121-123.

I Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AChCl	Acetylcholinchlorid
AChE	Acetylcholinesterase
Ag/AgCl-Elektrode	Silber/Silberchlorid- Elektrode
AIDH	Aldehyddehydrogenase
γ -APTS	γ - Aminopropyltriethoxysilan
BChCl	Butyrylcholinchlorid
BChE	Butyrylcholinesterase
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CPG	controlled pore glass
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
dest.	destilliert
d.h.	dass heißt
DMF	Dimethylformamid
GC	Gaschromatographie
GCE	Glas-Carbon-Elektrode
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
MCFA	Multi-Commutated Flow Analysis
MS	Massenspektroskopie
MTMOS	Methyltrimethoxysilan

NADH	Nicotinamid-Adenindinucleotid-Hydrogen
NTA	Nitrilotriessigsäure
OPH	Organophosphate
ORP	OrganophosphatHydrolase
PBA	1- Pyrenbutylsäure
PVA- SbQ	vernetzenden Polyalkohol, mit Styrylpyridiniumgruppen in der Betainstruktur
PVA-AWP	vernetzenden Polyalkohol- Asahi Water washable Plate
QCM	quartz cristall microbalance technique
TMOS	Tetramethylorthosilakat
v. Chr.	vor Christi Geburt
verd.	verdünnt
z.B.	zum Beispiel

II Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1** Schematische Darstellung der Impulsweiterleitung [6]
- Abb. 2.1** Schematische Darstellung des Laserschneidens [57]
- Abb. 2.2** Schematische Darstellung der Oberflächenhydroxylgruppen poröser Gläser nach [58]
- Abb. 2.3** Möglichkeiten der chemischen Oberflächenmodifizierung poröser Gläser nach [59]
- Abb. 2.4** Umsetzung der aminosilanisierten porösen Glasmembran mit Glutardialdehyd und Enzym nach [37]
- Abb. 2.5** schematische Darstellung der Enzymhemmung nach [67]
- Abb. 2.6** experimenteller Aufbau des Inhibierungsexperiment nach [13]
- Abb. 2.7** Relative Inhibierung in Abhängigkeit zur Inkubationszeit nach [16]
- Abb. 2.8** Schematische Darstellung des Biosensors nach [18]
- Abb. 2.9** Inhibierungskurven von immobilisierten Acetylcholinesterasen nach [19]
- Abb. 2.10** schematische Darstellung des MCFA nach [20]
- Abb. 2.11** Darstellung der Veränderungen des Stromsignals bei der Zugabe von Substrat bzw. Insektizid nach [20]
- Abb. 2.12** Einfluss von Ethanol, Methanol und Acetonitril auf die Aktivität des gebundenen Enzyms nach [26]
- Abb. 2.13** schematische Darstellung des biomagnetischen Glases und des Messaufbaus nach [27]
- Abb. 2.14** Illustration der Bildung des CaCO_3 -Chitosan-Komposits (A-C) und elektronenmikroskopische Aufnahme des Komposits auf der GCE (D) [27]
- Abb. 2.15** Katalytische Reaktion von Acetylcholinesterase-GCE nach der Glutardialdehyd-methode nach [31]
- Abb. 2.16** Katalytische Reaktion von Acetylcholinesterase-GCE nach der Sol-Gel-Methode nach [31]
- Abb. 2.17** Schematische Darstellung des Kompositfilms auf der Goldelektrode nach [32]
- Abb. 2.18** schematische Darstellung der Immobilisierung der modifizierten Acetylcholinesterase an die NiO-Nanopartikel nach [34]

- Abb. 2.19** Messapparatur zur Charakterisierung des pH-Sensors nach [34]
- Abb. 2.20** Schematische Darstellung der kovalenten Anbindung mit Hilfe von γ -APTS nach [42]
- Abb. 2.21** Schematische Darstellung der Co-Kondensation des Triethoxysilan-Derivates des Chromophores nach [42]
- Abb. 2.22** Reflexionsspektrum des Polyanilin-porösen Vycor-Glas Komposits in Lösung verschiedener pH-Werte nach [43]
- Abb. 3.1** Phasendiagramm des ternären Systems Na_2O - B_2O_3 - SiO_2 nach [84]
- Abb. 3.2** Ausgangsglasblock [86]
- Abb. 3.3** Kernbohrer der Firma Knopp [86]
- Abb. 3.4** runde Glasstäbe [86]
- Abb. 3.5** Laserstrahlbearbeitung mittels Scanner und Laser [59]
- Abb. 3.6** Pappform (links)[86] Form mit erster Schicht Epoxidharz
- Abb. 3.7** ausgehärteter Epoxidharzblock [86]
- Abb. 3.8** Extraktionsanlage [86]
- Abb. 3.9** Anlage zur alkalischen Nachbehandlung [86]
- Abb. 3.10** kovalente Immobilisierung des pH-Absorptionsindikators BS-121 an eine poröse Glasmembran[89]
- Abb. 3.11** Strukturformel, Trivialname und IUPAC- Bezeichnung der verwendeten NHS-aktivierten Farbstoffe
- Abb. 3.12** Platte mit aufgeklebter Membran zur Bestimmung der Permeabilität [86]
- Abb. 3.13** Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Durchführung der Permeabilitätsmessungen [94]
- Abb. 3.14** Schematische Darstellung eines Elektronenmikroskops [91]
- Abb. 3.15** Messapparatur zur Bestimmung der Enzymaktivität
- Abb. 3.16** Küvette mit integrierter mit BS121 modifizierte Membran und PTFE-Halter
links: rechteckige Membran, pH = 4, rechts: runde Membran, pH = 8,5 [89]
- Abb. 4.1a** grafische Darstellung der Porenverteilungen der Membran M50
- Abb. 4.1b** grafische Darstellung der Porenverteilungen der Membran M65
- Abb. 4.1c** grafische Darstellung der Porenverteilungen der Membran M75

- Abb. 4.1d** grafische Darstellung der Porenverteilungen der Membran M100
- Abb. 4.2a** elektronenmikroskopische Aufnahme der Membran M50
- Abb. 4.2b** elektronenmikroskopische Aufnahme der Membran M65
- Abb. 4.3c** elektronenmikroskopische Aufnahme der Membran M75
- Abb. 4.3** Kraft-Weg-Diagramm poröser Glasmembranen mit einem Porendurchmesser v. 75 nm
- Abb. 4.4** Abhängigkeit der Permeabilität für Stickstoff vom anliegenden Druck einer M65-, M75- und M100-Membranen
- Abb. 4.5** Ergebnisse der Bestimmung der Aminogruppendichte mittels Elementaranalyse
- Abb. 4.6** Ergebnisse der Bestimmung der Aminogruppendichte mittels Titration
- Abb. 4.7** Struktur des Aminosilans auf der Oberfläche einer porösen Glasmembran nach [65]
- Abb. 4.8** Darstellung einer γ -APTS-Schicht mit strukturellen Unregelmäßigkeiten [108]
- Abb. 4.9** Verlauf des Leaching der aminosilanisierten Glasmembran [nach 101]
- Abb. 4.10** intramolekular stabilisierter 5-Ring des γ -Aminopropylethoxysilan nach [108]
- Abb. 4.11** Hydrolyse des immobilisierten Alkoxysilan [nach 108]
- Abb. 4.12** Struktur des γ -APTS auf einer mit TEOS vorbehandelten Oberfläche der porösen Glases [nach 65]
- Abb. 4.13** mögliche Strukturen des Glutaraldehyds [nach 111]
- Abb. 4.14** Abhängigkeit der pH- Wertänderung von der AChCl-Konzentration bei 25°C und pH-Wert_{start} = 7
- Abb. 4.15** Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der AChCl-Konzentration bei 25°C und pH-Wert_{start} = 8
- Abb. 4.16** Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der AChCl-Konzentration bei 37°C und pH-Wert_{start} = 7
- Abb. 4.17** Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der AChCl-Konzentration bei 37°C und einem pH-Wert_{start} = 8,5
- Abb. 4.18** Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der Enzymkonzentration bei einer Substratkonzentration von 0,02 M
- Abb. 4.19** Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der theoretischen Anzahl der immobilisierten AChE
- Abb. 4.20** Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der Immobilisierungsdauer

- Abb. 4.21** Abhängigkeit der pH-Wertänderung nach der Zugabe von 10 µl Carbofuranlösung eines mit 1 mg AChE in 20 ml Puffer behandelten Membran-Enzym-Komplexes
- Abb. 4.22** Abhängigkeit der pH-Wertänderung nach der Zugabe von 1 µl Carbofuranlösung eines mit 0,2mg AChE in 20 ml Puffer behandelten Membran-Enzym-Komplexes
- Abb. 4.23** Abhängigkeit der pH-Wertänderung nach der Zugabe von 1 µl Carbofuranlösung eines mit 0,1 mg AChE in 20 ml Puffer behandelten Membran-Enzym-Komplexes
- Abb. 4.24** Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der 'normalen' und der 'veränderten' Inhibierung des Enzym-Membran-Komplexes der Beladung mit 0,1 mg AChE in 20 ml Pufferlösung
- Abb. 4.25** Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der 'normalen' und der 'veränderten' Inhibierung des Enzym-Membran-Komplexes der Beladung mit 0,2 mg AChE in 20 ml Pufferlösung
- Abb. 4.27** Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der Carbofuranmenge bei einer Immobilisierung mit 0,1 mg AChE in 20 ml Pufferlösung
- Abb. 4.28** Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der Carbofuranmenge bei einer Immobilisierung mit 0,05 mg AChE in 20 ml Pufferlösung
- Abb. 4.29** Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der Carbofuranmenge bei einer Immobilisierung mit 0,025 mg AChE in 20 ml Pufferlösung
- Abb. 4.30a** Abhängigkeit der pH-Wertänderung von den Lagerungsbedingungen nach 1 Tag Lagerung
- Abb. 4.30b** Abhängigkeit der pH-Wertänderung von den Lagerungsbedingungen nach 7 Tagen Lagerung
- Abb. 4.30c** Abhängigkeit der pH-Wertänderung von den Lagerungsbedingungen nach 14 Tagen Lagerung
- Abb. 4.30d** Abhängigkeit der pH-Wertänderung von den Lagerungsbedingungen nach 21 Tagen Lagerung
- Abb. 4.31** pH-Zeit-Abhängigkeit eines mit 0,1 mg in 20 ml Puffer immobilisierten Enzym-Membran-Komplexes von der Lagerungsdauer bei einer Lagerung auf getränkten Celluloseacetat-Plättchen
- Abb. 4.32** pH-Zeit-Abhängigkeit eines mit 2x0,1 mg in 20 ml Puffer immobilisierten Enzym-Membran-Komplexes von der Lagerungsdauer bei einer Lagerung auf getränkten Celluloseacetat-Plättchen
- Abb. 4.33** pH-Zeit-Abhängigkeit eines mit 2 mg in 20 ml Puffer immobilisierten Enzym-Membran-Komplexes von der Lagerungsdauer bei einer Lagerung auf getränkten Celluloseacetat-Plättchen
- Abb. 4.34a** Aktivitätsverlust nach 28 Tagen Lagerung eines einfach immobilisierten Enzym-Membran-Komplexes

- Abb. 4.34b** Aktivitätsverlust nach 28 Tagen Lagerung eines zweifach immobilisierten Enzym-Membran-Komplexes
- Abb. 4.34c** Aktivitätsverlust nach 28 Tagen Lagerung einer einfach immobilisierten Membran
- Abb. 4.35a** Abhängigkeit der pH-Wertänderung nach 1 Woche Lagerung bei 0°C
- Abb. 4.35b** Abhängigkeit der pH-Wertänderung nach 1 Woche Lagerung bei 4°C
- Abb. 4.35c** Abhängigkeit der pH-Wertänderung nach 1 Woche Lagerung bei Raumtemperatur
- Abb. 4.35d** Abhängigkeit der pH-Wertänderung nach 1 Woche Lagerung bei 40°C
- Abb. 4.36** Veränderung der Aktivität der immobilisierten AChE unter verschiedenen Bedingungen über einen Zeitraum von 100 Tagen nach [129]
- Abb. 4.37** verbleibende Aktivität der immobilisierten AChE nach 70 Tagen bei unterschiedlichen Lagerbedingungen nach [129]
- Abb. 4.38** Miniaturisierte pH-Elektrode
- Abb. 4.39** Messapparatur
- Abb. 4.40** Abhängigkeit der pH-Wertänderung von der Carbofuranmenge
- Abb. 4.41** Bestimmung der Reproduzierbarkeit
- Abb. 4.42** Reproduzierbarkeit der Messung nach [14]
- Abb. 5.1** Schematische Darstellung des Gesamtsensors nach [89]
- Abb. 5.2** schematischer Aufbau des MORES™ [144]
- Abb. 5.3** Möglichkeiten der Signalgewinnung mit dem MORES™ nach [144]
- Abb. 5.4** schematische Darstellung des Stacks
- Abb. 5.5** Apparatur zur Untersuchung der Funktionsweise des integrierten Sensors [89]
- Abb. 5.6** Prototyp des Pestizidsensors [89]
- Abb. 7.1** elektronenmikroskopische Aufnahmen von porösen Glasmembranen mit 55 nm Porendurchmesser

III Tabellenverzeichnis

- Tab. 2.1** Relative Aktivität von Lebercholinesterase verschiedener Herkunft gegenüber Acetyl- und Butyrylcholinestern nach [23]
- Tab. 2.2** Vergleich der I_{50} -Werte der verschiedenen Cholinesterasen durch die Inhibierung diverser Inhibitoren nach [23]
- Tab. 2.3** Hydrolyserate ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) von Insektencholinesterase verschiedener Herkunft gegenüber Acetyl-, Propionyl-, Benzoyl- und Butyrylcholinestern nach [24]
- Tab. 2.4** Detektionsgrenzen der einzelnen Acetylcholinesterasen nach [16]
- Tab. 2.5** Detektionsgrenzen der einzelnen Matrix-Enzym-Komplexe für verschiedene Pestizide nach [18]
- Tab. 3.1** Zusammenfassung der notwendigen Temperaturen
- Tab. 3.2** Zusammenfassung der Bedingungen zur Porengenerierung
- Tab. 3.3** Probenbezeichnung
- Tab. 4.1** Texturdaten der verwendeten Membranen
- Tab. 4.2** Aminogruppendichten bei Variation der Temperatur
- Tab. 4.3** Aminogruppendichten bei Variation der Zeit
- Tab. 4.4** Reproduzierbarkeit der Aminosilanisierung
- Tab. 4.5** Aminogruppendichten nach der Aktivierung bestimmt durch Titration
- Tab. 4.6** Anzahl der Aminogruppen pro nm^2
- Tab. 4.7** Menge an Aminogruppen μmol pro m^2
- Tab. 4.8** Aminogruppendichte nach APTMS-Modifizierung
- Tab. 4.9** Ergebnisse der Elementaranalyse für Stickstoff und Kohlenstoff
- Tab. 4.10** theoretische Stickstoff- und Kohlenstoffanteil nach der Glutardialdehydmodifizierung berechnet anhand der Titrationsergebnisse

Tab. 4.11 Vergleich der berechneten und der mittels Elementaranalyse bestimmten Kohlenstoffanteile

Tab. 4.12 Zusammenstellung der optimierten Parameter

Tab. 4.13 mögliche Fehlerquellen beim Pipettieren [118]

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Kathleen Hobritz
Adresse Am Nikolausberg 2
06198 Salzatal OT Benkendorf

Kontaktdaten Mobil: 0177-7072736
E-Mail: k.hobritz@googlemail.com

Geburtsdaten 17. April 1983 in der Lutherstadt Eisleben
Familienstand ledig
Kinder 1 (5 Jahre)

Beruflicher Werdegang

11.2012 – 12.2014 Gewerbeoberinspektor-Anwärterin - Landesamt für Verbraucherschutz
10.2010 – 05.2012 wissenschaftlicher Mitarbeiter - GNF e.V. Berlin-Adlershof
08.2009 – 09.2010 Elternzeit
11.2008 – 08.2009 Projektmanager - CPI ChemiePark Institut Bitterfeld
11.2007 – 10.2008 wissenschaftlicher Mitarbeiter – Sentronic GmbH Dresden

Akademischer Werdegang

10.2007 – 02.2014 Studiengang: Promotion Chemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema: Entwicklung eines neuen optischen Enzymsensors zum Nachweis von Pestiziden in Obst und Gemüse auf Basis nanoporöser Monolithe

10.2002 – 09.2007 Studiengang: Chemie-Diplom
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Schwerpunkt: Technische Chemie
Abschluss: Diplom

Schulbildung

09.1994 – 09.2002 Südstadt-Gymnasium Halle/S.
Abschluss: Abitur

Fremdsprachen

Englisch kommunikationssicher
Latein Latinum

Walter Korb

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Kathleen Hobritz

Kathleen Hobritz

Halle/ Saale Mai 2013