

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie
Lehrstuhl für Analytische Chemie
der Technischen Universität München

Online-Enzyminhibitionsdetektor für die Wirkungsbezogene Analyse von Toxinen

Susanne Fabel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. R. Nießner
2. Univ.-Prof. Dr. M. Schuster

Die Dissertation wurde am 19.03.2007 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 12.06.2007 angenommen.

Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Zeit von März 2003 bis Januar 2007 am Lehrstuhl für Analytische Chemie der Technischen Universität München unter Leitung von Herrn o. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Nießner für die Möglichkeit, das sehr interessante Projekt am Institut für Wasserchemie bearbeiten zu können. Die gute Ausstattung der Laboratorien, Bereitstellung finanzieller Mittel und sein stetes Interesse an den Forschungsergebnissen waren optimale Rahmenbedingungen, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Michael G. Weller für seine große Unterstützung bedanken. Jede Frage konnte ihm zu jeder Zeit gestellt werden. In zahlreichen Diskussionen entstanden viele Ideen, die nicht nur wesentlich für das Vorankommen der Arbeit waren, sondern von denen ich bestimmt auch noch in Zukunft profitieren werde.

Der Max-Buchner-Forschungstiftung danke ich für ihre finanzielle Unterstützung.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die Finanzierung des Projektes. Ich möchte mich bei den Kooperationspartnern für die gute Zusammenarbeit bedanken: Prof. Dr. Ursula Bilitewski und Bianca Lüderitz vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, danke ich für den Ideenaustausch. Ein besonderes Dankeschön möchte ich Prof. Dr. Till T. Bachmann und Dr. Holger Schulze ehemals vom Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart, jetzt Scottish Centre for Genomic Technology and Informatics an der Universität von Edinburgh aussprechen, die durch die großzügige Bereitstellung von Acetylcholinesterase große Teile dieser Arbeit erst ermöglichten.

Am Lehrstuhl für Fluidmechanik und Prozessautomation der Technischen Universität München danke ich Herrn Dr.-Ing. Wojciech Kowalczyk dafür, dass er sich die Zeit für die Numerische Simulation unseres Modells genommen hat.

Dr. Peter Henriksen vom National Environmental Research Institute, Roskilde, Dänemark, danke ich für das Überlassen einer Anatoxin-a(S)-haltigen Probe.

Dank gilt auch meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Bioanalytik II. Dr. Martin Kiening danke ich für die stete Hilfsbereitschaft in Sachen Computer und Massenspektrometer. Ich danke Bertram Knecht, Isabel Schaupt, Anne Wolter, Christian Cervino und Katrin Kloth für das freundliche Arbeitsklima. Ein besonderer Dank gilt Philipp Stolper, der mein Projekt übernahm - und das schnelle Korrekturlesen dieser Arbeit auf sich nahm. Ich wünsche ihm gute Forschungsergebnisse.

Ich danke Sebastian Wiesemann aus der institutseigenen Werkstatt, der die mitunter doch recht filigranen Bauteile trotz meiner Skizzen sehr gut gearbeitet hat.

Allen Kolleginnen und Kollegen danke ich für ihre Unterstützung und für die angenehme Atmosphäre am Institut, besonders Dr. Harald Prestel, Dr. Armin Messerer, Dr. Thomas Schmid, Dr. Christoph Haisch, Dr. Thomas Baumann, Dr. Michael Seidel, Diana Matschulat, Tobias Fehrenbach, Ulrike McKeon, Caroline Peskoller und allen hier nicht namentlich erwähnten.

Für ihre engagierte Mitarbeit möchte ich den Studentinnen und Studenten Ferdinand Haller, Stefan Preißer, Samuel Wilberforce, Kirsten Langfeld, Andreas Althammer, Sandro Pagano, Georg Simson, Franziska Betzler, Philipp Pitschi, Matthias Scherr und Hwang Gab-Soo danken.

Schließlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und Ihr Interesse an meiner Arbeit. Ein besonderer Dank gilt meinem Sohn Leonhard, der mit seinen Schlafzeiten wesentlich zur Vollendung dieser Arbeit beitrug.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

S. Fabel, R. Nießner, M. G. Weller, Effect-directed Analysis by High-performance Liquid Chromatography with Gas-segmented Enzyme Inhibition, *J. Chrom. A*, 1099:103–110 (2005).

πάντα ῥεῖ.
Heraklit

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|-----------|
| I | Einleitung und Problemstellung | 1 |
| II | Theorie | 5 |
| 1 | Wirkungsbezogene Analytik | 7 |
| 1.1 | Konzept | 7 |
| 1.2 | Strategien | 8 |
| 1.2.1 | Vorsäulen-Ansatz | 8 |
| 1.2.2 | Nachsäulen-Ansatz | 10 |
| 1.3 | Wirkungsbezogene Online-Detektionsmöglichkeiten in der HPLC . | 15 |
| 1.3.1 | Rezeptoren | 15 |
| 1.3.2 | Enzyme | 17 |
| 1.4 | Eingesetzte Zielstrukturen | 20 |
| 1.4.1 | Acetylcholinesterase | 20 |
| 1.4.2 | Proteinphosphatasen | 33 |
| 1.4.3 | Leuchtbakterien | 45 |
| 2 | Nachsäulenreaktoren in der Flüssigkeitschromatographie | 49 |
| 2.1 | Anforderungen an die Hydromechanik der Nachsäulenreaktoren . | 49 |
| 2.1.1 | Miniaturisierung | 50 |
| 2.1.2 | Flüssigkeitsbeförderung | 50 |
| 2.1.3 | Dispersion | 51 |
| 2.1.4 | Mischen | 54 |
| 2.2 | Gepackte Reaktoren | 56 |
| 2.3 | Gestrickte Reaktoren | 58 |
| 2.4 | Gassegmentierte Reaktoren | 59 |
| 3 | Anwendungen der Massenspektrometrie in der Wirkungsbezogenen Analytik | 63 |
| 3.1 | Massenspektrometrie parallel zum biochemischen Detektor | 63 |
| 3.1.1 | Bestimmung der präzisen Masse | 64 |
| 3.1.2 | Quantifizierung | 65 |
| 3.2 | Massenspektrometer als Detektor toxikologisch relevanter Reaktionen | 66 |
| 3.2.1 | Ionensuppression | 68 |
| 3.2.2 | Offline-Detektion von Enzymaktivitäten mit ESI | 69 |
| 3.2.3 | Online-Detektion von Enzymaktivitäten mit ESI | 69 |

| | | |
|--------------------------------------|--|------------|
| 3.2.4 | Mehrdimensionale massenspektrometrische Untersuchungen mit ESI | 70 |
| III Ergebnisse und Diskussion | | 71 |
| 4 | Auswahl der Targets für eine Wirkungsbezogene Analytik | 73 |
| 4.1 | Indikator für Neurotoxizität: Acetylcholinesterasen | 73 |
| 4.1.1 | Substrate | 74 |
| 4.1.2 | Inhibitoren | 77 |
| 4.1.3 | Stabilität des Enzyms in der mobilen Phase | 80 |
| 4.2 | Indikator für Hepatotoxizität: Proteinphosphatasen | 82 |
| 4.2.1 | Substrate | 83 |
| 4.2.2 | Inhibitoren | 84 |
| 4.2.3 | Stabilität des Enzyms in der mobilen Phase | 87 |
| 4.3 | Indikator für Gesamttoxizität: Leuchtbakterien | 89 |
| 5 | Aufbau der Fluidik eines wirkungsbezogenen Nachsäulendetektors | 95 |
| 5.1 | Auswahl der Pumpen | 96 |
| 5.1.1 | Mikrozahnringpumpe | 98 |
| 5.1.2 | Spritzenpumpe | 99 |
| 5.1.3 | Kolbenpumpe | 100 |
| 5.1.4 | Schlauchpumpe | 100 |
| 5.1.5 | Schlussfolgerung | 101 |
| 5.2 | Entwicklung des Nachsäulenreaktors | 101 |
| 5.2.1 | Dispersion in Reaktionskapillaren | 101 |
| 5.2.2 | Numerische Simulation: Mischen und Dispersion | 104 |
| 5.2.3 | Gestrickte Reaktionskapillaren | 106 |
| 5.2.4 | Anwendung einer <i>Peak-Parking</i> -Methode | 107 |
| 5.2.5 | Gassegmentierter Fluss | 111 |
| 5.3 | Zusammenfassung | 114 |
| 6 | Wirkungsbezogene Analyse mit gassegmentiertem Enzyminhibitionsdetektor | 117 |
| 6.1 | Aufbau der Apparatur | 117 |
| 6.1.1 | Flussteiler | 119 |
| 6.1.2 | Einspeisen der Gassegmente | 120 |
| 6.1.3 | Optimierung der Blasenseparation | 124 |
| 6.2 | Online durchgeführte Wirkungsbezogene Analyse von Neurotoxinen | 131 |
| 6.2.1 | AChE-Inhibitionssignal | 131 |
| 6.2.2 | Quantifizierung | 135 |
| 6.2.3 | Wirkungsbezogene Analyse einer Cyanobakterienprobe und eines Reaktionsumsatzes mit dem SFEID | 138 |
| 6.3 | Zusammenfassung | 142 |
| 7 | Vorsäulenexperimente für die Wirkungsbezogene Analyse | 143 |
| 7.1 | Schnelle Online-Anreicherung von Insektiziden | 143 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 7.2 | Online-Oxidation von Phosphorthionaten | 147 |
| 8 | Massenspektrometer als Enzyminhibitionsdetektor | 149 |
| 8.1 | Substratumsatz durch Acetylcholinesterase | 149 |
| 8.2 | Substratumsatz durch Angiotensin-konvertierendes Enzym | 153 |
| 8.3 | Zusammenfassung | 157 |
| IV | Zusammenfassung und Ausblick | 159 |
| V | Experimenteller Teil | 165 |
| 9 | Geräte | 167 |
| 9.1 | Pumpen | 167 |
| 9.2 | Detektoren | 167 |
| 9.3 | Fluidik-Zubehör | 167 |
| 9.4 | Sonstige | 170 |
| 10 | Chemikalien und Reagenzien | 171 |
| 10.1 | Verwendete Chemikalien | 171 |
| 10.2 | Enzyme, Proteine und Mikroorganismen | 172 |
| 10.3 | Standardsubstanzen | 173 |
| 10.4 | Pufferlösungen | 174 |
| 11 | Standardprozeduren | 177 |
| 11.1 | Ansetzen von Analytstandardlösungen | 177 |
| 11.2 | Bestimmen der Enzymaktivität | 177 |
| 11.3 | Enzyminhibitionstest auf der Mikrotiterplatte | 178 |
| 11.3.1 | Acetylcholinesterase | 178 |
| 11.3.2 | Proteinphosphatasen | 180 |
| 11.4 | Leuchtbakterientests | 181 |
| 12 | Chromatographische Methoden | 183 |
| 12.1 | HPLC-Trennung von Insektizid-Gemischen | 183 |
| 12.2 | HPLC-Methode für Microcystine | 183 |
| 12.3 | Online-SPE-HPLC-MS | 183 |
| 13 | Gassegmentierter Enzyminhibitionsdetektor | 185 |
| 13.1 | Enzym- und Substratlösungen | 185 |
| 13.2 | Signalauswertung | 185 |
| 14 | Massenspektrometrie | 187 |
| 14.1 | MS-Parameter | 187 |
| 14.2 | Kalibrierung | 187 |
| 14.3 | Präzise Massenbestimmung | 188 |
| 14.4 | Massenspektrometrische Bestimmung der Enzymaktivität | 188 |

Teil I

Einleitung und Problemstellung

Konventionelle instrumentelle analytische Verfahren liefern eine Fülle quantitativer und struktureller Daten der chemischen Komponenten einer Gewässerprobe. Die Schwierigkeit besteht darin, relevante von irrelevanten Kontaminanten im Sinne von Toxizität zu unterscheiden. Eine Flut an Meldungen von vermeintlich gefährlichen Verunreinigungen im Umweltbereich ist die Folge.

Die toxikologischen Untersuchungen von Gewässern erfolgt häufig durch Toxizitätstests mit Organismen. Eine Zuordnung der toxischen Wirkung auf individuelle Schadstoffe kann nur vereinzelt geschehen, zudem ist eine Konzentrationsangabe selten möglich und die Toxizität der Probe kann nur in Stoffäquivalenten angegeben werden.

Durch die Kombination von instrumentellen und biochemischen Verfahren wird eine neue Dimension der Umweltanalytik eröffnet, die so genannte Wirkungsbezogene Analytik. Die Wirkung einer Probe, wie beispielsweise die Toxizität, soll mit Informationen über die Einzelsubstanz, d.h. Struktur und Konzentration, verknüpft werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Entwicklung eines neuartigen analytischen Systems, das nicht nur chemisch-strukturelle oder quantitative Daten von individuellen Stoffen liefert, sondern gleichzeitig eine Gewichtung nach der toxischen Relevanz der Einzelstoffe ermöglicht. Nach einer chromatographischen Trennung wurde daher eine biochemische Detektionsstufe nachgeschaltet. Parallel dazu sollten die Daten konventioneller Detektoren wie Diodenarray und Massenspektrometer erfasst werden. Damit sollte die Möglichkeit gegeben werden, auch unbekannte Toxine anhand ihrer Inhibitionsdaten zu erkennen und gleichzeitig anhand ihrer physikochemischen Eigenschaften einer Stoffklasse zuzuordnen zu können.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Realisierung einer biochemischen Online-Detektion, die kontinuierlich nach einem chromatographischen Separationsschritt die eluierenden Verbindungen, die eventuell mit konventionellen Detektoren nicht erfasst werden können, anhand ihrer Wirkung anzeigt.

Als molekulare Zielorte einer toxischen Wirkung sollten Enzyme in den biochemischen Detektor integriert werden. Offline-Verfahren von Enzyminhibitionstest sollten daher auf eine Online-Durchführung umgestellt werden.

Um einen Nachweis für toxikologische Effekte führen zu können, deren Zielmoleküle noch nicht in den wirkungsbezogenen Detektor integriert wurden, sollten Leuchtakterien als Indikatoren für eine Gesamttoxizität in den wirkungsbezogenen Detektor eingebunden werden.

Der wirkungsbezogene Detektor dieser Arbeit sollte so konstruiert werden, dass eine Integration mehrerer toxischer Zielmoleküle möglich wäre, um eine parallele Erfassung multipler toxischer Effekte zu erlauben. Dabei sollten die hydromechanischen Komponenten mikrofluidische Dimensionen aufweisen, um den Reagenzienverbrauch und damit die laufenden Kosten der wirkungsbezogenen Detektion möglichst niedrig zu halten.

Die Leistung des wirkungsbezogenen Detektors hinsichtlich der Auflösung eines Chromatogramms sollte der konventioneller Detektoren der Chromatographie in nichts nachstehen. Verschiedene Reaktorbauweisen sollten daher untersucht werden, um bei einer möglichst stabilen Basislinie und einer möglichst geringen Analytdispersion eine nachweisstarke wirkungsbezogene Detektion zu erreichen.

Neben optischen Detektoren zur Erfassung von wirkungsbezogenen Reaktionen sollte auch die Möglichkeit einer massenspektrometrischen Detektion untersucht werden. Dazu sollten massenspektrometrische Nachweise von Enzymaktivitäten entwickelt werden, die bestmöglich eine parallele Messung mehrerer Enzymhemmungen mit einem Massenspektrometer erlauben.

Da einige Verbindungen erst durch Metabolisierung im Organismus ihre toxische Wirkung entwickeln und daher in einem Zielmolekül-basierenden Detektor nicht erfasst werden können, sollte in dieser Arbeit auch eine Möglichkeit zur Online-Derivatisierung in einem Vorsäulenschritt untersucht werden.

Insgesamt sollte mit dieser Arbeit ein Detektor konstruiert werden, mit dem nach einer chromatographischen Trennung online eine wirkungsbezogene Analyse parallel neben konventionellen Detektoren durchgeführt werden kann. Der theoretische Teil dieser Arbeit umfasst eine Literaturstudie zu bisher veröffentlichten Möglichkeiten von wirkungsbezogenen Analysen. Der Schwerpunkt wurde dabei auf eine wirkungsbezogene Detektion nach einer chromatographischen Trennung einer Probe gelegt.

Teil II

Theorie

1 Wirkungsbezogene Analytik

1.1 Konzept

Die heutige Herausforderung in der Ökotoxikologie [1] liegt darin, schnelle und kosteneffiziente Detektionsmethoden zu entwickeln, mit denen Umweltchemikalien erfasst werden können, die akut oder chronisch-toxische Effekte auf die ausgesetzten Organismen ausüben können.

Üblicherweise wird die toxische Exposition durch die Erfassung bekannter Schadstoffe in Umweltproben mit chemischer Analyse eingestuft. Der Fokus konzentriert sich dabei meist auf Substanzen, die in Labortests als hochgiftig erkannt wurden oder aber aufgrund ihres Produktionsvolumens besonders häufig vorkommen. Die Ökotoxizität kann durch individuelle Toxizitätsparameter, wie Bioverfügbarkeit und kombinierte Effekte modelliert werden [2].

Das Problem bei der toxikologischen Einstufung einer Probe liegt an den häufig geringen Konzentrationen der Verunreinigungen, deren Exposition aber oft chronisch ist. Zudem können vielfache toxische Auswirkungen von ein und derselben Verbindung ausgehen.

Ein weitere Herausforderung für die Analytik ist die große Vielfalt der freigesetzten Verbindungen. Dabei handelt es sich nicht nur um Industriechemikalien, sondern auch um Haushaltschemikalien und pharmazeutisch genutzte Verbindungen. Aufgrund der Vielfalt ist es unmöglich, eine toxikologische Risikoeinstufung einer Umweltprobe auf alle vorkommenden Verbindungen und deren Metaboliten basieren zu lassen.

Die Giftigkeit einzelner Substanzen oder ganzer Proben wird durch deren Effekte auf einzelne ausgewählte Organismen abgeschätzt. Dazu zählen Tod und Effekte auf Reproduktion und Wachstum. Gängige Testorganismen sind Fische, Algen, Pflanzen, Bakterien und wirbellose Tiere wie Wasserflöhe [3].

Nachteilig an den Toxizitätstests mit Organismen ist jedoch, dass sie nur eine spezifische Relevanz auf die eingesetzten Testorganismen haben, dass es keine Informationen auf die Identität des Schadstoffes gibt, und dass Summenparameter der Toxizität bestimmt werden.

Hier setzt das Konzept einer Wirkungsbezogenen Analyse (WBA) an [4]. Chemische Analyse und toxikologische Information werden sinnvoll kombiniert, um eine effektorientierte Schadstoffidentifizierung (*Effect-directed Analysis*, EDA) [5] zur Abschätzung der toxischen Gefährdung durch eine Probe zu erhalten. Die toxikologische Information kann dabei durch Biotests oder durch biomolekulare Erkennungsmechanismen erhalten werden, die mit instrumenteller Analytik verknüpft werden. In der Literatur wird dieser Ansatz unter anderem *Bioresponse-linked Instrumental Analysis* (BLIA) [6] genannt. EGGEN et al. sprechen von *Mechanism-based Bioanalytical Tools* (MBBT) [7].

Die toxikologische Erkennung auf molekularer Ebene hat Vorteile. Durch die biomolekulare Erkennung werden die Verbindungen nicht nur angezeigt, sondern sie können auch gleich je nach eingesetztem Indikatormolekül verschiedenen toxikologischen Mechanismen zugeordnet werden. Im Gegensatz zu Biotests mit Organismen können die Ergebnisse zeitnah gewonnen werden. Gerade für die Erfassung von chronischen Effekten ist es notwendig analytische Methoden zu haben, die in zumutbaren Zeitrahmen Ergebnisse liefern. Es ist daher sinnvoll, die Moleküle als Detektionseinheit zu verwenden, die für den Effekt eine Schlüsselrolle spielen.

Ein Überblick über die möglichen biologischen Zielmoleküle für eine Wirkungsbezogene Analyse ist in Tab. 1.1 gezeigt. Die gewählten Bindungspartner bzw. Reaktivitäten müssen über toxikologische Schlüsselprozesse des Organismus in umweltrelevantem Zusammenhang stehen.

Einfache biochemische Tests können die Komplexität des menschlichen Metabolismus zwar nicht simulieren, aber die Verbindungen, die durch diese Zielmoleküle erfasst werden, können einen Hinweis auf eine potentielle Gefährdung geben.

1.2 Strategien

Für die praktische Umsetzung einer WBA gibt es verschiedene Strategien. Die bioanalytische Erkennung kann vor oder nach einem physiko-chemischen Analysenschritt erfolgen, entweder in einem Offline-System oder technisch aufwendiger in einem Online-System.

Ein Überblick über biospezifische Detektionsmöglichkeiten in der Flüssigkeitschromatographie kann man sich in [8] verschaffen.

1.2.1 Vorsäulen-Ansatz

Eine Strategie der WBA ist es, vor einer chromatographischen Trennung die Proben auf ihre toxikologischen Effekte hin zu untersuchen. Bei diesem Vorsäulen-Ansatz werden die Proben meist grob anhand ihrer physikalischen Eigenschaften fraktioniert. Die toxikologische Effekte aufweisenden Fraktionen werden dann näher durch eine chemische Substanzanalyse untersucht.

Im Folgenden werden einige Beispiele aus der Literatur für diesen Ansatz der WBA gegeben.

Abflüsse von Kläranlagen wurden nach Anreicherung und Aufreinigung mit Größenausschlusschromatographie fraktioniert und auf östrogen aktive Substanzen untersucht, indem ein Screening mit rekombinanten Hefezellen, die den humanen Östrogenrezeptor zeigten, angewendet wurde [9]. Anschließend wurden die Verbindungen der aktiven Fraktionen mit LC-ESI-MS-MS identifiziert. Die Hefezellen enthielten in ihrem Genom DNA-Sequenzen des humanen Östrogenrezeptors (hER- α). Durch eine Bindung von Liganden an den Rezeptor wird als Antwort nach einigen Signaltransduktionsschritten das Enzym β -Galactosidase synthetisiert und in das Zellmedium abgegeben, wo es durch Umsatz eines Substrats zu einer messbaren Farbentwicklung kommt [10].

Tabelle 1.1: Biomolekulare Erkennungselemente für einen Einsatz in der Wirkungsbezogenen Analyse mit humaner Relevanz nach [6]

| Target | Beispiel | Biologische Funktion | Wechselwirkende Substanzen | Effekt |
|-------------------|---|-------------------------|--|-------------------------------------|
| Enzyme | Acetylcholinesterase | Synapsen | Organophosphate, Carbamate | Neurotoxizität |
| | Kinasen, Phosphatasen | Signalübermittlung | Chemotherapeutika, Tumormotoren, Immunosuppressiva | Wachstum, Entwicklung |
| | Proteinphosphatase 1 und 2A | Leberzellen | Microcystine | Hepatotoxizität |
| Ionenkanäle | Cytochromoxidase | Zellatmung | CN ⁻ , N ³⁻ | Zellatmung, Zelltoxizität |
| | Ca ²⁺ -Kanal, Na ⁺ -Kanal | Synapsen | Algentoxine | Neurotoxizität |
| Transportproteine | Hormonbindende Globuline | Hormontransport in Blut | Endokrine Disruptoren | Wachstum, Entwicklung, Reproduktion |
| Rezeptoren | Östrogen-, Androgenrezeptoren | Zellkern | Endokrine Disruptoren | Wachstum, Entwicklung, Reproduktion |
| | Nikotinischer Acetylcholinrezeptor | Synapsen | Anatoxin (Agonist des Rezeptors) | Neurotoxizität |
| DNA | DNA-Doppelstrang | Chromosomen | Intercalierende polyzyklische Aromaten | Genotoxizität |
| Cytoskelett | Tubulin | Zellteilung | Colchicin, Taxol | Zelltoxizität |
| | Ribosome | rRNA | Ribotoxine | Zelltoxizität |

Endokrine Disruptoren wie Östrogene und Xenöstrogene wurden mit einem *Enzyme-linked Receptor-Assay* detektiert [11], dessen Messprinzip ähnlich der ELISA-Methode ist. Die strukturelle Identifizierung der Steroide wurde bei den positiv getesteten Proben anschließend an eine Festphasenanreicherung mittels LC-MS durchgeführt.

Eine andere Strategie verfolgt eine Affinitätsanreicherung der Schadstoffe an immobilisierten Zielmolekülen mit biologischer Wirkung und anschließend eine instrumentelle Analyse zur Identifizierung der zurückgehaltenen Substanzen [12]. Die Anreicherung erfolgt ähnlich zu immunchromatographischen Methoden [13], aber nicht mit Antikörpern, sondern z.B. mit Rezeptoren oder anderen Zielmolekülen (siehe Tab. 1.1). Da sich die Affinität von Antikörpern nur auf die chemische Struktur und nicht auf etwaige biologische Effekte bezieht, können Antikörper nicht für eine WBA herangezogen werden. Die Strategie der Anreicherung verfolgt eine Vereinfachung der Probenmatrix vor der instrumentellen Analyse, die sich dann nur auf die angereicherten Analyten beziehen muss. Nachteilig an diesem Verfahren ist eine schwierige Parallelisierung, um mehrere toxikologische Mechanismen mitsamt Zielmolekülen implementieren zu können.

Toxische Auswirkungen von Umweltchemikalien können aus einem Cytochrom-P450-Stoffwechsel herrühren. Ein kontinuierlich arbeitender Cytochrom-P450-Reaktor zur Online-Generierung von Metaboliten wurde an eine automatisierte Festphasenanreicherung mit anschließender HPLC-Trennung gekoppelt [14]. Die im Bioreaktor metabolisierten Proben konnten anschließend angereichert und chromatographiert werden. Dies ist ein neuartiges Konzept für eine rasche Untersuchung von Stoffwechselprodukten. Vorstellbar wäre es, diesen Vorsäulenreaktor mit einem Nachsäulenansatz der WBA zu kombinieren, um so Ergebnisse bezüglich der toxischen Effekte der metabolisierten Verbindungen zu erhalten.

1.2.2 Nachsäulen-Ansatz

Eine andere Strategie der WBA beruht auf biomolekularer Erkennung nach einer chromatographischen Trennung. Diese Strategie hat den Vorteil, dass der chromatographische Schritt im Allgemeinen auch eine Probenaufreinigung beinhaltet und so Matrixeffekte reduziert. Dadurch wird die Reproduzierbarkeit der biochemischen Tests verbessert, die aufgrund von störenden Matrixeinflüssen als fragwürdige analytische Instrumente bezeichnet wurden [15].

Die analytischen Anwendungen von Biosensoren, die auf Enzyminhibition basieren [16] und allein ohne Kopplung an chromatographische Methoden eingesetzt werden, sind begrenzt. Es kann nicht zwischen verschiedenen Schadstoffen in derselben Probe unterschieden werden. So sprechen Biosensoren teilweise auf Schwermetalle und Pestizide an. Diese Probleme tauchen in einem Einsatz nach einer chromatographischen Trennung nicht oder nur sehr vermindert auf.

Bei der Kombination von Biosensoren mit einem Separationsschritt trifft man aber auf andere Hindernisse. Zum einen muss das biologische Material während des Trennungsvorgangs erneuert und reproduzierbar eingesetzt werden können, um eine eventuelle Steigerung oder Abschwächung der Detektionsstärke zu verhindern. Des Weiteren muss das Volumen des Eluats und auch das Trennmedium mit dem des biosensorischen Nachweises kompatibel sein [17].

Die Forschung im Bereich der Biosensorik bewegt sich demnach auch in Richtung der Mikro- bzw. Nanosensorik, d.h. in die Integration von Nanotechnologie, Mikrofluidik und bioanalytischen Messsystemen [18].

Offline-Detektion

Eine Möglichkeit von offline durchgeführten biochemischen Tests besteht darin, nur die Fraktionen einer chromatographischen Trennung, bei denen z.B. ein UV-Signal detektiert wurde, auf biologische Aktivität zu testen [3]. Besser ist es jedoch, das ganze Chromatogramm anhand konstanter Zeitintervalle zu fraktionieren, bioanalytisch zu testen und anschließend relativ zur Retentionszeit zu bioaktiven Chromatogrammen zusammensetzen [19, 20, 21]. Dies hat den Vorteil, dass Verbindungen, die nicht mit den konventionellen Detektoren erfassbar sind, nicht übersehen werden.

Wiederholtes Fraktionieren und bioanalytisches Testen der Fraktionen wird vor allem in der Abwasseranalytik mit komplexen Substanzgemischen in einer toxizitätsgeleiteten Analyse durchgeführt [19]. Unter dem Begriff *Toxicity Identification Evaluation* (TIE) gibt die amerikanische Umweltbehörde (US-EPA) Vorschläge für eine Versuchsdurchführung speziell für organische und anorganische Schadstoffe in wässrigen Proben. Treten bei einer Probe schädliche Wirkungen auf, so findet in einem ersten Schritt indirekte Fraktionierung statt, bei der schrittweise verschiedene Schadstoffgruppen entfernt werden und anschließend wieder ihre biologische Wirkung, meist mit Organismen, getestet wird. Eine Reduzierung der Wirkung lässt darauf schließen, dass die entfernte Schadstoffgruppe Ursache für einen Teil der Wirkung war. Weitere Fraktionierungen geschehen dann direkt durch die Kombination verschiedener chromatographischer Methoden. Toxizitätsorientierte Abwasseranalyse besteht demnach aus Extraktion, Fraktionierung, Toxizitätstest, Identifizierung und Bestätigung der Ergebnisse [19].

In der Offline-Detektion der WBA kommen häufig Mikrotiterplattentests mit fraktioniertem HPLC-Eluat zum Einsatz. Nach einer RP-HPLC wurde von NIELSEN et al. [20] ein Östrogenrezeptor-Bioassay durchgeführt, indem die Probe auf eine Mikrotiterplatte fraktioniert und prozessiert wurde. Dazu musste das fraktionierte Eluat auf einem rekombinanten Hefestamm, der humanen Östrogenrezeptor α (hER α) exprimiert, für mehrere Stunden inkubiert werden. In Anwesenheit von Östrogenen produzierten die mit Probenlösung inkubierten Hefezellen ein autofluoreszierendes Protein. Die Entwicklung des Fluoreszenzsignals wurde detektiert [22]. Ein Zusammensetzen der Fluoreszenzsignale relativ zur Retentionszeit der Fraktionen lieferte ein sogenanntes Biogramm mit einer Zeitauflösung von 20 s.

Ein ähnlicher Bioassay basierend auf einem Hefetest mit Androgen-Rezeptoren wurde entwickelt, um Designer-Steroide in Dopingproben nachweisen zu können [23]. Mit Steroiden versetzte Urinproben wurden mit HPLC getrennt und das Eluat parallel in zwei Mikrotiterplatten fraktioniert. In einer Platte wurde durch Inkubation mit den Hefezellen ein Biogramm nach Zusammensetzen der Fraktionen entsprechend der Retentionszeit aufgenommen. Die androgenwirkenden Fraktionen wurden durch massenspektrometrische Detektion der zugehörigen Proben der parallel fraktionierten zweiten Platte mit Feinmassenbestimmung

identifiziert. Ein Nachteil des Bioassays mit rekombinanten Hefezellen ist, dass die Ergebnisse erst nach mehrstündigen Inkubationszeiten gewonnen werden können. Eine verkürzte Analysenzeit wäre vor allem hinsichtlich der Dopingkontrollen wünschenswert.

Weitere Techniken, um die Ligand-Rezeptorbindungen schneller auf molekularer Ebene zu detektieren, bieten die Messung einer Fluoreszenzresonanzenergie oder Fluoreszenzpolarisation, die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie oder die Oberflächen-Plasmonenresonanz-Technik [24].

Eine weitere Kopplung von chemischer Separation mit wirkungsbezogener Detektion stellt die Verbindung von Dünnschichtchromatographie mit anschließendem Mutagenitätstest dar. Ein Bioassay zum Testen der Mutagenität wurde 1973 von AMES [25] entwickelt. Der sogenannte AMES-Test erlaubt es, mit einem besonderen Bakterienstamm von *Salmonella typhimurium*, der Histidin nicht synthetisieren kann, Chemikalien auf ihre mutagene Wirkung zu testen. Durch Rückmutation, die von schädigenden Chemikalien ausgelöst wird, können die Bakterien wieder Histidin produzieren und Kolonien bilden. Üblicherweise werden nur UV-aktive Fraktionen des HPLC-Eluats im AMES-Test getestet. Dies ist eine sehr zeitaufwendige und ineffiziente Methode. Indem die chromatographische Trennung mit Dünnschichtplatten vorgenommen wurde, die anschließend mit Agar und AMES-Bakterienstamm belegt wurden, konnten mit weniger Aufwand Ergebnisse erzielt werden. Flächen mit Bakterienwachstum lassen auf Mutagenese schließen und werden entfernt für eine weitere chemische Analyse [26, 27].

Ein weiterer Offline-Assay wurde ebenfalls mit Dünnschichtchromatographie und anschließendem biochemischen Test direkt auf der Platte durchgeführt [28]. Nach der chromatographischen Trennung wurden die Platten getrocknet und anschließend entweder in eine Lösung von Acetylcholinesterase oder einer Kultur von *Photobacterium fischeri* getaucht. Die Platte wurde für 30 min inkubiert. Im Fall des Inhibitionstests auf Acetylcholinesterase wurde die Platte anschließend in eine Substratlösung getaucht und nach dreiminütiger Entwicklungszeit die Inhibitionspunkte als Flecken detektiert. Nach der Inkubation mit Leucht-bakterienlösung konnte direkt die Photonenemission verglichen werden.

Sehr effizient wäre es, in einer Wirkungsbezogenen Analyse verschiedene Effekte parallel durch zeitgleiches Testen verschiedener Targets zu detektieren. Eine multidimensionale biochemische Detektion von Microcystinen wurde von ZECK et al. [21] beschrieben. Nach einer Umkehrphasen-HPLC mit automatischer Fraktionierung des Eluats auf eine Mikrotiterplatte wurden cyanobakterielle Microcystine und Nodularin mit einem offline durchgeführten Proteinphosphataseinhibitionstest erfasst. Parallel zur Detektion der UV-Absorption konnte anhand der Enzymaktivität ein sogenanntes Enzymogramm erstellt werden. Für eine nachweisstarke Quantifizierung und strukturelle Charakterisierung wurden zusätzlich parallel zum Enzymtest eine Immunodetektion der Microcystine mit ELISA unter Verwendung von drei verschiedenen monoklonalen Antikörpern mit unterschiedlicher Affinität durchgeführt. Aktive Fraktionen wurden mit einem ESI-TOF-MS näher untersucht.

Online-Detektion

Technisch aufwendiger aber schneller ist eine online durchgeführte biochemische Detektion nach der chromatographischen Trennung. Im Folgenden werden einige der bisher veröffentlichten Methoden zur Online-Kopplung von chemischer Trennung und biochemischer Detektion vorgestellt.

Biomolekulare Erkennung nach GC Eines der frühesten Beispiele der Online-Kombination einer chemischen Trennung mit einem bioanalytischen Detektor war die Entwicklung der Gaschromatographie/Olfaktometrie (GCO). Die Anwendungsbereiche der GCO sind heute sehr vielseitig [17]. Mit dem GCO-System wurde die Detektion einiger aromaaktiver Verbindungen mit einer Nachweisgrenze weit unterhalb von konventionellen Detektoren möglich. Nachteile der GCO liegen in den Kosten und dem Trainingsaufwand eines menschlichen Detektors. Die Exposition des Menschen zu Chemikalien und psychophysikalische Messabweichungen wirken sich ebenfalls negativ aus. Biochemische Detektionsmöglichkeiten ohne den Einsatz von Menschen sind daher zu bevorzugen.

Ein Schritt in diese Richtung war der Einsatz von Insektenantennen zur Detektion von physiologisch aktiven Verbindungen aus komplexen Mischungen nach einer gaschromatographischen Trennung von MOORHOUSE et al. 1969 [29]. Bei der Gaschromatographie/Elektroantennographie (EAG) ist das Signal der Insektenantennen durch zwei extrazelluläre Elektroden erfasst worden, zwischen die die Insektenantenne gespannt wurde. Das mit einem konventionellen Flammenionisationsdetektor (FID) gewonnene Signal wurde mit dem EAG-Signal korreliert. MOORHOUSE et al. konnten mit GC/EAG Pheromone von weiblichen Motten wirkungsbezogen detektieren. Der Einsatz von männlichen und weiblichen Insektenantennen lieferte unterschiedliche Messergebnisse. In neueren Ansätzen ist die Insektenantenne direkt mit einem Feldeffekttransistor gekoppelt, um die Ableitung der Signale von der Insektenantenne zu verbessern und dadurch die mechanische und elektrische Stabilität des Biosensors zu erhöhen [30]. Die Antwortzeit des Detektorsignals ist mit drei Sekunden relativ lang [29]. Die Auflösung des resultierenden Elektroantennogramms wird also durch den Detektor und nicht durch die chromatographische Auflösung limitiert.

Eine Steigerung der Sensitivität und Selektivität konnte durch die Kopplung von GC mit einzelnen Zellen aus Insektenantennen erreicht werden [17, 31].

Biomolekulare Erkennung nach CE Ganze Zellen als Detektoren nach Trennung von Analyten durch Kapillarelektrophorese wurde von der Gruppe um ZARE [32] entwickelt. Die Kapillarelektrophorese ist besonders geeignet für Biosensoren mit einzelnen Zellen aufgrund des Probenvolumens von Nano- bis Picolitern und der physiologischen Kompatibilität des Trennpuffers und des Zellpuffers. Die Detektion von Rezeptorbindungen erfolgte mit einem Fluoreszenzindikator über ein Mikroskopobjektiv. Um den Verlust der Rezeptorantwort und einer damit einhergehenden Desensibilisierung der Messung zu entgehen, wurde von FISHMAN et al. [32] ein ganzer Array an immobilisierten Zellen unterhalb des CE-Auslasses abgefahren. Die Zellen waren räumlich nicht völlig getrennt in einem 500 mL Volumen immobilisiert. Die CE-Fraktionen waren jeweils jedoch nur so klein, dass

nur die unmittelbar zum CE-Auslass benachbarten Zellen durch die eluierenden Analyten beeinflusst wurden.

Eine weitere Kopplungstechnik ist die Kombination von Kapillarelektrophorese mit der *Patch-Clamp*-Technik (PC), mit der die Aktivität einzelner Ionenkanäle gemessen werden kann. Die PC-Technik wurde 1976 von NEHER und SAKMANN entwickelt [33]. Durch Messung der Kinetik, Desensibilisierungsrate und Öffnen bzw. Schließen von Ionenkanälen können detaillierte Informationen über die Aktivierung von Rezeptoren an der Oberfläche einer im PC-Aufbau immobilisierten Zelle erhalten werden. Die Detektion der Rezeptorbindung erfährt durch die Erfassung des Ionenstroms, der durch die Ionenkanäle fließt, eine biologische Verstärkung. Da Rezeptorsysteme oftmals durch eine Vielzahl an strukturell ähnlichen Agonisten aktiviert werden können, kann eine selektive Information nur durch eine sequentielle Applikation der möglichen Liganden auf die Rezeptoren erhalten werden, wie es bei der Kopplung von CE und PC der Fall ist.

Ein Screening von natürlichen und synthetischen Rezeptorantagonisten konnte durch ein CE/PC-System demonstriert werden [34]. Der Laufpuffer der CE enthielt einen Agonisten für einen speziellen Rezeptor, der dadurch dauerhaft aktiviert wurde. In der Gegenwart eines Antagonisten, der elektrophoretisch aus einem Gemisch getrennt wurde, konnte entsprechend der Inhibition eines Ionenkanals ein negativer Ausschlag des Messstroms erfasst werden. Ein Nachteil der Patch-Clamp-Technik ist jedoch die kurze Haltbarkeit der Messeinheit von 20-30 min [17].

Neben der Durchgängigkeit von Ionenkanälen werden auch Enzymaktivitäten nach CE als biomolekulare Detektionseinheit verwendet. Eine elektrophoretische Separation von vier Analyten durch Detektion der Enzyminhibition wurde mit Acetylcholinesterase gezeigt [35]. Die Trennung und Detektion erfolgte auf einem mikrofluidischen Chip mit Computer-gesteuertem elektrokinetischen Flüssigkeitstransport.

Biomolekulare Erkennung nach LC Verschiedene biochemische Detektionseinheiten gekoppelt an Flüssigkeitschromatographie wurden in der Literatur beschrieben. Häufig werden Rezeptorassays und Enzyminhibitionstests mit HPLC gekoppelt. Aufgrund der Bedeutung dieser Detektionssysteme für eine Wirkungsbezogene Analyse, wird auf sie im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

Nicht nur nach HPLC, sondern auch nach einer Größenausschlusschromatographie (*Size-exclusion Chromatography*, SEC) wurde ein Enzyminhibitionstest gekoppelt. Inhibitoren der Protease Subtilisin wurden durch SEC getrennt und die Enzyminhibition anschließend online in einem homogenen Aktivitätstest mit einem FRET-Substrat detektiert [36]. Das Fluorophor 5-[(2-Aminomethyl)amino]-naphthalen-1-sulfonsäure (EDANS) als Donor und die nicht fluoreszierende 4-(4-Dimethylaminophenyl-azo)benzoesäure (DABCYL) als Akzeptor wurden an das HIV-Protease-Substrat I gebunden. Die Trennung eines Proteingemisches erfolgte mit einer Flussrate von 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ an einer Größenausschluss säule mit anschließender UV-Detektion. Zu diesem Fluss wurde Enzymlösung und Substratlösung mit jeweils 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ mit *Superloops* zudosiert. Als *Superloops* werden Kunststoffschläuche mit geringem Totvolumen bezeichnet, die zwischen Pumpen und Zufluss zur Reaktorschleife eingebaut wurden. Die *Superloops* vermeiden die un-

spezifische Bindung der Biomoleküle an die Oberflächen der Pumpe und reduzieren den Verbrauch an teuren Chemikalien, die nur mit der notwendigen Menge eingesetzt werden müssen. Die Inhibition und der Substratumsatz wurden innerhalb von drei Minuten in gestrickten Teflonschläuchen durchgeführt. Bei von der Säule eluierenden Inhibitoren, wie z.B. Aprotinin, wurde das Substrat nicht gespalten. Aufgrund des Übergangs der Anregungsenergie vom Donor auf das Akzeptormolekül wurde dann jeweils eine Reduktion des Fluoreszenzsignals im Enzyminhibitionsdetektor erfasst.

Neben einer Enzyminhibition wurden auch ganzes Zellgewebe und Mikroben mit Kohlenstoffpaste auf Elektroden immobilisiert und als Detektor nach einer LC eingesetzt [37]. Spezifische Enzyme im Gewebe und den Mikroben konnten Substrate, denen das Interesse galt, umsetzen. Die Antwortzeit betrug jedoch ~ 30 s und war damit relativ lang. Der Vorteil ist natürlich die andauernde Produktion und Stabilisierung der Enzyme im Gewebe. In einem parallelisierten Aufbau konnte eine mehrdimensionale Messung durchgeführt werden, indem Zellgewebe aus Bananen, Hefe und Pilzen an eine chromatographische Trennung gekoppelt wurde. Mit diesem System wurden amperometrisch biogene Amine, primäre Alkohole und Monophenole in komplexen Mischungen nebeneinander bestimmt.

1.3 Wirkungsbezogene Online-Detektionsmöglichkeiten in der HPLC

Verschiedene Möglichkeiten Online-Systeme für die WBA zu realisieren finden sich in der Literatur. Der Schwerpunkt wird im Folgenden auf die Kombination von HPLC und Rezeptorbindungsassays bzw. Enzyminhibitionstests gelegt.

1.3.1 Rezeptoren

Verschiedene Beispiele von Rezeptor-Ligand-Bindungsassays werden von DE JONG et al. [24] aufgeführt. Um die Rezeptor-Ligand-Bindung erfassen zu können, muss mindestens ein Bindungspartner markiert werden. Radioisotopen-Markierung hat dabei den Vorteil, dass die Markierung keine Auswirkung auf die Affinität des Liganden zum Rezeptor hat. Ein Nachteil ist, neben dem entstehenden radioaktiven Abfall und der gesundheitlichen Gefährdung des Anwenders, die lange Auslesezeit für die Assays im Vergleich zu Fluoreszenzassays. Die Radioaktivitätsmessung benötigt für 10 000 counts eine Messzeit von ca. 25 min, die Fluoreszenzmessung benötigt hingegen weniger als 50 ms.

Für eine Online-Detektion sind vor allem homogene Rezeptor-Ligand-Bindungsassays von Vorteil, die keine Abtrennung von freien und gebundenen Liganden benötigen. Dazu werden Markierungstechniken wie FP, FRET und FCS angewendet [24].

Ein wichtiger Vorteil von Membranrezeptorassays gegenüber von Antikörperbindungsassays ist der, dass Chemikalienklassen von physiologischer, pharmakologischer und toxikologischer Bedeutung erkannt werden können. Weil ein Rezeptorsystem oftmals von einer Vielzahl strukturell verwandter, endogener Agonisten

aktiviert wird, können mit dem Einsatz von Membranrezeptoren klassenspezifische biosensorische Detektionssysteme aufgebaut werden [17].

Ein Detektionsprinzip ist die Konkurrenz von Analyt und zugesetztem markiertem Ligand des biomolekularen Targets. Das Detektionssignal wird durch Abtrennen von freiem und gebundenem Ligand erzeugt. Das Abtrennen kann geschehen durch *Restricted-Access-Materialien* [38], Rezeptor-Affinitätssäulen [39] oder einem Hohlfaser-Modul [40].

Östrogen-aktive Verbindungen in Urinproben [41] und im Extrakt von Granatapfel [38] wurden nach einer chromatographischen Trennung mit einem β -Östrogen-Assay in einem biochemischen Detektor erfasst. Chemische Informationen wie Molekulargewicht und MS/MS-Fingerprints wurden durch parallele MS-Detektion gewonnen [38]. Drei östrogen wirkende Verbindungen konnten in einem Lauf detektiert und mit APCI⁻-MS/MS-Spektren anhand eines Vergleichs mit Datenbanken identifiziert werden. Ein rekombinanter humaner β -Östrogenrezeptor und eine Lösung des natürlichen autofluoreszierenden Liganden Coumestrol wurden zum HPLC-Eluat zugesetzt. Die Inkubationszeit zwischen Rezeptor und Analyt betrug 40 s, die verbliebenen freien Rezeptorbindungsstellen wurden durch Zugabe von Ligandenlösung in weiteren 40 s Reaktionszeit titriert. Die Bindung an den Rezeptor verstärkte die Fluoreszenz von Coumestrol. Eluierte ein Ligand von der analytischen Säule, so wurde die Fluoreszenz temporär reduziert und im Biogramm ein negativer Signalausgang aufgezeichnet. Eine *Restricted Access*-Säule (RA-Säule) wurde vor den Fluoreszenzdetektor (340 nm/410 nm) installiert, um den Signalhintergrund durch Autofluoreszenz von ungebundenem Coumestrol zu reduzieren, damit die Sensitivität des biochemischen Detektors erhöht wurde.

OOSTERKAMP et al. [39] entwickelten einen Rezeptor-Ligand-Bindungsassay für die Analyse von Urokinase und dazu kreuzreaktiven Verbindungen. Ein Fluorescein-markierter Urokinaserezeptor wurde kontinuierlich zum Eluat einer Umkehrphasenchromatographie zugesetzt, um mit potentiellen Liganden zu reagieren, die von der Trennsäule eluierten. Nach einer Reaktionszeit von 60 s wurden die ungebundenen Urokinaserezeptoren an einer Affinitätssäule mit immobilisierter Urokinase entfernt, während der Rezeptor-Ligand-Komplex die Säule ungehindert passierte und mit einem Fluoreszenzdetektor detektiert wurde. Die Schwierigkeit beim Markieren der Rezeptoren besteht darin, idealerweise nur ein Markierungsmolekül pro Rezeptor zu haben, um die Affinität zum Liganden nicht zu beeinträchtigen. Der Durchbruch von unverbrauchtem, markiertem Rezeptor zum Fluoreszenzdetektor war ein Problem dieses Systems, wenn bei langen chromatographischen Läufen die Affinitätssäule gesättigt war. Zwischen den Läufen war jeweils ein Regenerationsschritt notwendig.

Eine weitere Methode zum Abtrennen von freiem und gebundenem Ligand wurde mit *Free-flow Electrophoresis* (FFE) durchgeführt [42]. Anschließend erfolgte die Detektion der getrennten Fraktionen beispielsweise durch Fluoreszenzdetektion. Dieser Ansatz wurde mit Biotin und Streptavidin als Modellverbindungen für Ligand- und Rezeptorproteine auch online an HPLC gekoppelt. Zur Quantifizierung wurde mit Fluorescein markiertes Biotin zugegeben, um mit freiem Streptavidin einen Komplex zu bilden. Mittels FFE wurde der Komplex aus Streptavidin und markiertem Biotin abgetrennt und detektiert. Der Aufwand einer optimierten Separation der gebundenen und freien Liganden ist relativ groß, da die Puffer

des biochemischen Detektors und der mobilen Phase zusätzlich auf die elektrophoretische Trennung optimiert werden mussten.

Ein Rezeptor-Ligand-Bindungsassay ohne die Abtrennung von freien Liganden wurde mit Instrumenten der Durchflusszytometrie gezeigt [43]. Als Modellsystem wurde hier eine immunologische Detektion von Digoxin mit anti-Digoxigenin-Fab-Fragmenten, die mit Fluorescein markiert waren, durchgeführt. Eine Übertragung der Methode auf wirkungsbezogene Rezeptor-Ligand-Bindungsassays ist sicherlich möglich. Zum Säuleneluat einer chromatographischen Trennung von Digoxin, Digoxigenin und Gitoxigenin wurden simultan Kügelchen mit gebundenem Digoxin und fluoreszenzmarkierten Fab-Fragmenten hinzugegeben und für eine Reaktionszeit von 2–3 min durch gestrickte PTFE-Schläuche gepumpt. Die Bindung von Fab-Fragmenten an das Digoxin der Kügelchen erzeugte ein konstantes Fluoreszenzsignal als Basislinie. Das Fluoreszenzsignal wurde mit einem konventionellen Durchflusszytometer detektiert. Von der Säule eluierende potentielle Liganden der Fab-Fragmente reduzierten die Fluoreszenz. Die detektierte Streufluoreszenz der Kügelchen wurde mathematisch geglättet und Bindungschromatogramme konnten gewonnen werden. Ein Zugewinn dieses Verfahrens zur biochemischen Detektion von Ligand-Rezeptor-Bindung ist die Möglichkeit, in einer Reaktionskapillare durch verschiedene Markierungsmoleküle mehrere homogene Assays gleichzeitig durchzuführen.

1.3.2 Enzyme

Sehr häufig werden Enzyme in Biosensoren verwendet, die nach einer chemischen Trennung als Detektoren eingesetzt werden [17]. Meist haben die Biosensoren aber wenig mit einer wirkungsbezogenen Detektion zu tun, da nicht eine Enzyminhibition, sondern das Screening nach Substraten im Vordergrund steht. Die Enzyme werden entweder direkt auf der Elektrodenoberfläche immobilisiert, oder aber in einem Enzymreaktor (*Immobilized Enzyme Reactor*, IMER) eingebettet. Diese werden aber eher als Bioreaktoren, als als Biosensoren klassifiziert, da der biologische Transducer separat vom physikalischen Transducer auftaucht [8].

Enzyme sind durch ihre Vielfalt an Wechselwirkungen und ihre Selektivität sehr gut geeignet, um verschiedene chemische Stoffklassen zu analysieren. Bei der Verwendung von Enzymen als biochemische Detektionseinheit sind Trenneffizienz und Enzymspezifität die Parameter, um ein optimiertes Analysensystem aufzubauen. Bei einer hohen chromatographischen Trenneffizienz kann die Enzymselektivität breiter sein, um verschiedene Analyten enzymatisch erfassen zu können. Da ein Enzym viele Substratmoleküle umsetzen kann, gibt es eine gute Signalverstärkung.

Prinzipiell können zwei Reaktionstypen der Enzyminhibition gekoppelt an ein HPLC-System unterschieden werden. Zum einen kann die Enzyminhibition heterogen mit an Oberflächen immobilisierten Enzymen durchgeführt werden, zum anderen kann die Nachsäulenreaktion homogen erfolgen.

HPLC mit IMER Eine Möglichkeit der Durchführung einer Enzyminhibition als Nachsäulenreaktion besteht in der Implementierung eines IMER. Ein Überblick über die Anwendung von IMERs wird in [44] gegeben.

Das Enzym der Wahl wird auf einem Sorbens immobilisiert und in eine Säule oder Kartusche gepackt. Substratlösung wird kontinuierlich über den IMER gepumpt. Der Kontakt zwischen Substrat und aktivem Enzym führt zu einer Umsetzung, die als konstante Basislinie detektiert werden kann. Eluieren Inhibitoren von der chromatographischen Trennsäule und gelangen dann in den IMER, führt dies durch die Verringerung der Enzymaktivität zu einem Rückgang des Signals, da der Substratumsatz geringer ausfällt.

Ein Vorteil der IMER ist, dass sie physikalisch aus dem System heraus genommen und ersetzt werden können. Außerdem sind sie relativ stabil und wiederverwendbar. Des Weiteren können im Nachsäulensystem Pumpen zur Beförderung von Enzymlösung eingespart und Reagenzien sparsamer eingesetzt werden.

Die Nachteile der IMER liegen in der Enzymkinetik. Gerade bei kompetitiven Inhibitoren hängt die Inhibitionskinetik auch von der Substratkonzentration ab. Bei einem IMER müssen die inhibierten Enzyme regelmäßig regeneriert werden, um gleichbleibende Verhältnisse der Enzymkinetik zu erhalten. Die Regenerierung geschieht oftmals durch Reagenzlösungen (z.B. Oxime für phosphorylierte AChE, siehe auch Abb. 1.4). Alternativ kann auch das gesamte Trägermaterial mit dem Enzym ausgetauscht werden.

Ein automatischer Austausch des Trägermaterials aus einem Enzymreaktor einer Fließinjektionsanalyse konnte durch Immobilisierung des Enzyms auf magnetischen Partikeln durchgeführt werden [45]. Die Partikel wurden in einem permanentmagnetischen Reaktor festgehalten. Das Aufheben des permanenten Magnetfeldes ermöglicht, dass die Partikel mit dem immobilisierten Enzym herausgespült und durch neue ersetzt werden konnten. Acetylcholinesterase wurde auf magnetischen Partikeln immobilisiert und die Enzymaktivität in einer Fließinjektionsanalyse colorimetrisch und elektrochemisch bestimmt [45]. Eine Anwendung dieses Reaktors direkt nach einer chromatographischen Trennung wurde jedoch nicht gezeigt.

Ein Nachsäulenreaktionsdetektor für die Analyse von Organophosphat- und Carbamatpestiziden wurde mit immobilisierter Acetylcholinesterase beschrieben [46]. Die AChE war im IMER auf Glaskügelchen immobilisiert. Mit einem isokratischen Lauf mit 50% Tetrahydrofuran und 50% Wasser konnten exemplarisch zwei Organophosphate und zwei Carbamate getrennt und durch die Enzyminhibition detektiert werden.

HPLC mit homogenem Enzymreaktor Im homogenen Nachsäulenreaktor werden Enzym- und Substratlösung kontinuierlich zur mobilen Phase gepumpt. Eine angemessene Verdünnung des Eluats ist in den meisten Fällen notwendig, um eine Deaktivierung des Enzyms durch die mobile Phase zu vermeiden.

Ein homogener Aktivitätstest von Acetylcholinesterase wurde nach einer HPLC mit paralleler Detektion von Massenspektren und UV-Absorption durchgeführt [47, 48]. Der Substratumsatz wurde in [47] mit Acetylthiocholiniodid und Dithionitrobenzoesäure colorimetrisch nach einer Methode von ELLMAN [49] durchgeführt (siehe Abb. 1.7). Inhibitorische Effekte von eluierenden Analyten wurden nach einer Reaktionszeit von ungefähr zwei Minuten in Polymerschläuchen durch negative Signalausschläge erfasst. Die Analyse eines Naturstoffextrakts zeigte im Enzymogramm sehr breite Inhibitionsbanden und eine verrauschte Basislinie des

Aktivitätssignals. Die Bandenverbreiterung wurde als Hauptproblem benannt, die reduziert werden müsste, um die Sensitivität des biochemischen Detektors zu erhöhen.

Hemmende Wirkungen von Pflanzenextrakten auf Acetylcholinesterase aus Zitronenbitter wurde von RHEE et al. [50] mit einer Fließinjektionsanalyse mit fluorimetrischer Detektion der Enzymaktivität durchgeführt. Als Substrat wurde 7-Acetoxy-1-methyl-choliniumiodid verwendet, welches durch Hydrolyse zu einem stark fluoreszierendem Produkt umgesetzt wurde. Das System wurde auch an eine präparative HPLC mit einer parallelen massenspektrometrischen Detektion gekoppelt [48], um die aktiven Substanzen identifizieren zu können. Enzym- und Substratlösung wurden bei diesem Aufbau kurz hintereinander zum Eluat der HPLC gegeben. Die Detektion der Enzymaktivität erfolgte nach einer Reaktionszeit von 2.5 min.

Ein fluorimetrischer Aktivitätsnachweis von Acetylcholinesterase in einem luftsegmentierten Nachsäulenreaktor wurde von MOYE und WADE schon 1976 vorgestellt [51], um einen im Vergleich zu UV-Absorptionsmessungen empfindlicheren Nachweis von Carbamaten zu erhalten, die mit HPLC getrennt wurden. Als Substrat wurde N-Methylindoxylacetat verwendet. Die Acetylcholinesterase wurde unter anderem aus Stubenfliegenköpfen isoliert. Die Reaktionszeit betrug ungefähr 4 min.

Eine Online-Detektion der Aktivität von Phosphat-verbrauchenden oder Phosphat-freisetzenden Enzymen nach einer chromatographischen Trennung wurde von SCHENK et al. [52] anhand des Einsatzes von alkalischer Phosphatase demonstriert. Der Assay basierte auf der Detektion von anorganischem Phosphat, welches beim Substratumsatz durch das aktive Enzym freigesetzt wurde. Ein fluoreszenzmarkiertes, phosphatbindendes Protein wurde zum Enzym-Inhibitor-Substrat-Gemisch zugesetzt. Vom Substrat enzymatisch abgespaltenes Phosphat und das markierte Protein gingen eine Bindung ein, wodurch die Fluoreszenz des markierten Proteins verstärkt wurde. Als Substrat wurde Methylumbelliferylphosphat verwendet. Das Fluoreszenzsignal des neben Phosphat entstehenden Produkts Methylumbelliferyl wurde ebenfalls als Referenz für die Optimierung dieses allgemeinen Phosphatnachweises herangezogen. Die Reaktionszeit des Phosphatassays betrug wenige Sekunden. Um den Signalhintergrund zu reduzieren mussten alle Phosphatspuren vorher aus den verwendeten Lösungen enzymatisch entfernt werden. Ein Inhibitor aus einem Pflanzenextrakt konnte nach einer chromatographischen Reinigung online durch das Inhibitionssignal des Enzyms in Form einer Reduzierung der Fluoreszenz des phosphatbindenden Proteins erfasst und mit einer parallelen Massendetektion identifiziert werden. Aufgrund der großen Bandenverbreiterung wurde nur ein Analyt biochemisch detektiert.

HPLC wurde mit einem homogenen Enzymreaktor gekoppelt, um Inhibitoren von Angiotensin-konvertierendem Enzym aus hydrolysiertem Molkeprotein zu detektieren [53]. Insgesamt 30 Enzyminhibitoren wurden so durch ihre inhibitorische Wirkung erfasst. Die Reaktionszeit für Inhibition und Substratumsatz betrug 3 min. Koeluirende Substanzen wurden anhand von Ähnlichkeiten im Enzyminhibitionssignal und im Signal der Massenspuren nach dem sogenannten *Peak Matching*-Verfahren evaluiert.

Ein homogener Enzymreaktor nach HPLC mit massenspektrometrischer

Detektion wurde von DE BOER et al. [54] vorgestellt. Natürliche Pflanzenextrakte wurden auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber dem Enzym Cathepsin B untersucht. Die Enzymaktivität wurde anhand des Umsatzes von Substrat massenspektrometrisch verfolgt. Durch die massenspektrometrische Detektion der Enzymaktivität konnten chemische und biologische Informationen mit einem Detektor gewonnen werden (siehe auch Kapitel 3.2).

Eine massenspektrometrische Detektion der Acetylcholinesterase-Aktivität nach einer chromatographischen Trennung wurde kürzlich beschrieben [55]. Mit einem ESI-MS wurde simultan der Umsatz des Enzyms anhand der Substratmasse Acetylcholin bzw. anhand der Produktmasse Cholin verfolgt. Eluierende Inhibitoren reduzierten die Intensität des Produktsignals bzw. erhöhten die Intensität des Substratsignals. Parallel dazu konnte anhand von MS-MS-Spektren der Inhibitor anhand seiner Fragmentbildung identifiziert werden.

1.4 Eingesetzte Zielstrukturen

Verschiedene Zielstrukturen, die auch in Biosensoren Anwendung finden [18], sind interessant für eine Wirkungsbezogene Analyse. Die praktischen Arbeiten dieser Dissertation konzentrierten sich auf den Einsatz von Acetylcholinesterase, Proteinphosphatasen und Leuchtbakterien in einem homogenen Inhibitionsdetektor gekoppelt an eine HPLC und werden daher im Folgenden näher betrachtet.

1.4.1 Acetylcholinesterase

Bedeutung Die wichtigste physiologische Funktion der Acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) ist der Abbau von Reizsignalen durch einen schnellen Abbau des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh) in den cholinergen Synapsen, die sich im vegetativen Nervensystem sowie an den motorischen Endplatten befinden. Als motorische Endplatten werden die Kontaktstellen zwischen Nerv und Muskel bezeichnet.

AChE liegt in unterschiedlichen Strukturen vor, die sich in der Art der Assoziation von katalytischen Untereinheiten und ihren hydrodynamischen Eigenschaften unterscheiden. Sie können in ihrer hydrophilen Form löslich sein oder membrangebunden auftreten [56]. Die Acetylcholinesterase in den Synapsen ist ein membranständiges Glykoprotein [57].

Die Umsatzzahl des natürlichen Substrats ist mit $k_{cat} = 1.6 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ ungewöhnlich hoch [58]. Erklärungen für die katalytische Effizienz und Substratspezifität der AChE wurden einerseits durch Mutationsstudien und andererseits durch Röntgenstrukturanalysen des Übergangszustands durch Enzym-Inhibitor-Bindungen auf molekularer Ebene gefunden [59].

Die Umsetzung des Substrates im aktiven Zentrum der AChE erfolgt in einer katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Glutamat (Abb. 1.1, a). Der Zugang zum aktiven Zentrum wird durch 14 aromatische Aminosäurereste gebildet [60]. Die Kristallstruktur von AChE zeigt, dass das aktive Zentrum am Ende eines tiefen Schlundes liegt [61].

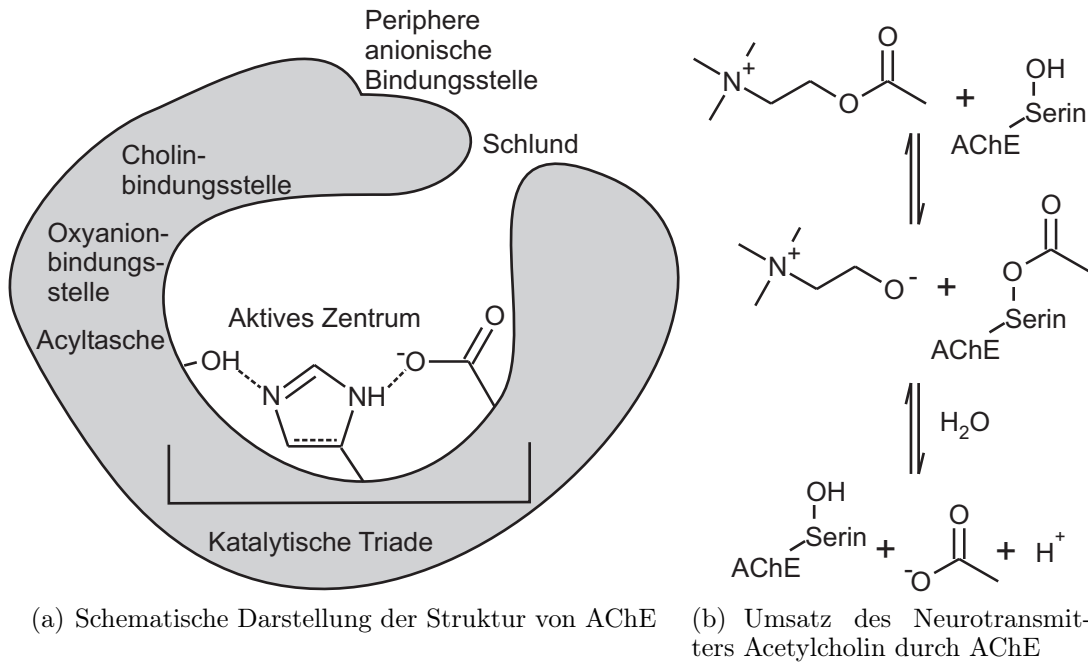


Abb. 1.1: Struktur (a) und Substratumsatz (b) der AChE: Die Aktivität der AChE wird durch fünf strukturelle Untereinheiten bestimmt: Katalytische Triade, Oxyanionbindungsstelle, Cholinbindungsstelle, Acyltasche und die periphere anionische Bindungsstelle [60, 62, 63].

Die katalytischen Schritte in der Esterhydrolyse bestehen aus einem anfänglichen Transacylierungsschritt am Serin des Enzyms mit dem Abgang der alkoholischen Gruppe (Abb. 1.1, b). Danach folgt die Addition von Wasser begleitet von der Deacylierung des Enzyms. Acylierung und Deacylierung durchlaufen tetraedrische Übergangszustände, die durch Wasserstoffbrückenbindungen von Aminen des Enzymgerüsts zum Carbonylsauerstoff an der Oxyanionbindungsstelle stabilisiert werden [60].

An der Cholinbindungsstelle wird über Kation- π -Wechselwirkungen das tertiäre Ammonium von Cholin an einem Tryptophan gebunden [62]. Die Acyltasche bestimmt die Substratspezifität [60]. Des Weiteren wurde eine periphere anionische Bindungsstelle identifiziert, die vermutlich ihren Beitrag zum schnellen Substratumsatz liefert, da das kationische Substrat angezogen, das anionische Produkt aber abgestoßen wird.

In letzter Zeit wurden noch weitere, nicht klassische Funktionalitäten der AChE aufgedeckt [63]. Cytochemische Untersuchungen lieferten Hinweise auf eine Aktivierung von Dopamin-Nervenzellen, Wachstum von Synapsen und Neuronen oder auch Einflüsse auf die Bildung von Blutzellen im Knochenmark. Vielfach gibt es nur cytologische Untersuchungen, deren direkter Zusammenhang mit verschiedenen Varianten und inhibitorischen Mechanismen von AChE noch deutlicher gezeigt werden muss.

Inhibitoren Inhibitoren der AChE binden an drei verschiedenen Stellen [64, 65], die in Abb. 1.1, a schematisch dargestellt sind. Eine Bindungsstelle ist die periphere anionische Bindungsstelle in der Nähe des Schlundes, der zum aktiven Zentrum der AChE führt. Diese Bindungsstelle wird durch einige geladene bisquaternäre Ammoniumverbindungen blockiert. In diesem Fall spricht man von einer allosterischen Hemmung. Die zweite Bindungsstelle im Enzym ist die Cholinbindungsstelle im aktiven Zentrum, die durch trizyklische Inhibitoren wie z.B. Acridin gehemmt wird. Die bedeutendste Bindungsstelle ist die Acyltasche des aktiven Zentrums. Die Größe der Acyltasche wirkt sich auf die Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber Inhibitoren aus, die einen ähnlichen Übergangszustand wie das Substrat eingehen.

Inhibitoren, die wie das Substrat eine Bindung mit dem Serin der katalytischen Triade eingehen, sind Carbamate und Organophosphate. Sie werden weltweit als Insektizide eingesetzt, da sie das Nervensystem angreifen. Bekannte chemische Kampfstoffe wie Sarin sind ebenfalls Organophosphate. Einige Organophosphat-, Carbamatpestizide und chemische Waffen sind in Abb. 1.2 dargestellt.

Der Mechanismus der Hemmung von AChE durch Carbamate und Organophosphate nach ALDRIDGE [66] ist in Abb. 1.3 schematisch dargestellt. In einem ersten Schritt bildet sich der Michaelis-Menten-Komplex EI^*X , der in einem zweiten Schritt in ein acyliertes Enzym EI und die Abgangsgruppe X des Inhibitors zerfällt. Für den Fall, dass nur ein kleiner Teil des Enzyms als Michaelis-Menten-Komplex vorliegt, lässt sich die Gleichung als bimolekulare Reaktion mit der bimolekularen Geschwindigkeitskonstante k_i darstellen. Der k_i -Wert ist ein Maß für die Stärke der Hemmwirkung eines spezifischen Inhibitors auf die AChE. Er gibt Auskunft über die Sensitivität einer bestimmten AChE gegenüber dem jeweiligen Hemmstoff.

Durch Hemmung der AChE kommt es zu einer Anreicherung des Neurotransmitters Acetylcholin an cholinergen Synapsen, motorischen Endplatten und im Gehirn. Die Folge ist ein Dauerreizzustand, der als endogene Acetylvergiftung bezeichnet wird. Symptome sind im Allgemeinen Kramp fzustände, Atemlähmung und eine Verlangsamung der Herzfrequenz.

Nach der Inhibition durch Phosphorylierung stehen dem blockierten Komplex drei mögliche Reaktionswege offen (Abb. 1.4). Das Enzym kann reaktiviert werden durch eine spontane Hydrolyse, die aber vor allem bei der Inhibition durch Organophosphate sehr langsam bis gar nicht abläuft. Für Sarin und Tabun konnte keine spontane Hydrolyse beobachtet werden [67]. Eine Reaktivierung kann auch durch Gabe eines starken Nucleophils wie Pyridiniumoxim erfolgen [68]. Der gebildete Phosphorester muss rasch hydrolysiert werden können, um eine Rückreaktion zum inhibierten Enzym zu vermeiden.

Durch Hydrolyse einer O-Alkylgruppe kommt es zu einer Alterung des phosphorylierten Enzyms. Eine Reaktivierung nach Alterung des phosphorylierten Enzyms ist nicht mehr möglich, da sich durch die Dealkylierung des Phosphatrestes ein stabiles Produkt gebildet hat.

Die Inhibitionskinetik von Organophosphatverbindungen und deren Reaktivierung durch Oxime wurde von WOREK et al. [67] *in vitro* an AChE aus humanen Erythrozyten studiert, wobei die Abhängigkeit der Daten von der chemischen Struktur der untersuchten Verbindungen berücksichtigt wurde. Die durch Inhibi-

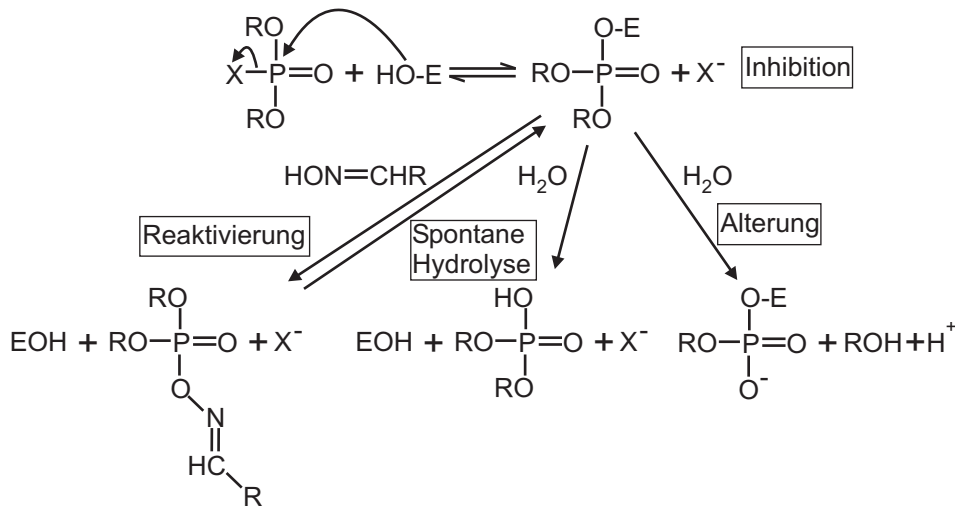


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Hemmung von AChE durch Organophosphate. Nach der Inhibition kann es zur Reaktivierung des Enzyms durch Gabe von Oximen oder durch spontane Hydrolyse kommen. Durch Alterung bleibt das Enzym irreversibel gehemmt [67].

Tabelle 1.2: Hemmkonstanten k_i der Inhibition von humaner AChE nach WOREK et al. [67]

| Inhibitor | k_i [$M^{-1}min^{-1}$] |
|----------------|----------------------------|
| Paraoxon-ethyl | $2.2 \cdot 10^6$ |
| Tabun | $7.4 \cdot 10^6$ |
| Sarin | $2.7 \cdot 10^7$ |
| Soman | $9.2 \cdot 10^7$ |
| VX | $1.2 \cdot 10^8$ |
| VR | $4.4 \cdot 10^8$ |
| Butylsarin | $6.1 \cdot 10^8$ |

tion humaner AChE ermittelten Hemmkonstanten k_i einiger chemischer Kampfstoffe sind im Vergleich mit der Hemmkonstante des Insektizids Paraoxon-ethyl in Tab. 1.2 gezeigt. Die Organophosphonate wie Sarin sind stärkere Inhibitoren als das Organophosphat Paraoxon-ethyl.

Bei der Betrachtung des Inhibitionsmechanismus muss man zwei verschiedene strukturelle Aspekte des Inhibitors beurteilen. Zum einen muss die Affinität des Inhibitors zur Bindungsstelle am Enzym betrachtet werden, zum anderen muss die Rolle der elektronenziehenden Gruppen am Inhibitor berücksichtigt werden, die zu einer schnellen Spaltung des Enzym-Inhibitor-Komplexes führt [69].

Ein Vergleich der kinetischen Daten der Inhibition durch alkanische Organophosphatester mit dem aromatischen Organophosphat Paraoxon zeigt allerdings, dass Paraoxon ein starker Inhibitor aufgrund seiner Affinität zur Bindungsstelle ist. Weniger stark wirkt sich der elektronenziehende Effekt der Verbindung aus, der zu einer schnellen Spaltung des Enzym-Inhibitor-Komplexes und damit zu ei-

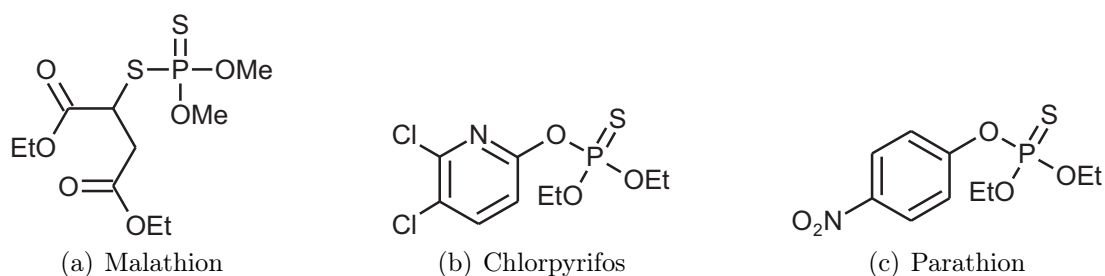


Abb. 1.5: Phosphorthionate werden erst nach Oxidation potente Inhibitoren der AChE.

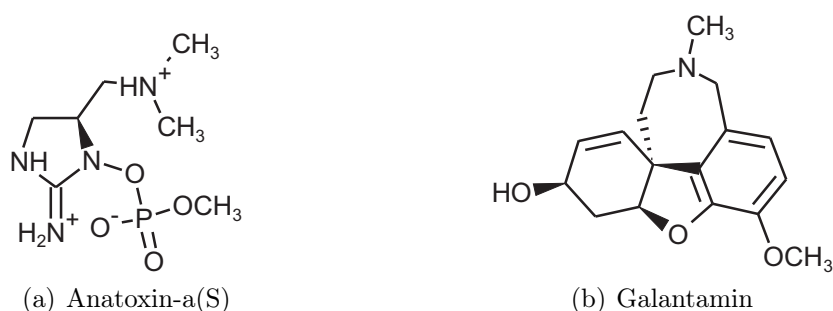


Abb. 1.6: Natürlich vorkommende AChE-Inhibitoren aus Cyanobakterien (a) und Schneeglöckchen (b).

ner Hemmung des Enzyms durch Phosphorylierung führt. Eine Verzweigung der Alkylkette zeigte eine abnehmende inhibitorische Wirkung auf die AChE, vermutlich aufgrund von sterischen Hemmungen [70]. Auch bezüglich der Alterung des phosphorylierten Enzyms gibt es strukturbedingte Unterschiede. Die Zeit für die Alterung des phosphorylierten Enzyms nimmt mit längeren Alkylresten zu. Die Halbwertszeit der Alterung lag zwischen 3 h für Sarin und 231 h für Butylsarin [67].

Häufig werden Insektizide nicht als Organophosphate sondern als Phosphorthionate eingesetzt (Abb. 1.5). Phosphorthionate zeigen in höheren Organismen erst nach metabolischer Aktivierung eine hemmende Wirkung auf AChE. Die geringere Elektronegativität des Schwefels gegenüber dem Sauerstoff führt zu einer langsameren Abspaltung der Abgangsgruppe des Inhibitors. Dadurch wird der Inhibitionsmechanismus verlangsamt.

Für *in vitro*-Bestimmungen der Phosphorthionate durch AChE-Inhibition sind mehrere chemische Oxidationsmethoden wie z.B. mit Brom, Chlor oder N-Bromsuccinimid (NBS) bekannt [71]. Speziell für den Einsatz in der biosensorischen Lebensmittelanalyse wurde eine Mutante von Cytochrom P450 eingesetzt, um Phosphorthionate für die Analyse durch AChE-Inhibition zu oxidieren [72]. Der Nachteil der Standardoxidationsmethoden ist der, dass z.B. im Falle der NBS-Oxidation Ascorbinsäure, welche recht häufig in Lebensmitteln enthalten ist, das Oxidationsmittel zersetzt. Des Weiteren ist die chemische Oxidation unspezifisch und führt häufig zu nicht quantitativen Reaktionen in Realproben.

Neben den AChE-Inhibitoren anthropogenen Ursprungs lassen sich auch einige in Pflanzen und Pilzen [73] oder auch in Cyanobakterien [74] finden.

In Cyanobakterien der Gattung *Anabaena flos-aquae* wurde das Alkaloid Anatoxin-a(S) (Abb. 1.6, a) gefunden [75]. Die Anatoxin-a(S)-Vorkommen sind wenig dokumentiert. Dies mag seine Gründe nicht nur im seltenen Auftreten von Anatoxin-a(S)-haltigen Algenblüten haben, sondern auch an fehlenden analytischen Methoden liegen. Da Anatoxin-a(S) kein Chromophor aufweist, kommt als physikochemische Analyse nur HPLC mit massenspektrometrischer Detektion in Frage.

Alternativ kann Anatoxin-a(S) anhand seiner starken inhibitorischen Wirkung auf AChE erfasst werden [75]. Bei dieser Detektionsmethode besteht jedoch die Gefahr, dass die Inhibition von anthropogen eingetragenen Schadstoffen wie Insektiziden beeinflusst wird. Um zwischen einer Inhibition durch Organophosphaten und Anatoxin-a(S) zu unterscheiden, wurde die Möglichkeit zur Reaktivierung eines Biosensors mit Pyridin-2-aldoxim-methochlorid (2-PAM) untersucht [76]. Im Falle einer Inhibition durch z.B. Paraoxon ist eine Reaktivierung zum großen Teil möglich, nicht so bei Anatoxin-a(S). Nach der Inhibition durch Anatoxin-a(S) zeigte das Enzym schnell Alterungserscheinungen aufgrund der Struktur des Inhibitors [77] und konnte folglich nicht mehr reaktiviert werden.

Bedeutung haben AChE-Inhibitoren aus Naturstoffen auch als palliative Medikamente in der Alzheimertherapie gewonnen. Mittlerweile können zwei Drittel aller Demenzerkrankungen auf die Alzheimerkrankheit zurückgeführt werden. Dabei tritt ein Mangel an dem Neurotransmitter Acetylcholin im Hirn auf. Die symptomatische Behandlung zielt derzeit darauf ab, das cholinergene Nervensystem pharmakologisch zu verstärken. Dazu werden AChE-Inhibitoren als Medikamente eingesetzt, die den biochemischen Abbau von Acetylcholin verlangsamen und dabei zumindest theoretisch die cholinergene Reizübertragung verlängern.

Das Alkaloid Galantamin (Abb. 1.6, b) wurde früher aus Schneeglöckchen und Narzissen gewonnen und wird heute synthetisch hergestellt unter dem Namen *Reminyl* als AChE-Hemmer vermarktet [78]. Es hemmt die Acetylcholinesterase kompetitiv. Ein Problem an den derzeit eingesetzten Medikamenten sind störende Nebenwirkungen, da nicht nur neuronale AChE des Hirns gehemmt wird, sondern auch AChE an anderen Stellen angegriffen wird [79]. Neue Analysen- und Detektionsmethoden sind wünschenswert, um die Forschung der Alzheimermedikation zu unterstützen. Gerade hinsichtlich der zunehmenden Lebenserwartung wird die Zahl der Alzheimerpatienten anwachsen.

Enzymaktivitätstest Sehr häufig wird die AChE-Aktivität basierend auf einer von ELLMAN [49] entwickelten Reaktion bestimmt. Der Nachweis erfolgt mit dem Substrat Acetylthiocholiniodid (ATCI), das nach enzymatischer Hydrolyse durch Reaktion mit dem ELLMAN's Reagenz 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) das chromogene Produkt Thionitrobenzoat (TNB) erzeugt (Abb. 1.7). Die Absorption von TNB wird bei 412 nm gemessen. Anhand des molaren Extinktionskoeffizienten von TNB kann die Aktivität des Enzyms in Units pro Milliliter angegeben werden. Ein Unit des Enzyms wird dabei als die Menge an Enzym definiert, die in einer Minute 1 μmol des Substrats umsetzt.

Der Extinktionskoeffizient wurde von ELLMAN mit $13\,600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ angege-

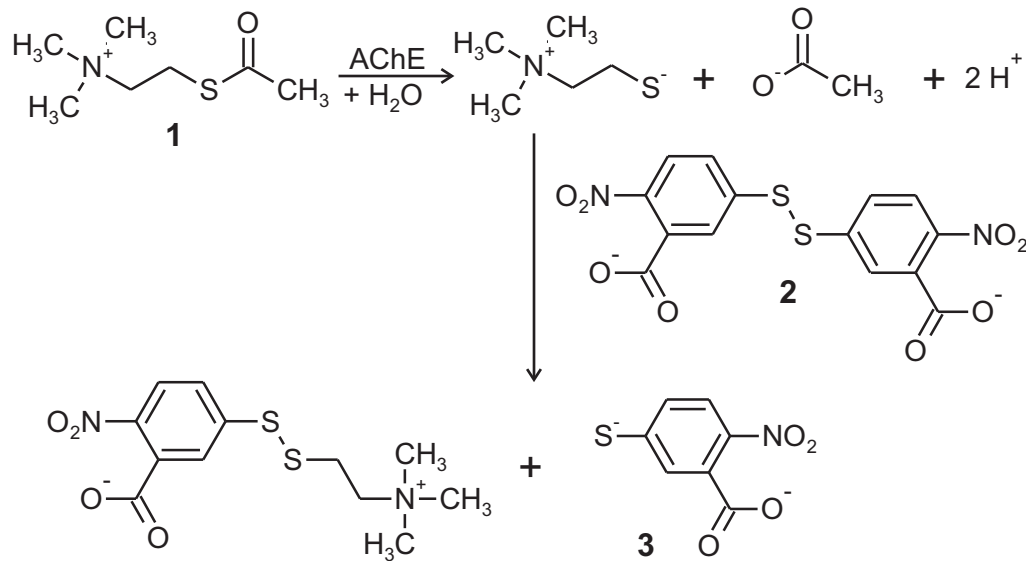


Abb. 1.7: Nachweis der AChE-Aktivität nach ELLMAN [49]. Acetylthiocholiniodid (ATCI, 1) wird enzymatisch hydrolysiert. Das entstehende Thiol reagiert mit dem ELLMAN's Reagenz 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, 2). Es entsteht das chromogene Thionitrobenzoat (TNB, 3) mit einem Absorptionsmaximum bei 412 nm.

ben [49]. Neuere Messungen zeigten jedoch eine Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten von der Messtemperatur. Die von EYER et al. [80] empfohlenen Extinktionskoeffizienten für TNB betragen $14\,500\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 25°C und $13\,800\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 37°C in 0.1 M Phosphatpuffer bei pH 7.4.

Der AChE-Aktivitätsnachweis nach ELLMAN kann falsch-positive Ergebnisse liefern. Einige Amine und Aldehyde können die chemische Reaktion zwischen Thiocholin und DTNB hemmen und so ebenfalls zur fehlenden Farbentwicklung beitragen. Dies konnte bei der Wirkungsbezogenen Analyse einiger Naturextrakte durch Kombination von Dünnschichtchromatographie mit AChE-Inhibitionstests festgestellt werden [81].

Ein seltener verwendetes Substrat für die colorimetrische Detektion der AChE-Aktivität ist p-Nitrophenylacetat. Nach Hydrolyse wird die Absorption des Produktes p-Nitrophenolat bei 402 nm detektiert [69].

In einem Nachsäulenreaktionsdetektor mit immobilisierter Acetylcholinesterase wurde ein anderer colorimetrischer Nachweis der AChE-Aktivität beschrieben [46]. Als Substrat wurde α -Naphthylacetat über den IMER gepumpt, welches durch aktive Enzyme zu α -Naphthol hydrolysiert wird. Nach dem Nachsäulenreaktor wurde das Reagenz „Fast Red GG“-Salz, ein p-Nitrobenzoldiazoniumfluoroborat, zudosiert. Salz und Naphthol reagieren zu einem Chromophor, dessen Absorption bei 500 nm detektierbar ist.

Ein weiterer colorimetrischer Nachweis der Enzymaktivität kann über die Änderung des pH-Wertes erfolgen. Bei der Reaktion von AChE mit dem Substrat Acetylcholin entsteht Essigsäure. Die Erniedrigung des pH-Wertes kann durch Indikatormoleküle wie z.B. Thymolblau angezeigt werden. ANDRES et al. [82] benutzten dieses Messprinzip in einem faseroptischen Biosensor. AChE und Thy-

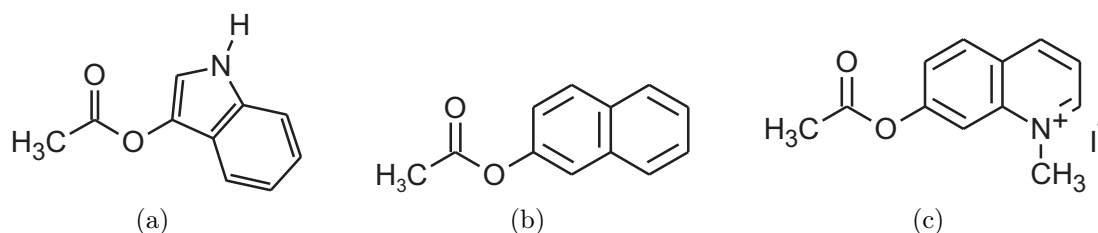


Abb. 1.8: Substrate, die nach der enzymatischen Umsetzung durch AChE ihre Fluoreszenzeigenschaften verändern. In Klammern sind die Anregungs- und Emissionswellenlängen der Produkte angegeben. (a) Indoxylacetat ($\lambda_{ex}=395$ nm, $\lambda_{em}=470$ nm) (b) 2-Naphthylacetat ($\lambda_{ex}=320$ nm, $\lambda_{em}=410$ nm) (c) 7-Acetoxy-1-methyl-chinoliniumiodid (AMQI, $\lambda_{ex}=403$ nm, $\lambda_{em}=502$ nm)

molblau wurden auf Glaskügelchen immobilisiert und durch ein Nylonnetz am Ende eines faseroptischen Messkopfes platziert. Das Licht einer LED (600 nm) wurde in die Faser eingekoppelt und am Messkopf zum Detektor reflektiert. Durch die enzymatische Änderung des pH-Wertes wechselte die Farbe des Indikators von blaugrün zu gelb, was eine Zunahme der Intensität des reflektierten Lichts zur Folge hatte. Dieses Messprinzip wurde jedoch nicht in einem kontinuierlich messenden Detektor, sondern nur in einem FIA-System mit abwechselnder Injektion von Pestiziden und Acetylcholin angewendet.

Eine Änderung des pH-Wertes aufgrund der enzymatischen Freisetzung von Essigsäure kann natürlich ebenfalls über eine Fluoreszenzmessung erfolgen [83, 84]. In einem FIA-System wurde in den Trägerstrom zur Substratlösung der pH-Indikator 2-Butyl-6-(4-methyl-piperazin-1-yl)-benzo[de]isoquinolon-1,3-dion gegeben, der anhand der pH-Wert-Erniedrigung eine direkte Korrelation mit der AChE-Aktivität lieferte [84].

Einige Substrate, die direkt nach enzymatischer Umsetzung ihre Fluoreszenzeigenschaften ändern, sind in Abb. 1.8 aufgeführt. Indoxylacetat und 2-Naphthylacetat liefern nach enzymatischer Umsetzung die fluoreszierenden Produkte 3-Hydroxyindol beziehungsweise 2-Naphtol [85]. Ein Substrat mit höherer Quantenausbeute und besserer Löslichkeit ist 7-Acetoxy-1-methyl-chinoliniumiodid (AMQI), welches durch Hydrolyse zu einem stark fluoreszierenden Produkt umgesetzt wird [86]. Ein Nachteil an diesem Substrat ist jedoch die starke Autohydrolyse des Substrates bei höheren pH-Werten. Das Substrat wurde daher in schon beschriebenen Anwendungen für Fließinjektionsanalysen auf Eis bei einem pH \sim 5 gelagert [50, 48].

Ein weiterer fluorimetrischer Nachweis der AChE-Aktivität wurde mit einer Substrat-Reagenz-Reaktion gezeigt [35]. Als Substrat wurde Acetylthiocholin eingesetzt. Nach der enzymatischen Hydrolyse bildet das Produkt mit dem Reagenz Coumarinylphenylmaleimid (Abb. 1.9) einen fluoreszierenden Thioether, dessen Fluoreszenz bei 355 nm angeregt wird und dessen Emission bei 470 nm detektiert wird. Dieser Nachweis wurde in einer Mikrochip-Anwendung mit laserinduzierter Fluoreszenz eingesetzt [35]. Die Löslichkeit des Reagenzes ist jedoch in Wasser gering und musste daher in einem hohen Anteil von Acetonitril vorgenommen werden.

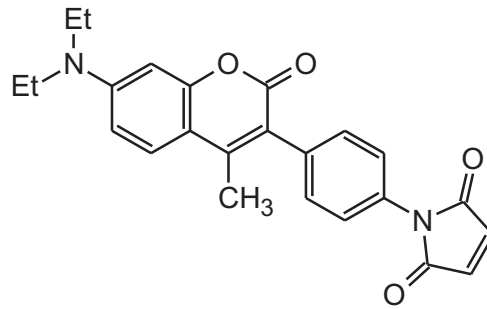


Abb. 1.9: N-(4-(7-Diethylamino-4-methylcoumarin-3-yl)phenyl)maleimid (CPM) bildet mit Thiocholin ein fluoreszierendes Produkt.

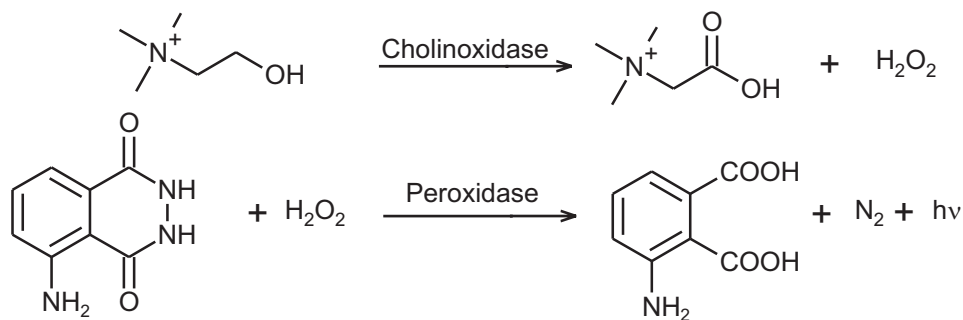


Abb. 1.10: Das Produkt der enzymatischen Hydrolyse Cholin wird durch Cholinoxidase zu Betain oxidiert. Dabei entstehendes Wasserstoffperoxid reagiert mit Luminol katalysiert durch Peroxidase unter Chemilumineszenz.

Ein Nachweis der AChE-Aktivität mittels Chemilumineszenz erfolgt unter Zugabe von Acetylcholin, Luminol und den Enzymen Cholinoxidase und Meerrettichperoxidase [87] (Abb. 1.10). Cholin wird durch die enzymatische Hydrolyse von Acetylcholin gebildet und durch Cholinoxidase zu Betain unter Bildung von Wasserstoffperoxid oxidiert. Luminol wird durch Wasserstoffperoxid katalysiert von Meerrettichperoxidase unter Lumineszenzerscheinung oxidiert.

Inhibitoren wie Carbamat- und Organophosphatpestizide [88] und mögliche Medikamente für die Alzheimertherapie [89] wurden mit dieser Methode in Mikrotiterplatten-Experimenten bestimmt. Nachteil an dieser Nachweismethode ist, dass durch die vielen erforderlichen Reaktionsschritte die Detektion empfindlich auf enzymatische, metallische und chemische Verunreinigungen reagiert. Zudem ist das intermediär gebildete Wasserstoffperoxid instabil und sehr reaktiv, was die Empfindlichkeit verringert.

Neuere Nachweismethoden der AChE-Aktivität gehen in die Richtung der Entwicklung von Molekülen, die nach enzymatischem Umsatz direkt eine Chemilumineszenzerscheinung erzeugen [90]. Der Einsatz sterisch anspruchsvoller Moleküle als Substrate für AChE ist aber limitiert. Da das aktive Zentrum des Enzyms am Ende eines engen Schlundes lokalisiert ist, können aufgrund sterischer Hinderung große Moleküle nicht als Substrat umgesetzt werden, die nach Deacylierung eine Lumineszenz erzeugen könnten. Daher wurde von SABELLE et al. [90] eine disulfidische Verbindung synthetisiert, die nach Reaktion mit Thiocholin, welches

enzymatisch aus dem Substrat Acetylthiocholin umgesetzt wurde, ein Leuchtsignal erzeugte. Nachteil an den gezeigten Ergebnissen war jedoch, dass nur eine Endpunktbestimmung der Enzymaktivität möglich war. Es mußte zur Erzeugung des Signals ein Lumineszenzverstärkermolekül zugegeben werden, das jedoch die AChE vollständig hemmte.

In der Biosensorik wird die AChE-Aktivität sehr häufig elektrochemisch bestimmt [91]. Für die elektrochemische Detektion wird das Enzym in der Regel direkt auf den Elektroden immobilisiert [92] oder in einem IMER verwendet.

Die erste Generation der amperometrischen Biosensoren mussten Cholinoxidase als zusätzliches Enzym einsetzen [91]. Da beim Einsatz von Acetylcholin das Produkt der enzymatischen Hydrolyse Cholin nicht elektrochemisch aktiv war, musste es durch Cholinoxidase unter Freisetzung von Wasserstoffperoxid oxidiert werden. Der Stromfluss der Oxidation von Wasserstoffperoxid wurde bei einem Potential von $\sim +650$ mV gegen eine Ag/AgCl-Elektrode gemessen. Da ein so hohes Potential angelegt werden musste, kam es häufig zu oxidativen Interferenzen mit Inhaltsstoffen der Probenlösung. Die neuere Generation der amperometrischen Biosensoren benötigt kein zusätzliches Enzym. Als Substrat wird Acetylthiocholin eingesetzt. Es entsteht Thiocholin, welches bei einem geringeren Potential von $\sim +400$ mV zu Dithiobischolin oxidiert wird.

Bei der seltener publizierten potentiometrischen Detektion der AChE-Aktivität wird die Änderung des pH-Wertes aufgrund der enzymatisch freigesetzten Essigsäure erfasst.

Aufgrund ihrer Kompaktheit sind elektrochemische Biosensoren ein gern verwendetes Instrument in der Bioanalytik. Auf Enzyminhibition basierende Biosensoren scheitern aber häufig an Realproben, da sie weder zwischen verschiedenen Analyten ausreichend differenzieren, noch sie identifizieren können [15, 91, 92]. Es kann jeweils nur die Gesamttoxizität der Probe bestimmt werden, die aber durch Matrixeffekte verfälscht sein kann. Unter diesen Voraussetzungen kann die Vielzahl der in der Literatur vorgestellten Biosensoren nur in Screeningverfahren oder als Monitoringwerkzeug eingesetzt werden.

Zukunftsweisende Ansätze gehen in die Richtung Biosensoren zu entwickeln, die zwischen verschiedenen Analyten differenzieren können, oder aber die Detektion der Hemmwirkung nach vorangegangener Trennung der Analyten zu etablieren.

Eine Möglichkeit eine Differenzierung der Inhibitoren zu schaffen besteht darin, die unterschiedlichen Empfindlichkeiten von Acetylcholinesterasen aus verschiedenen Quellen auszunutzen. Eine Klassifizierung unterschiedlicher insektizider Organophosphorester und Carbamate anhand ihrer Hemmkonstanten gegen verschiedene Cholinesterasen wurde von HERZSPRUNG vorgenommen [71]. Hemmkonstanten der Inhibition von verschiedenen Cholinesterasen durch Inhibitorkombinationen wurden ermittelt. Testparameter wie Oxidation, Reduktion und Reaktivierung wurden variiert. Anhand der resultierenden Hemmwirkungsmuster gelang es, den aus der Enzyminhibition eines Insektizidgemisches resultierenden Summenparameter aufzulösen und einzelne Inhaltsstoffe qualitativ und quantitativ zu analysieren [93].

Mit neueren Methoden konnte die Sequenz von Acetylcholinesterasen aus verschiedenen Quellen genetisch verändert werden, um die Sensitivität oder Selektivität gegen spezielle Inhibitoren zu erhöhen und eine empfindlichere biosensori-

sche Detektion zu erreichen [92]. Mit der Auflösung der dreidimensionalen Struktur der AChE aus *Torpedo californica* mit Röntgenstrukturanalyse [61] konnte die Struktur-Funktions-Beziehung des Enzyms anhand seitenspezifischer Mutagenese untersucht werden. Die Entwicklung von effizienten Expressionssystemen für die Produktion von großen Mengen an rekombinanten Enzymen leistete auch ihren Beitrag in der Anwendung von AChE-Mutanten.

Jeweils vier Varianten rekombinanter Mutanten von AChE aus *Drosophila melanogaster* wurden auf einen Multianalyt-Sensor mit elektrochemischer Detektion aufgebracht, um anhand ihrer unterschiedlichen Empfindlichkeitsmuster gegen die Zielanalyten Summenparameter der Enzyminhibition auflösen zu können [94]. Es konnte gezeigt werden, dass einzelne Konzentrationen aus binären Mischungen zweier Organophosphate (Malaoxon und Paraaxon) oder einer Carbamat- und Organophosphat-Mischung (Carbofuran und Paraaxon) bestimmt werden konnten.

Eine online durchgeführte elektrochemische Detektion der Enzymaktivität wurde mit einer Fließinjektionsanalyse demonstriert [95]. Die selektive Analyse eines Insektizids unter Ausschluss von falsch-positiven Ergebnissen aufgrund von Matrixeffekten wurde mit drei Detektionskanälen durchgeführt. Um selektiv das Insektizid Omethoat nachzuweisen, wurde in einem Kanal die Aktivität von immobilisierter AChE aus *Drosophila melanogaster* (DmAChE) gemessen, während auf einer anderen Detektionselektrode AChE aus dem Zitteraal (eeAChE) immobilisiert war, welche resistent gegen Omethoat war. Im dritten Kanal wurde die Aktivität einer Mutante von DmAChE erfasst, die empfindlicher auf Omethoat reagiert als der Wildtyp, um eine empfindlichere Messung aufgrund einer Enzymmutante zu demonstrieren. Verschiedene Matrixeinflüsse wie Schwermetalle, Tenside, extreme pH-Werte oder ein geringer Salzgehalt hemmten die Aktivität aller Enzyme. Das Insektizid hemmte jedoch nur die Enzyme aus der Fruchtfliege. Anhand der simultanen Inhibition von eeAChE und DmAChE konnte nun gefolgert werden, dass die Inhibition nicht aufgrund von Insektizid, sondern aufgrund von Wechselwirkungen mit der Matrix erfolgte.

Eine spezifische Detektion von Anatoxin-a(S) durch Einsatz einer Kombination von AChE-Mutanten mit unterschiedlichen Empfindlichkeiten gegen Insektizide und Anatoxin-a(S) wurde von DEVIC et al. [96] gezeigt, um zwischen AChE-hemmendem Algentoxin oder Insektiziden differenzieren zu können.

Eine andere Möglichkeit der Differenzierung von Inhibitoren, die durch enzymatische Inhibition erfasst wurden, besteht darin, die Analyten sequentiell nach einer chromatographischen Trennung auf ihre Hemmwirkung zu untersuchen, wie es dem Prinzip der Wirkungsbezogenen Analyse entspricht. Eine kontinuierliche elektrochemische Detektion der AChE-Aktivität nach einer chromatographischen Trennung wurde jedoch bisher noch nicht in der Literatur beschrieben.

Die Detektion der AChE-Inhibition, die nach einer chromatographischen Trennung durchgeführt wurde, erfolgte in der Regel mit optischen Messprinzipien (Tab. 1.3).

Tabelle 1.3: Beispiele für die Kombination von chromatographischer Trennung und AChE-Inhibitionstests

| LC-Methode | Substrat | Detektion der Inhibition | Reaktor (Reaktionszeit) | Analyten (Nachweisgrenze) | Referenz |
|------------------|-----------------------------------|-----------------------------|---|---|----------|
| RP (isokratisch) | ATCI/DTNB (nach ELLMAN) | Absorption (405 nm) | gestrickter PFA-Schlauch (~1.9 min) | Galantamin (0.3 nmol) | [47] |
| RP (isokratisch) | AMQI | Fluoreszenz | gestrickter PFA-Schlauch (~2.5 min) | Galantamin (0.15 nmol) | [48] |
| RP (Gradient) | Acetylcholin | Massenspektrometer | gestrickter PEEK-Schlauch (~3.4 min für Inhibition, ~1.1 min für Substratumsatz) | Galantamin (IC ₅₀ =0.38 μmol, LOD nicht bestimmt) | [55] |
| NP (isokratisch) | ATCI/DTNB (nach ELLMAN) | Absorption (420 nm) | Luftsegmentierung, Kunststoff-Schlauch (16 min für Inhibition, 9 min für Substratumsatz) | Dichlorvos (1 ng) | [97] |
| RP (Gradient) | ATCI/DTNB (nach ELLMAN) | Absorption (405 nm) | Luftsegmentierung, Kunststoff-Schlauch (14 min für Inhibition, 3 min für Substratumsatz) | Sarin (20 pg), Soman (10 pg), Tabun (60 pg) | [98] |
| NP (isokratisch) | Indoxylacetat | Fluoreszenz (430/501 nm) | Luftsegmentierung, Kunststoff-Schlauch (3.5 min für Inhibition, 4.5 min für Substratumsatz) | Carbofuran (0.2 ng) | [51] |
| HPTLC | Naphtylacetat, „Fast-Blue B“-Salz | Absorption (533 nm) | Reaktion direkt auf der Platte (30 min für Inhibition, 3 min für Substratumsatz) | Paraoxon (13 pg), Dichlorvos (200 pg), Carbaryl (200 pg), Aldicarb (400 pg) | [28] |

Bei der Verbindung von Chromatographie und Enzymaktivitätstest muss die Stabilität der AChE gegen Lösungsmittel der mobilen Phase berücksichtigt werden. AChE zeigt dabei in verschiedenen Lösungsmitteln eine erstaunliche Stabilität. MIONETTO et al. [99] testeten die Denaturierung von AChE aus Zitteraal nach Inkubation mit verschiedenen Lösungsmitteln. Zur Aktivitätsbestimmung wurde das Enzym in Wasser extrahiert und die Aktivität nach ELLMAN bestimmt. Die Stabilität von freier AChE nahm in allen mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln wie Methanol, Aceton und Acetonitril stark ab. Alkane und andere unpolare Lösungsmittel zeigten jedoch keinen oder nur wenig denaturierenden Effekt auf das Enzym. Die Inaktivierung des Enzyms durch die hydrophilen Lösungsmittel kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass stabilisierende Wassermoleküle aus der Grenzschicht zum Enzym entfernt werden und somit eine Entfaltung der Proteinstruktur stattfinden kann.

Zusammenfassung Acetylcholinesterase wird häufig für die Entwicklung von biochemischen Detektoren verwendet. Aufgrund der hohen Substratumsatzzahl und guten Verfügbarkeit ist es dafür sehr geeignet. Verschiedene optische Nachweismethoden der Enzymaktivität sind möglich. Für die Wirkungsbezogene Analyse hat die Inhibition der AChE eine Bedeutung für den Nachweis von neurotoxischen Substanzen, wie Insektiziden und einigen chemischen Kampfstoffen.

1.4.2 Proteinphosphatasen

Bedeutung Proteinphosphatasen (PP) sind mögliche Zielstrukturen einer Wirkungsbezogenen Analyse, da sie eine wichtige Rolle in der Signalübermittlung von eukaryontischen Zellen spielen. An der Zelloberfläche verankerte oder zellinterne Signalmoleküle beeinflussen die Zellen mittels spezifischer Rezeptoren, die das Signal einer Amplifikationskaskade zuführen. Das Signalübermittlungssystem und die Zielproteine werden durch Phosphorylierung mittels Kinasen aktiviert. Dephosphorylierung durch Phosphatasen dämpft hingegen die Signalübermittlung. Das Resultat der Signalübermittlung hängt von der Signalintensität und dem Empfängerzelltyp ab [57]. Die (De-)Phosphorylierungen, die je nach Kinase bzw. Phosphatase an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten erfolgen kann, bewirken konformative und damit auch funktionelle Änderungen der Zielproteine [100]. Die Zielproteine der Kinasen und Phosphatasen sind an den verschiedensten Mechanismen in der zellulären Regulation wie z.B. Glycogenstoffwechsel, Muskelkontraktion, Proteinsynthese oder Leberstoffwechsel beteiligt [101, 102, 103, 104], woraus sich ihre große Bedeutung für eine Wirkungsbezogene Analyse ergibt.

Phylogenetisch werden die Phosphotyrosin-Phosphatase-Familie (PTP) und zwei Familien der Serin/Threonin-Phosphatasen (PPP und PPM) unterschieden. Die Serin/Threonin-Phosphatasen spalten Phosphorsäureester von Serin- bzw. Threoninresten in den Substraten ab, während die Phosphotyrosin-Phosphatasen mit Tyrosinresten wechselwirken.

Die für die Signalweiterleitung bedeutsamere Gruppe ist die der Serin/Threonin-Phosphatasen. Der PPM-Familie gehören verschiedene Formen der PP-2C und das mitochondriale Enzym Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase an.

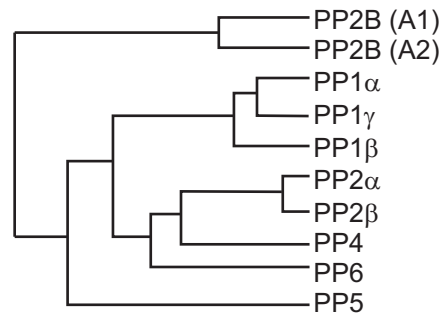


Abb. 1.11: Das Dendrogramm zeigt die sequentielle Verwandtschaft zwischen verschiedenen Mitgliedern der PPP-Familie der Serin/Threonin-Phosphatasen [105].

Tabelle 1.4: Biochemische Klassifizierung von Serin/Threonin-Phosphatasen [106]

| | PP1 | PP2A | PP2B | PP2C |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------|------------------|
| Phosphorylierung der Untereinheiten der Phosphorylasekinase | β | α | α | α |
| Absolute Abhängigkeit von divalenten Kationen | - | - | Ca^{2+} | Mg^{2+} |
| Inhibition durch Okadasäure | $\text{IC}_{50} = 10 \text{ nM}$ | $\text{IC}_{50} = 0.1 \text{ nM}$ | schwach | - |
| Inhibition durch Microcystin-LR | $\text{IC}_{50} = 0.1 \text{ nM}$ | $\text{IC}_{50} = 0.1 \text{ nM}$ | schwach | - |
| Aktivität gegen Casein als Substrat | sehr schwach | hoch | sehr schwach | hoch |

Der PPP-Familie der Serin/Threonin-Phosphatasen gehören PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5 und PP6 an. Deren Verwandtschaftsgrad ist anhand der katalytischen Untereinheiten in Abb. 1.11 veranschaulicht.

Die Unterteilung der verschiedenen Typen erfolgt je nach zugrunde liegender Substratspezifität, Sensitivität gegenüber Inhibitoren und Abhängigkeit von divalenten Kationen (siehe Tab. 1.4).

Über 30% der menschlichen Proteine enthalten kovalent gebundenes Phosphat [102]. Im menschlichen Genom sind ca. 500 Proteinkinase codiert, wovon zwei Drittel Serin/Threonin-Kinasen sind. Von den Proteinphosphatasen gibt es dagegen nur 150, wovon 40 Serin/Threonin-Phosphatasen sind [107]. Die Regulierung der vielen Kinasen kann durch vergleichsweise wenige Proteinphosphatasen geschehen, da die Proteinphosphatasen aus der PPP-Familie beispielsweise als Komplexe zwischen katalytischen und regulatorischen Untereinheiten auftreten [105]. So gibt es neben der katalytischen Untereinheit von PP1, die in den drei Isoformen α , β und γ vorkommt, über 50 regulatorische Untereinheiten. Die katalytischen Untereinheiten binden sich an regulatorische Untereinheiten, wo-

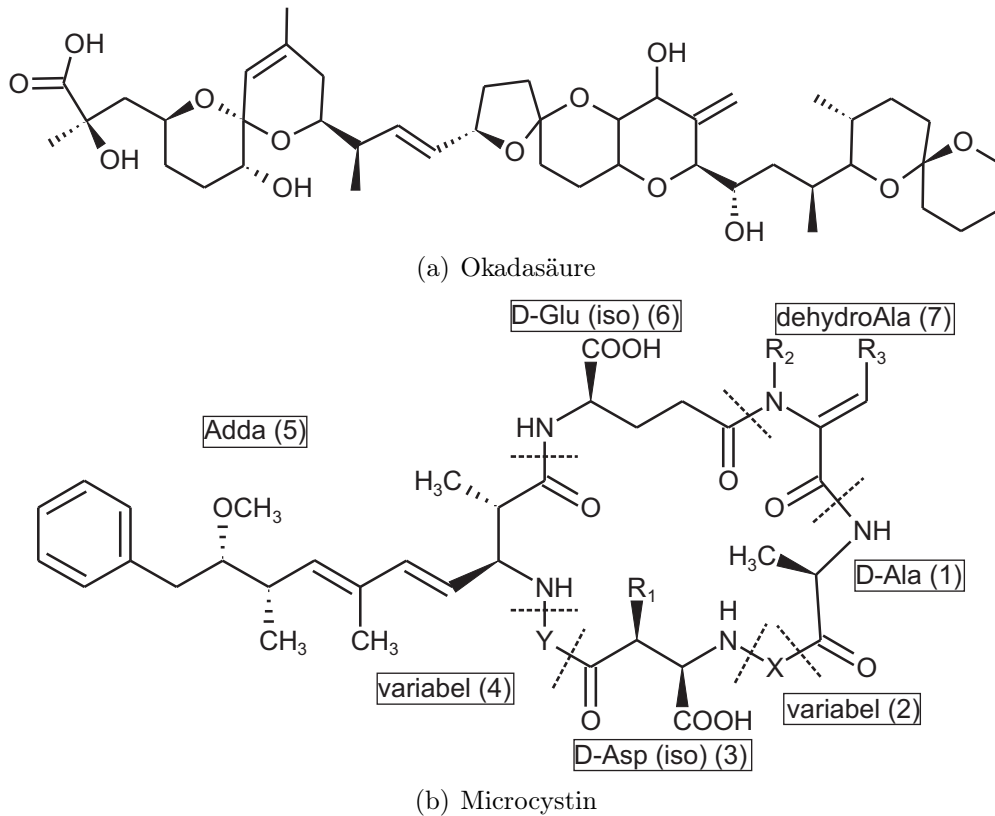


Abb. 1.12: Verwendete Inhibitoren der Proteinphosphatasen: Okadasäure und Microcystine

durch die Aktivität, Substratspezifität und intrazelluläre Verteilung der Enzyme gesteuert wird [108].

Inhibitoren Da sich die Experimente dieser Arbeit auf die Enzymtypen PP1 und PP2A konzentrieren, werden im Folgenden nur deren Inhibitoren betrachtet. Es gibt verschiedene natürlich vorkommende Inhibitoren von PP1 und PP2A [105], die vor allem für die Erforschung einer anwachsenden Zahl an Zellregulierungen durch reversible Proteinphosphorylierung eingesetzt werden.

Zu den Inhibitoren gehören die marinen Toxine Okadasäure und nahe verwandte Stoffe wie Dinophysistoxin und Acanthifolicin. Die Toxine werden von Dinoflagellaten, in Plankton vorkommenden Algen, produziert. Die Toxine werden von Schwämmen und vor allem Muscheln aufgenommen und gelangen damit in die menschliche Nahrungskette. Sie gelten als Hauptverursacher der diarrhischen Muschelvergiftung (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*, DSP). Okadasäure ist ein Fettsäurederivat mit vielen Polyetherbindungen (Abb. 1.12, a) und ein potenter Inhibitor der PP2A [109].

Für eine Wirkungsbezogene Analyse von Wasserproben sind cyclische Hepatotoxine, die von Cyanobakterien produziert werden, wichtige Inhibitoren von Proteinphosphatasen. Cyanobakterien, früher auch Blaualgen genannt, tauchen

weltweit in Binnen- und Küstengewässern auf und produzieren eine Vielzahl von Cyanotoxinen mit unterschiedlichen toxischen Wirkungen [74, 110]. Neben Neurotoxinen wie den cyanobakteriellen Alkaloiden Saxitoxin, Cylindrospermopsin, Anatoxin-a und Anatoxin-a(S) sind die cyclischen Heptapeptide (Microcystine) und Pentapeptide (Nodularine) von Bedeutung, da sie hepatotoxisch wirken. Auf die Struktur und Wirkung der Microcystine wird im Folgenden näher eingegangen. Die Experimente dieser Arbeit konzentrieren sich projektbedingt auf diese Inhibitoren.

Microcystine und Nodularine haben eine Ringstruktur mit einer ungewöhnlichen C₂₀-Aminosäure (2S,3S,8S,9S)-3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4E,6E-diensäure (ADDA). Die Doppelbindung der ADDA-Seitenkette ermöglicht die Detektion der Toxine im UV bei 238 nm. Zum anderen wurden ADDA-spezifische monoklonale Antikörper für eine immunoanalytische Bestimmung dieser Strukturklasse entwickelt [111, 112]. Zudem spielt die hydrophobe Seitenkette eine wichtige Rolle bei der Inhibition der Proteinphosphatasen.

Die allgemeine Struktur der Microcystine ist in Abb. 1.12, b dargestellt. ADDA formt zusammen mit D-Glutaminsäure, N-Methyl-dehydro-alanin, D-Alanin, einer variablen L-Aminosäure (X), D-Asparaginsäure und einer weiteren L-Aminosäure (Y) eine Ringstruktur. Glutaminsäure und Asparaginsäure sind über ihre Seitenketten in das Peptidgerüst eingebunden (iso-Form).

Die strukturelle Vielfalt der Microcystine ist sehr groß, da neben der Variation der Aminosäuren X und Y auch Methylierungen bzw. Demethylierungen der Seitenketten, Veresterung der Carbonsäuren und Acetylierung statt Methylierung des Sauerstoffs der ADDA-Seitenkette auftreten kann. Über 90 Varianten konnten bisher charakterisiert und über 60 isoliert werden [112, 113].

Die Nomenklatur der Microcystine erfolgt durch Anhang der Einbuchstaben-Codes der variablen Aminosäuren in Position 2 und 4 an den Namen Microcystin. Zum Beispiel befindet sich beim häufig auftretenden Microcystin-LR (MC-LR) an Position 2 die Aminosäure Leucin und an Position 4 die Aminosäure Arginin.

Für katalytische Untereinheiten von PP1 als auch von PP2A konnte gezeigt werden, dass die Bindung der Microcystine an Serin/Threonin-Phosphatasen über einen zweistufigen in Abb. 1.13 gezeigten Mechanismus erfolgt [114]. Im ersten Schritt erfolgt eine schnelle Bindung und Deaktivierung der katalytischen Untereinheit in einem Zeitraum von Minuten. Anschließend erfolgt in einem zweiten Schritt die kovalente Bindung der Microcystine an die Proteinphosphatasen in einem Zeitraum von Stunden.

Zur Charakterisierung seiner Lage in der katalytischen Tasche wurde MC-LR mit der katalytischen Untereinheit PP1 α kokristallisiert [115]. Die ADDA-Seitenkette befindet sich dicht gepackt in einen hydrophoben Graben, der aus dem aktiven Zentrum herausführt. Die Glutamyl-Carboxylgruppe und die ungewöhnliche Aminosäure N-Methyldehydroalanin stehen in Wechselwirkung mit der Bindungstasche des Enzyms, wo letztere eine kovalente Bindung mit einem Cystein des Enzyms ausbildet, indem eine nukleophile Addition des Thiols in einer Michael-Addition an den α,β -ungesättigten Alaninrest erfolgen kann. Nodularine können aus sterischen Gründen die kovalente Bindung nicht eingehen. Schwach bindende Strukturvarianten der Microcystine können ebenfalls nicht kovalent gebunden werden [114]. Okadasäure hat eine ähnliche Affinität an die Bindungs-

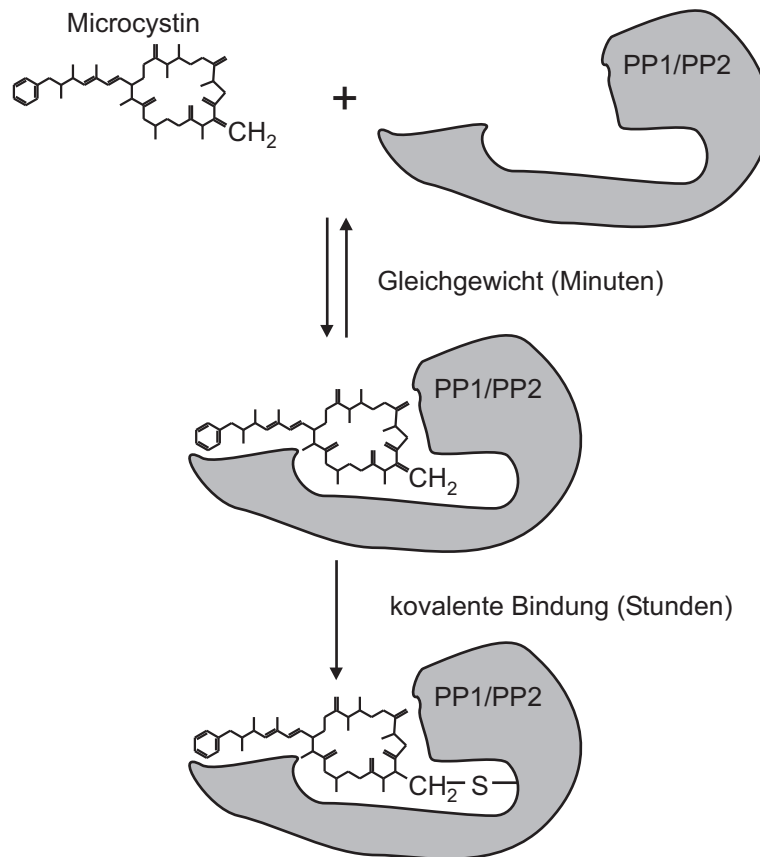


Abb. 1.13: Hypothetischer Bindungsmechanismus von Microcystinen an die katalytische Untereinheit von PP1 und PP2A [114].

tasche wie die Microcystine [109].

Microcystine sind Inhibitoren der Proteinphosphatasen PP1 und PP2A von Tieren und höheren Pflanzen. Die Inhibition der Proteinphosphatasen kann verschiedene Effekte im Organismus auslösen mit akuter oder chronischer Toxizität als Folge [116].

Durch einen selektiven Aufnahmemechanismus über die Zellmembran von Hepatozyten ist die Leber das Zielorgan der Microcystine [117, 118]. Die Inhibition der Proteinphosphatasen führt zu einer Überphosphorylierung der Intermediärfilamente des Cytoskeletts. Daraus ergeben sich morphologische Veränderungen der Leberzellen, die zu einer Instabilität des Lebergewebes führen. Eine akute Vergiftung mit Microcystinen führt daher im Zusammenwirken mit dem hydrostatischen Druck in den Blutgefäßen zu schweren intrahepatischen Blutungen, die zum Tode führen können.

Ein Fallbeispiel von akuten Vergiftungserscheinungen zeigte sich 1996 in der brasilianischen Stadt Caruaru. 126 Patienten eines Dialysezentrums, die mit cyanobakteriell verseuchtem Wasser behandelt worden waren, hatten akute neurotoxische und hepatotoxische Symptome. 60 Patienten verstarben [119].

Für den von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) vorgeschlagenen Grenz-

wert von 1 $\mu\text{g/L}$ Microcystin in Trinkwasser ist aber nicht so sehr die akute Toxizität der Microcystine entscheidend, sondern es stehen vielmehr die chronischen Vergiftungserscheinungen im Vordergrund. Unter Berücksichtigung eines Sicherheitsfaktors wurde der Trinkwassergrenzwert als die geringste Dosis bestimmt, die bei regelmäßiger Einnahme keine Langzeitschäden bewirkt [120].

Die chronische Toxizität von Microcystinen beruht auf ihrer Wirkung als Tumorpromotoren [121]. Vor allem die Inhibition der PP2A scheint dafür verantwortlich zu sein. PP2A reguliert intrazellulär den Phosphorylierungsgrad von mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Die Kinasen sind im phosphorylierten Zustand aktiv. Aktivierte MAPK kann in den Zellkern wandern und dort über Transkriptionsfaktoren Gene einschalten, die für das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung wichtig sind. Eine Inaktivierung der MAPK durch Dephosphorylierung kann bei Inhibition der PP2A nicht erfolgen, was zu einem unkontrollierten Zellwachstum und somit zur Entwicklung eines Tumors führen kann [116].

Studien aus China zeigen jedoch, dass eine chronische Aufnahme viel geringerer Konzentrationen, als die von der WHO vorgeschlagenen, zur Tumorentstehung beitragen können. In der chinesischen Bevölkerung wurde ein Zusammenhang zwischen dem häufigen Auftreten von primärem Leberkrebs und dem Bezug des Trinkwassers aus Bächen und Seen gefunden [122]. Einige der beprobten Wasserreservoirs zeigten bei der Analyse mit einem ELISA Konzentrationen zwischen 90 bis 460 ng/L Microcystin. Die Ergebnisse der Massenbeprobung zeigten, dass zur Absicherung gegen chronische Vergiftungen ein niedrigerer Grenzwert von 0.01 $\mu\text{g/L}$ für Microcystine ratsam wäre. Zudem wurde ein Zusammenwirken von Aflatoxin und Microcystin im Bezug auf die Entstehung von Lebertumoren festgestellt [123].

Enzymaktivitätstest Der Enzyminhibitionstest wird häufig homogen durchgeführt. Für eine Steigerung der Empfindlichkeit werden Enzym- und Probenlösung meist vorinkubiert. Anschließend wird die verbliebene Enzymaktivität durch Zugabe eines Substrats bestimmt, dessen enzymatisch umgesetztes Produkt detektiert werden kann. Die Inkubationszeit des Substrats hängt dabei von der Geschwindigkeit des Substratumsatzes und der Empfindlichkeit der Detektion ab.

Verschiedene Substrate sind in der Literatur für die Detektion der Enzymaktivität beschrieben worden. Ein Überblick von Proteinphosphatase-Inhibitionstests ist in Tab. 1.5 dargestellt.

Die Sensitivität der Assays nahmen mit abnehmender Enzymkonzentration zu [124] (siehe Tab. 1.6). Zu niedrig konnte die Enzymkonzentration allerdings nicht gewählt werden, da dann auch das Absorptionssignal des Substratumsatzes zu gering wurde. Ein Kompromiss zwischen signifikanter Absorption (durch hohe Enzymkonzentration) und guter Sensitivität (bei einer niedrigen Enzymkonzentration) muss also gefunden werden. Die Erklärung für die erhöhte Sensitivität bei niedriger Enzymkonzentration liegt in der stöchiometrischen Bindung und der starken Wechselwirkung von Enzym und Toxin [114].

Tabelle 1.5: IC₅₀-Werte für die Inhibition von Proteinphosphatasen durch Microcystin-LR. Die angegebenen Konzentrationen entsprechen denen in der Probe. (Tabelle nach [125])

| Enzym (Quelle) | IC ₅₀ [$\mu\text{g/L}$] MC-LR | Substrat (Detektion) | Zeit für Inhibition/- Substratumsatz | Referenz |
|--------------------------------|---|--|---|----------|
| PP1 (Kaninchenmuskel) | 1.7 | [³² P]-Phosphoprotein (Radioaktivität) | -/10 min (30°C) | [124] |
| PP1 (rekombinant) | 6 | pNPP (Absorption) | 4 min/40 min (37°C) | [126] |
| PP1 (rekombinant) | 38 | pNPP (Absorption) | 1 min/21 min (28°C) | [127] |
| PP1 α (rekombinant) | 0.7 | Phosvitin (Malachitgrün- Absorption) | 5 min/120 min (30°C) | [128] |
| PP1 α (Kaninchenmuskel) | 20 | pNPP (Absorption) | -/20 min (30°C) | [129] |
| PP1 (Kaninchenmuskel) | 0.15 | DiFMUP (Fluoreszenz) | 10 min/30 min (37°C) | [130] |
| PP1 (rekombinant) | 2 | pNPP (Absorption) | 5 min/108 min (37°C) | [131] |
| PP1 (rekombinant) | 0.12 | Fluoreszenzpeptid | 15 min/- (37°C) | [132] |
| PP2A (Kaninchenmuskel) | 0.04 | [³² P]-Phosphoprotein (Radioaktivität) | -/10 min (30°C) | [124] |
| PP2A (Kaninchenmuskel) | 0.5 | pNPP (Absorption) | 5 min/90 min (37°C) | [125] |
| PP2A (humane Erythrozyten) | 0.42 | pNPP | 8 min/60 min (37°C) | [133] |
| PP2A (Mäusehirn) | 5 | pNPP (Absorption) | 5 min/60 min (20°C) | [134] |
| PP2A (Mäusehirn) | 3 | [³² P]-Phosphorylase a (Radioaktivität) | 5 min/60 min (20°C) | [134] |
| PP2A (humane Erythrozyten) | 0.35 | DiFMUP (Fluoreszenz) | 10 min/30 min (37°C) | [130] |
| PP2A (humane Erythrozyten) | 0.13 | Fluoreszenzpeptid | 15 min/- (37°C) | [132] |
| PP2A (humane Leberzellen) | 0.46 | pNPP (Absorption) | 5 min/30 min (37°C) | [135] |

Tabelle 1.6: IC₅₀-Werte für die Inhibition von PP2A durch MC-LR bei variierender Enzymkonzentration. Daten entnommen aus [133]

| | | | | |
|-------------------------------|-----|------|------|------|
| PP2A-Konzentration [mU/mL] | 100 | 50 | 25 | 10 |
| IC ₅₀ [μ g/L] | 0.5 | 0.17 | 0.08 | 0.07 |

Ein klassischer Nachweis der Phosphataseaktivität ist die Endpunktsbestimmung von [³²P]-Phosphat, das aus ³²P-markiertem Substrat freigesetzt wurde. Als Substrat können physiologisch relevante Proteinsubstrate wie Phosphohiston oder Phosphorylase a eingesetzt werden, die mit radioaktivem Phosphat markiert wurden [124]. Für die Bestimmung der Aktivität wird nach einer gewissen Inkubationszeit die Proteinphosphatase durch Zugabe von Trichloressigsäure denaturiert. Nicht umgesetztes Substratprotein fällt aus. Die Radioaktivität des freien Phosphats in der Lösung wird dann durch Szintillationszählung bestimmt [106]. Beim Vergleich mit einer Blindprobe ohne Anwesenheit von Enzym kann die Enzymaktivität ermittelt werden.

Ein nicht radioaktiver Nachweis der PP-Aktivität basiert auf der Quantifizierung von freigesetztem anorganischem Phosphat durch Proteinphosphatasen [136]. Durch Malachitgrün und angesäuertem Phosphomolybdat bildet sich ein Farbkomplex, dessen Absorption bei 630 nm gemessen wird. Ein eingesetztes Substrat in dieser Form des PP-Inhibitionstests war Phosvitin [128], ein hoch phosphoryliertes Protein aus Eigelb. In einem anderen Assay wurde als natürliches, phosphoryliertes Substrat Casein zum Aktivitätsnachweis von PP2A eingesetzt [137] (siehe Abb. 1.14). Casein ist ein besseres Substrat der PP2A als der PP1 [106] (siehe Tab. 1.4). Phosphatspuren in den Proben beeinträchtigen diese Form des Aktivitätsnachweises. Realproben mussten beim colorimetrischen Phosphatnachweis von Phosphatspuren befreit oder stark verdünnt werden, um keine Interferenzen mit dem Nachweis der enzymatischen Freisetzung zu erhalten [128].

Eine andere Möglichkeit freigesetztes Phosphat mit Hilfe von Enzymen nachzuweisen, wurde anhand eines 2-Amino-6-mercapto-7-methylpurin-ribonukleosids als Substrat gezeigt. In Anwesenheit von Phosphat spaltet das Enzym Purinukleosid-ortho-phosphat-ribosyltransferase den Purinbasenrest von der Ribose ab, wobei sich der Extinktionskoeffizient des umgesetzten Substrats ändert [138]. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass keine extremen pH-Werte wie beim Malachitgrünassay zur Signalbildung Voraussetzung sind. Stark saure pH-Werte führen in bioanalytischen Experimenten zum Ausfallen von Proteinen aus der Probenlösung. Mit dem Purin-ribonukleosid als Substrat konnten die Aktivitäten sowohl von PP1 als auch von PP2A nachgewiesen werden [139].

Der wohl am häufigsten durchgeführte Enzymaktivitätstest für Proteinphosphatasen erfolgt durch eine spektrophotometrische Bestimmung der enzymatischen Hydrolyse von *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP) [125, 126, 127, 129, 131, 133, 134, 135] (siehe Abb. 1.15, a). pNPP wird zu *para*-Nitrophenolat umgesetzt, dessen Absorptionsmaximum bei 405 nm liegt, mit einem Extinktionskoeffizienten von $16\,500\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [106]. Da es sich bei pNPP um ein unspezifisches Substrat handelt, kann es nur zum Aktivitätsnachweis von gereinigten Proteinphosphatasen dienen. Der Vorteil von pNPP als Substrat liegt darin, dass es billig,

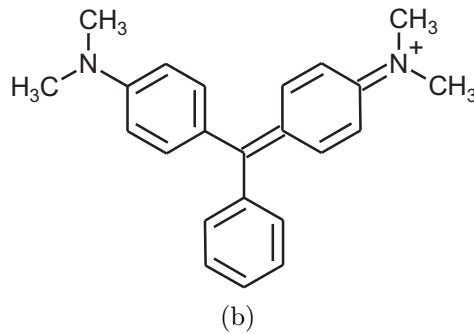
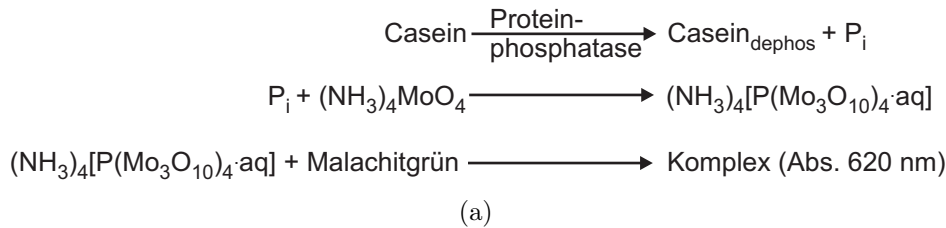


Abb. 1.14: Nachweis der Enzymaktivität mit dem natürlichen Substrat Casein. Das phosphorylierte Casein wird durch Proteinphosphatasen dephosphoryliert (a). Das freiwerdende anorganische Phosphat wird durch Reaktion mit Malachitgrün (b) anhand der Absorption des sich bildenden Komplexes bei 620 nm nachgewiesen.

leicht erhältlich und einfach zu handhaben ist. Die Sensitivität des Nachweises ist schlechter als im radioaktiven Testformat, bei dem natürliche Substrate verwendet werden [134].

Weitere künstliche Substrate ändern ihre Fluoreszenzeigenschaften nach enzymatischer Hydrolyse eines Phosphatrestes. 4-Methylumbelliferylphosphat (MUP) und Fluoresceindiphosphat (FDP) (siehe Abb. 1.15, b und d) wurden als Substrate für einen PP2A-Aktivitätstest miteinander verglichen [140] und zeigten keine Unterschiede in ihrer Sensitivität.

Eine empfindlichere Detektion der PP-Aktivität konnte mit dem fluorogenen Substrat 6,8-Difluoro-4-methylumbelliferyl-phosphat (DiFMUP) (siehe Abb. 1.15, c) erreicht werden [130]. Das Hydrolyseprodukt 6,8-Difluoro-4-methylumbelliferyl (DiFMU) hat einen niedrigeren pK_a -Wert ($pK_a=4.7$) als das Hydrolyseprodukt von MUP ($pK_a=7.8$) und somit bei dem optimalen pH-Wert für PP1 und PP2A von pH 7.0 auch eine höhere Fluoreszenzquantenausbeute [141]. Die Dephosphorylierung von DiFMUP durch PP2A war um das fünffache größer als die durch PP1 [130].

Ein weiteres Fluoreszenzsubstrat ist die Anwendung eines fluoreszenzmarkierten Phosphopeptids als Substrat. NOBLE et al. [132] führten in der Nähe eines phosphorylierten Threonins einen Fluoreszenzfarbstoff in ein Substratpeptid ein. Das Fluoreszenzsignal veränderte sich nach Phosphorylierungsstatus. Eine Dephosphorylierung führte durch Quenchen zu einer über 50%igen Abnahme des Fluoreszenzsignals. Inhibitionskurven von PP1 und PP2A mit MC-LR, Okada-säure und Nodularin konnten bestimmt werden. Das natürliche Substrat Phosphorylase a hat einen K_m -Wert von 14 μM , im Vergleich dazu hat das in [132]

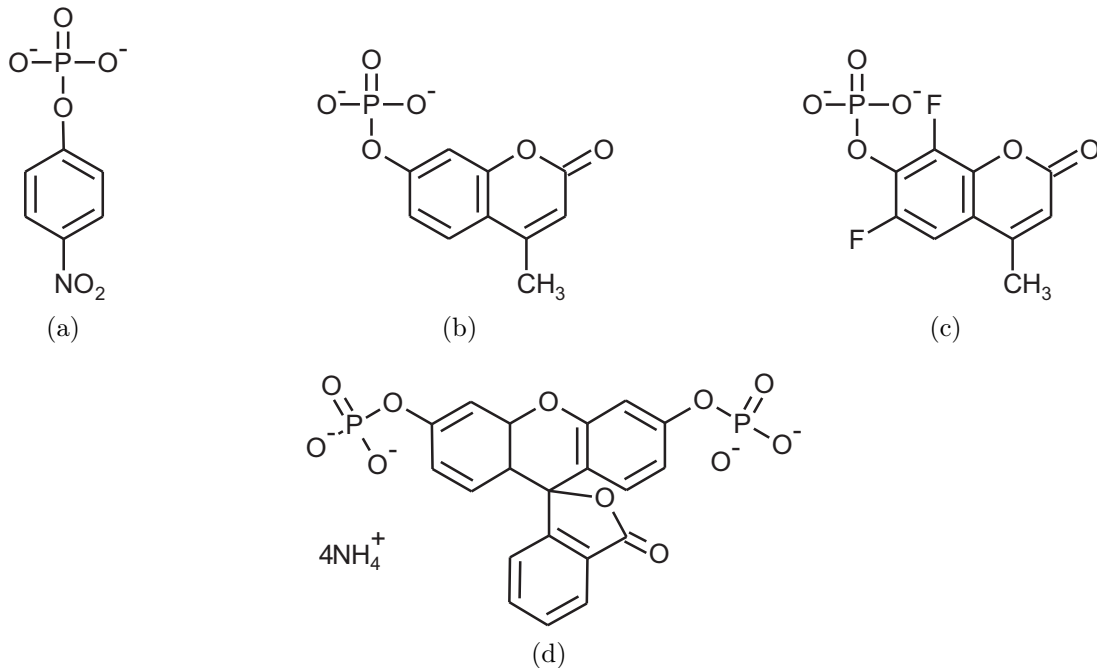


Abb. 1.15: Künstliche Substrate für den Aktivitätsnachweis von Proteinphosphatase. In Klammern sind jeweils die Absorptions- bzw. die Anregungs- und Emissionswellenlängen angegeben. (a) para-Nitrophenylphosphat (pNPP, $\lambda_{max}=405$ nm) (b) 4-Methylumbelliferyl-phosphat (MUP, $\lambda_{ex}=360$ nm, $\lambda_{em}=449$ nm) (c) 6,8-Difluoro-4-methylumbelliferyl-phosphat (DiFMUP, $\lambda_{ex}=358$ nm, $\lambda_{em}=455$ nm) (d) Fluoresceindiphosphat (FDP, $\lambda_{ex}=490$ nm, $\lambda_{em}=514$ nm)

synthetisierte Substrat einen Wert von $11.4 \mu\text{M}$. Das bedeutet keine Einschränkung in der katalytischen Effizienz durch das künstliche Substrat.

Neben den homogenen Enzymaktivitätstests werden vereinzelt heterogene Testformate zur Bestimmung der Proteinphosphataseinhibition durchgeführt.

Von YANG et al. [142] wurde ein auf Oberflächen-Plasmonen-Resonanz basierender Biosensor vorgestellt. Die Inhibition von kovalent an der Oberfläche gebundener PP2A durch Microcystin konnte anhand der Bindung zum Substrat Phosphorylase a untersucht werden.

Ein elektrochemischer Nachweis im Proteinphosphataseassay wurde von CAMPAS et al. [143] vorgestellt. Es wurde ein amperometrischer Biosensor entwickelt, bei dem das Enzym in Polyvinylalkohol mit Styrylpyridingruppen per Siebdruckverfahren auf Kohlenstoffelektroden immobilisiert wurde. Die Immobilisierung brachte eine Stabilisierung der Enzymaktivität hinsichtlich der Lagerung im Vergleich zu freien Lösungen, wie mit einem colorimetrischen Test nachgewiesen werden konnte. Die Nachweisgrenzen von Inhibitionstests mit MC-LR verschlechterten sich jedoch im Vergleich zur freien Lösung vermutlich aufgrund von Diffusionsbarrieren. Verschiedene Substrate wurden in cyclischen Voltammetrieanalysen eingesetzt. Die enzymatisch umgesetzten Substrate wurden nach Dephosphorylierung durch die Oxidationspotentiale registriert. Die elektrochemische Detektion der Inhibition von PP2A durch MC-LR lieferte nach Optimierungen mit Ca-

Tabelle 1.7: IC₅₀-Werte von Microcystinen im PP1- und PP2A-Inhibitionsassay [135, 146] und Toxizitätsdaten basierend auf der letalen Dosis für 50% der Mäuse bei Injektion in die Bauchhöhle (intraperitoneal) [147]. (n.b.=nicht bestimmt)

| Microcystin | PP1 [146] IC ₅₀ [nM] | PP2A [135] IC ₅₀ [nM] | LD ₅₀ [μ g/kg i.p.] |
|-------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| LW | 160 | 0.29 | n.b. |
| LY | 100 | 0.34 | 90 |
| LR | 47 | 0.46 | 50 |
| LA | 100 | 0.56 | 50 |
| LF | 80 | 0.57 | n.b. |
| RR | n.b. | 0.60 | 600 |
| YR | 70 | 0.84 | 70 |

techolmonophosphat einen IC₅₀-Wert von 0.9 μ g/L bei Zeitspannen von jeweils 30 min für Inhibition und Substratumsatz [144].

Inhibitorische Effekte einer Probe, die mittels der Enzyminhibition bestimmt wurden, werden üblicherweise in Äquivalenten von MC-LR angegeben. Nicht alle Microcystinvarianten hemmen Proteinphosphatasen gleich stark (siehe Tab. 1.7). Als Folge der variierenden IC₅₀-Werte können PP-Inhibitionsassays keine quantitativen Ergebnisse liefern, z.B. falls eine Probe mehrere Microcystinvarianten beinhaltet. Die Konzentration von weniger aktiven Microcystinen würde unterschätzt und die von aktiveren Microcystinen überschätzt werden. Zudem können beispielsweise cyanobakterielle Proben selbst Phosphataseaktivitäten besitzen, die die Anwesenheit von Toxinen maskieren könnten [145].

Nicht nur die Bestimmung von Konzentrationen, sondern auch das Abschätzen einer potentiellen Giftigkeit durch PP-Inhibitionstests muss mit Vorsicht geschehen, wie ein Vergleich der IC₅₀-Werte und LD₅₀-Werte in Tab. 1.7 zeigt. MC-RR mit einem LD₅₀ von 600 μ g/kg wirkt *in vivo* sehr viel weniger toxisch als das MC-LR mit einem LD₅₀ von 50 μ g/kg. Im PP2A-Inhibitionstest entfalten sie jedoch eine annähernd gleiche inhibitorische Wirkung. Auf der anderen Seite ist MC-YR mit einem LD₅₀ von 70 μ g/kg genauso toxisch wie MC-LR. Im Enzyminhibitionstest stellte es sich allerdings als das am wenigsten aktive Toxin heraus.

Der Enzyminhibitionstest nimmt keine Rücksicht auf die Toxikinetik und Toxodynamik der Microcystine *in vivo*. Eine Wirkungsbezogene Analyse mit Proteinphosphatasen als Zielstrukturen in der Detektionseinheit kann also nicht die absolute Toxizität der Probe auf einen Organismus wiedergeben. Dennoch ist der Einsatz von Proteinphosphatasen gerade hinsichtlich der Strukturvielfalt der Microcystine sinnvoll, um potentielle Schadstoffe anzeigen zu können, die aufgrund fehlender Standardreagenzien ansonsten unerkant bleiben würden.

Eine Verknüpfung von struktureller Information und toxischem Effekt wurde von METCALF et al. [146] dargestellt. Durch die Kombination von ELISA und PP-Inhibitionstest wurde die unspezifische Deaktivierung des Enzyms erkannt. Microcystin-LR-Antiserum wurde zur Probenlösung vor Durchführung des Enzymassays zugegeben. Die Bindung von Antigen und Antikörper reduziert die inhibitorische Wirkung auf PP1. Die Differenz der Hemmung konnte dann spezi-

fisch dem MC-LR in der Probe zugeordnet werden.

Eine andere Methode für eine spezifische Inhibition der Proteinphosphatasen durch Microcystine zu sorgen, wurde durch eine dem Enzymassay vorangehende Immunoextraktion durchgeführt [148]. Neben der Entfernung von störenden Matrixeffekten konnten die zu testenden Analyten in den Proben um einen Faktor zehn angereichert werden. Die Immunoextraktion wurde offline an immobilisierten polyklonalen Anti-Microcystin-LR-Antikörpern durchgeführt. Dadurch konnten im PP2A-Inhibitionstest vor allem die falsch-positiven Ergebnisse reduziert werden.

Für eine Wirkungsbezogene Analyse ohne den störenden Einfluss von Kreuzreaktivitäten in der Immunoextraktion ist es jedoch vielversprechender, eine chromatographische Trennung vor dem Enzyminhibitionstest durchzuführen.

Von ZECK et al. [21] wurde eine mehrdimensionale Detektion von Microcystin-haltigen Proben nach Trennung mit HPLC vorgestellt. Neben der Detektion der spektralen Absorption mit einem Photodiodenarray wurde das auf Mikrotiterplatten fraktionierte Eluat parallel mit ELISA und PP1-Inhibitionstest untersucht. Positiv getestete Proben wurden mit einem Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer (ESI-TOF-MS) identifiziert.

Ein weiterer Inhibitionstest mit PP2A wurde von ORTEA et al. [149] nach einer RP-HPLC offline eingesetzt. Die massenspektrometrische Untersuchung mit einem Tandem-MS konzentrierte sich dann auf die positiv getesteten Fraktionen. In Proben aus einem irischen See konnten so MC-LR und MC-LA identifiziert werden.

Zusammenfassung Aufgrund ihrer großen Bedeutung bei der Signalübermittlung in Zellen sind Proteinphosphatasen bedeutsame Zielstrukturen für einen Einsatz in der Wirkungsbezogenen Analyse.

Interessant ist eine Untersuchung von cyanobakteriellen Proben mit einem wirkungsbezogenen Detektor, da die in Cyanobakterien auftretenden Microcystine potente Inhibitoren der Proteinphosphatasen sind. Aufgrund der strukturellen Vielfalt und fehlender Standards ist eine physikochemische Analyse aufwendig. Mit einem online messenden Proteinphosphatase-Inhibitionsdetektor mit paralleler massenspektrometrischer Detektion könnten bisher verborgen gebliebene Strukturen anhand ihres inhibitorischen Signals aufgezeigt werden. Bisher wurden dazu nur Offline-Experimente durchgeführt. Limitierend für eine Online-Durchführung der Enzyminhibitionstests ist vor allem die Verfügbarkeit der Enzyme. Während PP1 schon in rekombinanter Form kommerziell erhältlich ist, ist dies bei PP2A nicht der Fall. In den vorgestellten Experimenten wurde bisher nur in [143] genetisch veränderte, humane PP2A aus mit Baculoviren infizierten Insektenzellen eingesetzt. Eine weitere Einschränkung eines Online-Detektors sind die geringen Umsatzgeschwindigkeiten der verwendeten Substrate. Eine Verkürzung der Reaktionszeiten geht dabei meist auf Kosten der Empfindlichkeit des Detektors.

1.4.3 Leucht Bakterien

Neben dem Einsatz von Enzymen, die selektiv auf die jeweiligen Giftstoffe reagieren, können Leucht Bakterien als Signalgeber für eine Gesamtoxizitätsmessung in der Wirkungsbezogenen Analyse eingesetzt werden.

Fische, Ratten, Mäuse und Wasserflöhe werden neben Pflanzen und Algen als Testorganismen für Toxizitätsmessungen verwendet [3]. Der Hauptnachteil der Toxizitätstests mit Tieren und Pflanzen liegt in der Standardisierung der Organismen, der speziellen Ausrüstung, einer langen Expositionszeit bei großem Probenvolumen und einer nur mäßigen Reproduzierbarkeit.

Im Vergleich dazu können mikrobielle Bioassays mit einfachen Mitteln schnell und kostengünstig durchgeführt werden [150]. Eine große Anzahl an Tests, basierend auf mikrobielle Organismen, werden für das Toxizitätsscreening von Abwässern eingesetzt.

Bioassays mit Bakterien als Testorganismen können anhand ihres Detektionsprinzips in fünf Klassen unterteilt werden [151]. Beobachtet werden in den Assays das Wachstum der Population, der Verbrauch an Substrat, die Zellatmung, die Inhibition von ATP-abhängiger Lumineszenz und die Inhibition von Biolumineszenz.

Das am häufigsten eingesetzte biolumineszierende Bakterium ist *Vibrio fischeri*. Dabei handelt es sich um ein Gram-negatives Bakterium, das Meeresbewohner besiedelt. Daneben sind noch andere biolumineszierende maritime Gattungen wie *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium leiognathi*, *Vibrio logei* und *Vibrio harveyi* bekannt [152].

Biolumineszenz ist Licht, dass von einigen Organismen während ihres Stoffwechsels durch Oxidation des Substrats Luciferin unter Einwirken des Enzyms Luciferase oder anderer Photoproteine erzeugt wird [153].

In *Vibrio fischeri* wird die Lumineszenzerscheinung nach einer komplexen biochemischen Reaktion erzeugt, die vereinfacht in Abb. 1.16 dargestellt ist. Luciferase katalysiert die Oxidation des bakteriellen Luciferins, eines reduzierten Riboflavinphosphats (FMNH₂) und eines langkettigen Aldehyds (RCHO) zu einem oxidierten Flavinmononucleotid und einer Fettsäure (RCOOH). Dabei wird blau-grünes Licht mit einem Emissionsmaximum bei 490 nm abgegeben [154]. Mit einem passenden Detektor wie Photomultiplier, Photodiode oder empfindlichem Film wird die Lichtemission erfasst [155].



Abb. 1.16: Schema der biochemischen Reaktion, die zur Lichtemission in *Vibrio fischeri* führt [153].

Die bakterielle Lumineszenz ist eine sehr empfindliche Methode, um toxische Verunreinigungen von Proben zu bestimmen [156]. Üblicherweise werden die Leucht Bakterientests bei 15°C, einem pH-Wert von 7.0 und einem 2%igen Natriumchloridgehalt durchgeführt.

Die Intensität des Leuchtsignals hängt jedoch stark von der Zelldichte ab. Um zwischen einer Abnahme der Lumineszenz aufgrund zunehmender Kontamination

oder abnehmender Zelldichte zu unterscheiden, wird die Zelldichte durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 670 nm bestimmt. Eine parallele Bestimmung der Intensität der Biolumineszenz und der Zelldichte online und in situ wurde von BENDRIAA et al. [157] mit faseroptischen Instrumenten an einem Bioreaktor gezeigt. Da die Lumineszenzreaktion Sauerstoff verbraucht, beeinflusst auch der Sauerstoffgehalt der Probe die Leuchtkraft der Bakterien und sollte neben pH-Wert und Temperatur konstant gehalten werden.

Ein Vergleich des Einflusses verschiedener Chemikalien auf die Biolumineszenz der Bakterien wird durch die Bestimmung von EC_{50} -Werten aus Konzentrationsreihen vorgenommen. Der EC_{50} -Wert gibt dabei die effektive Konzentration des Giftstoffs an, bei dem die Intensität der Biolumineszenz im angegebenen Expositionszeitraum um fünfzig Prozent reduziert wird [150]. KAISER [158] konnte zeigen, dass eine sehr gute Korrelation der EC_{50} -Werte basierend auf *Vibrio fischeri*-Tests mit LC_{50} -Werten besteht, die aus anderen aquatischen Spezies wie Regenbogenforellen, Goldfischen, Daphnien, Geiseltierchen oder Algen gewonnen wurden. Beim Vergleich mit Säugetieren sind die LD_{50} -Werte natürlich abhängig vom Aufnahmeweg der Chemikalien. Beim Vergleich von oraler, intraperitonealer oder intravenöser Aufnahme wurden die geringsten LD_{50} -Werte intravenös erreicht und korrelieren am besten mit den EC_{50} -Werten des Leuchtbakterientests.

Verschiedene Mechanismen führen zu einer Änderung der Intensität des Biolumineszenzsignals [159]. Zum einen können echte Toxizitätserscheinungen auftreten, die durch Struktur-Wirkungsbeziehungen entschlüsselt werden können [160]. Dies können beispielsweise Wechselwirkungen mit Rezeptoren an der Zelloberfläche, eine Störung der Membranfunktion der Zelle, chemische Reaktionen mit Zellkompartimenten oder die Hemmung von Enzymsystemen sein.

Andererseits können auch physikalisch-chemische Mechanismen zu einem geringeren Biolumineszenzsignal führen [159]. Zum Beispiel verändert die Anwesenheit von Schweratomen in der Probe die Singulett-Triplett-Übergangsrate. Durch die Anwesenheit von metallischen Salzen kann es zu einer veränderten Übertragung von Elektronen und Ladungen in den beteiligten Reaktionen kommen. Einen bedeutenden Einfluss auf enzymatische Prozesse nehmen Kationen auf Elektronendonoren wie Schwefelatome und Thiolgruppen in Proteinen. Neben den Probeninhaltsstoffen kommt es zu zusätzlichen Abweichungen in den Messergebnissen der Leuchtbakterientests durch Variationen in den Messprozeduren und unterschiedlichen verwendeten Reagenzien. Es werden flüssig- und gefriergetrocknete Bakterienproben verwendet, die unterschiedlich rekonstituiert werden [161].

Verschiedene standardisierte Testsysteme können mitsamt zugehöriger Ausrüstung kommerziell erhalten werden. Ein Vergleich von drei kommerziellen Leuchtbakterientests zur Einstufung der Toxizität wurde von JENNINGS et al. [161] vorgestellt. In einer Toxizitätsstudie über 81 Chemikalien wurden die mit Microtox[®] (Azur Environmental), LUMISTox[®] (Hach-Lange) und ToxAlert 10[®] (Merck) ermittelten Ergebnisse unter standardisierten Messbedingungen verglichen. Dabei konnten ähnliche Ergebnisse reproduzierbar mit allen drei Testformaten erhalten werden, sofern ein Operator unter strikter Einhaltung der Standards die Tests ausführte.

Problematisch bei der Bestimmung der Toxizität einiger Proben ist zum einen die teilweise geringe Löslichkeit der Chemikalien in Wasser und zum anderen ein

variierender Salzgehalt [161, 162]. Die Anwesenheit von Lösungsmitteln führt zu einer Überbewertung der Toxizität einer Probe. Mit LUMISTox® wurde z.B. für Methanol ein EC₅₀-Wert von 88 500 ppm und für Ethanol 32 400 ppm ermittelt [161]. Ethanol hat somit eine stärker hemmende Wirkung auf die Leuchtakterien gezeigt als Methanol.

Da es sich um maritime Bakterien handelt, wird ein gewisser Salzgehalt für die metabolische Aktivität benötigt [162]. Eine hohe und stabile Biolumineszenzintensität konnte beobachtet werden, wenn bei 15°C und einem pH-Wert von 7.0 die NaCl-Konzentration zwischen 0.3–0.5 M im Probenvolumen lag. In einer 0.1 M NaCl-Lösung konnte genauso wie bei Konzentrationen von mehr als 1 M NaCl kein Lumineszenzsignal detektiert werden. Beim Testen von Süßwasserproben muss somit durch Zugabe von Natriumchlorid auf die Einhaltung der optimalen Salinität geachtet werden.

Die Anwendung des Leuchtbakterientests ist sehr vielseitig [151]. Nicht nur Oberflächen- und Grundwasserproben, sowie komplexe Abwässer wurden untersucht [19]. Auch ein Toxizitätstest von Sedimentproben unter Verwendung von Filtrationssäulen ist möglich [163].

Mit Leuchtakterien als alleiniges Testsystem in der Wirkungsbezogenen Analyse läuft man Gefahr, systematisch manche Schadstoffe zu übersehen, die durch die große inhibitorische Wirkung der Matrix, wie z.B. Schwefel, maskiert werden [19]. Systembedingt kann die Hemmung des Photosystems II mit dem Leuchtbakterientest nicht erfasst werden. Bestimmte Herbizidklassen wie Atrazin bleiben mit diesem Detektionsprinzip unerkannt [5]. Antagonistische und synergistische Effekte sind komplizierende Faktoren, die die Toxizität einer Probe dramatisch verändern können.

FIA-Methoden oder Nachsäulenreaktionen zur Hemmung der Biolumineszenz von Leuchtakterien gekoppelt an eine chromatographische Trennung sind in der Literatur bisher nicht bekannt. In einer beschriebenen Kombination von Chromatographie und Leuchtbakterientest wurde HPLC-Eluat, das im Diodenarraydetektor ein Signal zeigte, auf Mikrotiterplatten fraktioniert und auf einen Effekt gegen *Vibrio fischeri* getestet [164]. Es erfolgte keine kontinuierliche Erfassung der Gesamttoxizität, wie es mit einem Online-Detektor möglich wäre. Ein offline durchgeführter Leuchtbakterientest wurde von FIEHN et al. [165] durch wiederholtes Fraktionieren nach einer schrittweisen Festphasenextraktion auf einer Mikrotiterplatte gezeigt.

Ähnlich wie bei den Acetylcholinesterasen wurde mithilfe von gentechnologischen Mitteln versucht, eine spezifische Toxizität untersuchen zu können. Rekombinante Stämme von *Escheria coli* mit modifizierten Genen für die Biolumineszenzerzeugung wurden in einem Mehrkanalsystem kultiviert, um kontinuierlich verschiedene Toxizitätsklassen bestimmen zu können [166, 167]. Eine Injektion eines Gemisches von Giftstoffen zeigte in jedem Kanal eine spezifische Veränderung der Intensität des Biolumineszenzsignals aufgrund der Zelltoxizität. Die untersuchten Toxizitätsklassen umfassten DNA-, Protein- und Zellmembranzerstörende Reagenzien. Die Biolumineszenz konnte sowohl aus-, als auch angeschaltet werden durch die Anwesenheit von toxischen Verbindungen. Das Detektionssystem umfasste einen zweistufigen Minibioreaktor. Der erste Reaktor regulierte das Zellwachstum, indem kontinuierlich frische Bakterien zugegeben

wurden. Im zweiten Reaktormodul wurden die pulsweise injizierten Proben mit den Leuchtbakterien vermischt und der Toxizitätstest ausgeführt.

Zusammenfassung Die Gesamtheit toxischer Effekte könnte in einer Wirkungsbezogenen Analyse von einem auf Leuchtbakterien basierenden Detektor erfasst werden. In der Literatur sind jedoch bisher keine online messenden Leuchtbakterieninhibitionstests nach einer chromatographischen Trennung beschrieben worden. Ein Hindernis ist die Instabilität der Leuchtbakterien sowohl gegen Lösungsmittel, als auch gegen Messbedingungen, die von ihren natürlichen Lebensbedingungen abweichen, wie zu hohe Temperaturen oder zu niedrige Salinität. Neben der Gesamttoxizität konnte mit gentechnisch veränderten Bakterien eine selektive Toxizität nachgewiesen werden. Dies ist gerade hinsichtlich einer mehrdimensionalen Wirkungsbezogenen Analyse erstrebenswert.

2 Nachsäulenreaktoren in der Flüssigkeitschromatographie

Die Entwicklung von Nachsäulenreaktoren in der Flüssigkeitschromatographie nahm ihren Anfang in der Aminosäureanalytik. Der Aufbau einer online durchgeführten Ninhydrinderivatisierung wurde schon 1948 von MOORE et al. [168] beschrieben. Mit der Nachsäulenderivatisierung werden generell vor allem zwei Ziele verfolgt. Zum einen soll die Sensitivität gegenüber konventionellen Detektoren gesteigert werden. Zum anderen soll die Selektivität durch eine spezifische Reaktion erreicht werden. Für die Wirkungsbezogene Analyse spielt vor allem die selektive Detektion toxikologisch relevanter Reaktionen eine Rolle. Die Empfindlichkeit der Detektion ist von geringerer Bedeutung, da bei sehr niedrigen Konzentrationen der Giftstoffe ohnehin keine relevante biologische Aktivität mehr nachgewiesen werden kann.

Verschiedene Reaktionstypen wie z.B. (photo-)chemische Derivatisierungen oder Enzymreaktionen konnten in Nachsäulenreaktoren umgesetzt werden [169, 170, 171]. Unterschiedliche Detektionsmethoden und Reaktionszeiten setzen verschiedene Bauweisen der Reaktoren voraus. Im Folgenden werden zunächst die Aspekte beleuchtet, die aus hydrodynamischen Gesichtspunkten beim Aufbau eines Nachsäulendetektors berücksichtigt werden müssen. Des Weiteren werden Designs der Nachsäulenreaktoren mit Anwendungsbeispielen aus der Literatur besprochen, wobei der Schwerpunkt auf eine Anwendung in der Wirkungsbezogenen Analytik gelegt wird.

2.1 Anforderungen an die Hydromechanik der Nachsäulenreaktoren

Für den Aufbau eines Nachsäulenreaktors für die Flüssigkeitschromatographie müssen einige fluidische Details berücksichtigt werden, die im Folgenden näher erläutert werden. Für die Wirkungsbezogene Analyse wird mit HPLC ein Gemisch potentieller Giftstoffe getrennt, die anschließend mit Zielmolekülen von toxikologischer Relevanz zur Reaktion gebracht werden. Die Reaktion zwischen Eluat und Reagenzien läuft in einem Reaktor ab. Anschließend erfolgt eine Online-Detektion der Reaktion. Neben einer Miniaturisierung des Systems müssen Überlegungen bezüglich der Flüssigkeitsbeförderung, der Dispersion und des Mischens angestellt werden.

2.1.1 Miniaturisierung

Die Reaktionen der Nachsäulenreaktoren erfordern in den meisten Fällen die Zugabe von Reaktanden. Ansätze miniaturisierter Reaktoren werden auf sogenannten *Lab-on-a-Chip*-Systemen oder auch μ TAS-Systemen (*Micro Total Analysis Systems*) verwirklicht [172, 173, 174], aber auch in Kapillarreaktoren durchgeführt [175]. μ TAS-Reaktoren werden eingesetzt für Derivatisierungen, für den Substratnachweis bei Enzymreaktionen, für DNA-Analysen, für die Zellsortierung und bei diagnostischen Fragestellungen, die beispielsweise den Zellmetabolismus betreffen [176].

Eine Kopplung dieser mikrofluidischen Systeme an eine chromatographische Trennung wurde bisher jedoch nur in Einzelfällen beschrieben. Dabei handelt es sich meist um die Kopplung des Nachsäulenreaktors an eine Trennung der Analyten mittels Kapillarelektrophorese.

So wurde von HADD et al. [35] ein mikrofluidischer Assay vorgestellt, um Inhibitoren der Acetylcholinesterase nach elektrophoretischer Separation erfassen zu können. Die Trennung des Probengemisches wurde direkt in Enzympuffer durchgeführt. Die Enzymaktivität wurde durch elektrokinetisches Zudosieren des Substrates Acetylthiocholinchlorid und des Reagenzes Coumarinphenylmaleimid durch Laser-induzierte Fluoreszenz erfasst. Die Trennung von vier Inhibitoren und die Detektion des Substratumsatzes erfolgte dabei innerhalb von nur 70 s.

Eine Miniaturisierung der Nachsäulenreaktoren reduziert den Verbrauch an Reagenzien. Dies ist nicht nur aus Kostengründen von Vorteil, sondern auch wegen der teilweise geringen Verfügbarkeit von Biomolekülen, wie speziellen Enzymen, sinnvoll. Eine Miniaturisierung der Reaktionsvolumina ist daher gerade in der Wirkungsbezogenen Analytik erstrebenswert.

Durch Miniaturisierung wird die Reaktionszeit wegen kürzerer Diffusionswege verkürzt [177, 176]. Ein weiterer Vorteil der Minireaktoren ist dabei auch eine Vereinfachung und Beschleunigung von Heiz- und Kühlvorgängen aufgrund der geringeren Volumina.

Die Miniaturisierung erfordert jedoch ein Umdenken in der Detektionstechnik, da die Detektionsvolumina von einigen Mikrolitern auf wenige Nanoliter reduziert sein können. Konventionelle Detektoren wie Absorptions- oder Fluoreszenzmessungen mit einfachen Lichtquellen sind oft zu wenig empfindlich. Laser-induzierte Fluoreszenzmessungen oder Fluoreszenzpolarisationsmessungen sind daher geeignete Detektionstechniken für miniaturisierte Reaktionssysteme [178].

Mit der Miniaturisierung wird jedoch auch das Mischen von Reagenzien zum Analyten zunehmend zum Problem (siehe Abschnitt 2.1.4).

2.1.2 Flüssigkeitsbeförderung

Zur Beförderung der Reagenzien im Nachsäulenreaktor können je nach hydrodynamischen Gegebenheiten verschiedene Pumpentypen eingesetzt werden [179]. Bei den mechanischen Pumpentypen werden dynamische Pumpen, bei denen dem System kontinuierlich Energie zugeführt wird, von Verdrängerpumpen unterschieden, bei denen periodisch Energie zugeführt wird [179]. Ein Überblick über verschiedene Möglichkeiten der Flüssigkeitsbeförderung in miniaturisierten Systemen auf Chipebene findet sich in Literatur [176] und [179].

Zu den dynamischen Pumpen gehören Ultraschall- und Zentrifugalpumpen. Ein Flussbereich zwischen $10 \mu\text{L}/\text{min}$ bis zu einigen mL/min wird im Allgemeinen durch die Verdrängerpumpen abgedeckt. Zu ihnen gehören Kolbenpumpen, peristaltische Pumpen und Zahnringpumpen.

Geringere Flussraten in einem Bereich von nL/min werden für die *Lab-on-a-Chip*-Anwendungen benötigt und in der Regel nicht durch mechanische Pumpen, sondern durch Elektroosmose, Elektrophorese und auch magnetohydrodynamisches Pumpen befördert [180].

Ein Vorteil der nichtmechanischen Pumpen ist das Ausbilden einer Propfströmung im Kanal. Eine elektrische Doppelschicht wird durch ein externes elektrisches Feld bewegt. Wegen der Viskosität des Mediums bildet sich über den ganzen Querschnitt eine einheitliche Fließgeschwindigkeit aus, die in einer Propfströmung resultiert [181].

Im Gegensatz dazu bildet sich bei mechanisch bewegten Flüssigkeiten eine parabolische Verteilung der Fließgeschwindigkeit mit der höchsten Geschwindigkeit an der Achse des Kanals aus, was in einer Dispersion von Analyten entlang der Fließrichtung resultiert (siehe Abschnitt 2.1.3).

Aufgrund der Dispersion wären nichtmechanische Pumpen zu bevorzugen, jedoch ist die Kompatibilität und die praktische Handhabung mit elektrokinetischer Flussbeförderung aufwendiger. Neben Überlegungen zur Dispersion spielen aber auch Parameter wie aufzubringender Rückdruck und Pulsation eine Rolle bei der Auswahl der geeigneten Pumpentypen für den jeweiligen Nachsäulenreaktor.

Eine Kontrolle des Flusses erfordert je nach Flussrate unterschiedliche Messprinzipien [179]. Während bei größeren Flussraten im hohen mL/min -Bereich noch durch mechanisch bewegte Teile die Flussrate bestimmt werden kann, wird bei mikrofluidischen Anwendungen meist auf thermische Flusssensoren zurückgegriffen. Dabei wird die Aufheizrate anhand eines definierten Volumens in Abhängigkeit von der Flussrate erfasst. Der Flusssensor der Firma Sensirion, der in dieser Arbeit eingesetzt wurde, misst beispielsweise thermoelektrisch auf der CMOS-Technologie basierend, die eine Miniaturisierung des Flusssensors ermöglicht.

Eine weiteres Problem kann bei manchen Pumpentypen auch die Thermostatisierung der Reagenzien sein. Gerade für wertvolle Biomoleküle, wie sie in der Wirkungsbezogenen Analyse eingesetzt werden, ist es aber notwendig, konstante Temperaturen halten zu können. Spritzenpumpen sind zum Beispiel nur schwer zu thermostatisieren. Einen Ausweg bietet die Verwendung sogenannter *Super-loops* als Vorratsbehälter für die zu befördernden Flüssigkeiten. Die Schläuche werden bequem thermostatisiert, die Reagenzien werden durch das Pumpen von Verdrängerflüssigkeit befördert [53].

2.1.3 Dispersion

Die Geschwindigkeit des Volumenstroms in Rohren ist entlang des Querschnitts nicht einheitlich. In welcher Form sich die Geschwindigkeitsvektoren in Abhängigkeit von der Position verändern, hängt von der Art des Flusses ab. Man muss dabei laminaren und turbulenten Fluss unterscheiden [182].

Reibungskräfte aufgrund der Viskosität lassen die Geschwindigkeit der Flüs-

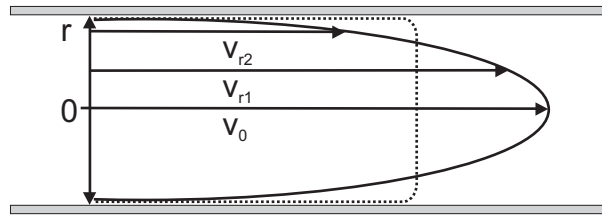


Abb. 2.1: Verteilung der Geschwindigkeitsvektoren v bei laminarer (durchgezogene Linie) und turbulenter (gestrichelte Linie) Strömung in Abhängigkeit des Reaktorradius r . Es resultiert ein parabolisches Strömungsprofil im Fall des laminaren Flusses und eine Propfströmung im Fall des turbulenten Flusses.

sigkeit am Kontaktpunkt mit einer festen Wand gleich Null werden. Die höchste Geschwindigkeit herrscht im Zentrum des Rohrs.

Bei einem turbulenten Fluss findet aufgrund der chaotischen Bewegung und des Vermischens der Moleküle ein Transfer der Kraftmomente zwischen den Molekülen statt. Als Ergebnis ist die Geschwindigkeit der Flüssigkeit einheitlicher verteilt und man erhält eine Propfströmung (siehe Abb. 2.1, gestrichelte Linie).

Weil ein laminarer Fluss im Wesentlichen aus einzelnen Schichten von Flüssigkeit aufgebaut ist, findet wenig Energietransfer statt und das Geschwindigkeitsprofil wird parabolisch [182, 183]. Wird ein Flüssigkeitszylinder mit dem Radius r und der Länge l mit der Geschwindigkeit v bewegt und steht die Reibungskraft $F_R = 2\pi r l \eta$ und die Druckkraft $F_p = \pi r^2 \Delta p$ im Gleichgewicht, d.h. $F_R = F_p$, so gilt:

$$\frac{dv}{dr} = \frac{\Delta p}{2\eta l} r, \quad (2.1)$$

wobei die Variable η die Viskosität und die Variable p den Druck bezeichnen. Das parabolische Flussprofil einer laminaren Strömung (Abb. 2.1, durchgezogene Linie) lässt sich also durch folgende Gleichung beschreiben, wobei v_0 die Strömungsgeschwindigkeit im Zentrum des Rohrs mit dem Radius R ist:

$$v = v_0 - \frac{\Delta p}{4\eta l} r^2 \quad \text{mit} \quad v_0 = \frac{\Delta p}{4\eta l} R^2. \quad (2.2)$$

Der Volumenstrom des laminaren Flusses durch das ganze Rohr wird durch das Gesetz von HAGEN-POISEUILLE

$$\dot{V} = \int_0^R 2\pi r v(r) dr = \frac{\pi \Delta p}{8\eta l} R^4 \quad (2.3)$$

wiedergegeben. Über das ganze Rohr gemittelt ist die Strömungsgeschwindigkeit damit

$$\bar{v} = \frac{\dot{V}}{\pi R^2} = \frac{1}{2} v_0. \quad (2.4)$$

Da sich beim laminaren Fluss die Flüssigkeit im Zentrum des Rohres mit doppelter durchschnittlicher Geschwindigkeit bewegt, kommt es im Nachsäulenreaktor zur axialen Dispersion zweier aufeinander folgender Analytbanden.

Mit Hilfe der dimensionslosen REYNOLDS-Zahl

$$\Re = \frac{2 \cdot v \cdot \rho \cdot r}{\eta} \quad (2.5)$$

kann bei gegebenen Bedingungen, d.h. bei einem gegebenen Rohrradius r , bei gegebener Strömungsgeschwindigkeit v und ferner bei gegebener Dichte ρ und Viskosität η der Flüssigkeit, eine Voraussage getroffen werden, ob ein laminarer oder turbulenter Strömungstyp vorliegt. Liegt die REYNOLDS-Zahl unter einem Wert von 1000, so herrschen laminare Verhältnisse vor [182]. Für $1000 \leq \Re \leq 2000$ befindet man sich in einem Übergangsbereich, in dem kleine Störungen der Stromlinien zu einem Umschlag von laminarem zu turbulentem Strom führen können. Bei höheren REYNOLDS-Zahlen liegt somit ein turbulentes Fließverhalten vor.

Beim Umschlag von laminar zu turbulent nimmt der Strömungswiderstand erheblich zu. Der im System abfallende Rückdruck ist nicht mehr linear proportional zum Volumenstrom \dot{V} wie im laminaren Fall (siehe Gleichung 2.3). Vielmehr verhält er sich proportional zu \dot{V}^2 und lässt sich daher nicht mehr über das HAGEN-POISEUILLE-Gesetz berechnen [182]. Aufgrund der chaotischen Verhältnisse im turbulenten Fluss sind die fluidmechanischen Betrachtungen komplizierter [183] und sollen hier nicht näher erläutert werden, da unter den Bedingungen einer Nachsäulenreaktion meist mit laminaren Strömungen gerechnet werden muss, wie folgende Beispielrechnung zeigt.

In einem linearen Kapillarreaktor mit einem Innendurchmesser von 0.5 mm beträgt die REYNOLDS-Zahl $\Re = 5$ bei einer Flussrate von 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, d.h. bei einer Strömungsgeschwindigkeit von $8.48 \cdot 10^{-3}$ m/s, wobei die Viskosität und Dichte der Flüssigkeit vergleichbar mit der von Wasser bei 25°C angenommen wurde ($\rho = 997$ kg/m³, $\eta = 8.91 \cdot 10^{-4}$ kg/ms [183]). Bei den gegebenen Bedingungen herrschen eindeutig laminare Strömungsverhältnisse vor.

Bei Nachsäulenreaktoren wird vor allem die Zunahme der Halbwertsbreite von Analytbanden aufgrund des parabolischen Strömungsprofils zu einem Problem, da die chromatographische Auflösung verloren geht. Hinzu kommt, dass die Nachweisempfindlichkeit durch Verdünnung der Probe sinkt. Unter idealen Bedingungen kann die Varianz der Bandenverbreiterung bei einem laminaren Flussprofil in offenen Reaktionsröhren nach Gleichung

$$\sigma_t^2 = \frac{t_r d^2}{96 D_m} \quad (2.6)$$

berechnet werden [184], wobei t_r die mittlere Reaktionszeit, d der Innendurchmesser der Reaktionskapillare und D_m der molekulare Diffusionskoeffizient des Analyten ist.

In einer offenen Reaktionskapillare mit einem Innendurchmesser von 0.5 mm beträgt die Standardabweichung σ_t nach einer Reaktionszeit von 10 min demnach bei einem typischen molekularen Diffusionskoeffizienten $D_m = 1 \cdot 10^{-5}$ cm²/s für kleine Analytmoleküle 0.65 min. Bei einer gaußförmigen Bande gilt für die Halbwertsbreite $w_{1/2} = 2.354 \cdot \sigma$. Es ist daher davon auszugehen, dass im oben

beschriebenen Beispielreaktor die Analytbande durch die Reaktionskapillare um zusätzliche 1.5 min verbreitert werden würde.

Der Verlust der chromatographischen Auflösung R zweier Banden mit der Halbwertsbreite $w_{1/2}$ und der Retentionszeit t_R berechnet sich zu [185]

$$R = 1.18 \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_{1/2,1} + w_{1/2,2}}. \quad (2.7)$$

Die Halbwertsbreite $w_{1/2}$ bei der Auftrennung von Pestizidstandards (siehe Experimenteller Teil, Tab. 6.1) beträgt durchschnittlich 0.23 min. Nach einer zehn Minuten dauernden Reaktionszeit in einem idealen Reaktor würde die Auflösung durch die oben berechnete Bandenverbreiterung von 1.5 min demnach nach Gleichung 2.7 nur noch 16% der Anfangsauflösung sein.

Im wirkungsbezogenen Detektor sollen die Analyten mit gleicher Auflösung wie mit konventionellen Detektoren erfasst werden können. Die verschiedenen Bauarten der Nachsäulenreaktoren versuchen daher, den Verlust der chromatographischen Auflösung so gering wie möglich zu halten.

Im Prinzip kann nach Gleichung 2.6 die Varianz durch kleinere Innendurchmesser des Reaktors verringert werden. Dafür muss jedoch ein erhöhter Druckabfall als Preis gezahlt werden, der durch die HAGEN-POISEUILLE-Gleichung (2.3) berechnet werden kann. Ein Halbieren des Durchmessers hätte einen 64fachen Anstieg des Rückdrucks im System zur Folge, wenn die volumetrische Flussrate beibehalten werden sollte, da der Druckabfall des Systems von der sechsten Potenz des Radius abhängt.

Eine Reduktion der Bandenverbreiterung kann durch geometrische Verformung beispielsweise durch gestrickte Reaktoren (siehe Abschnitt 2.3) erreicht werden. Dadurch soll ein radialer Massentransfer erreicht werden, der ähnlich wie im turbulenten Fluss zu einer Vereinheitlichung der Geschwindigkeitsvektoren führen soll. Das Wickeln einer Reaktionskapillare konnte die Bandenverbreiterung um 60% im Vergleich zum linearen Reaktor reduzieren [186].

Weitere Möglichkeiten zur Verringerung der Dispersion in Nachsäulenreaktoren bieten eine Flüssig- oder Gassegmentierung (siehe Abschnitt 2.4) oder die Erzeugung von Turbulenzen in gepackten Reaktoren (siehe Abschnitt 2.2).

2.1.4 Mischen

Mikrofluidische Reaktoren werden in den meisten Fällen durch niedrige REYNOLDS-Zahlen (vgl. Gleichung 2.5) charakterisiert. Wie im Abschnitt 2.1.3 erwähnt, fließt die Flüssigkeit in laminaren Schichten mit einem geringen Massentransfer in radialer Richtung zwischen den Schichten. Das Mischen zweier Reagenzien, wie Eluent und Biochemikalien bei der Wirkungsbezogenen Analyse, kann daher nur durch Diffusion stattfinden. Je nach Dimension des Reaktors und nach Größe der eingesetzten Moleküle erfolgt die Durchmischung durch Diffusion aber sehr langsam.

Der Diffusionsweg eines Moleküls in zwei Dimensionen über den Radius r abhängig von der Zeit τ wird durch

$$r^2 = 4D\tau \quad (2.8)$$

beschrieben [187]. Betrachtet man zum Beispiel ein annähernd sphärisches Molekül mit einem Molekulargewicht zwischen 500 bis 1000 g/mol, so hat es einen Diffusionskoeffizienten D in der Größenordnung von $5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ [176]. Die Wegstrecke von 0.25 mm, der Radius einer typischen Reaktionskapillare, wird dabei in ~ 0.5 min überwunden. Für eine Wegstrecke von 50 μm werden dagegen nur 1.25 s benötigt.

Um die Durchmischung in radialer Richtung zu beschleunigen, wurden verschiedene Mischer für *Lab-on-a-Chip*-Systeme entwickelt [176, 179]. Man unterscheidet zwischen aktiven und passiven Mixern [188].

Bei den aktiven Mixern wird Energie extern zugeführt, um den laminaren Fluss zu stören und Turbulenzen zu erzeugen. Das Zusammenfließen zweier Lösungen über ein T-Stück führt noch zu keiner Vermischung durch Turbulenzen, wenn laminare Strömungsverhältnisse bestehen. Aktive Mischer arbeiten zum Beispiel mit magnetischen Mikrorührern oder einem elektrischen Feld, um elektrophoretische Kräfte zu erzeugen, die am Übergang zweier laminarer Schichten verschiedener Lösungen einen chaotischen Fluss induzieren [189]. Piezoelektrische Bauteile werden beim akustischen Mischen mit Ultraschallwellen eingesetzt. Eine akustische stehende Welle erzeugt einen sogenannten RAYLEIGH-Fluss, der entgegengesetzt zum laminaren Fluss gerichtet ist [189, 190]. Dabei kommt es zu Verwirbelungen. Durch die Anwesenheit von Gasblasen konnte ebenfalls mit Ultraschall ein akustisches Mikromischen gezeigt werden [191]. Die Blasenoberfläche wird den Schallwellen ausgesetzt und verhält sich dabei wie eine vibrierende Membran, die für Turbulenzen in der angrenzenden Flüssigkeit sorgt.

Neben den aktiven Mixern werden passive Mischer verwendet, die die Diffusionsbewegung der Moleküle ausnutzen. Die Distanz im Kanal wird durch geometrisches Verformen des Reaktors verringert. Mit der Wegstrecke wird die benötigte Diffusionszeit verkürzt (siehe Gleichung 2.8). Die Verkleinerung des Reaktionskanals durch Einbauen einer Engstelle verbessert das Mischen, wie in einer mikrofluidischen FIA-Anwendung gezeigt werden konnte [192]. Diese Bauweise ist jedoch limitiert bezüglich der Flussrate, da ansonsten nach dem Gesetz von HAGEN-POISEUILLE (Gleichung 2.3) ein zu hoher Rückdruck an der Engstelle des Kanals abfallen würde.

Eine andere passive Mischstruktur wurde von der Gruppe um MANZ für *Lab-on-a-Chip*-Systeme entwickelt [193]. Der Strom wird physikalisch in kleinere Flussarme geteilt. Die zweite Flüssigkeit wird an jedem Arm zugeführt. Anschließend werden die einzelnen laminaren Flüsse wiedervereinigt. Die Diffusionswege sind somit kürzer als im ungeteilten Fluss. Das Aufteilen des Hauptstroms in n laminare Flüsse führt zu einer n^2 -mal schnelleren Vermischung. Beim Zusammenführen kommt es jedoch zu Inhomogenitäten in den verschiedenen laminaren Flüssen, da es durch geometrische Gegebenheiten zu leichten Unterschieden in den verschiedenen Kanälen kommt. Eine Anwendung dieser Mischstruktur im Anschluss an eine chromatographische Trennung ist nicht beschrieben, da diese Inhomogenitäten zu einem Vermischen in longitudinaler Richtung führen und somit die chromatographische Auflösung verschlechtert werden würde.

Eine Zyklon-Mischkammer für das Zumischen von Reagenz speziell für Nachsäulenreaktionen wurde von ENGELHARDT und NEUE [194] entwickelt. Das Reagenz wird mit praktisch keinem Totvolumen tangential zum Eluat über einen

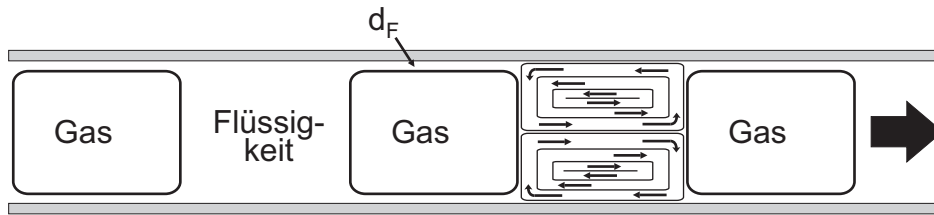


Abb. 2.2: Im gassegmentierten Fluss kommt es zu zirkulären Strömungen im Flüssigkeitssegment. Dadurch erfolgt ein rasches Durchmischen innerhalb des Segments. Der Flüssigkeitsfilm d_F führt zu einem Flüssigkeitsübertrag von einem Segment zum darauf folgenden Segment und damit zu einer geringen Dispersion (nach [196, 197]).

Spalt zwischen zwei aufeinander steckenden Kegeln zugeführt. Durch den abnehmenden Radius der Kegel, nimmt die Fließgeschwindigkeit des Reagenzes zur Spitze hin zu, wo es als zyklonischer Fluss mit dem Säuleneluat zusammentrifft. Die Eluentenströmung wird durch den Reagenzstrom umwickelt. Dadurch soll die Vermischung effizienter sein [195].

Eine weitere Möglichkeit laminare Ströme zu vermischen, besteht in der Segmentierung des Stroms mit Gas oder einer nicht mischbaren Flüssigkeit. Das Mischen in segmentierten Flüssigkeiten kann durch die Ausbildung eines bolusförmigen Flusses verstanden werden [196]. Aufgrund der Reibungskräfte der Flüssigkeit an der Wand bilden sich im Segment zwei parallele zirkulierende Strömungen entlang der Flussachse aus (siehe Abb. 2.2). Das Vermischen in longitudinaler Richtung innerhalb eines Segments erfolgt sehr schnell. Durch den zirkulierenden Fluss bewegt sich die Flüssigkeit daher ähnlich zur Propfströmung mit einer annähernd konstanten Fließgeschwindigkeit über den Kanalquerschnitt betrachtet.

Poly(dimethylsiloxan) als Segmentierungsflüssigkeit wurde von der Gruppe um ISMAGILOV [198] angewendet, um farbige wässrige Lösungen, die in Mikrokanälen gepumpt wurden, zu vermischen. Die Mischeffekte aufgrund des bolusförmigen Flusses konnten mit einer Kamera visualisiert werden. Die durch Trägerflüssigkeit getrennten Tropfen erfahren durch Scherkräfte die Induktion eines rezirkulierenden Flusses, wodurch das Mischen innerhalb des Tropfens erleichtert wird. Durch mäanderförmige Kanalstrukturen konnte das Mischen durch sich periodisch verändernde Scherkräfte verstärkt werden [199].

Eine Verbesserung des Mischens in Vergleich zur nicht segmentierten Flüssigkeit konnte auch durch Gassegmentierung in Glaskapillaren experimentell gezeigt werden [175].

2.2 Gepackte Reaktoren

Für die mit sphärischen Partikeln befüllten Reaktoren (engl. *packed bed*) gelten, bezüglich der Verringerung der Dispersion, dieselben Überlegungen wie bei chromatographischen Säulen. Die Bandenverbreiterung in gepackten Reaktoren wird demnach durch die VAN-DEEMTER-Gleichung bestimmt [195]. Damit hängt die Dispersion vom Teilchendurchmesser ab. Bei sinkendem Teilchendurchmesser nimmt die Axialdispersion im Reaktor ab, gleichzeitig nimmt der Druckabfall

über das System jedoch zu.

Für die Bereitstellung einer gewissen Reaktionszeit ist jedoch ein bestimmtes Totvolumen des Reaktors erforderlich. Sind Reaktor- und Partikeldurchmesser sehr gering, so muss der Reaktor länger sein. Aufgrund des Rückdrucks ist es nicht sinnvoll, mehrere Meter eines Reaktors mit Partikeln im μm -Bereich zu befüllen, um auf eine Reaktionszeit von einigen Minuten zu kommen. Die Reaktionszeit wird dadurch begrenzt auf zwei bis vier Minuten [186, 195].

In den meisten Anwendungen ist das Füllmaterial inert. Es gibt aber auch Anwendungen bei denen die Kugeln z.B. als Oberflächenkatalysator oder durch immobilisierte Enzyme an der Nachsäulenreaktion teilhaben. Hierbei spricht man von Festphasenreaktoren [170]. Durch die erforderliche Retention an der Reaktionsoberfläche des Füllmaterials wird der Einfluss auf die Bandenverbreiterung im Vergleich zu inert gepackten Reaktoren verändert.

Für die Wirkungsbezogene Analyse ist eine Immobilisierung von toxikologisch interessanten Biomolekülen wie zum Beispiel Enzymen wünschenswert. Chromatographisch getrennte Analyten könnten sich dann an die Zielstellen des gepackten Reaktors binden und ein Detektionssignal generieren. Der Einsatz immobilisierter Enzyme in IMERN wurde schon in Abschnitt 1.3.2 erwähnt. Häufig erfassen die Nachsäulenreaktionen in den IMERN jedoch keine Inhibition der Enzyme, sondern chromatographisch getrennte Substrate werden nachgewiesen [169]. Nach diesem Prinzip wurden Acetylcholinesterase und Cholinoxidase von OKUYAMA in einem IMER auf Polymerkügelchen immobilisiert [200]. Die Substrate Acetylcholin und Cholin wurden auf einer Säule voneinander getrennt und über den Nachsäulenreaktor geführt. Die Detektion des Substratumsatzes konnte dann elektrochemisch erfolgen.

Eine Anwendung eines IMERs mit Inhibition von Acetylcholinesterase durch injizierte Inhibitoren wurde von BARTOLINI et al. [201] beschrieben. IC_{50} -Werte von typischen Alzheimer-Medikamenten wurden bestimmt. Es fand jedoch keine Kopplung des IMERs an eine chromatographische Säule statt. Einzelne Inhibitoren und ATCI als Substrat wurden simultan in einen Trägerstrom mit ELLMAN's Reagenz injiziert. In dem monolithischen IMER wurde immobilisierte Acetylcholinesterase durch die Analyten inhibiert. Der negative Ausschlag der Basislinie durch reduzierten Umsatz des ELLMAN's Reagenz wurde zur Auswertung herangezogen.

Moderne Trägermaterialien für IMER sind monolithisch. Die Vorteile des monolithischen Materials gegenüber herkömmlich gepackter Silicakügelchen als Trägermaterial ist eine geringere Analysenzeit und ein geringerer Druckabfall. Der Massentransfer in den Poren des Monolithen ist zudem schneller als in den Poren der Trägerkügelchen [202].

Reaktive Füllmaterialien sind der Vorteil von gepackten Reaktoren im Vergleich zu gestrickten oder segmentierten Kapillarreaktoren [169]. Indem schon ein Reaktionspartner auf der Oberfläche im Reaktor vorliegt, wird eine Pumpe weniger für die Reagenzienbeförderung benötigt. Damit wird auch das Rauschen der Grundlinie des Nachsäulendetektors aufgrund der Pulsation von Reagenzienpumpen verringert.

Der Einsatz von gepackten Reaktoren in der Wirkungsbezogenen Analyse hat ansonsten mehr Nachteile als Vorteile. Zum einen sind die Reaktionszeiten auf

einige wenige Minuten beschränkt, da ansonsten der Druckabfall für das System zu groß werden würde [195, 186]. Zum anderen verändert eine Analytbindung im Falle von immobilisierten Targetmolekülen die Kinetik des Reaktors. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, sollte für jeden von der Säule eluierenden Analyten die gleiche Menge an Targetmolekülen zur Verfügung stehen. Das Material des gepackten Reaktors müsste also ständig regeneriert werden.

Für den Einsatz in der Wirkungsbezogenen Analyse scheinen daher homogene Ansätze in Kapillarreaktoren sinnvoller zu sein. Um die Dispersion trotzdem so gering wie möglich zu halten, werden gestrickte und segmentierte Reaktoren eingesetzt, die in den folgenden Abschnitten erläutert werden.

2.3 Gestrickte Reaktoren

Die hydrodynamischen Gegebenheiten in einem Nachsäulenreaktor für die Wirkungsbezogene Analyse (siehe Abschnitt 2.1) wie geringe Flussraten und kleine Kapillardurchmesser, führen zu einem laminaren Strömungsprofil im Reaktor.

Das Vermischen zwischen den laminaren Schichten radial zur Flussachse kann in einer geraden Kapillare nur durch Diffusion der Analyten erfolgen. Das Mischen von Reagenzien und Eluat ist daher oft ungenügend. Es resultieren verrauschte Grundlinien aufgrund der Flüssigkeitsfahnen, die sich im laminaren Fluss ausbilden. Hinzu kommt, dass die parabolische Geschwindigkeitsverteilung im laminaren Fluss zu einer unerwünschten Dispersion der Analyten in axialer Richtung führt.

Um die Leistung einer Kapillare als Nachsäulenreaktor zu verbessern, müssen folglich die laminaren Schichten überwunden werden. Dazu muss ein Massentransfer radial zur Flussrichtung induziert werden. Dies wird durch Wickeln oder sogar Stricken der Reaktionskapillaren mit einer Strickliesel [194] erreicht.

In einer gewickelten Reaktionskapillare treten Zentrifugalkräfte in den Biegungen auf, die einen Sekundärfluss orthogonal zur Fließrichtung im Reaktor induzieren und damit einen radialen Massentransfer bewirken [186, 203]. Da die Fließgeschwindigkeit in der Nähe des Zentrums der Reaktionskapillare am größten ist, wird die Flüssigkeit aus der Zentrumsnähe kontinuierlich Richtung Reaktorwand gewirbelt. Als Folge wird die Flüssigkeit gezwungen, in zwei Strömungen oberhalb und unterhalb der Achse zu fließen.

Experimentelle und theoretische Behandlungen der Bandenverbreiterung in gewickelten Reaktionskapillaren wurden von TIJSEN [204] und DEELDER et al. [184] durchgeführt, um die geometrischen Einflüsse auf die Dispersion als Funktion der Flussrate diskutieren zu können. Der Einfluss der Wicklung auf die Dispersion in gewickelten Kapillarreaktoren kann über die DEAN-Zahl Dn

$$Dn = \Re \sqrt{\frac{r_t}{r_c}} \quad (2.9)$$

und die SCHMIDT-Zahl Sc

$$Sc = \frac{\eta}{D_m \rho} \quad (2.10)$$

abgeschätzt werden [184]. Berücksichtigt werden dabei die REYNOLDS-Zahl \Re , die Viskosität η und Dichte ρ der Flüssigkeit, sowie der Radius der Kapillare r_t als auch der Radius der Wicklung r_c .

JANSSEN [205] konnte zeigen, dass für $Dn^2Sc \leq 100$ keine signifikante Verringerung der axialen Dispersion in gewundenen Reaktionskapillaren im Vergleich zu geraden Reaktionskapillaren gefunden werden kann. Bei $100 \leq Dn^2Sc \leq 5000$ wurde die axiale Dispersion jedoch sogar um zwei Drittel reduziert. Für eine Verringerung der Bandenverbreiterung sind also starke Verformungen der Kapillaren mit engen Windungen und extremen Richtungswechseln Ausschlag gebend.

In der Literatur beschriebene Anwendungen der gestrickten Reaktoren arbeiten meist mit Flußraten von 10 cm/s und mehr. Der Einfluss der geometrischen Verformung angewendet auf Reaktoren mit sehr geringen Flussraten wie im *Lab-on-a-Chip*-Design ist kaum beschrieben.

Von KAUFMAN et al. [203] wurde die Verringerung der Dispersion in Kapillarreaktoren für die Mikrobore-HPLC untersucht. In gestrickten Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 300 μm konnte bei Flussraten zwischen 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ bis 1.2 mL/min die Dispersion um 44% im Vergleich zu äquivalenten linearen Reaktoren verringert werden. Da aber die Dispersion in linearen Reaktoren schon sehr groß ist (vgl. Abschnitt 2.1.3), reicht auch diese Verringerung nicht aus, um die chromatographische Auflösung im Nachsäulenreaktor bei niedriger Flussrate und kleinen Dimensionen des Reaktors erhalten zu können.

Ein Einsatz der gestrickten Reaktoren ist demnach mehr für kurze Reaktionszeiten von ein bis zwei Minuten bei Flussraten im ml/min Bereich geeignet [194, 206, 207]. Werden längere Reaktionszeiten benötigt, ist der Einsatz von segmentierten Reaktoren (Abschnitt 2.4) besser geeignet.

2.4 Gassegmentierte Reaktoren

Eine weitere Methode, um die Dispersion in offenen Reaktionskapillaren zu reduzieren, ist die Segmentierung des Flüssigkeitsstroms durch Gasblasen oder nicht mischbare Flüssigkeiten. Die longitudinale Dispersion wird verringert, da der Flüssigkeitsstrom in einzelne abgeschlossene Reaktionsvolumina unterteilt wird. Die Gassegmentierung wurde schon 1957 in einem automatisierten Analysensystem in der klinischen Chemie von SKEGGS [208, 209] angewendet. Bekannt ist dieses System vor allem als FIA-System unter dem Namen *AutoAnalyzer* der Firma Technicon.

Die Segmentierung eines wässrigen Eluats mit nicht mischbaren organischen Flüssigkeiten wird als Online-Extraktion der in der wässrigen Phase gelösten Substanzen angewendet [210, 211]. Ist die Extraktion nicht erwünscht, darf das Eluat nur hydrophile Analyten enthalten [212].

Die Flüssigkeitssegmentierung hat gegenüber der Gassegmentierung den Vorteil, dass keine großen Unterschiede in der Kompressibilität zwischen Gas und Flüssigkeit stören und zu Druckschwankungen im System führen. Fluktuationen der Fließgeschwindigkeit aufgrund von Druckunterschieden im Reaktorsystem treten seltener auf. Die Fluktuationen sind häufig die Ursache einer verrauschten Grundlinie im segmentierten Reaktor [175].

Die Nachsäulenreaktionen in der Wirkungsbezogene Analyse werden entsprechend physiologischer Bedingungen im wässrigen Milieu durchgeführt. Die mehr oder weniger hydrophoben, per Umkehrphasenchromatographie getrennten Analyten könnten während der benötigten Reaktionszeiten zu einem großen Teil in eine Segmentierungsflüssigkeit extrahiert werden und stünden dann für die biochemische Reaktion des wirkungsbezogenen Detektors nicht mehr zur Verfügung. Die Betrachtungen konzentrieren sich daher auf gassegmentierte Nachsäulenreaktoren.

Die Dispersion in axialer Richtung ist in segmentierten Reaktoren stark verringert, da durch das Segmentierungsmedium einzelne Reaktionsvolumina abgetrennt werden. Die Parameter für eine möglichst geringe Bandenverbreiterung in gassegmentierten Reaktoren wurden von SNYDER theoretisch und semiempirisch berechnet [213, 197, 196]. Die Länge der Gassegmente sollte mindestens das 1.5fache des Innendurchmessers der Reaktionskapillare sein. Die Dispersion wird bei geringeren Durchmessern der Kapillare prinzipiell kleiner. Eine Verringerung des Durchmessers erfordert aber, um im optimalen Bereich der geringsten Dispersion zu bleiben, eine Verringerung der Flussrate und eine Erhöhung der Segmentierungsfrequenz. Die theoretisch erforderliche hohe Segmentierungsfrequenz von beispielsweise 35 s^{-1} für einen Kapillarinne Durchmesser von 0.5 mm und eine Flussrate von $240 \mu\text{L}/\text{min}$ ist jedoch technisch schwer erreichbar [171]. Aufgrund von Lichtstreuungen verursachen Gasblasen ein Rauschen des Detektorsignals, das ein Auswerten ohne weitere Maßnahmen unmöglich macht. Üblicherweise werden Segmentierungsfrequenzen von höchstens 2 s^{-1} eingesetzt, wenn die Gasblasen physikalisch vor der Detektorzelle abgetrennt werden [169]. Eine Segmentierungsfrequenz von 5 s^{-1} konnte durch elektronisches Filtern des Signals erreicht werden [186].

Obwohl die Dispersion im segmentierten Reaktor im Vergleich zum linearen Reaktor stark reduziert ist, lässt sich die Bandenverbreiterung durch axiale Dispersion nicht vollständig unterdrücken. Ursache ist ein Flüssigkeitsfilm, der sich an der Kapillarwand ausbildet. Durch den Flüssigkeitsfilm findet ein Übertrag von Segment zu Segment statt [197, 196]. Je dicker der Flüssigkeitsfilm ist, desto größer wird auch die durch den segmentierten Reaktor verursachte Bandenverbreiterung. Die Dicke des Films kann anhand der Oberflächenspannung, Viskosität und der linearen Fließgeschwindigkeit abgeschätzt werden [214, 196].

Neben der geringen axialen Dispersion ist ein erleichtertes Mischen von Eluat und Reagenz durch eine zirkulierende Strömung (siehe Abb. 2.2 in Abschnitt 2.1.4) ein weiterer Vorteil. Die Durchmischung in axialer Richtung innerhalb eines Segmentes erfolgt sehr schnell [196].

Variieren die Segmentvolumina jedoch, so werden die Kompartimente unterschiedlich gut gemischt und das Rauschen der Basislinie nimmt zu [175]. Die Hauptursache für unregelmäßige Längen der Segmente sind variierende Flussraten, die aufgrund der Gaskompressibilität beim Einspeisen der Blasen herrühren.

Es gibt verschiedene Ansätze für eine Einspeisung von Gasblasen in einen Flüssigkeitsstrom ohne das Auftreten von Druckschwankungen, wie beispielsweise im patentierten LOAI-System (*liquid out, air in*) [215]. Bei diesem System wird beim Einbringen einer Gasblase gleichzeitig ein äquivalentes Volumen an Eluat entnommen. Häufig werden die Blasen mit peristaltischen Pumpen eingespeist,

wobei eine leichte Pulsation akzeptiert wird.

Wie oben erwähnt, können aufgrund der optischen Detektoren und den dabei auftretenden Reflexionen die Signale nicht ohne Weiteres aufgezeichnet werden. Es gibt verschiedene Prinzipien der Blasenabtrennung [170]. Die einfachste Variante ist das Abtrennen mit einem T-Stück. Die nach oben gerichtete Öffnung entfernt Luft aus dem Flüssigkeitsstrom durch Ausnutzen der verschiedenen Dichten und der Schwerkraft. Des Weiteren gibt es noch Phasenseparatoren für die Flüssigkeitssegmentierung, die die unterschiedliche Durchlässigkeit von organischen und wässrigen Flüssigkeiten durch Membranen aufgrund ihrer Benetzungseigenschaften ausnutzen [210, 216].

Die größte Herausforderung bei den segmentierten Reaktoren ist das Trennen der Phasen ohne die Dispersion der Banden zu verstärken. SCHOLTEN et al. [217] zeigten, dass der Einfluss der Phasenseparatoren auf die Dispersion der Analyten gravierend ist. Neben der zunehmenden Bandenverbreiterung wird ein großer Teil der Flüssigkeit bei einigen beschriebenen Phasenseparatoren [170] zusammen mit den Blasen entfernt und steht damit nicht mehr der Detektion zur Verfügung. Dadurch sinkt die Empfindlichkeit eines Nachweises. Eine optimale Leistung von gassegmentierten Reaktoren kann nur erreicht werden, wenn die konventionellen Entgaser in Form von T-Stücken nicht eingesetzt werden [186].

Ein neuerer Ansatz für das Abtrennen von Gasblasen ist in [218] beschrieben. Hier wurde der unterschiedliche Energieaufwand zur Deformierung von Gas- und Flüssigkeitssegmenten ausgenutzt. Da sich Gasblasen aufgrund der Oberflächenspannung schwerer deformieren lassen, ist der Rückdruck von Gasblasen an hydrophilen Nanoporen um einiges größer als der von wässrigen Lösungen. Wegen der Rückdruckdifferenzen lassen sich durch eine gut durchdachte Fluidik die Gassegmente von der Flüssigkeit abtrennen.

Die Gasblasen müssen nicht unbedingt physikalisch entfernt werden. Bei ausreichend großen Flüssigkeitsvolumen der Segmente für die Detektorzelle, kann der Datensatz online oder nachträglich überarbeitet werden. Dies kann z.B. durch digitales Filtern per Computer erfolgen [215, 186, 175]. Ein elektronisches Herausfiltern der Gasblasen bei der Datenaufzeichnung wurde schon 1969 von HABIG et al. [219] beschrieben. Die Leitfähigkeit zwischen Eingang und Ausgang der Detektorzelle wurde gemessen und mit einer Relaisschaltung gekoppelt, die den X-Y-Schreiber regelte. Befand sich eine Gasblase in der Detektorzelle, so war die Leitfähigkeit gering und das Relais wurde geöffnet, damit der X-Y-Schreiber ausgeschaltet wurde. Somit wurden die optischen Effekte der Gasblasen auf die Datenspur unterbunden.

Enzymatische Reaktionen in gassegmentierten Nachsäulenreaktoren mit Relevanz für die Wirkungsbezogene Analyse wurden schon in der Literatur beschrieben. Von RAMSTEINER und HÖRMANN [97] wurden eine Flüssigkeitschromatographie und ein *AutoAnalyzer*-System für die empfindliche Detektion von Cholinesteraseinhibitoren aneinander gekoppelt. Insgesamt benötigten die Analyten 30 min für die Passage durch das *AutoAnalyzer*-System. Carbamate und Organophosphate wurden untersucht, wobei mit der verwendeten manuell gefüllten Chromatographiesäule nur eine Trennung von zwei Insektiziden gezeigt werden konnte. Ein Extrakt von Pflaumenblättern wurde mit einem Organophosphat versetzt, welches anhand eines einzelnen Inhibitionssignals erfasst werden konnte.

Im Gegensatz dazu konnte mit dem UV-Detektor keine Auflösung des Naturstoff-Chromatogramms erzielt werden.

Von MOYE und WADE [51] wurde eine Acetylcholinesteraseinhibition im luftsegmentierten Reaktor mit dem Fluoreszenzsubstrat Indoxylacetat nach einer Inhibitionszeit von 3.5 min und einer Reaktionszeit von 4.5 min gezeigt. Die Flussrate betrug 1.1 mL/min. Es wurde AChE aus Köpfen von Stubenfliegen und aus Rindererythrocyten eingesetzt. Die Nachweisgrenze für das Insektizid Carbofuran betrug 0.2 ng beim Einsatz von AChE aus der Stubenfliege.

Die Inhibition von Acetylcholinesterase aus Zitteraal in einem gassegmentierten Reaktor durch die Eluenten einer Umkehrphasenchromatographie wurde anhand einer Trennung der Organophosphate Sarin, Soman und Tabun von SIPPONEN [98] gezeigt.

Die in der Literatur vorgestellten Detektoren zur Erfassung der Enzyminhibition nach chromatographischen Trennungen arbeiten mit mehrminütigen Reaktionszeiten. Diese langen Reaktionszeiten werden gerade in der Wirkungsbezogenen Analyse benötigt. Die Flussraten bewegen sich bei den in der Literatur beschriebenen Ansätzen jedoch meist im ml/min Bereich, was einen relativ hohen Verbrauch an Reagenzien mit sich bringt. Beim Einsatz von wertvollen Zielmolekülen steigen somit aber die Analysekosten stark an. Der Ansatz im Rahmen dieser Dissertation zielte daher darauf ab, einen gassegmentierten Enzyminhibitionsdetektor mit möglichst niedrigen Flussraten bei hoher Segmentierungsfrequenz zu entwickeln, um die Kosten möglichst gering zu halten und eine bestmögliche chromatographische Auflösung zu erzielen.

3 Anwendungen der Massenspektrometrie in der Wirkungsbezogenen Analytik

Massenspektrometer können in der Wirkungsbezogenen Analyse verschiedene Aufgaben übernehmen. Zum einen können sie parallel zu einem konventionellen optischen Detektor und dem wirkungsbezogenen Detektor zur Identifizierung herangezogen werden (siehe Abschnitt 3.1). Zum anderen kann direkt eine massenspektrometrische Detektion einer toxikologisch relevanten Reaktion erfolgen. Dazu gehört auch die massenspektrometrische Erfassung enzymatischer Umsetzungen (siehe Abschnitt 3.2).

3.1 Massenspektrometrie parallel zum biochemischen Detektor

Das Massenspektrometer parallel zu einer wirkungsbezogenen Detektion erfüllt analog wie bei der konventionellen LC-MS die Aufgabe der Identifizierung und Strukturaufklärung von Substanzen. Eingeschränkt ist auch eine Quantifizierung der Analyten möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Flugzeitmassenanalysator LCT der Firma Micromass verwendet. Als Ionisationsquelle wurde die Elektrospray-Ionisation eingesetzt. Daher wird bei den folgenden Beispielen aus der Literatur der Schwerpunkt auf dieses Verfahren gelegt.

Die massenspektrometrische Detektion mit einem ESI-QTOF-MS wurde parallel zur Detektion der Hemmung von Angiotensin-konvertierendem Enzym angewendet, um chemische Informationen über die Inhibitoren zu erhalten [53]. Im Fall von registrierten Inhibitionssignalen im wirkungsbezogenen Detektor wurden interessante Ionen durch Erzeugung von charakteristischen Fragmenten mit selektiven Parametereinstellungen näher untersucht. Für die Identifizierung der inhibierenden Substanzen waren weitere Analysen notwendig. Die Strukturaufklärung konnte also nicht wirklich parallel vorgenommen werden.

Eine parallele Messung einer Ligand-Rezeptor-Bindung in einem biochemischen Detektor und eine massenspektrometrische Identifizierung konnte mit einem APCI-MS/MS-Gerät gezeigt werden. Verbindungen aus der Haut von Granatäpfeln, die wie Östrogene wirken, wurden biochemisch durch einen online durchgeführten Rezeptortest detektiert und durch eine parallele massenspektrometrische Untersuchung identifiziert, indem die Spektren mit Datenbanken verglichen wurden [38].

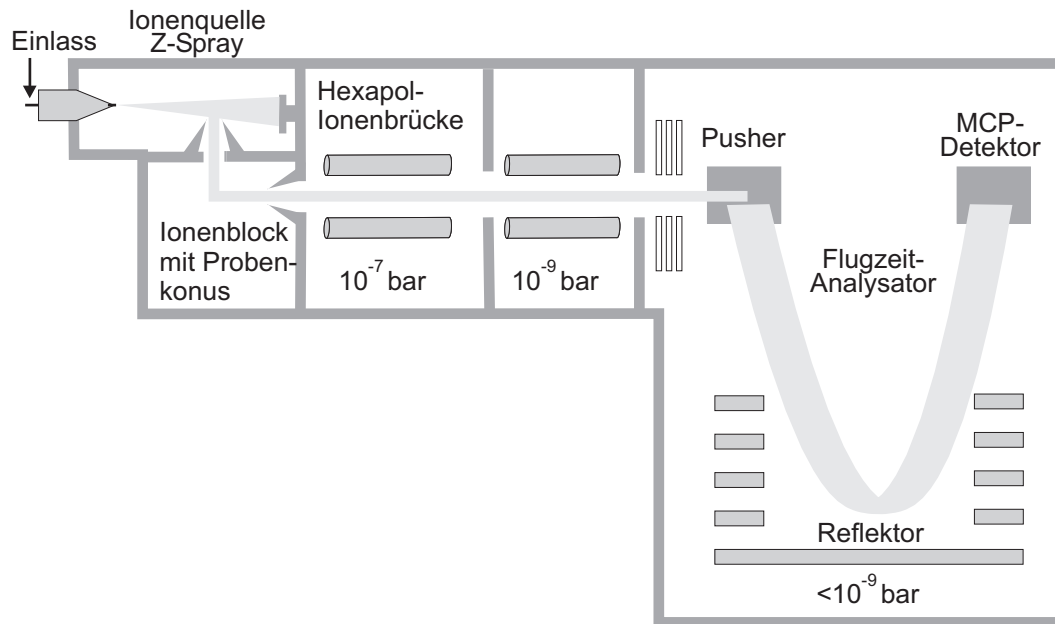


Abb. 3.1: Aufbau des ESI-TOF-MS *LCT* der Firma Micromass, das in dieser Arbeit verwendet wurde. Die im Elektrospray erzeugten Ionen gelangen auf Z-förmiger Flugbahn über Ionenbrücken zum Flugrohr, in dem durch Beschleunigung der Ionen im feldfreien Raum die Ionen anhand ihrer m/z -Verhältnisse zeitlich getrennt am MCP-Detektor ankommen [221].

Im Folgenden wird auf die Möglichkeiten der Bestimmung der präzisen Masse und Quantifizierung des in dieser Arbeit eingesetzten Massenspektrometers eingegangen.

3.1.1 Bestimmung der präzisen Masse

Der Flugzeit-Massenanalysator trennt Ionen aufgrund ihrer Flugzeit bei konstanter Anfangsenergie. Der Vorteil dieses Prinzips liegt darin, dass Ionen über einen sehr großen Massenbereich simultan bei konstanten Geräteparametern gemessen werden können [220].

Der Massenanalysator des verwendeten ESI-TOF-MS Geräts ist schematisch in Abb. 3.1 dargestellt. Die von der Elektrospray-Ionenquelle kommenden Ionen werden nicht entlang ihrer Flugachse in den Massenanalysator gelassen, sondern senkrecht dazu. Im darauffolgenden Ionenblock befindet sich der Einlass Richtung Flugröhre nochmals senkrecht zur Flugachse. Durch die als Z-Spray bezeichnete Flugbahn wird das Eindringen von Verschmutzungen wie Neutralteilchen, Puffersalzen oder Matrixsubstanzen in den Massenanalysator reduziert. Zwei Hexapol-Ionenbrücken sorgen als Schleusen für den Übertritt der Ionen von Atmosphärendruck zum Hochvakuum. Zudem werden die Ionen auf einen schmalen Strahl fokussiert. Sie gelangen dann zum sogenannten *Pusher*, der durch einen Spannungspuls Ionenpakete quer zur Flugrichtung des kontinuierlichen Ionenstrahls heraus extrahiert und in Richtung des feldfreien Flugrohres beschleunigt. Bei

konstanter kinetischer Energie haben die Ionen je nach m/z -Wert unterschiedliche Fluggeschwindigkeiten. Die Trennung der Ionen erfolgt anhand der Trägheit der Ionen. Die Ionen fliegen zum Reflektor, an dem sie abgebremst und zum Detektor umgelenkt werden. Durch den Reflektor behält das Flugrohr und damit das ganze Gerät Labortischgröße. Durch verschiedene Eintrittstiefen in den Reflektor erfolgt je nach Energie der Ionen eine weitere Massenfokussierung. Die Detektion der Ionen erfolgt auf einer großflächigen Multikanalplatte (*Multi Channel Plate*, MCP).

Die Massengenauigkeit normaler reflektierender ESI-TOF-Geräte liegt nur bei 25 ppm. Mit orthogonal beschleunigenden Geräten kann eine Genauigkeit besser als 5 ppm erreicht werden [222, 223]. Um eine Masse genau bestimmen zu können, muss zeitnah zur Messung eine Massenkalisierung durch externe Standards durchgeführt werden [224]. Dies geschieht je nach Massenbereich mit unterschiedlichen Lösungen wie zum Beispiel Polyethylenglykolen, Phosphorsäure, Natriumiodid- oder Cäsiumiodid-Lösungen, die durch Clusterbildung eine Kalibrierung des Geräts über einen weiten Massenbereich zulassen.

Soll eine präzise Bestimmung der Masse durchgeführt werden, muss ein interner Standard zugegeben werden. Diese sogenannte *Lock Mass* sorgt dafür, dass die extern aufgenommene Kalibrierfunktion aufgrund von tagesabhängigen, leichten Temperaturschwankungen oder Schwankungen in der Stromversorgung korrigiert werden kann [223]. Die Massenkorrektur erfolgt durch einen Vergleich von theoretischer und gemessener Masse des internen Standards. Die *Lock Mass* sollte dabei so nah wie möglich an den interessierenden m/z -Verhältnissen liegen, um eine bestmögliche Bestimmung der präzisen Masse gewährleisten zu können. Der interne Standard kann kontinuierlich über ein T-Stück dem Eluat der HPLC zugemischt werden. Bei neueren Modellen kann der interne Standard durch einen zweiten Einlass direkt in die Ionenquelle gegeben werden, um ein konstantes, von der HPLC unabhängiges Signal des internen Standards zu erhalten.

Die Intensität der resultierenden Massensignale spielt ebenfalls eine Rolle für die Feinmassenbestimmung. Ist das Signal zu schwach, resultiert eine schlechte Peakform aufgrund der Ionenstatistik [224, 221]. Gerade im Bereich der Nachweisgrenze kann daher mit dem in dieser Arbeit verwendeten ESI-TOF-MS keine Bestimmung der hochaufgelösten Masse durchgeführt werden.

Eine Anleitung zu unterschiedlichen Möglichkeiten zur Datenauswertung mit dem in dieser Arbeit verwendeten LCT ESI-TOF-MS wird von WU und MCALISTER in [225] gegeben.

3.1.2 Quantifizierung

Eine Quantifizierung von Substanzen ist im Massenspektrometer mit einer ESI-Quelle nur möglich, wenn interne Standards bekannter Konzentration mit einer ähnlichen Ionisierbarkeit zur Probe zugegeben werden, da die relativen Intensitäten nicht mit den relativen Konzentrationen übereinstimmen müssen. Die Gefahr einer falschen Quantifizierung aufgrund von niedrigeren Signalintensitäten durch Ionensuppression (vgl. Abschnitt 3.2.1) kann weitgehend ausgeschlossen werden, wenn beispielsweise deuterierte Standards verwendet werden.

Die Quantifizierung wird neben der Ionensuppression durch Adduktionenbil-

dung und Alterung der Geräteteile erschwert. Chelatisierung oder Adduktbildung von beispielsweise Na^+ -Ionen erschwert eine Quantifizierung, da sich die Signale der Substanz auf mehrere m/z -Verhältnisse verteilen und eine Kalibrierung auf Addukte unmöglich ist.

Ein Kalibrierung durch externe Standards ermöglicht keine fehlerfreie Quantifizierung, da neben der Ionensuppression der Ionendetektor und die Ionoptik aufgrund von Schmutzablagerungen altern können und sich damit die Nachweisgrenze verschlechtert. Eine MCP besteht beispielsweise aus kleinen Bleiglasröhrchen, die in einer zweidimensionalen Matrix parallel nebeneinander angeordnet sind. Die Röhrchen sind innen mit einer siliziumdioxidhaltigen Schicht auf einem Halbleitermaterial ausgekleidet. Durch Anlegen einer Spannung zwischen den beiden Seiten der Platte dienen sie als Sekundärelektronenvervielfacher. Verschmutzungen der Platte lassen sich im Laboralltag nicht vermeiden, reduzieren aber mit der Zeit die Signalstärke. Nachweisgrenzen können daher nach einiger Zeit höher liegen.

Eine quantitative Bestimmung der mit dem wirkungsbezogenen Detektor registrierten Substanzen ist ohnehin nur begrenzt sinnvoll. Der dynamische Messbereich des Massenspektrometers umfasst nicht den gleichen Bereich, wie der des wirkungsbezogenen Detektors. Es besteht also das Problem, eine Überlappung des linearen Messbereichs der verschiedenen Detektoren zu schaffen.

Einfacher erscheint es, die Quantifizierung der Substanzen, die durch eine toxiologisch relevante Wirkung identifiziert wurden, durch einen optischen Detektor mit einem großen dynamischen Messbereich im UV-Vis-Spektrum vorzunehmen.

3.2 Massenspektrometer als Detektor toxikologisch relevanter Reaktionen

Seit der Entwicklung von sanften Ionisierungsmethoden in der Massenspektrometrie wie FAB, MALDI und ESI richtet sich das Interesse bei massenspektrometrischen Untersuchungen nicht nur auf die Substanzauflklärung, sondern auch auf die Beobachtung von Reaktionen oder Protein-Protein-Wechselwirkungen. Eine Übersicht über verschiedene massenspektrometrische Anwendungen in der Wirkstoffforschung wird von DENG und SANYAL in [226] gegeben. Die Autoren unterscheiden dabei Ansätze, die auf der Funktion der Zielmoleküle basieren, wie z.B. Enzyminhibition, und affinitätsbasierende Ansätze, die Komplexe von Zielmolekülen und potentiellen Wirkstoffen untersuchen.

Zur Beobachtung von Rezeptor-Ligand-Bindungen ist vor allem die sanfte Ionisierung durch ESI geeignet. Ein Assay mit kontinuierlichem Fluss zur Bestimmung von Biotin-Streptavidin-Bindungen mit ESI-MS-Detektion [227] wurde vergleichbar mit fluoreszenzdetektierten Assays [228, 229] durchgeführt.

Bei der Beobachtung von enzymatischen Umsetzungen mit der Massenspektrometrie (Reviews in [230, 231]) wird das m/z -Signal des vom Enzym umgesetzten Substrats analysiert. Der Vorteil der massenspektrometrischen Detektion von Enzymreaktionen liegt im Einsatz von natürlichen Substraten.

Optische Detektionsmethoden erfordern dagegen meist eine zeitaufwendige Entwicklung von chromogenen oder fluorogenen Substraten, die ihre optischen Ei-

genschaften nach der enzymatischen Umsetzung ändern. Dabei kann es jedoch zu falsch positiven bzw. negativen Ergebnissen kommen, falls die optischen Eigenschaften der Inhibitoren mit denen des umgesetzten Substrats interferieren und beispielsweise bei gleicher Wellenlänge absorbieren, fluoreszieren oder quenchen. Die Enzymkinetik von künstlichen Substraten kann zudem eine völlig andere als die der natürlichen Substrate sein [232]. Dadurch wird es einerseits schwierig kinetische und mechanistische Studien im Falle unbekannter Enzyme durchzuführen, andererseits geht eine langsame Kinetik des Substratumsatzes auch auf die Kosten der Geschwindigkeit und Empfindlichkeit eines Enzymtests.

Natürliche Substrate mit einem radioaktiven Isotop zu markieren, ist dabei eine Möglichkeit, die Enzymkinetik des natürlichen Substrats zu erhalten. Als Beispiel sei hier die mit ^{32}P markierte Phosphorylase a für einen Proteinphosphataseaktivitätsnachweis genannt. Jedoch sind markierte Substrate nicht immer erhältlich und die Synthese und Verwendung des radioaktiven Materials erfordern eine spezielle Laborausstattung. Einfacher ist es, wenn das natürliche Substrat zur Detektion der Enzymaktivität eingesetzt werden kann. Das ist bei der massenspektrometrischen Detektion möglich. Ein weiterer Vorteil der massenspektrometrischen Beobachtung im Gegensatz zur optischen Detektion eines Enzymumsatzes ist die Möglichkeit einer simultanen Messung mehrerer Enzym-Substrat-Reaktionen, wenn sich die m/z -Verhältnisse der verschiedenen Produkte nicht überlagern.

Für die Hochdurchsatzanalyse von Enzym- und Substrat-Wechselwirkungen sind Tests beschrieben, die auf MALDI-MS-Methoden basieren [222]. Das Interesse richtet sich vornehmlich auf das Finden von neuen Targets und mechanistische Aufklärungen im Bereich der pharmazeutischen Wirkstoffforschung und weniger auf die für Umweltanalytik relevante Bereiche. Ein Hochdurchsatz ist möglich, da das Testformat häufig aus einem Array besteht.

Um Interferenzen mit den Matrixkristallen speziell bei Produkten mit niedrigem Molekulargewicht zu vermeiden, wurde die matrixfreie DIOS-MS angewendet. DIOS steht für *Desorption/Ionization on Silicon* [233]. Dabei werden die Analyten aus der Lösung auf eine Siliziumoberfläche gespottet, eingetrocknet und dann mit einem MALDI-MS-Gerät analysiert.

Neben der Beobachtung des Substratumsatzes der Enzyme Phenylalaninhydroxylase, Glycotransferase und Protease gelang es SHEN et al. [234] mittels DIOS-MS ganze Inhibitorbibliotheken von Acetylcholinesterase mit einer Probenrate von 1.6 s^{-1} zu untersuchen.

Die MALDI-Techniken sind vor allem für HTS geeignet. Eine Online-Kopplung mit Trennmethoden, wie zum Beispiel HPLC, um Kreuzreaktivitäten zu vermeiden oder den Ansatz der Wirkungsbezogenen Analyse zu verfolgen, ist schwierig.

Gut geeignet ist hierfür die Elektrospray-Ionisierung, da sie kompatibel mit Reaktionen ist, die in der Flüssigphase stattfinden. Durch die problemlose Zugabe von internen Standards vor Eintritt in die Ionisationsquelle, ist auch eine Quantifizierung des Substratumsatzes bedingt möglich.

Problematisch bei der Anwendung von ESI-MS ist jedoch die Unterdrückung der Signale durch Matrix-Komponenten (siehe Abschnitt 3.2.1). Daher kann die massenspektrometrische Untersuchung häufig nur nach einer chromatographischen Trennung erfolgen [226].

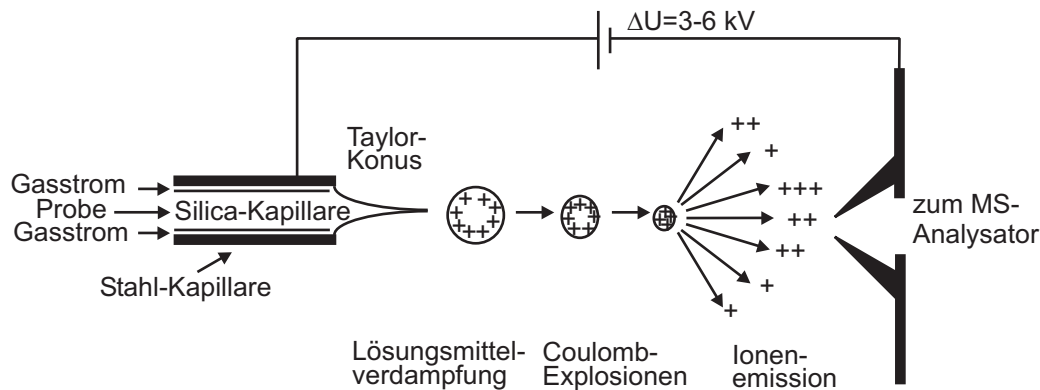


Abb. 3.2: Ionenbildung bei der Elektrospray-Ionisierung aus geladenen Aerosoltröpfchen (Schema nach [236, 112]).

3.2.1 Ionensuppression

Um die Ionensuppression zu verstehen, muss der Mechanismus der Elektrospray-Ionisierung näher betrachtet werden. Schematisch ist die Modellvorstellung der Ionenbildung in Abb. 3.2 dargestellt.

Das angelegte elektrische Feld zwischen Kapillarspitze und Massenspektrometereingang durchdringt die Analytlösung und trennt die Ionen in entgegengesetzten Richtungen in Abhängigkeit von der angelegten Polarität. Die an der Flüssigkeitsoberfläche akkumulierten positiven Ionen (bei entsprechender Polung der Spannung) werden weiter in die Richtung der Kathode am Massenspektrometereingang gezogen. Dabei entsteht ein charakteristischer Flüssigkeitskonus (engl. *Taylor Cone*). Dieser Konus emittiert an der Spitze kontinuierlich kleine Flüssigkeitstropfen von wenigen μm im Durchmesser. Durch Verdampfen des Lösungsmittels im geheizten Gasstrom schrumpfen diese Tröpfchen bei konstanter Ladung, bis die Abstoßung durch die gleichnamige Ladung so groß wird, dass sie in Tröpfchen mit nur wenigen nm im Durchmesser zerfallen. Zuletzt bleiben geladene Festkörper zurück oder es werden Ionen aufgrund eines Feldemissionsvorganges aus den Nanotröpfchen emittiert.

Die Unterdrückung des Signals resultiert aus der Anwesenheit von weniger flüchtigen Verbindungen, die die Effizienz der Tröpfchenbildung oder Verdampfung verändern [237]. Dies wiederum wirkt sich auf die Menge der geladenen Ionen in der Gasphase aus, die letztendlich den Detektor erreichen. Moleküle hoher Masse unterdrücken die Signale kleiner Moleküle. Polare Analyten sind empfänglicher für eine Ionensuppression [238].

Die Suppression der Signale von Substrat oder Produkt einer enzymatischen Reaktion kann aufgrund von Puffersalzen, Kofaktoren oder Verunreinigungen in der Probe erfolgen. Ein Einsatz von flüchtigen, für die ESI-MS geeigneten Puffern kann aber auch zu einem Aktivitätsverlust der Enzyme führen. Die Zugabe von organischem Lösungsmittel ist oft erforderlich, um die Oberflächenspannung der geladenen Tröpfchen zu erniedrigen und hohe Ionisierungsraten zu erhalten. Ein hoher Anteil an organischem Lösungsmittel verringert jedoch die Enzymaktivität teils erheblich.

3.2.2 Offline-Detektion von Enzymaktivitäten mit ESI

Eine Optimierung der Puffer und Additive für optimale Bedingungen im Enzymassay und für die massenspektrometrische Untersuchung erfolgt meist offline. In einem Reaktionsgefäß wird erst nach der enzymatischen Umsetzung organisches Lösungsmittel zugegeben. Falls es die Ionensuppression zulässt, können die Enzymassays ohne Aufreinigung direkt analysiert werden. Für eine quantitative Bestimmung des enzymatischen Umsatzes werden dem Reaktionsansatz isopenmarkierte oder dem Analyten strukturell sehr ähnliche Verbindungen als interne Standards zugesetzt, um Schwankungen in den Signalintensitäten auszugleichen [239].

Auch bei der Offline-Kopplung von Enzymtest und ESI-MS können nicht unbedingt alle aktivierenden Additive wie beispielsweise Mg^{2+} für die Proteinkinase A [240] in ausreichender Konzentration zugesetzt werden. Anschließend müsste der Ansatz zu stark für die massenspektrometrische Optimierung verdünnt werden, um eine Ionensuppression zu verhindern.

Ein höherer Durchsatz der Proben kann als FIA durch Injektion der Enzymansätze mit einem Autosampler in eine mobile Phase aus organischem Lösungsmittel erreicht werden. Die Methodenentwicklung für die Aktivitätsbestimmung von Fucosyltransferase [241], Chymotrypsin [242] und Esterase [243], sowie die Untersuchung von Inhibitorbibliotheken von Glucosyltransferase [244] wurde dadurch erleichtert.

Häufig sind jedoch die Intensitätsverluste der Produktsignale durch komplexe Reaktionsmischungen auch bei offline durchgeführten Versuchen so groß, dass die Probe vor Eintritt in das ESI-MS gereinigt werden muss [226]. Die Aktivität von Rizin A konnte nach Abtrennen des Produkts Adenin von den Reagenzien mit LC-MS detektiert werden [245]. Um rasch die Matrixeffekte von Enzymaktivitätstests zu verringern, wurde auch eine Aufreinigung der Probe mit *Turbulent Flow Chromatography* (TFC) durchgeführt [246].

3.2.3 Online-Detektion von Enzymaktivitäten mit ESI

Die Online-Kopplung von enzymatischen Assays mit ESI-MS wurde von LEE et al. [247] schon 1989 durchgeführt. Ein thermostatisiertes Reaktionsgefäß wurde direkt an das MS gekoppelt. Mit einer Transferzeit der Probe in das MS von einer Sekunde konnte in Echtzeit der Umsatz von Lactase, Chymotrypsin und Leucinaminopeptidase gezeigt werden.

Ein heterogener Enzyminhibitionsassay wurde von HODGSON et al. [248] online an ESI-MS gekoppelt. Substrat und Inhibitor wurden mit Autosampler bzw. Pumpen in einen monolithischen Reaktor mit immobilisierter Adenosindeaminase gegeben und der enzymatische Umsatz im ESI-MS beobachtet.

HPLC kombiniert mit einem homogenen Enzyminhibitionsassay mit Online-Detektion der Enzymaktivität im ESI-MS wurde von DE BOER et al. [54] beschrieben. Natürliche Pflanzenextrakte wurden auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber dem Enzym Cathepsin B untersucht. Anfangs wurde der Test in Reaktionskapillaren [54] durchgeführt. Später wurde der Assay zur *Lab-on-a-Chip*-Fluidik miniaturisiert [249]. Die Reaktionszeit der Enzyminhibition inklusive Substratumsatzzeit ist mit einer Minute relativ kurz. Trotzdem ist die

Dispersion in den Reaktionskapillaren bzw. in der Fluidik des Chips ebenso wie bei den konventionellen Detektoren der Enzymaktivität ein Problem.

Eine massenspektrometrische Online-Detektion der Acetylcholinesterase-Aktivität nach einer chromatographischen Trennung wurde kürzlich beschrieben [55]. Mit einem ESI-MS wurde simultan der Umsatz des Enzyms anhand der Substratmasse Acetylcholin und anhand der Produktmasse Cholin verfolgt. Eluierende Inhibitoren reduzierten die Intensität des Produktsignals bzw. erhöhten die Intensität des Substratsignals. Parallel dazu konnte anhand von MS-MS-Spektren der Inhibitor anhand seiner Fragmentbildung identifiziert werden. Aus einem Naturstoffextrakt konnte Galantamin identifiziert werden. Zur Beobachtung von eventuellen Ionensuppressionen wurde Uracil als interner Standard kontinuierlich mit der Substratlösung zudosiert. Ein Einbruch im Signal von Uracil sollte eine Ionensuppression anzeigen. Die ermittelten IC_{50} -Werte waren etwas höher als ansonsten in der Literatur beschrieben. Die Autoren führten dies auf eine erhöhte Methanolkonzentration, kurze Reaktionszeiten (51.5 s für die Inhibition und 17.2 s für den Substratumsatz) und die Bandenverbreiterung zurück.

3.2.4 Mehrdimensionale massenspektrometrische Untersuchungen mit ESI

Für die multidimensionale Wirkungsbezogene Analyse wäre eine massenspektrometrische Detektion besonders wünschenswert, da im Gegensatz zu konventionellen Methoden ein einzelner Detektor ausreichen würde, um Struktur und Wirkung aufzuklären. Je komplexer die biochemischen Systeme werden, desto bedeutender wird jedoch besonders bei ESI-MS-Messungen die Ionensuppression.

Üblicherweise werden die Reaktionen offline im Reaktionsgefäß durchgeführt und nach einem Aufreinigungsschritt wie LC oder Affinitätschromatographie (AC) im ESI-MS untersucht. GERBER et al. [250, 251] ließen vier Enzyme in einem Ansatz mit den jeweiligen Substratkonjugaten reagieren und vereinfachten die Probenmatrix mit AC, so dass die Aktivitäten im ESI-MS ausgewertet werden konnten.

Untersuchungen verschiedener Enzymaktivitäten an lebenden Organismen wurden von BASILE et al. [252] vorgenommen. Bakterien wurden auf einem Filter immobilisiert und mit einem Substratmix inkubiert. Nach Aufreinigung der Probenlösung durch Filtration konnten im ESI-MS anhand der Produkte die Aminopeptidaseaktivitäten ermittelt werden. Anhand von Aktivitätsunterschieden war es möglich, eine Zuordnung zu verschiedenen Bakterienstämmen zu treffen.

Ein Versuch, den Umsatz zweier Enzyme simultan in einem homogenen Versuchsansatz ohne Aufreinigungsschritte mit ESI-MS zu detektieren, wurde mit alkalischer Phosphatase und Mikroperoxidase gezeigt [253]. Online-Durchführungen von simultanen Messungen mehrerer enzymatischer Reaktionen sind in der Literatur bisher jedoch nicht beschrieben.

Teil III

Ergebnisse und Diskussion

4 Auswahl der Targets für eine Wirkungsbezogene Analytik

Verschiedene Voraussetzungen müssen bei der Auswahl der Zielstrukturen für eine Wirkungsbezogene Analytik beachtet werden. Es sollte eine toxikologische Relevanz vorhanden sein, die mit der Wechselwirkung von Target und Analyt einhergeht. Da der wirkungsbezogene Detektor als homogen arbeitender Detektor konzipiert wurde, müssen sowohl die Targets als auch benötigte Substrate kontinuierlich zudosiert werden. Daher wurde auch auf günstige Bezugsquellen der Zielstrukturen geachtet. In die erste Auswahl als Targets für den wirkungsbezogenen Detektor fielen damit zum einen Acetylcholinesterasen, deren Inhibition einen Indiz auf mögliche neurotoxische Substanzen liefert. Zum anderen wurden Proteinphosphatasen untersucht, deren Inhibition auf potentielle hepatotoxische Verbindungen schließen lässt. Schließlich wurden auch Leuchtbakterien als Targets untersucht. Deren Einsatz in einem wirkungsbezogenen Detektor sollten einen Überblick über die Gesamtoxität der Probe geben, für den Fall, dass kein Messkanal für spezielle toxikologische Zielmoleküle zur Verfügung steht.

4.1 Indikator für Neurotoxizität: Acetylcholinesterasen

Acetylcholinesterase (AChE) ist ein gut geeignetes Enzym für die Anwendung in Biosensoren [91]. Es sind keine Cofaktoren erforderlich, um das Enzym zu aktivieren. AChE kann einfach aus mehreren Organismen gewonnen werden und besitzt verglichen mit anderen Enzymen eine sehr gute Stabilität, sowohl unter Messbedingungen als auch die Lagerung betreffend. Hohe Umsatzzahlen des Enzyms bedeuten kurze Reaktionszeiten, um gute Messsignale detektieren zu können. Ausgehend von einem Einsatz in einem Online-Detektor wurden für die Entwicklung der Assays jeweils Inhibitionszeiten von maximal 10 Minuten veranschlagt. Für den Umsatz des Substrates wurden höchstens 5 Minuten gerechnet.

Für die Anwendung im Online-Detektor wurde eine rekombinant hergestellte AChE verwendet. Zum Einsatz kam eine Mutante der Acetylcholinesterase aus dem Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis* Variante B (NbAChE) [254], die mit hohen Ausbeuten in Hefezellen *Pichia pastoris* aus dem Überstand gewonnen werden kann und nach Anreicherung mit Cross-flow-Ultrafiltration mit Anionenaustauschchromatographie gereinigt wird [255]. Die Inhibitionskonstanten der NbAChE waren gegenüber einigen Insektiziden gentechnologisch erhöht worden, um empfindlichere Messungen mit Biosensoren zu ermöglichen. Dazu wurden Aminosäuren ausgetauscht, die an der katalytischen Triade beteiligt sind. Im Folgenden wurde, wenn nicht anders erwähnt, die Mutante M301A verwendet, bei

der Methionin an Position 301 durch Alanin ausgetauscht wurde [256].

Die NbAChE-Mutante konnte in einfacher Pufferlösung bei pH 8.5 ohne weitere aktivierende oder stabilisierende Reagenzien eingesetzt werden. Aus Zellüberstand aufgereinigte AChE mit einer Konzentration von $\sim 10\,000$ U/mL konnte über mehrere Monate im Kühlschrank ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden. Auch die auf 10 mU/mL in TRIS-Puffer (pH 8.0) verdünnte Arbeitslösung der AChE zeigte während eines Messtages, gelagert bei Raumtemperatur, keine Verminderung ihrer Aktivität. Eine Temperierung der Enzymlösung im Messaufbau war hinsichtlich der Enzymaktivität daher nicht notwendig.

4.1.1 Substrate

Ein Nachweis der AChE-Aktivität erfolgte mit dem Substrat Acetylthiocholiniodid (ATCI), das nach enzymatischer Hydrolyse durch Reaktion mit dem ELLMAN's Reagenz 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) das chromogene Produkt Thionitrobenzoat (TNB) erzeugt, dessen Absorption bei 412 nm detektiert wird (Abb. 1.7) [49].

Besonders vorteilhaft für den Aufbau eines Online-Detektors ist bei diesem Aktivitätsnachweis, dass die verwendeten Reagenzien kostengünstig erhältlich sind. Nachteilig für einen Online-Detektor erscheint, dass zusätzlich zum Substrat eine Reagenzlösung zudosiert werden muss. Dies würde theoretisch bedeuten, dass eine zusätzliche Pumpe in einem Online-System erforderlich wäre. In Offline-Versuchen auf der Mikrotiterplatte zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Qualität des Signals, gleichgültig ob Substrat- und Reagenzlösung nacheinander zugegeben wurden, oder ob ein Substrat-Reagenz-Gemisch hergestellt und zur Enzymlösung gegeben wurde. Im Online-Versuch erwies sich die Zugabe des Substrat-Reagenz-Gemisches außerdem als vorteilhaft, da die Grundlinie des Signals stabiler war. Aufgrund der vorherrschenden laminaren Strömungen im Online-Detektor (siehe Abschnitt 2.1.3) war ein vollständiges Mischen im Fall des getrennten Zudosierens beider Lösungen in radialer Richtung schwierig, wodurch eine schwankende Grundlinie des Detektorsignals generiert wurde. Für den Einsatz in Online-Detektoren empfiehlt es sich daher, wenn möglich alle Reagenzien vorgemischt zuzudosieren.

Die spontane Hydrolyse von ATCI in der Abwesenheit von Enzym war vernachlässigbar gering. Vergleichende Versuche zeigten keine Verbesserung des Messsignals, egal ob das Substrat-Reagenz-Gemisch gekühlt aufbewahrt wurde, bevor es zum Einsatz kam oder nicht.

Wird das ELLMAN's Reagenz für die Bestimmung der AChE-Aktivität verwendet, stören freie Thiolgruppen die Reaktion. Es konnte daher kein BSA als stabilisierendes Protein zur Enzymlösung gegeben werden, da dadurch das Reagenz abreagierte und einen hohen Signaluntergrund erzeugte.

Mit dem Substrat ATCI wurde die Aktivität der AChE bei verschiedenen pH-Werten getestet. Mit zunehmendem pH-Wert stieg das Grundsignal an. Um eine Hydrolyse von ATCI und die Zersetzung von DTNB zu TNB ohne Einwirken des Enzyms auszuschließen, wurde die gemessene Absorptionsänderung um das in Abwesenheit von Enzym resultierende Signal korrigiert. Die Versuche zeigten, dass die Aktivität des Enzyms mit steigendem pH-Wert bis zu einem pH-Wert

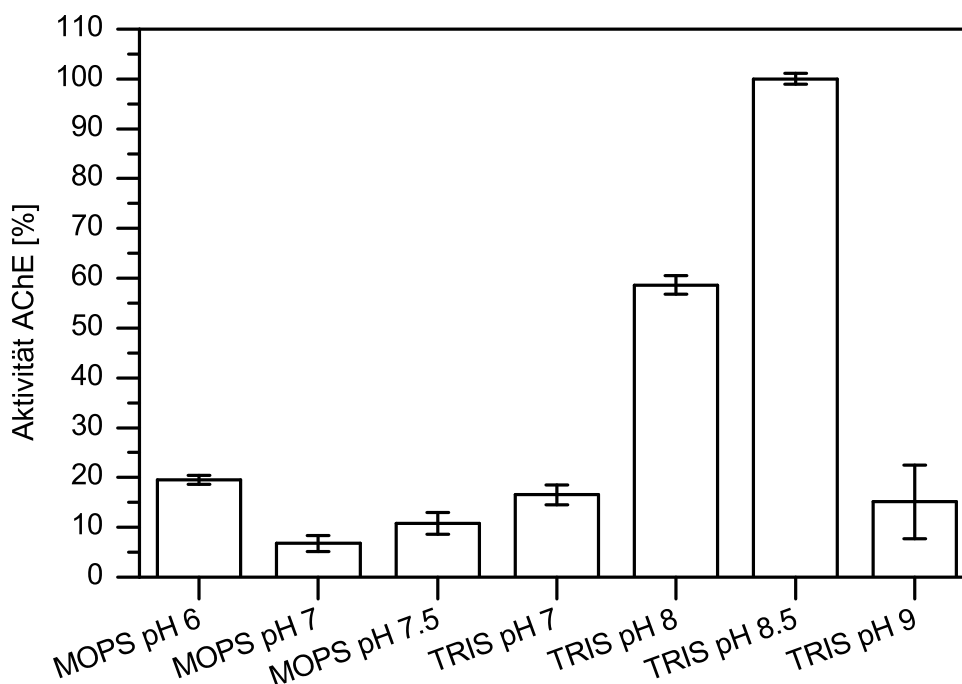


Abb. 4.1: Einfluss verschiedener Puffer auf die AChE-Aktivität. In TRIS-Puffer pH 8.5 zeigte die Enzymlösung die größte Aktivität. Bei höheren pH-Werten nahm die Aktivität als Folge der spontanen Hydrolyse des Substrats ATCI wieder ab. (Fehler: Standardabweichung, $n=3$)

von 8.5 zunahm und dann wieder stark abnahm (siehe Abb. 4.1). Die Abnahme der Aktivität lag unter anderem an der Hydrolyse und Zersetzung des Substrats und Reagenzes, die die enzymatische Hydrolyse behinderten.

Neben dem Aktivitätsnachweis durch Absorptionsmessung nach ELLMAN wurden Substrate für AChE getestet, die nach enzymatischer Hydrolyse ihre Fluoreszenzeigenschaften verändern (Abb. 4.2). Auf Mikrotiterplatten wurden jeweils die Substratumsätze durch spontane und enzymatische Hydrolyse getestet und gegebenenfalls optimiert. Dabei wurde jeweils die zeitliche Entwicklung des Fluoreszenzsignals erfasst.

Fluoresceindiacetat (Abb. 4.2, a) wäre wegen der geringen Kosten ein für die Online-Detektion sehr geeignetes Substrat. In den Versuchen stellte es sich jedoch als unzuverlässig heraus. Die Entwicklung des Fluoreszenzsignals durch die enzymatische Hydrolyse folgte keiner Kinetik erster Ordnung (Abb. 4.3), da zwei Acetatgruppen abgespalten werden können. Das intermediär entstehende Monoacetat fluoresziert weniger stark als Fluorescein. Eine Bestimmung der Enzym-Einheiten, um die Reduzierung der Aktivität zu quantifizieren, ist somit schwierig, da die gängigen Formeln nicht angewendet werden können. Für eine Online-Detektion mit festen Reaktionszeiten wäre das Substrat trotzdem geeignet. Ein schwerwiegender Nachteil ist jedoch zusätzlich die geringe Löslichkeit von Fluoresceindiacetat. In Methanol beträgt die Löslichkeit 1 mM. Eine Verdünnung in Wasser resultiert in einer Substratkonzentration, die weit entfernt von der opti-

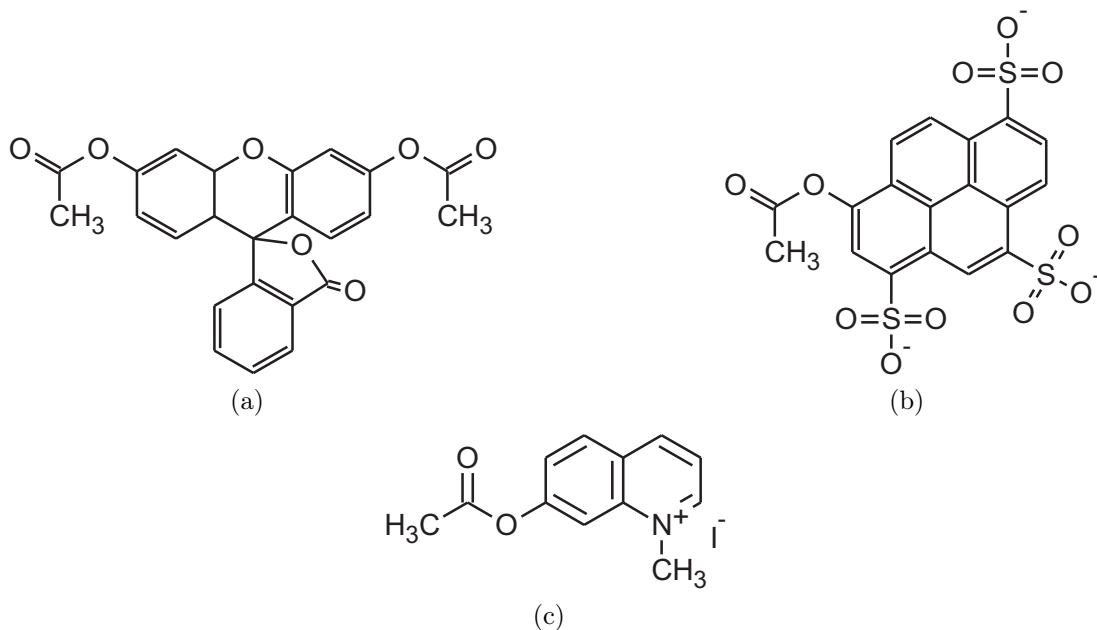


Abb. 4.2: Substrate, die nach der enzymatischen Umsetzung durch AChE ihre Fluoreszenzeigenschaften verändern. In Klammern sind die Anregungs- und Emissionswellenlängen der Produkte angegeben. (a) Fluoresceindiacetat (FDA, λ_{ex} =488 nm, λ_{em} =520 nm) (b) 8-Acetoxy-pyren-1,3,6-trisulfonsäure (λ_{ex} =460 nm, λ_{em} =530 nm) (c) 7-Acetoxy-1-methyl-chinoliniumiodid (AMQI, λ_{ex} =403 nm, λ_{em} =502 nm)

malen Konzentration liegt, damit das Enzym nach der Michaelis-Menten-Kinetik mit maximaler Geschwindigkeit arbeiten kann.

Eine in wässriger Lösung sehr leicht lösliche Acetoxyverbindung ist die 8-Acetoxy-pyren-1,3,6-trisulfonsäure (Abb. 4.2, b), die nach Abspalten des Acetats ein starkes Fluorophor mit einer Anregungswellenlänge von 460 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm erzeugt. Bei pH-Werten im Bereich des pH-Optimums von AChE wird das Acetat jedoch spontan abgespalten. Es war nicht möglich, im Fluoreszenzspektrometer eine enzymatische Hydrolyse zu erfassen, da die spontane Zersetzung den Signaluntergrund zu sehr erhöhte. Eine Hydrolyserate in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte konnte nicht aufgenommen werden, da die Zersetzung so rasch erfolgte, dass jeweils bereits nach kürzester Messzeit eine Signalsättigung, d.h. ein hoher Umsatz des Substrats eintrat. In der Literatur wurde die 8-Acetoxy-pyren-1,3,6-trisulfonsäure als Nachweis für eine Esterhydrolyse durch Peptid-Dendrimere bei einem niedrigen pH-Wert von 5.5 in Citratpuffer eingesetzt [257].

Als weiteres Fluoreszenzsubstrat wurde 7-Acetoxy-1-methyl-chinoliniumiodid (AMQI, Abb. 4.2, c) getestet. AMQI wurde in der Literatur als Substrat für eine Online-Detektion von AChE-Aktivität eingesetzt [50]. Es ist sehr gut wasserlöslich. Die Hydrolyse ist bei pH 8.0 nicht so ausgeprägt wie bei der 8-Acetoxy-pyren-1,3,6-trisulfonsäure, nimmt mit zunehmendem pH-Wert jedoch deutlich zu. Die Hydrolyserate von AMQI in Abwesenheit von Enzym wurde bei verschiedenen

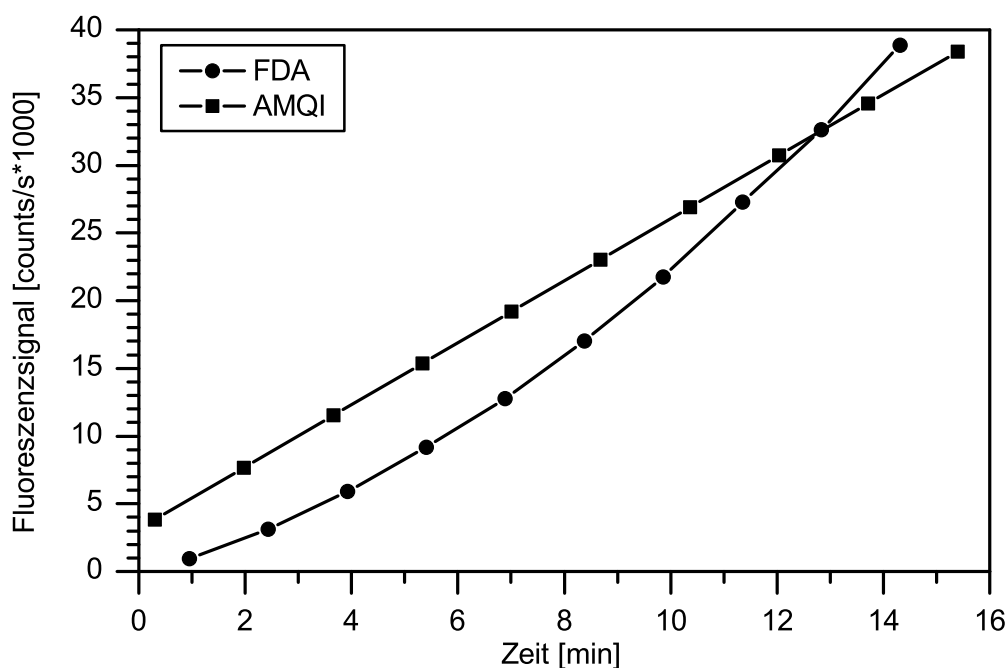


Abb. 4.3: Vergleich des enzymatischen Umsatzes der Substrate FDA und AMQI. Die Fluoreszenzentwicklung von FDA erfolgt durch die beiden Abgangsgruppen nicht linear. (n=3, Fehler in dieser Skalierung nicht darstellbar)

pH-Werten getestet. Bezogen auf Wasser hydrolysierte AMQI im Pufferbereich pH 5-6 (Citrat- und Natriumdihydrogenphosphat-Puffer) vergleichbar schnell. Zwischen pH 6-7 (Natriumdihydrogenphosphat- und TRIS-Puffer) war die Hydrolyse um einen Faktor 4 erhöht. AMQI gelöst bei pH 8 in TRIS-Puffer zeigte sogar eine 15fach schnellere Hydrolyse als in Wasser. Dennoch wurde dieses Substrat im Vergleich mit den anderen getesteten Fluoreszenzsubstraten als am geeignetsten für die Verwendung in einem Online-Detektor erachtet, da es eine gute Löslichkeit und Quantenausbeute hat. Um die spontane Hydrolyse gering zu halten, wurde das AMQI dabei in Wasser gelöst und bis zur Messung auf Eis gelagert.

4.1.2 Inhibitoren

Verschiedene Inhibitoren der AChE wurden verwendet (Abb. 1.2, a-f, Abb. 1.5 und Abb. 1.6). Die Insektizide und der Naturstoff Galantamin standen als Standardlösungen zur Verfügung. Anatoxin-a(S) war in einer gefriergetrockneten Blaualgenprobe der Gattung *Anabaena flos-aquae* enthalten.

Die Enzyminhibition wurde jeweils in Mikrotiterplattentests durchgeführt. Dabei wurden die Versuchsparameter nicht hinsichtlich einer niedrigen Nachweisgrenze der Inhibitoren optimiert, sondern die Versuchsbedingungen wurden so gewählt, dass praxisorientierte Inhibitions- und Substratumsatzzeiten für eine Anwendung in einem Online-Enzyminhibitionsdetektor berücksichtigt wurden. Mithilfe der Vorversuche auf der Mikrotiterplatte sollten die zu erwartenden Inhibitionssignale eines Online-Detektors abgeschätzt werden können.

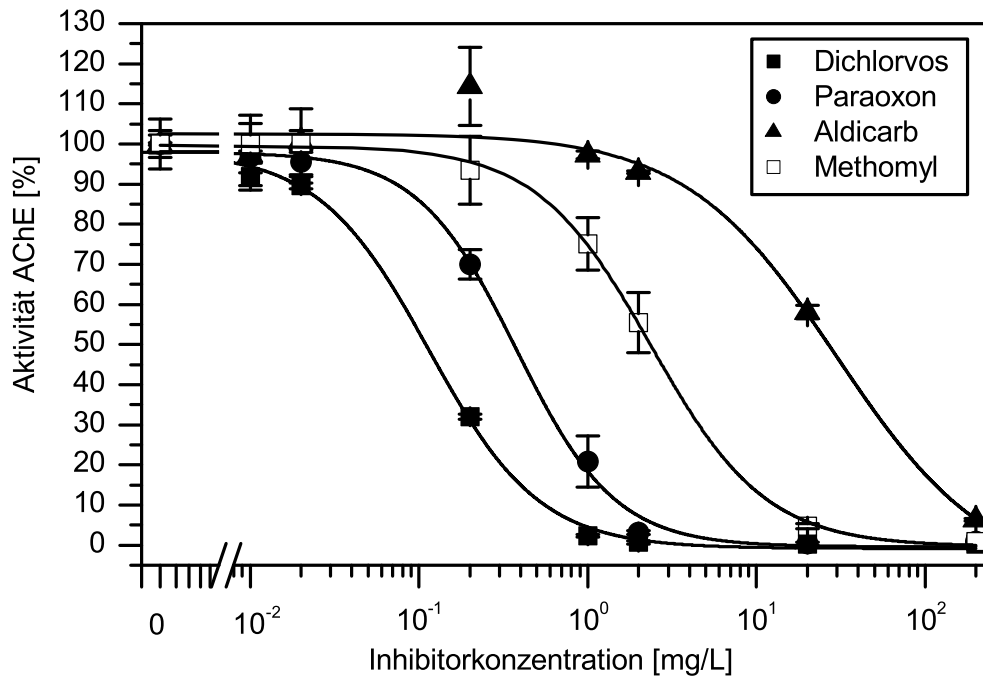


Abb. 4.4: Enzyminhibitionskurven einiger Insektizide. Auf der Mikrotiterplatte wurden jeweils verschiedene Insektizidkonzentrationen mit AChE für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die verbliebene Enzymaktivität nach ELLMAN bestimmt. (Fehler: Standardabweichung, $n=3$)

Verschiedene Inhibitorkonzentrationen wurden jeweils um einen Faktor 10 durch Enzympuffer verdünnt und für eine kurze Inhibitionszeit von 5 min bei Raumtemperatur gehalten, um die Versuchsbedingungen in einem Online-Detektor zu simulieren. Die Enzymaktivität wurde nach der Inkubationszeit nach ELLMAN mit ATCI als Substrat bestimmt.

Durch Auftragen der Inhibitorkonzentration in der eingesetzten Probe gegen die verbliebene Enzymaktivität konnten Kalibrierkurven der Enzyminhibition gewonnen werden. Exemplarisch sind in Abb. 4.4 die Inhibitionskurven für die Carbamate Aldicarb und Methomyl und die Organophosphate Dichlorvos und Paraoxon gezeigt. Die Datenpunkte konnten sigmoidal angepasst werden.

Die benötigte Inhibitorkonzentration, um eine 50%ige Inhibition der Enzymaktivität zu beobachten (IC_{50}), unterscheidet sich deutlich von Insektizid zu Insektizid. Der IC_{50} -Wert lässt Rückschlüsse auf die Affinität der verschiedenen Inhibitoren zu den verwendeten AChE zu.

Die Hemmkonstanten der Inhibitoren, die später im Online-Enzyminhibitionsdetektor untersucht werden sollten, wurden ebenfalls durch Mikrotiterplatten-tests bestimmt. Zur Bestimmung der k_i -Werte wurde das Enzym für jeweils 5 min mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen inkubiert. Die Konzentration des freien Enzyms $[E]$ ändert sich mit einer Kinetik pseudo-erster-Ordnung nach Gleichung 4.1 [57].

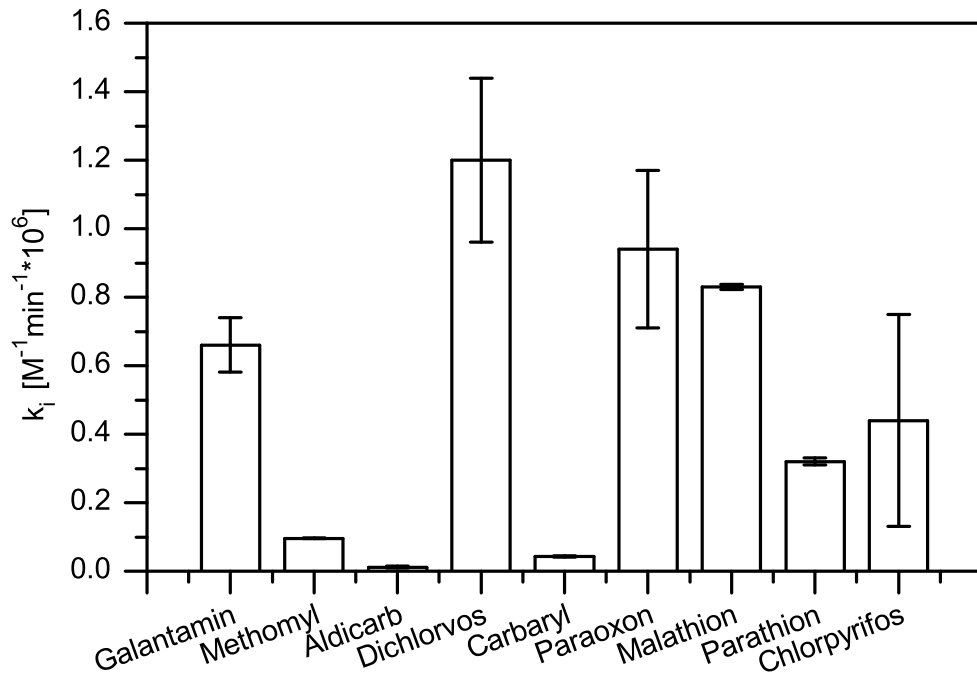


Abb. 4.5: Hemmkonstanten k_i der NbAChE-Mutante M301A einiger Insektizide. Die Phosphorthionate wurden vor Bestimmung der Enzymhemmung chemisch oxidiert. Die Oxidation mit N-Bromsuccinimid war unvollständig. Daher wurden unterschiedliche k_i -Werte für Paraoxon und Parathion nach Oxidation erhalten. (Fehler: Standardabweichung, $n=3$)

$$\ln \frac{[E]}{[E_0]} = -k_i \cdot [I] \cdot t \quad (4.1)$$

Dabei ist $[E_0]$ die Anfangskonzentration des Enzyms, $[I]$ die Inhibitorkonzentration im Reaktionsvolumen und t die Inhibitionszeit. Logarithmisches Auftragen der prozentualen Abnahme der Enzymaktivität gegen die variierende Inhibitorkonzentration ergaben Geraden. Die Hemmkonstante k_i wurde durch Teilen der Steigung durch die Inhibitionszeit von 5 min berechnet. Die ermittelten Hemmkonstanten der verwendeten NbAChE-Mutante sind in Abb. 4.5 dargestellt. Phosphorthionate wurden vor der Inkubation mit Enzym chemisch mit N-Bromsuccinimid (NBS) oxidiert.

Üblicherweise wird die Hemmkonstante durch Variation der Zeit bei konstanter Inhibitorkonzentration bestimmt [256, 71]. Für eine schnelle, parallele Bestimmung der Hemmkonstanten auf einer Mikrotiterplatte war jedoch die Variation der Inhibitorkonzentration und Konstanthalten der Inhibitionszeit einfacher. Die ermittelten Hemmkonstanten stimmen in ihrer Größenordnung mit den Literaturdaten, soweit vorhanden, überein (Tab. 4.1).

Die unterschiedlichen Hemmkonstanten, die die Affinität der Inhibitoren zum Enzym widerspiegeln, wirken sich auch direkt auf die Nachweisgrenzen des Enzyminhibitionsdetektors (EID) aus. Da die Inhibitionszeit im Nachsäulenreaktor

Tabelle 4.1: Hemmkonstanten k_i [$M^{-1}min^{-1}$] der NbAChE-Mutante M301A: Vergleich der experimentellen Ergebnisse und Literaturdaten

| Inhibitor | k_i (M301A) Experiment | k_i (M301A) [254, 256] | k_i (Wildtyp) [254] |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Galantamin | $6.6 \cdot 10^5$ | – | – |
| Methomyl | $9.6 \cdot 10^4$ | – | – |
| Aldicarb | $1.2 \cdot 10^4$ | $1.3 \cdot 10^4$ | $8.0 \cdot 10^3$ |
| Dichlorvos | $1.2 \cdot 10^6$ | – | $1.3 \cdot 10^5$ |
| Carbaryl | $4.3 \cdot 10^4$ | $5.6 \cdot 10^4$ | $3.1 \cdot 10^4$ |
| Paraoxon | $9.4 \cdot 10^5$ | $1.5 \cdot 10^6$ | $1.0 \cdot 10^6$ |
| Malathion | $8.3 \cdot 10^5$ | – | – |
| Parathion | $3.2 \cdot 10^5$ | – | – |
| Chlorpyrifos | $4.4 \cdot 10^5$ | – | $2.0 \cdot 10^7$ |

konstant ist, liefern Inhibitoren mit hoher Hemmkonstante ein stärkeres Inhibitionssignal als Inhibitoren mit niedriger Hemmkonstante. Der Online-EID wird also mit zunehmender Hemmkonstante geringere Nachweisgrenzen erreichen können.

Laut Trinkwasserverordnung liegt der tolerierbare Grenzwert für Pflanzenschutzmittel bei $0.1 \mu g/L$ für einzelne Stoffe und bei $0.5 \mu g/L$ als Summenwert. Der Aufbau eines Online-EIDs, der die Erwartungen der Trinkwasserverordnung erfüllen kann, müsste also eigentlich auf einen Nachweis des Insektizids mit der geringsten Hemmkonstante optimiert werden. Die praktische Umsetzung ist aber aufgrund der benötigten Reaktorgrößen nicht realisierbar. Zudem wurden die Grenzwerte mit einem Sicherheitsbereich sehr niedrig festgelegt, um einen toxischen Effekt auf den Menschen auszuschließen. Im Konzentrationsbereich der Trinkwasserverordnung ist eine Wirkungsbezogene Analyse daher in Frage zu stellen. Bei der Wahl der Parameter des Online-EIDs wurde folglich nicht darauf abgezielt, die Grenzwerte der Trinkwasserverordnung erfassen zu können, sondern vielmehr mit AChE als Targetmolekül die prinzipielle Machbarkeit einer Wirkungsbezogenen Analyse zu zeigen.

4.1.3 Stabilität des Enzyms in der mobilen Phase

Die Wirkungsbezogene Analyse verbindet physikalisch-chemische Trennung mit einer biochemischen Detektionseinheit zum Erkennen potentieller Schadstoffe. Der Enzyminhibitionsdetektor (EID) muss mit der mobilen Phase der chromatographischen Trennung kompatibel sein.

Da sich die Arbeiten auf RP-HPLC konzentrierten, wurden die häufig gebräuchlichen Lösungsmittel Methanol und Acetonitril mit AChE-Lösung inkubiert und anschließend nach ELLMAN die verbliebene Aktivität der AChE berechnet. Die Inkubationszeit betrug 5 min, um die Ergebnisse auf einen Online-Detektor übertragen zu können.

Die Ergebnisse zeigten, dass die eingesetzte NbAChE durch Acetonitril stärker denaturiert wurde als durch Methanol (siehe Abb. 4.6). Bei einem 50%igen Methanolgehalt betrug die Restaktivität der NbAChE noch $\sim 40\%$, während beim

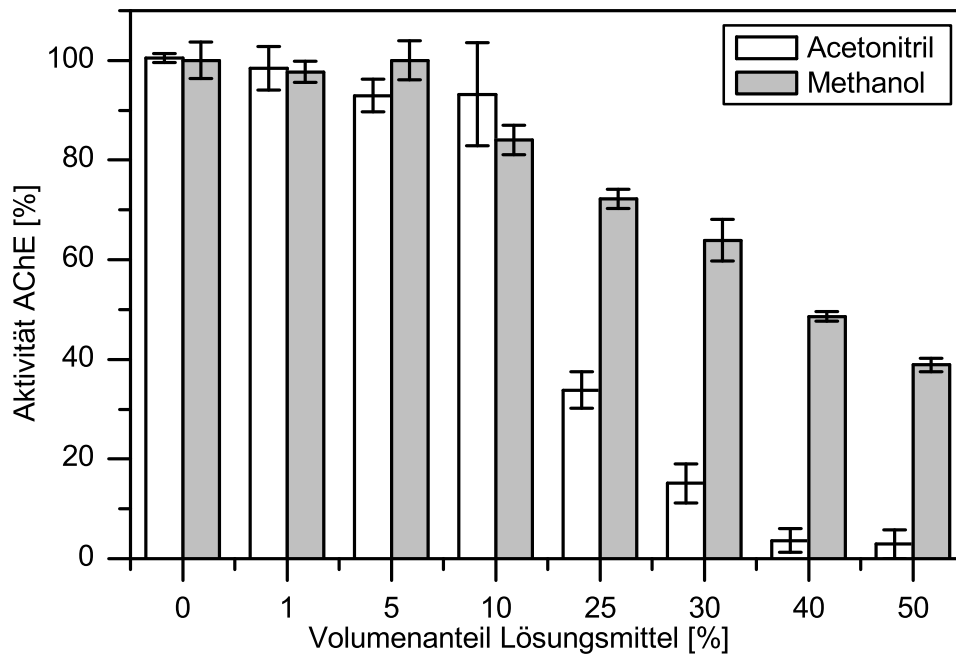


Abb. 4.6: Denaturierung von Acetylcholinesterase durch die mobile Phase. NbAChE verliert mit zunehmender Acetonitrilkonzentration stärker an Aktivität als bei zunehmendem Methanolgehalt. Die Inkubationszeit betrug 5 min. (Fehler: Standardabweichung, $n=3$)

gleichen Acetonitrilgehalt kaum noch Aktivität nachgewiesen werden konnte. Bis zu einem 10%igen Lösungsmittelgehalt macht sich jedoch kaum ein hemmender Einfluss auf die AChE bemerkbar. Da der EID nicht nur mit isokratischen Trennungen, sondern auch mit Trennungen durch Lösungsmittelgradienten kombinierbar sein sollte, musste beim Design des Online-Systems berücksichtigt werden, dass die mobile Phase der HPLC in der Fluidik des Detektors höchstens 10% betrug. Ansonsten würde sich der Lösungsmittelgradient in der Basislinie bemerkbar machen. Daher wurden beim Online-EID jeweils neun Teile Enzymlösung zu einem Teil HPLC-Eluat zudosiert. Als Lösungsmittel der mobilen Phase wurde Methanol gewählt. Zu einem ähnlichen Schluß kamen auch INGGANINAN et al. [47].

Die Lösungsmittelstabilität von Acetylcholinesterasen aus unterschiedlichen Quellen variieren, wie die Testergebnisse zeigten (Abb. 4.7). Acetylcholinesterase aus dem Zitteraal (eeAChE) verlor bei zunehmendem Acetonitrilgehalt stärker an Aktivität als NbAChE. Da sich NbAChE insgesamt als stabileres Enzym erwiesen hat, wurden alle weiteren Versuche in Richtung eines Online-EIDs mit diesem Enzym durchgeführt.

Effekte von Säuren wie maximal 0.1% Ameisensäure oder Essigsäure in der mobilen Phase wurden bei einer zehnfachen Verdünnung des HPLC-Eluats mit 10 mmolarem Enzympuffer nicht beobachtet. Eine Erniedrigung des pH-Wertes wird demnach abgepuffert.

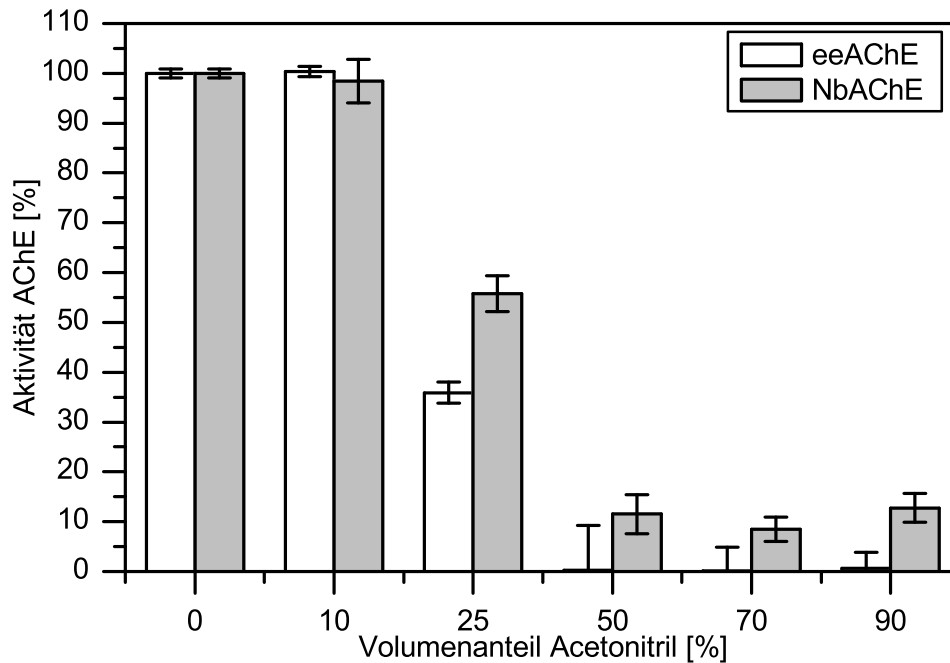


Abb. 4.7: Vergleich der Stabilität in Lösungsmittel von Acetylcholinesterasen aus unterschiedlichen Quellen. Die Acetylcholinesterase aus dem Zitteraal (eeAChE) reagiert empfindlicher auf Acetonitril als die Acetylcholinesterase aus der Nematode *Nippostrongylus brasiliensis* (NbAChE). Die Inkubationszeit betrug 5 min. (Fehler: Standardabweichung, n=3)

4.2 Indikator für Hepatotoxizität: Proteinphosphatasen

Eine wirkungsbezogene Erkennung von vielen cyanobakteriellen Toxinen kann über die Bindung an Serin/Threonin-Phosphatasen erfolgen. Die Proteinphosphatasen (PP) sind im Vergleich zur AChE die Arbeits- und Lagerungsstabilität betreffend bei weitem empfindlichere Enzyme. Sie benötigen zudem verschiedene Cofaktoren zur Aktivierung. Enzymlösungen wurden fraktioniert und nicht länger als 6 Monate im Gefrierfach aufbewahrt. Arbeitslösungen wurden kurz vor Durchführung der Tests hergestellt. Enzymaktivitäts- und Enzyminhibitionstests wurden auf Mikrotiterplatten durchgeführt, um die Assays hinsichtlich eines Einsatzes in einem Online-EID zu optimieren.

Verwendet wurden Enzyme aus kommerziellen Quellen. Es handelte sich dabei um rekombinant hergestellte Proteinphosphatase 1 aus Kaninchen der Firma Sigma und um Proteinphosphatase 2A aus Kaninchenmuskel der Firma Promega.

Für eine spätere Anwendung in einem Online-Assay wurde am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart an der rekombinanten Herstellung humaner Proteinphosphatasen aus Leberzellen gearbeitet. Die Enzyme sollten dem Institut für Wasserchemie im Rahmen eines BMBF-Projekts zur Verfügung gestellt werden, um eine Wirkungsbezogene Analyse mit humaner Prote-

inphosphatase als Target kostengünstig aufbauen zu können. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit auch erste Tests mit rekombinant hergestellter humaner PP2A durchgeführt.

4.2.1 Substrate

Mit Blick auf die Entwicklung einer Online-Detektionsmöglichkeit der Enzymaktivität wurden verschiedene Substrate untersucht. Die Enzyme sollten möglichst hohe Umsatzzahlen für die Substrate aufweisen, damit bei kurzen Reaktionszeiten eine hohe Signalentwicklung zu erwarten ist und die Enzyminhibition empfindlich nachzuweisen ist.

para-Nitrophenylphosphat (pNPP, Abb. 1.15) wurde als Substrat getestet. Nach enzymatischer Hydrolyse der Phosphatgruppe wird die Absorption des entstandenen *para*-Nitrophenolats bei 405 nm gemessen. Günstig für die Anwendung in einer homogen durchgeführten Online-Messung sind dabei die niedrigen Kosten für pNPP. Nachteilig wirkt sich jedoch der mit $16\,500\text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ recht niedrige Extinktionskoeffizient des Produkts aus. Empfindliche Messungen erfordern eine lange Substratentwicklungszeit, die den Aufbau des Online-Detektionssystems aufwendiger machen würde. Hinzu kommt, dass die schon mit natürlichen Substraten niedrigen Umsatzzahlen für dieses künstliche Substrat weiter reduziert sind, d.h. der Substratumsatz noch langsamer stattfindet. Für den Einsatz in einem Online-EID ist es aber wichtig, ein Substrat zu wählen, das schnell umgesetzt wird und dessen Produkt sehr empfindlich detektiert werden kann.

Eine höhere Umsatzzahl wurde für ein natürliches Substrat erwartet. Deshalb wurde das phosphorylierte Protein Casein als Substrat getestet. Die Detektion der Enzymaktivität beruht dabei auf der Bestimmung des durch die Proteinphosphatasen freigesetzten Phosphats.

Der Nachweis der Enzymaktivität mit Casein als Substrat und einem Phosphatnachweis mittels Malachitgrün wäre hinsichtlich der niedrigen Kosten für die Reagenzien sehr erstrebenswert für einen Einsatz im Online-EID. Sehr aufwendig waren jedoch die Vorbereitungen vor der Messung. Um den Signaluntergrund zu reduzieren, wurden alle Geräte und Lösungen von Phosphat befreit. Die Glasgeräte wurden dazu mit verdünnter Salzsäure gespült. Freies Phosphat aus der Caseinlösung wurde über Sephadex-Säulen abgetrennt. Anschließend musste wiederum für eine reproduzierbare Durchführung der Tests mit Hilfe eines BCA-Assays die genaue Caseinkonzentration bestimmt werden.

Neben dem Aufwand zur Beseitigung von Phosphatspuren ist ein weiterer Nachteil das Ausfallen von Protein aus dem Reaktionsansatz bei dem niedrigen pH-Wert, der für die Bildung des farbigen Komplexes optimal ist. Dadurch wurde nicht nur die Absorptionsmessung aufgrund der Trübung verfälscht. Ein Einsatz des Caseins als Substrat für einen Online-Detektor musste ausgeschlossen werden, da die Gefahr einer Blockierung des fluidischen Systems aufgrund von ausgefallenem Protein zu groß war.

Da Fluoreszenzmessungen physikalisch bedingt sensitivere Messungen erlauben, wurden Fluoreszenzsubstrate getestet (Abb. 1.15, b-d). Fluoresceindiphosphat (FDP) wird vor allem als Substrat für Alkalische Phosphatasen benutzt, da ein alkalischer pH-Wert optimal für die Fluoreszenzemission des nach der

Hydrolyse entstandenen Fluorescein ist. FDP selbst ist farblos und fluoresziert nicht. Die Phosphatgruppen werden sequentiell durch das Enzym abgespalten. Das Fluoresceinmonophosphat fluoresziert jedoch nur schwach. Da die Proteinphosphatasen nur eine sehr niedrige Umsatzzahl haben, entstand während der relativ kurzen Substratumsatzzeit von 5 bis 20 min, die hinsichtlich eines Online-Tests gewählt wurden, hauptsächlich das Monophosphat. Diese Schlussfolgerung wurde gezogen, da nur ein sehr schwacher Zuwachs an Fluoreszenzsignal bei den auf Mikrotiterplatten durchgeführten Tests zu verzeichnen war.

Die Signalentwicklung von 4-Methylumbelliferyl-phosphat (MUP) als Substrat war ebenfalls nicht zufriedenstellend bei dem für Proteinphosphatasen optimalen pH Wert von 7.

Der Einsatz von den Fluoreszenzsubstraten FDP und MUP brachte im Vergleich zu pNPP als Substrat keinen Gewinn an Sensitivität.

Empfindlichere Messergebnisse konnten mit 6,8-Difluoro-4-methylumbelliferyl-phosphat (DiFMUP) als Substrat erzielt werden (siehe Abb. 4.8). Durch die Fluorgruppen wird der pK_a -Wert von MUP zu DiFMUP erniedrigt und das Fluoreszenzoptimum verschiebt sich zu niedrigeren pH-Werten.

In Abb. 4.8 sind die Inhibitionskurven von MC-LR mit PP1 dargestellt, die einmal mit dem Substrat pNPP und einmal mit dem Substrat DiFMUP gewonnen wurden. Die Inkubationszeit von Inhibitor und Enzym, sowie die Zeit für die Signalentwicklung waren jeweils identisch (siehe Bildunterschrift). Im Fall des Fluoreszenzsubstrats DiFMUP konnte jedoch eine zehnfach geringere Enzymkonzentration als beim Substrat pNPP eingesetzt werden, um bei gleicher Substratumsatzzeit noch ausreichendes Signal zu erhalten. Die geringere Enzymkonzentration verursachte daher auch einen geringeren IC_{50} -Wert für die mit DiFMUP gewonnene Kurve.

Obwohl die Verwendung von DiFMUP als Substrat in einem Online-Detektor nicht die kostengünstigste Variante ist, zeigen die Messergebnisse dennoch, dass diesem Substrat gegenüber dem günstigeren pNPP der Vorzug gegeben werden sollte.

Im Folgenden wurde die PP-Aktivität mit pNPP oder DiFMUP als Substrat bestimmt. Bei der Verwendung von pNPP wurde jeweils eine Substratentwicklungszeit von 20 min angesetzt. Bei der Verwendung von DiFMUP als Substrat waren 5 min für einen messbaren Substratumsatz ausreichend.

4.2.2 Inhibitoren

Als Inhibitoren für die PP wurden wässrige Standardlösungen von Okadasäure und Microcystinen verwendet. Rekombinant hergestellte humane PP sollten als Targets in einem Online-EID eingesetzt werden. Die Inhibition der rekombinanten PP wurde zur Charakterisierung der Enzyme mit der Inhibition kommerzieller PP verglichen. Zuerst wurden die Inhibitionstests von kommerziell bezogenen Proteinphosphatasen auf Mikrotiterplatten optimiert. Es wurden Inhibitionskurven aufgenommen, indem verschiedene Inhibitorkonzentrationen mit den Enzymen inkubiert wurden und verschiedene Substrate getestet wurden.

Zur Identifizierung verschiedener Proteinphosphatasen benutzt man typische Inhibitoren [106]. Anhand der Affinität der vermuteten Enzyme zu den Inhibito-

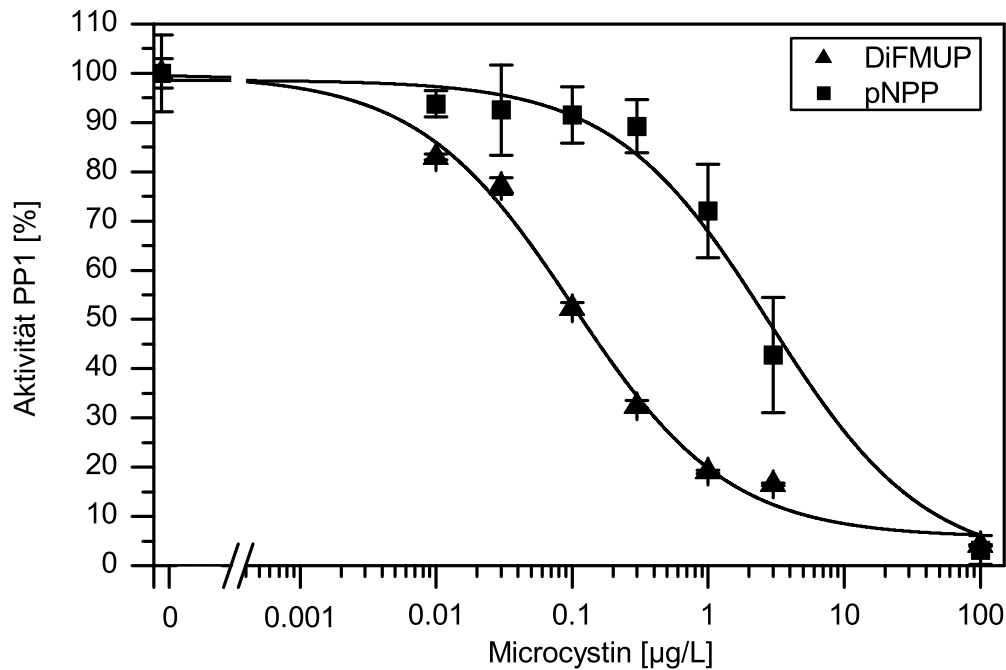


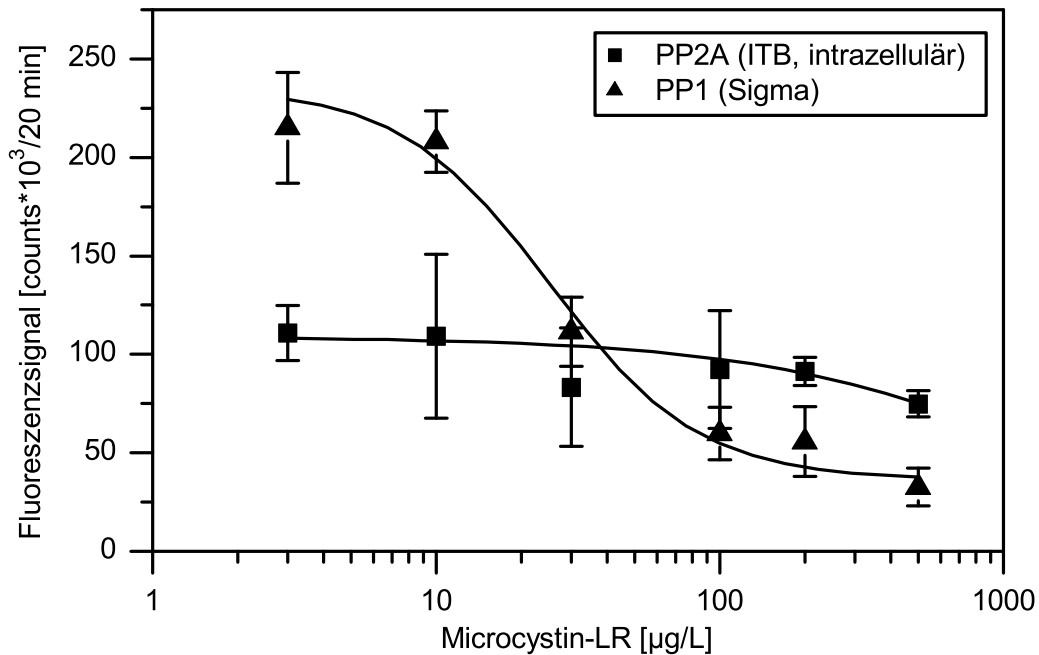
Abb. 4.8: Vergleich der Substrate pNPP und DiFMUP. Unter gleichen Inhibitionsbedingungen erhält man mit dem Fluoreszenzsubstrat DiFMUP die empfindlicheren Kalibrierkurven. Es wurde PP1 von der Firma Sigma mit Microcystin (MC-LR) auf der Mikrotiterplatte gehemmt. Mit DiFMUP beträgt der IC_{50} -Wert $0.10 \mu\text{g/L}$, mit pNPP beträgt der IC_{50} -Wert $2.8 \mu\text{g/L}$. Bedingungen: Enzymlösung ($20 \mu\text{L}$, $\sim 2 \text{ U/mL}$ (pNPP), $\sim 0.2 \text{ U/mL}$ (DiFMUP)) und MC-LR-Lösung ($70 \mu\text{L}$, verschiedene Konzentrationen) wurden für 20 min bei RT inkubiert. Jeweils $110 \mu\text{L}$ Substratlösung wurden zugegeben. Die Signalveränderung in 20 min wurde herangezogen, um die verbliebene Enzymaktivität zu bestimmen. (Fehler: Standardabweichung, $n=3$)

ren, die über den IC_{50} -Wert bestimmt wird, und anhand eventueller Abhängigkeiten von divalenten Kationen können Voraussagen über die Art der PP gemacht werden (siehe Tab. 1.4).

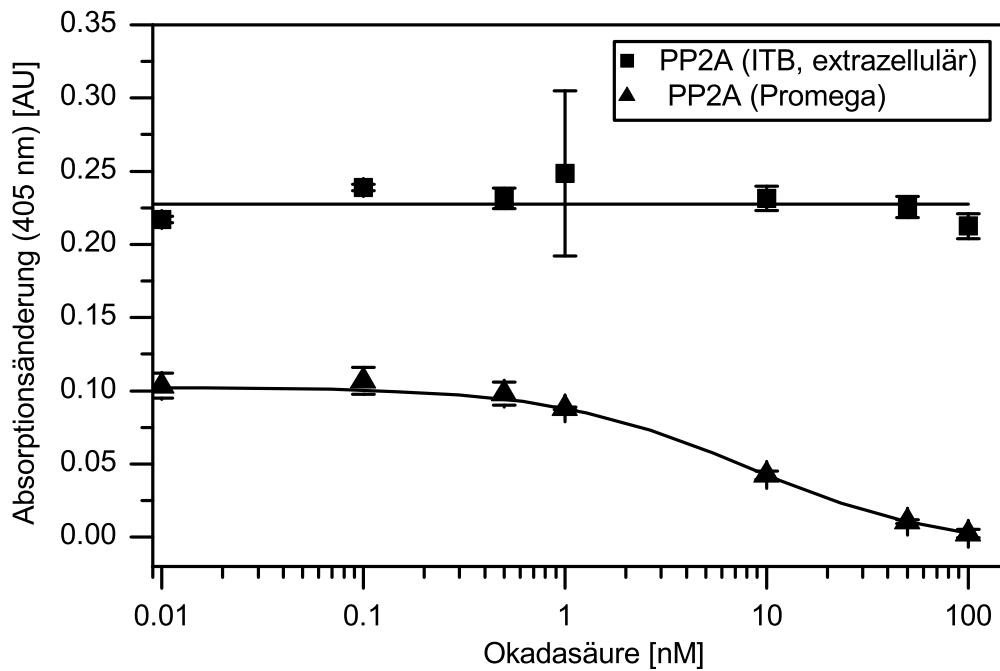
Wie man Abb. 4.9 entnehmen kann, konnten für PP1 der Firma Sigma ein IC_{50} -Wert von $25 \mu\text{g/L}$ (entspricht 25 nM) bei der Inhibition durch MC-LR bestimmt werden (Abb. 4.9, a). Für PP2A der Firma Promega wurde bei der Inhibition durch Okadasäure ein IC_{50} -Wert von 7.6 nM ermittelt (Abb. 4.9, b).

Die Inhibitionskurven mit den kommerziell bezogenen Proteinphosphatasen wurden als Referenzkurven für die rekombinant hergestellten Proteinphosphatasen der Projektpartner herangezogen. Sowohl mit der intrazellulär als auch mit der extrazellulär gewonnenen, rekombinant hergestellten PP2A konnten keine Inhibitionskurven aufgenommen werden. Die Verdünnungen der Enzymlösungen wurden dabei jeweils so gewählt, dass die Signalentwicklung im Test jeweils in einer nahezu gleichen Größenordnung wie bei den kommerziellen PP war.

Die Umsetzung der Substrate pNPP und DiFMUP ist unspezifisch für Phosphatasen. Die Inhibition durch Microcystin oder Okadasäure läuft jedoch spezi-



(a)



(b)

Abb. 4.9: Inhibitionstest mit Okadasäure und Microcystin-LR zur Charakterisierung intra- und extrazellulärer gewonnener, rekombinanter humaner PP2A. Die rekombinant hergestellten PP2As zeigten keine spezifische Inhibition. (a) Inhibition von rekombinant hergestellter, intrazellulärer PP2A (Projektpartner) im Vergleich zu einer kommerziellen PP1 (Sigma, rekombinant aus Kaninchen). (Substrat: AMQI) (b) Inhibition von rekombinant hergestellter, extrazellulärer PP2A (Projektpartner) im Vergleich zu einer kommerziellen PP2A (Promega, aus Kaninchenmuskel). (Substrat: pNPP) (Fehler: Standardabweichung, n=3)

fisch für PP1 und PP2A ab [114, 109]. Die getesteten rekombinant hergestellten PPs waren für einen Einsatz in einem wirkungsbezogenen Detektor daher nicht geeignet, weil sie die unspezifischen Substrate umsetzen konnten, aber sich nicht spezifisch inhibieren ließen.

Während der praktischen Arbeiten zu dieser Dissertation standen daher keine rekombinant hergestellten humanen PPs für einen Einsatz in einem Online-EID zur Verfügung. Der Einsatz von PPs als Target einer Wirkungsbezogenen Analyse beschränkte sich aus Kostengründen auf eine Offline-Inhibition in Mikrotiterplatten.

4.2.3 Stabilität des Enzyms in der mobilen Phase

Auf der Mikrotiterplatte wurde der Aktivitätsverlust von PP1 der Firma Sigma in Gegenwart verschiedener Volumenanteile der als mobile Phasen gebräuchlichen Lösungsmittel Methanol und Acetonitril getestet (Abb. 4.10). Wie schon bei der AChE festgestellt wurde, ist Methanol besser als mobile Phase geeignet, da weniger Aktivitätsverlust zu verzeichnen war. Proteinphosphatase zeigte sich weniger stabil gegen Lösungsmiteleinflüsse als AChE.

Nicht nur aufgrund der mangelnden Lösungsmittelstabilität der PPs, sondern auch wegen der geringen Stabilität von AChE wurde der Online-EID so konzipiert, dass das Eluat der chromatographischen Trennung zehnfach verdünnt wird, um Lösungsmittelleffekte in der biochemischen Detektionseinheit gering zu halten.

Sehr häufig wird in der Literatur zur chromatographischen Bestimmung von cyanobakteriellen Toxinen mit einem Acetonitril-Gradienten gearbeitet [258]. Häufig wird der mobilen Phase Trifluoressigsäure (TFA) als Ionenpaarbildner zugesetzt. Betrachtet man die Stabilität des Enzyms, ist Methanol besser als Lösungsmittel geeignet. Es wurde eine Chromatographiemethode mit Methanol in der mobilen Phase entwickelt, um exemplarisch ein Gemisch aus drei Microcystinstandardlösungen zu trennen. Um ein weites chromatographisches Fenster für geplante Realprobenmessungen von Microcystinen abzudecken, wurde ein Gemisch aus eher hydrophoben (MC-LR), hydrophilen (MC-RR) und aromatischen (MC-YR) Microcystinen gewählt. Um ein Chromatogramm mit guter Auflösung zu erhalten, musste der mobilen Phase Säure zugesetzt werden. Als geeignet haben sich sowohl TFA als auch Essigsäure erwiesen.

Das resultierende Chromatogramm mit Methanol und 0.1% TFA in der mobilen Phase ist in Abb. 4.11 gezeigt. Für eine Offline-Bestimmung der inhibitorischen Wirkung der Microcystine auf PP1 wurde das Eluat auf einer Mikrotiterplatte fraktioniert, durch Verdünnen mit Puffer neutralisiert und mit Enzymlösung versetzt. Nach einer Inhibitionszeit von ca. 20 min wurde mit dem Substrat DiFMUP die Aktivität des Enzyms bestimmt und als Inhibitionskurve zeitlich dem mit dem UV-Detektor erfassten Chromatogramm zugeordnet (Abb. 4.11, kleines Bild).

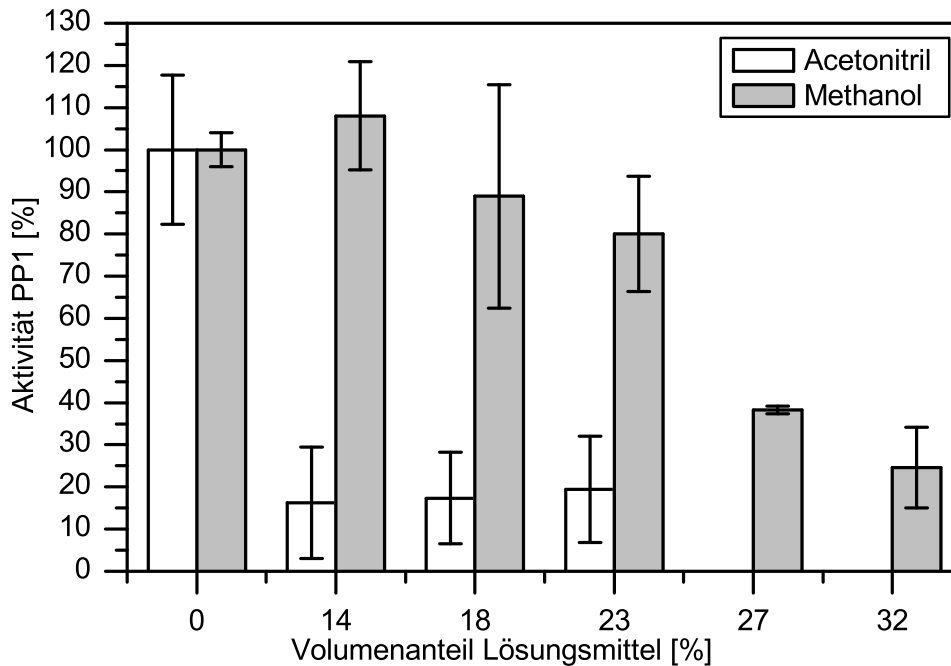


Abb. 4.10: Effekte der mobilen Phase auf die Aktivität von Proteinphosphatase. Acetonitril hemmt die Proteinphosphatase weitaus stärker als Methanol. Bei einem Acetonitrilgehalt von mehr als 23% konnte keine Aktivität mehr gemessen werden. (Fehler: Standardabweichung, n=3)

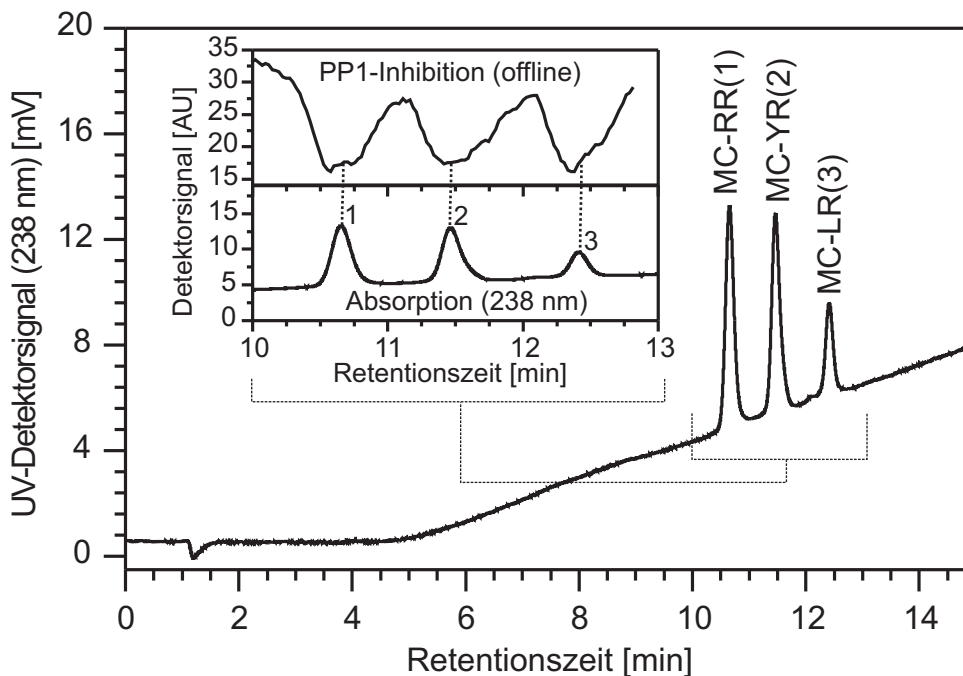


Abb. 4.11: Separation von drei Microcystinen mit Methanol-Wasser-Gradient (0.01% TFA) und anschließende Offline-Analyse der PP-Inhibition auf der Mikrotiterplatte. Das Enzym PP1 der Firma Sigma und das Substrat DiFMUP wurden verwendet.

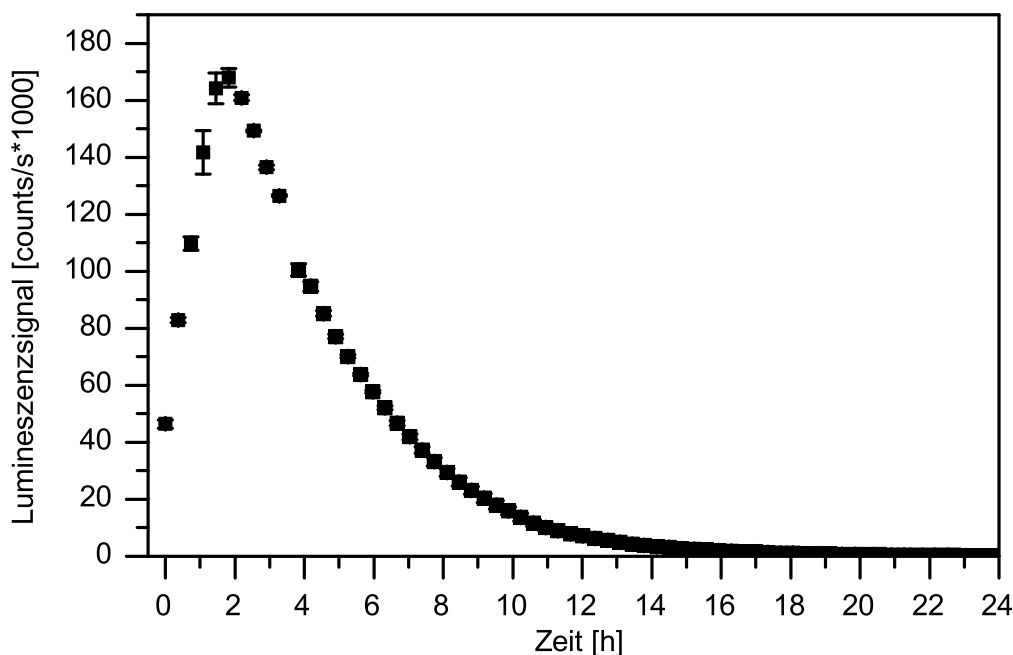


Abb. 4.12: Die Entwicklung des Lumineszenzsignals einer Leuchtbakterienlösung im Laufe der Zeit. Die Bakterienlösung wurde bei Raumtemperatur ohne Thermostatisierung für die gesamte Messdauer im Fluoreszenzmessgerät aufbewahrt. (Fehler: Standardabweichung, $n=3$)

4.3 Indikator für Gesamtoxizität: Leuchtbakterien

Die Leuchtbakterienlösung wurde aus lyophilisierten Bakterien hergestellt. Die Intensität des Lumineszenzsignals ist zeitlich nicht konstant (Abb. 4.12). Die Zunahme des Lumineszenzsignals kann nicht mit der Temperierung erklärt werden. Die Messungen wurden in $300\text{-}\mu\text{L}$ -Volumina durchgeführt. Es ist davon auszugehen, dass schon nach einigen Minuten auch ohne Temperierungsvorrichtung des Messgeräts eine konstante Temperatur in der Kavität der Mikrotiterplatte herrscht. Wahrscheinlicher ist hier der Einfluss von Sauerstoff zu beobachten. Durch das Schütteln zwischen den Messungen nimmt die Probe Sauerstoff auf, das Lumineszenzsignal steigt an. Ab einem gewissen Optimum nimmt die Lumineszenz wieder ab, weil einerseits Nährstoff verbraucht und andererseits die Temperatur im Gerät zu hoch für die Leuchtbakterien wurde, die aus dem Meer stammend kühlere Gewässer bevorzugen. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 15°C .

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Lagerung der Bakterienlösung in Pumpenreservoirs ohne Thermostat zu keinem konstanten Signal der Grundlinie bei einer Anwendung in einem Online-Detektor führen wird.

Um die Möglichkeit einer Verknüpfung von Leuchtbakterientests mit HPLC zu untersuchen, wurde der Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf das Lumineszenzsignal der Leuchtbakterien untersucht. Leuchtbakterienlösung wurde jeweils mit unterschiedlichen Anteilen an Methanol, Ethanol und Acetonitril für 15 min

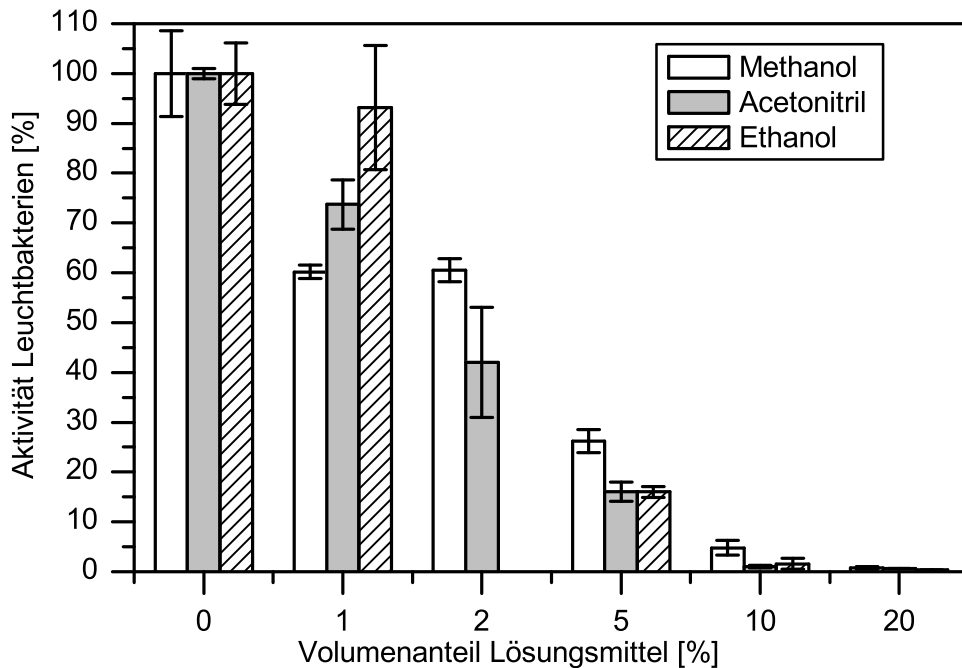


Abb. 4.13: Lösungsmittel inhibieren die Lumineszenz von Leucht Bakterien erheblich. Es konnte kein bedeutender Unterschied in den hemmenden Effekten von Methanol und Ethanol gemessen werden. (Experimentelle Bedingungen: 240 μ L Leucht Bakterienlösung wurden mit 60 μ L 2%iger NaCl-Lösung mit entsprechendem Lösungsmittelgehalt für 15 min bei RT inkubiert. Das Lumineszenzsignal wurde jeweils auf 0% Lösungsmittelgehalt der entsprechenden Messreihe normiert.) (Fehler: Standardabweichung, n=3)

inkubiert. Im Anschluss wurde die Lumineszenz erfasst. Die ermittelten Signale wurden jeweils auf die Messwerte für lösungsmittelfreie Leucht Bakterienlösung normiert.

Die prozentuale Abnahme des Lumineszenzsignals in Abhängigkeit zunehmender Lösungsmittelkonzentration ist in Abb. 4.13 dargestellt. Im Vergleich zu den Restaktivitäten der zuvor untersuchten Enzyme AChE und PP, nehmen die Lösungsmittel auf die Aktivität der Leucht Bakterien einen größeren Einfluss. Während bei den Enzymen bis zu einer Lösungsmittelkonzentration von 10% noch keine Verringerung der Aktivität zu verzeichnen war, ist im Fall der Leucht Bakterien nur bei Methanol noch 5% des anfänglichen Lumineszenzsignal zu beobachten. Bei Anwesenheit von Acetonitril oder Ethanol ist das Signal kaum noch vom Hintergrund zu unterscheiden. Aufgrund der Qualität der Daten kann nicht eindeutig entschieden werden, welchem Lösungsmittel als mobile Phase beim Aufbau eines online durchgeführten Leucht Bakterientests der Vorzug gegeben werden sollte. Methanol scheint einen etwas geringeren hemmenden Effekt auf die Leucht Bakterien auszuüben als die Lösungsmittel Acetonitril und Ethanol.

Auf der Mikrotiterplatte wurde Leucht Bakterienlösung mit verschiedenen Konzentrationen von Carbofuran und Paraoxon-ethyl in 10%iger methanolischer Lösung für 15 min inkubiert und das Lumineszenzsignal gemessen. Die resultierenden Kalibrierkurven sind in Abb. 4.14 gezeigt. Die zur Bakterienlösung gegebenen

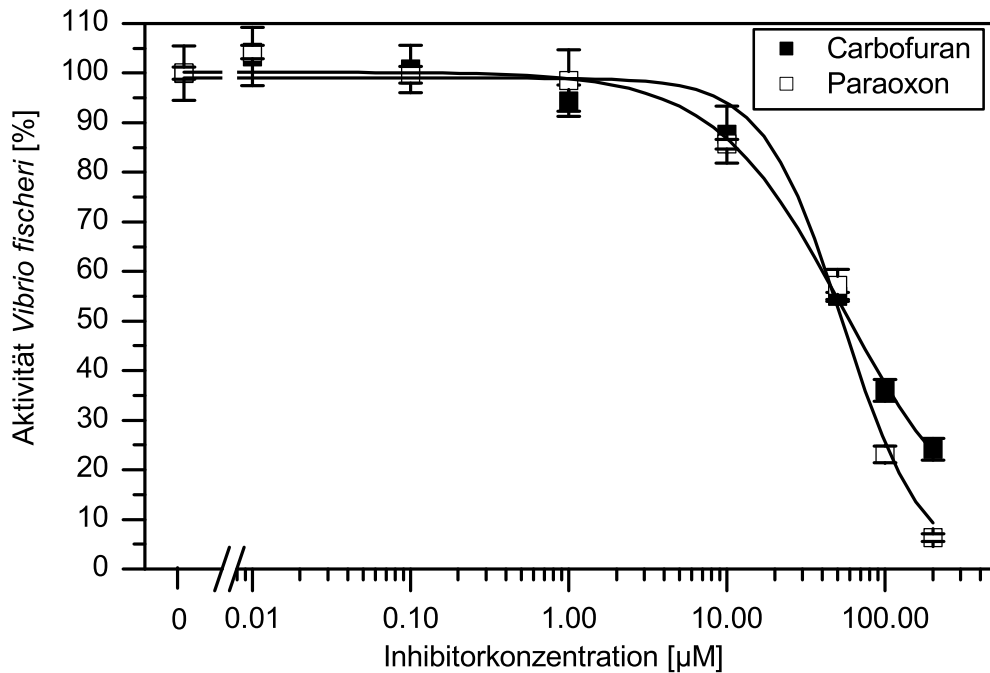


Abb. 4.14: Kalibrierkurve der Inhibition von Leuchtbakterien durch Carbofuran und Paraoxon. (Experimentelle Bedingungen: 40 µL Insektizidstandard in 10% Methanol, 40 µL NaCl-Lösung (4%) und 80 µL Leuchtbakterienlösung wurden 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Lumineszenzsignal für die jeweilige Inhibitorkonzentration erfasst, auf das Signal der Blindprobe normiert und eine sigmoidale Fitkurve angepasst.) (Fehler: Standardabweichung, n=3)

Insektizidlösungen hatten jeweils einen Methanolgehalt von 10%, um hemmende Lösungsmittelleffekte aufgrund der Verdünnungsreihe der methanolischen Stamm-lösung der Insektizidstandards zu vermeiden. Die Versuchsdurchführung erlaubte zudem eine Abschätzung, welche Inhibitionssignale bei einem Methanolgehalt von 10% und der Anwesenheit von Inhibitoren bei der Kopplung von HPLC und Leuchtbakterientest zu erwarten wären.

Nun wurde eine Wirkungsbezogene Analyse mit Offline-Inhibition von Leucht-bakterien durchgeführt. Ein Problem stellte dabei insbesondere die geringe Lö-sungsmittelverträglichkeit der Leuchtbakterien dar. Ein Insektizidgemisch von Carbofuran und Paraoxon-ethyl (je 500 µM) wurde auf einer C18-Säule isokra-tisch getrennt. Die mobile Phase setzte sich aus 50% Methanol und 50% Wasser zusammen. Mit Hilfe eines automatischen Fraktionensammlers wurden jeweils 2 Tropfen (~40 µL) pro Kavität einer Mikrotiterplatte aufgefangen. In einem ers-ten Versuch wurden 160 µL Bakterienlösung direkt zum Eluat zugegeben und nach 30 Minuten Inkubation das Lumineszenzsignal erfasst. Durch Zuordnen der Kavitäten zur Retentionszeit konnten Lumineszenzsignal und UV-Detektorsignal korreliert werden. Den Absorptionsbanden von Carbofuran und Paraoxon im UV-Detektor konnte jedoch keine parallele Verringerung des Lumineszenzsignals zuge-ordnet werden. Offenbar überwog der hemmende Effekt des Methanols mit einem

Volumenanteil von 10% in der Kavität die Inhibition durch die Insektizide.

Für eine Variante mit stärkerer Verdünnung des Eluats auf unter 10% Lösungsmittelgehalt wurden pro Kavität jeweils 40 μL des Eluats zu vorgelegten 160 μL 2%ige NaCl-Lösung getropft. Aus jeder Kavität wurden 80 μL entnommen und zu 80 μL der Bakterienlösung gegeben. Somit wurde das Eluat um einen Faktor 10 auf einen Methanolgehalt von 5% verdünnt.

Auch bei diesem Test konnte der UV-Absorption kein Inhibitionssignal der Leuchtbakterien zugeordnet werden. Das Rauschen der Grundlinie des Lumineszenzsignals war zu hoch, als das eindeutig eine Inhibitionsbande erkannt werden hätte können. Da nach den Ergebnissen aus Abb.4.13 ein 5%iger Methanolgehalt die Ausgangslumineszenz um 70% reduziert, nahm das Lösungsmittel immer noch einen inhibierenden Einfluss auf die Leuchtbakterien. Aus Abb. 4.14 konnte geschlossen werden, dass bei einer zehnfachen Verdünnung der injizierten Probenlösung für Carbofuran und Paraoxon eine Reduzierung des Lumineszenzsignals auf 20% der Anfangsintensität zu erwarten gewesen wäre. Berücksichtigt man jedoch noch die zusätzliche Verdünnung der Probenlösung aufgrund der isokratischen Trennung, kann man aus Abb. 4.14 erkennen, dass durch die weitere Verdünnung nur mehr ein sehr schwaches Inhibitionssignal generiert werden kann.

Mit der Verdünnung der mobilen Phase geht zwangsläufig auch eine Verdünnung der Analyten einher. Daher wurde in einer weiteren Offline-Fraktionierung getestet, ob Abdampfen des Lösungsmittels vor Zugabe der Bakterienlösung einen besseren Weg zum Erhalt eines Inhibitionsschmatogramms mit Leuchtbakterien darstellt.

Das HPLC-Eluat wurde dazu auf eine Mikrotiterplatte fraktioniert. Durch mehrstündiges Schütteln der offenen Platte dampfte das Lösungsmittel ab. Leuchtbakterien wurden zugegeben. Das nach der Inhibitionszeit resultierende Lumineszenzsignal in den Näpfen wurde mit dem Chromatogramm des UV-Detektors korreliert (Abb. 4.15). Es ließ sich deutlich eine Inhibitionsbande für das Carbofuran erkennen (Abb. 4.15, oben, 1). Für das Paraoxon-ethyl konnte jedoch kein Inhibitionssignal parallel zur UV-Absorption erfasst werden. Vermutlich evaporierte das Insektizid mit dem Lösungsmittel.

Abdampfen der mobilen Phase zur Verringerung des Lösungsmiteleinflusses ist eine Methode zur Offline-Messung der Leuchtbakterientoxizität. Es muss aber damit gerechnet werden, dass flüchtige Analyten nicht mehr nachzuweisen sind oder ihr Gehalt reduziert wurde und sie so von der Wirkungsbezogenen Analyse nicht erfasst werden können.

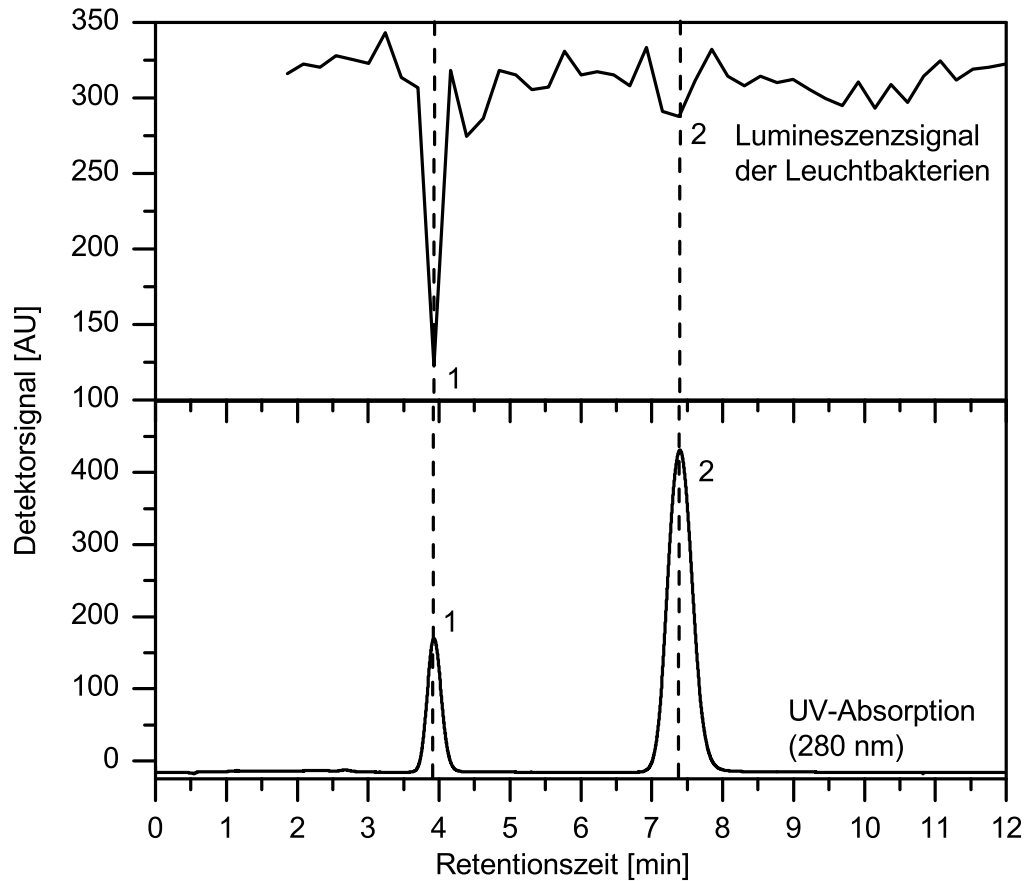


Abb. 4.15: Carbofuran (1) und Paraoxon-ethyl (2) wurden isokratisch getrennt und auf einer MTP fraktioniert. Die inhibitorische Wirkung auf Leuchtbakterien wurde offline getestet. Um den inhibierenden Einfluss der mobilen Phase zu reduzieren, wurde das Lösungsmittel Methanol bei RT abgedampft. Ungünstig dabei wirkt sich ein niedriger Dampfdruck der Analyten aus, deren Gehalt beim Verdampfen ebenfalls reduziert wurde (siehe Paraoxon-ethyl, 2). (Experimentelle Bedingungen: Injektion von 20 μL Carbofuran- und Paraoxon-Gemisch (je 500 μM); mobile Phase: Methanol/Wasser (50%/50%); Flussrate 200 $\mu\text{L}/\text{min}$; Säule: Luna; 40 μL Fraktionen wurden für 3 h bei RT offen geschüttelt; Zugabe von 120 μL Leuchtbakterienlösung; Auslesen des Lumineszenzsignals nach 30 min.)

5 Aufbau der Fluidik eines wirkungsbezogenen Nachsäulendetektors

Für eine Wirkungsbezogene Analyse wurde zunächst ein System mit einer enzymatischen Detektion eines möglichen Effekts entwickelt. Als Modellenzym für Neurotoxizität wurde die gut untersuchte Acetylcholinesterase herangezogen. Da das Enzym ohne Cofaktoren und mit einer großen Substratumsatzrate arbeitet (Abschnitt 4.1), ist es besonders für einen Online-Detektor geeignet. Die verwendete NbAChE wurde rekombinant hergestellt und stand daher in ausreichenden Mengen für Optimierungsexperimente zur Verfügung.

Das Flussschema eines EIDs nach einer chromatographischen Trennung ist in Abb. 5.1 dargestellt. Nachdem die Probe über eine Umkehrphasensäule aufgetrennt wurde, wird der Fluss aufgeteilt. Ein Teil des Flusses gelangt in den EID, der andere Teil wird optional zu anderen Detektoren wie UV-Vis-Detektor oder Massenspektrometer geleitet.

Der EID baut sich aus einem Reaktor und einer Detektionseinheit auf. Im Reaktor findet die Enzyminhibition und der Substratumsatz statt. Wie im theoretischen Teil dieser Arbeit in Kapitel 2 erwähnt, stehen prinzipiell mehrere Möglichkeiten zur Verfügung, einen Nachsäulenreaktor für eine Enzyminhibition aufzubauen. Hier wurde der Detektor mit einer homogen durchgeführten Enzyminhibition eingesetzt. Sowohl Enzym, als auch Substrat werden in Lösung zum Eluat zudosiert. Inhibition und Substratumsatz zur Signalentwicklung finden jeweils in Reaktoren mit geeigneter Aufenthaltszeit statt (Abb. 5.1).

Vorteilhaft am homogen durchgeführten EID ist, dass zu jedem Zeitpunkt frisches, unverbrauchtes Enzym in konstanter Menge während des chromatographischen Laufs zur Verfügung steht. Ein Nachteil ist dabei sicherlich, dass teures

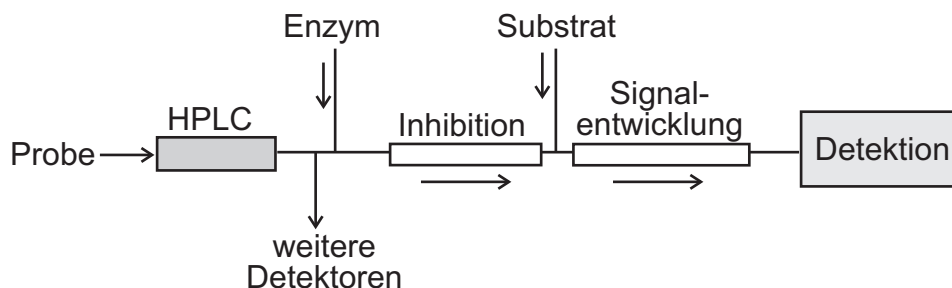


Abb. 5.1: Schematische Darstellung zum Aufbau eines Enzyminhibitionsdetektors für eine Wirkungsbezogene Analyse

Tabelle 5.1: Überblick der getesteten Pumpen

| Pumpentyp | Hersteller, Modell | Flussbereich |
|--------------------|----------------------------------|---|
| Mikrozahnringpumpe | HNP, mzs-2905 | 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ –18 mL/min |
| Spritzenpumpe | Cavro, XL 3000 | je nach Spritzenvolumen |
| Spritzenpumpe | Harvard Apparatus, PHD 2000 | je nach Spritzenvolumen |
| Kolbenpumpe | Vici, M6 | 6 nL/min–10 mL/min |
| Schlauchpumpe | Ismatec, MS-4/6-Reglo, Analog | 38 $\mu\text{L}/\text{min}$ –1.9 mL/min |

Enzym oder auch Substrat in größeren Mengen verbraucht wird, als es bei einem heterogen durchgeführten Enzyminhibitionstest der Fall wäre.

Der homogen durchgeführte EID benötigt das kontinuierliche Befördern von Enzym- und Substratlösung. Die chromatographische Auflösung der Probe muss im wirkungsbezogenen Detektor erhalten werden. Details, die beim Aufbau des wirkungsbezogenen Nachsäulendetektors bezüglich der Pumpenauswahl und der Bauweise des Reaktors durchdacht wurden, sind im Folgenden beschrieben.

5.1 Auswahl der Pumpen

Die Pumpen müssen einen pulsationsarmen, konstanten und kontinuierlichen Fluss generieren (siehe Kapitel 2.1.2). Es wurden verschiedene Pumpentypen für die Anwendung im EID getestet (Tab. 5.1). Der Flussbereich sollte für einen miniaturisierten Aufbau zwischen 1 und 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ liegen.

Die Flussrate wurde hauptsächlich gravimetrisch bestimmt. Aber gerade bei kleinen Flussraten erwies sich diese Methode als mühsam und fehlerhaft, da Verdunstung das Ergebnis verfälschte. Daher wurde die Flussrate auch mit einem Flusssensor der Firma Sensirion bestimmt. Der auf CMOS-Technologie basierende Sensor reagiert auf Temperaturänderungen und wurde vom Hersteller mit Wasser kalibriert. Jede andere Flüssigkeit bedarf einer Kalibrierung der Rohdaten anhand gravimetrischer Messung. Für die Anwendung während eines chromatographischen Laufs mit einer Gradiententrennung, bei der sich laufend die Zusammensetzung der mobilen Phase ändert, ist der Sensor daher nicht ohne weiteres zu gebrauchen.

Die Pulsation des Flusses lässt sich nicht gravimetrisch bestimmen, da nur ein Mittelwert über den Zeitraum, in dem die Flüssigkeit aufgefangen wurde, gebildet werden kann. Mit Hilfe eines Drucksensors kann die Pulsation bestimmt werden. Einige Pumpenmodelle haben einen Drucksensor integriert. Dabei handelt es sich jedoch meist um Hochdruckpumpen. Die bei Niederdruck angewendeten Pumpen aus Tab. 5.1 haben keine installierten Drucksensoren. Die Pulsation des Flusses für den jeweiligen Pumpentyp konnte daher nur mit dem Flusssensor von Sensirion über die Flussrate mit einer Datenaufzeichnungsrate von 1.5625 Hz festgehalten werden (siehe Abb. 5.2).

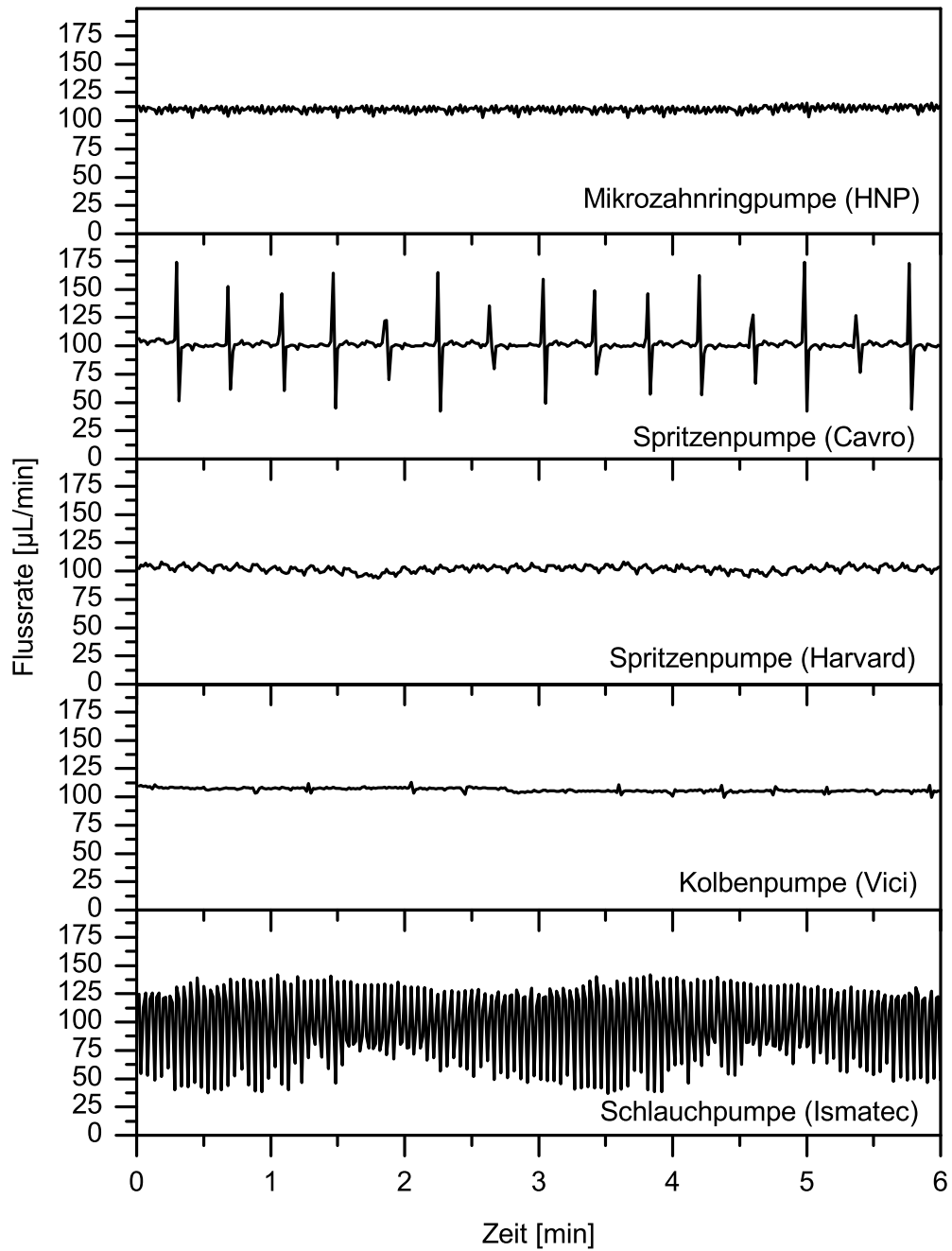


Abb. 5.2: Mit einem Flusssensor wurde die Pulsation verschiedener Pumpentypen bei einer Flussrate von $\sim 100 \mu\text{L}/\text{min}$ mit 1.5625 Hz aufgezeichnet. Die höchste Pulsation zeigte erwartungsgemäß die Schlauchpumpe. Einen nahezu pulsationsfreien Fluss generierte die Kolbenpumpe der Firma Vici. Die hohen Ausschläge der Spritzenpumpe von Cavro sind auf den Pendelbetrieb zurückzuführen.

Tabelle 5.2: Übersicht der Messungen der Flussratengenauigkeit von verschiedenen Pumpenmodellen.

| | MZR | Cavro | Cavro (Pendel- betrieb) | Harvard Vici | Schlauch |
|--|-------|-------|-------------------------------|--------------|----------|
| mittlere Flussrate [$\mu\text{L}/\text{min}$] | 110.2 | 100.8 | 101.8 | 101.0 | 98.3 |
| Standard- abweichung [%] | 2.5 | 1.5 | 14.1 | 2.7 | 33.6 |
| F_{min} [$\mu\text{L}/\text{min}$] | 102.5 | 97.8 | 41.7 | 93.5 | 99.3 |
| ΔF_{min} [%] | 7.0 | 3.0 | 58.8 | 7.5 | 6.6 |
| F_{max} [$\mu\text{L}/\text{min}$] | 115.6 | 102.9 | 174.0 | 107.9 | 113.1 |
| ΔF_{max} [%] | 4.9 | 2.1 | 72.1 | 6.8 | 6.4 |

5.1.1 Mikrozahnringpumpe

Mikrozahnringpumpen (MZR) sind kontinuierlich fördernde Verdrängerpumpen mit einem außenverzahnten Innenrotor und einem innenverzahnten Außenrotor. Durch die Verzahnung bilden sich verschiedenen Förderkammern, die während der Rotation ihr Volumen ändern. Abhängig von der Drehrichtung der Rotoren hat man eine Druck- und eine Saugseite. Die Fördermenge der Pumpe ergibt sich durch die Drehzahl der Rotoren, das Verdrängungsvolumen der Pumpe und den volumetrischen Wirkungsgrad. Der Wirkungsgrad der Pumpen ist abhängig von der Viskosität des Mediums und vom Rückdruck des Fluidiksystems. Mit zunehmendem hydraulischen Widerstand nimmt der Wirkungsgrad der Pumpe ab. Mit einem Verdrängervolumen von $3 \mu\text{L}$ soll die Pumpe laut Herstellerangaben einen Differenzdruck von 0–30 bar überwinden können, wobei sich diese Spezifikation auf Medien mit der Viskosität von Öl bezieht.

Um die Pulsation einer Mikrozahnringpumpe unter den Bedingungen im EID zu messen, wurde Wasser mit einer Flussrate von $\sim 100 \mu\text{L}/\text{min}$ gepumpt. Die Pumpe musste gegen keinen Rückdruck arbeiten. Wie man in Tab. 5.2 entnehmen kann, fördert die Mikrozahnringpumpe relativ pulsationsarm mit Abweichungen $\leq 7\%$ von der mittleren Flussrate.

Trotz der geringen Pulsation war dieser Pumpentyp für eine Anwendung im EID nicht geeignet. Da die Enzymlösung durch zwei Reaktionsschleifen gepumpt werden musste (Abb. 5.1), musste sie gegen einen höheren Rückdruck als die Substratlösung gefördert werden. Die Pumpen für die Enzym- und Substratlösung unterschieden sich je nach Position in ihrem Wirkungsgrad. Auch die Einstellung konstanter Flussraten erforderte eine langwierige Gleichgewichtseinstellung.

Da die Mikrozahnringpumpen kein Rückschlagventil haben, konnten Enzym- und Substratlösung nicht mit frei wählbaren Flussraten dosiert werden, da bei zu geringen Fördermengen einer Pumpe der Rückdruck des Fluidiksystems nicht mehr überwunden werden konnte und die stärkere Pumpe Flüssigkeit in das Reservoir der anderen Pumpe beförderte. Das Basisliniensignal des EIDs war somit nicht mehr reproduzierbar.

5.1.2 Spritzenpumpe

Eine sehr pulsationsarme Flüssigkeitsbeförderung kann mit Spritzenpumpen vorgenommen werden. Die Pulsation des Flusses hängt dabei von der Auflösung des Schrittmotors ab, der den Kolben der Spritze voran treibt. Je mehr Mikroschritte für einen Kolbenhub zurückgelegt werden müssen, desto pulsationsärmer ist die Flussrate. Die Fördermenge einer Spritzenpumpe ist sehr konstant, da sie im Gegensatz zu Mikrozahnringpumpen unabhängig vom Gegendruck des fluidischen Systems arbeitet, sofern der zulässige Differenzdruck nicht überschritten wird. Die Flussrate hängt vom Volumen der Spritze ab.

Unvorteilhaft an Spritzenpumpen ist jedoch, dass ein kontinuierlicher Fluss mit einer Spritzenpumpe allein nicht erreicht werden kann. Es besteht jedoch bei einigen Typen die Möglichkeit, die Spritzenpumpen im Pendelbetrieb arbeiten zu lassen.

Die Spritzenpumpe der Firma Cavro (Tab. 5.1) ist mit einem Drei-Wege-Ventil ausgerüstet. Über eine serielle Ansteuerung mit dem Programm LabView arbeiten jeweils zwei Pumpen im Pendelmodus. Während die erste Pumpe Flüssigkeit ansaugte, gab die zweite Pumpe die Flüssigkeit ab.

Beim Modell Cavro XL 3000 wird bei hochauflösender Voreinstellung des Schrittmotors ein Kolbenhub in 24 000 Schritten ausgeführt. Die langsamste, wählbare Geschwindigkeit beträgt dabei 200 Schritte/s. Bei einer Schrittlänge von $2.5 \mu\text{m}$ entspricht dies einer zurückgelegten Strecke des Kolbens von 0.5 mm/s .

Wie man in Tab. 5.2 sehen kann, ist die Pulsation mit Abweichungen von $\leq 3\%$ von der mittleren Flussrate gering, während Wasser mit einer Fördermenge von $100 \mu\text{L/min}$ mit einer 1 mL-Spritze abgegeben wird. Erst bei einem kontinuierlichen Fluss mit im Pendelbetrieb arbeitenden Spritzenpumpen wurden pulsierende Schwankungen mit Abweichungen von $\leq 72\%$ von der mittleren Flussrate beobachtet.

Um die durch Pendelbetrieb entstehende Pulsation der Spritzenpumpen zu vermeiden, wurde eine Spritzenpumpe Modell PHD 2000 der Firma Harvard Apparatus angeschafft (Tab. 5.1). Dieses Modell verfügt über zwei Plätze, um Spritzen einzulegen. Ein Pendelbetrieb ist mit dieser Pumpe nicht möglich, aber auch nicht nötig, da der Schrittmotor eine im Vergleich zu den Spritzenpumpen von Cavro bessere Auflösung hat und daher größervolumige Spritzen eingelegt werden können. Um mit einer Pumpe zwei Flüssigkeiten gleichzeitig mit unterschiedlicher Flussrate zu bewegen, wurden in der Werkstatt des Instituts Spritzenadapter gebaut, damit Spritzen unterschiedlichen Volumens eingelegt werden konnten. Ein weiterer Vorteil dieser Modifikation war, dass nun Sprizentypen für die Pumpe der Firma Cavro auch in die Pumpe der Firma Harvard eingelegt werden konnten.

Beim Modell PHD 2000 wird der Kolben mit einem sehr hoch aufgelösten Schrittmotor angetrieben. Die minimale Schrittgeschwindigkeit, die sich aus gewünschter Flussrate und Durchmesser des Kolbens berechnet, beträgt dabei ein Schritt pro 27.3 s , was bei einer Schrittlänge von $0.082 \mu\text{m}$ einer zurückgelegten Strecke des Kolbens von $0.03 \mu\text{m/s}$ entspricht. Über einen Mikroprozessor wird die Schrittlänge je nach Spritzenvolumen und eingestellter Flussrate variiert. Daher kann mit diesem Pumpenmodell selbst bei sehr geringer Flussrate ein pulsationsfreier Fluss befördert werden. Falls gewünscht, könnte aber laut

Herstellerangabe auch die Pulsation eines schlagenden Herzens simuliert werden.

Wie man der Tab. 5.2 entnehmen kann, ist die Pulsation der Pumpe der Firma Harvard Apparatus mit einer 10 mL-Spritze im Vergleich zur 1 mL-Spritze in Pumpe der Firma Cavro im Pendelbetrieb mit einer Abweichung von $\leq 7.5\%$ geringer.

5.1.3 Kolbenpumpe

Im Inneren des Pumpengehäuses der Kolbenpumpe der Firma Vici (Tab. 5.1) befindet sich ein Rotor mit vier Verdrängerkolben in Saphirzylindern. Bei der Drehung des Rotors durch einen Mikroschrittmotor bewegen sich die Kolben über eine stationäre, schräg gestellte Nockenscheibe. Die Auflösung des Schrittmotors beträgt 243 200 Schritte pro 100 μL . Das Totvolumen der Pumpe mit 100 μL ist im Vergleich zu den geringen förderbaren Flussraten relativ groß. Zu jedem Zeitpunkt zieht ein Kolben Flüssigkeit auf, einer gibt Flüssigkeit ab und die anderen beiden Kolben befinden sich in einem Übergangszustand. Dadurch soll laut Hersteller über einen weiten Bereich pulsationsarm Flüssigkeit und sogar Gas befördert werden können. Das Pumpenmodell M6 kann gegen einen Druck bis zu 6 bar (100 psi) fördern. Dadurch, dass die Pumpe selbstansaugend ist, soll sie tolerant gegen Gasblasen sein, die doch einmal ihren Weg in das Fluidiksystem finden.

Die Pulsation der Kolbenpumpe wurde mit Wasser bei einer mittleren Flussrate von 106 $\mu\text{L}/\text{min}$ bestimmt. Dieser Pumpentyp hatte im Vergleich zu den anderen Pumpenmodellen im kontinuierlichen Flussbetrieb mit einer Abweichung $\leq 6.6\%$ von der mittleren Flussrate die geringste Pulsation (vgl. Tab. 5.2 und Abb. 5.2). In der Anwendung im EID zeigte sich jedoch, dass sich Gasblasen im fluidischen System als sehr störend auswirkten. Aus hydromechanischen Überlegungen heraus musste ein gasegmentierter Nachsäulenreaktor eingesetzt werden. Bei den niedrigen Flussraten wurden Gasblasen nicht mehr aus dem Pumpenkopf gespült. Das Resultat war eine starke Zunahme der Pulsation und eine verrauschte Basislinie des EIDs, die eine Auswertung der Daten unmöglich machte.

5.1.4 Schlauchpumpe

Die Funktionsweise der Schlauchpumpe beruht auf Abdrücken eines flexiblen Pumpenschlauchs an mehreren Stellen. Die abgedrückten Stellen werden mit Walzen, die sich an einem Rotorblock befinden, in Fließrichtung bewegt. Die Fördermenge wird durch die Rotordrehzahl und den Innendurchmesser des Schlauchs bestimmt. Bei konstanter Flussrate reduziert eine Erhöhung der Drehzahl und eine Verringerung des Schlauchinnendurchmessers die Pulsation. Aufgrund des Funktionsprinzips der Peristaltikpumpe war die Pulsation für eine Flussrate von ca. 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ jedoch nie vergleichbar mit den anderen beschriebenen Pumpentypen (Abb. 5.2, unten).

Der Schlauchinnendurchmesser betrug 0.51 mm und ist für Flussraten zwischen 0.038 und 1.9 mL/min geeignet. Die Pumpe kann bis zu 1 bar Rückdruck eingesetzt werden. Bei kleinerem Schlauchinnendurchmesser kann laut Hersteller ein noch größerer Druck aufgebracht werden.

Der Nachteil an Schlauchpumpen ist neben der Pulsation, dass sich mit der Alterung der Schläuche oder einer Veränderung des Anklemdrucks des Schlauchs die Flussraten ändern können.

5.1.5 Schlussfolgerung

Der Vergleich der verschiedenen Pumpenmodelle hinsichtlich der Pulsationsmessung und im praktischen Einsatz im EID hat gezeigt, dass als Förderpumpe für Enzym- und Substratlösung die Spritzenpumpe der Firma Harvard Apparatus am besten geeignet ist. Die Spritzenpumpen der Firma Cavo zeigten im Pendelbetrieb eine zu große Pulsation. Eine Anwendung dieser Pumpen setzt eine Optimierung der Pumpenansteuerung voraus. Die Förderrate der Mikrozahnringpumpe ist zu sehr vom im System herrschenden Druck abhängig. Der Einsatz der Kolbenpumpe ist aufgrund des sehr starken Einflusses von störenden Luftblasen im System nur bedingt für einen gassegmentierten Nachsäulenreaktor zu empfehlen. Die Pulsation der Schlauchpumpe ist zu groß, um sie zur Enzym- oder Substratförderung einzusetzen.

5.2 Entwicklung des Nachsäulenreaktors

Um den in Abb. 5.1 dargestellten EID zu realisieren, standen zunächst mehrere Möglichkeiten zur Auswahl. Ein Reaktor mit immobilisierten Enzymen wurde nicht in Betracht gezogen, da während des gesamten chromatographischen Laufs frisches, nicht inhibiertes Enzym in gleichbleibender Menge zur Verfügung stehen sollte. Des Weiteren ist eine Immobilisierung nicht nur abhängig vom jeweiligen Enzym, sondern auch aufwendig zu parallelisieren.

Eine homogene Ausrichtung eines wirkungsbezogenen Detektors wurde vor allem hinsichtlich weiterer Miniaturisierung in Richtung *Lab-on-a-Chip*-Anwendungen bevorzugt. Die Detektion mehrerer möglicher toxischer Effekte in parallelen Kanälen auf einem Chip erschien leichter realisiert werden zu können, als bei etwaigen heterogenen Reaktorbauweisen.

Die Bauweise des EIDs setzte voraus, dass die Auflösung der chromatographischen Trennung im bestmöglichen Fall im wirkungsbezogenen Detektor erhalten bleibt. Dabei musste zum einen das Mischen von Enzym, Eluat und Substrat optimiert werden. Zum anderen musste die Dispersion der Analyten minimiert werden. Daher wurden verschiedene Möglichkeiten der Enzyminhibition in offenen Kapillaren ausgetestet.

5.2.1 Dispersion in Reaktionskapillaren

Um die Betriebskosten eines online durchgeführten EIDs niedrig zu halten, wurden Volumenströme im Bereich von $\mu\text{L}/\text{min}$ im Aufbau eingeplant. Analytische HPLC-Trennungen werden bei Flussraten bis zu $1\text{ mL}/\text{min}$ durchgeführt. Es musste beim Aufbau berücksichtigt werden, dass Enzyme ihre Aktivität durch organische Lösungsmittel in der mobilen Phase verlieren. Um das Eluat im EID zu verdünnen und trotzdem bei einer Flussrate von Mikrolitern pro Minute zu

Tabelle 5.3: Halbwertsbreiten $w_{1/2}$ von Carbofuran aus offline und online gewonnenen Inhibitionssignalen im Vergleich zum UV-Signal aus Abb. 5.3

| Detektion | $w_{1/2}$ [min] |
|--------------------------|-----------------|
| UV-Signal | 0.1 |
| Enzyminhibition, online | 0.9 |
| Enzyminhibition, offline | 0.3 |

bleiben, musste der HPLC-Fluss vor Eintritt in den EID aufgeteilt werden. Zu Beginn wurde dies mit einem T-Stück und Restriktionskapillaren realisiert. Dies stellte sich jedoch als sehr störanfällig für Schwankungen des Rückdrucks im fluidischen System heraus. Daher wurde ein massgeschneiderter Splitter angefertigt (siehe Kapitel 6, Abb. 6.2).

In einem ersten Aufbau (vgl. Abb. 5.1) eines EIDs wurden PTFE-Schläuche mit einem Innendurchmesser von 0.5 mm und einer Länge von jeweils 1 m als Reaktionskapillare für die Inhibition der AChE und den Substratumsatz verwendet. Mit diesen Reaktordimensionen und den in der Bildunterschrift zu Abb. 5.3 beschriebenen Flussraten, betrug die Inhibitionszeit 0.57 min und die Zeit für den Substratumsatz 0.44 min. Die Aufenthaltszeit der Analyten im Enzymreaktor betrug also ca. eine Minute.

Die Reaktionskapillaren wurden jeweils in große Schleifen gelegt. Der Aktivitätsnachweis der AChE wurde nach ELLMAN durchgeführt. Das Substrat ATCI und das Reagenz DTNB wurden dabei als Mischung zusammen gepumpt.

Ein Gemisch der Insektizide Carbofuran und Paraoxon-ethyl wurde isokratisch getrennt und die UV-Absorption (Abb. 5.3, unten), sowie die Enzyminhibition in den offenen Reaktionskapillaren online detektiert (Abb. 5.3, Mitte). Zum Vergleich wurde das Eluat tropfenweise auf eine Mikrotiterplatte fraktioniert und ebenfalls die inhibitorische Wirkung auf AChE getestet (Abb. 5.3, oben; Bedingungen siehe Teil V, Abschnitt 11.3.1). Im offline durchgeführten Test betrug die Inhibitionszeit 30 min, bevor Substrat zugegeben wurde.

Nach der Gleichung 2.5 aus Abschnitt 2.1.3 berechnet sich die REYNOLDS-Zahl für die Dimensionen des in Abb. 5.3 verwendeten Enzymreaktors zu $\Re=21$. Der Fluss im Reaktor lässt sich also als laminar beschreiben, da $\Re \ll 2000$ ist. Ein Vergleich des UV- und Inhibitionssignals in Abb. 5.3 zeigt deutlich, dass sich die Auflösung im EID verschlechtert hat. Da sich in den Reaktionsschleifen aufgrund der niedrigen REYNOLDS-Zahl ein parabolisches Flussprofil ausgebildet hat, ist der Verlust der Auflösung auf die Hydromechanik zurückzuführen. Unspezifische Adsorption der Reaktanden an der Kapillarwand spielt wohl eher eine geringe Rolle.

Wie man der Tabelle 5.3 entnehmen kann, wurde die Carbofuran-Bande in einer Minute Gesamtreaktionszeit im EID um einen Faktor 9 verbreitert. Da die beiden Analyten chromatographisch sehr gut getrennt waren, konnten im EID die Inhibitionssignale der beiden Stoffe noch aufgelöst werden.

Eine Wirkungsbezogene Analyse eines komplexeren Substanzgemisches ist bei der Leistung dieses EIDs nicht möglich. Die Reaktionszeit von ~ 1 Minute ist

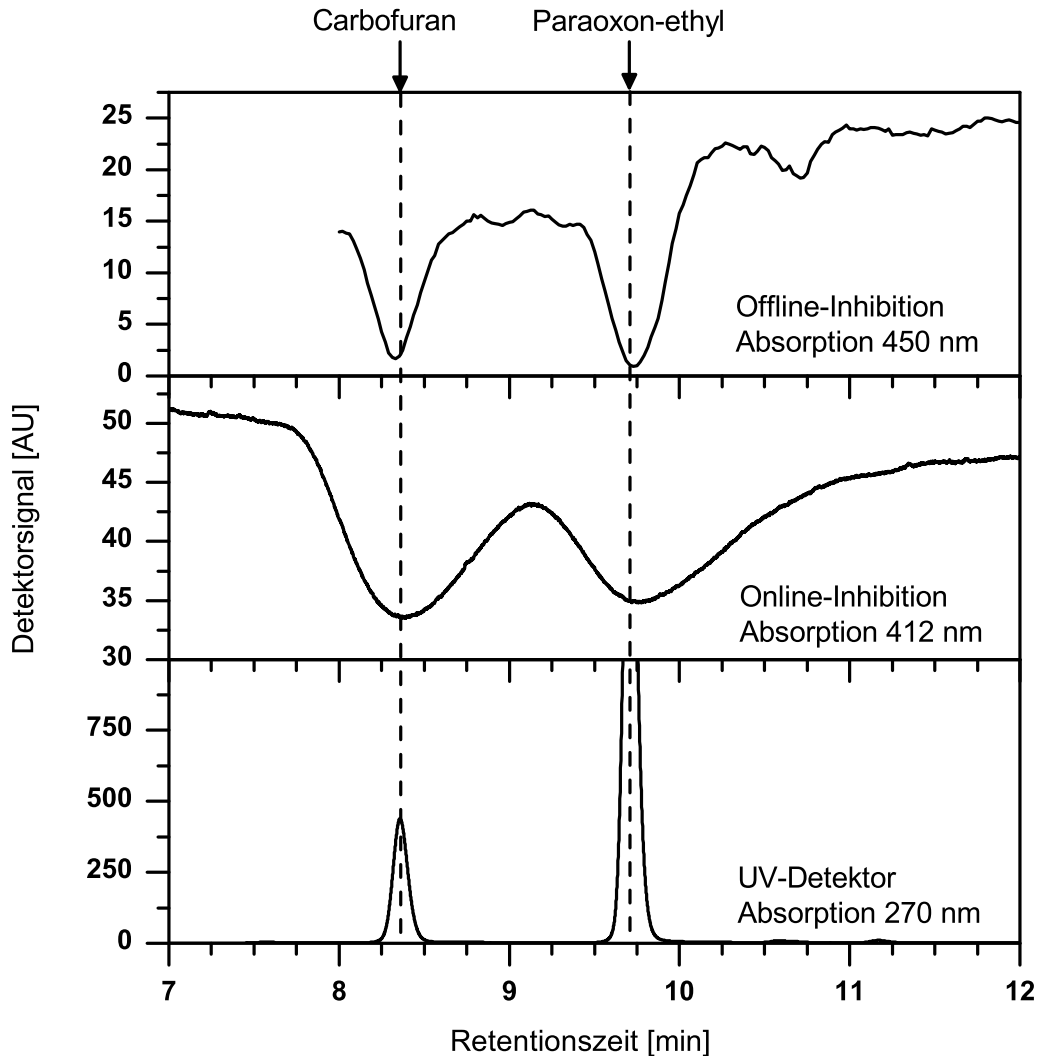


Abb. 5.3: Gegenüberstellung der Dispersion von UV-Detektor (unten) und Online-Inhibition der AChE (oben). Zum Vergleich ist die Enzyminhibition der Insektizide Carbofuran und Paraoxon-ethyl gezeigt, die offline durch Fraktionieren des Eluats auf eine Mikrotiterplatte erreicht wurde. (Bedingungen: HPLC: Säule LiChrospher; Flussrate 1 mL/min, Mobile Phase: 30% Methanol, 70% Wasser; 243 $\mu\text{L}/\text{min}$ des Eluats in den EID; 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ -Dosierung von jeweils Enzym- und Substratlösung mit Spritzenpumpen (Cavro); Enzymlösung 170 mU/mL; Substratlösung: ATCI und DTNB je 1 mM; Enzyminhibition (offline): 150 μL TRIS-Puffer, 1 Tropfen (ca. 20 μL) Eluat, 10 μL AChE (1 mU/mL), 30 min bei RT Inkubieren, 10 μL DTNB (1 mM), 10 μL ATCI (1 mM), Messung der Absorptionsänderung bei 450 nm.)

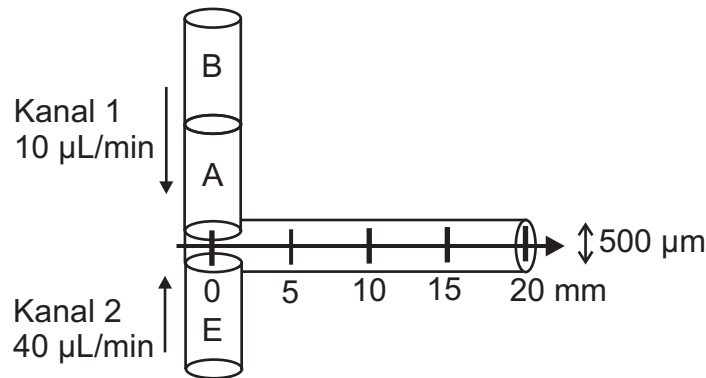


Abb. 5.4: Modell für die Numerische Simulation, die am Lehrstuhl für Fluidmechanik und Prozessautomation der Technischen Universität München durchgeführt wurde.

dabei noch sehr kurz gewählt worden. Bei längeren Reaktionszeiten würde die Dispersion zunehmen (vgl. Gleichung 2.6). Die Empfindlichkeit eines Enzyminhibitionstests steigt aber mit längerer Einwirkzeit von Analyt und Enzym. Ein Nachweis der Enzymaktivität für andere Enzyme mit niedrigeren Umsatzzahlen als AChE ist bei so kurzen Substratumsatzzeiten nicht mehr möglich. Ein Reaktordesign mit linearen Kapillaren als Reaktor musste daher aufgrund der gravierenden Dispersion und dem Verlust der Auflösung verworfen werden.

5.2.2 Numerische Simulation: Mischen und Dispersion

Bei der Numerischen Simulation wurde das Mischen zweier Lösungen berechnet, die über ein T-Stück unter ähnlichen Bedingungen wie im EID zusammenfließen. Die Elution der getrennten Analyten von einer HPLC-Säule simulierend, wurde das Mischen zweier aufeinander folgender Stoffe A und B entlang der Flussrichtung betrachtet.

Am Lehrstuhl für Fluidmechanik und Prozessautomation der Technischen Universität München wurde von Dr.-Ing. Kowalczyk freundlicherweise die Strömungsmechanik eines Modells (Abb. 5.4) am Computer simuliert. Als Modellgeometrie wurden runde Kanäle mit einem Durchmesser von $500 \mu\text{m}$ betrachtet. Die Geometrie wurde rechnerisch durch Prismen angenähert. Aus Gründen der Rechnerkapazität beschränkten sich die Berechnungen auf eine Strecke von 20 mm nach dem Zusammenströmen an einem T-Stück. Die Flussraten betragen $10 \mu\text{L}/\text{min}$ aus Kanal 1 und $40 \mu\text{L}/\text{min}$ aus Kanal 2. Die hydrodynamischen Parameter von Wasser wurden verwendet. Da Biomoleküle wie Enzyme aus Kanal 2 fließen sollten, wurde mit einem Diffusionskoeffizienten von $10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ gerechnet. Aus Kanal 1 flossen 30 Sekunden lang Substanz A, dann 30 Sekunden Substanz B. Aus Kanal 2 floss kontinuierlich Enzymlösung E (Abb. 5.4).

Die Analyse der Strömungslinien zeigte, dass im Modell ausschließlich laminare Ströme auftraten, wie man in Abb. 5.5 sehen kann. Durch das Zusammenführen der beiden Ströme in einem T-Stück entstanden keine Turbulenzen. Dies ließ schon die Berechnung der niedrigen REYNOLDS-Zahl aus Abschnitt 5.2.1 vermuten. Die Simulation verdeutlichte, dass das Vermischen der Flüssigkeiten

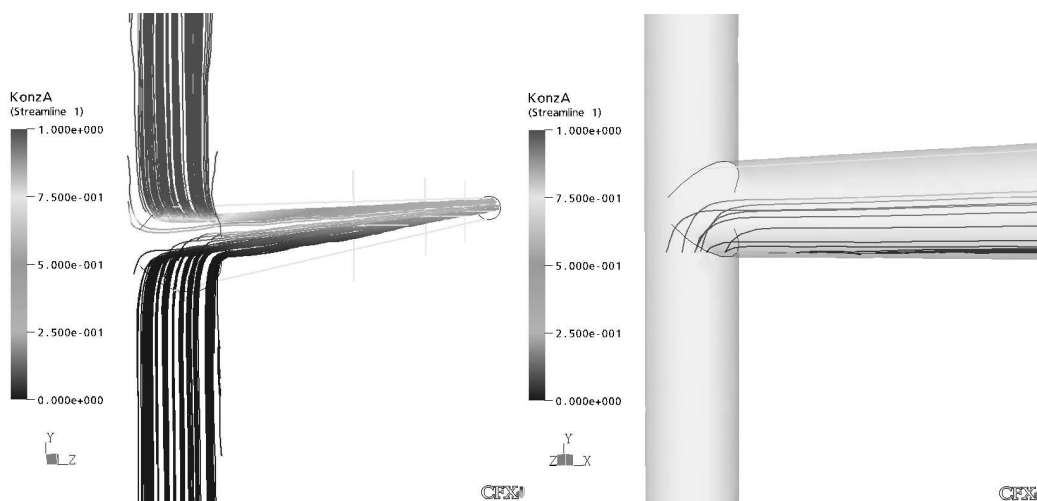


Abb. 5.5: Die anhand des Modells aus Abb. 5.4 berechneten Strömungsprofile zeigten keine Turbulenzen. Im ganzen System lagen laminare Strömungslinien vor. Das Mischen in axialer Richtung der beiden Lösungen konnte daher nur durch Diffusion stattfinden.

aus beiden Kanälen mit T-Stück nur durch Diffusion erfolgen kann. Die Analyse der Konzentrationen zeigte, dass bereits 20 mm nach dem Zusammenmischen der Substanzen eine Mischung mit 20% A mit einem Fehler $\leq 5\%$ erfolgt war. Entlang des Kapillarquerschnitts stellte sich jedoch ein Konzentrationsgradient zwischen ca. 24% A im oberen Teil des Kanals und ca. 17.5% A im unteren Teil des Kanals ein. In der Mitte des Kanals lag die erwartete Konzentration von 20% A vor. Die Asymmetrie des Konzentrationsgradienten rührt von den unterschiedlichen Flussraten aus Kanal 1 und 2 her.

Um die longitudinale Vermischung der Substanzen A und B zu untersuchen, wurde die Konzentration von A und B zu verschiedenen Zeiten an den Wegpunkten 5, 10 und 15 mm nach dem Zusammenmischen mit E berechnet. In der Abb. 5.6 ist deutlich die Überlagerung der Banden bereits am Wegpunkt 5 mm gezeigt. Um eine longitudinale Vermischung von A und B zu vermeiden, sollten bei den im Modell vorherrschenden Bedingungen Gasblasen mindestens im Abstand von 10 Sekunden zur Segmentierung zugegeben werden. Hinsichtlich der longitudinalen Dispersion sollten die Gasblasen so früh wie möglich eingespeist werden.

Die Ergebnisse der Numerischen Simulation zeigten, dass unter den berücksichtigten Parametern im Fluidiksystem mit laminaren Strömen zu rechnen ist, die weit davon entfernt sind, in turbulente Strömungen umzuschlagen. Aufgrund der laminaren Strömung sorgt nur Diffusion für das Mischen zweier Flüssigkeiten senkrecht zum Rohrquerschnitt. Die longitudinale Dispersion, die verantwortlich ist für das Mischen zweier Stoffe in Fließrichtung, war dagegen in der Simulation bereits nach einer kurzen zurückgelegten Wegstrecke ausgeprägt.

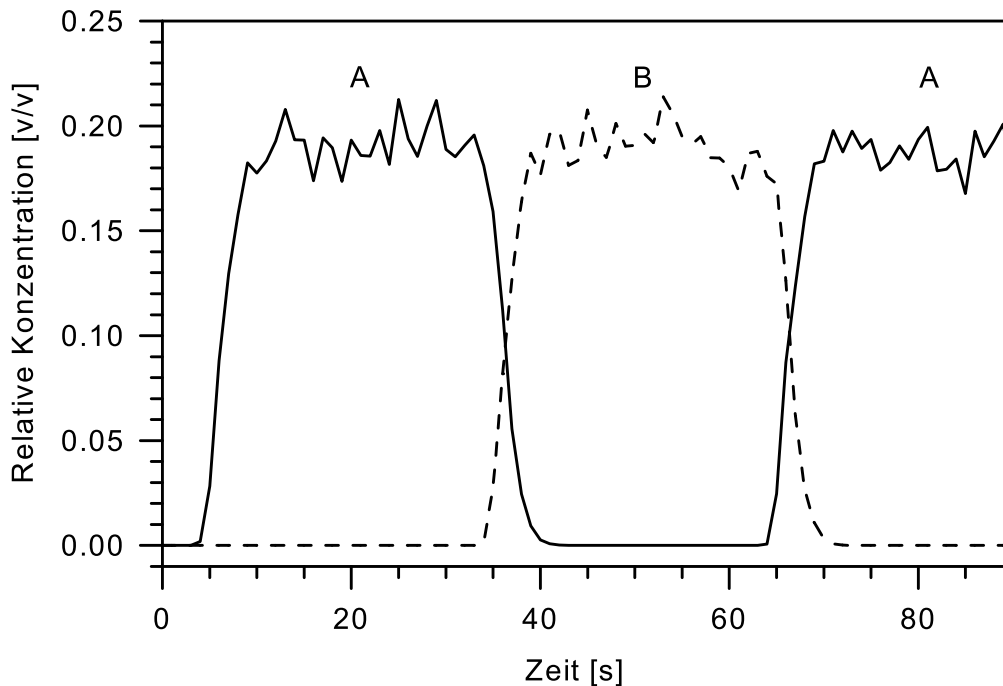


Abb. 5.6: Die Numerische Simulation nach dem Modell aus Abb. 5.4 zeigt, dass A und B bei dem Wegpunkt 5 mm schon überlagert sind. Die longitudinale Dispersion nimmt bei Wegpunkt 10 und 15 mm zu (Daten nicht gezeigt).

5.2.3 Gestrickte Reaktionskapillaren

In Kapitel 2 wurden verschiedene Methoden erläutert, um die Bandenverbreiterung außerhalb der Säule in Nachsäulenreaktoren zu reduzieren. Eine der aufgeführten Techniken ist das Stricken der Reaktionskapillare.

Die Funktion eines gestrickten Nachsäulenreaktors hinsichtlich der Reduzierung der Bandenverbreiterung wurde wie folgt in einem Modellexperiment getestet. Das Insektizid Carbofuran wurde in einen Trägerstrom aus 10% Methanol und 90% Wasser mit einer Flussrate von $100 \mu\text{L}/\text{min}$ injiziert. Der Analyt wurde zuerst direkt nach der Injektion im UV-Detektor detektiert. Bei den nächsten Tests musste der Analyt erst eine PTFE-Kapillare von 1 m Länge und einem Innendurchmesser von 0.5 mm durchfließen, bevor wieder die UV-Absorption aufgezeichnet wurde. Die Kapillare war dabei zuerst linear gestreckt, dann mit Hilfe einer Häkelnadel in enge Maschen gelegt. Die dazugehörigen Chromatogramme und ein Foto der gestrickten Kapillare sind in Abb. 5.7 gezeigt.

Ein Vergleich der Halbwertsbreite der Signale der linearen und gestrickten Kapillare zeigt, dass sich die Halbwertsbreite beim gestrickten Reaktor nicht signifikant verringert. Gemäß der Literatur [186, 203] sollte die Bandenverbreiterung im gestrickten Reaktor aufgrund eines induzierten Sekundärstroms erheblich geringer sein als beim linearen Reaktor. Es kann daher angenommen werden, dass der Einfluss gestrickter Reaktoren auf die Bandenverbreiterung auf höhere Flussraten in makroskopischen Reaktionsschläuchen limitiert ist. Ähnliche Schlussfolgerun-

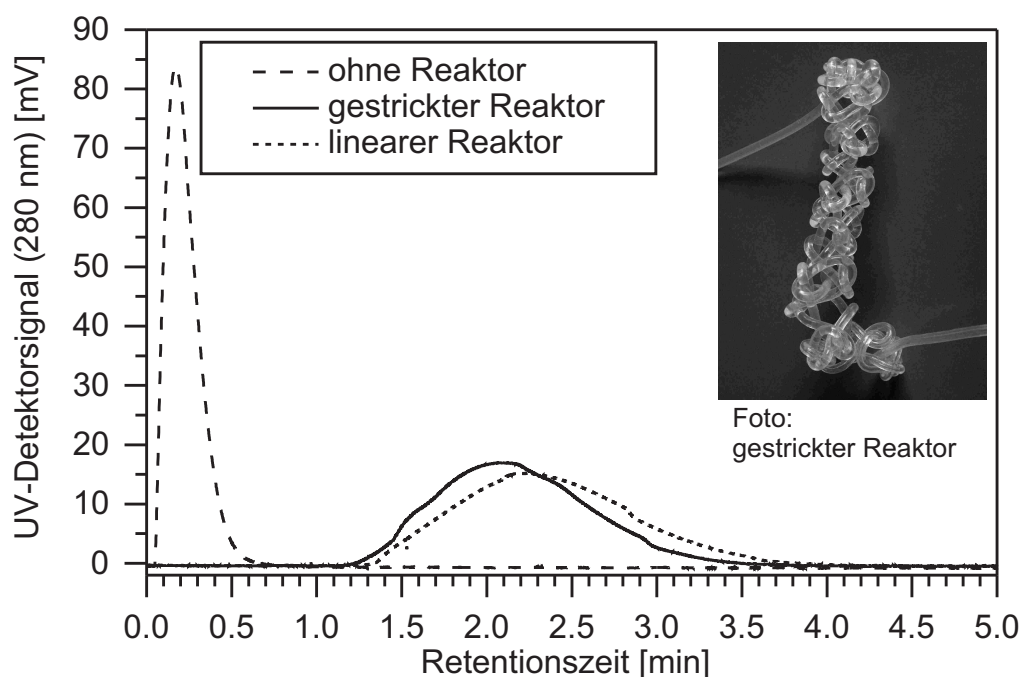


Abb. 5.7: Der Vergleich der Dispersion in einem linearen und einem gestrickten Reaktor zeigt, dass es bei beiden Ausführungen im Vergleich zur Dispersion ohne Reaktor zur erheblichen Bandenverbreiterung kommt. Die Flussrate betrug in diesem Chromatogramm $100 \mu\text{L}/\text{min}$. Auch bei höheren Flussraten wurde keine Reduzierung der longitudinalen Dispersion beobachtet.

gen wurden auch schon in [203] gezogen. Die Eignung eines gestrickten Reaktors für einen EID mit einem Flussbereich von Mikrolitern pro Minute wurde daher verworfen.

5.2.4 Anwendung einer *Peak-Parking*-Methode

Die Länge des Reaktors bestimmt bei gegebener Flussrate und Innendurchmesser der Kapillare die Reaktionszeit. Mit der Länge der Reaktionskapillare nimmt jedoch auch die longitudinale Dispersion zu.

Die AChE ist ein Enzym mit sehr hoher Umsatzzahl. In diesem Fall konnte mit einer Substratumsatzzeit von 0.44 min aus dem Beispiel in Abb. 5.3 im Online-Detektor noch ein auswertbares Signal gewonnen werden. Um jedoch die Empfindlichkeit des EIDs zu erhöhen, beziehungsweise ein Inhibitionssignal für langsamere Enzyme überhaupt erst zu ermöglichen, wurde als Lösung eine *Peak-Parking*-Methode getestet.

Ein Verteiler-Ventil mit mehreren Anschlüssen (Abb. 5.8) wurde in das Flusschema des biochemischen Detektors eingebaut, um die Analyten in Reaktions-schleifen parken zu können und nach beliebiger Reaktionszeit eluieren zu lassen.

Um den Aufbau zu vereinfachen, wurde zunächst ein FIA-System verwendet, bei dem keine Säule eingebaut war. In den ersten Versuchen wurde AChE-Lösung injiziert und vor dem Ventil über ein T-Stück Substratlösung zugegeben

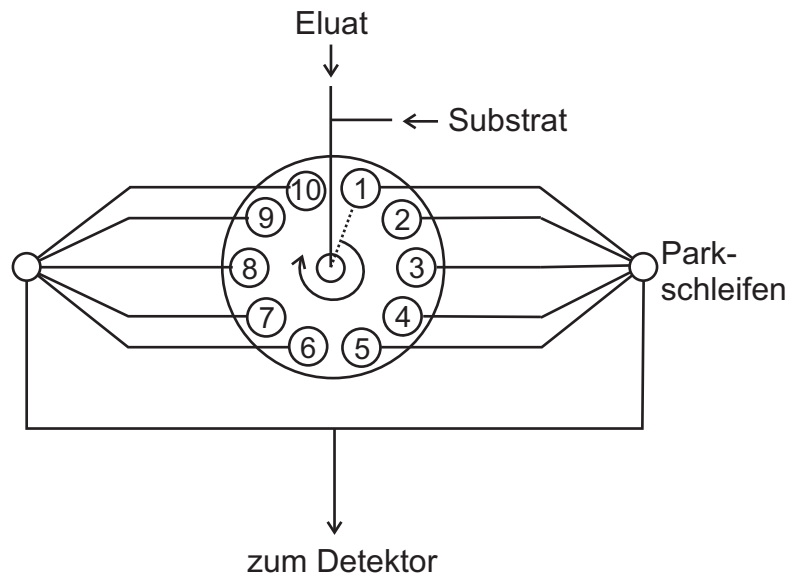


Abb. 5.8: Schema der Ventilschaltung für das *Peak-Parking*.

(Abb. 5.8). Durch das Schalten des 10-Positionen-11-Port-Ventils wurde die Enzymlösung kontinuierlich in Reaktionsschleifen mit identischem Volumen geparkt. Nach der gewünschten Reaktionszeit wurde der Inhalt der Reaktionsschleife durch nachfließenden Trägerstrom zum Detektor weitergeleitet. Die Reaktionsschleifen waren aus PEEK und fassten mit einem Innendurchmesser von 0.5 mm und einer Länge von 80 cm ein Volumen von 157 μL .

Die Dispersion konnte durch diesen Aufbau im Vergleich zu geraden Reaktionskapillaren verringert werden, wie in folgendem Experiment gezeigt werden konnte. In einen Trägerstrom von Wasser mit einer Flussrate von 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ wurden 5 μL einer AChE-Lösung (0.2 U/mL) injiziert. Direkt nach dem Injektionsventil wurde über ein T-Stück eine ATCI/DTNB-Lösung (je 0.1 mM) mit der Flussrate 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ zugegeben. In einer ersten Messung wurde anstelle einer Parkschleife eine PEEK-Kapillare mit einem Innendurchmesser von 0.5 mm und einer Länge von 6.80 m angeschlossen. Die Umsetzung des Substrats wurde ohne Schalten des Ventils durch Messung der Absorption bei 412 nm verfolgt. Die Bande eluierte stark verbreitert nach ca. 13 min mit einer Halbwertsbreite von 4.2 min, wie man Abb. 5.9 (durchgezogene Linie) entnehmen kann.

Zum Vergleich dazu wurde durch Schalten des Ventils das injizierte Enzym in einer Parkschleife für eine Dauer von 11.7 min geparkt und anschließend eluiert, so dass die Retentionszeit des Enzyms mit 13 min identisch war mit der Retentionszeit im Versuch ohne Anwenden des *Peak-Parkings* (Abb. 5.9).

Die Halbwertsbreite im *Peak-Parking*-Versuch betrug nur 1.2 min. Durch die *Peak-Parking*-Methode konnte also die Bandenverbreiterung um 72% im Vergleich zur linearen Reaktionskapillaren reduziert werden. Verschieden lange Parkzeiten der injizierten Enzymbande zeigten eine Zunahme des Signals. In einem weiteren Experiment wurde getestet, ob eine verlängerte Parkzeit die Empfindlichkeit des Enzymnachweises steigert. Dazu wurden injizierte Enzymbanden un-

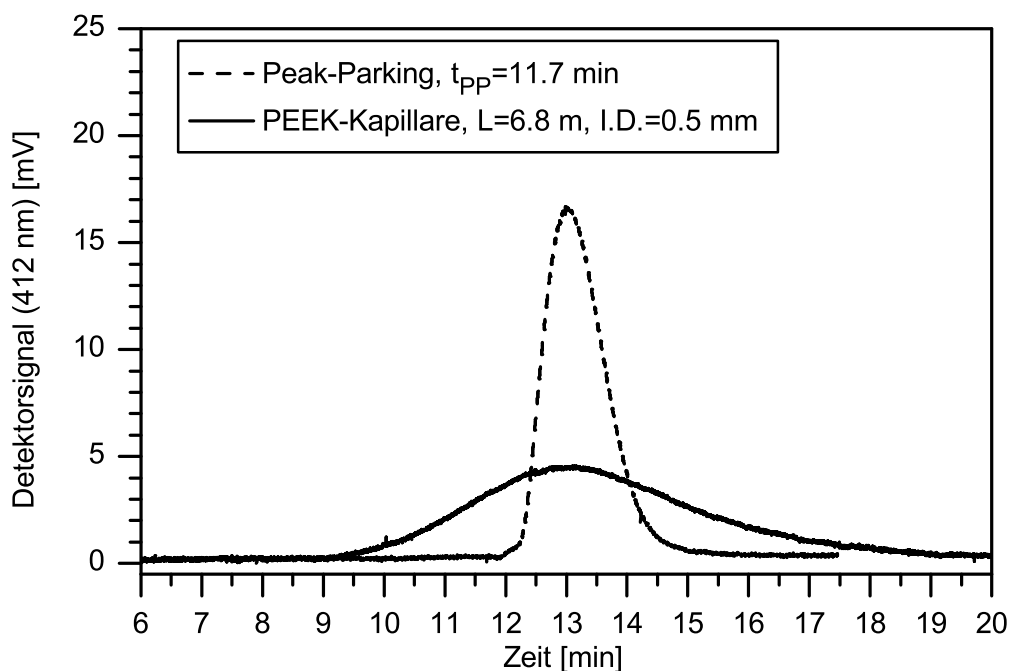


Abb. 5.9: Die Bandenbreite eines geparkten Peaks im Vergleich zu einem direkt eluierenden Peak. Die mittlere Aufenthaltszeit im Reaktor von 11.7 min ist in beiden Fällen gleich.

terschiedlich lange geparkt und mit der Signalentwicklung ohne Enzyminjektion verglichen.

Wie man in Abb. 5.10 erkennen kann, nahm jedoch auch die Signalentwicklung der Blindprobe mit zunehmender Parkzeit zu. Das Verhältnis Signal/Hintergrund und damit die Empfindlichkeit des Enzymnachweises konnte so nicht erhöht werden. Das lag einerseits daran, dass an den Wänden der PEEK-Kapillare Enzym adsorbierte und daher auch bei der Blankmessung ein Substratumsatz stattfand. Zum anderen lag die Substratkonzentration von 0.1 mM nicht bei einer optimalen Konzentration, mit der das Enzym nach der Michaelis-Menten-Kinetik mit maximaler Geschwindigkeit Substrat umsetzt.

Um eine fundiertere Aussage über den Einfluss der Parkzeit auf die Empfindlichkeit des AChE-Nachweises treffen zu können, müssten daher einerseits Spülschritte mit z.B. Methanol eingeführt werden, um adsorbiertes Enzym zu entfernen und andererseits müsste das Substrat in einer höheren Konzentration von mindestens 1 mM zugegeben werden, um den Enzymumsatz mit maximaler Geschwindigkeit für maximale Signalausbeute ablaufen zu lassen.

Für den Aufbau eines Detektors für die Wirkungsbezogene Analyse wurde wieder eine Säule in das Fluidiksystem eingebaut. Um das System trotzdem noch einfach zu halten, wurde eine Gelsäule eingebaut. AChE sollte aus einem Proteingemisch abgetrennt werden, um anschließend über das Zudosieren von Substrat nachgewiesen werden zu können.

Die Gelsäule mit einem Innendurchmesser von 10 mm und einer Länge von 4.5 cm wurde manuell gefüllt (Toyopearl, HW-55s, TOSOH BIOSEP). Eine inji-

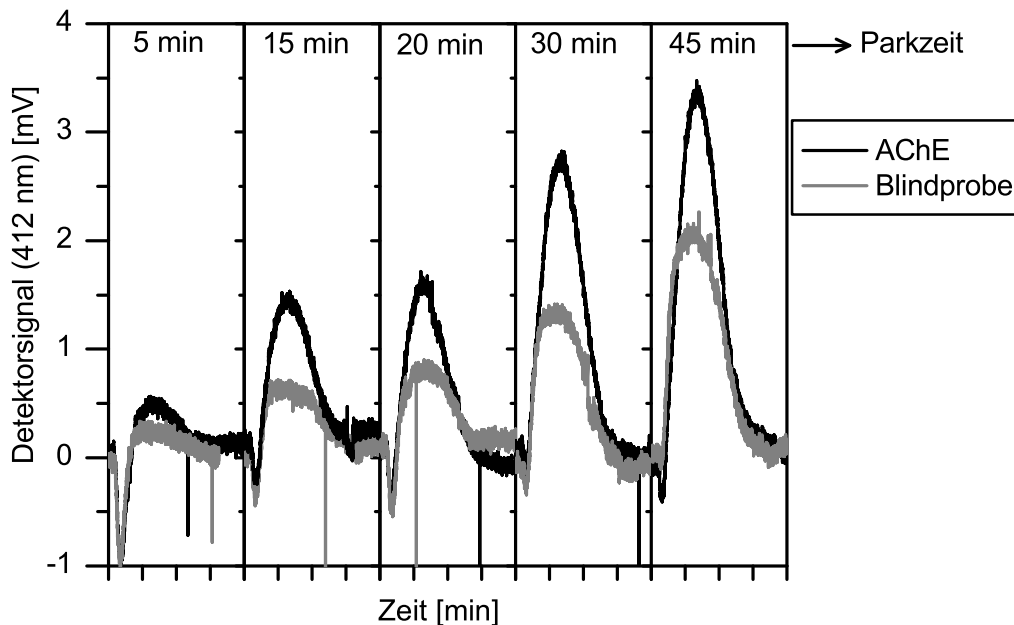


Abb. 5.10: AChE wurde verschieden lang mit Substrat in Schleifen geparkt und eluiert. Als Blindprobe wurde jeweils nur Substrat/Reagenz-Gemisch ohne Enzym geparkt. Ein Vergleich des Absorptionssignals zeigt, dass sowohl das Signal des geparkten Enzyms, als auch das Signal der Blindprobe ansteigt. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass Enzym auf den Wänden der PEEK-Kapillare haftet und die Umsetzung des Substrats auch in der Blindprobe stattfand.

zierte AChE-Lösung wurde über diese Säule als Bande eluiert. Das Eluat der Gelchromatographie musste kontinuierlich in den Reaktionsschleifen geparkt werden. Um die Reaktionsbedingungen für alle Parkschleifen identisch zu halten, wurde für alle Schleifen dieselbe Parkzeit eingestellt.

Das parabolische Strömungsprofil erwies sich hier aber ebenfalls als problematisch, da das Entleeren der Reaktionsschleifen eine längere Zeit in Anspruch nahm als das Befüllen. Die Enzymlösung, die in spätere Schleifen geparkt wurde, befand sich daher etwas längere Zeit im System, bevor sie den Detektor erreichte, als Enzymlösung aus früheren Schleifen.

Außerdem konnte die von der Säule eluierende Bande nicht in eine einzelne Schleife geparkt werden. Durch die Elution aus den Parkschleifen mit einem parabolischen Strömungsprofil konnte die auf mehrere Schleifen verteilte Bande nicht mehr zusammengesetzt werden, sondern wurde wie in Abb. 5.11 zu sehen ist, auseinander gerissen. Die Bande hätte nur noch rechnerisch zusammengefügt werden können, wobei die Signalverstärkung späterer Schleifen wegen der längeren Reaktionszeit und die Dispersion bei der Elution aus den Schleifen korrigiert werden hätte müssen. Da dies zu aufwendig und fehlerbehaftet gewesen wäre, wurde die *Peak-Parking*-Methode als Reaktoraufbau für den EID verworfen.

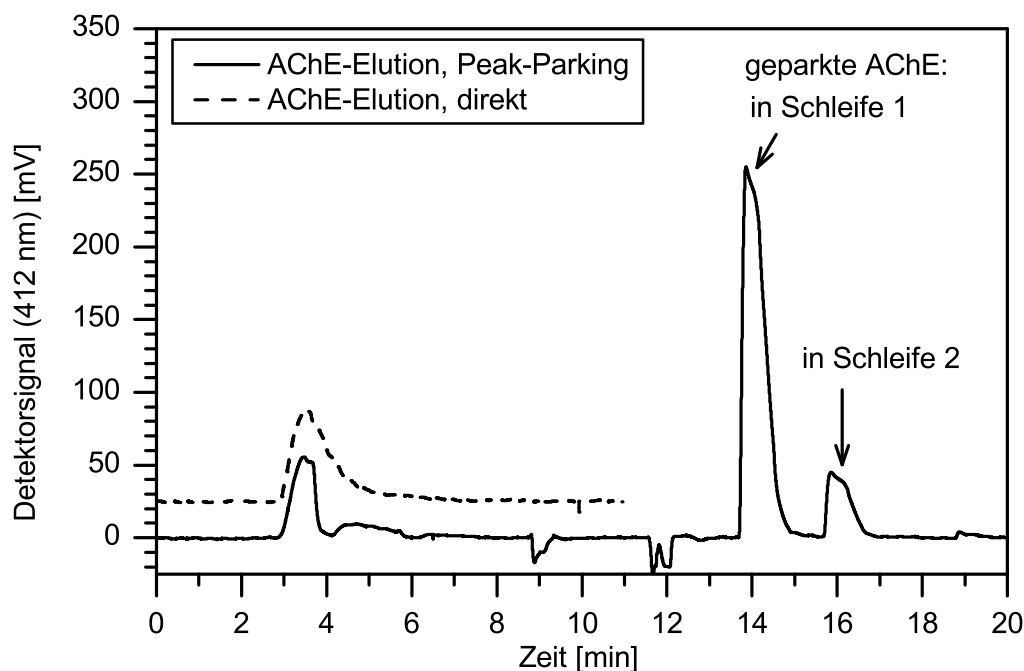


Abb. 5.11: Von einer Gelsäule eluierende AChE wurde einmal direkt zum Detektor geleitet (gestrichelte Linie, dargestellt mit einem Offset von 25 mV) und einmal nach $t=3.5$ min teilweise in den Parkschleifen geparkt (durchgezogene Linie). Das Signal ist deutlich verstärkt, aber die Bandenverbreiterung nach dem *Peak-Parking* ist zu groß. Die Elutionsbande passt nicht gesamt in eine Parkschleife, sondern muß in Schleife 1 und Schleife 2 geparkt werden. Daher wird bei der Elution nach erfolgter Reaktionszeit die Enzymbande auseinander gerissen. (Nähere Erläuterungen siehe Text.)

5.2.5 Gassegmentierter Fluss

Um die Dispersion der Analyten in den Reaktionsschleifen des EIDs zu reduzieren, wurde eine Segmentierung des Flusses vorgenommen. Die Fluidmechanik einer Flüssigkeitssegmentierung mit beispielsweise Hexan wäre einfach zu handhaben. Um eine Flüssig-Flüssig-Extraktion der auf einer C18-Säule getrennten Analyten in den Segmentierungsstrom zu vermeiden, konnte Hexan jedoch nicht eingesetzt werden. Quecksilber wäre eine gute Alternative für die Flüssigkeitssegmentierung gewesen, zudem es auch am Ende der Segmentierung recycelt werden hätte können. Aus gesundheitlichen und Umwelt-Gründen wurde dieser Ansatz jedoch verworfen.

Die Segmentierung wurde mit Gasblasen vorgenommen. Durch die Einspeisung von Gasblasen in die Reaktionskapillaren bildeten sich einzelne Reaktionsvolumina, die die longitudinale Dispersion der eluierten Analyten in den Reaktionskapillaren verringerte.

Durch das Auftreten einer in der Literatur beschriebenen bolusförmigen Zirkulation wurde zudem das radiale Mischen in den Kapillaren erleichtert. Dies war beim Zudosieren von Enzymlösung zu Eluat und beim späteren Zudosieren von Substratlösung erforderlich.

In den Reaktionskapillaren ohne Segmentierung konnte, bei einem Flussverhältnis von 40 Teilen Enzymlösung zu einem Teil Substratlösung, keine stabile Grundlinie der Produktabsorption erreicht werden. Ungenügendes Mischen der Lösungen an einem T-Stück war vermutlich die Ursache, obwohl die Flüssigkeiten in einem 180°-Winkel zusammenflossen. Dies steht im Einklang mit in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen zur Optimierung von T-Stücken [169] und der Numerischen Simulation (siehe Abschnitt 5.2.2).

Als Segmentierungsgas wurde in ersten Versuchen Helium verwendet, da es eine geringe Löslichkeit in Flüssigkeiten hat. In den ersten Testreaktoren wurden Kapillaren aus PEEK oder PTFE verwendet. Die Kunststoffkapillaren wurden für die Segmentierung durch Glaskapillaren ersetzt, da einerseits PTFE eine sehr hohe Permeabilität für Helium und andere Gase hat und andererseits Gasblasen wegen der verringerten Oberflächenspannung stärker an Kunststoffoberflächen haften bleiben. Ein weiterer Vorteil von Glasoberflächen ist die, im Vergleich zu Kunststoffen, geringere Adsorption von Proteinen. Deshalb mussten keine Additive zur Enzymlösung hinzugefügt werden, um einer Adsorption entgegen zu wirken.

In den UV-Vis-Detektor wurde anstelle einer normalen Z-förmigen Durchflusszelle eine Kapillarflusszelle der Firma LC-Packings (Dionex) eingebaut. Gasblasen blieben an den Kanten und Ecken der konventionellen, analytischen Flusszelle hängen und waren nur durch Spülen mit sehr hohen Flussraten zu entfernen. Lichtstreuung durch Blasen in der Detektorzelle störten das optische Signal. Bei der Kapillarflusszelle war eine Glaskapillare mit einem Innendurchmesser von 150 μm für eine Schichtdicke von 8 mm Z-förmig gebogen und direkt in einen Detektorblock eingegossen worden.

Eine Kapillarflusszelle eines Fluoreszenzdetektors der Firma Jasco wurde ebenfalls getestet. Dabei handelte es sich um eine Glaskapillare mit einem Innendurchmesser von 200 μm , die U-förmig gebogen in ein Metallgehäuse einjustiert war. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Flusszelle zu filigran war, um den Transport vom Hersteller in Japan nach Deutschland unbeschadet überstehen zu können.

Beim Einbau einer Kapillarflusszelle in den Detektor mussten die Flüssigkeitssegmente groß genug sein bzw. der Abstand der Gasblasen ausreichend sein, damit nicht ununterbrochen eine Gasblase in der Detektorzelle war und das optische Signal störte. Der nötige Abstand der Gasblasen war durch die Länge des Lichtweges in der Zelle vorgegeben.

Das Zudosieren von Helium über ein T-Stück in eine offene Kapillare wurde mit einem Gasdruckfeinregulierventil versucht. Da nahezu kein Rückdruck in der Kapillare vorherrschte, konnte die Segmentierung mit diesem makroskopischen Ventil bei den geringen Flussraten nicht fein genug und reproduzierbar eingestellt werden. Kleinere Ventile waren serienmäßig nicht erhältlich. Sie hätten erst zeitaufwendig entwickelt werden müssen. Daher mussten andere Wege gefunden werden, Gasblasen zur Segmentierung in den Reaktor einzuspeisen.

Ein gesteuertes Einspeisen der Blasen, um die kontinuierliche Störung des Signals durch Lichtstreuung im Detektor zu vermeiden, wurde mit der in Abb. 5.12 gezeigten Ventilschaltung unternommen. Dabei wurde das Volumen der Bohrungen im Rotor des Ventils ausgenutzt. Die Bohrungen hatten einen Durchmesser von 0.5 und 0.6 mm. Das Totvolumen auf der Rotorscheibe betrug ca. 0.4 μL

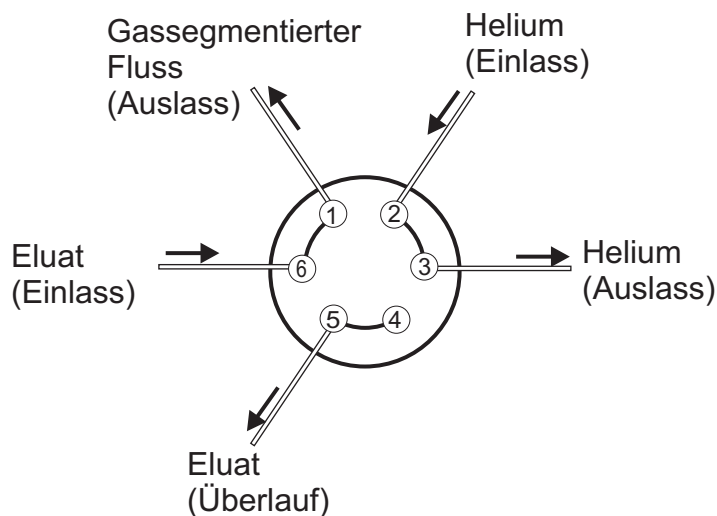


Abb. 5.12: Erste Versuche die Luftblasen gezielt in das fluidische System einzuspeisen wurden mit einem 2-Positionen-Ventil durchgeführt (Flüssigkeitssegment in den Reaktor: Verbindung zwischen 2-3, 4-5 und 6-1; Gasblase in den Reaktor: Verbindung zwischen 1-2, 3-4 und 5-6). Nachteilig an dieser Ventilschaltung waren große Druckschwankungen und die mechanische Beanspruchung des Ventils durch das häufige Trockenschalten.

pro Vertiefung. Die Heliumzufuhr wurde direkt an das Ventil angeschlossen. Am Auslass des Heliums wurde mit einem Regulierventil ein Gasrückdruck eingestellt, der ähnlich dem in den Reaktionskapillaren vorherrschenden Druck war, um reproduzierbare Heliumblasen bei konstanter Flussrate in den EID einzuspeisen. Die Schaltung des Ventils wurde mit dem Programm LabView über eine serielle Schnittstelle gesteuert.

Problematisch bei der Einspeisung der Gasblasen mit dieser Schaltung waren sowohl Rückdruckschwankungen auf der Gasseite als auch auf der Flüssigkeitsseite während des Schaltens des Ventils. Ein weiteres Problem war die mechanische Beanspruchung des Ventils, da es auf der Seite der Gasanschlüsse nicht benetzt wurde. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine hohe Frequenz der Segmentierung für eine Verringerung der Dispersion sorgt [213]. Von der Geräteseite her betrug das minimale Zeitintervall zwischen zwei Schaltvorgängen 500 ms bedingt durch den Datentransfer über die serielle Schnittstelle. Bereits nach kurzem Einsatz des Ventils und trotz Schmierens der Gasanschlüsse mit Glyzerin traten schabende Geräusche auf, die auf eine Abnutzung der Rotorscheibe des Ventils hinwiesen. Da dieser Ansatz nicht wirtschaftlich sein konnte, wurde in späteren Versuchen auf ein Einspeisen der Blasen mit diesem Fluidikventil verzichtet. Weitere Details der Optimierung des segmentierten Flusses werden im folgenden Kapitel 6 im Zusammenhang mit der Optimierung des EIDs erläutert.

Die Notwendigkeit einer Optimierung des Abstands der Gassegmente wird anhand der in Abb. 5.13 gezeigten Ergebnisse verdeutlicht. Die zwei Insektizide Carbofuran und Paraoxon-ethyl wurden auf einer C-18-Säule isokratisch getrennt.

Der Säulenausgang wurde an die Ventilschaltung aus Abb. 5.12 angeschlossen. Der segmentierte Fluss mit einer Flussrate von $250 \mu\text{L}/\text{min}$ wurde über eine Kapillarschleife von 3 m Länge mit einem Innendurchmesser von 0.5 mm zu einem UV-Detektor geführt und die Dispersion der Analyten bei 280 nm beobachtet. Wie in Abb. 5.13 gezeigt ist, wurde durch unterschiedliche Schaltintervalle der Abstand der Gasblasen variiert. Entsprechend der Ergebnisse aus der Literatur [213] zeigte sich, dass eine höhere Frequenz an Gasblasen zu einer geringeren Rückvermischung der Analyten in der Kapillare führte.

5.3 Zusammenfassung

Das Hauptaugenmerk wurde auf die Flüssigkeitsbeförderung und die longitudinale Dispersion im EID gerichtet. Verschiedene Pumpentypen wurden verglichen. Für eine pulsationsarme Flussbewegung fiel die Entscheidung auf Spritzenpumpen mit einem feinaufgelösten Schrittmotor. Die getesteten Kolbenpumpen zeigten im Einzeltest einen nahezu pulsationsfreien Fluss, schieden jedoch aufgrund praktischer Unannehmlichkeiten im Zusammenhang mit einem gassegmentierten Reaktordesign aus. Ein Vergleich der vorgestellten Reaktorbauweisen zeigte, dass bei der Anwendung eines gassegmentierten Reaktors das Problem der longitudinalen Dispersion in mikrofluidischen Nachsäulenreaktoren am besten beseitigt werden konnte. Die im folgenden Kapitel erläuterten Ergebnisse bezüglich eines wirkungsbezogenen Detektors beziehen sich daher allesamt auf die Anwendung der Gassegmentierung.

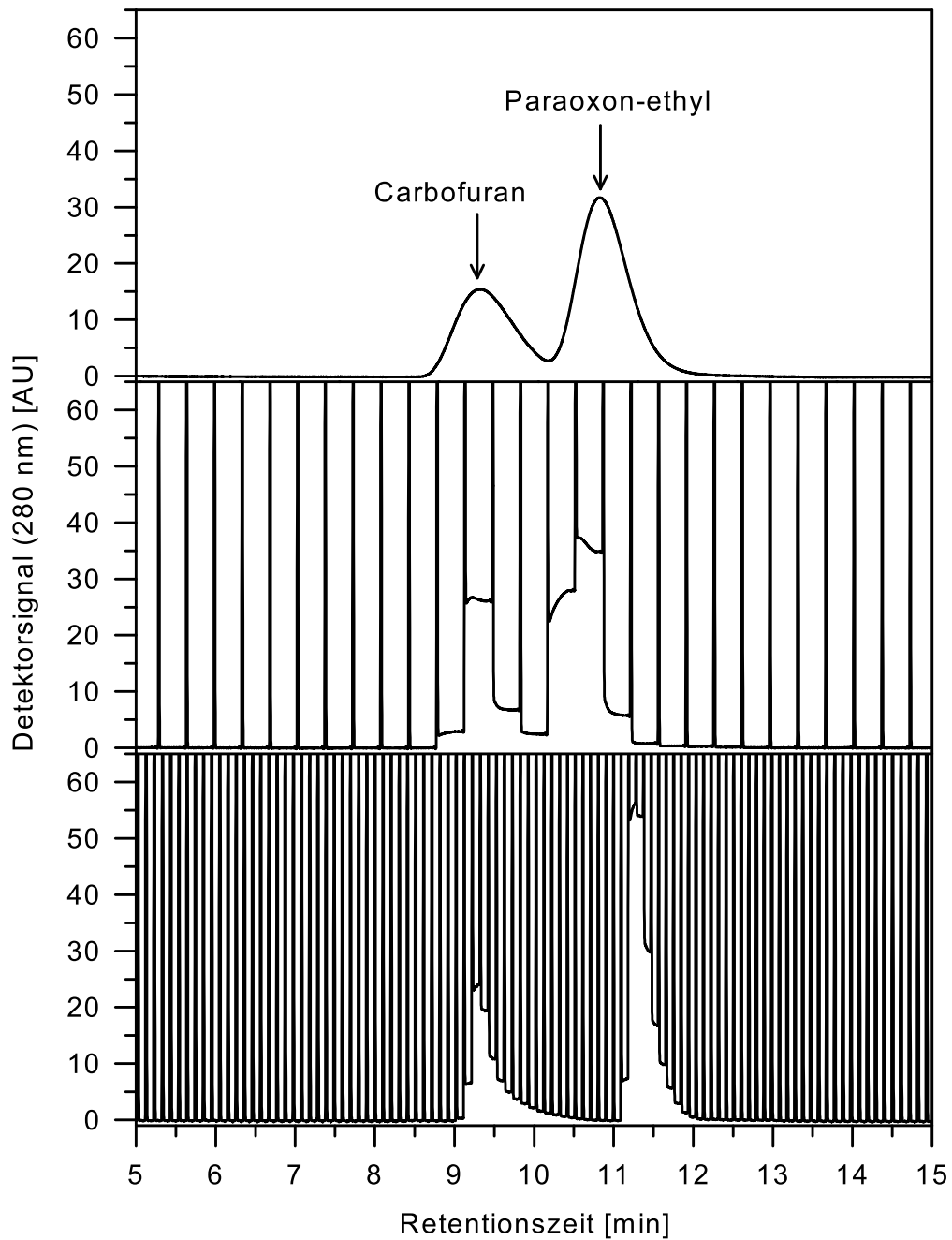


Abb. 5.13: Nach einer isokratischen Trennung von Carbofuran und Paraoxon-ethyl bei 50% Methanol auf einer C18-Säule wurde zum Eluatstrom ($250 \mu\text{L}/\text{min}$) durch das Schalten eines Ventils (vgl. Abb. 5.12) Gas eingespeist. Danach folgte eine Kapillarschleife von $\sim 3 \text{ m}$ Länge und einem Innendurchmesser von 0.5 mm . Je kürzer der Abstand der Gasblasen war, desto geringer war die Dispersion der Analyten. Gasblasen in der Detektorzelle erzeugen die positiven Signalausschläge der Chromatogramme. Oben: Dispersion ohne Gassegmentierung. Mitte: Ventil offen für Gas: 1 s , Ventil offen für Eluat: 20 s . Unten: Ventil offen für Gas: 1 s , Ventil offen für Eluat: 5 s .

6 Wirkungsbezogene Analyse mit gassegmentiertem Enzyminhibitionsdetektor

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit sollte die Identifizierung toxischer Analyten mittels Wirkungsbezogener Analytik sein. Die Arbeiten konzentrierten sich hauptsächlich auf den Aufbau eines Nachsäulendetektors für die Hemmung von AChE, die in einer rekombinant hergestellten Form des Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis* von den Projektpartnern PD Dr. T. T. Bachmann und Dr. H. Schulze, Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart, zur Verfügung gestellt wurde.

Da für einen späteren Zeitpunkt eine Parallelisierung der Wirkungsbezogenen Analyse mit mehreren Zielmolekülen geplant war, wurde von Anfang an versucht, den Aufbau mit geringem technischen Aufwand bei zugleich niedrigem Reagenzienverbrauch zu realisieren.

Im folgenden Kapitel wird die Anordnung vorgestellt, mit der eine Wirkungsbezogene Analyse von wässrigen Proben nach chromatographischer Trennung möglich ist. Aus den im vorangegangenen Kapitel erläuterten Gründen wurde die dazu benötigte Enzyminhibition in einem gassegmentierten Nachsäulendetektor (*Segmented Flow Enzyme Inhibition Detector*, SFEID) optimiert.

6.1 Aufbau der Apparatur

Das Flusschema der Anordnung für eine Wirkungsbezogene Analyse mittels Enzyminhibition ist in Abb. 6.1 dargestellt. Die Probe wurde mit einem Autosampler in das chromatographische System eingebracht. Die Analyten wurden auf einer C18-Säule mit einem Lösungsmittelgradienten getrennt. Wenn nicht anders beschrieben, wurde ein Gradient aus Methanol und Wasser mit 0.01% Essigsäure angewendet, da Tests auf der Mikrotiterplatte für Methanol die geringste denaturierende Wirkung auf Biomoleküle ergaben (siehe Abb. 4.6). Die Essigsäure wurde hinzugefügt, um die Ionisierungsrate im ESI-TOF-MS zu erhöhen.

Nach der Trennsäule wurde der Fluss aufgeteilt. Ein Teil des Eluats wurde in den gassegmentierten EID geleitet (Abb. 6.1, Flussweg oben). Der größere Anteil des HPLC-Eluats wurde für die Detektion der Analyten mit konventionellen Detektoren verwendet, die die Information aus dem biochemischen Detektor ergänzten. In der Versuchsanordnung wurden die Absorption der Analyten im UV-Vis-Bereich (Abb. 6.1, Flussweg Mitte) und die Massenspuren (Abb. 6.1, Flussweg unten) aufgezeichnet.

Als Substrat für die Detektion der verbliebenen Aktivität der AChE wurde

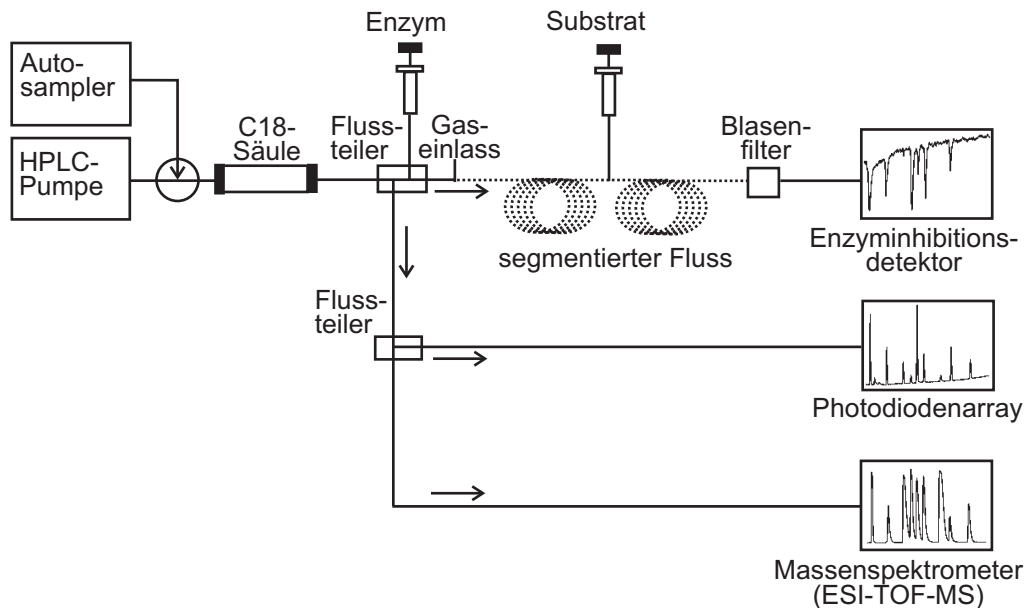


Abb. 6.1: Versuchsanordnung zur Wirkungsbezogenen Analyse: HPLC mit Autosampler verbunden mit einer Paralleldetektion von Enzyminhibition, Massenspektrometer und Photodiodenarray.

entweder ein ATCI/DTNB-Gemisch zudosiert und mit einem UV-Vis-Detektor die Absorption des Produkts TNB bei einer Wellenlänge von 412 nm verfolgt. Alternativ wurde das Substrat AMQI verwendet und die Fluoreszenz des Produkts zur Bestimmung der restlichen Enzymaktivität mit einem Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 403 nm und einer Emissionswellenlänge von 502 nm aufgezeichnet. Einzelheiten zu den jeweiligen Ergebnissen werden jeweils in den Bildunterschriften der Chromatogramme erwähnt.

Die Enzym- und Substratlösungen wurden jeweils mit einer Spritzenpumpe der Firma Harvard Apparatus zudosiert. Die Flussraten wurden während der Optimierungsphase der Versuchsanordnung variiert. In der optimierten Versuchsanordnung betrug die Flussrate des Eluats in den EID $10 \mu\text{L}/\text{min}$. Die Enzymlösung wurde mit $90 \mu\text{L}/\text{min}$ und die Substratlösung mit $2.25 \mu\text{L}/\text{min}$ zudosiert. Dazu wurden die beiden Plätze der Spritzenpumpe mit einer 10 mL- und einer $250 \mu\text{L}$ -Spritze bestückt. Die Substratlösung wurde über ein T-Stück mit einer 40mal kleineren Flussrate als der Hauptfluss zudosiert, um ein Zerreißen der Segmentierungsblasen zu vermeiden. Im Fall der Aufzeichnung der Massenspuren mit dem ESI-TOF-MS wurden ca. $70 \mu\text{L}/\text{min}$ des HPLC-Eluats in das Massenspektrometer abgezweigt.

Im Folgenden wird auf die kritischen Bereiche des fluidischen Aufbaus, auf die die Optimierungsversuche abzielten, näher eingegangen. Anschließend werden die mit dem optimierten Aufbau gewonnenen Wirkungsbezogenen Analysen vorgestellt.

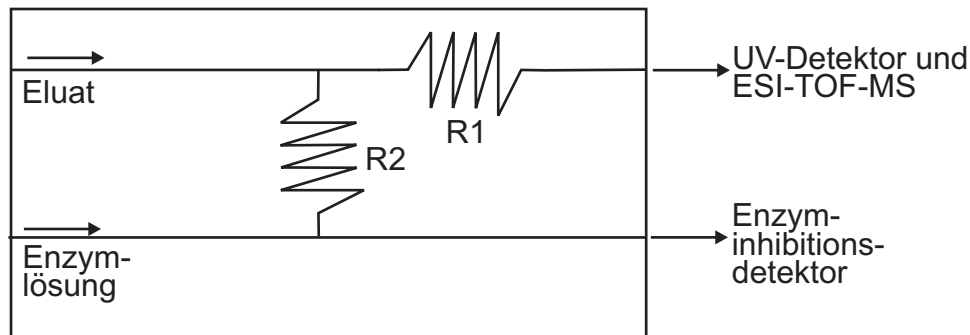


Abb. 6.2: Ein maßgefertigter Flussteiler mit Flusswiderstand $R2 \gg R1$ leitet einen Teil des Eluats zum Enzyminhibitionsdetektor (Splitverhältnis 1:20 bei $200 \mu\text{L}/\text{min}$ Eluatstrom).

6.1.1 Flussteiler

Das Teilen des Eluatstroms von der HPLC wurde anfangs mit Restriktionskapillaren von unterschiedlichen Längen und Innendurchmessern vorgenommen. Da das Einspeisen der Gasblasen sehr stark von den Flussraten in den Reaktionskapillaren abhing, musste ein reproduzierbares Teilverhältnis des Säuleneluats zum EID und zu den weiteren Detektoren wie Massenspektrometer und UV-Detektor eingestellt werden können. Es zeigte sich jedoch, dass kein reproduzierbares Abteilen der Flussrate in den EID erreicht werden konnte.

Um die Reproduzierbarkeit der Flussteilung weitgehend unabhängig vom Rückdruck des fluidischen Systems zu halten, wurde von der Firma Sunchrom ein Flussteiler mit einem festen Splitverhältnis von 1:20 für eine Eingangsflussrate von $200 \mu\text{L}/\text{min}$ maßgefertigt (Abb. 6.1, erster Flussteiler nach der Trennsäule). Da der Splitter durch die Flusswiderstände R1 und R2 (Abb. 6.2) einen Rückdruck von ca. 40 bar bei der Eingangsflussrate von $200 \mu\text{L}/\text{min}$ erzeugte, blieb das Splitverhältnis konstant. Niedrige Druckschwankungen im fluidischen System auf der Auslassseite, die zum Beispiel beim Einspeisen der komprimierbaren Gasblasen entstanden, nahmen keinen Einfluss auf die Flussteilung.

Am Flussteiler wurde auf der Seite des niedrigen Flusses direkt die Zuleitung für die Enzymlösung angeschlossen, um mit einem möglichst geringen Totvolumen nach dem Teilen des Eluats die Enzymlösung zudosieren zu können.

Der zweite Flussteiler aus Abb. 6.1, der das restliche HPLC-Eluat auf die Flusswege in Richtung Photodiodenarray und Massenspektrometer teilte, wurde mit einem Niederdruck-Flussteiler mit Nadelventil der Firma Upchurch Scientific realisiert. Auch hier stellte sich heraus, dass wie beim Aufteilen mit T-Stück und Restriktionskapillaren, das Verhältnis der Flussraten zueinander nicht immer konstant blieb. Die Unterschiede waren jedoch vernachlässigbar, da anders als beim EID keine volumenabhängige Reaktion vor der Messung durchgeführt werden musste und die Schwankungen der Retentionszeit in einem annehmbaren Rahmen lagen.

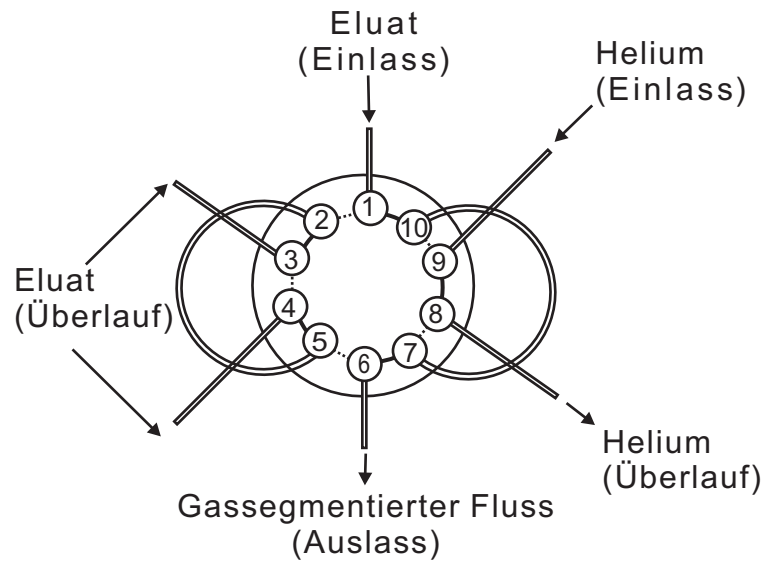


Abb. 6.3: Ventilschaltung zur Einspeisung von definierten Gasblasen. Die Schleife zwischen Position 10 und 7 wurde mit Gas befüllt. Durch Schalten des Ventils wurde ein definiertes Segment in den Fluss eingespeist.

6.1.2 Einspeisen der Gassegmente

Die anfängliche Versuchsanordnung für ein kontrolliertes Einspeisen von Gasblasen in den Nachsäulenreaktor wurde in Kapitel 5.12 gezeigt. Die Einstellungen der vorgestellten Ventilschaltung wurden dabei auf eine isokratische Trennung von zwei Insektiziden, die eine kurze Kapillarschleife passieren mussten, mit UV-Detektion optimiert. Wie erwähnt, waren große Druckschwankungen während des Schaltvorgangs ein Problem. Die Druckschwankungen wurden zum Teil durch unterschiedliche Drücke an der Gaszuleitung und in den Reaktionskapillaren erzeugt. Zum anderen Teil entstanden die Schwankungen durch die Geometrie des Ventilrotorblocks. Die Druckschwankungen hatten einen erheblichen Einfluss auf die Fließgeschwindigkeit in der Kapillarschleife. Bei der Anwendung im EID variierten aufgrund der schwankenden Flussraten die Reaktionszeiten und die Mischverhältnisse von Eluat, Enzym- und Substratlösung.

Weitere Optimierungsversuche für ein robusteres Einspeisen von Gasblasen wurden mit längeren Reaktionsschleifen und dem Zudosieren von Enzym- bzw. Substratlösung unternommen, um eine möglichst rauscharme Grundlinie des Signals im EID zu erreichen. Eine abgeänderte Variante der Ventilschaltung aus Abb. 5.12 mit einem 10-Port-2-Wege-Ventil ist in Abb. 6.3 dargestellt. Helium wurde in eine Probenschleife unter einem konstanten Druck gefüllt, um jeweils definierte Blasenvolumen einspeisen zu können. Da das Helium unter den in den Reaktionskapillaren vorherrschenden Druck gebracht werden musste, wurde am Helium-Überlauf ein Rückdruckregler in Form einer Schraubdeckelflasche mit Belüftungshahn installiert. Der korrekte Rückdruck konnte durch die Druckausgleichsmöglichkeit am Helium-Überlauf leichter eingestellt werden, als bei der in Abb. 5.12 dargestellten Anordnung. Trotzdem war die Feinabstimmung der

Drücke sehr aufwendig.

Nach Justierung arbeitete diese Anordnung reproduzierbar, wie anhand der in Abb. 6.4 gezeigten Ergebnisse verdeutlicht wird. Die Stabilität des Aufbaus und die Reproduzierbarkeit der erfassten Inhibitionssignale wurden durch mehrfache Injektion eines Carbofuran- und Paraoxon-Gemisches und anschließender isokratischer Trennung mit Methanol/Wasser (1:1) als mobile Phase getestet. Die UV-Absorption bei 280 nm wurde parallel zum Enzyminhibitionssignal erfasst. Die Detektorzelle für die Enzyminhibition war eine Kapillarflusszelle, damit keine Blasen in der Zelle hängen blieben.

Nach einer gewissen Zeit der Gleichgewichtseinstellung im System konnte das Inhibitionssignal reproduzierbar mit dem gasegmentierten Nachsäulenreaktor erfasst werden (Abb. 6.4, Mitte). Das System konnte über eine Stunde kontinuierlich stabil betrieben werden, bevor ein erneutes Befüllen der Spritzenpumpen ein Anhalten des Flusses erforderte. Ein Vergleich des Inhibitionssignals mit Gassegmentierung (Abb. 6.4, Mitte) und ohne Segmentierung (Abb. 6.4, oben) zeigt deutlich die verbesserte Auflösung der Inhibitionssignale mit Segmentierung.

Auch bei der Ventilschaltung aus Abb. 6.3 konnten leichte Druckschwankungen aufgrund der Ventilgeometrie nicht verhindert werden. Außerdem blieb das Problem der mechanischen Abrasion durch das Trockenschalten bestehen.

Das gesetzte Ziel, die in der chromatographischen Trennung erreichte und mit dem UV-Detektor erfasste Auflösung der Analyten im EID zu erhalten, konnte nicht vollständig erreicht werden. Für die verringerte Auflösung im EID kamen mehrere Gründe in Frage. Das Schaltventil war nicht für so kleine Flussraten geeignet, wie sie die Versuchsanordnung erforderte. Die Ventilanschlüsse und Vertiefungen in der Rotordichtungsscheibe erzeugten ein zusätzliches Totvolumen. Ein Ventil mit kleineren Dimensionen stand zum Versuchszeitpunkt nicht zur Verfügung. Die Frequenz der Gasblasen war steuerungstechnisch limitiert, da sich das Ventil höchstens mit einem zeitlichen Abstand von 500 ms schalten ließ. Die Ergebnisse aus Abb. 5.13 lassen vermuten, dass die optimale Frequenz der Segmentierung durch die Ventilschaltung nicht erreicht werden konnte. Da keine Ventile zur Verfügung standen, die einen schnelleren Schaltzyklus zuließen, mussten alternative Wege zum Einbringen von Gasblasen mit hoher Frequenz und kleinem zusätzlichem Totvolumen gefunden werden.

Ein verringerter Abstand der Gasblasen bei hoher Segmentierungshäufigkeit warf aber neue Fragestellungen auf, da dann das Detektorsignal aufgrund zu vieler Blasen in der Zelle gestört wurde. Ein Abtrennen der Blasen vor der Detektorzelle wurde nötig. Auf die Versuche, die Blasen abzutrennen, wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

Zunächst werden aber die weiteren Möglichkeiten erläutert, um das Einbringen der Gasblasen zu verbessern. Bei allen folgenden Varianten war jedoch das Abtrennen der Blasen vor der Detektorzelle notwendig.

Die Gasblasen wurden über ein T-Stück mit geringem Totvolumen eingebracht (Abb. 6.5, a). Dabei wurde der Einlassdruck mit einem Feinregulierventil geregelt. Eine Gleichgewichtseinstellung des Systems war jedoch nur mit sehr langwierigem Nachregeln zu erreichen und speziell in Zusammenarbeit mit Blasenfiltern nicht praktikabel (siehe auch Abschnitt 6.1.3).

Vielversprechender war das Einspeisen der Gasblasen über ein offenes T-Stück

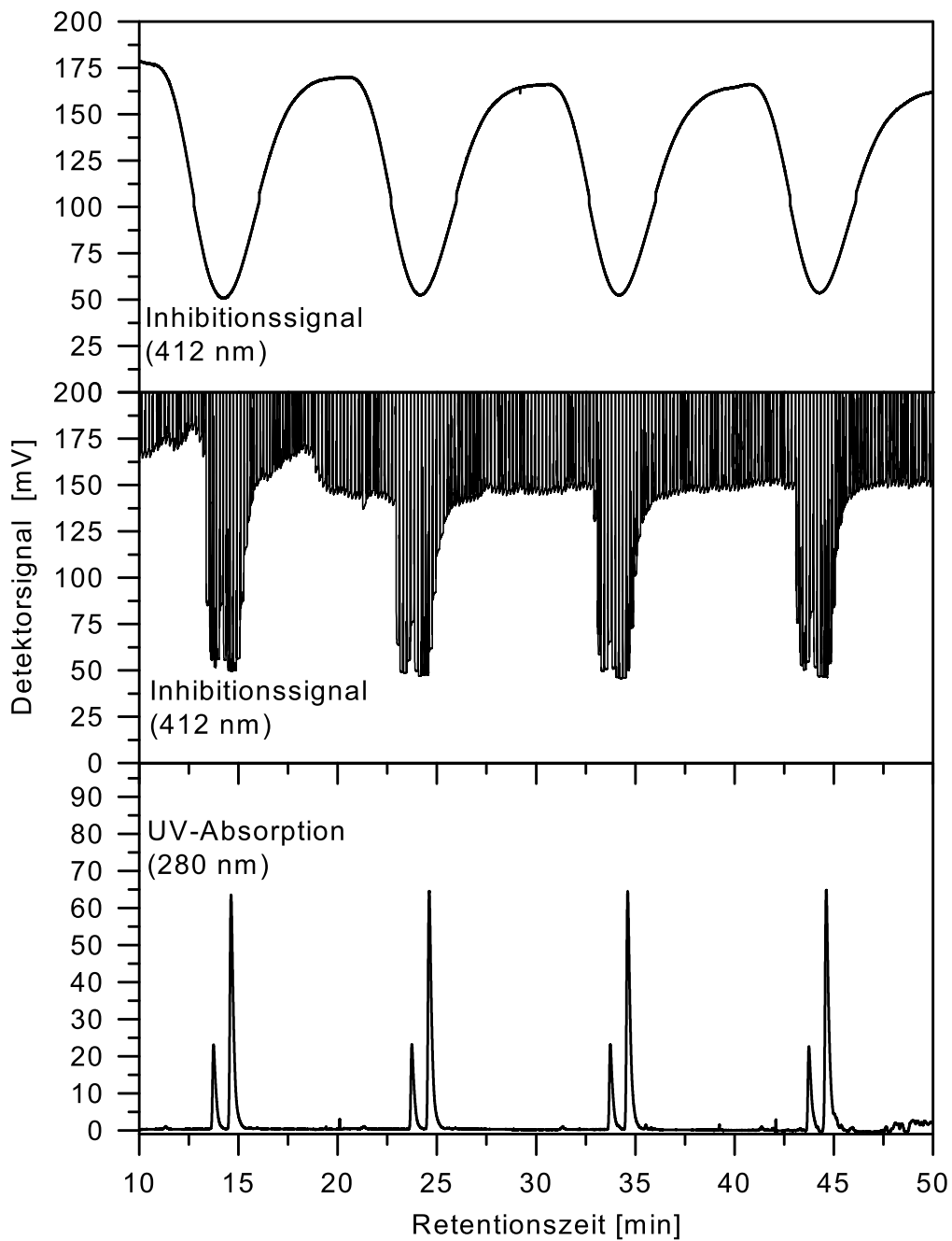


Abb. 6.4: Die isokratische Trennung von Carbofuran und Paraoxon-ethyl wurde mehrfach wiederholt. Das Enzyminhibitionssignal im gassegmentierten Aufbau (Mitte) war reproduzierbar. Die Dispersion der Analyten war trotz einer Verweilzeit in den Reaktionsschleifen für ~ 7 min soweit verringert, dass die Analyten getrennt erfasst werden konnten (Mitte: Gas/Flüssigkeit 0.5 s/2 s, Ventilschaltung aus Abb. 6.3). Im Vergleich dazu trat ohne Segmentierung eine Rückvermischung der Analyten auf, so dass nur noch ein gemeinsames Inhibitionssignal aufgezeichnet wurde (oben).

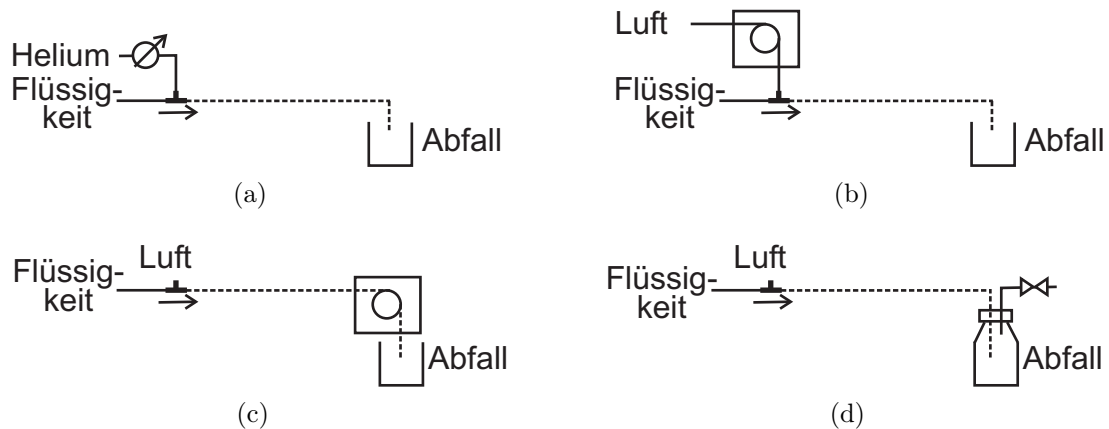


Abb. 6.5: Schematische Darstellung der getesteten Möglichkeiten zum Einbringen von Gasblasen in den Flüssigkeitsstrom: (a) Helium wurde mit Überdruck über ein Feinregulierventil eingebracht. (b) Luft wurde durch eine Schlauchpumpe eingebracht. (c) Luft wurde durch Unterdruck eingesaugt, der mit einer Schlauchpumpe erzeugt wurde. (d) Luft wurde durch Unterdruck eingesaugt, der durch eine evakuierte Flasche erzeugt wurde.

durch Unterdruck, der auf der Auslassseite der Flusszelle des EIDs angelegt wurde. In einem ersten Versuch wurde der Unterdruck mit Hilfe einer Schlauchpumpe erzeugt (Abb. 6.5, c). Die Pulsation der Schlauchpumpe beim Einspeisen der Luftblasen übertrug sich jedoch auf die Flussrate im EID und verursachte eine verrauschte Basislinie des Inhibitionssignals.

Da das Rauschen der Grundlinie auch die Nachweisgrenze verschlechterte, wurde eine unter leichtem Unterdruck stehende Schraubdeckelflasche mit Anschlüssen angeschlossen (Abb. 6.5, d). Der Unterdruck wurde erzeugt, indem die Flasche für einige min an eine Vakuumpumpe angeschlossen wurde. Um die Luftblasen in geeigneter Anzahl in das System einzusaugen, konnte der Unterdruck an der Schraubdeckelflasche über Hähne angepasst werden. Für eine Gleichgewichtseinstellung des Systems, die durch eine stabile Basislinie definiert werden kann, wurden ~ 70 min benötigt (Abb. 6.6).

Die Zeit war um ein Vielfaches länger als bei der Anwendung der Schlauchpumpe, die bereits nach ~ 10 min eine stabile Grundlinie lieferte. Die Basislinie war jedoch nach der Äquilibrationszeit weniger verrauscht.

In Abb. 6.6 werden die Inhibitionssignale eines kurzen isokratischen Laufs zur Trennung von Carbofuran und Paraoxon gezeigt. Bei der ersten gezeigten Injektion wurde ein Gemisch mit jeweils $1 \mu\text{mol/L}$ an Insektiziden injiziert, bei der zweiten gezeigten Injektion betrug die Konzentration der Insektizide jeweils $5 \mu\text{mol/L}$. Beim Einspeisen der Luftblasen mit Unterdruck, der durch eine Flasche erzeugt wurde (Abb. 6.5, d), konnte die Inhibition aufgrund der ruhigen Basislinie selbst bei geringen Konzentrationen der Insektizide nachgewiesen werden. Aufgrund der langen Zeit für eine Gleichgewichtseinstellung war es unter diesen Bedingungen jedoch nicht möglich, chromatographische Trennungen mit einem langen Elutionsfenster durchzuführen, da bereits nach 110 min die Sprit-

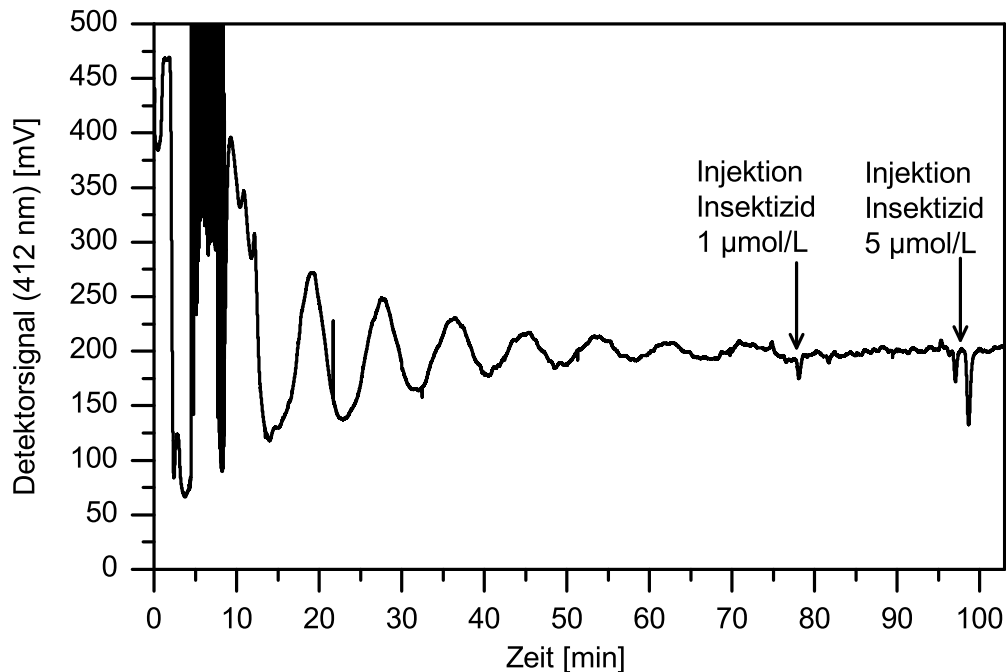


Abb. 6.6: Die Luftsegmentierung erfolgte in diesem Versuch durch eine Schraubdeckelflasche, die sich unter Unterdruck befand (siehe auch Abb. 6.5, d). Das System benötigte eine sehr lange Zeit für die Gleichgewichtseinstellung, resultierte dann aber in einer ruhigen, pulsationsarmen Basislinie, wodurch die Nachweisgrenze sank. Die Blasen wurden mit einer Frequenz von ca. 5 Hz eingespeist und vor der Detektorzelle abgetrennt.

zenpumpen für Enzym- und Substratlösung wieder nachgefüllt werden mussten. Das Stoppen und Auffüllen der Förderpumpen im EID erforderte erneut Zeit für die Äquilibration des Systems. Die Variante mit der Unterdruckflasche resultierte zwar in einer schönen Basislinie, aber Inhibitionssignale von komplexeren Substanzgemischen mit einer länger dauernden chromatographischen Separation wären nicht möglich gewesen.

Daher wurde in der optimierten Versuchsanordnung das Einspeisen der Gasblasen mit Überdruck vorgenommen. Da das Einspeisen der Gassegmente mit einem Feinreguliertventil nicht reproduzierbar war, wurden die Gasblasen mit einer Schlauchpumpe eingespeist (Abb. 6.5, b). Die Umdrehungszahl und der Innendurchmesser der Schlauchpumpe bestimmten dabei die Frequenz mit der die Blasen eingespeist wurden. Die Gassegmentierung in der Reaktionskapillare wird in Abb. 6.7 gezeigt. Die Blasen wurden mit ~ 4.5 Hz eingespeist. Die Flüssigkeitssegmente hatten ein Volumen von $\sim 0.5 \mu\text{L}$ und waren damit annähernd doppelt so groß wie die Gassegmente.

6.1.3 Optimierung der Blasenseparation

Es gab mehrere Gründe, die für eine Blasenseparation vor der Detektorzelle sprachen. Zum einen stören Gasblasen in der Detektorzelle das Signal aufgrund von

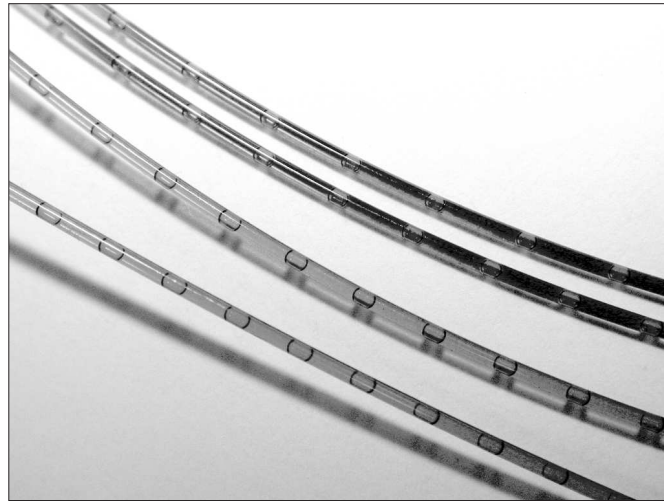


Abb. 6.7: Gasblasen zur Segmentierung des Eluats in einer Glaskapillare mit einem Außendurchmesser von $660\ \mu\text{m}$. Die Gasblasen wurden mit einer Schlauchpumpe nach Abb. 6.5, b eingebracht.

Lichtreflexionen. Ist die Frequenz der Gassegmentierung zu hoch, wird selbst das mit einer Kapillarflusszelle erzeugte Signal gestört, da sich zu jedem Zeitpunkt eine reflektierende Gasblase in der Detektorzelle befindet (siehe Abb. 6.8, Linie unten). Zum anderen wird die Auswertung der Inhibitionssignale erschwert, wenn beispielsweise genau beim Minimum des Inhibitionssignals Gasblasen in der Detektorzelle für einen positiven Detektorausschlag sorgen. Das Inhibitionssignal würde somit unterschätzt werden.

Das Entfernen der Gasblasen mit einer in der Chromatographie üblichen Membranblasenfalle (getestet wurde ein Produkt der Firma Omnifit) oder mittels eines Lösungsmittelentgasers war nicht erfolgreich. Zum einen war das Totvolumen zu groß, zum anderen konnte die große Menge der eingespeisten Blasen nicht entfernt werden. Daher wurden in der Werkstatt des Instituts für Wasserchemie Blasenfilterprototypen aus Plexiglas konstruiert (Abb. 6.9).

Da Gas einen höheren Durchbruchsdruck als Flüssigkeit durch enge Kanäle hat, wurde der erste Blasenfilter als T-Stück mit $1\ \text{mm}$ bzw. $0.25\ \text{mm}$ großen Bohrungen konstruiert (Abb. 6.9, a). Da die Gasblasen weniger Verformungsenergie für den großen Kanal benötigten, konnten Flüssigkeit und Gas getrennt werden. Der Unterschied im Durchbruchsdruck für den Gasauslass und den Flüssigkeitsauslass war jedoch in diesem Filtermodell so gering, dass der Aufbau nicht mit der gewünschten Effizienz arbeitete. Teilweise gelangten bei kleinsten Druckschwankungen im System Gasblasen über den Flüssigkeitsauslass in die Detektorzelle.

Daher wurde ein Y-förmiger Blasenfilter konstruiert, bei dem eine Membran eingelegt werden konnte, um einen unterschiedlichen Gasdurchbruchsdruck für die beiden Auslasskanäle aufzubauen (Abb. 6.9, b). Bei der Auswahl der Membran war ein Kompromiss zu finden, zwischen der Effizienz des Abtrennens der Blasen und der Stabilität der Membran, die beim Fixieren mechanisch strapaziert wurde. Eine Cellulosemembran (Whatman) mit einer Porengröße von $8\ \mu\text{m}$ eignete sich am besten für das Abtrennen der Blasen, wie in Abb. 6.8 anhand der Linie oben

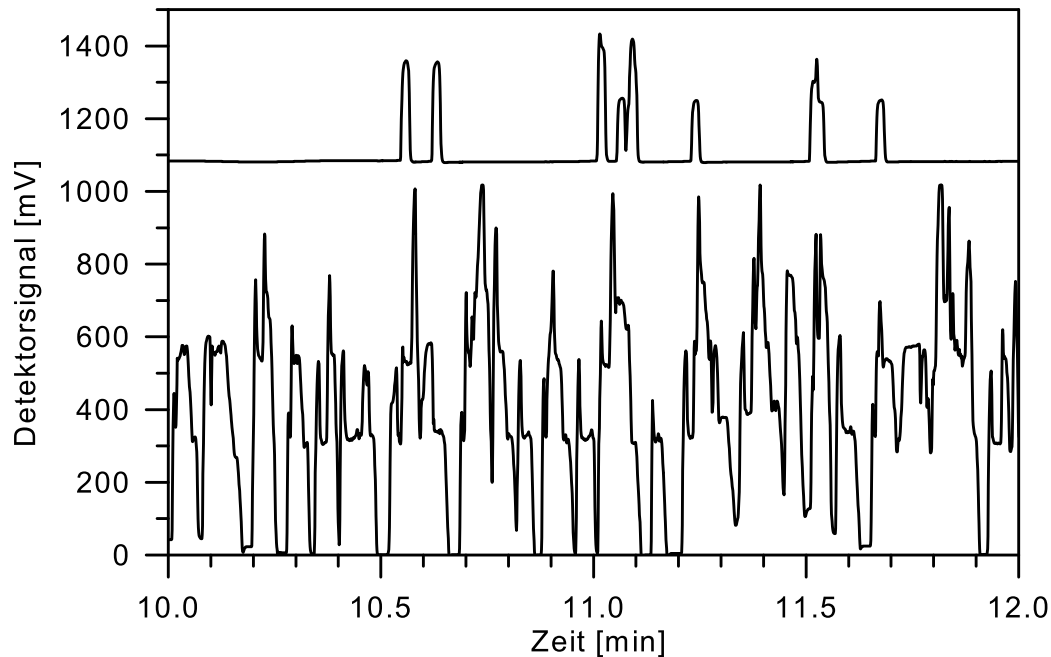


Abb. 6.8: Blasen wurden mit einer Frequenz von ~ 5 Hz in eine Kapillare eingespeist. Die geringen Abstände der Gasblasen erforderten ein Abtrennen der Blasen vor der Detektorzelle, da das Detektorsignal ansonsten gestört wurde (Linie unten). Blasenfilter machten ein Auswerten des Detektorsignals möglich (Linie oben, Signal mit einem Offset von 700 mV dargestellt). Der Membranblasenfilter (Abb. 6.9, b) entfernte die Gassegmente mit einer Effizienz von über 98%.

gezeigt wird.

Anders als bei Blasenfilter (a) aus Abb. 6.9, bei dem die Flüssigkeit ohne zusätzliche Pumpen durch die Detektorzelle fließen konnte, wurde bei Blasenfilter (b) mit alternierend saugenden Spritzenpumpen eine Flussrate durch die Detektorzelle eingestellt. Der detaillierte Aufbau ist in Abb. 6.10 dargestellt.

Lediglich 5% des Flüssigkeitsstroms, also $5 \mu\text{L}/\text{min}$ von $100 \mu\text{L}/\text{min}$, konnten in die Detektorzelle eingesaugt werden. Der größte Anteil an Flüssigkeit wurde über den Gasauslass in den Abfall transportiert. Die Flussrate konnte jedoch nicht erhöht werden, da ansonsten zu viele Gasblasen durch die Membran durchbrachen und sich störend auf das Detektorsignal auswirkten.

Eine Erhöhung der Flussrate bei konstantem Volumen der Durchflusszelle wäre wünschenswert, da das relative Totvolumen der Zelle verringert werden würde. Die Inhibitionsbanden würden somit schmaler und der Singalausschlag größer werden. Damit könnte zugleich die Nachweisgrenze des EIDs verbessert werden.

Abgewandelt aus Blasenfilter (b) in Abb. 6.9 wurde somit Blasenfilter (c) konstruiert, bei dem eine nanoporöse *Anodisc*-Membran mit einem Durchmesser von 2.1 cm in den Prototyp eingelegt werden konnte. Die Flussrate durch den EID konnte bei dieser Variante jedoch im Vergleich zum Blasenfilter (b) mit Cellulosemembran nicht erhöht werden. Nicht der zu niedrige Gasdurchbruchsdruck war nun das Problem, sondern der zu hohe Durchbruchsdruck für Flüssigkeiten, der

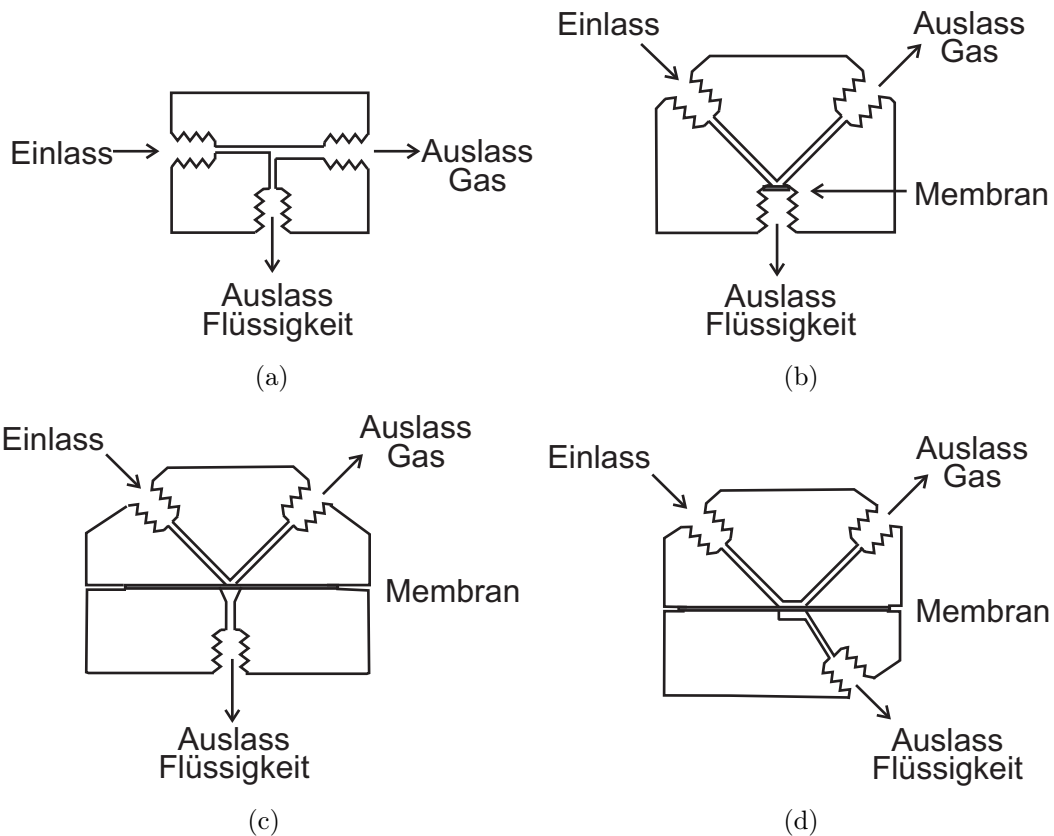


Abb. 6.9: Verschiedene Prototypen von Blasenfiltern wurden getestet: (a) Ein T-Stück mit zwei unterschiedlichen Bohrungen für das Abtrennen von Gas- und Flüssigphase. (b) Blasenfilter mit einer Membran zum Einlegen. Fixiert wird die Membran durch ein Ferrule am Auslass für die Flüssigkeit. Dabei wird die Membran mechanisch sehr beansprucht. Die brüchigen *Anodisc*-Membranen konnten in diesen Blasenfilter nicht eingebaut werden. (c) Zerlegbarer Blasenfilter zum bequemen Einlegen von brüchigen Membranfiltern wie beispielsweise *Anodisc*-Membranen. (d) Zerlegbarer Membranfilter mit vergrößerter Filteroberfläche, um den Transfer der Flüssigkeit und damit die Flussrate durch die Detektorzelle zu erhöhen.

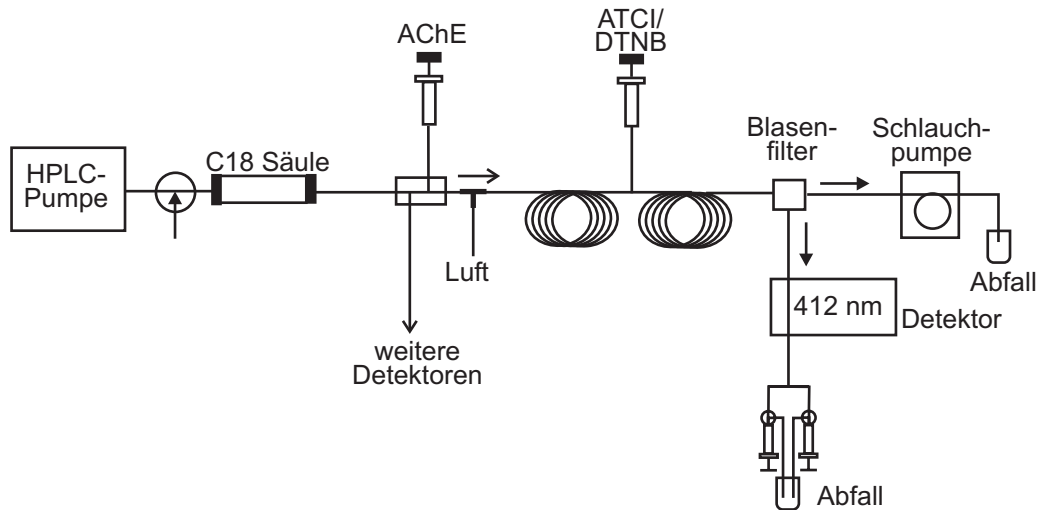


Abb. 6.10: Aufbau des luftsegmentierten Enzyminhibitionsdetektors mit Abtrennen der Luftsegmente vor der Detektorzelle durch einen Membranblasenfilter. Die Luftsegmente werden durch einen von einer Schlauchpumpe erzeugten Unterdruck ins System gebracht. Alternierend arbeitende Spritzenpumpen saugen die abgetrennte Flüssigkeit durch die Membran in die Detektorzelle.

es den auf der Detektorseite saugenden Pumpen unmöglich machte, mit hoher Flussrate durch die Flusszelle zu saugen.

Daher wurde Blasenfilter (d) in Abb. 6.9 entwickelt, bei dem durch einen Kanal die Oberfläche zwischen Membran und segmentierter Flüssigkeit erhöht wurde. Damit konnte eine höhere Flussrate durch den EID als bei den übrigen Blasenfiltertypen erreicht werden. Dies jedoch auch nur für kurze Zeit, da die Nanoporen (200 und 20 nm) der *Anodisc*-Membran nach kurzer Zeit durch Partikel aus der Flüssigkeit blockiert wurden.

Die in Abb. 6.9 aufgeführten Filter mit Membranen arbeiteten gut, solange die chromatographische Trennung isokratisch durchgeführt wurde (Abb. 6.11). Mit Hilfe der hohen Segmentierungsfrequenz von 5 Hz gelang es, die chromatographische Auflösung im EID nahezu zu erhalten.

Im Fall eines Lösungsmittelgradienten war es jedoch nicht möglich, die Drücke und Flussraten im fluidischen System so einzustellen, dass keine Blasen durch den Filter durchbrachen. Durch den variierenden Anteil an Methanol in der mobilen Phase veränderten sich die Viskosität und die Oberflächenspannung der segmentierten Flüssigkeit. Die Durchflussdrücke für Gas bzw. Flüssigkeit in den Kanälen des Blasenfilters änderten sich daher im Verlauf des Gradienten. Dies führte dazu, dass immer wieder Gasblasen unkontrolliert in die Detektorzelle gelangten, was zu einem positiven Signalausschlag im EID führte (Abb. 6.12, oben). Trotzdem konnte der EID gekoppelt an eine Gradiententrennung betrieben werden. In Abb. 6.12 ist die Trennung eines Gemisches von fünf Insektiziden (zwei Carbamate, zwei Organophosphate und ein Phosphorthionat) gezeigt.

Neben den störenden Effekten bei einer Gradiententrennung war auch die geringe Flussrate von maximal 10% des segmentierten Flusses, der durch die De-

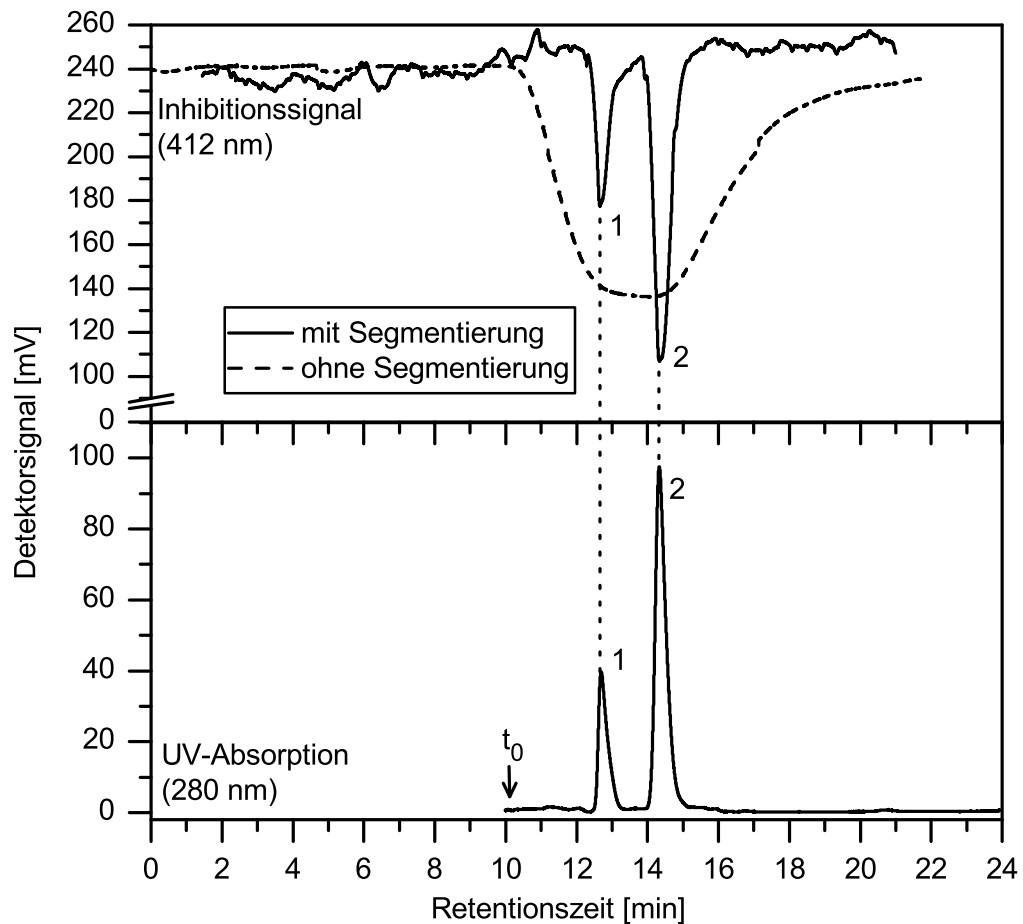


Abb. 6.11: Ein Gemisch zweier Insektizide (1: Carbofuran, 2: Paraoxon-ethyl) wurde isokratisch über eine RP-Säule aufgetrennt. Die Absorption wurde mit einem UV-Detektor aufgezeichnet (Chromatogramm unten, dargestellt mit einem Offset von 10 min). Ohne Segmentierung erfolgte im EID durch den laminaren Fluss eine Rückvermischung der Analyten. Es konnte nur ein Inhibitionssignal erfasst werden (Chromatogramm oben, gestrichelte Linie). Mit Segmentierung konnten die Inhibitionssignale mit guter Auflösung detektiert werden (Chromatogramm oben, durchgezogene Linie).

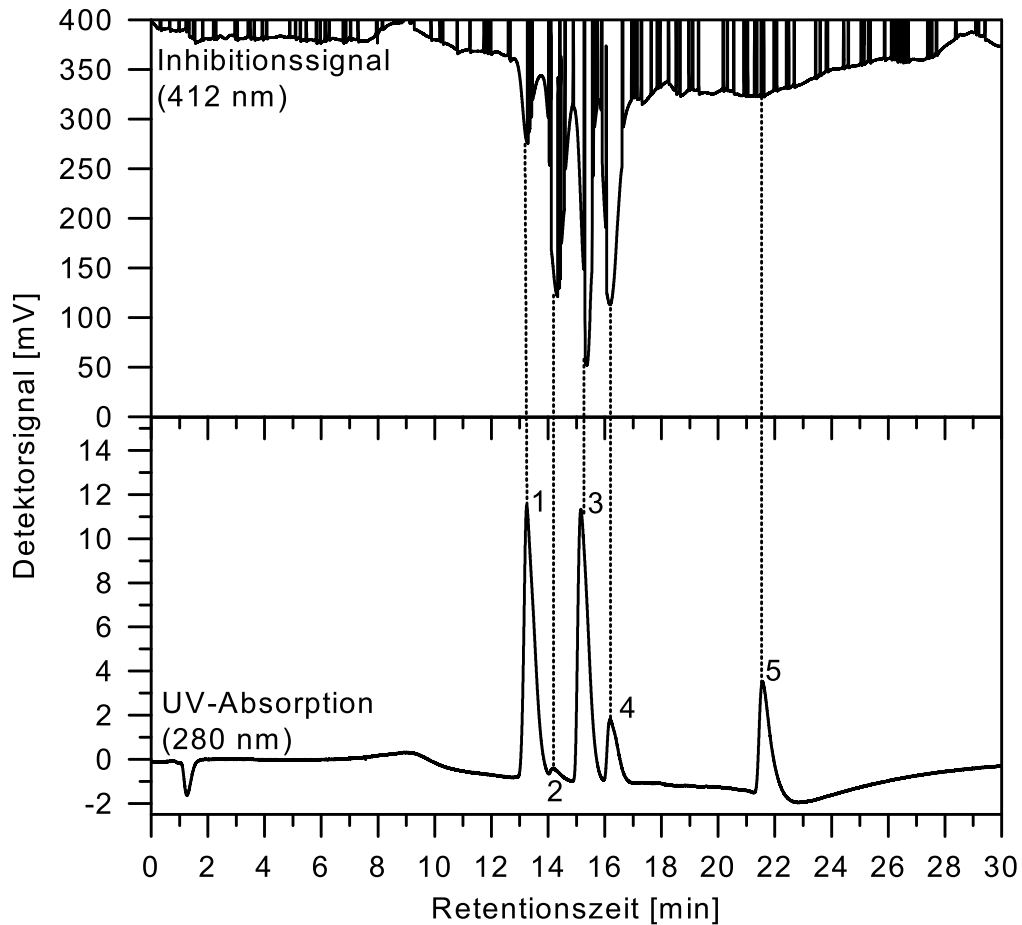


Abb. 6.12: Eine Mischung von Pirimicarb (1), Dichlorvos (2), Carbaryl (3), Paraoxon-ethyl (4) und Chlorpyrifos-methyl (5) wurde mit einem Wasser/Methanol-Gradienten aufgetrennt. Obwohl die Abtrennung der Flüssigkeit und der Luftblasen nicht komplett erfolgte, konnte ein zuverlässiges Inhibitionssignal erfasst werden (Chromatogramm oben, dargestellt mit einem Offset von -7.7 min). Nicht abgetrennte Blasen, die durch die Detektorzelle flossen, verursachten die positiven Signalausschläge (oben).

tektorzelle des EIDs gesaugt werden konnte, ein Ansatzpunkt für weitere Verbesserungen. Eine höhere Flussrate durch die Flusszelle erhöht die Auflösung und Empfindlichkeit der Detektion.

Im weiteren Verlauf der Experimente wurde eine Fluoreszenzmessung im wirkungsbezogenen Detektor etabliert. Im verwendeten Fluoreszenzdetektor der Firma Jasco hatte die kleinste verfügbare Flusszelle ein Volumen von 5 μL . Ungünstig an dieser Flusszelle war, dass in die Detektorzelle gelangte Luftblasen aufgrund der kantigen Zellgeometrie nicht mehr so leicht herausgespült werden konnten wie aus einer Kapillarflusszelle.

Hinzu kam, dass das Volumen der Zelle bei der mit Blasenfiltern erreichten Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ bei weitem zu groß war. Die Flusszelle würde pro Minute nur noch zweimal durchspült werden. Bei einer Halbwertsbreite des eluierten Peaks von ungefähr 0.3 min bedeutete dies, dass das Inhibitionssignal nur noch mit rechnerisch 0.6 Datenpunkten erfasst werden könnte, d.h. die Auflösung der Analytbanden würde alleine schon wegen der großvolumigen Detektorzelle verschlechtert werden. Einzige Lösung war die Erhöhung der Flussrate durch die Detektorzelle. Dazu wurde eine neue Methode, die Gasblasen abzutrennen entwickelt (Abb. 6.13). Die Gasblasen wurden dabei wieder mit Überdruck über eine Schlauchpumpe in das System eingespeist. Das Abtrennen der Blasen erfolgte durch ein offenes System, bei dem die Gasblasen in die Atmosphäre entweichen konnten. Dieser Blasenfilter ermöglichte eine Flussrate von 90 $\mu\text{L}/\text{min}$ durch den EID.

6.2 Online durchgeführte Wirkungsbezogene Analyse von Neurotoxinen

6.2.1 AChE-Inhibitionssignal

Für die Auswertung der Daten der Wirkungsbezogenen Analyse, die parallel mit SFEID, MS und PDA aufgenommen wurden (siehe Abb. 6.1 und Abb. 6.13), müssen die produzierten Chromatogramme zeitlich übereinander gelegt werden.

In Abb. 6.14 ist die Trennung eines Gemisches von acht Insektiziden gezeigt, die mit einer Konzentration von jeweils 20 mg/L in Wasser vorlagen. Um die zeitliche Verschiebung des Enzyminhibitionssignals zu den anderen Detektoren aufgrund der Reaktionszeit zu korrigieren, wurde zusätzlich zu dem Insektizidgemisch der AChE-Inhibitor Galantamin zum Trennungsgemisch dazu gegeben. Galantamin (1) wurde bei den gegebenen chromatographischen Bedingungen (siehe Teil V 12.1) nicht auf der Säule retardiert und eluierte im Totvolumen. Die Differenz der Retentionszeit von Galantamin im PDA und die Retentionszeit des ersten Inhibitionssignals zeigte den Zeitabstand von PDA zu SFEID an. Um diesen Offset wurde die Zeitachse der Chromatogramme korrigiert.

Bei dem gezeigten Chromatogramm aus Abb. 6.14 betrug die zeitliche Verschiebung 8.15 min. Ausgehend von der Länge der Reaktionskapillaren von 4 m für die Inhibition und 2 m für die Umsetzung des Substrats, betrug die Inhibitionszeit also ca. 5.4 min und die Zeit für Umsetzung des Substrats ca. 2.7 min.

Eine theoretische Berechnung der zeitlichen Verschiebung der Chromatogram-

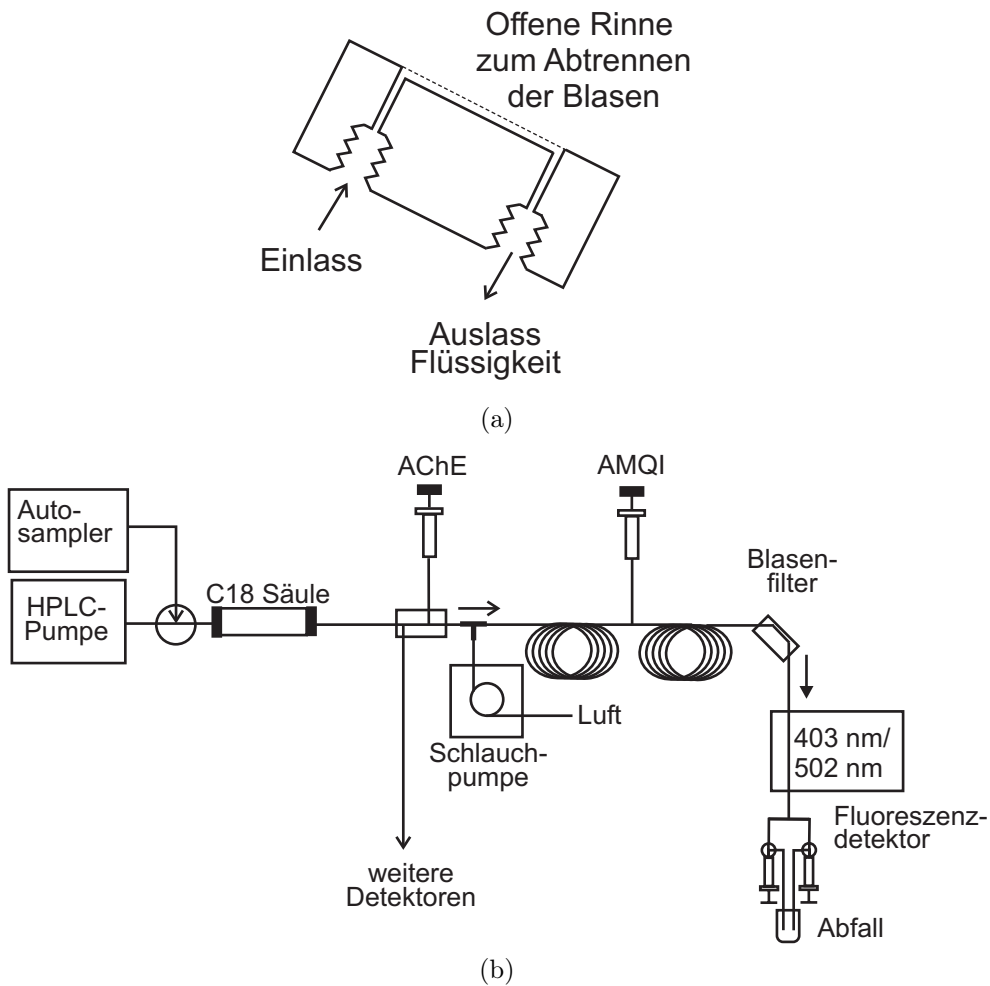


Abb. 6.13: Die optimierte Version des Blasenfilters (a) im Aufbau des SFEID (*Segmented Flow Enzyme Inhibition Detector*, b): Der segmentierte Strom gelangt durch den Einlass in den Blasenfilter und passiert eine offene Rinne, aus der die Gasblasen entweichen können. Am Ende der Rinne wird die Flüssigkeit mit Pumpen durch die Durchflusszelle des EIDs gesaugt. Das Aufstellen des Blasenfilters im 45°-Winkel erleichtert die Trennung der Gas- und Flüssigkeitsphase.

Tabelle 6.1: Retentionszeit t_{Ret} und Halbwertsbreite $w_{1/2}$ der HPLC-SFEID-MS-PDA-Trennung aus Abb.6.14 in [min]

| | Analyt | PDA | | MS | | SFEID | |
|---|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | t_{Ret} | $w_{1/2}$ | t_{Ret} | $w_{1/2}$ | t_{Ret} | $w_{1/2}$ |
| 1 | Galantamin | 1.49 | 0.15 | 1.42 | 0.21 | 1.23 | 0.46 |
| 2 | Methomyl | 4.62 | 0.29 | 4.58 | 0.21 | 4.52 | 0.43 |
| 3 | Aldicarb | 8.93 | 0.20 | 8.90 | 0.35 | 0.03 | 0.32 |
| 4 | Dichlorvos | 10.75 | 0.21 | 10.72 | 0.23 | 10.91 | 0.54 |
| 5 | Carbaryl | 12.10 | 0.23 | 12.09 | 0.27 | 12.34 | 0.56 |
| 6 | Paraoxon | 13.78 | 0.24 | 13.79 | 0.27 | 14.11 | 0.47 |
| 7 | Malathion | 17.87 | 0.24 | 17.85 | 0.47 | – | – |
| 8 | Parathion | 20.32 | 0.25 | 20.32 | 0.27 | 20.06 | 0.39 |
| 9 | Chlorpyrifos | 25.08 | 0.20 | 25.13 | 0.32 | – | – |

me anhand der Flussrate und des Volumens der Reaktionskapillaren war unzureichend, da die Bestimmung der Fließgeschwindigkeit des gasegmentierten Stroms zu ungenau war.

Für die Auftrennung von komplexen Substanzgemischen, muss ein Chromatogramm eine möglichst hohe Auflösung haben. Die Halbwertsbreite der eluierenden Peaks muss daher möglichst gering gehalten werden. In Tab. 6.1 sind die Retentionszeiten t_{Ret} und Halbwertsbreiten $w_{1/2}$ für die verschiedenen Detektoren aus Abb. 6.14 aufgelistet.

Die experimentell bestimmten Halbwertsbreiten des PDA-Signals waren um durchschnittlich 50% geringer als die Halbwertsbreite des SFEID-Signals. Rechnerisch bedeutete dies zwar eine Halbierung der Peakkapazität, aber im Vergleich zum Verlust der Auflösung im EID im unsegmentierten Fluss (vgl. Abb. 6.11, Chromatogramm oben, gestrichelte Linie) stellte dieses Ergebnis eine erhebliche Verbesserung dar.

Der Verlust an Auflösung von PDA zu SFEID wird zum Teil durch die Dispersion in den Reaktionsschleifen verursacht, die trotz Segmentierung auftritt. Abhängig vom Material der Kapillaren und der Flüssigkeit wird die Oberfläche der Kapillaren in Form eines Fluidfilms benetzt (Abb. 2.2). Flüssigkeit eines Segments gelangte daher an die Kapillarwand und wurde von einem folgenden Segment wieder aufgenommen. Dieser Massentransfer von einem zum nächsten Segment führte daher neben dem Einfluss von Verbindungsstücken zu der beobachteten longitudinalen Dispersion.

Die Differenz der Retentionszeiten war nicht konstant. Vergleicht man die Differenz der Retentionszeiten von PDA und MS mit der Differenz der Retentionszeiten zwischen PDA und SFEID, so fällt auf, dass die mit den SFEID-Daten gebildeten Differenzen weiter streuen. Dies weist auf leichte Schwankungen in der Fließgeschwindigkeit im SFEID hin. Eine eindeutige Tendenz war jedoch nicht erkennbar. Die Chromatogramme waren trotzdem auswertbar.

Am Beispiel des Phosphoresters Dichlorvos wird der Vorteil der Wirkungsbezogenen Analyse offensichtlich, unbekanntes oder mit konventionellen Detektoren

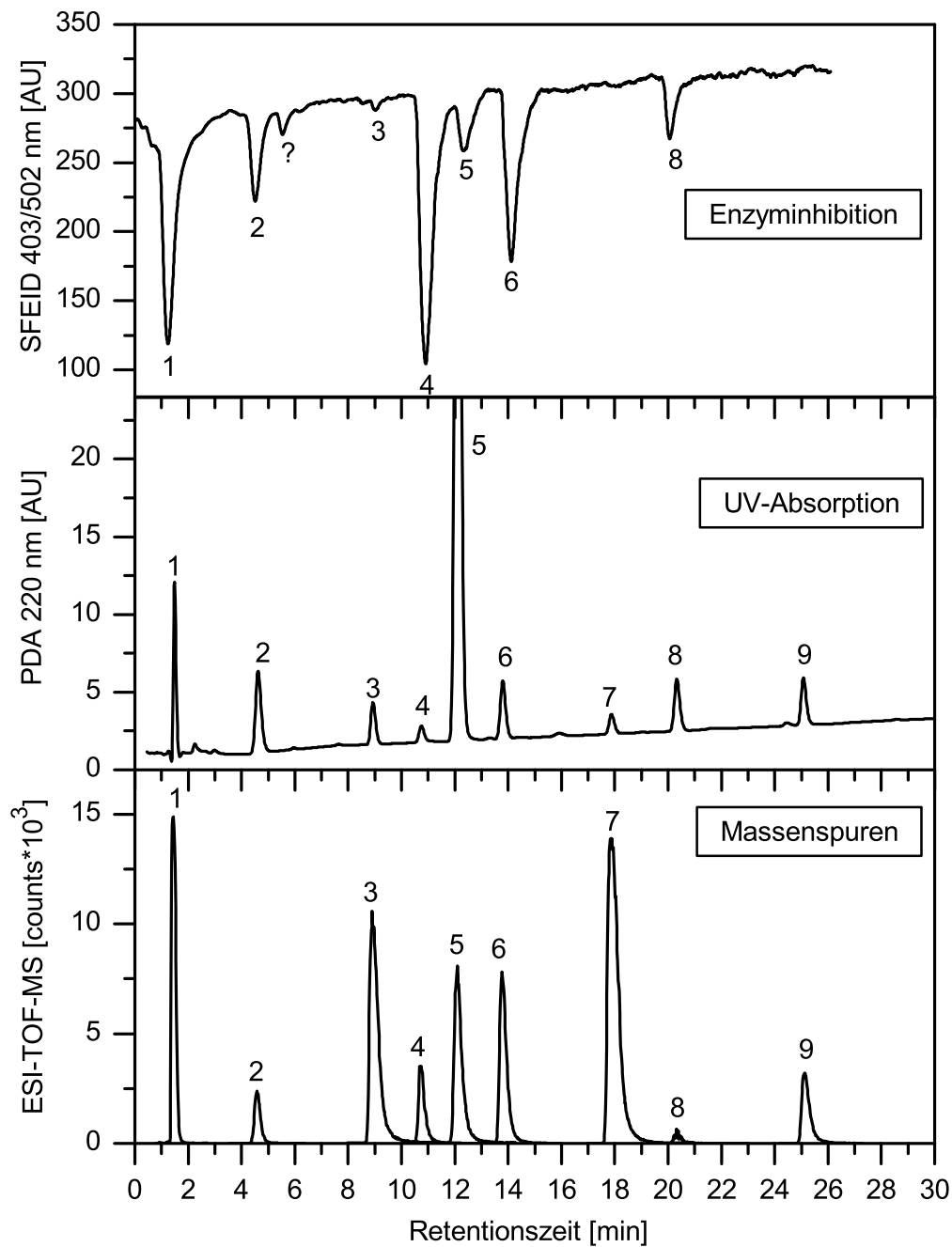


Abb. 6.14: Das Potential des wirkungsbezogenen Detektors demonstriert an einem komplexen Substanzgemisch. Mit einem Gradienten wurden Galantamin (1), Methomyl (2), Aldicarb (3), Dichlorvos (4), Carbaryl (5), Paraoxon (6), Malathion (7), Parathion (8) und Chlorpyrifos (9) auf einer C18-Säule getrennt. Parallel zu ihren inhibitorischen Effekten auf AChE (oben) wurden ihre UV-Absorption (220 nm, Mitte) und ihre Massenspuren (unten, siehe auch Tab. 6.2, Seite 136) aufgezeichnet. Die Anordnung des EIDs ist in Abb. 6.13 gezeigt.

schwer zu erfassende Substanzen durch ihre Wirkung zu bestimmen. Da Dichlorvos nur eine isolierte Doppelbindung hat (Struktur siehe Abb. 1.2), ist der Absorptionskoeffizient sehr niedrig, das Inhibitionssignal von Dichlorvos ist dagegen sehr deutlich zu detektieren (Abb. 6.14, Peak 4).

6.2.2 Quantifizierung

Zur Auswertung des Inhibitionssignals wird die Signalhöhe und nicht die Fläche des negativen Inhibitionspeaks herangezogen. Dies liegt zum einen an enzymkinetischen Überlegungen. Die Inhibition und der Substratumsatz durch das Enzym erfolgen nur bedingt einer Kinetik erster Ordnung. Sie sind auch abhängig von der Art des Inhibitors. Ein linearer Zusammenhang zwischen der Fläche des Signals und der Konzentration des Analyten trifft nur eingeschränkt zu. Aufgrund der Dispersion in den Kapillaren, die auch mit der Segmentierung nicht zu vermeiden ist, wird sich die Konzentration des von der HPLC-eluierenden Analyten gaußförmig um sein Konzentrationsmaximum verteilen. Aufgrund der Enzymkinetik kann man aber nicht davon ausgehen, dass sich das Inhibitionssignal ebenso durch ein inverses Gaußsignal darstellen lässt.

Zum anderen stören Segmentierungsblasen, die gelegentlich in die Detektorzelle gelangen, das Integral des Signals.

Daher war es zuverlässiger, das Inhibitionssignal anhand der Höhe auszuwerten. Ein weiterer Punkt, der für die Auswertung über die Signalhöhe spricht, war die Unzulänglichkeit der verfügbaren Chromatographie-Software, das Integral über negative Signalausschläge zu bilden.

Zur Quantifizierung des Inhibitionssignals musste zu Beginn der Messungen (täglich einmal) die Signalhöhe ($S_{Substrat}$) bestimmt werden, die durch die Umsetzung des Substrats ohne Anwesenheit von Enzym erzeugt wurde. Während anschließend die Enzymlösung gepumpt wurde, wurde die Höhe der Basislinie bestimmt (S_{Blank}). Die Differenz von S_{Blank} und $S_{Substrat}$ entsprach dementsprechend der 100%igen Aktivität des Enzyms. Die verbliebene Restaktivität des Enzyms wurde durch das Minimum des Inhibitionssignals ($S_{Inhibitor}$) nach Gleichung 6.1 ermittelt.

$$AktivitätAChE [\%] = \frac{S_{Inhibitor} - S_{Substrat}}{S_{Blank} - S_{Substrat}} \cdot 100 \quad (6.1)$$

Durch Injektion von jeweils 20 μ L Wasser, versetzt mit den in Abb. 6.14 aufgeführten Analytstandards in verschiedenen Konzentrationen, wurde die Nachweisgrenze der jeweiligen Detektoren bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 6.2 aufgeführt. Für Galantamin wurden jeweils keine Nachweisgrenzen bestimmt, da dieser Inhibitor auf der Säule nicht retardiert wurde und nur für die Totzeitkorrektur zwischen EID und den anderen Detektoren verwendet wurde (siehe Abschnitt 6.2.1).

In der Tab. 6.2 sind die m/z-Verhältnisse der stärksten Ionen der jeweiligen Analyten angegeben. Falls das Signal des Natrium-Addukts höher war als das der protonierte Masse, wurde das Signal des Natrium-Addukts zur Auswertung herangezogen.

Tabelle 6.2: Nachweisgrenzen für PDA, SFEID und MS (n.b.= nicht bestimmbar)

| Analyt | m/z | Ion | LOD [mg/L] | | | |
|----------------|-----|---------------------|------------|---------------------|------|-------|
| | | | PDA | (λ_{max}) | MS | SFEID |
| 1 Galantamin | 288 | [M+H] ⁺ | | n.b. | n.b. | n.b. |
| 2 Methomyl | 185 | [M+Na] ⁺ | 0.01 | (235 nm) | 0.2 | 3 |
| 3 Aldicarb | 213 | [M+Na] ⁺ | 0.5 | (245 nm) | 0.05 | 4 |
| 4 Dichlorvos | 221 | [M+H] ⁺ | 2 | (210 nm) | 0.05 | 0.2 |
| 5 Carbaryl | 224 | [M+Na] ⁺ | 0.02 | (280 nm) | 1 | 4 |
| 6 Paraoxon | 276 | [M+H] ⁺ | 0.02 | (276 nm) | 0.05 | 2 |
| 7 Malathion | 353 | [M+Na] ⁺ | 1 | (220 nm) | 0.05 | – |
| 8 Parathion | 292 | [M+H] ⁺ | 0.02 | (276 nm) | 0.1 | 5 |
| 9 Chlorpyrifos | 372 | [M+Na] ⁺ | 0.2 | (288 nm) | 0.1 | – |

Unter den Phosphorthionaten zeigte nur Parathion bei sehr hoher Konzentration ein Inhibitionssignal. Malathion und Chlorpyrifos zeigten dagegen kein Inhibitionssignal.

Die Nachweisgrenze wurde definiert als $S/N \geq 3$. Die Nachweisgrenzen der verschiedenen Detektoren unterscheiden sich deutlich. Die massenspektrometrische Bestimmung der Nachweisgrenze stellte nur eine Momentaufnahme dar, da mit Alterung der MCP-Detektorplatte des Geräts gleichzeitig auch die Empfindlichkeit nachlässt (siehe Teil II, Abschnitt 3.1). Hinzu kommt, dass etwaige koelutierende Substanzen aufgrund von Ionensuppression das Signal des Analyten reduzieren könnten. Daher müsste (siehe auch Kapitel 8) immer eine Referenzsubstanz mit gleicher Ionisierungseffizienz parallel gemessen werden.

Die Nachweisgrenze des SFEID ist im Vergleich zu den anderen Detektoren –soweit überhaupt bestimmbar– bis auf die Ausnahme Dichlorvos jeweils am höchsten. Die Inhibitionszeit ist mit 5.43 min relativ kurz gewählt. Mit der Segmentierungstechnik wären auch längere Reaktionszeiten kein Problem, wenn geeignete Pumpen für eine kontinuierliche Förderung der benötigten Lösungen zur Verfügung stehen würden. Die andere Frage ist, ob es überhaupt sinnvoll ist, die Detektionszeit der Probe zu verlängern, um Nachweisgrenzen zu erniedrigen. Die Wirkungsbezogene Analyse zielt vor allem auf schnelle Ergebnisse über mögliche toxische Effekte ab. Es ist daher kein naheliegendes Ziel, einen wirkungsbezogenen Detektor zu konstruieren, der im Bereich der Nachweisgrenzen der Trinkwasserverordnung messen kann. Da man sich messtechnisch an einen erstrebenswerten Grenzwert von Null nur durch höhere Schwellenwerte annähern kann, wurden die Grenzwerte der Trinkwasserverordnung ohne toxikologische Bedeutung sehr niedrig gewählt. Eine Verbesserung der Nachweisgrenze wird deshalb besser durch Anreicherung der Probe erreicht (siehe Kapitel 7.1).

Ein Problem der unterschiedlichen Nachweisgrenzen der verschiedenen Detektoren ist dabei auch, dass die MCP-Platte im MS schnell Sättigung zeigt. Möglicherweise wird im SFEID erst ein Signal erfasst, während das Signal des Massenspektrometers schon gesättigt ist.

Zum Abschätzen der Leistungsfähigkeit des SFEID wurden exemplarisch Kali-

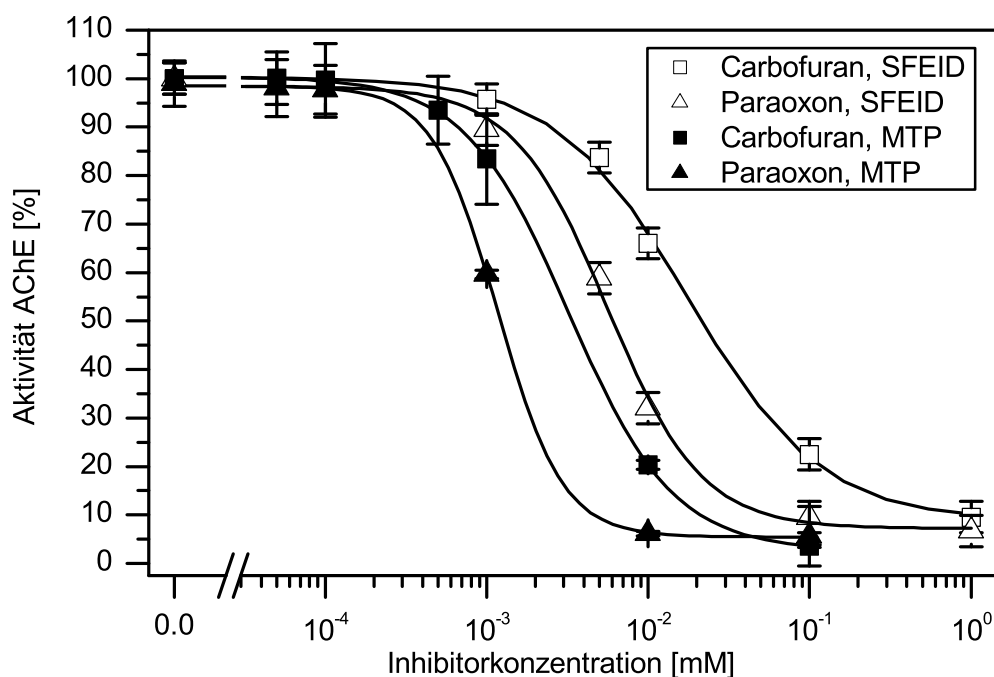


Abb. 6.15: Durch Auftragen verschiedener Insektizidkonzentrationen gegen die Restaktivität des Enzyms resultierte eine sigmoidale Kalibrierkurve. Die Messpunkte wurden mit dem segmentierten Enzyminhibitionsdetektor (SFEID) und auf der Mikrotiterplatte (MTP) ermittelt, wobei die Inhibitionszeit (5 min) und der Probenverdünnungsfaktor (Faktor 10) bei beiden Methoden identisch war. (Fehler: Standardabweichung, $n=3$ für Offline-Assay; Fehler $\leq 4\%$ für SFEID-Daten)

brierkurven zweier Insektizide mit dem SFEID erzeugt und mit Kalibrierkurven verglichen, die auf der Mikrotiterplatte generiert wurden. Die Messkurven des SFEID wurden durch die Injektion von Insektizidstandards verschiedener Konzentration nach einer isokratischen Trennung erstellt. Nach Gleichung 6.1 wurde die jeweilige verbliebene Restaktivität des Enzyms bestimmt und gegen die Konzentration des Inhibitors in der Probe aufgetragen. Die resultierenden Kurven konnten sigmoidal angepasst werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 6.15 im Vergleich zu Kalibrierkurven gezeigt, die bei vergleichbaren Inhibitionszeiten und theoretischen Verdünnungsfaktoren der Proben in der Mikrotiterplatte erstellt wurden.

Aus den Kalibrierkurven wurde die Nachweisgrenze (LOD) und der Wert für eine 50%ige Inhibition (IC_{50}) bestimmt (Tab. 6.3). Bezogen auf die injizierte Masse betrug die Nachweisgrenze ($S/N \geq 3$) mit dem SFEID für Carbofuran 13 ng und für Paraoxon 7 ng. Im Mikrotiterplattenassay wurde die Nachweisgrenze als Abnahme der Enzymaktivität um 20% definiert und betrug für Carbofuran 5 ng und für Paraoxon 3 ng. Die IC_{50} -Werte des HPLC-SFEID waren ungefähr fünfmal höher als die mit dem Mikrotiterplattenassay bestimmten Werte.

Ein Vergleich der effektiven Analytkonzentration mit und ohne Säule am Signalmaximum der UV-Absorption zeigte, dass Effekte innerhalb der Säule mit

Tabelle 6.3: LOD und IC₅₀-Werte für Carbofuran und Paraoxon-ethyl bestimmt auf der Mikrotiterplatte und mit dem segmentierten Enzyminhibitionsdetektor (SFEID) aus Abb. 6.15

| | | Carbofuran | | | Paraoxon-ethyl | | |
|------------------|--------------------|------------|-----|------|----------------|------|------|
| | | ng | μM | mg/L | ng | μM | mg/L |
| LOD | SFEID | 13 | 3.0 | 0.66 | 7.4 | 1.3 | 0.36 |
| | MTP | 4.9 | 1.1 | 0.24 | 3.2 | 0.58 | 0.16 |
| IC ₅₀ | SFEID ^a | 79 | 18 | 3.9 | 31 | 5.6 | 1.5 |
| | MTP ^b | 14 | 32 | 0.72 | 6.4 | 1.2 | 0.32 |

Der Fehler des IC₅₀-Wertes bestimmt aus der Kalibrierkurve in Abb. 6.15 ist ^a14 % für Carbofuran und 9.7 % für Paraoxon, und ^b1.9 % für Carbofuran und 2.6 % für Paraoxon.

einem Faktor 2 zur Bandenverbreiterung beitragen. Daher konnte gefolgert werden, dass im SFEID eine Dispersion außerhalb der Säule durch die fluidischen Bauteile, wie Reaktionskapillaren und Verbindungsstücke verursacht wurde, die eine Verringerung der Empfindlichkeit des Detektors um einen Faktor 2–3 zur Folge hatten.

6.2.3 Wirkungsbezogene Analyse einer Cyanobakterienprobe und eines Reaktionsumsatzes mit dem SFEID

Die Leistungsfähigkeit des wirkungsbezogenen Detektors wurde bisher nur an Insektizidstandards gezeigt, die in deionisiertes Wasser gegeben worden waren. Im Folgenden werden die Messergebnisse verschiedener Proben gezeigt, die stellvertretend für kompliziertere Fragestellungen die Performance des SFEID zeigen sollen.

Anatoxin-a(S) ist ein von Cyanobakterien produzierter Phosphorester und als AChE-Inhibitor ein starkes Nervengift. Da es keine Absorption im UV hat, ist es schwer zu detektieren. Anatoxin-a(S) ist nicht als Reinsubstanz erhältlich. Das bedeutet, dass aufgrund fehlender Standardreagenzien eine analytische Bestimmung des Anatoxingehalts in der Probe schwierig ist.

Eine gefriergetrocknete Probe von Cyanobakterien der Gattung *Anabaena flos-aquae* wurde freundlicherweise von Dr. Peter Henriksen, National Environmental Research Institute, Roskilde, Dänemark, überlassen. Die Blaualgenprobe, die Anatoxin-a(S) in unbekannter Menge enthielt, wurde mit Methanol/Wasser im Ultraschallbad extrahiert. Der Überstand wurde mit den zwei Insektiziden Carbofuran und Paraoxon-ethyl versetzt, deren bekannte Retentionszeit ein Übereinanderlegen der Chromatogramme von UV- und Enzyminhibitionssignal ermöglichte. Die Probe wurde in die HPLC injiziert und auf einer C18-Säule getrennt.

Es wurde analog zu Abb. 6.1 die Enzyminhibition detektiert. Dabei wurde Blasenfilter b aus Abb. 6.9 verwendet. Zum Zeitpunkt dieser Messung wurde noch mit dem nicht ganz optimierten Aufbau mit Membranblasenfilter und Einspeisen der Gasblasen über Unterdruck gearbeitet. Daher sind im Chromatogramm des EIDs die positiven Signalausschläge von Luftblasen in der Detektorzelle zu sehen.

Mit dem UV-Detektor wurde eine mit dem Säulenvolumen eluierende Bande erfasst (Abb. 6.16, 1). Da Anatoxin-a(S) sehr hydrophil ist, wurde es an der Säule aus C18-Material nicht retardiert. Neben den Inhibitionssignalen von Carbofuran (2) und Paraoxon-ethyl (3) konnte nur ein zusätzliches Signal ermittelt werden. Dieser Inhibitionspeak musste dem Totvolumen der Säule zugeordnet werden. Da Anatoxin-a(S) unter diesen Bedingungen nicht chromatographiert wurde, konnte man in diesem Fall nicht von einer Wirkungsbezogenen Analyse sprechen, da unklar war, ob noch andere, mit dem Totvolumen eluierende Substanzen, wie z.B. Ionen, für die Inhibition verantwortlich waren. Es gelang jedoch nicht, mit alternativen Säulenmaterialien, wie z.B. der auf Kohlenstoff basierenden Hypercarb-Säule der Firma Thermo, eine Methode zur Auftrennung des Anatoxin-a(S)-Extraktes zu entwickeln. In der Literatur wurde Anatoxin-a(S) meist durch Größenausschlusschromatographie abgetrennt und mit NMR-Messungen verifiziert [259]. Zum Zeitpunkt der Messung stand das Massenspektrometer als weiterer, Struktur aufklärender Detektor nicht zur Verfügung.

Phosphorthionate sind nur sehr schwache Inhibitoren der AChE, wie man den fehlenden Inhibitionssignalen für Malathion und Chlorpyrifos in Abb. 6.14 entnehmen kann. Im Organismus werden Phosphorthionate durch enzymatische Oxidation zu potenten Inhibitoren metabolisiert. Um im wirkungsbezogenen Detektor auch die Substanzklasse der Phosphorthionate zu berücksichtigen, ist eine Oxidation der Schwefelgruppe notwendig. In der Literatur sind verschiedene Möglichkeiten zur Oxidation beschrieben. Häufig wird eine chemische Oxidation mit N-Bromsuccinimid (NBS) durchgeführt [71, 72]. Überschüssiges Reagenz wird dabei vor Einsatz des Enzyms durch Ascorbinsäure beseitigt, um keine inhibitorischen Effekte auf das Enzym im Reaktionsvolumen zu haben. Das Abtrennen ist beim Einsatz des wirkungsbezogenen Detektors nicht notwendig, da das NBS vom Oxidationsansatz durch HPLC vor dem Kontakt mit dem Enzym abgetrennt wird.

Ein Gemisch der Phosphorthionate Parathion, Chlorpyrifos und Malathion wurde offline in einem Reaktionsgefäß mit N-Bromsuccinimid für 45 min im Ultraschallbad oxidiert. Anschließend wurde die Reaktionslösung ohne weitere Aufbereitung direkt in den wirkungsbezogenen Detektor injiziert. Das Signal der Enzyminhibition und die Massenspuren der beteiligten Phosphorthionate und der Oxidationsprodukte wurden parallel erfasst. Die resultierenden Chromatogramme sind in Abb. 6.17 dargestellt. Wo vorher im Chromatogramm des SFEIDs nur ein schwaches Inhibitionssignal des Parathions (Peak 5) zu sehen war, konnten nach der chemischen Oxidation drei deutliche Inhibitionssignale der oxidierten Phosphorthionate ausgemacht werden. Die Inhibitionsbanden korrelierten mit den Massenspuren von Malathion-oxon, Paraoxon und Chlorpyrifos-oxon. Die Massenspuren der Edukte zeigten aber auch, dass die Oxidation mit NBS selbst nach 45-minütiger Reaktionszeit nicht vollständig war. Daher wurden andere Möglichkeiten zur chemischen Oxidation getestet (siehe Kapitel 7.2).

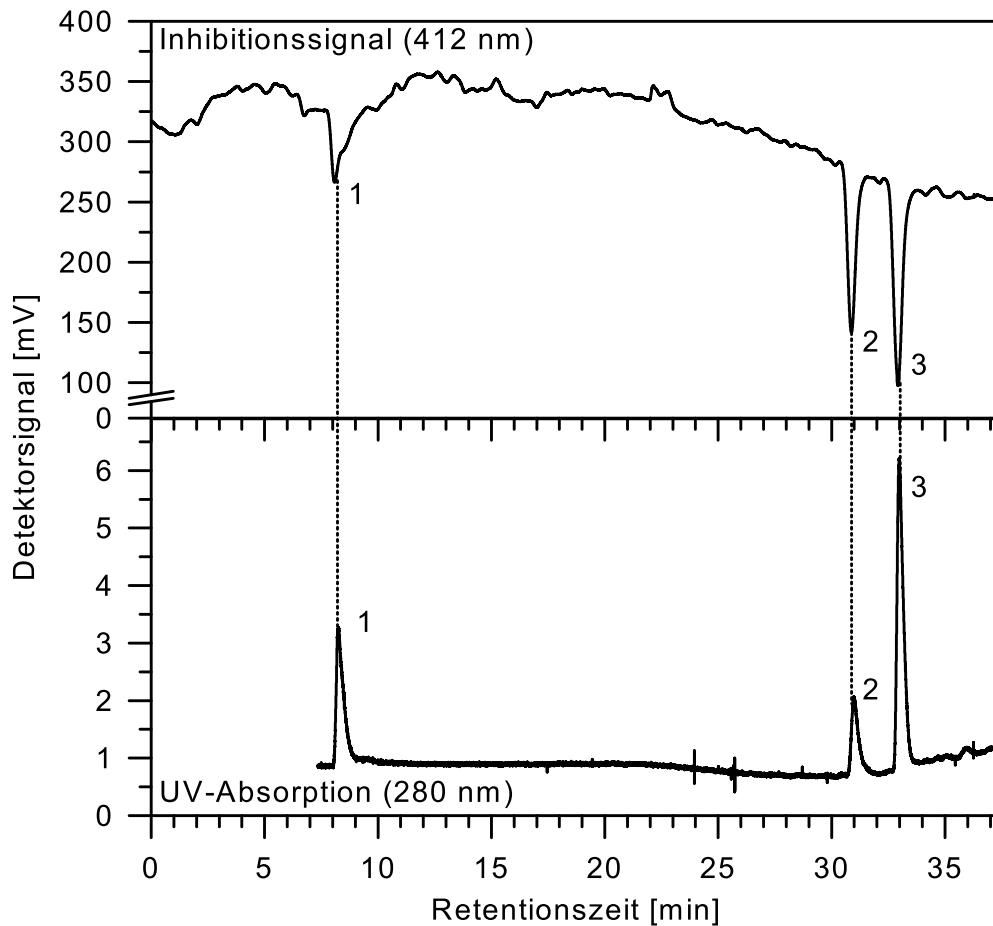


Abb. 6.16: Ein methanolischer Extrakt von *Anabaena flos-aquae* wurde mit Carbofuran (2) und Paraoxon-ethyl (3) dotiert. Im UV-Detektor wurde eine nicht retardierende Bande (1) erfasst, die eine inhibitorische Wirkung auf AChE zeigte. Da jedoch keine Retention an der C18-Säule stattgefunden hatte, konnte die Inhibition nicht mit Sicherheit dem Anatoxin-a(S) alleine zugeordnet werden. Das Massensignal wurde nicht aufgezeichnet.

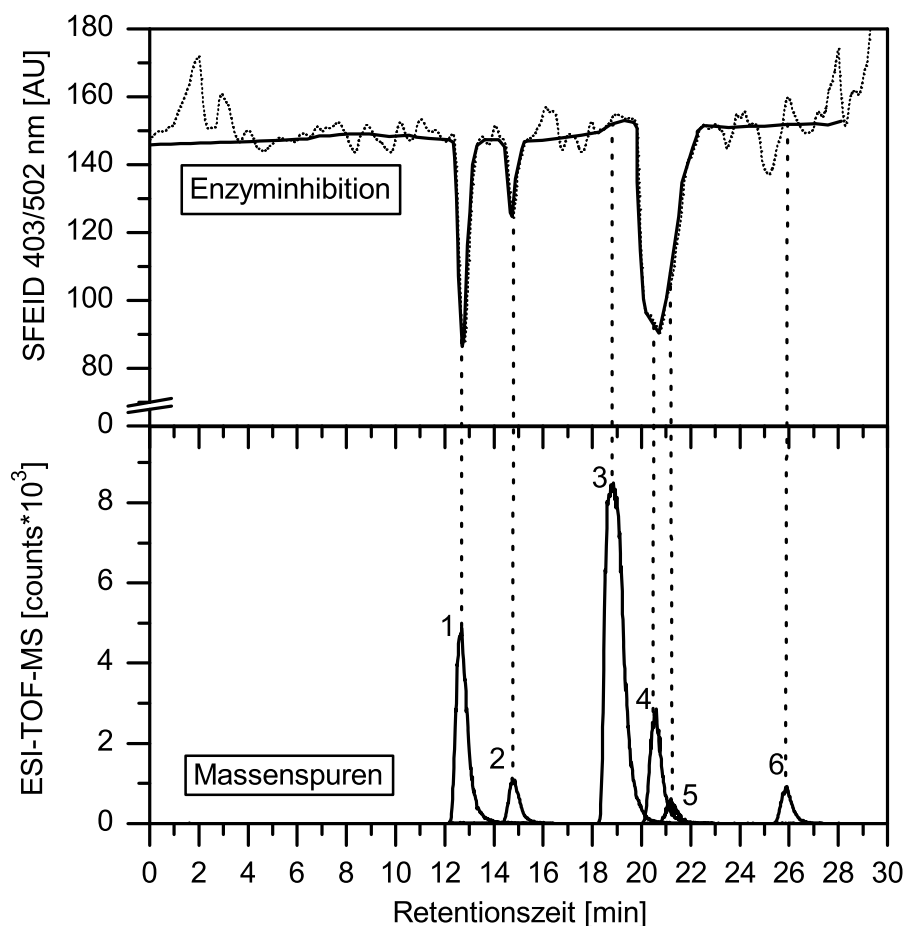


Abb. 6.17: Die Phosphorthionate Malathion, Parathion und Chlorpyrifos wurden offline mit NBS oxidiert. Anschließend wurde die Reaktionslösung wirkungsbezogen mit dem Aufbau aus Abb. 6.13 analysiert. Die Inhibitionssignale wurden anhand der Massenspuren identifiziert: Malathion-oxon (1, $m/z=337$), Paraoxon (2, $m/z=276$), Malathion (3, $m/z=353$), Chlorpyrifos-oxon (4, $m/z=356$), Parathion (5, $m/z=292$) und Chlorpyrifos (6, $m/z=372$). Das Enzyminhibitionssignal musste aufgrund des starken Rauschens geglättet werden. Die Rohdaten sind punktiert dargestellt (oben). Die Massenspuren der Edukte zeigen, dass die Oxidation nicht vollständig abgelaufen war. Die Inhibitionssignale konnten den Oxidationsprodukten zeitlich zugeordnet werden. Das Inhibitionssignal von Chlorpyrifos-oxon wurde vom leicht inhibitorischen Effekt des Edukts Parathion überlagert und hat daher eine etwas deformierte Form.

6.3 Zusammenfassung

Die Schwierigkeit in der Entwicklung eines wirkungsbezogenen Detektors mit einer online durchgeführten Enzyminhibition lag hauptsächlich darin, die chromatographische Auflösung während der Nachsäulenreaktion zu erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass eine geeignete Methode die Gassegmentierung war.

Mit dem SFEID konnte das Prinzip der Wirkungsbezogenen Analyse anhand der Hemmung von AChE zur Simulation eines neurotoxischen Effekts demonstriert werden. Bedauerlicherweise konnten nur mit Standard versetzte Trinkwasserproben gemessen werden, da keine Realproben mit zu erwartenden, neurotoxischen Kontaminanten zur Verfügung standen.

Anhand der Oxidation von Phosphorthionaten konnte gezeigt werden, dass mit dem SFEID deren Umsetzung zu Inhibitoren erfasst werden kann.

Die unterschiedlichen Nachweisgrenzen der eingesetzten Detektoren schränken das analytische Fenster der Wirkungsbezogenen Analyse ein, da nur wenn die Analyten in der Konzentration der Schnittmenge von MS, PDA und SFEID vorliegen, eine Analyse der drei Dimensionen Struktur, UV-Vis-Absorption und Effekt gemacht werden kann.

7 Vorsäulenexperimente für die Wirkungsbezogene Analyse

Die Nachweisgrenzen des SFEID lagen im Vergleich zu UV-Detektor und Massenspektrometer recht hoch. Liegen Probeninhaltsstoffe in niedrigen Konzentrationen vor, die einen toxischen Effekt verursachen, aber aufgrund der hohen Nachweisgrenze nicht erfassbar sind oder, die erst nach Metabolisierung einen inhibitorischen Effekt auf das Enzym des SFEID haben, so wird ein Vorsäulenschritt notwendig. Im Folgenden werden die Ergebnisse einer online durchgeführten Anreicherung und Oxidation einiger Insektizide in einem Vorsäulenschritt der Wirkungsbezogenen Analyse gezeigt.

7.1 Schnelle Online-Anreicherung von Insektiziden

Wie schon in Tab. 6.2 aufgeführt wurde, sind die Nachweisgrenzen der parallel messenden Detektoren sehr unterschiedlich. Während die konventionellen Detektoren wie PDA und MS Analyten in einem Konzentrationsbereich von wenigen $\mu\text{g/L}$ erfassen können, liegen die Nachweisgrenzen des EIDs im Bereich von mg/L . Um die Nachweisgrenze des EIDs ohne eine Verlängerung der Reaktionszeit zu verbessern, wurde eine Methode zur Online-Anreicherung der Insektizide entwickelt. Da die hohen Nachweisgrenzen des EIDs eine starke Anreicherung nötig machen, wurde ein rascher Anreicherungsfluss der Probe über das Anreicherungs-material angestrebt, um die gesamte Analysenzeit möglichst kurz zu halten. Die Ventilschaltung zur Anreicherung ist schematisch in Abb. 7.1 dargestellt. Damit die Peakverbreiterung der Analyten durch das Totvolumen der Anreicherungsschaltung gering ausfällt, wurde die Flussrate der mobilen Phase von den in früheren Experimenten eingestellten $200 \mu\text{L/min}$ auf $500 \mu\text{L/min}$ erhöht.

Die für die Anreicherung verwendete Vorsäule und die Kartuschen verschiedener Hersteller sind in Tab. 7.1 aufgeführt. Das Anreicherungs-material sollte eine gute Wiederfindung sowohl von hydrophilen als auch von hydrophoben Analyten aufweisen. Zudem sollten die Analyten als schmale Banden eluiert werden können.

Bei der Kartusche mit dem Material PLRP eluierten die Analyten zwar bis auf eine Ausnahme als eine einzige Bande, jedoch eluierten sie nicht zeitlich getrennt und teilweise mit einer erheblichen Peakbreite (Abb. 7.2, a). Bei der Kartusche mit dem Material Resin GP eluierten die Analyten nicht als einzelne Bande, sondern es wurden bis auf eine Ausnahme jeweils zwei Banden erfasst (Abb. 7.2, b). Der Zusatz HLB der Oasis Kartusche steht für *Hydrophilic Lipophilic Balance* und sollte daher für eine gute Wiederfindung eines großen Analytbereichs ge-

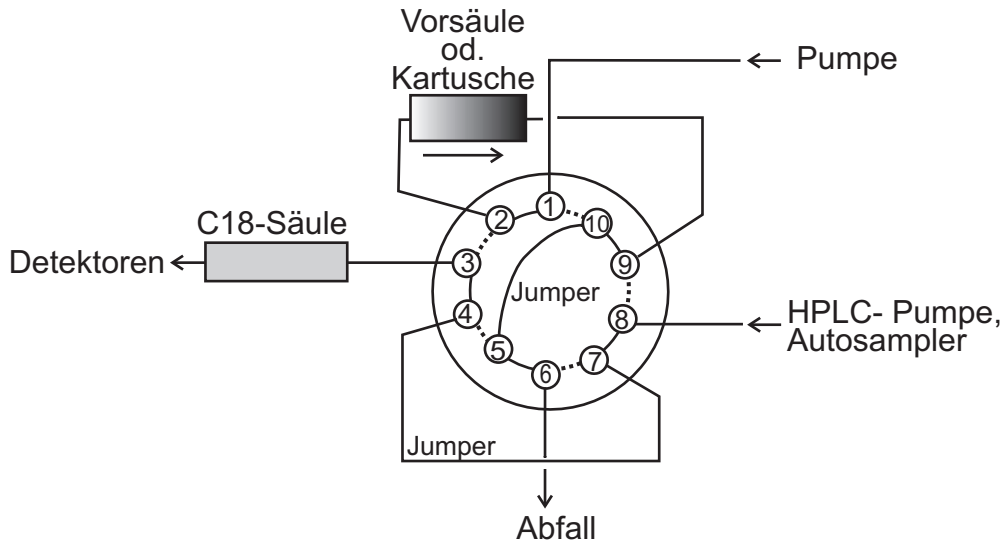


Abb. 7.1: Schema für die Anreicherung und Oxidation von Insektiziden

Tabelle 7.1: Verwendete Kartuschen bzw. Vorsäule für eine Online-SPE von Insektiziden für die Kombination mit dem wirkungsbezogenen Detektor

| | PLRP Kartusche | Resin GP Kartusche | Oasis HLB Kartusche | Onyx Vorsäule |
|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|---|---------------------------------|
| Hersteller | Spark Holland | Spark Holland | Waters | Phenomenex |
| Dimension | 10 x 2 mm | 10 x 2 mm | 10 x 2 mm | 5 x 4.6 mm |
| Material | Polystyrol-di- vinylbenzol | Polydivinyl- benzol | Polydivinyl- benzol-co-N- vinylpyrrolidon | C18, monolithi- sches Silica |
| Anreicherungs- flussrate | 15 mL/min | 8 mL/min | 15 mL/min | 15 mL/min |
| Partikelgröße | 15-25 μm | 5-15 μm | 30 μm | – |
| Porengröße | 100 Å | 100 Å | 80 Å | 2 μm , 130 Å |

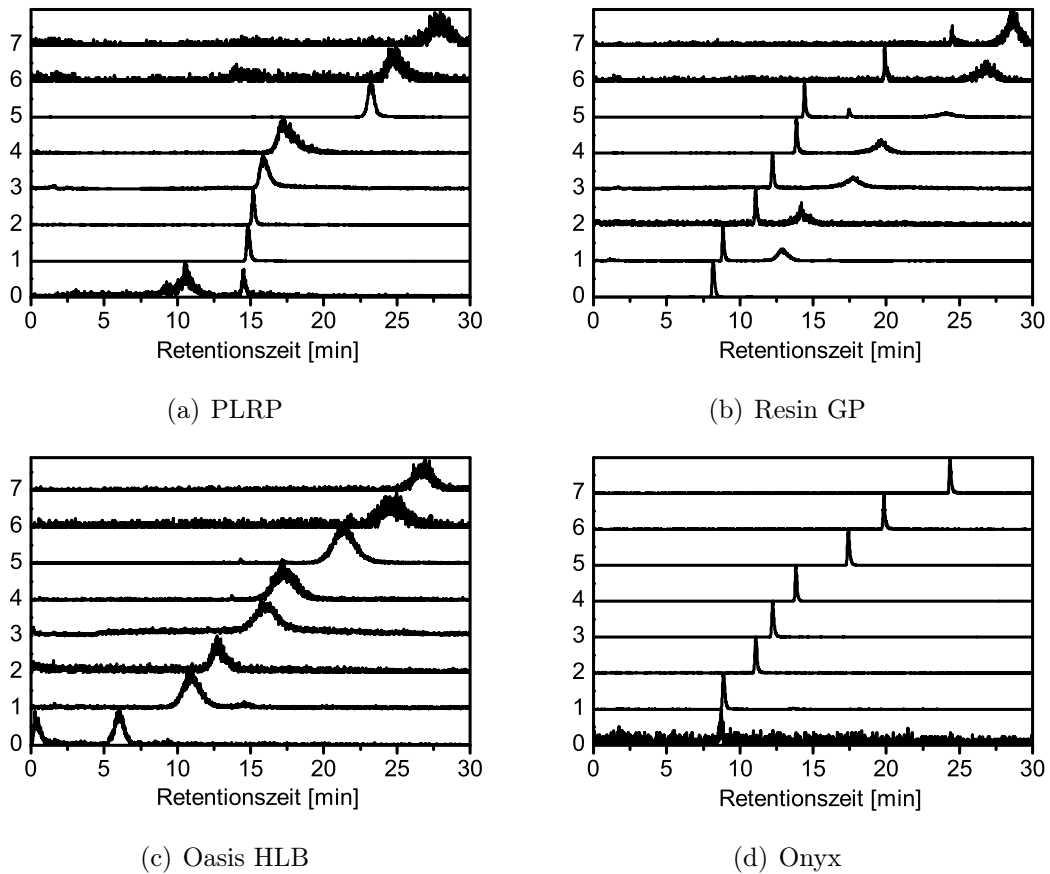


Abb. 7.2: Die Kartuschen (a) bis (c) sowie die Vorsäule (d) wurden im Flusschema aus Abb. 7.1 verwendet, um jeweils 10 mL einer wässrigen Mischung aus acht Insektiziden (jeweils 10 $\mu\text{g/L}$) anzureichern. Die Analyten wurden durch ihre Massenspuren detektiert: Methomyl (0, $m/z=185$), Aldicarb (2, $m/z=213$), Dichlorvos (1, $m/z=243$), Carbaryl (3, $m/z=224$), Paraoxon (4, $m/z=298$), Malathion (5, $m/z=353$), Parathion (6, $m/z=292$) und Chlorpyrifos (1, $m/z=372$).

eignet sein. Die Analyten konnten getrennt voneinander eluiert werden, hatten aber sehr breite Elutionsprofile (Abb. 7.2, c). Diese breiten Elutionsprofile sind ungeeignet als Ausgangsauflösung für den EID, bei dem ohnehin eine Bandenverbreiterung aufgrund der Nachsäulenreaktion dazu kommt. Die beste Elution wurde durch Anreichern der Insektizide auf der monolithischen Vorsäule Onyx (Abb. 7.2, d) erhalten, die aus demselben Material wie die Trennsäule bestand. Nur das hydrophilste Insektizid Methomyl konnte auf der Vorsäule nicht angereichert werden.

Die Wiederfindung einiger Insektizide nach Anreicherung auf der Onyx-Vorsäule wurde bestimmt (Tab. 7.2). Verschiedene Trinkwasservolumina versetzt mit unterschiedlichen Konzentrationen an Insektiziden wurden über die Vorsäule gepumpt. Eine Menge von theoretisch 100 ng pro Insektizid wurde jeweils angereichert. Die Quantifizierung erfolgte über die Fläche des PDA-Signals bei der

Tabelle 7.2: Auf der Onyx-Vorsäule wurden verschiedene Volumina wässriger Insektizidgemische jeweils mit einer Flussrate von 15 ml/min angereichert und über das PDA-Signal die Wiederfindung bestimmt. In Klammern ist die Konzentration für jedes im Gemisch enthaltene Insektizid angegeben.

| Insektizid | Anreicherungs volumen (Konzentration) | | | |
|--------------|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | 100 mL (1 $\mu\text{g/L}$) | 50 mL (2 $\mu\text{g/L}$) | 20 mL (5 $\mu\text{g/L}$) | 10 mL (10 $\mu\text{g/L}$) |
| Methomyl | – | – | – | – |
| Aldicarb | 9.0% | 15% | 46% | 85% |
| Dichlorvos | 39% | 48% | 107% | 115% |
| Carbaryl | 95% | 106% | 104% | 107% |
| Paraoxon | 99% | 101% | 98% | 102% |
| Malathion | 112% | 113% | 108% | 108% |
| Parathion | 108% | 111% | 112% | 115% |
| Chlorpyrifos | 112% | 105% | 105% | 107% |

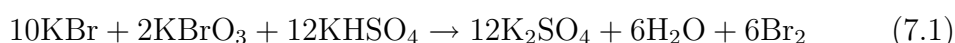
jeweiligen maximalen Absorptionswellenlänge. Wie erwähnt, konnte Methomyl unter den gewählten Bedingungen nicht angereichert werden. Geringere Volumina sorgten für eine bessere Wiederfindung der Insektizide Aldicarb und Dichlorvos, die bei größeren Volumina durchbrachen. Für die restlichen Insektizide war die Wiederfindung unabhängig vom Anreicherungs volumen sehr gut.

Die Bedeutung dieser schnellen Anreicherung soll im folgenden Beispiel verdeutlicht werden. Für Paraoxon wurde mit dem SFEID eine Nachweisgrenze von 2 mg/L, bezogen auf ein Injektionsvolumen von 20 μL bestimmt (Tab. 6.2). Dies entspricht einer absoluten injizierten Menge von 40 ng. Liegt eine Probenlösung mit einer Paraoxonkonzentration von 1 $\mu\text{g/L}$ vor, so müssten 40 mL der Lösung über die Vorsäule angereichert werden, um mit dem SFEID einen Nachweis führen zu können. Da das monolithische Säulenmaterial nur einen geringen Rückdruck aufbaut, kann die Probenlösung mit einer Flussrate von 15 mL/min befördert werden. Die benötigte Zeit für eine Anreicherung des Insektizids würde somit nur 2.7 min betragen. Wird die Anreicherung während der Äquilibration der Säule durchgeführt, so hat man keinen Zeitverlust in der Analyse zu verzeichnen.

7.2 Online-Oxidation von Phosphorthionaten

Die Chromatogramme einer offline durchgeführten Oxidation von Phosphorthionaten mit NBS zu ihren Enzyme hemmenden Derivaten wurden schon in Abb. 6.17 gezeigt. Die chemische Oxidation war nicht vollständig, da die Massenspuren der Edukte nach der Reaktion immer noch nachgewiesen werden konnten. Eine Oxidationsmethode, die vollständig abläuft und online durchführbar ist, wurde daher gesucht.

Eine andere chemische Oxidationsmethode verwendet Brom [71]. Kaliumbromid- und Kaliumbromatlösung bilden mit Kaliumhydrogensulfatlösung nach Gleichung 7.1 eine wässrige Bromlösung.



Für einen Einsatz in der Wirkungsbezogenen Analyse sollte die Oxidation möglichst rasch erfolgen. Da der Anreicherungsschritt schon in das System eingebaut war, wurde nun auch die Oxidation in einer Online-Form integriert. Wie im Abschnitt 7.1 beschrieben, wurden die Insektizide auf einer Onyx-Vorsäule angereichert. Nach der Anreicherung wurden 10 mL einer 0.05%igen Bromwasserlösung mit einer Flussrate von 15 mL/min über die Vorsäule gepumpt. Anschließend wurde die Vorsäule nochmals mit 10 mL Reinstwasser gespült und dann das Ventil (Abb. 7.1) für die Elution der angereicherten Produkte geschaltet. In Abb. 7.3 sind die Chromatogramme des PDA-Detektors und der Massenspuren der Edukte und Produkte ohne und mit Oxidationsschritt nach der Anreicherung gegenübergestellt.

Das Volumen der Vorsäule betrug mit einem Durchmesser von 4.6 mm, einer Länge von 5 mm und einer Porosität von $\sim 80\%$ ungefähr $66 \mu\text{L}$. Die lineare Fließgeschwindigkeit betrug demnach $\sim 1.9 \text{ cm/s}$. Die Kontaktzeit zwischen Brom und angereicherter Probe betrug also nur $\sim 0.26 \text{ s}$. Trotzdem war die *On-column*-Oxidation mit Bromwasser im Gegensatz zur NBS-Oxidation quantitativ, wie man an den fehlenden Massenspuren der Edukte in Abb. 7.3, b entnehmen kann.

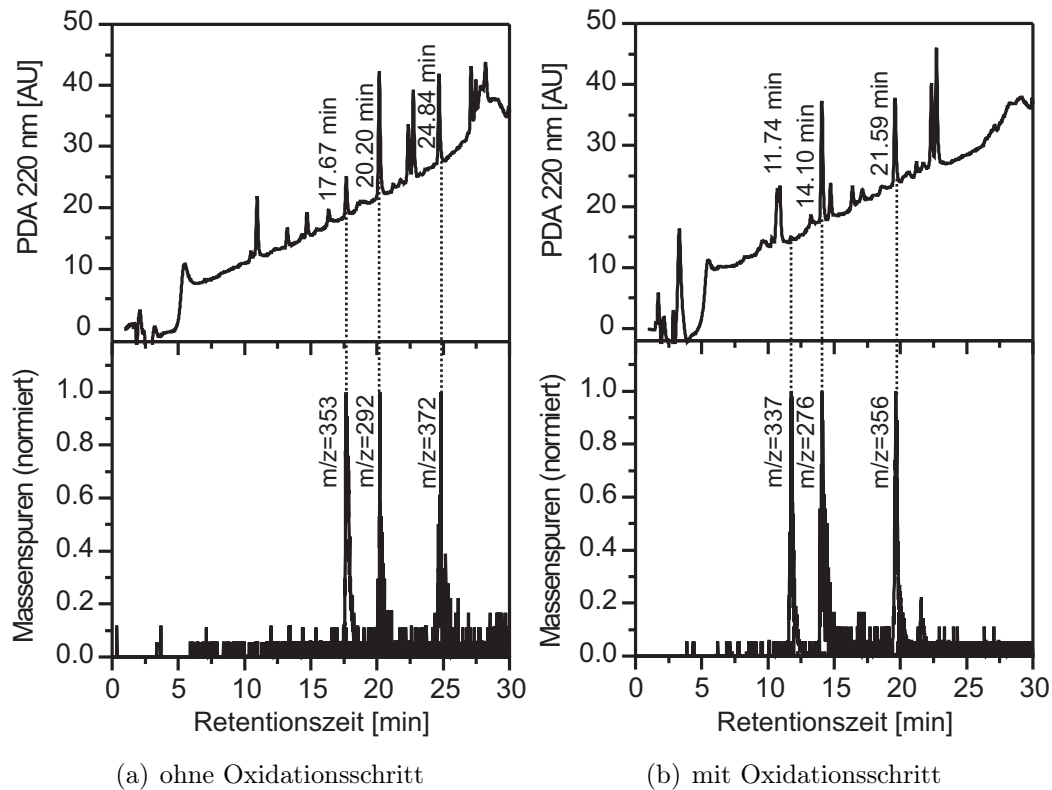


Abb. 7.3: Online-Oxidation von Phosphorhionaten mit Bromwasser. Trinkwasser wurde mit Malathion, Parathion und Chlorpyrifos versetzt (Konzentration für jedes Insektizid jeweils $10 \mu\text{g/L}$). 10 mL dieser Lösung wurden auf einer Onyx-Vorsäule angereichert. Die Analyten wurden (a) direkt nach der Anreicherung eluiert und (b) vor der Elution durch eine Reaktion auf der Vorsäule mit Bromwasser oxidiert. Es wurden jeweils die UV-Absorption und die Massenspuren der Edukte (Malathion $m/z=353$, Parathion $m/z=292$, Chlorpyrifos $m/z=372$) und die Massenspuren der Produkte (Malathion-oxon $m/z=337$, Paraoxon $m/z=276$, Chlorpyrifos-oxon $m/z=337$) aufgezeichnet. Ein Vergleich von (a) und (b) zeigt, dass die Oxidation trotz einer kurzen Kontaktzeit von Brom und Probe von 0.26 s vollständig verlaufen war.

8 Massenspektrometer als Enzyminhibitionsdetektor

Eine Enzymaktivitätsbestimmung mit einer massenspektrometrischen Detektion des Substratumsatzes hat im Vergleich zu optischen Methoden mehrere Vorteile.

Es können natürliche Substrate eingesetzt werden, die aufgrund einer besseren Enzymkinetik schneller umgesetzt werden und daher bei gleicher Reaktionszeit einen empfindlicheren Test erlauben sollten. Zudem wäre der Einsatz von natürlichen Substraten im Regelfall eine enorme Kostenersparnis, da nicht die aufwendig synthetisierten künstlichen Substrate, die meist nur in kleinen Mengen erhältlich sind, eingesetzt werden müssten. Letzteres wäre vor allem für den Ansatz eines wirkungsbezogenen Detektors mit einem homogenen Enzyminhibitionstest als Detektionseinheit vorteilhaft, da kontinuierlich Substratlösung zudosiert werden müsste.

Eine massenspektrometrische Detektion der Enzymaktivität könnte auch eine mehrdimensionale Wirkungsbezogene Analyse mit mehreren verschiedenen Enzymen als Targets vereinfachen. Würde man die Substrate so wählen, dass die m/z -Signale der Produkte sich nicht gegenseitig stören, so könnten die Enzymassays simultan in einem Reaktor durchgeführt werden.

Es wurden Versuche offline mit Acetylcholinesterase (AChE) und Angiotensin-konvertierendem Enzym (engl. *Angiotensin Converting Enzyme*, ACE) mit dem Ziel durchgeführt, einen online an HPLC gekoppelten, homogenen Enzyminhibitionsassay mit mehreren Enzymen zu entwickeln.

8.1 Substratumsatz durch Acetylcholinesterase

Als Substrat für die massenspektrometrische Detektion der AChE-Aktivität wurde das natürliche Substrat Acetylcholin eingesetzt, welches durch die AChE unter Abspaltung von Acetat zu Cholin hydrolysiert wird (siehe Abb. 8.1). Das Massensignal von Cholin wurde im ESI^+ -TOF-MS beobachtet (siehe Tab. 8.1).

Abhängig von Bestandteilen der Probenlösung schwankte bei konstanter Cholin-Konzentration die Ionisierungsrate. Um eine falsche Bestimmung des Substratumsatzes zu vermeiden, wurde als interner Standard an den Methylgruppen deuteriertes Cholin (Cholin- d_9) zum Reaktionsansatz zugegeben. Cholin- d_9 und Cholin haben eine ähnliche Ionisierungseffizienz. Durch Bestimmen des Verhältnisses der Intensitätssignale von Cholin und Cholin- d_9 konnte die relative Veränderung der Produktkonzentration mit der konstanten Konzentration des internen Standards als Referenz bestimmt werden.

Der AChE-Aktivitätstest sollte nach Offline-Optimierung neben der simultanen Messung der Aktivität von weiteren Enzymen online an eine HPLC gekoppelt

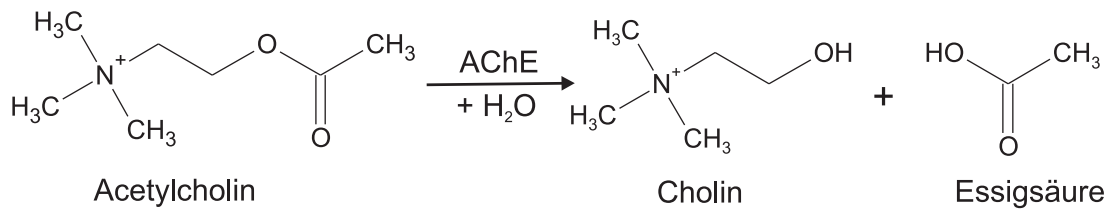


Abb. 8.1: Das Substrat Acetylcholin wird durch aktive AChE unter Abspaltung von Essigsäure zu Cholin hydrolysiert. Die Menge an umgesetzten Cholin pro Zeit wird mittels Massenspektrometer beobachtet und die Aktivität der AChE bestimmt.

Tabelle 8.1: Im AChE-Test auftretende monoisotopische Massen

| | Summenformel | Molmasse (monoisotopisch) positiv geladen |
|---------------------------------|---|---|
| Acetylcholin | C ₇ H ₁₆ NO ₂ | 146.1181 |
| Cholin | C ₅ H ₁₄ NO | 104.1075 |
| Cholin-trimethyl-d ₉ | C ₅ H ₅ D ₉ NO | 113.1639 |

werden. Bei der Entwicklung des Tests wurde versucht, so wenig Zudosierungsschritte wie möglich zu machen, da dies im online durchgeführten Test jeweils eine zusätzliche Pumpe erfordern würde. Die Zeit für die Inhibition und den Substratumsatz wurde mit jeweils 5 Minuten angesetzt, um mit dem SFEID vergleichbare Konditionen zu haben, die eine Umstellung des Offline-Assays auf eine Online-Durchführung erleichtern.

Für einen empfindlichen Inhibitionstest musste das umgesetzte Substrat in möglichst geringer Konzentration nachgewiesen werden können. Obwohl die Signale der Cholin-Lösungen in reinem Wasser höher waren, wurde die Nachweisgrenze für Cholin in Ammoniumbicarbonatpuffer (10 mM, pH 7.7) bestimmt, der für die Aktivität der AChE geeigneter ist. Die Nachweisgrenze für Cholin im ESI-TOF-MS wurde auf 50 nmol/L bestimmt ($S \geq 3N$). Der interne Standard wurde in den Folgeexperimenten jeweils mit einer Konzentration von 50 nmol/L zugesetzt. AChE, Acetylcholin und Cholin-d₉ wurden in Ammoniumbicarbonatpuffer (10 mM, pH 7.7) zusammen gegeben. Der Substratumsatz konnte anhand der Entwicklung des Produktpeaks von Cholin relativ zum Cholin-d₉-Signal beobachtet werden.

Die optimierte Konzentration der AChE wurde so gewählt, dass nach einer fünfminütigen Substratumsatzzeit das Signalverhältnis von Cholin und Cholin-d₉ ungefähr 1 betrug, d.h. ungefähr 50 nmol/L an Substrat umgesetzt worden ist. Würde das Verhältnis weit über 1 liegen, so wäre einerseits die Empfindlichkeit des Tests verschlechtert worden, da unnötig viel Enzym eingesetzt worden wäre. Andererseits könnte dann auch der Fall auftreten, dass eine relative Quantifizierung der Produktkonzentration mit dem internen Standard nicht mehr möglich wäre, da die Intensitäten aufgrund einer Übersättigung des MCP-Detektors nicht mehr in einem linearen Verhältnis zueinander stünden. Wäre das Verhält-

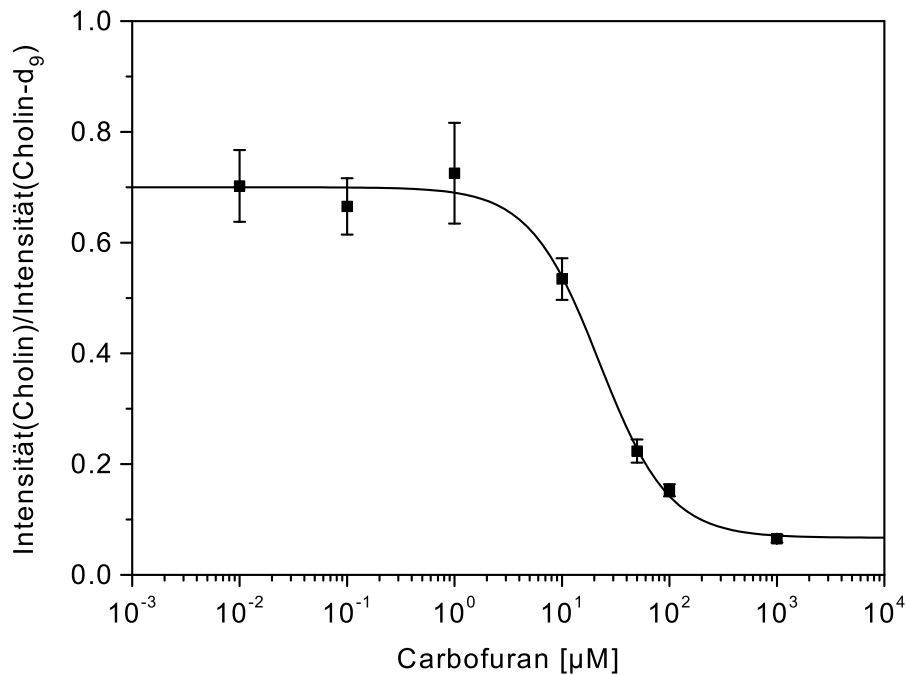


Abb. 8.2: Massenspektrometrisch bestimmte Inhibitionskurve von AChE. Aufgetragen sind die Konzentrationen des eingesetzten Carbofuranstandards gegen das Signalverhältnis von Substrat und Referenzsubstanz, das aus einem Massenspektrum (vgl. Abbildung 8.3) gewonnen wurde. Die Fehlerbalken resultieren aus der Standardabweichung der Intensitäten von fünf aufgenommenen Massenspektren. Der IC_{50} -Wert für Carbofuran beträgt $22.3 \pm 3.8 \mu\text{M}$ (4.93 mg/L, 148 ng).

nis viel kleiner als 1, so bestünde die Gefahr, dass das Produktsignal aufgrund von Signalrauschen und nicht aufgrund mangelnder Enzymaktivität nicht mehr nachgewiesen werden könnte.

Nach optimierten Testbedingungen konnte eine Inhibitionskurve der AChE aufgenommen werden (Abb. 8.2). Wässrige Lösungen des Insektizids Carbofuran verschiedener Konzentration wurden zu AChE und internem Standard gegeben. Nach einer Inhibitionszeit von 5 Minuten wurde das Substrat Cholin zugegeben. Nach einer Substratumsatzzeit von 5 Minuten wurde anschließend aus der Höhe der Signale von Cholin und Cholin-d₉ im Massenspektrum (Abb. 8.3) das Verhältnis in Abhängigkeit zur Inhibitorkonzentration gebildet.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der AChE-Aktivität anhand des verringerten Substratumsatzes durch Analyse im ESI-TOF-MS detektiert werden konnte. Der Test wurde offline in wässrigem Milieu durchgeführt. Auch ohne Zugabe von organischem Lösungsmittel waren die Intensitäten von Produkt und internem Standard hoch genug, um den Umsatz des Substrats empfindlich nachweisen zu können.

Eine Ionensuppression aufgrund der Zusammensetzung des Assays wurde nicht beobachtet. Die AChE benötigt jedoch keine aktivierenden Additive, die sich ansonsten häufig störend auf die Ionisierungseffizienz auswirken. Der mit dieser Methode bestimmte IC_{50} -Wert von $22.3 \mu\text{mol/L}$ stimmt gut mit den auf konventio-

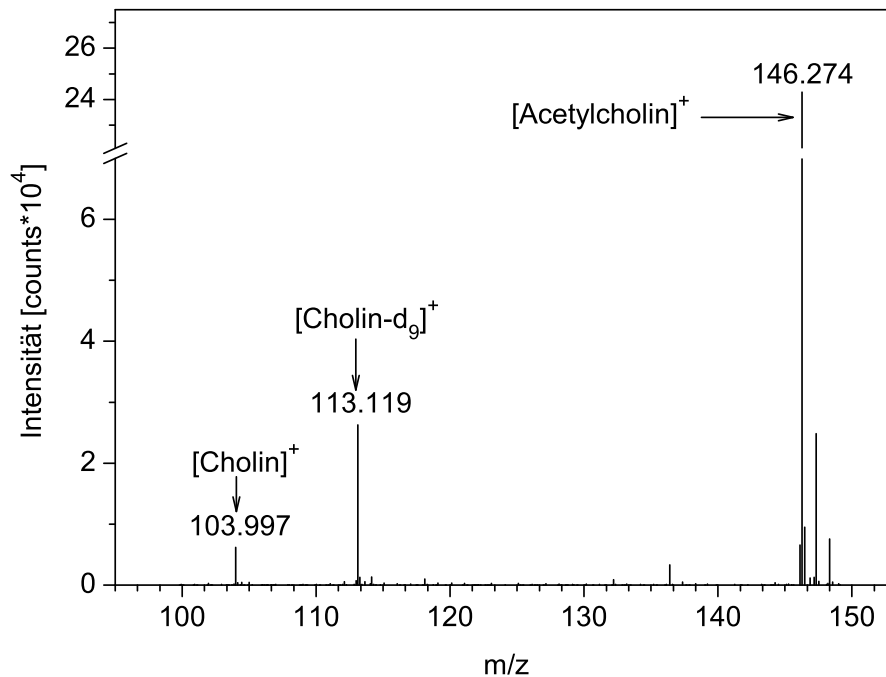


Abb. 8.3: Massenspektrum zur Bestimmung der AChE-Aktivität. Der Umsatz des Substrats Acetylcholin zu Cholin wird quantifiziert durch das Signal der Referenzsubstanz Cholin-d₉, dessen Konzentration konstant bleibt. Hier wurde ein Carbofuranstandard mit der Konzentration 50 $\mu\text{mol/L}$ eingesetzt.

nelle Art mit dem ELLMAN's Reagenz bestimmten Werten überein (vgl. Tab. 6.3).

Die Durchführung des Tests ist einfach auf ein Online-System gekoppelt an eine HPLC zu übertragen. Dabei würde mit der ersten Pumpe direkt am Säulenausgang Enzymlösung und interner Standard in Ammoniumbicarbonatpuffer zudosiert werden. Der Inhibitionsansatz müsste wie im SFEID eine Reaktionskapillare mit geeignetem Volumen für eine Inhibitionszeit von 5 Minuten passieren. Dann würde mit einer zweiten Pumpe die Cholinlösung befördert werden. Nachdem die Lösung eine Reaktionskapillare in weiteren 5 Minuten passiert hätte, würde die Reaktionsmischung direkt in das ESI-TOF-MS geleitet werden, um dort den Substratumsatz zu analysieren. Bei Auftragen der m/z-Spur von Cholin gegen die Zeit, würde man ein Chromatogramm mit negativen Banden im Fall der Elution von Inhibitoren von der Säule beobachten können.

Wird nur die AChE-Aktivität massenspektrometrisch detektiert, so hat man keine Vorteile gegenüber der optischen Detektion. Im Fall der AChE werden die künstlichen Substrate für die optische Detektion im Vergleich zum natürlichen Substrat nicht viel langsamer umgesetzt. Erst bei der simultanen Messung der Aktivitäten mehrerer verschiedener Enzyme würde der Vorteil einer massenspektrometrischen Detektion überwiegen. Daher wurde versucht, einen weiteren Enzymassay mit massenspektrometrischer Detektion zu etablieren.

8.2 Substratumsatz durch Angiotensin-konvertierendes Enzym

Das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE; EC 3.4.15.1) mit dem Synonym Peptidyl-dipeptidase A spielt eine Schlüsselrolle im Renin-Angiotensin-System von Säugetieren [260]. Das Enzym hydrolysiert Peptide unter der Abspaltung eines C-terminalen Dipeptids. ACE ist für die Aufrechterhaltung eines normalen Blutdrucks und des Elektrolytgleichgewichts verantwortlich. Zur Behandlung einer arteriellen Hypertonie werden sogenannte ACE-Hemmer wie Captopril und Lisinopril eingesetzt.

Als Substrat für die Detektion der ACE-Aktivität wird häufig Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin (HHL) verwendet. Unter Abspaltung von L-Histidyl-L-Leucin (His-Leu) entsteht Hippursäure (Abb. 8.4). Die Aktivität wird über die entstehende Hippursäure bestimmt. Laut Definition der Enzymaktivität setzt ein Unit der ACE pro Minute 1.0 μmol an Hippursäure bei pH 8.3 und 37°C frei. Da das Produkt keine anderen optischen Eigenschaften als das Substrat hat, müssen für eine Bestimmung der Produktkonzentration Hippursäure und HHL voneinander getrennt werden. Einerseits kann Hippursäure aus dem Enzymansatz in eine organische Phase extrahiert werden, oder Substrat und Produkt werden mit HPLC oder CE getrennt [261] und die Absorption der Hippursäure im UV gemessen.

Da diese Verfahren aufwendig sind und eine Umstellung auf eine Online-Detektion des Substratumsatzes nicht einfach zu realisieren ist, ist die Entwicklung eines massenspektrometrischen ACE-Inhibitionstests interessant. Ein einziger in der Literatur beschriebener, online durchgeführter ACE-Assay wurde mit einem fluoreszenzmarkierten Peptid als Substrat realisiert [53].

Die massenspektrometrische Aktivitätsbestimmung von ACE wurde ausgewählt, da ACE bei ähnlichen pH-Werten wie die AChE aktiv ist und keine Additive erfordert, die die Probenmatrix für die ESI-TOF-MS-Analyse komplizieren würden. ACE ist eine Metallopeptidase, da das aktive Zentrum Zn^{2+} bindet. Ohne weitere Zugabe von Zinkionen zeigt die ACE Aktivität.

Es wurde versucht, einen Aktivitätstest für ACE zu erstellen, indem der Substratumsatz anhand des entstehenden Massensignals von Hippursäure bestimmt werden sollte. Als interner Standard wurde das, der Hippursäure strukturell ähnliche Benzoyl-Alanin (Bz-Ala-OH) gewählt (Tab. 8.2). Interner Standard und Produkt unterscheiden sich nur durch eine Methylgruppe und sollten daher eine ähnliche Ionisierungseffizienz zeigen. Im Hinblick auf den Verbrauch an Substanz in einem Online-Enzymassay wurde auf einen isotonenmarkierten Standard verzichtet, um die laufenden Kosten niedrig zu halten.

An die Entwicklung des ACE-Test mit Detektion im ESI⁺-Modus wurde ähnlich herangegangen wie bei der Optimierung des AChE-Tests. Zuerst wurde die Detektion des internen Standards in Enzympuffer (Ammoniumbicarbonat, 10 mM, pH 8.0) optimiert. Anders als im Fall der Detektion von Cholin, welches schon eine positive Ladung trägt, musste zur Detektion der $[\text{Bz-Ala-OH}+\text{H}]^+$ -Masse Methanol zugesetzt werden. Bei einem Methanolgehalt von 50% in einer Bz-Ala-OH-Lösung mit der Konzentration 500 nmol/L ist das Signal im Vergleich zu einer Lösung ohne Methanol um mehr als das Fünffache stärker. Wurde der Lösung zusätzlich noch 0.1% (v/v) an Essigsäure zugegeben, so wurde die Intensität des

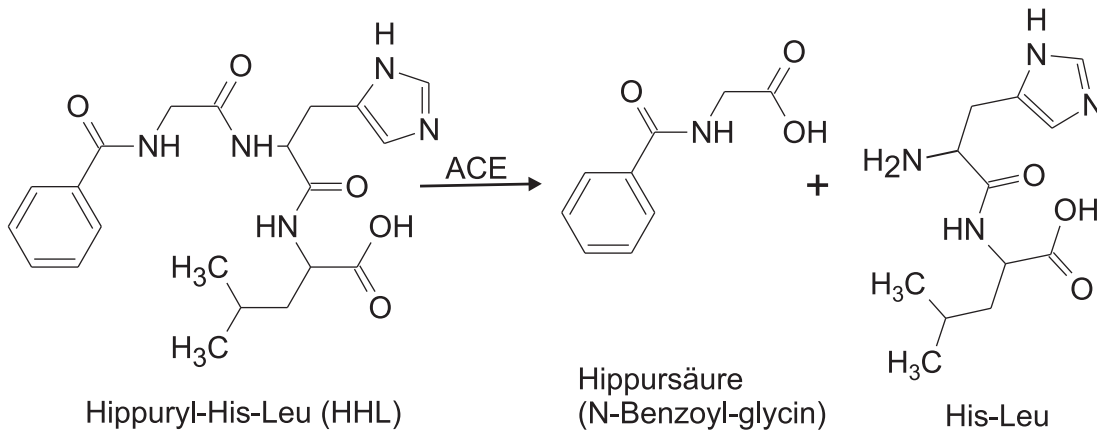


Abb. 8.4: ACE setzt das Substratpeptid Hippuryl-Histidyl-Leucin zu Hippursäure und dem Dipeptid Histidyl-Leucin um.

Tabelle 8.2: Im ACE-Test auftretende monoisotopische Massen

| | Summenformel | Molmasse (monoisotopisch) positiv geladen |
|------------------------|----------------------|---|
| Hippuryl-His-Leu (HHL) | $C_{21}H_{27}N_5O_5$ | 430.2090 |
| Hippursäure | $C_9H_9NO_3$ | 180.0661 |
| His-Leu | $C_{12}H_{20}N_4O_3$ | 269.1614 |
| Bz-Ala-OH | $C_{10}H_{11}NO_3$ | 194.0817 |

Signals zusätzlich verdoppelt. Die auf die Detektion von Bz-Ala-OH optimierten Parameter des MS sind in Tabelle 14.1 im Experimentellen Teil gezeigt.

Die Ionisierungseffizienz von Bz-Ala-OH wurde durch Substratlösung jedoch stark reduziert (Abb. 8.5). Bei gleichen Messbedingungen wurde die Intensität von Bz-Ala-OH bei der Anwesenheit von HHL aufgrund von Ionensuppression um 86% von 104 600 Counts auf 15 010 Counts reduziert.

Im Massenspektrum eines ACE-Assays mit Enzym, Substrat und internem Standard konnte aufgrund einer weiteren Verringerung der Ionisierungsrate weder das Massensignal des internen Standards, noch das Produktsignal der Hippursäure detektiert werden (Abb. 8.6, oben).

Das Signal des durch Substratumsatz ebenfalls entstehenden Produkts His-Leu bei $m/z=269$ wurde nur in Anwesenheit von ACE detektiert. Eine verlässliche Bestimmung der Aktivität des Enzyms über dieses Massensignal war jedoch nicht möglich, da kein Standard bekannter Konzentration und mit ähnlicher Ionisierungsrate eingesetzt wurde.

Eine Korrelation von Substratintensität und His-Leu-Intensität war nicht möglich, da die Ionisierungseffizienz zu unterschiedlich war und das Signal des Substrats den linearen Messbereich des MCP-Detektors überschritt.

Für die weitere Arbeit an der massenspektrometrischen Detektion der ACE-

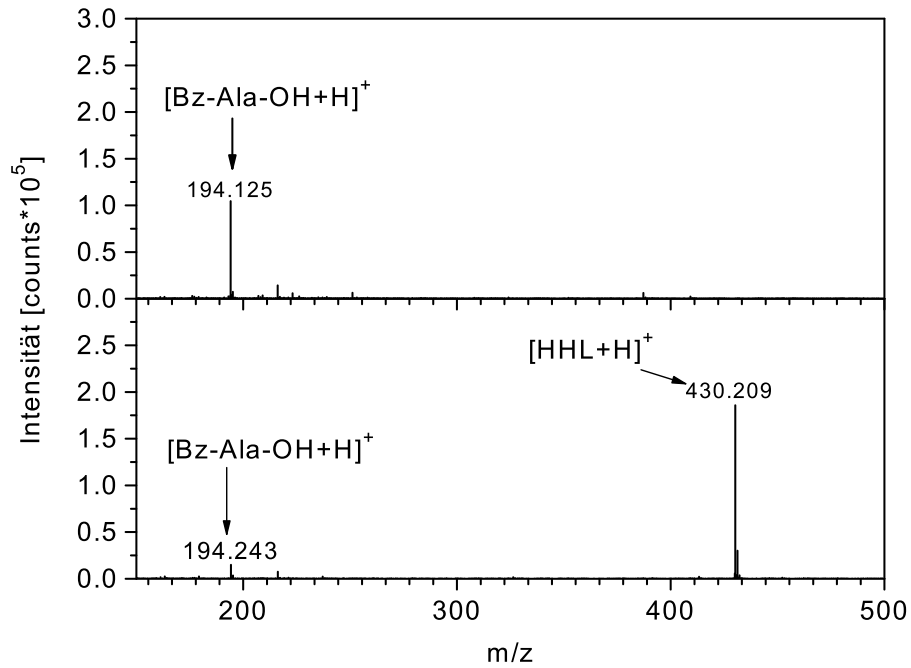


Abb. 8.5: Stark variierende Intensitäten des $[\text{Bz-Ala-OH+H}]^+$ -Signals. Oben: 50 μM Bz-Ala-OH in 50% MeOH, 0.1% Essigsäure ergab ein Signal von 104 600 counts. Unten: 50 μM Bz-Ala-OH und 50 μM HHL in 50% MeOH, 0.1% Essigsäure ergab nur noch ein Signal von 15 010 counts.

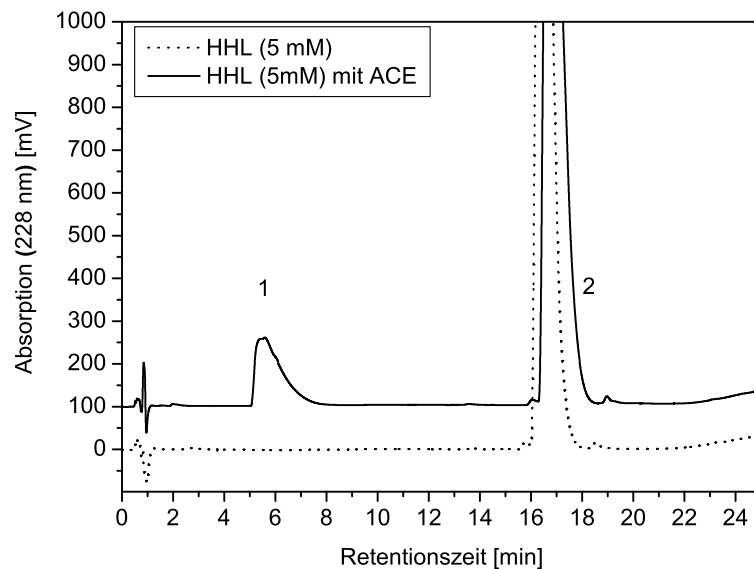


Abb. 8.6: Chromatographischer Aktivitätsnachweis des ACE. Ein ACE-Ansatz wurde nach 30-minütiger Substratumsatzzeit chromatographiert. In der Anwesenheit von aktivem ACE (durchgezogene Linie) wurde bei $t_{ret}=5.5$ min Hippursäure eluiert. Ohne den Zusatz von Enzym (gestrichelte Linie) wurde nur das Substrat HHL bei $t_{ret}=16-17$ min detektiert. Die Fraktion der UV-absorbierenden Banden wurden zur Bestätigung massenspektrometrisch analysiert (siehe Abb. 8.7).

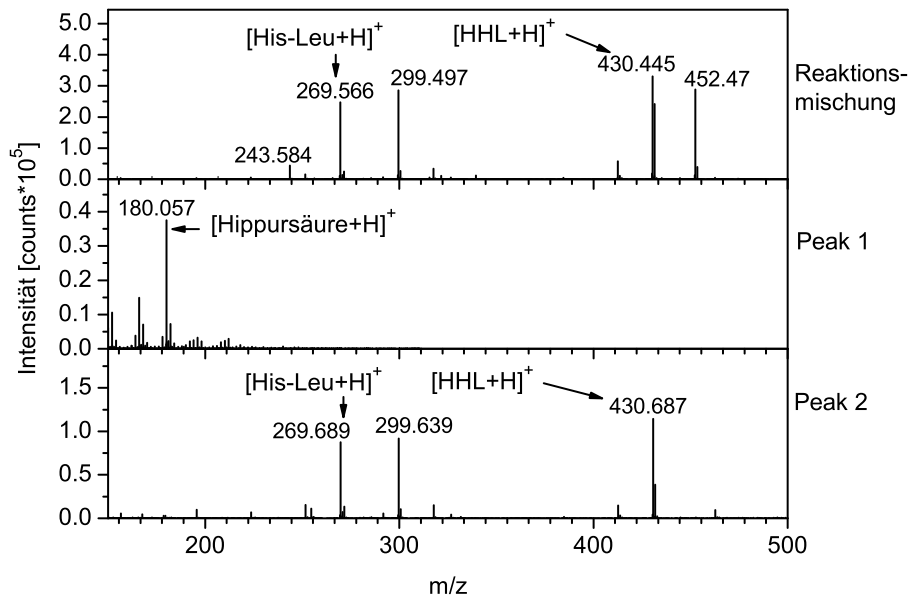


Abb. 8.7: ACE-Aktivitätsnachweis durch Chromatographie und Massenspektrometrie. Oben: Ein ACE-Ansatz (Bedingungen siehe Bildunterschrift von Abb. 8.6) wurde direkt im MS analysiert. Weder das Massensignal der Hippursäure noch des internen Standards Bz-Ala-OH konnte erfasst werden. Mitte: Das Massenspektrum der in Abb. 8.6 bei $t_{ret}=5.5$ min eluierenden Bande zeigte, dass es sich dabei um Hippursäure handelt. Unten: Das Massenspektrum der in Abb. 8.6 als zweite eluierenden Bande zeigte, dass es sich dabei um nicht umgesetztes Substrat HHL und um das His-Leu handelte.

Aktivität musste ausgeschlossen werden, dass das Massensignal von His-Leu nur durch Fragmentation des Substrats in der Ionisierungsquelle entstand und das Massensignal der Hippursäure aufgrund der Inaktivität des Enzyms nicht zu sehen war.

Zur Bestätigung der Enzymaktivität wurde eine Referenzanalyse mit chromatographischer Trennung des Produkts Hippursäure vom Substrat HHL herangezogen. Die Mischung des Enzymaktivitätstests wurde auf einer Umkehrphasensäule (C18) getrennt und die Absorption der eluierenden Banden bei 228 nm detektiert (Abb. 8.6). Durch Zugabe von ACE zum Testansatz ließen sich nach Abstoppen der Reaktion nach 30 Minuten zwei Banden mit HPLC voneinander trennen. Die relativen Retentionszeiten stimmten mit Angaben aus der Literatur überein. Das Massenspektrum der ersten Bande bei einer Retentionszeit von 5.5 min zeigte, dass es sich dabei um das Produkt Hippursäure handelte (Abb. 8.7, Mitte). Das nicht umgesetzte Substrat und His-Leu wurden bei den gewählten chromatographischen Bedingungen nicht voneinander getrennt, konnten aber im Massenspektrum identifiziert werden (Abb. 8.7, unten). Wurde anstelle von Enzymlösung nur Puffer zum ACE-Aktivitätstest zugegeben, so wurde im Chromatogramm nur die Elution des Substrats beobachtet (Abb. 8.6, gestrichelte Linie).

Bei der Entwicklung eines massenspektrometrischen Aktivitätsnachweises für ACE zeigte sich die Ionensuppression des Produktsignals Hippursäure und des internen Standards Bz-Ala-OH bei der Anwesenheit des Substrats HHL als problematisch. Ein Nachweis der Aktivität konnte nur über die konventionelle Analyse durch HPLC und UV-Absorption erfolgen.

8.3 Zusammenfassung

Die Umstellung der Wirkungsbezogenen Analyse auf eine massenspektrometrische Detektion der Enzyminhibition erwies sich als nicht zielführend. Für die AChE konnte rasch eine homogene Versuchsdurchführung ohne Aufreinigung der Probe entwickelt werden, die einen Inhibitionsnachweis der AChE im ESI-TOF-MS zuließ.

Um jedoch die Vorteile eines Massenspektrometers als wirkungsbezogenen Detektor gegenüber denen eines konventionellen optischen Detektors zur Geltung zu bringen, müssten die Aktivitäten mehrerer Enzyme gleichzeitig in einem Reaktor bestimmt werden können. Die Bestimmung der Aktivität von ACE mit ESI-TOF-MS konnte ohne einen Zwischenschritt zur Aufreinigung nicht durchgeführt werden, da Ionensuppression die Detektion des Substratumsatzes verhinderte.

Im Rahmen des BMBF-Projektes, innerhalb dessen die vorliegende Arbeit entstand, wäre ein massenspektrometrischer Aktivitätsnachweis von Proteinphosphatasen besonders interessant. Da diese Enzyme jedoch aktivierende Additive benötigen, ist davon auszugehen, dass die Ionensuppression bei einer massenspektrometrischen Untersuchung der Enzymaktivität noch gravierendere Probleme machen würden, als sie schon beim ACE-Nachweis ohne Additive aufgetreten sind. Daher wurden keine weiteren Bemühungen unternommen, das ESI-TOF-MS als Online-Detektor für Enzymaktivitäten zu etablieren.

Teil IV

Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung eines Detektors für die Wirkungsbezogene Analyse vorgestellt. Potentielle Schadstoffe sollen anhand der molekularen Targets, die für eine toxische Wirkung in Organismen relevant sind, erkannt werden.

Die Auswahl an in Frage kommenden Zielmolekülen ist vielfältig. Hier wurde das Hauptaugenmerk auf die Acetylcholinesterase und Proteinphosphatasen Typ 1 und Typ 2A gelegt, um neuro- bzw. hepatotoxische Verbindungen aufspüren zu können. Um einen Überblick über die Gesamtoxizität einer Probe zu erhalten, wurden Leuchtbakterienhemmtests herangezogen. Als Inhibitoren der Enzyme und Mikroorganismen wurden Insektizide und cyanobakterielle Toxine untersucht.

Um Kreuzreaktivitäten und Matrixeffekte zu vermeiden, wurde die Strategie verfolgt, nach einer chromatographischen Trennung den Detektionsschritt der Wirkungsbezogenen Analyse zu integrieren. Aktivitätsgeleitet wurden Enzyminhibitoren in einem Nachsäulenreaktor online erfasst.

Verschiedene Enzymsubstrate wurden für einen Einsatz in einem Online-Detektor getestet. Für eine UV-Vis-Detektion der AChE-Aktivität wurde der Aktivitätsnachweis mit Acetylthiocholiniodid und dem ELLMAN's Reagenz geführt. Für eine Fluoreszenzdetektion der AChE-Aktivität hat sich das Substrat 7-Acetoxy-1-methylchinoliniumiodid als geeignet erwiesen.

Passende Substrate für die Proteinphosphatasen waren *para*-Nitrophenylphosphat für die Aktivitätsbestimmung mittels Absorptionsmessung und 6,8-Difluoro-4-methylumbelliferylphosphat für eine Aktivitätsbestimmung mittels Fluoreszenzmessung. Der Einsatz des letzteren Substrates ließ ein empfindlicheres Testformat der Enzyminhibition zu, da weniger Enzym eingesetzt werden musste, um nach kürzerer Zeit als bei *para*-Nitrophenylphosphat ein messbares Signal zu erhalten. Da im konzipierten Online-Enzyminhibitionsdetektor im homogenen Format kontinuierlich Substratlösung gepumpt werden muss, empfiehlt es sich jedoch, als Substrat das bei weitem günstigere Substrat *para*-Nitrophenylphosphat zu wählen, um ökonomisch attraktiv zu bleiben. Der Verbrauch an Enzym ist relativ hoch und kann aus wirtschaftlicher Sicht nur durch die günstige Verfügbarkeit von rekombinanten Enzymen, die in großen Mengen hergestellt werden, vertreten werden.

Erste von unseren Projektpartnern rekombinant gewonnene Proteinphosphatasen zeigten zwar einen Substratumsatz, aber keine spezifische Hemmung. Daher wurde keine Online-Detektion der Proteinphosphatase-Inhibition nach einer chromatographischen Trennung durchgeführt, sondern es wurden nur Offline-Experimente durch Fraktionieren auf einer Mikrotiterplatte vorgenommen. Gegen Ende des zeitlichen Rahmens der vorliegenden Arbeit standen rekombinante Proteinphosphatase Typ 2A mit spezifischer Hemmung durch Microcystine zur Verfügung. Die Vorarbeiten, die in dieser Arbeit geleistet wurden, können als Grundlage für eine Übertragung des Offline-Verfahrens auf eine Online-Inhibition für eine Wirkungsbezogene Analyse dienen.

Natürlich wären toxisch relevante, humane Zielmoleküle wissenschaftlich interessanter. Aber für die Demonstration einer Wirkungsbezogenen Analyse ist auch die Inhibition der Acetylcholinesterase aus der Nematode *Nippostrongylus brasiliensis* sinnvoll. Eine Mutante dieses Enzyms konnte von unseren Projektpartnern

in großen Mengen rekombinant hergestellt werden.

Die Lösungsmittelverträglichkeit der Acetylcholinesterase, Proteinphosphatase und der Leuchtbakterien wurde getestet. Methanol zeigte sowohl bei den Enzymen als auch bei den Mikroorganismen die geringste deaktivierende Wirkung und wurde daher als organischer Teil der mobilen Phase in den chromatographischen Experimenten gewählt. Dennoch ist der inhibierende Einfluss des Lösungsmittels gerade auf Leuchtbakterien hoch. Eine Verdünnung von einem Teil HPLC-Eluat mit neun Teilen Enzym- bzw. Leuchtbakterienlösung ist notwendig, um den Einfluss einer Gradiententrennung auf das Signal des wirkungsbezogenen Detektors gering zu halten. Die eluierenden Analyten werden folglich natürlich verdünnt und damit die Nachweisgrenze verschlechtert. Alternativ könnte das Lösungsmittel vor Eintritt in den Enzym- bzw. Bakterieninhibitionsreaktor beispielsweise durch Dialyse abgetrennt werden. Geeignete miniaturisierte Systeme für eine möglichst totvolumenfreie Abtrennung müssten entwickelt werden.

Die Lichtemission der Leuchtbakterien verändert sich nicht nur mit dem Lösungsmittelanteil. Offline-Experimente zeigten, dass auch der Sauerstoffgehalt eine gravierende Rolle spielt und in einem Online-Assay geregelt werden sollte, um eine stabile Basislinie des Signals zu erhalten. Des Weiteren muss die Salinität und eine geeignete Arbeitstemperatur berücksichtigt werden.

Die Dimensionen des Nachsäulenreaktors wurden im Bereich von $\mu\text{L}/\text{min}$ konzipiert, um den Reagenzienverbrauch niedrig zu halten. Als pulsationsarme Pumpen für eine geeignete Flüssigkeitsbeförderung wurden Spritzenpumpen verwendet.

Im gewählten Flüssigkeitsbereich herrschten niedrige REYNOLDS-Zahlen vor. Eine Herausforderung stellte die Dispersion und das Mischen in den Reaktionskapillaren dar. Mit einer Numerischen Simulation konnte verdeutlicht werden, dass das Mischen über ein T-Stück in radialer Richtung unzulänglich ist. Die Dispersion in longitudinaler Richtung stellt ein Problem dar, da die chromatographische Auflösung im wirkungsbezogenen Detektor verringert wird.

Der Einsatz von linearen, gestrickten und gassegmentierten Nachsäulenreaktoren im Online-Inhibitionsdetektor von Acetylcholinesterase nach einer chromatographischen Trennung eines Insektizidgemisches wurde getestet. Ein Vergleich der Bandenverbreiterung in einem linearen und einem gestrickten Reaktor zeigte im gewählten Flussbereich von $\mu\text{L}/\text{min}$ keine Verbesserung. Auch die Möglichkeit eluierende Peaks in Reaktionsschleifen zu parken (*Peak-Parking*) und nach der Reaktionszeit wieder zu eluieren, zeigte nur unbefriedigende Resultate bezüglich der Dispersion. Erst der Einsatz einer Gassegmentierung mit einer geeignet hohen Segmentierungsfrequenz brachte nahezu einen Erhalt der chromatographischen Auflösung trotz Enzyminhibitionsreaktor.

Das Einspeisen der Gassegmente wurde optimiert, um möglichst regelmäßige Reaktionsvolumina im segmentierten Fluss mit geeigneter Frequenz zu erhalten. Da die optische Detektion des Reaktionsflusses durch Gasblasen in der Detektorzelle gestört wurde, erfolgte eine Separation der Phasen vor der Detektorzelle. Mehrere Prototypen von Blasenfiltern wurden entworfen, um auch bei den sich ständig ändernden physikalischen Parametern einer Gradiententrennung ein sicheres Abtrennen der Blasen zu erlauben. Gerade dieses Bauteil zeigte sich jedoch als sehr anfällig. Um das System robuster zu machen, ist es sicherlich von Vorteil

die optischen Messsignale mittels Computer digital von den Interferenzen durch Blasen zu bereinigen.

Das Prinzip der Wirkungsbezogenen Analyse konnte mit dem optimierten Aufbau des segmentierten Enzyminhibitionsdetektors (SFEID) verdeutlicht werden, indem mit Insektizidstandards versetzte Trinkwasserproben auf einen potentiellen neurotoxischen Effekt durch die Hemmung von Acetylcholinesterase untersucht wurden. Dabei fielen vor allem die unterschiedlichen Nachweisgrenzen von UV-Vis-Detektor, Massenspektrometer und SFEID auf. Der Enzyminhibitionsdetektor lag teilweise sogar um zwei Größenordnungen über der Nachweisgrenze der anderen Detektoren (z.B. Paraoxon: 0.02 mg/L (PDA), 0.05 mg/L (MS), 2 mg/L (SFEID)). Die Nachweisgrenze hängt stark von den Hemmkonstanten der einzelnen Inhibitoren ab. Eine Erniedrigung der Nachweisgrenze könnte zum einen durch eine Verlängerung der Reaktionszeit erreicht werden. Durch die Segmentierung sollte die Dispersion aufgrund einer verlängerten Reaktionszeit nicht ins Gewicht fallen. Zum anderen könnte eine weniger starke Verdünnung des Eluats zielführend sein. Derzeit ist die Verdünnung um einen Faktor zehn notwendig, um die Aktivität des Enzyms trotz organischem Lösungsmittel in der mobilen Phase zu erhalten.

Eine weitere Möglichkeit die Nachweisgrenze des SFEIDs zu verbessern, ist ein Anreicherungsschritt, der online vor der chromatographischen Säule durchgeführt wird. In vorliegender Arbeit wurden Experimente einer Online-Anreicherung vor der chromatographischen Trennung durchgeführt. Im Anschluss daran war es möglich, auf einer Vorsäule angereicherte Phosphorthionate online chemisch zu oxidieren und direkt in potente Inhibitoren der Acetylcholinesterase zu überführen. Mit dieser Methode ist es denkbar, potentielle Schadstoffe, die erst durch Verstoffwechslung entstehen, mit einem wirkungsbezogenen Detektor erfassen zu können.

Die massenspektrometrische Beobachtung der Enzymaktivität anhand des Substratumsatzes wurde untersucht. Der Umsatz von Acetylcholin durch Acetylcholinesterase und deren Inhibition durch das Insektizid Carbofuran konnte in einem offline durchgeführten Experiment mit einem ESI-TOF-MS erfasst werden ($IC_{50} = 22.3 \pm 3.8 \mu M$). Ionensuppression machte dagegen eine Beobachtung des Substratumsatzes von Angiotensin-konvertierendem Enzym mittels Massenspektrometer unmöglich.

Da Proteinphosphatasen Typ 1 und Typ 2A Additive für ihre Aktivität benötigen, wird Ionensuppression bei der Entwicklung eines massenspektrometrischen Assays für diese Enzyme eine Herausforderung darstellen. Da Proteinphosphatasen mit den künstlichen Substraten geringe Umsatzzahlen haben, wäre es jedoch zu überlegen, einen massenspektrometrischen Assay mit natürlichen Substraten zu unternehmen. Gegebenenfalls müssten vor dem Einlass in das Massenspektrometer störende Substanzen entfernt werden.

Der Gewinn einer massenspektrometrischen Beobachtung der Enzymaktivität gegenüber optischen Detektionsmethoden liegt zum einen in der Verwendung von natürlichen Substraten, die meist mit der optimalen Geschwindigkeit enzymatisch umgesetzt werden können. Zum anderen wäre eine Parallelisierung für eine zukünftige multidimensionale Wirkungsbezogene Analyse einfacher, da die Detektion der Aktivität mehrerer Enzyme nebeneinander in einem Flusskanal stattfinden

könnte und somit die hydrodynamischen Parameter des Systems gegenüber eines optischen Multikanalsystems vereinfacht werden würden.

Eine Online-Detektion der AChE-Aktivität mittels Massenspektrometer nach einer chromatographischen Trennung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Eine direkte Kopplung eines gassegmentierten Reaktors an die ESI-Quelle des verwendeten ESI-MS ist nicht möglich, da durch die Gassegmente das Spray gestört wird und somit nicht verlässlich kontinuierlich Massensignale aufgezeichnet werden können.

Eventuell wäre es hier sinnvoll, eine gänzlich andere Form der Segmentierung zu wählen und beispielsweise das Eluat der Chromatographie in Tröpfchenform auf einer Matrix zu segmentieren. Dies könnte auf einem rotierenden Band geschehen, wie es im Zusammenhang mit MALDI-Messungen mit der *Lab-on-a-Tape*-Technik schon der Fall ist [262].

Hinsichtlich einer Miniaturisierung auf ein *Lab-on-a-Chip*-System müsste die Detektionsoptik anders konstruiert werden. Laser-induzierte Fluoreszenz könnte eine nachweisstarke Detektion so mancher wirkungsbezogener Reaktionen ermöglichen. Durch das Verwenden von Faseroptiken könnte eine mikrofluidische Bauweise des wirkungsbezogenen Detektors auch bei einer Parallelisierung auf mehrere Zielmoleküle vereinfacht werden. Um das Potential des in dieser Arbeit vorgestellten Detektors für eine Wirkungsbezogene Analyse unbekannter Proben auszuschöpfen, wäre es zudem sinnvoll, MS/MS-Spektren aufzunehmen, um so die Schadstoffe oder eventuell auch Wirkstoffe über eine Fragmentierung identifizieren zu können.

Teil V

Experimenteller Teil

9 Geräte

9.1 Pumpen

HPLC-Pumpe L-6200A Intelligent Pump (Merck, Darmstadt)
HPLC-Pumpe Model 480 High Precision Pump (Gynkotek, Dionex GmbH, Idstein)
HPLC-System Alliance (2690, Waters GmbH, Eschborn)
Kolbenpumpe Model M6 pump (CP2-4841-100, VICI, GAT Gamma Analysetechnik GmbH, Bremerhaven)
Mikrozahnringpumpe mZR-2905 (HNP Mikrosysteme GmbH, Parchim)
Schlauchpumpe Ismatec SA MS-Reglo (Ismatec, Wertheim-Mondfeld)
Spritzenpumpe Cavro XL 3000 Modular Digital Pump (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim)
Spritzenpumpe Model 11 (Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten)
Spritzenpumpe Model PHD 2000 Infuse/Withdraw (71-2001, Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten)

9.2 Detektoren

Elektrospray-Flugzeit-Massenspektrometer LCT (Micromass, Waters GmbH, Eschborn)
Fluoreszenzdetektor 2020-FP-S mit 5 μL Durchflusszelle (6829-J003S, Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt)
Fluoreszenzreader Wallac Victor² Multilabel Counter (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) Mikrotiterplattenreader 340 ATTC (SLT Lab Instrument Deutschland GmbH, Crailsheim)
UV-Vis-Detektor (K-2501, Knauer, Berlin)
UV-Vis-Detektor (L-4520, Merck, Darmstadt)
UV-Vis-Detektor für die Kapillarelektrophorese (4225, Unicam Chromatography, Kassel)
UV-Vis-Detektor, Photodiodenarray (996, Waters GmbH, Eschborn)

9.3 Fluidik-Zubehör

Anreicherungskartusche für Prospekt HySphere-Resin GP, 10 mm x 2 mm, 5–15 μm Partikelgröße (0794.610, Spark Holland, Emmen/Niederlande)

Anreicherungskartusche für Prospekt Oasis HLB, 10 mm x 2 mm, 30 μm Partikelgröße (186000258, Waters GmbH, Eschborn)
Anreicherungskartusche für Prospekt PLRP, 10 mm x 2 mm, 15-25 μm Partikelgröße (0794.301, Spark Holland, Emmen/Niederlande)
Blasenfalle (Omnifit, Msscientific, Berlin)
ChromStar 4.14, HPLC-Datenverarbeitungssoftware (SCPA, Stuhr)
Flusssensor, CMOSens Liquid Flow Meter (ASL1430-16, Sensirion AG, Zürich/Schweiz)
Fraktionensammler (2128, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA/USA)
Makeup-Flow Splitter, maßgefertigt, 1:20 (529-620-PO90-CS, Sunchrom Wissenschaftliche Geräte GmbH, Friedrichsdorf)
Trennsäule, LiChrospher 100, RP18 endcapped, 250 mm x 4.0 mm, 5 μm (1.615500, Merck, Darmstadt)
Trennsäule, Luna C18(2), 50 mm x 2.0 mm, 5 μm (00B-4252-B0, Phenomenex, Aschaffenburg)
Trennsäule, Onyx Monolithic C18, 50 mm x 4.6 mm, 2 μm Porengröße (CH0-7644, Phenomenex, Aschaffenburg)
Vorsäule, Onyx Monolithic C18, 5 mm x 4.6 mm, 2 μm Porengröße (KJ0-7651, Phenomenex, Aschaffenburg)

ETFE Flangeless Ferrules 1/16" (Z-UC-P-200X, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
ETFE Luer Adapter, 1/4x28 (Z-UC-P-624, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
Delrin-Stopfen für 10-32 Anschlüsse (Z-UC-U-467BX, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
FEP Teflon Sleeve, für OD 630 μm -670 μm (Z-UC-F246X, Upchurch Scientific, Postnova Analytics GmbH, Landsberg)
FEP Teflon-Tubing 1/16" x 0.25 mm (Z-UC-1526, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
FEP Teflon-Tubing 1/16" x 0.5 mm (Z-UC-1548, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
FEP Teflon-Tubing 1/16" x 0.75 mm (z-UC-1522, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
Glaskapillare mit Polyimidbeschichtung, 660 μm x 530 μm (6540-TSP530660, Polymicro Technologies, Optronis GmbH, Kehl)
Micro LC Flusszelle (160237, LC Packings, Dionex GmbH, Idstein)
PEEK-6-Port-Verteiler, 1.0 mm Bohrung (Z-UC-P-152, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
PEEK-Absperrventil, 0.5 mm Bohrung (Z-UC-P-733, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
PEEK-Female-to-female Luer Adapter (Z-UC-P-659, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
PEEK Flangeless Nut 1/16" (Z-UC-P-230X, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
PEEK-Frit-in-a-ferrule 1/8", 2 μm (Z-UC-P-374, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

PEEK-Niederdruck-4-Wege-Schaltventil, Fluß im rechten Winkel (Z-UC-V-100L, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

PEEK-one-piece fingertight Fitting 1/16" (Z-UC-F-120X, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

PEEK-T-Stück, 10-32 Anschlüsse, 0.5 mm Bohrung (Z-UC-P-727, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

PEEK-T-Stück, 1/4-28 Anschlüsse, 0.5 mm Bohrung (Z-UC-P-712, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

PEEK-Tubing 1/16" x 65 μm (Z-UC-1560, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

PEEK-Tubing 1/16" x 125 μm (Z-UC-1535, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

PEEK-Tubing 1/16" x 0.5 mm (Z-UC-1532L, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

PEEK-Two-piece sealtight Fitting 1/16" (Z-UC-F-287X, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

PEEK-Union, 10-32 Anschlüsse, 0.25 mm Bohrung (Z-UC-P-742, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

PEEK-Universal one-piece coupler, 0.13 mm ID (336501, Alltech GmbH, Unterhaching)

PEEK-Y-Stück, 1/4-28 Anschlüsse, 0.5 mm Bohrung (Z-UC-P-512, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

Rückdruckregler 20 psi, 0.25 mm Bohrung (Z-UC-P-791, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

Rückdruckregler variabel 1/16" (58788, Supelco, Taufkirchen)

Spritze, 1000 Series Gastight Syringes mit Teflon-Luer Lock, verschiedene Volumina (Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten)

Spritze mit PTFE-Dichtung und Luer Lock, 10 mL, H-M, XL (2645077, ILS GmbH, Stützerbach)

Stainless Steel-Frit-in-a-ferrule 1/16", 2 μm (Z-UC-P-272, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

Stainless Steel-Fritte für Vorsäulenfilter 2 μm (Z-UC-A-100X, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

Stainless Steel-Probenschleife 5 μL (Z-UC-1950, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

Stainless Steel-Vorsäulenfilter 0.5 μm (Z-UC-A-318, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

TEFZEL-T-Stück, 0.5 mm Bohrung (Z-UC-P-632, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

UHMWPE-Fritte, 2 μm (Z-UC-A-423, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

Vacutight Fitting, 1/4-28 (Z-UC-P-930, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

9.4 Sonstige

Einstufiger Gasrückdruckregler 0-40 psi (81890, Alltech GmbH, Unterhaching)
Flaschendruckregler, Messing FM61 10 bar (71706139, Messer Griesheim GmbH, Krefeld)

Fluoreszenzspektrometer LS 50 (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim)

Mikrotiterplatte für Absorptionsmessung, Flachboden, hohe Bindungskapazität (655061, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen)

Mikrotiterplatte für Fluoreszenzmessung, schwarz, F-Form, mittlere Bindungskapazität (655076, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen)

Online-Entgaser (3415 α , ERC, Alteglofsheim)

Online-Entgaser Degasys DG-1310 (Gynkotek, Dionex GmbH, Idstein)

Reduzierferrule Vespel 1/8"-1/16" (RF-200/100-V, Alltech GmbH, Unterhaching)

Schüttler für Mikrotiterplatten Easyshaker (EAS2/4, SLT, Overath)

UV-Vis-Spektrometer DU 650 (Beckmann Instrument, Fullerton/USA)

Verbindungsstück Messing FPT 1/4"-1/4" (14072, Alltech GmbH, Unterhaching)

Verbindungsstück Messing FPT 1/8"-1/4" (14071, Alltech GmbH, Unterhaching)

10 Chemikalien und Reagenzien

10.1 Verwendete Chemikalien

Aceton, Chromasolv, $\geq 99.8\%$ (34850, Riedel-de Haën, Taufkirchen)
Acetonitril, AMD Chromasolv, $\geq 99.9\%$ (34896, Riedel-de Haën, Taufkirchen)
7-Acetoxy-1-methyl-chinoliniumiodid, $\geq 98.0\%$ (00871, Fluka, Taufkirchen)
8-Acetoxy-pyren-1,3,6-trisulfonsäure, Natriumsalz, $\geq 98.0\%$ (00879, Fluka, Taufkirchen)
Acetylthiocholiniodid, $\geq 91.0\%$ (01480, Fluka, Taufkirchen)
Acetylcholinchlorid, $\geq 99\%$ (A6625, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
Albumin aus Rinderserum Fr. V, 99% (A3059, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
Ameisensäure, HPLC Grade, 50% (09676, Fluka, Taufkirchen)
Ammoniumhydrogencarbonat, $\geq 99.5\%$ (09830, Fluka, Taufkirchen)
Ammoniummolybdat, puriss. p.a., $> 99.0\%$ (09680, Fluka, Taufkirchen)
Bz-Ala-OH (E-1445, Bachem, Weil am Rhein)
Captopril, 98% (343700010, Acros Organics, Geel/Belgien)
Cholin-trimethyl-d₉-chlorid, 98 atom % D (492051, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
Citronensäure Monohydrat (1.00243, Merck, Darmstadt)
Diethyl-chlorphosphat, purum, $> 97.0\%$ (32085, Fluka, Taufkirchen)
6,8-Difluor-4-methylumbelliferylphosphat (D-6567, Molecular Probes, MoBiTec, Göttingen)
Dikaliumhydrogenphosphat, $\geq 99.0\%$ (60354, Fluka, Taufkirchen)
Dimethyl-chlorphosphat, 97% (437891, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure), ELLMAN's Reagenz (D8130, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
D,L-Dithiothreitol (DTT), $\geq 90.0\%$ (43817, Fluka, Taufkirchen)
Essigsäure, 100%, Suprapur (1.00066, Merck, Darmstadt)
Essigsäure, 50%, HPLC Grade (45754, Fluka, Taufkirchen)
Ethylenebis-(oxyethylenitrilo)-tetra-essigsäure (EGTA), 99% (409910250, Acros Organics, Geel/Belgien)
Ethylendiamintetraessigsäure, $\geq 99.0\%$ (03609, Fluka, Taufkirchen)
Ethylenglycoldimethylether, wasserfrei, 99.5% (259527, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
Fluoresceindiacetat, $\geq 98.0\%$ (31545, Fluka, Taufkirchen)
Fluoresceindiphosphat (F2999, Molecular Probes, Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
4-Fluor-2-nitrophenol, 99% (345059, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
Hippuryl-His-Leu-OH (M-1485, Bachem, Weil am Rhein)
Gelatine aus Schweinehaut (48720, Fluka, Taufkirchen)

Kaliumbromat, $\geq 99\%$ (02108, Riedel-de Haën, Taufkirchen)
Kaliumbromid, p.a. (1.04905, Merck, Darmstadt)
Kaliumhydrogensulfat, p.a. (1.04885, Merck, Darmstadt)
Kaliumhydroxid, Plätzchen, puriss. p.a., $\geq 85\%$ (30603, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
Kaliumphosphat, $\geq 98\%$ (P5629, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
Magnesiumchlorid-hexahydrat (1.05832, Merck, Darmstadt)
Manganchlorid-tetrahydrat, 98.7% (M9522, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
Malachitgrünkristalle (32745, Riedel-de Haën, Taufkirchen)
2-Mercaptoethanol, $\geq 99.0\%$ (63689, Fluka, Taufkirchen)
Methanol, Chromasolv, $\geq 99.9\%$ (34885, Riedel-de Haën, Taufkirchen)
Methanol, Gradient Grade, $\geq 99.8\%$ (B8402, J. T. Baker, CLN GmbH, Freising)
4-Methylumbelliferylphosphat, $\geq 99.0\%$ (69605, Fluka, Taufkirchen)
3-Morpholino-propansulfonsäure (MOPS), $\geq 99.5\%$ (69947, Fluka, Taufkirchen)
Natriumchlorid, $\geq 99.5\%$ (71376, Fluka, Taufkirchen)
Natriumperchlorat-monohydrat, $\geq 99.0\%$ (89152, Fluka, Taufkirchen)
N-Bromsuccinimid, 99% (B81255, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
4-Nitrophenol, $\geq 99\%$, (241326, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
para-Nitrophenylphosphat (P4744, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
2,3,4,5,6-Pentafluorphenol, $\geq 99\%$ (103799, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
Phosphorsäure, puriss. p.a., 49-51% (79607, Fluka, Taufkirchen)
Salzsäure, rauchend, 37% (84422, Fluka, Taufkirchen)
Toyopearl HW 55S (19813, Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart)
Trifluoressigsäure (TFA), HPLC Grade, $\geq 99.0\%$ (91707, Fluka, Taufkirchen)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), Ultrapure Grade, $\geq 99.9\%$ (154563, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
Tween20, f. d. Molekularbiol. (8.17072, Merck, Darmstadt)
Wasser, LC-MS Chromasolv (39253, Riedel-de Haën, Taufkirchen)
Wasser, HPLC Gradient Grade (B4218, J. T. Baker, CLN GmbH, Freising)
Wasserstoffperoxid, reinst, 30% (1.08597, Merck, Darmstadt)
Zinkchlorid, $\geq 98.0\%$ (96468, Fluka, Taufkirchen)

10.2 Enzyme, Proteine und Mikroorganismen

Acetylcholinesterase aus Zitteraal, Typ VI-S (C3389, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
Acetylcholinesterase aus dem Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis* (rekombinant hergestellt in *Pichia Pastoris*, Dr. Holger Schulze, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart)
Angiotensin-konvertierendes Enzym aus Kaninchenlunge (10386, Fluka, Taufkirchen)
Casein aus Rindermilch, gereinigt (C5890, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)

Casein aus Rindermilch, vitaminfrei (C3400, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
 LUMISTox Leucht Bakterien, lyophilisiert (LCK480, Hach Lange GmbH, Berlin)
 Proteinphosphatase-1 aus Kaninchen, katalytische Untereinheit, α -Isoform, rekombinant hergestellt (P7937, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
 Proteinphosphatase-2A aus Kaninchenmuskel, katalytische Untereinheit (V6311, Promega GmbH, Mannheim)

10.3 Standardsubstanzen

Aldicarb, 99.9%, Pestanal (33386, Riedel-de Haën, Taufkirchen)
 Carbaryl, 99.8%, Pestanal (45367, Riedel-de Haën, Taufkirchen)
 Carbofuran, 99.9%, Pestanal (45370, Riedel-de Haën, Taufkirchen)
 Chlorpyrifos, 99.2%, Pestanal (45395, Riedel-de Haën, Taufkirchen)
 Dichlorvos, 97.6%, Pestanal (45441, Riedel-de Haën, Taufkirchen)
 Malathion, 97.3%, Pestanal (36143, Riedel-de Haën, Taufkirchen)
 Methomyl, 99.9%, Pestanal (36159, Riedel-de Haën, Taufkirchen)
 Paraoxon-ethyl, 97.1%, Pestanal (36186, Riedel-de Haën, Taufkirchen)
 Parathion-ethyl, 98.8%, Pestanal (45607, Riedel-de Haën, Taufkirchen)
 Propoxur, 99.9%, Pestanal (45644, Riedel-de Haën, Taufkirchen)

Anatoxin-a(S) aus *Anabaena lemmermannii* (Dr. Peter Henriksen, Ministry of Environment and Energy, National Environmental Research Institute, Roskilde/Dänemark)
 Galantamin Hydrobromid, $\geq 94\%$ aus *Lycoris sp.* (G1660, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
 Microcystin-LR, $\geq 96\%$ aus *Microcystis aeruginosa* (ALX-350-012, Alexis Biochemicals, Axxora Deutschland GmbH, Grünberg)
 Microcystin-RR, $\geq 95\%$ aus *Microcystis aeruginosa* (ALX-350-043, Alexis Biochemicals, Axxora Deutschland GmbH, Grünberg)
 Microcystin-YR, $\geq 95\%$ aus *Microcystis aeruginosa* (ALX-350-044, Alexis Biochemicals, Axxora Deutschland GmbH, Grünberg)
 Okadasäure, $\geq 98\%$ (ALX-350-003, Alexis Biochemicals, Axxora Deutschland GmbH, Grünberg)

10.4 Pufferlösungen

ACE-Puffer

200 μL K_2HPO_4 (50 mM mit 1 M HCl auf pH 8.3 eingestellt)
200 μL Glycerin
200 μL ZnCl_2 (100 μM)
1400 μL Reinstwasser

Ammoniumhydrogencarbonatpuffer (10 mM, pH 8.0)

80 mg NH_4HCO_3
50 mL Reinstwasser
mit Ammoniumhydroxid (1%ig) pH-Wert einstellen
auf 100 mL mit Reinstwasser auffüllen

MOPS-Puffer

0.84 g MOPS
50 mL Reinstwasser
mit 1 M NaOH pH-Wert einstellen
auf 100 mL mit Reinstwasser auffüllen

MOPS-PP-Puffer

2500 μL MOPS (40 mM mit 1 M NaOH auf pH 7.5 eingestellt)
44 mg NaCl
1200 μL Reinstwasser
100 μL MgCl_2 (50 mM)
500 μL EGTA (10 mM in 20 mM MOPS-Puffer, pH 7.5)
100 μL MnCl_2 (5 mM)
kurz vor Gebrauch dazugeben:
100 μL DTT (50 mM)
500 μL BSA (1 mg/mL)

PBS-Puffer (pH 7.6)

1.36 g KH_2PO_4
12.20 g K_2HPO_4
8.50 g NaCl
ad 1000 mL Reinstwasser

TRIS-Puffer

1.21 g TRIS
50 mL Reinstwasser
mit 1 M HCl gewünschten pH-Wert einstellen
auf 100 mL mit Reinstwasser auffüllen

TRIS-PP-Puffer

2500 μL TRIS-Puffer (100 mM, pH 7.4)

1800 μL Reinstwasser

100 μL MnCl_2 (5 mM)

kurz vor Gebrauch dazugeben:

100 μL DTT (50 mM)

500 μL BSA (1 mg/mL)

TRIS-Substrat-Puffer

5000 μL TRIS-Puffer (100 mM, pH 8.5)

4000 μL MgCl_2 (50 mM)

200 μL DTT (50 mM)

11 Standardprozeduren

11.1 Ansetzen von Analytstandardlösungen

Stammlösungen der Insektizide und von Galantamin wurden in Methanol in einer Konzentration von 2 g/L angesetzt. Die weitere Verdünnung erfolgte mit Reinstwasser in Glasfläschchen zeitnah zu den Experimenten. Die Stammlösungen wurden in braunen Glasflaschen im Kühlschrank aufbewahrt.

Von Microcystinen wurden durch direkte Zugabe von Methanol zu den Aufbewahrungsgläschen Stammlösungen von ca. 1 g/L hergestellt. Die Lösungen wurden durch weiteres Verdünnen mit Methanol auf eine Konzentration von ungefähr 10 mg/L gebracht. Durch Messung der UV-Absorption bei 238 nm wurden unter Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten von MC-LR von $\epsilon = 39\,800 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ nach HARADA et al. [263] für alle Microcystine die genauen Konzentrationen bestimmt. Die Microcystinstandardreihe wurde durch Verdünnen mit Reinstwasser hergestellt. Die Microcystinstandards wurden in Probenfläschchen aus Braunglas gekühlt über mehrere Monate aufbewahrt.

11.2 Bestimmen der Enzymaktivität

Die Aktivität von Enzymen wird üblicherweise in Units pro Milliliter angegeben. Eine Unit wird dabei je nach Enzym unterschiedlich definiert.

Für AChE gilt, dass eine Unit 1 μmol von Acetylthiocholin zu Thiocholin und Acetat pro Minute bei 37°C und pH 8.0 hydrolysiert. Der Substratumsatz wird dabei über die Reaktion mit dem ELLMAN's Reagenz verfolgt (siehe Abb. 1.7).

Für die verwendeten Proteinphosphatasen gilt, dass eine Unit der Enzyme 1 nmol an p-Nitrophenylphosphat pro Minute bei 30°C und pH 7.0 umsetzt. Je nach Hersteller kann diese Definition aber auch abweichen.

Der Umsatz des Substrats wurde durch die Absorptionsänderung pro Zeiteinheit in einer Küvette im Photometer bestimmt. Nach dem Gesetz von LAMBERT-BEER gilt

$$\Delta A = \epsilon \cdot \Delta c \cdot d, \quad (11.1)$$

wobei ΔA die Absorptionsänderung pro Minute, ϵ der molare Extinktionskoeffizient (13 600 $\text{Lcm}^{-1}\text{mol}^{-1}$ für Thionitrobenzoat im Fall der AChE respektive 16 500 $\text{Lcm}^{-1}\text{mol}^{-1}$ für p-Nitrophenol im Fall der PP), Δc der Substratumsatz in $\mu\text{mol/mL}$ (bzw. in nmol/mL für die Proteinphosphatasen) pro Minute und d die Küvettendicke in mm (hier $d=10 \text{ mm}$) ist.

Die Aktivität der Enzyme A_{Enzym} [U/mL] berechnet sich für AChE durch

$$A_{\text{AChE}} = \Delta c \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL} \cdot \text{min}} \right] \cdot f = \frac{\Delta A}{\epsilon \cdot d} \cdot f = \frac{\Delta A \cdot f}{13.6} \left[\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right] \quad (11.2)$$

und für Proteinphosphatase durch

$$A_{PP} = \Delta c \left[\frac{\text{nmol}}{\text{mL} \cdot \text{min}} \right] \cdot f = \frac{\Delta A}{\epsilon \cdot d} \cdot f = \frac{\Delta A \cdot f}{0.0165} \left[\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right]. \quad (11.3)$$

Der Faktor f berücksichtigt dabei die Verdünnung der Enzymlösung bei der Aktivitätsbestimmung.

Da bei den vorhandenen Geräten keine Thermostatisierung vorgenommen werden konnte, bezogen sich die in dieser Arbeit bestimmten Enzymaktivitäten auf Raumtemperatur und waren nur eine Näherung zur Abschätzung der Enzymaktivität.

Für die Bestimmung der AChE-Aktivität wurden 480 μL Enzymverdünnung in TRIS-Puffer (100 mM, pH 8.0) mit 0.1% Gelatine mit 20 μL Substrat-Reagenz-Gemisch (DTNB und ATCI, je 10 mM in PBS-Puffer) in einer Mikroküvette vermischt. Die Änderung der Absorption wurde sofort im Spektrometer bei 412 nm aufgezeichnet, indem 60 Sekunden lang jede Sekunde ein Datenpunkt aufgezeichnet wurde. Die Enzymverdünnung wurde so gewählt, dass während der Messzeit von einer Minute eine deutliche Absorptionsänderung zu beobachten war, die Absorption jedoch nicht den Wert 1 überschritt. Durch das Anlegen einer Gerade an die Messwerte konnte unter Berücksichtigung der Vorverdünnung und Enzym-Substratverdünnung nach Gleichung 11.2 die Enzymaktivität bestimmt werden.

Um die Autohydrolyse des Substrats ATCI bzw. des Reagenzes DTNB zu berücksichtigen, wurde eine Messung ohne Enzym nur mit Puffer durchgeführt und die Absorptionsänderung der Enzymmessung entsprechend korrigiert.

Die Unit-Bestimmung für die Proteinphosphatasen erfolgte durch Zugabe von 40 μL Enzymverdünnung im TRIS-PP-Puffer (siehe Abschnitt 10.4) zu 460 μL Substrat-Lösung (pNPP, 33 mM in TRIS-Substrat-Puffer, siehe Abschnitt 10.4). Die Änderung der Absorption wurde bei 405 nm verfolgt, wobei 20 min lang alle 30 s ein Messpunkt aufgezeichnet wurde. Unter Berücksichtigung der Autohydrolyse des Substrats erfolgte die Auswertung analog zur AChE unter Verwendung der Gleichung 11.3.

11.3 Enzyminhibitionstest auf der Mikrotiterplatte

Zum einen wurden die Inhibitionstests der Enzyme auf der Mikrotiterplatte durchgeführt, um Kalibrierkurven zu erstellen, zum anderen wurden die Inhibitionstests offline an eine HPLC gekoppelt. Die prinzipielle Durchführung der Tests ist in folgenden Abschnitten aufgeführt. Etwaige Abweichungen in der Testdurchführung sind in den jeweiligen Bildunterschriften im Ergebnisteil aufgeführt.

11.3.1 Acetylcholinesterase

Für die AChE-Hemmtests mit NbAChE wurde das im Nährmedium gelöste Enzym durch eine 1:1000 Verdünnung mit TRIS-Puffer (100 mM, pH 8.0, 0.1 m/v% Gelatine) auf ca. 10 U/mL vorverdünnt.

Für Hemmtests mit dem Substrat ATCI und dem ELLMAN's Reagenz wurde die Enzymlösung mit TRIS-Puffer (10 mM, pH 8.0) auf ca. 10 mU/mL verdünnt. Es wurde eine wässrige 100 mM Lösung des Substrats ATCI hergestellt. Das Reagenz DTNB wurde in PBS-Puffer gelöst, um eine Konzentration von 25 mM zu erhalten. Um eine vorzeitige Hydrolyse des Substrats zu vermeiden, wurden Substrat- und Reagenzlösung bei 4°C aufbewahrt. Erst kurz vor Durchführung des Hemmtests wurden ein Teil ATCI-Lösung, fünf Teile DTNB-Lösung und drei Teile Wasser zusammengegeben, um ein Substrat-Reagenz-Gemisch (10 mM ATCI, 12.5 mM DTNB) zu erhalten.

Für Hemmtests mit dem Substrat AMQI wurde die Enzymlösung mit TRIS-Puffer (10 mM, pH 8.0) auf ca. 1 mU/mL verdünnt. Es wurde eine wässrige 20 mM Lösung von AMQI hergestellt und in Aliquoten bei -18°C eingefroren, um die vorzeitige Hydrolyse des Substrats zu verhindern. Zeitnah zur Durchführung der Tests wurde durch Zugabe von Wasser eine 5 mM AMQI-Lösung hergestellt.

Für die Erstellung einer Kalibrierkurve oder zur Messung der inhibitorischen Wirkung einer Probe wurden 20 µL der Standardlösungen oder Probenlösung in den Kavitäten der Mikrotiterplatte vorgelegt. Im Regelfall wurden dabei Dreifachbestimmungen durchgeführt. Es wurden 180 µL der Enzymlösung zugegeben. Abgedeckt mit Parafilm wurde die Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur für die Inhibitionszeit auf dem Schüttler belassen. Anschließend wurden 20 µL der ATCI-DTNB-Lösung bzw. der AMQI-Lösung zugegeben. Nach kurzem Schütteln wurde der Substratumsatz gemessen.

Im Fall des Assays mit ATCI als Substrat, wurde die Absorption 10 min lang bei 450 nm mit der Referenzwellenlänge 620 nm gemessen, wobei alle 30 s ein Datenpunkt aufgenommen wurde.

Wurde AMQI als Substrat verwendet, wurde im Fluoreszenzplattenlesegerät die Fluoreszenz unter Verwendung des Anregungsfilters bei 355 nm und des Emissionsfilters bei 535 nm gemessen. Die Signale wurden eine Sekunde lang pro Kavität aufgezeichnet. Die Messungen wurden mit einem Abstand von ca. 2 min (Geräte bedingt variabel je nach Plattenbelegung) zehnmal wiederholt.

Die zeitliche Änderung der Absorption bzw. Fluoreszenz wurde um die Autohydrolyse des Substrats ohne Anwesenheit von aktivem Enzym korrigiert, indem in eine Kavität anstelle von Enzymlösung nur Pufferlösung zugegeben wurde. Die verbliebene Enzymaktivität A_{Enzym} wurde aus dem Verhältnis von Absorptions- bzw. Fluoreszenzänderung (ΔA) mit Inhibitor und ohne Inhibitor nach Gleichung 11.4 berechnet.

$$A_{Enzym} [\%] = \frac{\Delta A_{Inhibitor}}{\Delta A_{Blindprobe}} \cdot 100 \quad (11.4)$$

Bei der Offline-Kopplung des Inhibitionstests an die HPLC wurde mit einem Fraktionensammler je ein Tropfen des Eluats in eine Kavität der Mikrotiterplatte gebracht. Ein Tropfen hatte dabei ein Volumen von ca. 25 µL. Es wurden 225 µL Enzymlösung pro Kavität zugegeben und nach einer bestimmten Inhibitionszeit 25 µL an Substrat-Reagenz-Gemisch dazu pipettiert. Analog zu den oben beschriebenen Mikrotiterplattentests wurde die zeitliche Signalveränderung verfolgt, um die verbliebene Enzymaktivität zu bestimmen.

11.3.2 Proteinphosphatasen

Je nach Herkunftsspezies und Hersteller der PP unterschied sich die Durchführung der Enzymtests. Die PP ist weitaus weniger stabil als die AChE und erforderte daher aufwendigere Enzym- und Substratpuffer. Wenn nicht anders in der Bildunterschrift im Ergebnisteil beschrieben, wurden die Tests im unten stehenden Format durchgeführt.

PP1 Proteinphosphatase 1 (PP1, Sigma) lag in lyophilisierter Form vor. Durch Zugabe von wässriger Glycerinlösung (20% v/v) wurde das Enzym rekonstituiert zu einer Stammlösung von ~1350 U/mL (in 250 mM NaCl, 50 mM Imidazol, pH 7.4, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 2 mM MnCl₂, 0.025% Tween-20, 100 mg/ml Trehalose und 20% Glycerin). Aliquote der Stammlösung wurden bei -20°C aufbewahrt und kurz vor der Versuchsdurchführung aufgetaut.

Für den Assay wurde die PP1 in TRIS-PP-Puffer (siehe Abschnitt 10.4) verdünnt. Für die Durchführung des Assays mit pNPP wurde eine 33 mM Lösung von pNPP in TRIS-Substrat-Puffer hergestellt.

Für die Durchführung des Assays mit DiFMUP als Substrat wurde eine 100 µM Lösung in TRIS-Substrat-Puffer aus einer 10 mM Vorverdünnung in TRIS-Puffer (50 mM, pH 7.4) hergestellt.

Für die Erstellung von Kalibrierkurven wurden 70 µL Microcystin-Standardlösung pro Kavität vorgelegt. In der Regel wurde eine Dreifachbestimmung vorgenommen. Es wurden 20 µL Enzymlösung (1:800 verdünnt mit TRIS-PP-Puffer falls Substrat pNPP, 1:6400 verdünnt falls Substrat DiFMUP) pro Kavität dazu pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde für 20 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf der Inhibitionszeit wurden 110 µL Substratlösung zugegeben.

PP2A Proteinphosphatase 2A (PP2A, Promega) lag in einer Konzentration von 500 U/ml in einem MOPS-Puffer (20 mM, pH 7.5 mit 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA, 60 mM 2-Mercaptoethanol, 50% v/v Glycerin) bei -18°C vor.

Für den Inhibitionstest wurde PP2A in MOPS-PP-Puffer (siehe Abschnitt 10.4) verdünnt. In TRIS-Substrat-Puffer wurde eine 14.2 mM pNPP-Lösung hergestellt.

Für die Erstellung von Kalibrierkurven wurden 40 µL Standardlösung (Microcystine oder Okadasäure) pro Kavität vorgelegt. In der Regel wurde eine Dreifachbestimmung vorgenommen. Es wurden 10 µL Enzymlösung (1:60 verdünnt bei der Verwendung von pNPPP) pro Kavität dazu pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf der Inhibitionszeit wurden 150 µL Substratlösung zugegeben.

Bei der Verwendung von pNPP wurde die Absorptionsänderung während eines Zeitraums von 30 min bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Wurde DiFMUP als Substrat verwendet, wurde im Fluoreszenzplattenlesegerät die Fluoreszenz unter der Verwendung des Anregungsfilters bei 355 nm und des Emissionsfilters bei 460 nm gemessen. Die Signale wurden eine Sekunde lang pro Kavität

aufgezeichnet. Die Fluoreszenzänderung innerhalb von 20 min wurde gemessen. Die Auswertung der verbliebenen Enzymaktivität erfolgte analog zum AChE-Inhibitionsassay (vgl. Gleichung 11.4).

11.4 Leuchtbakterientests

Für die Durchführung der Leuchtbakterientests wurde ein kommerziell erhältliches Testkit verwendet, das aus gefriergetrockneten Leuchtbakterien des Stammes *Vibrio fischeri* und einer Rekonstitutionslösung (Glucose/NaCl, gepuffert bei pH 7.0) bestand. Die Reagenzien wurden bei -18°C aufbewahrt und erst unmittelbar vor der Durchführung des Tests aufgetaut.

Die Leuchtbakterien wurden reaktiviert, indem sie vorsichtig in der Rekonstitutionslösung bei Raumtemperatur aufgenommen wurden. Laut Hersteller sollten die Leuchtbakterien bei $+15^{\circ}\text{C}$ rekonstituiert werden. Aufgrund fehlender Thermostatisierung der Messgeräte fiel die Entscheidung auf die Handhabung und Messung der Leuchtbakterien bei Raumtemperatur. Man erhielt eine leicht getübte Lösung. Mit dem bloßen Auge war keine Lumineszenz zu erkennen.

Für die Durchführung des Bakterienhemmtests wurden die Leuchtbakterien mit NaCl-Lösung (2 Gew.-%) verdünnt. Da die Leuchtkraft der Bakterien mit der Zeit stark nachließ, wurden die Stammlösung und Verdünnung bei -4°C aufbewahrt und innerhalb eines Arbeitstages aufgebraucht.

Um inhibitorische Einflüsse auf die Leuchtbakterien zu testen, wurden Leuchtbakterienlösung und Probe bei Raumtemperatur auf einer schwarzen Mikrotiterplatte gemischt. Um den Gesamtgehalt an Natriumchlorid bei 2 Gew.-% zu halten, wurde bei NaCl-freien Proben zusätzlich NaCl zugegeben. Nach Ablauf der Inhibitionszeit wurde am Fluoreszenzreader Wallac die verbliebene Lumineszenz der Bakterien aufgezeichnet. Im Regelfall wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Es wurde für jede Kavität das Lumineszenzsignal für ein Zeitfenster von zehn Sekunden aufgezeichnet. Die Inhibitionszeit betrug 15 min, sofern nichts anderes erwähnt wird. Die genaue Durchführung der Tests mit den jeweiligen genauen Volumina wird in den Bildunterschriften im Ergebnisteil aufgeführt.

12 Chromatographische Methoden

Bei den in diesem Abschnitt angegebenen Methoden handelt es sich um Standardverfahren, die sich als geeignet erwiesen haben und bei den meisten Messungen angewendet wurden. Weichen die Versuchsbedingungen von den hier aufgeführten Methoden ab, so werden die jeweiligen Änderungen im Ergebnisteil aufgeführt.

12.1 HPLC-Trennung von Insektizid-Gemischen

Die HPLC, gekoppelt an den PDA-Detektor, MS und SFEID, wurde an der Anlage der Firma Waters durchgeführt. Im Regelfall wurden 20 μL der Probenlösung mit dem integrierten Autosampler injiziert. Für die Trennung der Insektizide wurde als stationäre Phase meist die RP-Säule Luna der Firma Phenomenex verwendet. Die mobilen Phasen waren Wasser und Methanol. Die Probenlösung wurde in den meisten Fällen durch einen Gradienten getrennt.

12.2 HPLC-Methode für Microcystine

Die HPLC zur Trennung der Microcystinstandards mit UV-Detektion und anschließendem offline durchgeführtem PP-Hemmtest wurde mit der HPLC-Pumpe der Firma Gynkotech durchgeführt. Die Proben wurden jeweils mit einem manuellen Injektionsventil mit 20 μL -Injektionsschleife in das System injiziert und die Absorption mit dem Detektor der Firma Knauer aufgezeichnet. Die automatische Fraktionierung des HPLC-Eluats für die Offline-Kopplung mit dem PP-Hemmtest wurde mit einem programmierbaren Fraktionensammler vorgenommen, der an den Ausgang des UV-Detektors gekoppelt war.

12.3 Online-SPE-HPLC-MS

Für die Anreicherungsexperimente wurde Leitungswasser mit Insektizidstandardlösungen versetzt. Die Anreicherung wurde auf einer Onyx-Vorsäule der Firma Phenomenex und verschiedenen Anreicherungskartuschen der Firma Spark Holland durchgeführt.

Es wurde kein automatisches Probenanreicherungssystem, wie der Prospekt von Spark Holland, benutzt, da aus Vorarbeiten bekannt war, dass es bei diesem System zu einer großen Bandenverbreiterung der eluierenden Analyten auf

Grund der großen Totvolumina des Systems kommt [112]. Die Anreicherung wurde daher mit einem Rheodyne-Schaltventil (10-Port, 2-Wege) mit kleinen Bohrungen (0.25 mm ID) durchgeführt, das manuell geschaltet wurde (Abb. 7.1). Die Lösungsmittel- bzw. Probenauswahl wurde ebenfalls manuell getätigt.

Die Kartuschen bzw. die Vorsäulen wurden jeweils mit 10 mL Methanol gespült. Die Rekonditionierung erfolgte mit 10 mL Wasser. Anschließend wurde das jeweilige Volumen der Trinkwasserprobe, die mit Insektizidstandards versetzt war, über die Pumpe auf die Anreicherungskartusche gegeben. Abschließend wurde nochmals mit 10 mL Wasser gespült und mit Umschalten des Ventils das Elutionsprogramm der chromatographischen Methode gestartet.

Die Wiederfindung der Analyten wurde durch die Fläche des PDA-Signals bei der maximalen Absorptionswellenlänge des Analyten bestimmt. Dazu wurden als Referenzpunkt 20 μL einer Standardlösung mit der Konzentration 20 mg/L mit dem Autosampler injiziert. Anhand der resultierenden Fläche des PDA-Signals wurde durch Dreisatzrechnung das Elutionssignal der angereicherten Insektizidlösung quantifiziert und in Relation zur theoretisch angereicherten Menge gesetzt.

13 Gassegmentierter Enzyminhibitionsdetektor

Verschiedene Aufbauten wurden bei der Entwicklung des Enzyminhibitionsdetektors (EID) verwendet. Prinzipielle Schritte, die bei der Inbetriebnahme des Systems berücksichtigt wurden, sind im Folgenden beschrieben. Detaillierte Beschreibungen zu Bauteilen und Variationen an fluidischen Parametern werden im Ergebnisteil erläutert.

13.1 Enzym- und Substratlösungen

Im EID wurde die Enzyminhibition homogen durchgeführt, d.h. Enzymlösung wurde mit dem Eluat aus der HPLC online zusammen gemischt. Zur Detektion der verbliebenen Aktivität des Enzyms nach einer gewissen Inhibitionszeit wurde das Substrat als Lösung zugemischt. Die Detektion erfolgte dann je nach Substrat mit Absorptions- oder Fluoreszenzdetektor.

Im gassegmentierten EID wurde eine aufgereinigte, rekombinant hergestellte Mutante der AChE von der Nematode *Nippostrongylus brasiliensis* (NbAChE) verwendet. Wenn nicht anders beschrieben, wurde die NbAChE von einer Konzentration von 10 000 U/mL in Nährpuffer auf 10 mU/mL mit TRIS-Puffer (10 mM, pH 8.0) verdünnt.

Bei der Verwendung von ATCI als Substrat wurde ein Gemisch aus ATCI-Lösung (10 mM) und DTNB-Lösung (12.5 mM) zum Enzym-Eluat-Strom zudosiert und anschließend mit einem UV-Vis-Detektor die Absorption bei 412 nm aufgezeichnet. Die Flusszelle im Detektor der Firma Knauer hat ein Totvolumen von 141 nl. Das Substrat-Reagenz-Gemisch wird, wie im Abschnitt 11.3.1 beschrieben, kurz vor der Testdurchführung hergestellt.

Das Substrat AMQI wurde mit einer Konzentration von 5 mM eingesetzt. Die Herstellung der Substratlösung erfolgte wie unter Abschnitt 11.3.1 beschrieben. Das umgesetzte AMQI wurde mit einem Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 403 nm und einer Emissionswellenlänge von 502 nm bei einer Spaltbreite von jeweils 20 nm detektiert. Die Flusszelle des Fluoreszenzdetektors der Firma Jasco hatte ein Totvolumen von 5 μ L.

13.2 Signalauswertung

Eine Integration der negativen Signale war mit der gewöhnlichen Chromatographie-Software (z.B. Chromstar, MassLynx 3.4) nicht möglich. Eine Möglichkeit der Integration gab es mit dem *Peak-Fitting-Module* der Software Origin 7.5. Dies war jedoch durch eine schwierige Anpassung der negativen Pulse mit einer

Funktion aufwendig. Die Inhibitionssignale waren aufgrund der Enzymkinetik nicht gaußförmig. Daher wurde für die Auswertung die Tiefe der Impulse, d.h. der Höhenunterschied zwischen Basislinie und Minimum des Inhibitionssignals herangezogen. Die Basislinie musste zuvor um die Autohydrolyse des Substrats korrigiert werden.

Um das Enzyminhibitionschromatogramm mit den Chromatogrammen von PDA und MS korrelieren zu können, musste das Enzyminhibitionssignal um die Reaktionszeit des EIDs auf der Zeitachse verschoben werden. Bei den jeweiligen Einstellungen des EIDs wurde dabei ein Testlauf mit einem bekannten starken Inhibitor des Enzyms aufgenommen und die zeitliche Differenz des Inhibitionssignals, der UV-Absorption und des Massensignals im Ionen-Chromatogramm ermittelt. Alternativ wurde der AChE-Inhibitor Galantamin als interner Standard zur Probe dazugegeben. Galantamin eluierte im Totvolumen und ermöglichte damit die Ermittlung des zeitlichen Offsets der Chromatogramme.

Die mit der Chromatographie-Software Chromstar (EID) und MassLynx (PDA, MS) aufgenommenen Daten wurden zur Weiterverarbeitung nach Origin 7.5 exportiert. Nach der Korrektur um die zeitliche Verschiebung konnten die Chromatogramme von PDA, MS und EID zur Auswertung übereinandergelegt und verglichen werden.

14 Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden mit dem Elektrospray-Flugzeitmassenspektrometer LCTTM der Firma Micromass (Waters) mit der Software MassLynx 3.4 aufgenommen. Die Ionenquelle wurde, wenn nicht anders beschrieben, im ESI⁺-Modus betrieben.

14.1 MS-Parameter

Für eine Optimierung der Parameter am MS wurde jeweils eine Lösung der zu untersuchenden Substanz mit einer Spritzenpumpe bei einer Flussrate von 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ in das Gerät injiziert. Um eine geeignete Signalstärke zu erhalten, wurde der Analyt jeweils in 50% Methanol mit einer Konzentration von ca. 100 μM gelöst. Die optimierten Einstellungen der verschiedenen, im Ergebnisteil beschriebenen Assays aus Kapitel 8, sind in Tabelle 14.1 aufgeführt.

Tabelle 14.1: ESI⁺-Parameter für LC-MS und Enzyminhibitonsassays

| MS-Parameter | LC-MS | AChE- Assay | ACE- Assay |
|---|---------|----------------|---------------|
| LC-Kapillarspitze [V] | 3000 | 3200 | 3200 |
| Sample Cone [V] | 25 | 30 | 50 |
| RF Lens [V] | 180 | 120 | 120 |
| Extraction Cone [V] | 3 | 2 | 5 |
| Desolvatisierungstemperatur [°C] | 250-300 | 250 | 120 |
| Temperatur der Quelle [°C] | 100-120 | 100 | 100 |
| MCP-Detektor [V] | 2700 | 2700 | 2700 |
| TDC Start [mV] | 800 | 800 | 800 |
| Vernebelungsstickstoffstrom [L/h] | 90-100 | 90 | 90 |
| Desolvatisierungsstickstoffstrom [L/hr] | 300-400 | 300 | 300 |
| Flussrate [$\mu\text{L}/\text{min}$] | 10-70 | 20 | 10 |

14.2 Kalibrierung

Die Kalibrierung des MS erfolgte durch Injektion von 0.1% Phosphorsäure in 50% Acetonitril. Die Kalibrierungsfunktion aus den Phosphorsäureaddukten wurde für einen Massenbereich von 90 bis 500 Da erstellt ($m/z = 98.9847; 196.9616;$

294.9385; 392.9154; 490.8923). Die Kalibrierung musste mit den Parametern durchgeführt werden, mit denen später die zu untersuchende Substanz erfasst wurde. Die *Sample Cone*-Spannung konnte jedoch frei verändert werden, ohne einen Einfluss auf die Kalibrierung zu nehmen. Die Spannung wurde für den gewählten Kalibrierbereich auf 50 V gesetzt.

14.3 Präzise Massenbestimmung

Für eine präzise Massenbestimmung im Bereich von 5 ppm musste neben einer guten Kalibrierfunktion auch eine sogenannte *Lock Mass* bereitgestellt werden, die kleinste Temperaturschwankungen im Gerät ausgleicht und die Kalibrierfunktion entsprechend korrigiert. Als *Lock Mass* wurde eine Lösung von Sulfadimethoxin ($[M+H]^+ = 311.0814$) in 50% Methanol mit einer Konzentration von 5 mg/L verwendet. Kurz vor dem Einlass in das ESI-TOF-MS wurde die *Lock Mass*-Lösung mit einer Spritzenpumpe über ein T-Stück mit einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ zu dem Eluat der LC-Säule mit einem Fluss von 85 $\mu\text{L}/\text{min}$ zudosiert.

14.4 Massenspektrometrische Bestimmung der Enzymaktivität

Der Enzyminhibitionstest wurde auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Anders als bei der Detektion des Substratumsatzes durch Absorptions- oder Fluoreszenzmessung wurde bei der massenspektrometrischen Bestimmung der Inhalt der einzelnen Kavitäten mit einer Spritze aufgezogen und mit einer Spritzenpumpe offline in das ESI-TOF-MS zur Analyse überführt.

Acetylcholinesterase Für die Durchführung eines Enzyminhibitionstests mit massenspektrometrischer Detektion wurde die Stammlösung der NbAChE von 10 000 U/mL mit Ammoniumhydrogencarbonatpuffer (10 mM, pH 7.7) auf eine Aktivität von 10 mU/mL verdünnt. Das Substrat Acetylcholin wurde in Wasser gelöst, um eine Konzentration von 10 mM zu erhalten. Von der Referenzsubstanz Cholin-trimethyl- d_9 wurde eine wässrige Lösung mit der Konzentration 500 nM hergestellt. Von dem Insektizid Carbofuran wurde aus der methanolischen Stammlösung eine Verdünnungsreihe von 10 nM bis 1 mM in Wasser angesetzt.

Als Reaktionsgefäße wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gewählt, da die Verunreinigung der Proben mit Weichmachern im Vergleich zu Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen geringer waren und eine Parallelisierung der Inhibitionsansätze erleichtert wurde. In eine Kavität der Mikrotiterplatte wurden 180 μL Ammoniumhydrogencarbonatpuffer (10 mM, pH 7.7) vorgelegt. Es wurden 30 μL der Cholin-trimethyl- d_9 -Lösung und 30 μL einer Carbofuranstandardlösung dazu pipettiert. Mit der Zugabe von 30 μL der NbAChE-Lösung wurde eine Stoppuhr gestartet, um nach einer Inhibitionszeit von 5 min 30 μL der Acetylcholinlösung zuzugeben. Während der Inhibitionszeit wurde die Mikrotiterplatte geschüttelt. Mit der Zugabe der Acetylcholinlösung wurde wieder die Stoppuhr gestartet und der Inhalt der Kavität mit einer Glasspritze aufgezogen. Der Inhibitionsansatz

wurde mit einer Spritzenpumpe in das ESI-TOF-MS injiziert. Mit den in Tabelle 14.1 aufgeführten Werten wurden die m/z -Signale von umgesetzten Substrat Cholin und Referenz Cholin-trimethyl- d_9 nach einer Substratentwicklungszeit von 5 min detektiert.

Angiotensin-konvertierendes Enzym Eine Stammlösung des Enzyms wurde durch Lösen von einer Unit der lyophilisierten Form in 500 μL ACE-Puffer (siehe Abschnitt 10.4) mit einer Aktivität von 2 U/mL hergestellt. Aliquote wurden bei -20°C aufbewahrt und kurz vor der Versuchsdurchführung aufgetaut. Das Substrat Hippuryl-His-Leu-OH (250 mg) wurde in 10 mL Ammoniumhydrogencarbonatpuffer (10 mM, pH 10 mit NaOH eingestellt) gelöst. Die Substratlösung wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Referenzsubstanz Bz-Ala-OH wurde in Ammoniumhydrogencarbonatpuffer (10 mM, pH 8.0) gelöst, um eine Lösung der Konzentration 10 mmol/L zu erhalten. Weitere Verdünnungen des Substrats und der Referenzsubstanz erfolgten im Ammoniumhydrogencarbonatpuffer (10 mM, pH 8.0).

Wie bei der massenspektrometrischen Enzymaktivitätsbestimmung der AChE wurden auch beim ACE-Assay Substrat-, Enzym- und Referenzlösung zusammengegeben, um bei den in Tabelle 14.1 aufgeführten Parametern den Umsatz des Substrats mit dem ESI-TOF-MS zu ermitteln. Zur Optimierung der Zusammensetzung des Assays wurden verschiedene Konzentrationsverhältnisse der Substanzen eingesetzt.

Im Folgenden wird ein verwendeter Ansatz für den Aktivitätsbeweis von ACE aufgeführt. Abweichende Zusammensetzungen der Versuche auf dem Weg zur Optimierung der massenspektrometrischen Bestimmung von ACE werden detailliert in den Bildunterschriften im Ergebnisteil beschrieben.

Um die Enzymaktivität massenspektrometrisch durch Substratumsatz zu bestimmen, wurden 800 μL TRIS-Puffer (100 mM, pH 8.0) in einem Glasvial vorgelegt. 100 μL der ACE-Lösung (20 mU/mL in Ammoniumhydrogencarbonatpuffer, 10 mM, pH 8.0) und 100 μL der Substratlösung (Hippuryl-His-Leu, 50 mM) wurden zugegeben. Nach einer Substratumsatzzeit von 30 min wurden 395 μL des Ansatzes mit 500 μL Methanol, 100 μL Essigsäure (1%) und 5 μL der Bz-Ala-OH-Lösung (10 mM) versetzt. Die Mischung wurde in einer Spritze aufgezogen und per Spritzenpumpe in das ESI-TOF-MS überführt. Das Signal des umgesetzten Substrats im Verhältnis zum Signal der Referenzlösung wurde aufgezeichnet.

Neben der massenspektrometrischen Bestimmung der ACE-Aktivität wurde als Referenzanalytik eine chromatographische Trennung von Substrat (HHL) und umgesetztem Substrat (Hippursäure) unter den in Tabelle 14.2 aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 14.2: Für den ACE-Aktivitätsnachweis wurden 20 μL des Reaktionsansatzes auf einer C18-Säule (Luna) der Firma Phenomenex mit einer Flussrate von 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ mit untenstehendem Gradientenprogramm getrennt. Die Absorption bei 228 nm wurde detektiert.

| Zeit | Mobile Phase A Wasser mit 0.1% Essigsäure | Mobile Phase B Methanol mit 0.1% Essigsäure |
|---------|---|---|
| 0 min | 90% | 10% |
| 10 min | 70% | 30% |
| 15 min | 70% | 30% |
| 16 min | 10% | 90% |
| 20 min | 10% | 90% |
| 210 min | 90% | 10% |
| 300 min | 90% | 10% |

Abkürzungen

| | |
|------------------------|--|
| ACE | Angiotensin-konvertierendes Enzym (<i>Angiotensin Converting Enzyme</i> , Peptidyl-Dipeptidase A) |
| ADDA | (2S,3S,8S,9S)-3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4E,6E-diensäure |
| AChE | Acetylcholinesterase |
| AMQI | 7-Acetoxy-1-methyl-chinoliniumiodid |
| APCI | <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> |
| ATCI | Acetylthiocholiniodid |
| BCA | <i>Bicinchoninic Acid</i> (zur Bestimmung des Proteingehalts) |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| BzAlaOH | Benzoyl-Alanin |
| DiFMUP | 6,8-Difluoro-4-methylumbelliferylphosphat |
| DTNB | 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (ELLMAN's Reagenz) |
| DTT | D,L-Dithiothreitol |
| EC | <i>Enzyme Commission Number</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| eeAChE | Acetylcholinesterase aus Zitteraal (<i>electric eel</i>) |
| EGTA | Ethylenbis-(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure |
| EID | Enzyminhibitionsdetektor |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| ESI-TOF | Elektrospray-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometer |
| FAB | <i>Fast Atom Bombardment</i> |
| FCS | Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie |
| FDA | Fluoresceindiaceat |
| FDP | Fluoresceindiphosphat |
| FP | Fluoreszenzpolarisation |
| FRET | <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> |
| GC | Gaschromatographie |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure |
| HHL | Hippuryl-Histidyl-Leucin, Hippuryl-His-Leu |
| HPLC | Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie |
| HPTLC | Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie |
| HTS | Hochdurchsatz-Screening |
| IC₅₀ | Testmittelpunkt sigmodaler Kalibrierungskurve; entspricht 50% Inhibition |
| IMER | Reaktor mit immobilisierten Enzymen |
| ITB | Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart |
| LC | Flüssigkeitschromatographie |
| LD₅₀ | Letale Dosis für 50% der Versuchstiere |

| | |
|---------------|---|
| MALDI | <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i> |
| MC | Microcystin |
| MOPS | 3-Morpholin-propansulfonsäure |
| MS | Massenspektrometrie |
| MTP | Mikrotiterplatte |
| MUP | 4-Methylumbelliferylphosphat |
| MZR | Mikrozahnringpumpe |
| NbAChE | Acetylcholinesterase aus dem Nematoden <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> |
| NBS | N-Bromsuccinimid |
| NP | Normalphase |
| PBS | Phosphat-Kochsalzpuffer |
| PDA | Photodiodenarray-Detektor |
| PEEK | Polyetheretherketon |
| PFA | Perfluoralkoxyalkane |
| pNPP | <i>para</i> -Nitrophenylphosphat |
| PP | Proteinphosphatase |
| PTFE | Polytetrafluorethylen |
| RP | Umkehrphase |
| RT | Raumtemperatur |
| SEC | Größenausschlußchromatographie |
| SFEID | Segmentierter-Fluss-Enzyminhibitionsdetektor (<i>Segmented Flow Enzyme Inhibition Detector</i>) |
| SPE | Festphasenextraktion |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TFC | <i>Turbulent Flow Chromatography</i> |
| TRIS | Tris(4-hydroxymethyl)-methylamin |
| UV | Ultraviolett |
| WBA | Wirkungsbezogene Analyse |

Literaturverzeichnis

- [1] R. I. L. Eggen, R. Behra, P. Burkhardt-Holm, B. I. Escher, N. Schweigert. Challenges in Ecotoxicology. *Environ. Sci. Technol.* 38:58A–64A, 2004.
- [2] N. van der Hoeven. Current Issues in Statistics and Models for Ecotoxicological Risk Assessment. *Acta Biotheor.* 52:201–217, 2004.
- [3] M. Farre, D. Barcelo. Toxicity Testing of Wastewater and Sewage Sludge by Biosensors, Bioassays and Chemical Analysis. *Trac-Trends Anal. Chem.* 22:299–310, 2003.
- [4] W. Brack, R. Altenburger. Effektororientierte Identifikation toxischer Verbindungen. *Mitteilungen der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie, GDCH* 2:6–8,21, 2002.
- [5] W. Brack. Effect-directed Analysis: A Promising Tool for the Identification of Organic Toxicants in Complex Mixtures? *Anal. Bioanal. Chem.* 377:397–407, 2003.
- [6] U. Bilitewski, G. Brenner-Weiss, P. D. Hansen, B. Hock, E. Meulenberg, G. Müller, U. Obst, H. Sauerwein, F. W. Scheller, R. Schmid, G. Schnabl, F. Spener. Bioresponse-linked Instrumental Analysis. *Trac-Trends Anal. Chem.* 19:428–433, 2000.
- [7] R. I. L. Eggen, H. Segner. The Potential of Mechanism-based Bioanalytical Tools in Ecotoxicological Exposure and Effect Assessment. *Anal. Bioanal. Chem.* 377:386–396, 2003.
- [8] J. Emnaëus, G. Marko-Varga. Biospecific Detection in Liquid Chromatography. *J. Chrom. A* 703:191–243, 1995.
- [9] I. Heisterkamp, J. Gandrass, W. Ruck. Bioassay-directed Chemical Analysis Utilizing LC-MS: A Tool for Identifying Estrogenic Compounds in Water Samples? *Anal. Bioanal. Chem.* 378:709–715, 2004.
- [10] E. J. Routledge, J. P. Sumpter. Estrogenic Activity of Surfactants and some of their Degradation Products Assessed using a Recombinant Yeast Screen. *Environ. Toxicol. Chem.* 15:241–248, 1996.
- [11] M. Seifert, G. Brenner-Weiss, S. Haindl, M. Nusser, U. Obst, B. Hock. A New Concept for the Bioeffects-related Analysis of Xenoestrogens: Hyphenation of Receptor Assays with LC-MS. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 363:767–770, 1999.

- [12] G. Brenner-Weiss, U. Obst. Approaches to Bioresponse-linked Instrumental Analysis in Water Analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 377:408–416, 2003.
- [13] M. G. Weller. Immunochromatographic Techniques - A Critical Review. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 366:635–645, 2000.
- [14] S. M. van Liempd, J. Kool, J. Reinen, T. Schenk, J. H. N. Meerman, H. Irth, N. P. E. Vermeulen. Development and Validation of a Microsomal Online Cytochrome P450 Bioreactor Coupled to Solid-phase Extraction and Reversed-phase Liquid Chromatography. *J. Chrom. A* 1075:205–212, 2005.
- [15] M. D. L. de Castro, M. C. Herrera. Enzyme Inhibition-based Biosensors and Biosensing Systems: Questionable Analytical Devices. *Biosens. Bioelectron.* 18:279–294, 2003.
- [16] A. Amine, H. Mohammadi, I. Bourais, G. Palleschi. Enzyme Inhibition-based Biosensors for Food Safety and Environmental Monitoring. *Biosens. Bioelectron.* 21:1405–1423, 2006.
- [17] H. A. Fishman, D. R. Greenwald, R. N. Zare. Biosensors in Chemical Separations. *Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Struct.* 27:165–198, 1998.
- [18] A. J. Baeumner. Biosensors for Environmental Pollutants and Food Contaminants. *Anal. Bioanal. Chem.* 377:434–445, 2003.
- [19] T. Reemtsma. Prospects of Toxicity-directed Wastewater Analysis. *Anal. Chim. Acta* 426:279–287, 2001.
- [20] M. I. W. F. Nielen, E. O. van Bennekom, H. H. Heskamp, J. A. van Rhijn, T. F. H. Bovee, L. A. P. Hoogenboom. Bioassay-directed Identification of Estrogen Residues in Urine by Liquid Chromatography Electrospray Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 76:6600–6608, 2004.
- [21] A. Zeck, M. G. Weller, R. Nießner. Multidimensional Biochemical Detection of Microcystins in Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 73:5509–5517, 2001.
- [22] T. F. H. Bovee, R. J. R. Helsdingen, P. D. Koks, H. A. Kuiper, R. L. A. P. Hoogenboom, J. Keijer. Development of a Rapid Yeast Estrogen Bioassay, Based on the Expression of Green Fluorescent Protein. *Gene* 325:187–200, 2004.
- [23] M. W. F. Nielen, T. F. H. Bovee, M. C. van Engelen, P. Rutgers, A. R. M. Hamers, J. A. van Rhijn, L. A. P. Hoogenboom. Urine Testing for Designer Steroids by Liquid Chromatography with Androgen Bioassay Detection and Electrospray Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Identification. *Anal. Chem.* 78:424–431, 2006.

- [24] L. A. A. de Jong, D. R. A. Uges, J. P. Franke, R. Bischoff. Receptor–ligand Binding Assays: Technologies and Applications. *J. Chrom. B* 829:1–25, 2005.
- [25] B. N. Ames, F. D. Lee, W. E. Durston. Improved Bacterial Test System for Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:782–786, 1973.
- [26] W. J. H. Bjorseth, G. Eidsa, J. Gether, L. Landmark, M. Moller. Detection of Mutagens in Complex Samples by the Salmonella Assay Applied Directly on Thin-layer Chromatography Plates. *Science* 215:87–89, 1982.
- [27] V. S. Houk, L. D. Claxton. Screening Complex Hazardous Wastes for Mutagenic Acitvity using a Modified Version of the TLC/Salmonella Assay. *Mutat. Res.* 169:81–92, 1986.
- [28] C. Weins, H. Jork. Toxicological Evaluation of Harmful Substances by In Situ Enzymatic and Biological Detection in High-Performance Thin-layer Chromatography. *J. Chrom. A* 750:403–407, 1996.
- [29] J. E. Moorhouse, R. Yeadon, P. S. Beevor, B. F. Nesbitt. Method for Use in Studies of Insect Chemical Communication. *Nature* 223:1174–1175, 1969.
- [30] <http://wwwuser.gwdg.de/~uffz/forsch/biosens/biosens.html>.
- [31] L. J. Wadhams, M. M. Blight, V. Kerguelen, M. Lemetayer, F. Marionpoll, C. Masson, H. H Phamdelegue, C. M. Woodcock. Discrimination of Oil-seed Rape Volatiles by Honey Bee - Novel Combined Gas-chromatographic Electrophysiological Behavioral Assay. *J. Chem. Ecol.* 20:3221–3231, 1994 zitiert in [17].
- [32] H. A. Fishman, O. Orwar, N. L. Allbritton, B. P. Modi, J. B. Shear, R. H. Scheller, R. N. Zare. Cell-to-cell Scanning in Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* 68:1181–1186, 1996.
- [33] E. Neher, B. Sakmann. Single-channel Currents Recorded from Membrane of Denervated Frog Muscle Fibres. *Nature* 260:799–802, 1976.
- [34] K. Jardemark, C. Farre, I. Jacobson, R. N. Zare, O. Orwar. Screening of Receptor Antagonists using Agonist-activated Patch Clamp Detection in Chemical Separations. *Anal. Chem.* 70:2468–2474, 1998.
- [35] A. G. Hadd, S. C. Jacobson, J. M. Ramsey. Microfluidic Assays of Acetylcholinesterase Inhibitors. *Anal. Chem.* 71:5206–5212, 1999.
- [36] J. Hirata, L. P. Chung, F. Ariese, H. Irth, C. Gooijer. Coupling of Size-exclusion Chromatography to a Continuous Assay for Subtilisin using a Fluorescence Resonance Energy Transfer Peptide Substrate: Testing of Two Standard Inhibitors. *J. Chrom. A* 1081:140–144, 2005.

- [37] M. P. Connor, J. Wang, W. Kubiak. Tissue-based and Microbe-based Electrochemical Detectors for Liquid Chromatography. *Anal. Chim. Acta.* 229:139–143, 1990.
- [38] D. A. van Elswijk, U. P. Schobel, E. P. Lanskyb, H. Irth, J. van der Greef. Rapid Dereplication of Estrogenic Compounds in Pomegranate (*Punica granatum*) using On-line Biochemical Detection Coupled to Mass Spectrometry. *Phytochemistry* 65:233–241, 2004.
- [39] A. J. Oosterkamp, R. van der Hoeven, W. Glassgen, B. König, U. R. Tjaden, J. van der Greef, H. Irth. Gradient Reversed-phase Liquid Chromatography Coupled On-line to Receptor-affinity Detection Based on the Urokinase Receptor. *J. Chrom. B* 715:331–338, 1998.
- [40] E. S. Lutz, H. Irth, U. R. Tjaden, J. van der Greef. Applying Hollow Fibres for Separating Free and Bound Label in Continuous-flow Immunochemical Detection. *J. Chrom. A* 755:179–187, 1996.
- [41] A. J. Oosterkamp, M. T. V. Herraiz, H. Irth, U. R. Tjaden, J. van der Greef. Reversed-phase Liquid Chromatography Coupled On-line to Receptor Affinity Detection Based on the Human Estrogen Receptor. *Anal. Chem.* 68:1201–1206, 1996.
- [42] M. Mazereeuw, C. M. de Best, U. R. Tjaden, H. Irth, J. van der Greef. Free Flow Electrophoresis Device for Continuous On-line Separation in Analytical Systems. An Application in Biochemical Detection. *Anal. Chem.* 72:3881–3886, 2000.
- [43] T. Schenk, A. Molendijk, H. Irth, U. R. Tjaden, J. van der Greef. Liquid Chromatography Coupled On-line to Flow Cytometry for Postcolumn Homogeneous Biochemical Detection. *Anal. Chem.* 75:4272–4278, 2003.
- [44] A. M. Girelli, E. Mattei. Application of Immobilized Enzyme Reactor in On-line High Performance Liquid Chromatography: A Review. *J. Chrom. B* 819:3–16, 2005.
- [45] A. Günther, U. Bilitewski. Characterization of Inhibitors of Acetylcholinesterase by an Automated Amperometric Flow-injection System. *Anal. Chim. Acta* 300:117–125, 1995.
- [46] M.E. Leon-Gonzalez, A. Townshend. Determination of Organophosphorus and Carbamate Pesticide Standards by Liquid Chromatography with Detection by Inhibition of Immobilized Acetylcholinesterase. *J. Chrom.* 539:47–54, 1991.
- [47] K. Ingkaninan, C. M. de Best, R. van der Heijden, A. J. P. Hofte, B. Karabatak, H. Irth, U. R. Tjaden, J. van der Greef, R. Verpoorte. High-Performance Liquid Chromatography with On-line Coupled UV, Mass Spectrometric and Biochemical Detection for Identification of Acetylcholinesterase Inhibitors from Natural Products. *J. Chrom. A* 872:61–73, 2000.

- [48] I. K. Rhee, N. Appels, B. Hofte, B. Karabatak, C. Erkelens, L. M. Stark, L. A. Flippin, R. Verpoorte. Isolation of the Acetylcholinesterase Inhibitor Ungeremine from *Nerine Bowdenii* by Preparative HPLC Coupled On-line to a Flow Assay System. *Biol. Pharm. Bull.* 27:1804–1809, 2004.
- [49] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, R. M. Featherstone. A new and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88, 1961.
- [50] I. K. Rhee, N. Appels, T. Luijendijk, H. Irth, R. Verpoorte. Determining Acetylcholinesterase Inhibitory Activity in Plant Extracts using a Fluorimetric Flow Assay. *Phytochem. Anal.* 14:145–149, 2003.
- [51] H. A. Moye, T. E. Wade. A Fluorometric Enzyme-Inhibition Detector for Carbamate Pesticide Analysis by High-Speed Liquid-Chromatography. *Anal. Lett.* 9:891–920, 1976.
- [52] T. Schenk, N. Appels, D. A. van Elswijk, H. Irth, U. R. Tjaden, J. van der Greef. A Generic Assay for Phosphate-consuming or -releasing Enzymes Coupled On-line to Liquid Chromatography for Lead Finding in Natural Products. *Anal. Biochem.* 316:118–126, 2003.
- [53] D. A. van Elswijk, O. Diefenbach, S. van der Berg, H. Irth, U. R. Tjaden, J. van der Greef. Rapid Detection and Identification of Angiotensin-converting Enzyme Inhibitors by On-line Liquid Chromatography-Biochemical Detection, Coupled to Electrospray Mass Spectrometry. *J. Chrom. A* 1020:45–58, 2003.
- [54] A. R. de Boer, T. Letzel, D. A. van Elswijk, H. Lingeman, W. M. A. Niessen, H. Irth. On-line Coupling of High-Performance Liquid Chromatography to a Continuous-flow Enzyme Assay Based on Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 76:3155–3161, 2004.
- [55] C. F. de Jong, R. J. E. Derks, B. Bruyneel, W. Niessen, H. Irth. High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-based Acetylcholinesterase Assay for the Screening of Inhibitors in Natural Extracts. *J. Chrom. A* 1112:303–310, 2006.
- [56] P. Taylor. The Cholinesterases. *J. Biol. Chem.* 266:4025–4028, 1991.
- [57] P. Christen, R. Jaussi. *Biochemie*. Springer, Heidelberg, 2005.
- [58] T. L. Rosenberry. Acetylcholinesterase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 43:103–218, 1975 zitiert in [256].
- [59] M. Harel, D. M. Quinn, H. K. Nair, I. Silman, J. L. Sussman. The X-ray Structure of a Transition State Analog Complex Reveals the Molecular Origins of the Catalytic Power and Substrate Specificity of Acetylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.* 118:2340–2346, 1996.

- [60] P. Taylor, Z. Radic. The Cholinesterases: From Genes to Proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34:281–320, 1994.
- [61] J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolov, C. Oeffner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman. Atomic Structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a Prototypic Acetylcholinesterase-binding Protein. *Science* 253:872–879, 1991.
- [62] A. Ordentlich, D. Barak, C. Kronman, N. Ariel, Y. Segall, B. Velan, A. Shaf-ferman. The Architecture of Human Acetylcholinesterase Active Center Probed by Interactions with Selected Organophosphate Inhibitors. *J. Biol. Chem.* 271:11953–11962, 1996.
- [63] H. Soreq, S. Seidman. Acetylcholinesterase — New Roles for an Old Actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:294–302, 2001.
- [64] Z. Radic, N. A. Pickering, D. C. Vellom, S. Camp, P. Taylor. Three Distinct Domains in the Cholinesterase Molecule Confer Selectivity for Acetyl- and Butyrylcholinesterase Inhibitors. *Biochemistry* 32:12074–12084, 1993.
- [65] P. Taylor, Z. Radic, N. A. Hosea, S. Camp, P. Marchot, H. A. Berman. Structural Bases for the Specificity of Cholinesterase Catalysis and Inhibition. *Toxicol. Lett.* 82/83:453–458, 1995.
- [66] W. N. Aldridge. Some Properties of Specific Cholinesterase with Particular Reference to the Mechanism of Inhibition by Diethyl p-Nitrophenyl Thiophosphate (E 605) and Analogues. *Biochem. J.* 46:451–456, 1950.
- [67] F. Worek, H. Thiermann, L. Szinicz, P. Eyer. Kinetic Analysis of Interactions Between Human Acetylcholinesterase, Structurally Different Organophosphorus Compounds and Oximes. *Biochem. Pharmacol.* 68:2237–2248, 2004.
- [68] E. Shek, T. Higuchi, B. Bodor. Improved Delivery Through Biological Membranes. 3. Delivery of n-Methylpyridinium-2-carbaldoxime Chloride Through the Blood-Brain Barrier in its Dihydropyridine Pro-drug Form. *J. Med. Chem.* 19:113–117, 1976.
- [69] G.J. Hart, O'Brien R.D. Recording Spectrophotometric Method for Determination of Dissociation and Phosphorylation Constants for the Inhibition of Acetylcholinesterase by Organophosphates in the Presence of Substrate. *Biochemistry* 12:2940–2945, 1973.
- [70] M. Ozmen, S. Sener, A. Mete, H. Kucukbay. In Vitro and In Vivo Acetylcholinesterase-inhibiting Effect of New Classes of Organophosphorous Compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 18:241–246, 1999.
- [71] P. Herzsprung. Methodische Grundlagen des Nachweises und der Bestimmung von insektiziden Phosphorsäureestern und Carbamaten im Wasser mittels Cholinesterasehemmung. *Dissertation*, Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften, Technische Universität München, 1991.

- [72] H. Schulze, R. D. Schmid, T. T. Bachmann. Activation of Phosphorothionate Pesticides Based on a Cytochrome P450 BM-3 (CYP102 A1) Mutant for Expanded Neurotoxin Detection in Food using Acetylcholinesterase Biosensors. *Anal. Chem.* 76:1720–1725, 2004.
- [73] P. J. Houghton, Y. H. Ren, M. J. Howes. Acetylcholinesterase Inhibitors from Plants and Fungi. *Nat. Prod. Rep.* 23:181–199, 2006.
- [74] W. W. Carmichael. The Cyanotoxins. *Adv. Bot. Res.* 27:211–256, 1997.
- [75] S. Matsunaga, R. E. Moore, W. P. Niemczura, W. W. Carmichael. Anatoxin-a(S), a Potent Anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *J. Am. Chem. Soc.* 111:8021–8023, 1989.
- [76] F. Villatte, H. Schulze, R. D. Schmid, T. T. Bachmann. A Disposable Acetylcholinesterase-based Electrode Biosensor to Detect Anatoxin-a(S) in Water. *Anal. Bioanal. Chem.* 372:322–326, 2002.
- [77] E. Hyde, W. W. Carmichael. Anatoxin-a(S), a Naturally-occurring Organophosphate, is an Irreversible Active Site-directed Inhibitor of Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7). *J. Biochem. Toxicol.* 6:195–201, 1991.
- [78] M. Heinrich, H. L. Teoh. Galanthamine from Snowdrop — the Development of a Modern Drug against Alzheimer’s Disease from Local Caucasian Knowledge. *J. Ethnopharmacol.* 92:147–162, 2004.
- [79] B. Ibach, E. Haen. Acetylcholinesterase Inhibition in Alzheimer’s Disease. *Curr. Pharm. Design* 10:231–251, 2004.
- [80] P. Eyer, F. Worek, D. Kiderlen, G. Sinko, A. Stuglin, V. Simeon-Rudolf, E. Reiner. Molar Absorption Coefficients for the Reduced Ellman Reagent: Reassessment. *Anal. Biochem.* 312:224–227, 2003.
- [81] I. K. Rhee, R. M. van Rijn, R. Verpoorte. Qualitative Determination of False-Positive Effects in the Acetylcholinesterase Assay using Thin Layer Chromatography. *Phytochem. Anal.* 14:127–131, 2003.
- [82] R. T. Andres, R. Narayanaswamy. Fibre-optic Pesticide Biosensor Based on Covalently Immobilized Acetylcholinesterase and Thymol Blue. *Talanta* 44:1335–1352, 1997.
- [83] H. Tsai, R. Doong. Simultaneous Determination of pH, Urea, Acetylcholine and Heavy Metals using Array-based Enzymatic Optical Biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 20:1796–1804, 2005.
- [84] S. Jin, Z. Xu, J. Chen, X. Liang, Y. Wu, X. Qian. Determination of Organophosphate and Carbamate Pesticides Based on Enzyme Inhibition using a pH-sensitive Fluorescence Probe. *Anal. Chim. Acta.* 523:117–123, 2004.

- [85] A. N. Diaz, F. G. Sanchez, V. Bracho, J. Lovillo, A. Aguilar. Enzymatic Determination of Fenitrothion by Cholinesterase and Acetylcholinesterase on Fluorogenic Substrates. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 357:958–961, 1997.
- [86] A. K. Prince. Spectrophotometric Study of the Acetylcholinesterase-catalyzed Hydrolysis of 1-Methyl-Acetoxyquinolinium Iodides. *Arch. Biochem. Biophys.* 113:195–204, 1966.
- [87] S. Birman. Determination of Acetylcholinesterase Activity by a new Chemiluminescence Assay with the Natural Substrate. *Biochem. J.* 225:825–828, 1985.
- [88] P. Moris, I. Alexandre, M. Roger, J. Remacle. Chemiluminescence Assays of Organophosphorus and Carbamate Pesticides. *Anal. Chim. Acta* 302:53–59, 1995.
- [89] M. Guardigli, P. Pasini, M. Mirasoli, A. Leoni, A. Andreani, A. Roda. Chemiluminescent High-Throughput Microassay for Evaluation of Acetylcholinesterase Inhibitors. *Anal. Chim. Acta* 535:139–144, 2005.
- [90] S. Sabelle, P.-Y. Renard, K. Pecorella, S. de Suzzoni-Dézard, C. Créminon, J. Grassi, C. Mioskowski. Design and Synthesis of Chemiluminescent Probes for the Detection of Cholinesterase Activity. *J. Am. Chem. Soc.* 124:4874–4880, 2002.
- [91] S. Andreescu, J. L. Marty. Twenty Years Research in Cholinesterase Biosensors: From Basic Research to Practical Applications. *Biomol. Eng.* 23:1–15, 2006.
- [92] H. Schulze, S. Vorlova, F. Villatte, T. T. Bachmann, R. D. Schmid. Design of Acetylcholinesterases for Biosensor Applications. *Biosens. Bioelectron.* 18:201–209, 2003.
- [93] O. Schäfer, L. Weil, R. Nießner. Bestimmung von Phosphorpestiziden und insektiziden Carbamaten mittels Cholinesterasehemmung. *Vom Wasser* 82:233–246, 1994.
- [94] T. T. Bachmann, B. Leca, F. Vilatte, J. L. Marty, D. Fournier, R. D. Schmid. Improved Multianalyte Detection of Organophosphates and Carbamates with Disposable Multielectrode Biosensors using Recombinant Mutants of *Drosophila* Acetylcholinesterase and Artificial Neural Networks. *Biosens. Bioelectron.* 15:193–201, 2000.
- [95] B. Bucur, M. Dondoi, A. Danet, J.-L. Marty. Insecticide Identification using a Flow Injection Analysis System with Biosensors Based on Various Cholinesterases. *Anal. Chim. Acta* 539:195–201, 2005.
- [96] E. Devic, D. H. Li, A. Dauta, P. Henriksen, G. A. Codd, J. L. Marty, D. Fournier. Detection of Anatoxin-a(S) in Environmental Samples of Cyanobacteria by using a Biosensor with Engineered Acetylcholinesterases. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4102–4106, 2002.

- [97] K. A. Ramsteiner, W. D. Hörmann. Coupling High-Pressure Liquid-Chromatography with a Cholinesterase Inhibition Autoanalyzer for Determination of Organophosphate and Carbamate Insecticide Residues. *J. Chrom.* 104:438–442, 1975.
- [98] K. B. Sipponen. Detector for Organophosphorus Compounds in Liquid-Chromatography Based on the Cholinesterase Inhibition Reaction. *J. Chrom.* 389:87–94, 1987.
- [99] N. Mionetto, J. L. Marty, I. Karube. Acetylcholinesterase in Organic-solvents for the Detection of Pesticides - Biosensor Application. *Biosens. Bioelectron.* 9:463–470, 1994.
- [100] L. N. Johnson. The Effects of Phosphorylation on the Structure and Function of Proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22:199–232, 1993.
- [101] P. Cohen. The Structure and Regulation of Protein Phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 58:453–508, 1989.
- [102] P. Cohen. The Role of Protein Phosphorylation in Human Health and Disease. *Eur. J. Biochem.* 268:5001–5010, 2001.
- [103] P. Cohen. Protein Kinases - the Major Drug Targets of the Twenty-first Century? *Nat. Rev. Drug Discov.* 1:309–315, 2002.
- [104] T. A. Millward, S. Zolnierowicz, B. A. Hemmings. Regulation of Protein Kinase Cascades by Protein Phosphatase 2A. *Trends Biochem. Sci.* 24:186–191, 1999.
- [105] D. G. Hardie. Analysis of Signal Transduction Pathways using Protein-Serine/Threonine Phosphatase Inhibitors. In D. G. Hardie (Hg.), *Protein Phosphorylation - A Practical Approach*, Kap. 3, S. 53–67. Oxford University Press, Oxford, 1999.
- [106] C. MacKintosh, G. Moorhead. Assay and Purification of Protein (Serine/Threonine) Phosphatases. In D. G. Hardie (Hg.), *Protein Phosphorylation - A Practical Approach*, Kap. 7, S. 153–181. Oxford University Press, Oxford, 1999.
- [107] International Human Genome Sequencing Consortium. Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome. *Nature* 409:860–921, 2001.
- [108] P. T. W. Cohen. Protein Phosphatase 1 - Targeted in Many Directions. *J. Cell Sci.* 115:241–256, 2002.
- [109] A. Takai, K. Sasaki, H. Nagai, G. Mieskes, M. Isobe, K. Isono, T. Yasumoto. Inhibition of Specific Binding of Okadaic Acid to Protein Phosphatase 2A by Microcystin-LR, Calyculin-A and Tautomycin: Method of Analysis of Interactions of Tight-binding Ligands with Target Protein. *Biochem. J.* 306:657–665, 1995.

- [110] S. Haider, V. Naithani, P. N. Viswanathan, P. Kakkar. Cyanobacterial Toxins: a Growing Environmental Concern. *Chemosphere* 52:1–21, 2003.
- [111] A. Zeck, M. G. Weller, D. Bursill, R. Nießner. Generic Microcystin Immunoassay Based on Monoclonal Antibodies against Adda. *Analyst* 126:2002–2007, 2001.
- [112] A. Zeck. *Entwicklung von immunoanalytischen, chromatographischen und massenspektrometrischen Methoden zur Bestimmung cynobakterieller Hepatotoxine (Microcystine und Nodularine)*. Dissertation, Fakultät für Chemie, 2001.
- [113] I. R. Falconer. Is There a Human Health Hazard from Microcystins in the Drinking Water Supply? *Acta hydrochim. hydrobiol.* 33:64–71, 2005.
- [114] M. Craig, H. A. Luu, T. L. McCready, D. Williams, R. J. Andersen, C. F. B. Holmes. Molecular Mechanisms Underlying the Interaction of Motuporin and Microcystins with Type-1 and Type-2A Protein Phosphatases. *Biochem. Cell Biol.* 74:569–578, 1996.
- [115] J. Goldberg, H. B. Huang, Y. G. Kwon, P. Greengard, A. C. Nairn, J. Kuriyan. Three-dimensional Structure of the Catalytic Subunit of Protein Serine/Threonine Phosphatase-1. *Nature* 376:745–753, 1995.
- [116] M. M. Gehringer. Microcystin-LR and Okadaic Acid-induced Cellular Effects: a Dualistic Response. *FEBS Lett.* 557:1–8, 2004.
- [117] J. E. Eriksson, D. Toivola, J. A. O. Meriluoto, H. Karaki, Y. G. Han, D. Hartshorne. Hepatocyte Deformation Induced by Cyanobacterial Toxins Reflects Inhibition of Protein Phosphatases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173:1347–1353, 1990.
- [118] M. Runnegar, N. Berndt, N. Kaplowitz. Microcystin Uptake and Inhibition of Protein Phosphatases: Effects of Chemoprotectants and Self-inhibition in Relation to Known Hepatic Transporters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 134:264–272, 1995.
- [119] S. Pouria, A. de Andrade, J. Barbosa, R. L. Cavalcanti, V. T. S. Barreto, C. J. Ward, W. Preiser, G. K. Poon, G. H. Neild, G. A. Codd. Fatal Microcystin Intoxication in Haemodialysis Unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 352:21–26, 1998.
- [120] J. K. Fawell, R.E. Mitchell, D. J. Everett, R. E. Hill. The Toxicity of Cyanobacterial Toxins in the Mouse: I Microcystin-LR. *Hum. Exp. Toxicol.* 18:162–167, 1999.
- [121] R. Nishiwaki-Matsushima, T. Otha, S. Nishiwaki, M. Suganuma, Kohyama. K., T. Ishikawa, W. W. Carmichael, H. Fujiki. Liver Tumor Promotion by the Cyanobacterial Cyclic Peptide Toxin Microcystin-LR. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 118:420–424, 1992.

- [122] Y. Ueno, S. Nagata, T. Tsutsumi, A. Hasegawa, M. F. Watanabe, H.-D. Park, G.-C. Chen, G. Chen, S.-Z. Yu. Detection of Microcystins, a Blue-green Algal Hepatotoxin, in Drinking Water Sampled in Haimen and Fusui, Endemic Areas of Primary Liver Cancer in China, by Highly Sensitive Immunoassay. *Carcinogenesis* 17:1317–1321, 1996.
- [123] M. Sekijima, T. Tsutsumi, T. Yoshida, T. Harada, F. Tashiro, G. Chen, S.-Z. Yu, Y. Ueno. Enhancement of Glutathione S-Transferase Placental-form Positive Liver Cell Foci Development by Microcystin-LR in Aflatoxin B1-initiated Rats. *Carcinogenesis* 20:161–165, 1999.
- [124] R. E. Honkanen, J. Zwiller, R. E. Moore, S. L. Daily, B. S. Khatra, M. Dukelow, A. L. Boynton. Characterization of Microcystin-LR, a Potent Inhibitor of Type 1 and Type 2A Protein Phosphatase. *J. Biol. Chem.* 265:19401–19404, 1990.
- [125] T. Heresztyn, B. C. Nicholson. Determination of Cyanobacterial Hepatotoxins Directly in Water using a Protein Phosphatase Inhibition Assay. *Water Res.* 35:3049–3056, 2001.
- [126] J. An, W. W. Carmichael. Use of a Colorimetric Protein Phosphatase Inhibition Assay and Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Study of Microcystins and Nodularins. *Toxicon* 32:1495–1507, 1994.
- [127] C. J. Ward, K. A. Beattie, E. Y. C. Lee, G. A. Codd. Colorimetric Protein Phosphatase Inhibition Assay of Laboratory Strains and Natural Blooms of Cyanobacteria: Comparisons with High-Performance Liquid Chromatographic Analysis for Microcystins. *FEMS Microbiol. Lett.* 153:465–473, 1997.
- [128] T. Heresztyn, B. C. Nicholson. A Colorimetric Protein Phosphatase Inhibition Assay for the Determination of Cyanobacterial Peptide Hepatotoxins Based on the Dephosphorylation of Phosvitin by Recombinant Protein Phosphatase 1. *Environ. Toxicol.* 16:242–252, 2001.
- [129] B. Wirsing, T. Flury, C. Wiedner, U. Neumann, J. Weckesser. Estimation of the Microcystin Content in Cyanobacterial Field Samples from German Lakes using the Colorimetric Protein-Phosphatase Inhibition Assay and RP-HPLC. *Environ. Toxicol.* 14:23–29, 1999.
- [130] O. I. Fontal, M. R. Vieytes, J. M. V. Baptista de Sousa, M. C. Louzao, L. M. Botana. A Fluorescent Microplate Assay for Microcystin-LR. *Anal. Biochem.* 269:289–296, 1999.
- [131] J. Rapala, K. Erkomaa, J. Kukkonen, K. Sivonen, K. Lahti. Detection of Microcystins with Protein Phosphatase Inhibition Assay, High-Performance Liquid Chromatography-UV Detection and Enzyme-linked Immunosorbent Assay - Comparison of Methods. *Anal. Chim. Acta* 466:213–231, 2002.
- [132] J. E. Noble, P. Ganju, A. E. G. Cass. Fluorescent Peptide Probes for High-Throughput Measurement of Protein Phosphatases. *Anal. Chem.* 75:2042–2047, 2003.

- [133] C. Rivasseau, P. Racaud, A. Deguin, M. C. Hennion. Development of a Bio-analytical Phosphatase Inhibition Test for the Monitoring of Microcystins in Environmental Water Samples. *Anal. Chim. Acta* 394:243–257, 1999.
- [134] B. S. F. Wong, P. K. S. Lam, L. H. Xu, Y. Y. Zhang, B. J. Richardson. A Colorimetric Assay for Screening Microcystin Class Compounds in Aquatic Systems. *Chemosphere* 38:1113–1122, 1999.
- [135] C. Robillot, M. C. Hennion. Issues Arising when Interpreting the Results of the Protein Phosphatase 2A Inhibition Assay for the Monitoring of Microcystins. *Anal. Chim. Acta* 512:339–346, 2004.
- [136] T. P. Geladopoulos, T. G. Sotiroidis, A. E. Evangelopoulos. A Malachite Green Colorimetric Assay for Protein Phosphatase-activity. *Anal. Biochem.* 192:112–116, 1991.
- [137] A. R. Fathi, A. Krautheim, S. Lucke, K. Becker, H. J. Steinfelder. Nonradioactive Technique to Measure Protein Phosphatase 2A-like Activity and its Inhibition by Drugs in Cell Extracts. *Anal. Biochem.* 310:208–214, 2002.
- [138] M.R. Webb. A Continuous Spectrophotometric Assay for Inorganic Phosphate and for Measuring Phosphate Release Kinetics in Biological Systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4884–4887, 1992.
- [139] Q. Cheng, Z.-X. Wang, S.D. Killillea. A Continuous Spectrophotometric Assay for Protein Phosphatases. *Anal. Biochem.* 226:68–73, 1995.
- [140] M. R. Vieytes, O. I. Fontal, F. Leira, J. M. V. Baptista de Sousa, L. M. Botana. A Fluorescent Microplate Assay for Diarrheic Shellfish Toxins. *Anal. Biochem.* 248:258–264, 1997.
- [141] W.-C. Sun, K. R. Gee, R. P. Haugland. Synthesis of novel Fluorinated Coumarins: Excellent UV-light Excitable Fluorescent Dyes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8:3107–3110, 1998.
- [142] M. S. Yang, P. K. S. Lam, M. H. Huang, B. S. F. Wong. Effects of Microcystins on Phosphorylase-a Binding to Phosphatase-2A: Kinetic Analysis by Surface Plasmon Resonance Biosensor. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* 1427:62–73, 1999.
- [143] M. Campas, D. Szydlowska, M. Trojanowicz, J.-L. Marty. Towards the Protein Phosphatase-based Biosensor for Microcystin Detection. *Biosens. Bioelectr.* 20:1520–1530, 2005.
- [144] D. Szydlowska, M. Campas, J. L. Marty, M. Trojanowicz. Catechol Monophosphate as a New Substrate for Screen-printed Amperometric Biosensors with Immobilized Phosphatases. *Sens. Actuators B* 113:787–796, 2006.
- [145] A. T. R. Sim, L.-M. Mudge. Protein Phosphatase Activity in Cyanobacteria: Consequences for Microcystin Toxicity Analysis. *Toxicon* 31:1179–1186, 1993.

- [146] J. S. Metcalf, S. G. Bell, G. A. Codd. Colorimetric Immune-Protein Phosphatase Inhibition Assay for Specific Detection of Microcystins and Nodularins of Cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:904–909, 2001.
- [147] K. Sivonen, G. Jones. Cyanobacterial Toxins. In I. Chorus, J. Bartram (Hg.), *Toxic Cyanobacteria in Water - A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, London, 1999.
- [148] C. Rivasseau, M. C. Hennion. Potential of Immunoextraction Coupled to Analytical and Bioanalytical Methods (Liquid Chromatography, ELISA Kit and Phosphatase Inhibition Test) for an Improved Environmental Monitoring of Cyanobacterial Toxins. *Anal. Chim. Acta* 399:75–87, 1999.
- [149] P. M. Ortea, O. Allis, B. M. Healy, M. Lehane, A. Ni Shuilleabhain, A. Furey, K. J. James. Determination of Toxic Cyclic Heptapeptides by Liquid Chromatography with Detection using Ultra-violet, Protein Phosphatase Assay and Tandem Mass Spectrometry. *Chemosphere* 55:1395–1402, 2004.
- [150] I. E. Tothill, A. P. F. Turner. Developments in Bioassay Methods for Toxicity Testing in Water Treatment. *Trac-Trends Anal. Chem.* 15:178–188, 1996.
- [151] S. Parvez, C. Venkataraman, S. Mukherji. A Review on Advantages of Implementing Luminescence Inhibition Test (*Vibrio fischeri*) for Acute Toxicity Prediction of Chemicals. *Environ. Int.* 32:265–268, 2006.
- [152] L. F. Greer, A. A. Szalay. Imaging of Light Emission from the Expression of Luciferases in Living Cells and Organisms: a Review. *Luminescence* 17:43–74, 2002.
- [153] I. Bronstein, J. Fortin, P. E. Stanley, G. S. A. B. Stewart, L. J. Kricka. Chemiluminescent and Bioluminescent Reporter Gene Assays. *Anal. Biochem.* 219:169–181, 1994.
- [154] <http://www.lifesci.ucsb.edu/~biolum/chem/detail2.html>.
- [155] R. J. Ellis, A. G. Wright. Optimal Use of Photomultipliers for Chemiluminescence and Bioluminescence Applications. *Luminescence* 14:11–18, 1999.
- [156] 3 DIN EN ISO 11348-1, 2. Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest). Beuth Verlag GmbH, Berlin, 1999.
- [157] L. Bendriaa, P. Picart, P. Daniel, H. Horry, M. J. Durand, G. Thouand. Versatile Device for On-line and In-situ Measurement of Growth and Light Production of Bioluminescent Cells. *Sens. Actuator B* 103:115–121, 2004.
- [158] K. L. E. Kaiser. Correlations of *Vibrio fischeri* Bacteria Test Data with Bioassay Data for other Organisms. *Environ. Health Perspect.* 106, Suppl. 2:583–591, 1998.

- [159] N. S. Kudryasheva. Bioluminescence and Exogenous Compounds: Physico-chemical Basis for Bioluminescent Assay. *J. Photochem. Photobiol. B* 83:77–86, 2006.
- [160] M. T. D. Cronin, T. W. Schultz. Structure–Toxicity Relationships for Three Mechanisms of Action of Toxicity to *Vibrio fischeri*. *Ecotox. Environ. Safte.* 39:65–69, 1998.
- [161] V. L. K. Jennings, M. H. Rayner-Brandes, D. J. Bird. Assessing Chemical Toxicity with the Bioluminescent Photobacterium (*Vibrio fischeri*): A Comparison of Three Commercial Systems. *Water Res.* 35:3448–3456, 2001.
- [162] S. Nagata, X. J. Zhou. Analyses of Factors to Affect the Bioassay System using Luminescent Bacterium *Vibrio fischeri*. *J. Health Sci.* 52:9–16, 2006.
- [163] M. Salizzato, B. Pavoni, A. V. Ghirardini, P. F. Ghatti. Sediment Toxicity Measured using *Vibrio fischeri* as Related to the Concentrations of Organic (PCBs, PAHs) and Inorganic (Metals, Sulphur) Pollutants. *Chemosphere* 36:2949–2968, 1998.
- [164] T. Reemtsma, O. Fiehn, M. Jekel. A Modified Method for the Analysis of Organics in Industrial Wastewater as Directed by their Toxicity to *Vibrio fischeri*. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 363:771–776, 1999.
- [165] O. Fiehn, L. Vigelahn, G. Kalnowski, T. Reemtsma, M. Jekel. Toxicity-directed Fractionation of Tannery Wastewater using Solid-phase Extraction and Luminescence Inhibition in Microtiter Plates. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 25:11–16, 1997.
- [166] M. B. Gu, G. C. Gil. A Multi-channel Continuous Toxicity Monitoring System using Recombinant Bioluminescent Bacteria for Classification of Toxicity. *Biosens. Bioelectron.* 16:661–666, 2001.
- [167] J. H. Lee, M. B. Gu. An Integrated Mini Biosensor System for Continuous Water Toxicity Monitoring. *Biosens. Bioelectron.* 20:1744–1749, 2005.
- [168] S. Moore, W. H. Stein. Photometric Ninhydrin Method for Use in the Chromatography of Amino Acids. *J. Biol. Chem.* 176:367–388, 1948.
- [169] I. S. Krull. *Reaction Detection in Liquid Chromatography*. Marcel Dekker, New York, 1986.
- [170] U. A. T. Brinkman, R. W. Frei, H. Lingeman. Post-column Reactors for Sensitive and Selective Detection in High-Performance Liquid-Chromatography - Categorization and Applications. *J. Chrom. B* 492:251–298, 1989.
- [171] R. W. Frei, A. H. M. T. Scholten. Reaction Detectors in HPLC. *J. Chrom. Sci.* 17:152–160, 1979.

- [172] A. Manz, N. Graber, H. M. Widmer. Miniaturized Total Chemical-Analysis Systems - a Novel Concept for Chemical Sensing. *Sens. Actuators B* 1:244–248, 1990.
- [173] D. R. Reyes, D. Iossifidis, P.-A. Auroux, A. Manz. Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology. *Anal. Chem.* 74:2623–2636, 2002.
- [174] P.-A. Auroux, D. Iossifidis, D. R. Reyes, A. Manz. Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical Standard Operations and Applications. *Anal. Chem.* 74:2637–2652, 2002.
- [175] J. L. Edwards, R. Bauman, D. M. Spence. Air Segmented Continuous Flow Analysis in Microbore Tubing. *Anal. Chim. Acta* 401:209–214, 1999.
- [176] S. C. Jakeway, A. J. de Mello, E. L. Russell. Miniaturized Total Analysis Systems for Biological Analysis. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 366:525–539, 2000.
- [177] K. F. Jensen. Microreaction Engineering – Is Small Better? *Chem. Eng. Sci.* 56:293–303, 2001.
- [178] A. J. Pope, U. M. Haupts, K. J. Moore. Homogeneous Fluorescence Readouts for Miniaturized High-Throughput Screening: Theory and Practice. *Drug Discov. Today* 4:350–362, 1999.
- [179] N.-T. Nguyen, S. T. Wereley. *Fundamentals and Applications of Microfluidics*. Artech House, Norwood, MA (USA), 2002.
- [180] U. Bilitewski, M. Genrich, S. Kadow, G. Mersal. Biochemical Analysis with Microfluidic Systems. *Anal. Bioanal. Chem.* 377:556–569, 2003.
- [181] H. Engelhardt, W. Beck, J. Kohr, T. Schmitt. Capillary Electrophoresis - Methods and Scope. *Angew. Chem.-Int. Edit.* 32:629–649, 1993.
- [182] C. Gerthsen. *Physik*. Springer-Verlag, Berlin, 1997.
- [183] R. L. Mott. *Applied Fluid Mechanics*. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ (USA), 2000.
- [184] R. S. Deelder, M. G. F. Kroll, A. J. B. Beeren, J. H. M. van den Berg. Post-column Reactor Systems in Liquid-Chromatography. *J. Chrom.* 149:669–682, 1978.
- [185] V. R. Meyer. *Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern*. Hüthig Verlag, Heidelberg, 1996.
- [186] R. S. Deelder, A. T. J. M. Kuijpers, J. H. M. van den Berg. Evaluation and Comparison of Reaction Detectors. *J. Chrom.* 255:545–561, 1983.
- [187] H. C. Berg. *Random Walks in Biology*. Princeton University Press, Princeton, NJ (USA) 1993.

- [188] L. E. Locascio. Microfluidic Mixing. *Anal. Bioanal. Chem.* 379:325–327, 2004.
- [189] G. G. Yaralioglu, I. O. Wygant, T. C. Marentis, B. T. Khuri-Yakub. Ultrasonic Mixing in Microfluidic Channels using Integrated Transducers. *Anal. Chem.* 76:3694–3698, 2004.
- [190] M. Bengtsson, T. Laurell. Ultrasonic Agitation in Microchannels. *Anal. Bioanal. Chem.* 378:1716–1721, 2004.
- [191] R. H. Liu, J. N. Yang, M. Z. Pindera, M. Athavale, P. Grodzinski. Bubble-induced Acoustic Micromixing. *Lab Chip* 2:151–157, 2002.
- [192] T. T. Veenstra, T. S. J. Lammerink, M. C. Elwenspoek, A. van den Berg. Characterization Method for a new Diffusion Mixer Applicable in Micro Flow Injection Analysis Systems. *J. Micromech. Microeng.* 9:199–202, 1999.
- [193] F. G. Bessoth, A. J. de Mello, A. Manz. Microstructure for Efficient Continuous Flow Mixing. *Anal. Commun.* 36:213–215, 1999.
- [194] H. Engelhardt, U. D. Neue. Reaction Detector with Three Dimensional Coiled Open Tubes in HPLC. *Chromatographia* 15:403–408, 1982.
- [195] W. Schleich, H. Engelhardt. Nachsäulenderivatisierung. *GIT Fachz. Lab.* 4:401–405, 1988.
- [196] L. R. Snyder, H. J. Adler. Dispersion in Segmented Flow Through Glass Tubing in Continuous-flow Analysis - Ideal Model. *Anal. Chem.* 48:1017–1022, 1976.
- [197] L. R. Snyder, H. J. Adler. Dispersion in Segmented Flow Through Glass Tubing in Continuous-flow Analysis - Nonideal Model. *Anal. Chem.* 48:1022–1027, 1976.
- [198] J. D. Tice, H. Song, A. D. Lyon, R. F. Ismagilov. Formation of Droplets and Mixing in Multiphase Microfluidics at Low Values of the Reynolds and the Capillary Numbers. *Langmuir* 19:9127–9133, 2003.
- [199] H. Song, J. D. Tice, R. F. Ismagilov. A Microfluidic System for Controlling Reaction Networks in Time. *Angew. Chem.-Int. Edit.* 42:768–772, 2003.
- [200] S. Okuyama, Y. Ikeda. Determination of Acetylcholine and Choline in Human Cerebrospinal-fluid using High-Performance Liquid-Chromatography Combined with an Immobilized Enzyme Reactor - Aging-induced Change of Acetylcholine Level. *J. Chrom. B* 431:389–394, 1988.
- [201] M. Bartolini, V. Cavrini, V. Andrisano. Monolithic Micro-Immobilized-Enzyme Reactor with Human Recombinant Acetylcholinesterase for On-line Inhibition Studies. *J. Chrom. A* 1031:27–34, 2004.

- [202] D. Josic, A. Buchacher, A. Jungbauer. Monoliths as Stationary Phases for Separation of Proteins and Polynucleotides and Enzymatic Conversion. *J. Chrom. B* 752:191–205, 2001.
- [203] A. D. Kaufman, P. T. Kissinger. Extra-column Band Spreading Concerns in Post-column Photolysis Reactors for Microbore Liquid Chromatography. *Curr. Sep.* 17:9–16, 1998.
- [204] R. Tijssen. Axial-dispersion and Flow Phenomena in Helically Coiled Tubular Reactors for Flow-analysis and Chromatography. *Anal. Chim. Acta* 114:71–89, 1980.
- [205] L. A. M. Janssen. Axial-dispersion in Laminar-flow Through Coiled Tubes. *Chem. Eng. Sci.* 31:215–218, 1976.
- [206] H. Engelhardt, J. Meister, P. Kolla. Optimisation of Post-column Reaction Detector for HPLC of Explosives. *Chromatographia* 35:5–12, 1993.
- [207] O. Kuhlmann, G. J. Krauss. Crocheted ETFE-Reactor for On-line Post-column Photoderivatization of Diclofenac in High-Performance Liquid Chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16:553–559, 1997.
- [208] L.T. Skeggs. An Automatic Method for Colorimetric Analysis. *Am. J. Clin. Pathol.* 28:311–322, 1957.
- [209] L. T. Skeggs. Persistence ... and Prayer: From the Artificial Kidney to the Autoanalyzer. *Clin. Chem.* 46:1425–1436, 2000.
- [210] J. A. Apffel, U. A. T. Brinkman, R. W. Frei. Design and Application of a Post-column Extraction System Compatible with Miniaturized Liquid-Chromatography. *Chromatographia* 18:5–10, 1984.
- [211] B. Karlberg, S. Thelander. Extraction Based on the Flow-injection Principle. 1. Description of the Extraction System. *Anal. Chim. Acta* 98:1–7, 1978.
- [212] A. H. M. T. Scholten, U. A. T. Brinkman, R. W. Frei. Solvent Segmentation in Liquid-Chromatography - Application to Photochemical-Reaction Detectors. *J. Chrom.* 205:229–237, 1981.
- [213] L. R. Snyder. Reaction Colorimeters as Detectors in High-Performance Liquid-Chromatography - Extra-column Band Broadening with Segmented Flow Through Reaction Coil. *J. Chrom.* 125:287–306, 1976.
- [214] P. Concus. On the Liquid Film Remaining in a Draining Circular Cylindrical Vessel. *J. Phys. Chem.* 74:1818–1819, 1970.
- [215] W. J. Smythe, S. L. Bellinger. Fluid System for Inclusion in a Total Automated Fluid System of a Sample Analyzer. United States Patent Office, Nummer: 3 826 615, 1974.

- [216] C. de Ruiter, J. H. Wolf, U. A. T. Brinkman, R. W. Frei. Design and Evaluation of a Sandwich Phase Separator for Online Liquid-Liquid-Extraction. *Anal. Chim. Acta* 192:267–275, 1987.
- [217] A. H. M. T. Scholten, U. A. T. Brinkman, R. W. Frei. Comparison of Liquid Segmented with Non-segmented Flow Systems in Postcolumn Reactors for Liquid-Chromatography. *Anal. Chem.* 54:1932–1938, 1982.
- [218] J. H. Tsai, L. W. Lin. Active Microfluidic Mixer and Gas Bubble Filter Driven by Thermal Bubble Micropump. *Sens. Actuators A* 97-8:665–671, 2002.
- [219] R. L. Habig, B. W. Schlein, L. Waters, R. E. Thiers. A Bubble-gating Flow Cell for Continuous-flow Analysis. *Clin. Chem.* 15:1045–1055, 1969.
- [220] M. Guilhaus, D. Selby, V. Mlynski. Orthogonal Acceleration Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 19:65–107, 2000.
- [221] LCT User's Guide, Issue 1, Code 6666467, Micromass, Waters GmbH, Eschborn.
- [222] W. M. A. Niessen. Progress in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Instrumentation and its Impact on High-Throughput Screening. *J. Chrom. A* 1000:413–436, 2003.
- [223] A. W. T. Bristow, K. S. Webb. Intercomparison Study on Accurate Mass Measurement of Small Molecules in Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14:1086–1098, 2003.
- [224] K. S. Webb, A. W. T. Bristow, M. Sargent, B. Stein. Methodology for Accurate Mass Measurement of Small Molecules – Best Practice Guide. *LGC Limited* Teddington, UK, 2004.
- [225] J. Wu, H. McAllister. Exact Mass Measurement on an Electrospray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer: Error Distribution and Selective Averaging. *J. Mass Spectrom.* 38:1043–1053, 2003.
- [226] G. Deng, G. Sanyal. Applications of Mass Spectrometry in Early Stages of Target Based Drug Discovery. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40:528–538, 2006.
- [227] A. C. Hogenboom, A. R. de Boer, R. J. E. Derks, H. Irth. Continuous-flow, On-line Monitoring of Biospecific Interactions using Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 73:3816–3823, 2001.
- [228] M. R. van Bommel, A. P. J. M. de Jong, U. R. Tjaden, H. Irth, J. van der Greef. Enzyme Amplification as Detection Tool in Continuous-flow Systems I. Development of an Enzyme-amplified Biochemical Detection System Coupled On-line to Flow-injection Analysis. *J. Chrom. A* 855:383–396, 1999.

- [229] A. J. Oosterkamp, H. Irth, M. T. V. Herraiz, U. R. Tjaden, J. van der Greef. Theoretical Concepts of On-line Liquid Chromatographic Biochemical Detection Systems. 1. Detection Systems Based on Labelled Ligands. *J. Chrom. A* 787:27–35, 1997.
- [230] A. Liesener, U. Karst. Monitoring Enzymatic Conversions by Mass Spectrometry: a Critical Review. *Anal. Bioanal. Chem.* 382:1451–1464, 2005.
- [231] D. B. Northrop, F. B. Simpson. Beyond Enzyme Kinetics: Direct Determination of Mechanisms by Stopped-flow Mass Spectrometry. *Bioorg. Med. Chem.* 5:641–644, 1997.
- [232] B. Bothner, R. Chavez, J. Wei, C. Strupp, Q. Phung, A. Schneemann, G. Siuzdak. Monitoring Enzyme Catalysis with Mass Spectrometry. *J. Biol. Chem.* 275:13455–13459, 2000.
- [233] J. Wei, J. M. Buriak, G. Siuzdak. Desorption/Ionization Mass Spectrometry on Porous Silicon. *Nature* 399:243–246, 1999.
- [234] Z. X. Shen, E. P. Go, A. Gamez, J. V. Apon, V. Fokin, M. Greig, M. Ventura, J. E. Crowell, O. Blixt, J. C. Paulson, R. C. Stevens, M. G. Finn, G. Siuzdak. A Mass Spectrometry Plate Reader: Monitoring Enzyme Activity and Inhibition with a Desorption/Ionization on Silicon (DIOS) Platform. *ChemBioChem* 5:921–927, 2004.
- [235] J. J. Thomas, Z. X. Shen, J. E. Crowell, M. G. Finn, G. Siuzdak. Desorption/Ionization on Silicon (DIOS): A Diverse Mass Spectrometry Platform for Protein Characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(9):4932–4937, 2001.
- [236] W. D. Lehmann. *Massenspektrometrie in der Biochemie*. Spektrum Verlag, Heidelberg, 1996.
- [237] R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah. Mechanistic Investigation of Ionization Suppression in Electrospray Ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11:942–950, 2000.
- [238] T. M. Annesley. Ion Suppression in Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* 49:1041–1044, 2003.
- [239] X. Ge, T. L. Sirich, M. K. Beyer, H. Desaire, J. A. Leary. A Strategy for the Determination of Enzyme Kinetics using Electrospray Ionization with an Ion Trap Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* 73:5078–5082, 2001.
- [240] A. R. de Boer, T. Letzel, H. Lingeman, H. Irth. Systematic Development of an Enzymatic Phosphorylation Assay Compatible with Mass Spectrometric Detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 381:647–655, 2005.

- [241] A. J. Norris, J. P. Whitelegge, K. F. Faull, T. Toyokuni. Kinetic Characterization of Enzyme Inhibitors using Electrospray-Ionization Mass Spectrometry Coupled with Multiple Reaction Monitoring. *Anal. Chem.* 73:6024–6029, 2001.
- [242] F. De Angelis, A. Di Tullio, P. Del Boccio, S. Reale, G. Savelli, N. Spretti. ESI-MS in the Study of the Activity of α -Chymotrypsin in Aqueous Surfactant Media. *Org. Biomol. Chem.* 1:3125–3130, 2003.
- [243] T. Steinkamp, A. Liesener, U. Karst. Reaction Monitoring of Enzyme-catalyzed Ester Cleavage by Time-resolved Fluorescence and Electrospray Mass Spectrometry: Method Development and Comparison. *Anal. Bioanal. Chem.* 378:1124–1128, 2004.
- [244] J. Wu, S. Takayama, C.-H. Wong, G. Siuzdak. Quantitative Electrospray Mass Spectrometry for the Rapid Assay of Enzyme Inhibitors. *Chem. Biol.* 4:653–657, 1997.
- [245] H. B. Hines, E. E. Brueggemann, M. L. Hale. High-Performance Liquid Chromatography/Mass Selective Detection Assay for Adenine Released from a Synthetic RNA Substrate by Ricin A Chain. *Anal. Biochem.* 330:119–122, 2004.
- [246] A. Liesener, A. M. Perchuc, R. Schoni, M. Wilmer, U. Karst. Screening for Proteolytic Activities in Snake Venom by Means of a Multiplexing Electrospray Ionization Mass Spectrometry Assay Scheme. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19:2923–2928, 2005.
- [247] E. D. Lee, W. Mück, J. D. Henion, T. R. Covey. Real-time Reaction Monitoring by Continuous-Introduction Ion-spray Tandem Mass-Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* 111:4600–4604, 1989.
- [248] R. J. Hodgson, T. R. Besanger, M. A. Brook, J. D. Brennan. Inhibitor Screening using Immobilized Enzyme Reactor Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 77:7512–7519, 2005.
- [249] A. R. de Boer, B. Bruyneel, J. G. Krabbe, H. Lingeman, W. M. A. Niessen, H. Irth. A Microfluidic-based Enzymatic Assay for Bioactivity Screening Combined with Capillary Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Lab Chip* 5:1286–1292, 2005.
- [250] S. A. Gerber, C. R. Scott, F. Turecek, M. H. Gelb. Analysis of Rates of Multiple Enzymes in Cell Lysates by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* 121:1102–1103, 1999.
- [251] S. A. Gerber, C. R. Scott, F. Turecek, M. H. Gelb. Direct Profiling of Multiple Enzyme Activities in Human Cell Lysates by Affinity Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Application to Clinical Enzymology. *Anal. Chem.* 73:1651–1657, 2001.

- [252] F. Basile, I. Ferrer, E. T. Furlong, K. J. Voorhees. Simultaneous Multiple Substrate Tag Detection with ESI-Ion Trap MS for In Vivo Bacterial Enzyme Activity Profiling. *Anal. Chem.* 74:4290–4293, 2002.
- [253] C. Hempen, A. Liesener, U. Karst. Fluorescence and Mass Spectrometric Detection Schemes for Simultaneous Enzymatic Conversions: Method Development and Comparison. *Anal. Chim. Acta* 543:137–142, 2005.
- [254] H. Schulze, S. B. Muench, F. Villatte, R. D. Schmid, T. T. Bachmann. Insecticide Detection Through Protein Engineering of *Nippostrongylus brasiliensis* Acetylcholinesterase B. *Anal. Chem.* 77:5823–5830, 2005.
- [255] S. Richter, J. Nieveler, H. Schulze, T. T. Bachmann, R. D. Schmid. High Yield Production of a Mutant *Nippostrongylus brasiliensis* Acetylcholinesterase in *Pichia pastoris* and its Purification. *Biotechnol. Bioeng.* 93:1017–1022, 2006.
- [256] H. Schulze. *Entwicklung hochsensitiver Biosensoren für neurotoxische Insektizide in Lebensmitteln: Enzymatische in-vitro Aktivierung von Phosphorhionaten mit der Monoxygenase P450-BM3 und Sensitivitätssteigerung durch Proteindesign von Acetylcholinesterase.* Dissertation, Fakultät für Chemie, Universität Stuttgart, 2003.
- [257] A. Clouet, T. Darbre, J.-L. Reymond. Esterolytic Peptide Dendrimers with a Hydrophobic Core and Catalytic Residues at the Surface. *Adv. Synth. Catal.* 346:1195–1204, 2004.
- [258] J. Meriluoto. Chromatography of Microcystins. *Anal. Chim. Acta* 352:277–298, 1997.
- [259] P. Henriksen, W. W. Carmichael, J. S. An, and O. Moestrup. Detection of an Anatoxin-a(S)-like Anticholinesterase in Natural Blooms and Cultures of Cyanobacteria/Blue-green Algae from Danish Lakes and in the Stomach Contents of Poisoned Birds. *Toxicon* 35:901–913, 1997.
- [260] D. Coates. The Angiotensin Converting Enzyme (ACE). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35:769–773, 2003.
- [261] S. van Dyck, S. Novakova, A. van Schepdael, J. Hoogmartens. Inhibition Study of Angiotensin Converting Enzyme by Capillary Electrophoresis after Enzymatic Reaction at Capillary Inlet. *J. Chrom. A.* 1013:149–156, 2003.
- [262] <http://www.biotrove.com>.
- [263] K. I. Harada, K. Matsuura, M. Suzuki, M. F. Watanabe, S. Oishi, A. M. Dahlem, V. R. Beasley, W. W. Carmichael. Isolation and Characterization of the Minor Compounds Associated with Microcystins LR and RR in the Cyanobacterium (Blue-Green Algae). *Toxicon* 26:433–440, 1990.