

**Biosensorsystem für vollständig automatisierte ultra-sensitive  
Multianalyt-Immunoassays**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von

**Günther Proll**

Tag der mündlichen Prüfung:	22.03.2005
Dekan:	Prof. Dr. S. Laufer
Erster Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Gauglitz
Zweiter Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Oberhammer

Für Corinna



## *Danksagung*

Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, das ich mit dem von ihm entgegengebrachten Vertrauen bearbeiten durfte. Außerdem danke ich ihm für die vielen Gelegenheiten meine Arbeit auf nationalen und internationalen Tagungen und Konferenzen vorstellen zu können.

Bei Herrn Prof. Dr. Heinz Oberhammer möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken.

Allen Kollegen der Arbeitsgruppe danke ich für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, die vielen hilfreichen Diskussionen und die ständige Hilfsbereitschaft. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dipl. chem. Jens Tschmelak, Herrn Dipl. math. Michael Kumpf, Frau Dipl. chem. Daniela Dankbar, Frau Dr. Sabine Reder und Herrn Jochen Mehne für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken.

Im Rahmen des EU-Projekts AWACSS möchte ich mich bei allen Projektpartnern bedanken, insbesondere bei Herrn Dr. Kaiser und Herrn Dr. Krämmer von der Siemens AG, Herrn Dr. Sacher und Herrn Dr. Stien vom DVGW TZW Karlsruhe sowie bei Herrn Dr. Jaroslav Slobodnik vom Environmental Institute für die angenehme und produktive Zusammenarbeit.

Um eine Arbeit wie diese durchzuführen, bedarf es auch der Hilfe und dem Rückhalt von privater Seite. Daher bedanke ich mich ganz besonders bei meinen Eltern und bei meinem Bruder, die mich immer unterstützt haben und mir mit gutem Rat zur Seite standen.

*An meine Frau:*

*Danke Corinna!*



---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Motivation der Arbeit.....	1
1.2	Zielsetzung der Arbeit.....	4
1.3	Das EU-Projekt AWACSS.....	5
2	Theorie.....	6
2.1	Biochemische Grundlagen .....	6
2.1.1	Antikörper und Antigen.....	6
2.1.2	Herstellung von Antikörpern .....	8
2.1.3	Ablauf der Antigen-Antikörper-Bindung .....	9
2.1.4	Thermodynamik der Antigen-Antikörper-Bindung .....	10
2.1.5	Kreuzreaktivität .....	12
2.1.6	Multianalyt-Immunoassays in der Wasseranalytik.....	13
2.1.7	Bindungshemmtest .....	14
2.2	Optische Grundlagen.....	17
2.2.1	Fluoreszenz .....	17
2.2.2	TIRF mit integrierter Optik .....	19
3	Material und Methoden .....	21
3.1	Analyte, Derivate und Antikörper.....	21
3.2	Verbrauchsmaterialien und Puffer .....	23
3.3	Geräte .....	24
3.4	Methoden.....	35
3.4.1	Oberflächenchemie .....	35
3.4.1.1	Vollmodifikation.....	36
3.4.1.2	Multianalyt-Modifikation .....	36
3.4.2	Markierung der Antikörper.....	38
4	Ergebnisse und Diskussion.....	39
4.1	Systemcharakterisierung .....	39
4.1.1	Messwerterfassung .....	39
4.1.1.1	Messwertberechnung im cw-Modus.....	40

---

4.1.1.2	Signalrauschen und Drift im cw-Modus .....	41
4.1.1.3	Messwertberechnung im Modulations-Modus .....	42
4.1.2	Systemcharakteristik für verschiedene IO-Chips .....	45
4.2	Kalibrierung .....	53
4.2.1	Einzelanalyt-Kalibrierung .....	53
4.2.2	Bewertung von Kalibrierungen .....	57
4.2.3	Multianalyt-Kalibrierung.....	63
4.3	Validierung mit Realproben.....	71
4.3.1	Trinkwasser.....	71
4.3.2	Ringversuch .....	77
4.3.3	Feldtest.....	80
4.3.4	Bewertung zur Validierung .....	87
5	Zusammenfassung und Ausblick .....	90
6	Literaturverzeichnis.....	94
7	Anhang .....	101
7.1	Abkürzungen.....	101
7.2	Veröffentlichungen .....	104
7.2.1	Publikationen .....	104
7.2.2	Poster .....	106
7.3	Vorträge.....	108
7.4	Akademische Lehrer .....	109
7.5	Lebenslauf.....	110

## 1 Einleitung

### 1.1 *Motivation der Arbeit*

Die nachhaltige Versorgung der Verbraucher mit sauberem Trinkwasser wurde weltweit (WHO 2003; UN 2005) als eines der wichtigsten Zukunftsthemen eingeordnet. Um Wasserressourcen zu schützen und um eine ständige Überwachung der Wasserqualität zu gewährleisten, ist es notwendig schnelle, sensitive, kostengünstige und einfach zu bedienende analytische Systeme zu entwickeln, die eine Vielzahl kleiner organischer Schadstoffmoleküle im Wasser detektieren können. Dieser Trend in der Wissenschaft wird weltweit unterstützt, so z. B. auch durch die Fördermaßnahmen der Europäischen Union innerhalb des fünften und des sechsten Rahmenprogramms (Cordis 2005). Diese Maßnahmen haben zu einer großen Zahl nationaler und internationaler Forschungsprojekte geführt.

Das Problembewusstsein auf diesem Gebiet hat sich zunächst eher langsam entwickelt. Ein erster Bericht über negative Einflüsse von synthetischen Chemikalien betrifft Reproduktionsstörungen bei Tieren. Das fast völlige Aussterben des Weißkopfseeadlers auf dem Nordamerikanischen Kontinent war Anlass für die erste Ursachenforschung auf diesem Gebiet (Broley 1958). In diesem Zusammenhang prägte sich der Begriff der „hormonaktiven Substanzen“ oder im englischsprachigen Raum „endocrine disrupting chemicals“ (EDC). Dabei definieren sich die EDCs als „... *exogenous substance that causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, secondary (consequent) to changes in endocrine functions*“ (Weybridge 1996) (beide Begriffe schließen mittlerweile auch die natürlichen Hormone mit ein). Es folgte eine Vielzahl von Studien über Missbildungen der Sexualorgane, Fruchtbarkeitsstörungen, hohe Sterblichkeitsraten beim Nachwuchs und weitere Fertilitätsprobleme der verschiedensten Tierpopulationen. Von den Medien wurden besonders Berichte über das Massensterben von Belugawalen im St. Lawrence River ab Mitte der 80er Jahre (Beland et al. 1993), das Auffinden von Alligatormännchen mit stark verkümmertem Penis 1993 im Apopka-See in Florida (Guillette et al. 1996) oder 1994 die Berichte über hermaphroditische Fische in englischen Flüssen, die Zulauf von geklärten Abwässern erhalten (Purdom et al., 1994), aufgegriffen.

Differenziert man zwischen den EDCs, so lassen sich vier Klassen unterscheiden. Neben den endogenen Estrogenen (z. B. Estron, Estradiol u. Estriol) werden die Phytoestrogene (z. B. Coumestrol), die synthetischen Estrogene wie z. B. das Ethinylestradiol aus der „Pille“ und die Xenoestrogene (z. B. Bisphenol A oder Triazine) zu den EDCs gezählt. Zwar sind die Xenoestrogene mit ihrer biologischen Wirkung in Organismen am schwächsten (Körner et al. 1998), aber die Konzentration, mit der sie in vielen Oberflächengewässern gefunden werden, ist um den Faktor zehn bis tausend höher als die für natürliche und synthetische Estrogene (Shore et al. 1993; Larsson et al. 1999; Fukazawa et al. 2002).

Viele dieser Stoffe gelangen dabei über kommunale oder industrielle Kläranlagen oder über die Landwirtschaft bzw. die Industrie in Flüsse und Seen. Neben den EDCs und der bekannten Gruppe der Pestizide stellen in jüngerer Zeit aber auch Rückstände aus Arzneimitteln ein zunehmendes Problem dar. Besonders häufig werden Vertreter aus der Antibiotikagruppe der Sulfonamide in Oberflächengewässern gefunden, die aus der Humanmedizin stammen oder auch im großen Stil bei der industriellen Tierproduktion eingesetzt werden (Falbe et al. 1999). Daneben werden auch weitere Arzneimittelrückstände, wie die sehr stabilen Röntgenkontrastmittel oder das entzündungshemmende Schmerzmittel Diclofenac, immer häufiger in Oberflächengewässern gefunden. Natürliche Toxine wie z. B. die Blaualgentoxine aber auch eine große Zahl an Industriechemikalien und chemischen Markern stellen die Wasserwirtschaft immer wieder vor neue Herausforderungen bei der Gewinnung von sauberem Trinkwasser.

Auf Grund dieser vielfältigen Substanzen, die mittlerweile in den meisten Wasserressourcen nachzuweisen sind, hat die Europäische Union im Annex der Trinkwasser Richtlinie (2000/60/EC 2000) eine Liste der „priority substances“ oder auch „emerging pollutants“ zusammengestellt. Für die Zukunft sieht die Gesetzgebung der EU auch die Notwendigkeit einer ständigen Überwachung von Oberflächengewässern, weshalb sie in der „European Water Management – Schrift“ (Griffiths 2002) und ihren Direktiven (2000/60/EC, 2000; 98/83/EC, 1998) Monitoringprogramme bis Ende 2007 für alle Mitgliedstaaten verbindlich vorschreibt. Zusätzlich wird darauf hingewiesen, dass auf Grund der mitunter schwierigen Analyse dieser Substanzen neue Techniken für die Überwachung entwickelt werden müssen. Leider sind bis heute in den angesprochenen

Gesetzestexten nur wenige Grenzwerte eindeutig festgelegt. So gilt in Europa für Pestizide der Grenzwert von  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$  als Einzelsubstanz und der Grenzwert von  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  für die Summenkonzentration.

Der aktuelle Stand bei der Wasseranalytik für den Nachweis kleiner organischer Schadstoffe im unteren  $\text{ngL}^{-1}$  Bereich sind die Flüssigkeits- und die Gaschromatographie. Für beide Techniken ist die Realisierung vollständig automatisierter und gleichzeitig kostengünstiger Systeme schwierig, zumal diese Verfahren vor der eigentlichen Analyse die Proben um mindestens einen Faktor 100 bis 1000 aufkonzentrieren müssen (Petrovics et al. 2002). Ohne Anreicherung arbeitet die sehr sensitive ELISA Technik (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) bis in den  $\text{ngL}^{-1}$  Bereich, die zu den immunochemischen Methoden zählt. Wie für die chromatographischen Techniken ist aber auch hier eine Automatisierung schwierig und erfordert deshalb enormen Geräteaufwand. Aus diesem Grund wurden innerhalb der letzten Jahre neue Wasseranalytatorsysteme entwickelt, die ebenfalls wie der ELISA Antikörper als analytisches Werkzeug einsetzen. Dabei ist das portable Wasseranalytatorsystem River Analyser (RIANA, Förderkennzeichen: ENV-CT95-0066) eines der ersten Geräte, das einen Multianalyt-Immunoassay erfolgreich in der Wasseranalytik einsetzte (Barzen 2000, Rodriguez-Mozaz 2004, Tschmelak 2004a). Mit diesem Gerät lassen sich Wasserproben innerhalb von 15 Minuten mit einer automatisierten Fluidik bestimmen (Klotz et al. 1998).

Vor diesem Hintergrund leistet diese Arbeit einen wichtigen Beitrag für den zukünftigen Einsatz eines innovativen optischen Biosensorsystems unter Verwendung von Multianalyt-Immunoassays bei der kontinuierlichen Überwachung von Oberflächengewässern, Grund- und Trinkwasser. Für die Umsetzung dieser Ziele ist es zunächst notwendig, ein besseres Verständnis von Immunoassays zu entwickeln. Stabilität und Spezifität der biologischen Erkennungsstrukturen sowie die Kenntnis über die ablaufenden Wechselwirkungen bedingen die technische Realisierung der hier entwickelten vollständigen Automatisierung von Messabläufen und Datenauswertung. Dabei müssen die Geräte- und Assayparameter so aufeinander abgestimmt werden, dass Nachweisgrenzen erreicht werden können, die eine ultra-sensitive Spurenanalytik ohne Probenvorbereitung erlauben. Für den kontinuierlichen Einsatz sind darüber hinaus stan-

standardisierte Messabläufe notwendig, die eine hohe Reproduzierbarkeit erlauben. Für die Umsetzung all dieser Anforderungen für den Multianalyt-Betrieb ist die Entwicklung einer neuartigen orts aufgelösten Oberflächenchemie notwendig. Die Eigenschaften der hierbei erzeugten Oberflächenmodifikationen sind ausschlaggebend für die Funktionalität und Standfestigkeit dieses Biosensorsystems.

## ***1.2 Zielsetzung der Arbeit***

Basierend auf den zuvor beschriebenen Aufgaben wird in dieser Arbeit ein optisches Biosensorsystem für das schnelle und kostengünstige Monitoring von Oberflächengewässern beschrieben und auf seine Leistungsfähigkeit hin untersucht.

In einem ersten Abschnitt dieser Arbeit sollte nach Design und anschließender Konstruktion die Systemintegration der einzelnen Komponenten erfolgen. Hierzu gehören die optischen und fluidischen Komponenten sowie die zur Ansteuerung und Programmierung bzw. zur Messwerterfassung notwendige Software. Verschiedene Ausführungen der integriert optischen Transducer bedingen unterschiedliche Ergebnisse bei der Durchführung von Immunoassays. Durch vergleichende Untersuchungen dieser Transducer unter Berücksichtigung der jeweiligen optischen Eigenschaften sollten geeignete Transducerdesigns ermittelt werden. In diesem Zusammenhang steht hier die erforderliche Optimierung der Messwerterfassung und Auswertung sowie die Programmierung standardisierter Messabläufe.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit stand die Entwicklung einer neuartigen orts aufgelösten Oberflächenchemie für die Durchführung von Multianalyt-Immunoassays im Zentrum, die eine ortsgenaue Ankopplung durch "Drucken" von Biomolekülen an die Transduceroberfläche erlaubt. Das Ziel war hier die Etablierung eines Multianalyt-Immunoassays für die Wasseranalytik und dessen geeignete statistische Bewertung.

Als dritter Aufgabenbereich ist die Überprüfung der analytischen Leistungsfähigkeit anhand von Realproben im Sinne einer Validierung anzusehen. Das komplette System musste hierfür am Ende unter realistischen Einsatzbedingungen getestet werden.

### **1.3 Das EU-Projekt AWACSS**

Diese Arbeit wurde durch die Kooperation im Rahmen des von der EU geförderten Projekts „Automated Water Analyser Computer Supported System“ (AWACSS; Förderkennzeichen: EVK1-CT-2000-00045) ermöglicht. Der optische Biosensor AWACSS sollte innerhalb dieses EU-Projekts als ein kostengünstiges, vollständig automatisiertes und sensitives Analysensystem entwickelt werden, das darüber hinaus auch eine Anbindung zu einer Datenbank via Internet bzw. Telefon besitzen soll. Mit diesem System sollen dann in Zukunft Monitoringprogramme durchgeführt werden, wie es von der EU ab Ende 2007 vorgeschrieben sein wird. Die Aufgaben waren wie folgt auf die Projektpartner verteilt:

Eberhard-Karls-Universität Tübingen (D): *Systemintegration, Immunochemie, Assay-design, Validierung, Oberflächenchemie, Feldtests und Projektmanagement.*

Central Research Laboratory (GB): *Instrument Hardware Design.*

Institute of Chem. & Environ. Chem. IIQAB (ES): *Instrument Design und Feldtests.*

DVGW-Technologiezentrum Wasser (D): *Instrument Design und Feldtests.*

Environmental Institute (SK): *Instrument Design und Feldtests.*

King`s College London (GB): *Immunochemie.*

Optoelectronics Research Centre (GB): *Integriert optische Transducer (IO-Chip).*

Siemens (D): *Elektronik, Software, Internet-Kommunikation und Marktanalyse.*

Water Research Institute (SK): *ELISA, Feldtests.*

## 2 Theorie

### 2.1 *Biochemische Grundlagen*

#### 2.1.1 Antikörper und Antigen

Antikörper (Immunglobuline) sind Glycoproteine, die innerhalb der humoralen Immunabwehr bei Vertebraten von B-Lymphozyten als Antwort auf Fremdmoleküle oder einen eindringenden Organismus gebildet werden (Roitt et al. 1995). Sie binden oft an das Fremdmolekül oder an die Zelle außerordentlich fest und aktivieren diese dadurch oder kennzeichnen sie für den Abbau durch Phagozyten oder Komplement-induzierte Lyse. Die Immunglobuline besitzen also die Eigenschaft, zwischen verschiedenen Molekülen unterscheiden zu können. Dabei bezeichnet man Moleküle, die eine Immunantwort hervorrufen, als Antigene (Alberts et al. 1995).

Der bekannteste Vertreter aus der Familie der Immunglobuline ist das Immunglobulin G (IgG) mit einem Molekulargewicht von ca. 150 000 g/mol.

Ein IgG-Molekül (s. Abbildung 1) besteht aus zwei identischen leichten Ketten (L-Ketten) mit ca. 220 Aminosäurenresten und zwei identischen schweren (H-Ketten) Polypeptidketten mit ca. 450 bis 600 Aminosäuren, die durch Disulfidbrücken kovalent und über nicht-kovalente Wechselwirkungen miteinander verknüpft sind (Lodish et al. 1996). An die H-Ketten ist jeweils eine Kohlenhydratkette kovalent gebunden. Die typische Y-Form des Moleküls kommt durch einen „Knick“ in der Mitte der schweren Kette zustande. Die Stelle des Antikörpers, an welcher das Antigen gebunden wird, heißt Paratop und ist komplementär zur antigenen Determinanten (Epitop) auf der Oberfläche des Antigens (Janeway & Travers 1994). Ein IgG-Molekül besitzt zwei identische Paratope (bivalent), wobei ein Antigen ein (monovalent), mehrere (multivalent) gleiche oder auch mehrere unterschiedliche Epitope besitzen kann. Die Paratope werden von variablen Domänen (V) am N-terminalen Ende der L- und der H-Ketten gebildet. In jeder V-Region gibt es drei Bereiche mit hypervariabler Aminosäuresequenz, die als „complementary determining regions“ (CDR) bezeichnet werden. Jede dieser sechs CDRs besteht aus ca. 50 Aminosäuren.

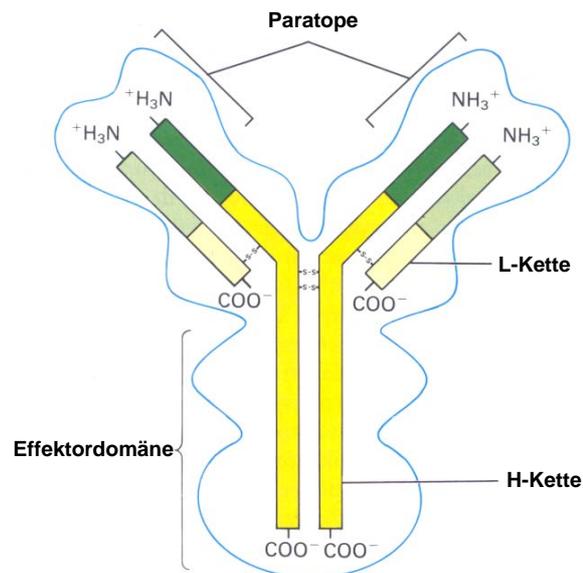


Abb. 1: Schematische Darstellung eines IgG Moleküls (nach Lodish et al. 1996, verändert).

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die fünf Antikörperklassen der Immunglobuline, die sich im Wesentlichen durch die H-Ketten unterscheiden. Die Hauptklasse der Immunglobuline ist die der IgG-Antikörper. Diese aktivieren das Komplementsystem, können die Plazenta durchqueren und werden von Makrophagen und Granulozyten gebunden. IgGs aus verschiedenen Spezies unterscheiden sich vor allem in Aminosäuresequenz der konstanten Regionen der H-Ketten der Effektor-domäne und im Glykosylierungsmuster.

Tabelle 1: Antikörperklassen

	IgM	IgD	IgG	IgE	IgA
H-Kette	$\mu$	$\delta$	$\gamma$	$\epsilon$	$\alpha$
L-Kette	$\kappa$ oder $\lambda$				
Zahl der 4-Ketten-Monomere	5	1	1	1	1,2 oder mehr
Serumkonzentration [ mg mL <sup>-1</sup> ]	1	0.03	12	0.0003	2
Molekulargewicht [ kD ]	950	180	150	160	190

### 2.1.2 Herstellung von Antikörpern

Zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers (Abuknesha 1987) gegen ein spezifisches Antigen wird diese Substanz einem geeigneten Tier (Hase, Maus, Ratte, Ziege, Schaf) wiederholt gespritzt (sog. Booster-Injektionen). Das Immunsystem dieses Tiers produziert daraufhin ein Gemisch aus spezifischen Antikörpern gegen dieses Antigen. Um diese Antikörperproduktion zu stimulieren bzw. zu verstärken, wird zusammen mit dem Antigen ein Adjuvant verabreicht. Sehr häufig wird Freund's Adjuvant, eine Wasser-in-Öl Emulsion, als Depot gespritzt. Grund für die Bildung mehrerer verschiedener Antikörper ist, dass zum einen Antigene oft mehrere Epitope besitzen, die von verschiedenen Antikörpern erkannt werden. Zum andern besteht die Möglichkeit, dass das gleiche Epitop von verschiedenen Antikörpern erkannt wird. Bei einer solchen Mischung aus spezifischen Antikörpern gegen ein Antigen spricht man von „einem“ polyklonalen Antikörper.

Kleine körperfremde Moleküle, die aufgrund ihrer geringen Größe selbst nicht immunogen in einem Organismus wirken, bezeichnet man als Haptene. Will man Antikörper gegen solch ein Molekül herstellen, dann muss das Hapten zur Immunisierung an ein hochmolekulares Trägerprotein (meist Rinderserum Albumin) gekoppelt werden. Ein Teil der gebildeten Antikörper erkennt dann das Hapten als Antigen (Cooper 1981), BSA-spezifisches IgG wird abgetrennt. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden auf diese Weise in Schaffen hergestellt. Im Gegensatz zu IgGs aus vielen anderen Spezies, sind solche aus Schaf sehr viel stabiler gegen biologische Abbauprozesse. Besonders deutlich wird dies bei dem Versuch, Fab-Fragmente durch enzymatische Spaltung mit Papain herzustellen. Papain spaltet ein IgG-Molekül in drei Teile: Zwei getrennte, identische Fab-Fragmente (fragment antigen binding) mit je einem Paratop, und ein Fc-Fragment (beide konstante Regionen der H-Ketten), das seinen Namen trägt, weil es in sehr vielen Fällen auskristallisiert (crystallizing). IgGs aus Schaf werden durch Papain erst nach vielen Stunden gespalten, wogegen solche aus Maus schon nach einer Stunde unter denselben Bedingungen gespalten sind. Diese Eigenschaft verleiht IgGs aus Schaf eine höhere Resistenz gegenüber den allgegenwärtigen Proteasen in der Umwelt.

Nach der Immunisierung werden die spezifischen Immunglobuline (meist IgG) aus dem Serum des Tiers isoliert und angereichert. Dies geschieht häufig über eine Affini-

tätschromatographie (Chandan und Esahak 1999, Ben Rejeb et al. 1998), wobei sich die Antikörper sogar noch in monospezifische Populationen trennen lassen, die nur ein spezifisches Epitop erkennen (Pingoud & Urbanke, 1997). Die wichtigste Eigenschaft solcher Antikörper, wenn sie als analytisches Werkzeug in Immunoassays verwendet werden, ist ihre anwendungsbedingte geeignete Affinität zum Antigen (s. Kapitel 2.1.7). Um maßgeschneiderte polyklonale Antikörper zu erhalten, kann eine Affinitätschromatographie auch mit der reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIFS) (Schmitt et al. 1997) überwacht werden, um die Fraktionen einfach und schnell diesbezüglich zu charakterisieren (Proll 2004).

Dieser Aufreinigungsprozess ist bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern etwas einfacher. Ihre Herstellung erfolgt durch Zellfusion einer antikörperproduzierenden B-Zelle mit einer Tumorzelle. Mit dieser Hybridomatechnik kann ein bestimmter (daher die Bezeichnung monoklonal) Antikörper praktisch in beliebig großer Menge durch Zellkulturtechnik hergestellt werden. Am häufigsten werden hierbei B-Zellen aus der Maus verwendet, die jedoch den Nachteil haben, dass diese Antikörper schneller degradieren als solche aus Schaf. Neuerdings werden auch vermehrt sehr stabile menschliche Antikörper auf diesem Wege hergestellt. In Zukunft werden sicherlich auch Antikörper oder Antikörperfragmente an Bedeutung gewinnen, die durch biotechnologische Methoden hergestellt werden.

### 2.1.3 Ablauf der Antigen-Antikörper-Bindung

Eine zentrale Rolle in dieser Arbeit spielt die spezifische Erkennung von Zielsubstanzen durch die Antigen–Antikörper–Bindung. Diese biomolekulare Wechselwirkung beruht auf verschiedenen abstandsabhängigen nicht-kovalenten Bindungskräften und kann als Affinitätsreaktion bezeichnet werden. Zu nennen sind hier elektrostatische Anziehungskräfte ( $\sim 1/d^2$ ), Dipol-Dipol-Wechselwirkungen ( $\sim 1/d^4$ ), Wasserstoffbrückenbindungen ( $\sim 1/d^6$ ) und Dispersions-Wechselwirkungen ( $\sim 1/d^{10}$ ) (mit  $d$  = Atomabstand). Die Summe dieser Kräfte führt bei einer spezifischen Erkennungsreaktion nach dem Induced-Fit-Modell zu der eigentlichen Bindung, wobei die Energie, die zur Dissoziation des Antigen–Antikörper–Komplexes aufgebracht werden muss, größer ist, als die zur Assoziation. Dieses Phänomen bezeichnet man als Hyste-

rese und beruht auf der Ausbildung zusätzlicher sekundärer Bindungen (van Oss, 1994; van Oss, 1995).

### 2.1.4 Thermodynamik der Antigen-Antikörper-Bindung

Bringt man einen Antikörper mit seinem Antigen zusammen, so stellt sich nach kurzer Zeit ein Gleichgewicht, bestehend aus freiem Antigen ( $Ag$ ) und freiem Antikörper ( $Ak$ ) sowie Antigen-Antikörper-Komplex ( $Ag-Ak$ ), ein. Die allgemeine Reaktionsgleichung lautet:



Wobei  $k_a$  und  $k_d$  die Assoziations- bzw. Dissoziationsratenkonstanten sind. Im Gleichgewicht ergibt sich die Gleichgewichtskonstante bzw. Affinitätskonstante ( $K$ ) aus dem Massenwirkungsgesetz

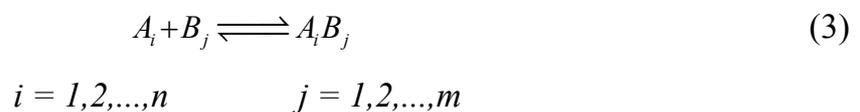
$$K = \frac{k_a}{k_d} = \frac{c_{Ag-Ak}}{c_{Ag} \cdot c_{Ak}} = \frac{c_{Ag-Ak}}{(c_{0,Ag} - c_{Ag-Ak}) \cdot (c_{0,Ak} - c_{Ag-Ak})} \quad (2)$$

mit	$K$ :	Affinitätskonstante
	$Ag$ :	Antigen
	$Ak$ :	Antikörper
	$Ag-Ak$ :	Antigen-Antikörper-Komplex
	$c_{Ag-Ak}$ :	Gleichgewichtskonzentration des Antigen-Antikörper-Komplexes
	$c_{Ak}$ :	Gleichgewichtskonzentration des Antikörpers
	$c_{Ag}$ :	Gleichgewichtskonzentration des Antigens
	$c_{0,Ak}$ :	Anfangskonzentration des Antikörpers
	$c_{0,Ag}$ :	Anfangskonzentration des Antigens

Für die meisten Antikörper beträgt  $K = 10^5$  bis  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  (Lodish et al. 1996). Bei polyklonalen Antikörpern, wie sie hier verwendet werden, setzt sich die beobachtete Affinität zu einem Analyten aus den konzentrationsabhängigen Beiträgen der einzelnen Klone zusammen. In diesem Zusammenhang sollte also eher von „mittleren Affinitätskonstanten“ gesprochen werden.

Diese Arbeit beschäftigt sich insbesondere mit Multianalyt-Immunoassays. Dies bedeutet, dass gleichzeitig mehrere Antigene und Antikörper anwesend sind. In diesem Fall erfolgen die Antigen-Antikörper-Bindungen als konkurrierende Reaktionen, wobei sich ebenfalls ein Gleichgewicht einstellt.

Für die mathematische Modellierung (Feldman et al. 1972; Feldman 1972; Blomberg 1991) dieser Situation werden folgende Annahmen gemacht: Jede Einzelreaktion ist reversibel und befindet sich im Gleichgewicht bzw. unterliegt dem Massenwirkungsgesetz. Die einzelnen Bindungsstellen ( $B$ ) konkurrieren unabhängig voneinander um univalente Analyte ( $A$ ). Es finden keine anderen Reaktionen statt außer:



Dabei bezeichnet  $n$  die Anzahl an verschiedenen Analyten und  $m$  die Anzahl an verschiedenen Bindungsstellen. Die Gleichgewichtszusammensetzung ist gegeben durch

$$K_{A_i, B_j} = \frac{c_{A_i B_j}}{c_{fA_i} \cdot c_{fB_j}} \quad (4)$$

$$i = 1, 2, \dots, n \quad j = 1, 2, \dots, m$$

$$c_{iA_i} = c_{fA_i} + \sum_{j=1}^m c_{A_i B_j} \quad (5)$$

$$c_{iB_j} = c_{fB_j} + \sum_{i=1}^n c_{A_i B_j} \quad (6)$$

- mit
- $K_{A_i, B_j}$  : Affinitätskonstante für jede Teilreaktion
  - $c_{fA_i}$  : Freie Gleichgewichtskonzentration des  $i$ ten Analyts
  - $c_{fB_j}$  : Freie Gleichgewichtskonzentration der  $j$ ten nicht reagierten Bindungsstelle
  - $c_{iA_i}$  : Gesamtkonzentration des  $i$ ten Analyts
  - $c_{iB_j}$  : Gesamtkonzentration der  $j$ ten Bindungsstelle

$c_{A_i B_j}$  : Gleichgewichtskonzentration des Komplexes aus dem  $i$ ten Analyten und der  $j$ ten Bindungsstelle

Aus Kombination der Gleichungen [4] bis [6] erhält man ein System aus  $n$  Gleichungen:

$$c_{tA_i} = c_{fA_i} + \sum_{j=1}^m \frac{K_{A_i, B_j} c_{tB_j} c_{fA_i}}{1 + \sum_{k=1}^n K_{A_k, B_j} c_{fA_k}} \quad (7)$$

$$i = 1, 2, \dots, n$$

Wenn dieses System aus  $n$  nichtlinearen Gleichungen für die Konzentration der freien Bindungsstellen ( $c_{fB_j}$ ) bei bekannten  $c_{tA_i}$ ,  $c_{tB_j}$  und  $K_{A_i, B_j}$  numerisch gelöst wird, dann kann  $c_{fB_j}$  wie folgt berechnet werden:

$$c_{fB_j} = \frac{c_{tB_j}}{1 + \sum_{i=1}^n K_{A_i, B_j} c_{fA_i}} \quad (8)$$

$$j = 1, 2, \dots, m$$

### 2.1.5 Kreuzreaktivität

Mit dem Phänomen der Kreuzreaktivität ist besonders bei polyklonalen Antikörpern immer zu rechnen, da sie, wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, eine heterogene Mischung von Antikörpern unterschiedlicher Affinitäten darstellen. Die Kreuzreaktivität beschreibt dabei die Tatsache, dass ein spezifisches Paratop eines Antikörpers mit anderer Affinität als zu seinem „eigentlichen“ Antigen auch an strukturverwandte Epitope binden kann. Dabei wird das Ausmaß, mit dem eine solche strukturverwandte Verbindung an den Antikörper bindet, als die relative prozentuale Kreuzreaktivität (%CR) bezeichnet. Die Bestimmung von %CR erfolgt in der Regel durch Titration eines Antikörpers mit dem spezifischen Analyten und der potenziell kreuzreagierenden Substanz. Trägt man die normierten Messwerte gegen den Logarithmus der Konzentration auf und bestimmt die Testmittelpunkte, so kann man die %CR folgendermaßen berechnen (Abraham 1969; Oubina et al. 1997):

$$\%CR = \frac{c_{AnalytTM}}{c_{kreuzAnalytTM}} \cdot 100 \quad (9)$$

mit  $c_{AnalytTM}$ : Konzentration des spezifischen Analyten am Testmittelpunkt

$c_{kreuzAnalytTM}$ : Konzentration des kreuzreaktiven Analyten am Testmittelpunkt

Die Kreuzreaktivität von Antikörpern kann aber auch zur Bestimmung von Summenparametern in der Analytik verwendet werden (Hock 1995; Winklmaier et al. 1997; Bjarnason et al. 1997; Van Emon et al. 1992; Proll 2001) oder es werden Multianalyt-Messungen mit komplexen Auswertemethoden durchgeführt (Reder 2003).

### 2.1.6 Multianalyt-Immunoassays in der Wasseranalytik

Benutzt man die Antigen-Antikörper-Bindung in der Analytik, um ein Molekül in einem Nachweisverfahren qualitativ oder quantitativ nachzuweisen, so spricht man von einem Immunoassay. Dabei lassen sich die Testformate dieser Immunoassays nach verschiedenen Kriterien unterscheiden. Zunächst ist eine Unterscheidung zwischen homogenen Assays, die in Lösung stattfinden, und heterogenen Assays, bei denen eine Oberflächenreaktion beteiligt ist, sinnvoll. Weiterhin können diese Assays in kompetitive bzw. nicht kompetitive Reaktionen, oder nach ihrer Detektion, markierungsfrei (direkt) bzw. mit Markierung (indirekt) unterteilt werden. In der Wasseranalytik müssen Immunoassays zu niedrigen Nachweisgrenzen kommen, dabei gleichzeitig mehrere Analyte quantifizieren (multianalyt) können und automatisierbar sein. Diese hohen Ansprüche schränken die in Frage kommenden Testformate stark ein.

Die Mikroarray-Technologie ist die treibende Kraft hinter der Entwicklung von Multianalyt-Immunoassays. Erst mit der Erzeugung funktionalisierter Oberflächen durch das Ankoppeln verschiedener Erkennungsstrukturen wurden die ersten dieser Systeme entwickelt. Im Bereich der Wasseranalytik wurden erfolgreiche Multianalyt-Immunoassays bisher nur in Kombination mit Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF; s. Kapitel 2.2.2) als erfolgsversprechende Detektionsmethode beschrieben. Die heterogene Phase war dabei entweder mit einem Array von Antikörpern (Ligler et al. 2001) für das Sandwichtestformat oder Antigenen (Barzen 2000) für den nicht-kompetitiven Bindungshemmtest modifiziert. Beide Systeme wurden durch die Kopplung an eine Fließ-Injektions-Analyse (FIA) (Krämer 1999) automatisiert.

In der Literatur sind noch einige weitere TIRF Biosensoren beschrieben, die zum Multianalyt-Nachweis fähig sind, jedoch nicht für Wasseranalytik konzipiert wurden. Das System von Silzel et al. (1998) wurde zur Bestimmung verschiedener Klassen humaner IgGs eingesetzt. Plowman et al. (1999) nutzte seinen TIRF Biosensor um verschiedene IgGs, Proteinkinase c MB, Troponin I oder Myoglobin nachzuweisen. Beiden Systemen ist zu Eigen, dass sie ein Array aus verschiedenen immobilisierten „Fängermolekülen“ einsetzen, die in der Regel Antikörper sind. Ein weiteres System (Schuderer et al. 2000) benutzt die TIRF-Technologie um mittels eines bulk-optischen Transducers für Multianalyt-Messungen mit fluoreszenzmarkierten Oligonucleotiden. Ebenfalls für den Nachweis von Oligonucleotiden, aber auch für immunochemische Detektion in der medizinischen Diagnostik, wird ein TIRF Sensor von Meusel (1998), Schult (1999) und Peter (2001) eingesetzt. Dieses System ist zum Multianalyt-Nachweis fähig und arbeitet mit einem elliptisch aufgeweiteten Laserstrahl, der über ein Prisma in einen Transducer unter Totalreflektion eingekoppelt wird und so ein flächiges Evaneszenzfeld erzeugt. In jüngster Zeit wurde auch der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für die Multianalyt-Detektion von Pestiziden benutzt (Sunil Bahnd 2005). Das heterogen kompetitive Testformat erschwert jedoch die Automatisierung erheblich, weshalb sich diese sehr aufwändigen Apparaturen bisher nur in der klinischen Diagnostik durchgesetzt haben.

In dieser Arbeit wird der Ansatz des Bindungshemmtests mit TIRF verfolgt, der nachfolgend eingehender beschrieben werden soll.

### **2.1.7 Bindungshemmtest**

Das Testformat, welches in dieser Arbeit verwendet wird, ist der Bindungshemmtest. Nachfolgend wird dieser Bindungshemmtest für Multianalyt-Immunoassays in der Durchflusszelle beschrieben. Ein solcher Test beginnt mit der Vorinkubation einer bestimmten Menge von fluorochrommarkierten Antikörperen mit der Messprobe, die die zu bestimmenden Analyten enthält. So kann sich das Gleichgewicht dieser Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen nach dem Massenwirkungsgesetz einstellen (s. Kapitel 2.1.4). Bei der hier verwendeten TIRF-Messmethode (s. Kapitel 2.2.2) ist auf der Oberfläche eines Glastransducers ein Array von Derivaten (s. o.) mit hoher Affinität

zu den korrespondierenden Antikörpern kovalent an bestimmten Messstellen immobilisiert. Dabei ist es wichtig, dass die jeweiligen Messstellen der Transduceroberfläche sehr viele spezifische Bindungsstellen (Derivatmoleküle) tragen. Die vorinkubierte Probenlösung wird in Kontakt mit den freien Bindungsstellen auf der Transduceroberfläche gebracht (s. Abbildung 2), wobei die durchschnittliche Verweilzeit der Probe sehr kurz gehalten wird (gesteuert über den Fluss der Probe durch eine Flusszelle). Dies gewährleistet, dass das ursprüngliche Gleichgewicht in der homogenen Phase nicht gestört wird. Antikörpermoleküle diffundieren an die Oberfläche, wobei solche mit wenigstens einer freien Bindungsstelle dort an das entsprechende immobilisierte Derivat binden können.

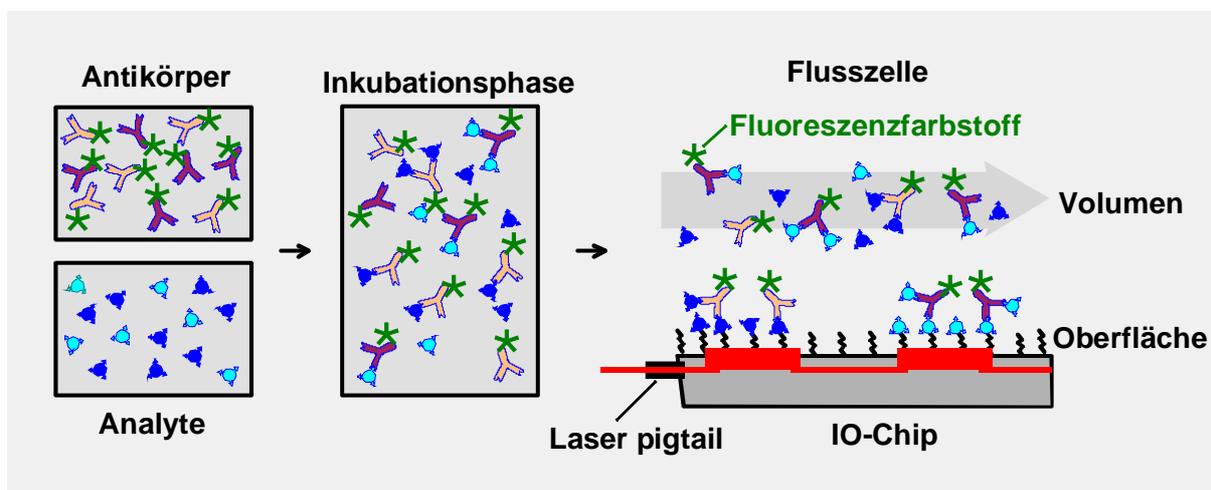


Abb. 2: Prinzip des Bindungshemmtests mit TIRF, exemplarisch für zwei Antikörper.

Befinden sich auf der Oberfläche genügend immobilisierte Bindungsstellen, so führt dies dazu, dass sämtliche bindungsfähigen „oberflächennahen“ Antikörpermoleküle an die Transduceroberfläche binden. Die daraus resultierende Verarmung von Antikörpermolekülen im oberflächennahen Bereich führt zur „Folgediffusion“ aus der Flüssigkeit in diese Diffusionsschicht. Im kontinuierlichen Fluss ist die nachgelieferte Menge an Antikörpermolekülen konstant. Bei geeigneter Wahl der Testbedingungen arbeitet das System hier massentransportkontrolliert (auch: diffusionskontrolliert). Eine Zusammenfassung dieser Wechselwirkungsprozesse ist in Abbildung 3 gezeigt. Besonders wichtig für die massentransportkontrollierte Anbindung der Antikörper an die Derivate auf der Oberfläche ist eine sehr schnelle Kinetik bzw. ein hoher Wert für

$K_{het}$  (Affinitätskonstante zum Derivat an der heterogenen Phase). So wird die Diffusion zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Die Menge an gebundenen Antikörpermolekülen wird nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs im Evaneszentfeld (s. Kapitel 2.2.2) über die Fluoreszenzintensität an den jeweiligen Messstellen quantifiziert und dient als indirektes Maß für die Analytkonzentrationen in der Probe.

Ein Immunoassay nach dem Prinzip des Bindungshemmtests stellt also ein nicht kompetitives Testformat dar. Das bedeutet, dass der Analyt und das Derivat nicht um den Antikörper konkurrieren. Die Immunreaktion erfolgt dabei wie beschrieben in einer flüssigen Phase, die Trennung und der Nachweis an einer festen Phase. Aus diesem Grund ordnet man dieses Testformat den heterogenen Immunoassays zu.

Die beschriebene Forderung nach Antikörpern mit hoher Affinität zum Analyt und zum Derivat ist bedingt durch diese Eigenschaften des Bindungshemmtests. Das heterogen kompetitive Testformat des ELISA auf der anderen Seite verlangt meist nach Antikörpern mit Affinitätskonstanten maximal  $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ . Eine zu starke Bindung des Antikörpers, z. B. an das Antigen, würde auf Grund des beinahe irreversiblen Charakters dieser Bindung, die erforderliche Gleichgewichtseinstellung zwischen den konkurrierenden Bindungspartnern einseitig begünstigen.

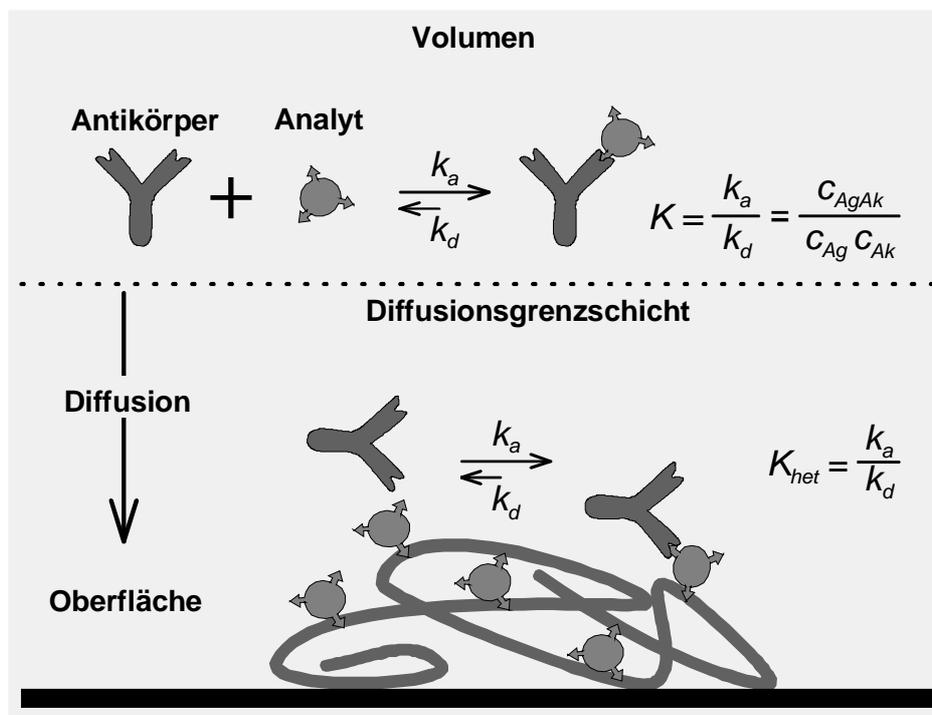


Abb. 3: Wechselwirkungsprozesse beim Bindungshemmtest.

## 2.2 Optische Grundlagen

### 2.2.1 Fluoreszenz

Bei der Fluoreszenz handelt es sich um einen Vorgang, bei dem ein Molekül nach Lichtabsorption die aufgenommene Energie durch Emission von Licht wieder abgibt. Betrachtet man Absorptions- und Emissionsvorgänge, so kann man diese sehr anschaulich mit Hilfe von diskreten Energiepaketen, den Photonen, beschreiben. Ein Photon besitzt dabei eine bestimmte Energie  $E_{ph}$ , die mit der Frequenz  $f$  bzw. der Wellenlänge  $\lambda$  und der Lichtgeschwindigkeit  $c$  über die Planck'sche Beziehung mit dem Planck'schen Wirkungsquantum  $h$  ( $h = 6.626 \cdot 10^{-34}$  Js) verknüpft ist.

$$E_{ph} = h \cdot f = h \cdot c / \lambda \quad (10)$$

Erfolgt die Emission sehr kurz (ps bis ms) nach der Absorption von Licht durch ein Molekül, ohne dass dabei eine Spinumkehr stattfindet, spricht man von Fluoreszenz. Dieser Vorgang lässt sich einfach an Hand des Jablonski-Termschemas (Abbildung 4) verdeutlichen.

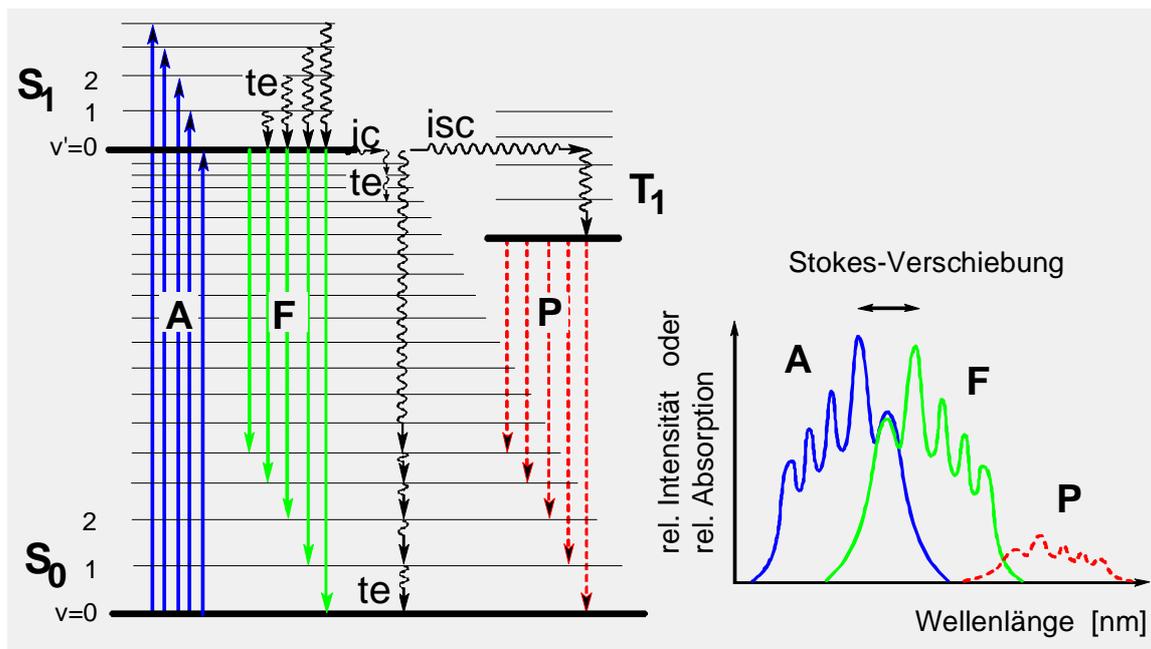


Abb. 4: Jablonski – Termschema

Befinden sich Moleküle bei Raumtemperatur nur im niedrigsten Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustandes  $S_0$ , können sie durch Absorption **A** in verschiedene Schwingungszustände des angeregten Zustands  $S_1$  innerhalb von etwa  $10^{-15}$  s gelangen (eine Anregung in höhere elektronische Zustände soll hier nicht betrachtet werden). Durch thermische Equilibrierung relaxieren die Moleküle innerhalb von ca.  $10^{-13}$  bis  $10^{-12}$  s (entsprechend der Boltzmannverteilung im thermischen Gleichgewicht) in den Schwingungszustand  $S_1$ . Von diesem angeregten ersten Schwingungszustand  $S_1$  (Lebensdauer ca.  $10^{-7}$  s) kann das Molekül unter Emission von Licht (Photon(en)) in den Schwingungszustand  $S_0$  zurückfallen. Diese Emission wird Fluoreszenz genannt und tritt etwa nach  $10^{-9}$  bis  $10^{-7}$  s nach der Anregung auf. Neben dieser Möglichkeit kann das Molekül aus dem  $S_1$ -Schwingungszustand auch noch durch interne Umwandlung innerhalb von  $10^{-7}$  bis  $10^{-5}$  s und anschließender Schwingungsrelaxation strahlungslos nach  $S_0$  desaktivieren.

Auch die isoenergetische Umwandlung in den Triplettzustand (intersystem crossing) ist in einigen Fällen möglich. Von dort kommt es nur dann zur Emission, in diesem Fall Phosphoreszenz **P**, wenn eine weitere Interkombination und anschließende thermische Equilibrierung nicht auftreten. In erster Näherung ist die Spinumkehr während eines Elektronenübergangs verboten, so dass der Triplettzustand sehr langlebig wird, falls keine strahlungslosen Konkurrenzprozesse auftreten.

In Abbildung 4 ist rechts die Feinstruktur des Absorptions- und des Fluoreszenzspektrums angedeutet. Dabei ist das Fluoreszenzspektrum zu größeren Wellenlängen verschoben (Stokes-Verschiebung), da ein Teil der absorbierten Energie durch die thermische Equilibrierung bereits verloren gegangen ist.

Von praktischem Interesse ist die Photozersetzung von Molekülen bei diesem beschriebenen Prozess. Die Ursache für dieses oft als Ausbleichen beschriebene Phänomen sind Photoreaktionen, die sehr leicht von dem angeregten Zustand solcher Moleküle ausgehen. Für die Beobachtung der Fluoreszenz bei Immunoassays sollte die Photostabilität der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe möglichst groß sein.

### 2.2.2 TIRF mit integrierter Optik

Die integrierte Optik verfolgt das Ziel, miniaturisierte optische Bauelemente, integriert in Wellenleiterstrukturen, unter Zuhilfenahme von Planartechnologien herzustellen und mehrere solcher Komponenten auf einem gemeinsamen Substrat zu integrieren. In dieser Arbeit wurden planare integriert optische Wellenleiter (im Folgenden als IO-Chips bezeichnet) für die Fluoreszenzanregung nach dem Prinzip der inneren Totalreflexion (Total Internal Reflection Fluorescence, TIRF) eingesetzt. Alle IO-Chips wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. James S. Wilkinson am Optoelectronics Research Centre der University of Southampton (United Kingdom) entwickelt und gebaut.

Integriert optische Wellenleiter können vom mono- oder multimodischen Typ sein. Diese Eigenschaft der Integrierten Optik ist auf die Dimension der wellenleitenden Struktur zurückzuführen. Gängige Dimensionen der Wellenleiterstrukturen sind in einem Bereich zwischen  $0.1 \mu\text{m}$  bis zu einigen  $\mu\text{m}$ . Dies entspricht einem Bruchteil der eingesetzten Wellenlänge bis zu einem kleinen Vielfachen der Wellenlänge. Bei noch größerer Dimension wird der Wellenleiter „bulk optisch“ genannt. Die eingesetzte Theorie zur Beschreibung dieser Wellenleiter ist bedingt durch diese Einteilung.

Für integriert optische Systeme ist die mathematische Beschreibung den Methoden der Resonatoroptik verwandt. Es werden stationäre Lösungen der Wellengleichungen gesucht, wobei die Lösungen der Eigenwertgleichungen (Eigenwerte) als Moden bezeichnet werden. Die Anzahl der Moden hängt von den Dimensionen des Wellenleiters im Vergleich zur Wellenlänge und von den Brechungsindexprofilen ab. Besitzt ein Wellenleiter nur eine Lösung, so wird er als monomodig bezeichnet und wird häufig für interferometrische Sensoren bevorzugt (Klotz 1998).

Allen Wellenleitertypen ist gemeinsam, dass das elektromagnetische Feld der geführten Welle an un stetigen Brechungsindexsprüngen nicht abrupt auf null abfällt, sondern wellenlängenabhängig exponentiell in das Umgebungsmedium abklingt, was aus den Stetigkeitsbedingungen bei Totalreflexion vom optisch dichteren ins optisch dünnere Medium folgt (Klotz 1998). Dieser Feldanteil wird Evaneszentfeld genannt und ist ein Teil der Modenstruktur des Wellenleiters. Er trägt einen Teil der geführten Lichtleistung und besitzt Eindringtiefen, die kleiner als die Lichtwellenlänge sind. Dies nutzt man in der Evaneszentfeldsensorik aus.

Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung eines IO-Chips für die Transduktion mittels TIRF.

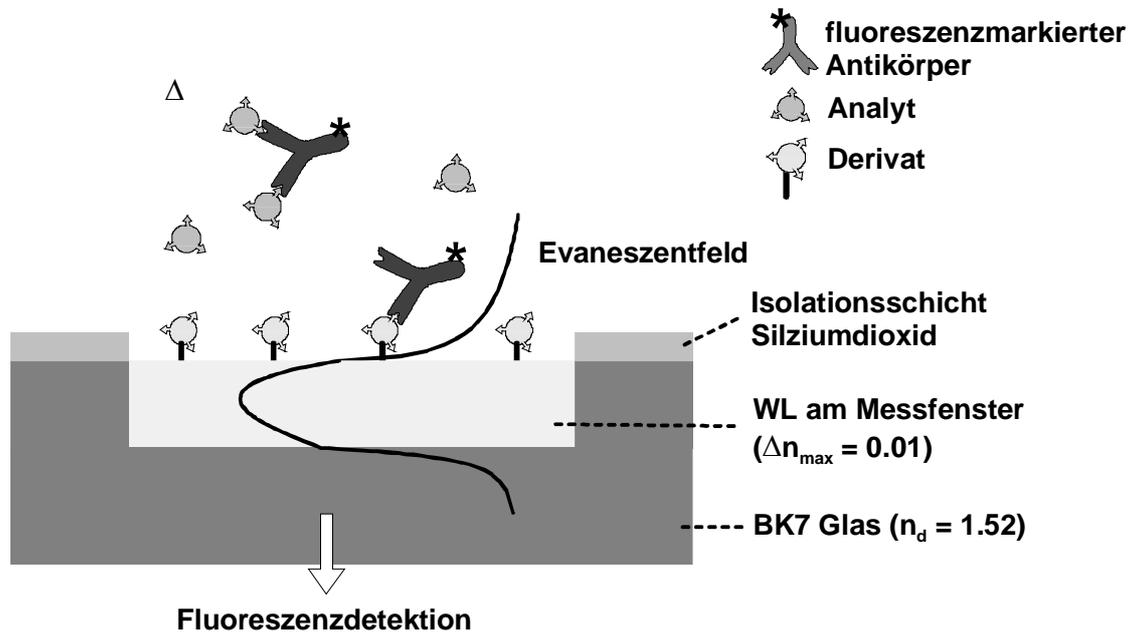


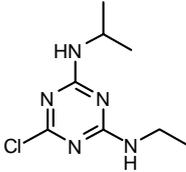
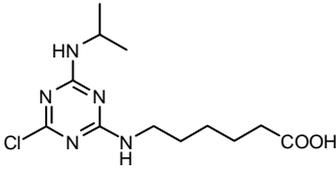
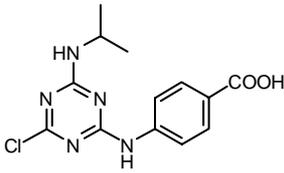
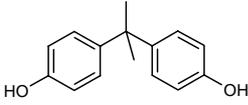
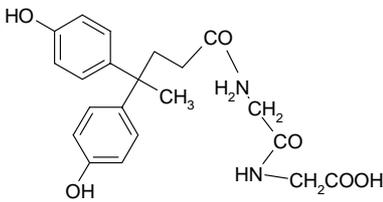
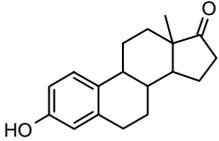
Abb. 5: Schematische Darstellung eines TIRF IO-Chips mit biomolekularer Erkennung.

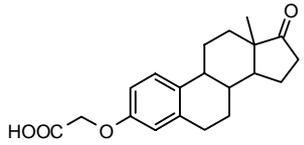
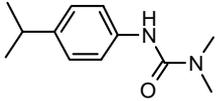
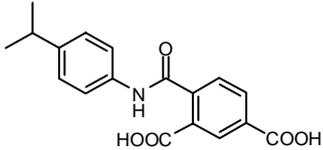
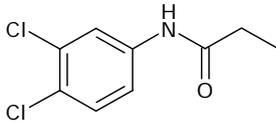
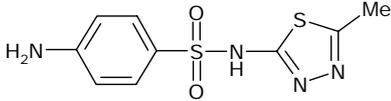
Oberflächennah gebundene Fluoreszenzfarbstoffmoleküle absorbieren Licht nach dem Lambert Beer'schen Gesetz und werden dadurch zur Fluoreszenz angeregt. Bei dieser Anordnung und der verwendeten Wellenlänge des Diodenlasers (635 nm) reicht das Evaneszenzfeld ca. 318 nm weit in das angrenzende Medium (PBS,  $n \approx 1.34$ ) hinein, bis es etwa auf  $1/e$  seines ursprünglichen Werts abgefallen ist. Dabei stammt der Beitrag zum Evaneszenzfeld fast ausschließlich von der TE-Mode (senkrecht zur Oberfläche des IO-Chips polarisiert) bei diesen monomodischen polarisationserhaltenden Wellenleitern. Bei einer weiteren Variante dieser IO-Chips wurde flächig der komplette sensitive Bereich mit einer dünnen Schicht aus Tantalpentoxid beschichtet. Auf Grund des hohen Brechungsindex dieses Materials ( $n_{635\text{nm}} = 2.09$ , Quigley et al. 1997) wird das Evaneszenzfeld verstärkt. Wie bei Klotz1998 gezeigt, ergeben sich für die TE-Mode Verstärkungsfaktoren von bis zu 30 durch Tantalpentoxidschichten von 30 nm Dicke.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Analyte, Derivate und Antikörper

Tabelle 2: Strukturformel und Molekulargewicht der verwendeten Analyte und Derivate.

Name	Summenformel	MG [ g mol <sup>-1</sup> ]	Strukturformel
Atrazin 2-Chlor-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazin	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub>	215,6	
ACA 4-Chloro-6-(isopropylamino-1,3,5-triazin-2-(6-amino)hexansäure	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	301,8	
ZxBA 4-Chloro-6-(isopropylamino-1,3,5-triazin-2-(6-amino)benzoesäure	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	307,7	
Bisphenol A (BPA) 4,4'-Isopropylidenediphenol	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	228,3	
HPVAG Bis-4-hydroxyphenyl-valeriansäure-glycylglycin	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	400	
Estron 3-Hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17-one	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	270,4	

E1,3CME Estron-3-carboxymethyl- ether	$C_{20}H_{24}O_4$	328.4	
Isoproturon N'-(4-isopropylphenyl)- N,N-dimethylurea	$C_{12}H_{18}N_2O$	206.3	
IPA 4-Isopropylaniline carbo- xyphthalate	$C_{18}H_{17}NO_5$	327.3	
Propanil N-(3,4)- dichloro- phenyl)propanamide	$C_9H_9Cl_2NO$	218.1	
PRN Das Derivat unterliegt der Geheimhaltung.			
Sulfamethizol 4-Amino-N-(5-methyl- 1,3,4-thiadiazol-2- yl)benzenesulfonamide	$C_9H_{10}N_4O_2S_2$	270.3	
SUL1 und SUL7 Die Derivate unterliegen der Geheimhaltung			

Die Analyte Atrazin, Isoproturon und Propanil (analytischer Standard PESTANAL<sup>®</sup>), Sulfamethizol und Estron (analytischer Standard VETRANAL<sup>®</sup>) sowie Bisphenol A wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Die Derivate (ACA, ZxBA, HPVAG, E1,3CME, IPA, PRN, SUL1 und SUL7) zu den Analyten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Ram Abuknesha vom King`s College London (England) zur Verfügung gestellt.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, a-Atrazin (a-ACA), a-Bisphenol A (a-BPA), a-Estron (a-E1), a-Isoproturon (a-IPA) und a-Propanil (a-PRN) sind polyklonal aus Schaf und wurden ebenfalls von Herrn Dr. Abuknesha hergestellt.

### 3.2 Verbrauchsmaterialien und Puffer

AMD	Aminodextran 120 kD	Amdex Helixresearch
AMD	Aminodextran 40 kD	Amdex Helixresearch
BSA	Rinderserumalbumin	Sigma, Deisenhofen
Cy5.5 <sup>TM</sup>	aktivierter Cyaninfarbstoff bisfunktional	Amersham Life Science, Braunschweig
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid	Sigma, Deisenhofen
DMF	Dimethylformamid	Fluka, Neu-Ulm
DMSO	Dimethylsulfoxid	Fluka, Neu-Ulm
GOPTS	3-Glycidyoxypropyl- trimethyl-siloxan	Fluka, Neu-Ulm
HCl	Salzsäure	Merck, Darmstadt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30 % Wasserstoffperoxidlö- sung	Fluka, Neu-Ulm
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	rauchende Schwefelsäure	Sigma, Deisenhofen
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka, Neu-Ulm
KOH	Kaliumhydroxid	Fluka, Neu-Ulm
Microcon	Mikrokonzentrator 30 kD	Millipore Corporation, Bedford, MA, USA
NaCl	Natriumchlorid	Fluka, Neu-Ulm
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat	Fluka, Neu-Ulm
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
NaOH	Natronlauge (5 N)	Fluka, Neu-Ulm
NHS	N-Hydroxysuccinimid	Fluka, Neu-Ulm
Ova	Ovalbumin	Sigma, Deisenhofen
PEG	Dicarboxypolyethylenglykol	Rapp Polymere, Tübingen
SDS	Natriumdodecylsulfat	Fluka, Neu-Ulm
Säule	Sephadex G-25 Säule	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

*Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline PBS)*

8.76 g Natriumchlorid (150 mmol) und 1.36 g Kaliumdihydrogenphosphat (10 mmol) werden mit deionisiertem Wasser auf 1 L aufgefüllt und 2 M Kalilauge auf pH 7.4 titriert.

*Piranha-Lösung*

60 Vol% konzentrierte Schwefelsäure und 40 Vol% Wasserstoffperoxidlösung (30 %) werden gemischt und direkt weiter verwendet.

*SDS-Regenerationslösung*

0.5 % SDS in deionisiertem Wasser wird mit HCl (5 N) auf pH 1.9 eingestellt.

### **3.3 Geräte**

*AWACSS*

Bei dem AWACSS-Gerät (s. Abbildung 6) handelt es sich um einen optischen Biosensor für die simultane Detektion von kleinen organischen Schadstoffen im Wasser mittels eines vollständig automatisierten TIRF-basierten Multianalyt-Immunoassays. Zusätzlich besteht die Fähigkeit zur Kommunikation mit einer Datenbank. Dieses Gerät wurde als Funktionsmuster innerhalb des von der EU geförderten Projekts AWACSS entwickelt und gebaut. Das AWACSS-Gerät besteht aus vier Hauptkomponenten:

1. AWACSS-Instrument: Elektronik, FIA-System (Fließ-Injektions-Analyse-System, gekoppelt an den Pal Autosampler über dessen Inject-Load-Ventil), Optik und dem IO-Chip für die Transduktion (s. Abbildung 7).
2. HTC Pal Autosampler (HTC-Pal, HTC Analytics, Schweiz): für die automatisierte Probengebung und Zumischung einer Antikörperstammlösung sowie für die Erstellung von Verdünnungsreihen bei Kalibrierungen mit einer modifizierten CycleComposer Software.
3. PC an der Messstation: für die Steuerung, Messwerterfassung, Datenauswertung und Telemetrie über ein Modem.
4. Server für Kommunikation Datenbank und einer Webseite.

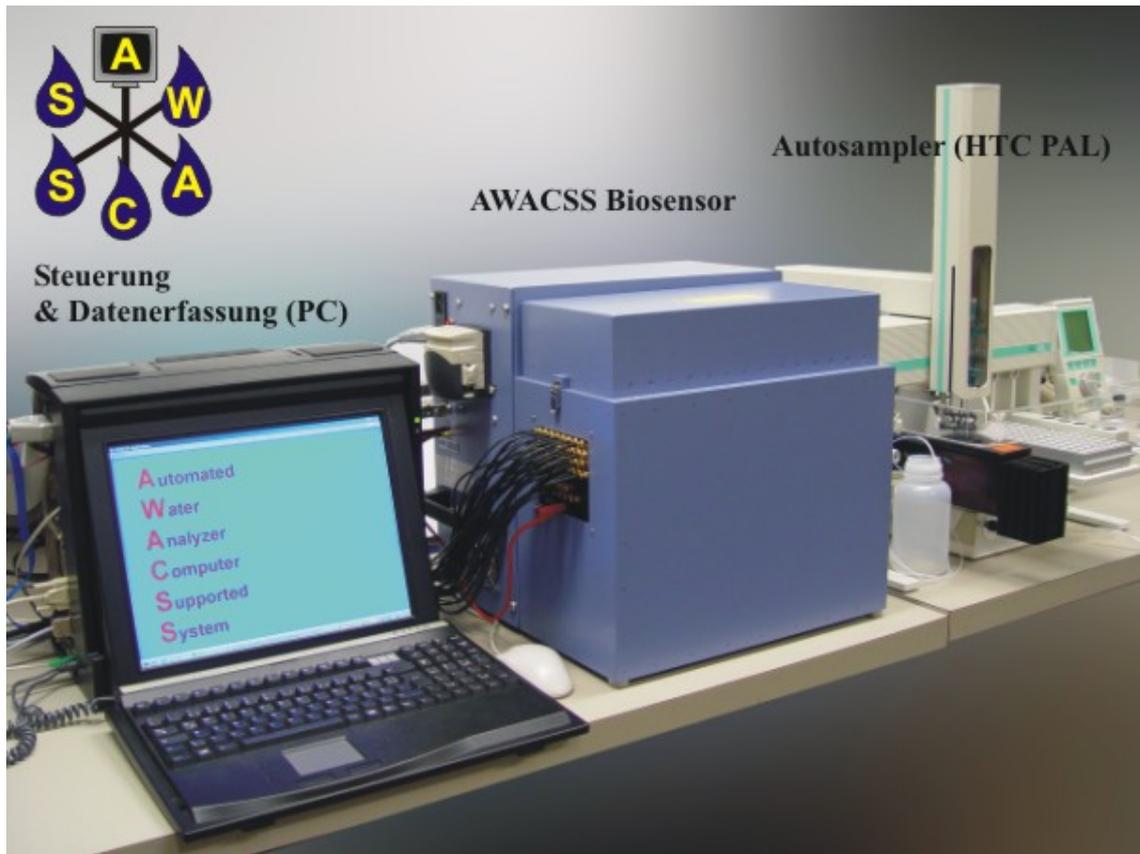


Abb. 6: Optisches Biosensorsystem AWACSS

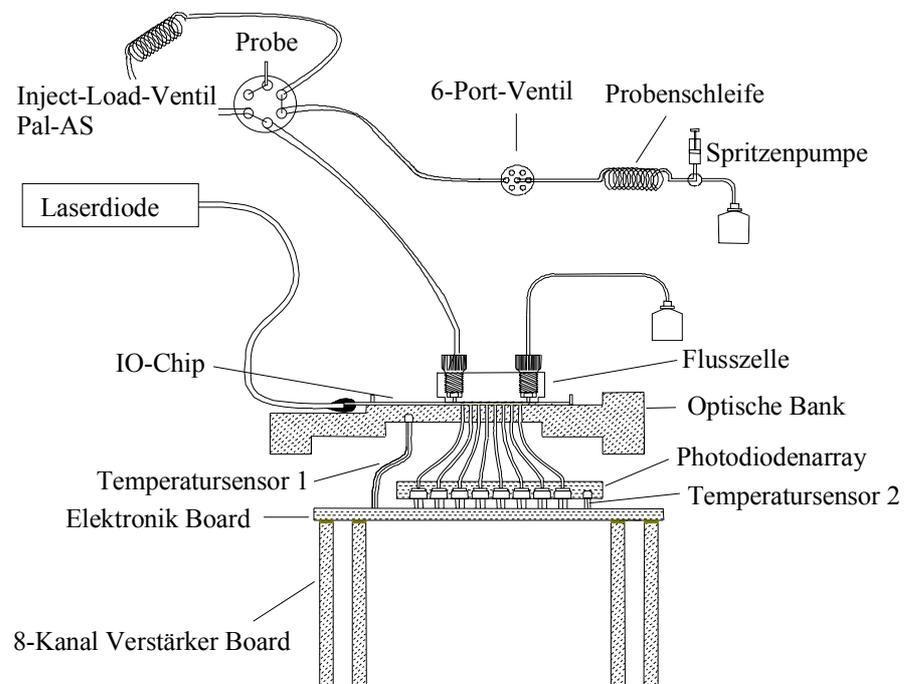


Abb. 7: Schematischer Aufbau des AWACSS-Instruments.

Nachfolgend sind die wesentlichen Komponenten aufgelistet und kurz beschrieben:

#### Verstärker

Linearverstärker mit Tiefpassfilter (1,5 Hz) für 32 getrennte Kanäle und analogen Ausgängen für die externe Datenverarbeitung und Digitalisierung; Ansteuerung über RS232-Schnittstelle.

#### Photodiodenplatine

32 Photodioden (OSI 5-IR-100M/1K, Centrovision, Newbury Park, USA) mit einer Sensitivität von 3 x NEP (noise equivalent power) von  $3 \times 10^{-13} \text{ WHz}^{-0.5}$  und zwei Temperatureausgängen (ein Temperatursensor auf dem Board und einer unter dem IO-Chip auf der optischen Bank). Experimentell wurde für dieses System aus Verstärker und Photodiodenplatine ein NEP von ca. 100 fW ermittelt.

#### Polymerlichtleiter und Filter

Unter jedem Messfenster des IO-Chips befindet sich ein Polymerlichtleiter (PML; Typ #PO2-534, Durchmesser 1mm, Edmund Optics Ltd., England), der das Fluoreszenzlicht mit einer Numerischen Appertur von  $0.51 \pm 0.03$  einsammelt und über einen Filter (Typ CRL- LDF-700-6 von NDCinfrared, UK) auf eine Photodiode abbildet.

#### FIA und Autosampler

Im AWACSS-Instrument befindet sich eine Spritzenpumpe mit T-Ventil sowie einem Mehrportventil. Nach dem 6-Port-Ventil auf dem Weg zum Sensor befindet sich das Inject-Load-Ventil des Autosamplers. Hier wird dem AWACSS-Gerät die Probe durch den Autosampler bereitgestellt (s. Abbildung 7).

#### IO-Chip

Der Transducer des AWACSS ist ein integriert optisches Bauteil. Während des AWACSS-Projekts wurden mehrere dieser IO-Chips mit unterschiedlichen Spezifikationen hergestellt und getestet (Tabelle 3). Alle IO-Chips bestehen dabei aus einer eingebetteten Streifenwellenleiterstruktur (Klotz 1998), der mittels Kaliumionenaustausch ( $\text{KNO}_3$  bei  $400 \text{ }^\circ\text{C}$  für 2 h) in BK7-Glas erzeugt wurde und zur Einkopplung des La-

sers mit einem Faserpigtail versehen ist. Dabei wird polarisationserhaltend monomodisches (nur TE-Mode) Laserlicht mit 635nm über einen Faserpigtail in den Wellenleiter eingekoppelt und über drei parabolische Y-Verzweigungen gleichmäßig auf vier „Linien“ verteilt. An diesen Verzweigungen wird der Wellenleiter je nach IO-Chip unterschiedlich stark aufgeweitet (vgl. Tabelle 3). Diese vier Linien weisen je acht äquidistante Unterbrechungen (1,5 mm lang und 0,3 mm breit) in der gelifteten Siliziumdioxidisolationsschicht (ca. 1 µm dick) auf, so dass an 32 Messstellen jeweils ein nutzbares Evaneszentfeld entsteht (s. Abbildung 8) (Ping 2004). Bei einigen dieser Chips wurde zur Verstärkung der Evaneszentfelder eine hochbrechende dünne Schicht aus Tantalpentoxid (25 oder 37 nm) aufgebracht.

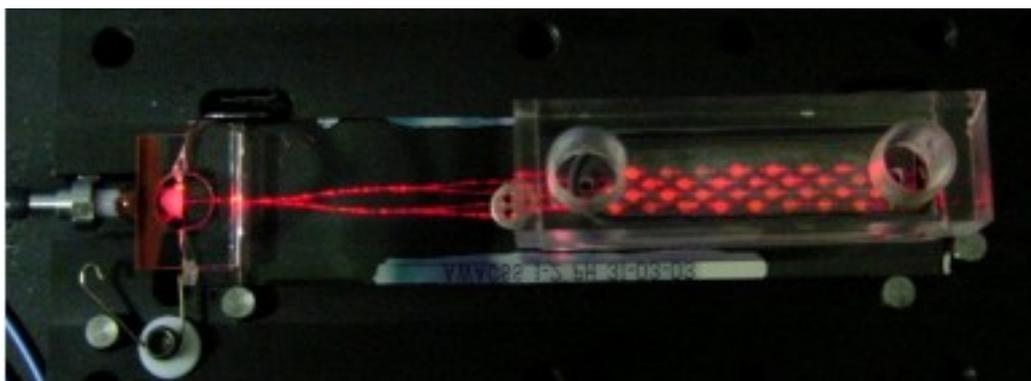
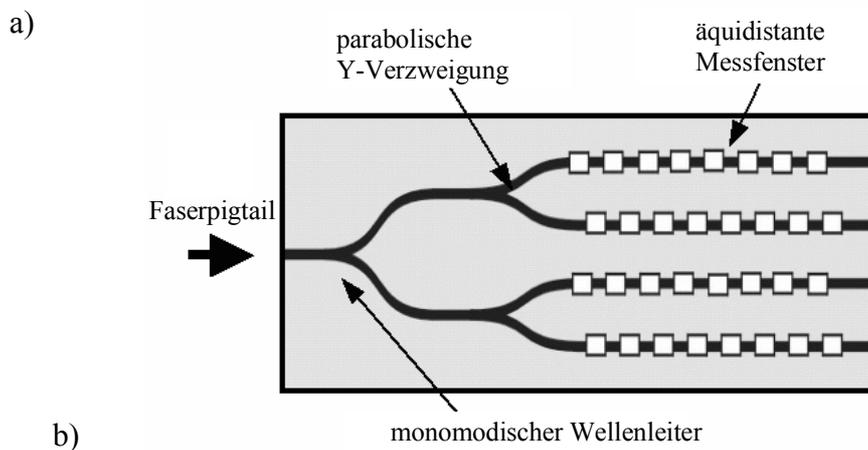


Abb. 8: a) Schematische Darstellung der integriert optischen planaren Wellenleiter (IO-Chips). b) IO-Chip mit Faserpigtail und aufgeklebter Flusszelle.

Tabelle 3: IO-Chips.

<b>Seriennummer</b>	<b>Aufweitung der Welleleiter an den Messfenstern</b> <b>[<math>\mu\text{m}</math>]</b>	<b>Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Schicht</b> <b>[nm]</b>
13 – 1	2.5	37
13 – 2	30	0
13 – 3	60	37
14 – 1	2.5	0
14 – 2	30	25
14 – 3*	60	25

\* Stand für Tests nicht zur Verfügung

### Flusszelle

Innerhalb dieser Arbeit kamen Flusszellen mit einem Flusskanal von ca. 35  $\mu\text{m}$  Höhe und einer Oberflächenrauigkeit von ca. 0.5  $\mu\text{m}$  zum Einsatz (gebaut vom Projektpartner CRL). Der Flusskanal (Länge 24 mm, Breite 5 mm) wurde dabei unter Hitze in einen PMMA-Block eingepreßt und ist so dimensioniert, dass er etwas größer als der sensitive Bereich der Messfensteranordnung ist. Die Zuleitung in den Flusskanal weist einen etwas größeren Durchmesser (1.5mm) als der Abfluss (1.0 mm) auf, um für einen positiven Gegendruck zur Unterdrückung von Luftblasenbildung zu sorgen. Diese Flusszellen wurden auf zuvor beschichtete IO-Chips positioniert und mit einem UV-härtenden Klebstoff dauerhaft fixiert (s. Abbildung 8). Für eine bessere Verteilung des Klebstoffs war der Bereich mit Kontakt zu der Transduceroberfläche mit SiO<sub>2</sub> beschichtet. Um die Oberflächenchemie auf den IO-Chips zu erneuern, mussten die geklebten Flusszellen mit rauchender Salpetersäure und DCM entfernt werden. Am Ende dieser Arbeit standen auch Flusszellen mit einer Dichtung zum Anpressen zur Verfügung.

### Makroeditor und Assayprogrammierung

Der von Siemens entwickelte Makroeditor erlaubt die Programmierung von Testformaten durch eine einfache Abfolge von vordefinierten Steuerbefehlen (Makros) und Eingabe von Parametern im Textmodus (Editor). Die eigentliche Hardware-

---

Ansteuerung erfolgt dann über ein Visual Basic-Messprogramm, welches die erstellten Makros interpretiert und ausführt. Die Makroeditoroberfläche ist in Abbildung 9 gezeigt. Die Software auf dem PC der Messstation erlaubt auch eine bidirektionale Kontrolle des Autosamplers. Dazu wurde die CycleComposer Software so modifiziert, dass eine vordefinierte Abfolge von Aktionen (Samplelist) durch einfaches Aufrufen z. B. in der Windows-Befehlszeile gestartet werden kann. Diese Aktion ist ebenfalls in den AWACSS-Makroeditor eingebunden. Für die zeitliche Synchronisation zwischen den beiden Programmen, AWACSS-Makroeditor und CycleComposer, wurde ein Kommunikationsprotokoll (sog. „handshake“) erarbeitet, das an Kontrollpunkten einen bidirektionalen Austausch von Steuersignalen (über Relais 1, TTL1-in und TTL2-in des Pal Autosamplers) erlaubt (s. Abbildung 10). Des Weiteren ist das Relais 2 des Autosamplers als Aktivitäts- bzw. Störungsmelder für den CycleComposer-Programmablauf immer geschlossen, so lange die Samplelist fehlerfrei ausgeführt wird. Dieser Zustand wird von der AWACSS-Software ständig abgefragt.

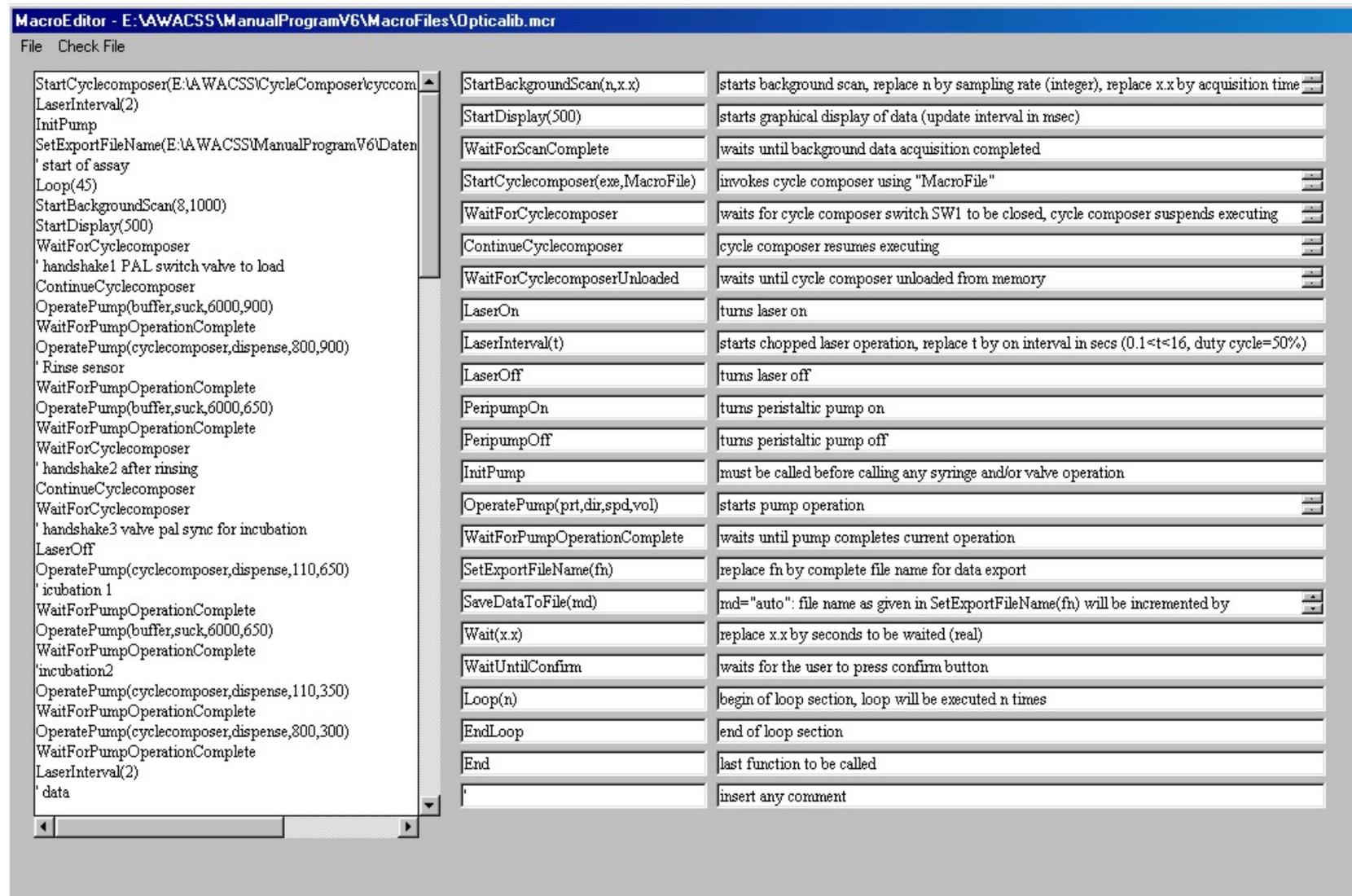


Abb. 9: Benutzeroberfläche des Makroeditorprogramms.

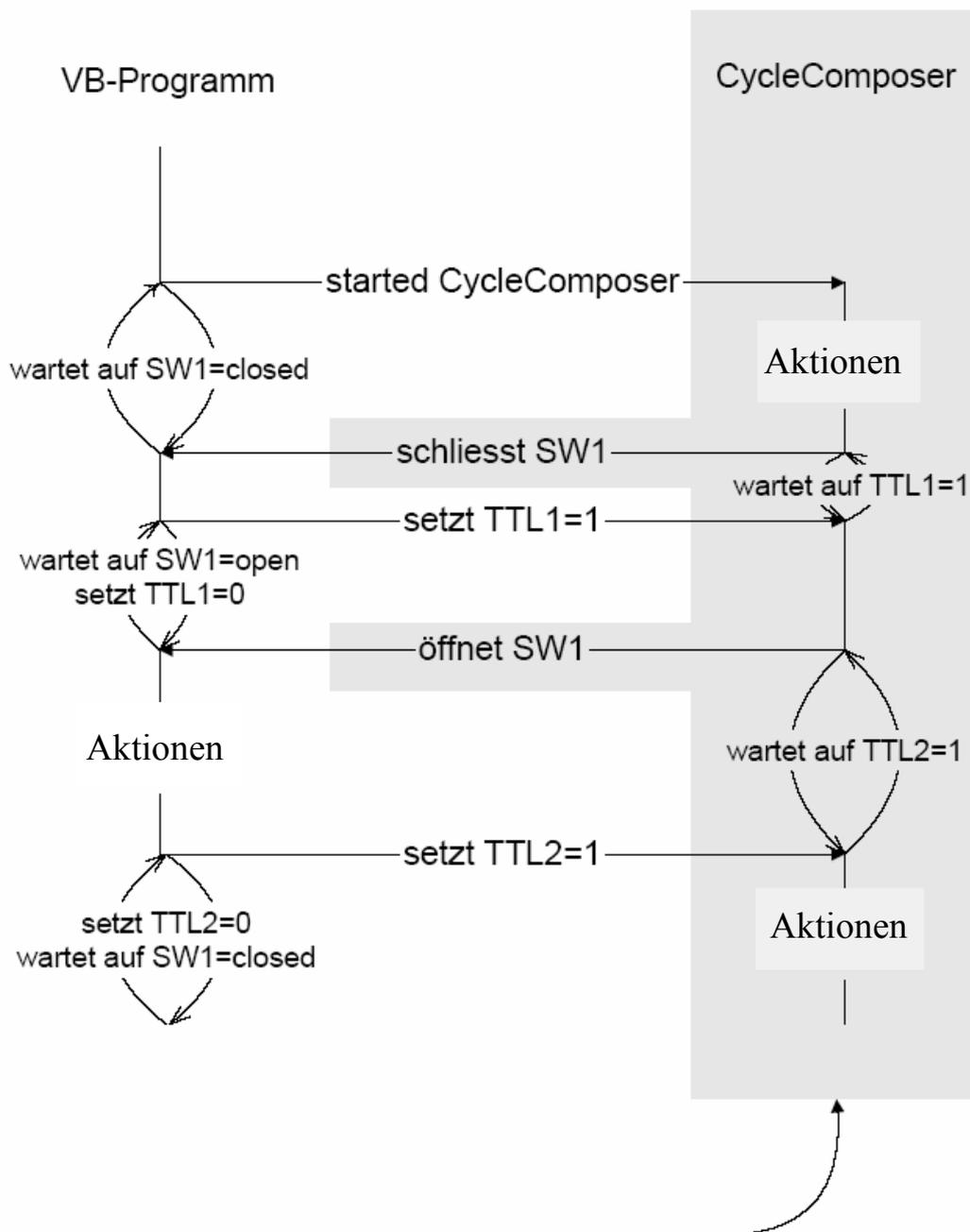


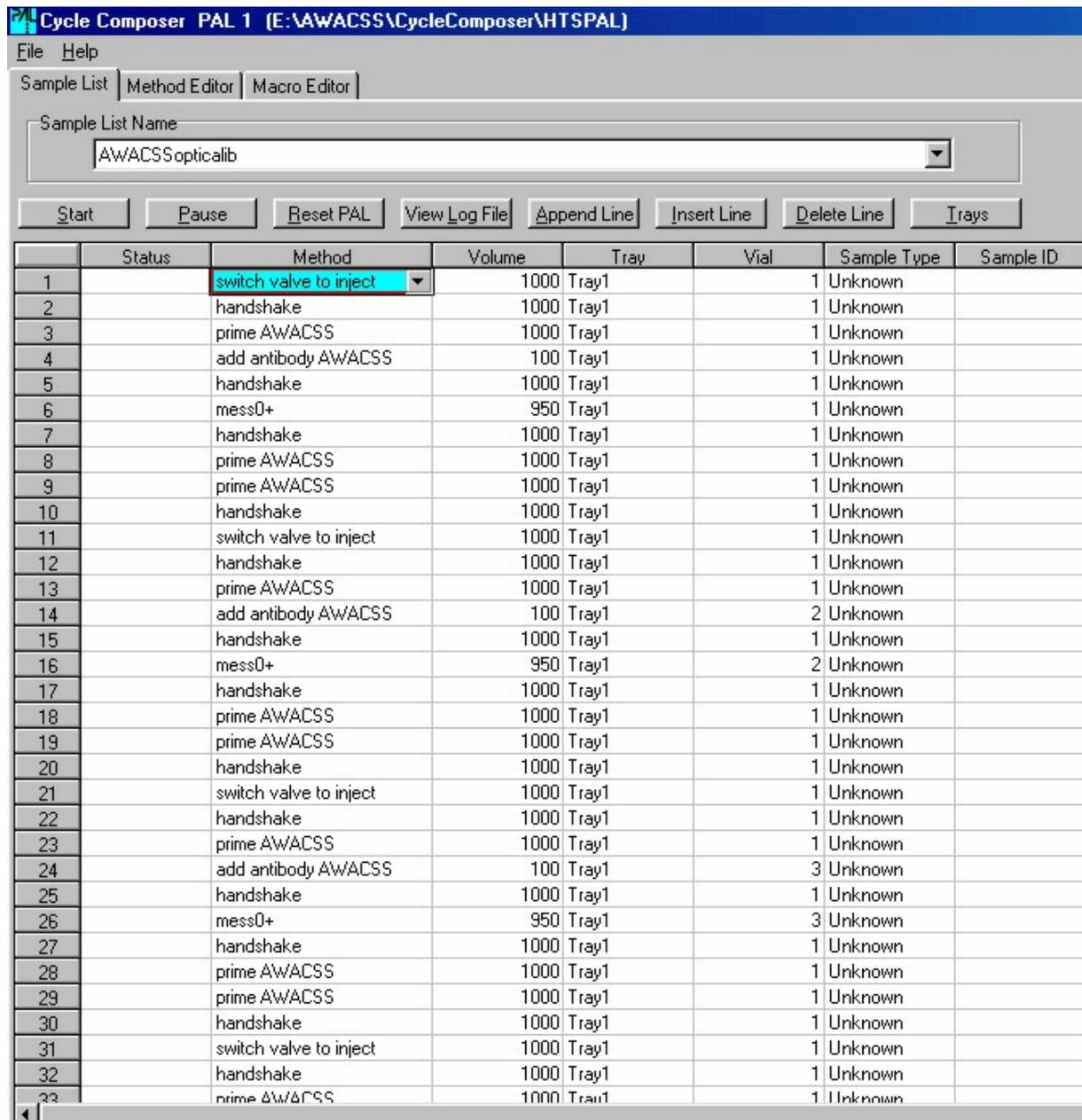
Abb. 10: Kommunikationsprotokoll („handshake“) zwischen der AWACS und der CycleComposer Software.

Das für die Multianalyt-Messungen verwendete AWACSS-Makro und die dazugehörigen Aktionen des Autosamplers (s. Abbildung 10) sind nachfolgend in Tabelle 4 gegenübergestellt und beschrieben.

Tabelle 4: Assayablauf.

<b>AWACSS-Makroeditor</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>CycleComposer</b>
StartCyclecomposer(E:\AWACSS\CycleComposer\cyccomp153.exe,AWACSSopticalib)	<i>Aufruf CycleComposer</i>	
	<i>Nach der Initialisierungssequenz des Autosamplers wird die Samplelist ausgeführt und Relais 2 geschlossen</i>	CycleComposer mit der Samplelist „AWACSS opticalib“ wird gestartet und Relais 2 wird geschlossen
LaserInterval(2)	<i>Lasermodulation 2 s</i>	Positionieren des Inject-Load-Ventils durch Methode “switch valve to inject“
InitPump	<i>Initialisierung der AWACSS Fluidik</i>	
SetExportFileName(E:\AWACSS\ManualProgramV6\Daten\testdaten.dat)	<i>Pfad für die automatische Datenfile-Erzeugung</i>	
' start of assay	<i>Kommentar</i>	
Loop(45)	<i>Anfang Schleife für Anzahl der Proben</i>	
StartBackgroundScan(8,1000) StartDisplay(500)	<i>Graphische Darstellung der Messwerte wird gestartet</i>	
WaitForCyclecomposer ' handshake1 PAL switch valve to load ContinueCyclecomposer	<i>Synchronisation vor Spülprozedur</i>	Methode „handshake“ wird durchgeführt (s. Abbildung 10)
OperatePump(buffer,suck,6000,900) WaitForPumpOperationComplete OperatePump(cyclecomposer,dispense,800,900) ' Rinse sensor WaitForPumpOperationComplete OperatePump(buffer,suck,6000,650) WaitForPumpOperationComplete	<i>Spülprozedur der AWACSS Fluidik und des Pal Autosamplers</i>	Methode „primeAWACSS“ spült die Spritze und die Probenschleife am Inject-Load-Ventil und Methode „add antibody AWACSS“ mischt die Ak-Stammlösung zur Probe
WaitForCyclecomposer ' handshake2 after rinsing ContinueCyclecomposer	<i>Synchronisation nach Spülprozedur für die Injektion der Probe durch den Autosampler</i>	Methode „handshake“ wird durchgeführt
	<i>Der Autosampler injiziert die Probe in die Probenschleife, und schaltet das Inject-Load-Ventil</i>	Methode „mess0“ wird durchgeführt
WaitForCyclecomposer ' handshake3 valve pal sync for incubation	<i>Arretierung der CycleComposer Software für die Inkubation</i>	Methode „handshake“ beginnt
LaserOff	<i>Laser aus</i>	
OperatePump(cyclecomposer,dispense,110,650) ' incubation 1 WaitForPumpOperationComplete OperatePump(buffer,suck,6000,650) WaitForPumpOperationComplete	<i>Probe wird über den Sensor gepumpt</i>	

'incubation2 OperatePump(cyclecomposer,dispense,110,350) WaitForPumpOperationComplete OperatePump(cyclecomposer,dispense,800,300) WaitForPumpOperationComplete		Beendigung des „Handshakes“
LaserInterval(2) ' data Wait(10.0)	<i>Laser an und währen 10 s werden nur Daten aufgenommen ohne Hardwareaktionen</i>	
ContinueCyclecomposer	<i>Beendigung der Pal Arretierung durch TTL2-Signal</i>	
OperatePump(regeneration1,suck,3000,800) WaitForPumpOperationComplete OperatePump(cyclecomposer,dispense,600,800) ' regeneration	<i>Regeneration AWACSS und Spülen Pal</i>	Es wird zwei mal die Methode „rinseAWACSS“ durchgeführt
WaitForPumpOperationComplete OperatePump(buffer,suck,6000,900) WaitForPumpOperationComplete OperatePump(cyclecomposer,dispense,800,900) ' rinse sensor after regeneration 1 WaitForPumpOperationComplete OperatePump(buffer,suck,6000,900) WaitForPumpOperationComplete OperatePump(cyclecomposer,dispense,800,900) ' rinse sensor after regeneration 2 WaitForPumpOperationComplete	<i>Spülen AWACSS</i>	
WaitForScanComplete SaveDataToFile(auto)	<i>Nach Datenaufnahme erfolgt die Automatische Abspeicherung</i>	
WaitForCyclecomposer ' handshake4 ContinueCyclecomposer	<i>Synchronisation nach Messung</i>	Methode „Handshake“ wird durchgeführt
Wait(2.0)	<i>AWACSS wartet für 2 s bevor eine neue Messung eingeleitet wird (ev. Gehen sonst neue Befehle wegen Timingproblemen verloren)</i>	Entweder Es werden weitere Proben nach dem gleichen Schema abg- earbeitet  Oder  Ende der Samplelist ist erreicht und Relais 2 wird geöffnet
EndLoop ' end of assay	<i>Alle Proben sind gemessen</i>	
WaitForCyclecomposerUnloaded	<i>Warten auf Relais 2 geöffnet</i>	
LaserOff End	<i>Laser aus und Programmende</i>	



Cycle Composer PAL 1 (E:\AWACSS\CycleComposer\HTSPAL)

File Help

Sample List | Method Editor | Macro Editor

Sample List Name: AWACSSopticalib

Start | Pause | Reset PAL | View Log File | Append Line | Insert Line | Delete Line | Trays

	Status	Method	Volume	Tray	Vial	Sample Type	Sample ID
1		switch valve to inject	1000	Tray1	1	Unknown	
2		handshake	1000	Tray1	1	Unknown	
3		prime AWACSS	1000	Tray1	1	Unknown	
4		add antibody AWACSS	100	Tray1	1	Unknown	
5		handshake	1000	Tray1	1	Unknown	
6		mess0+	950	Tray1	1	Unknown	
7		handshake	1000	Tray1	1	Unknown	
8		prime AWACSS	1000	Tray1	1	Unknown	
9		prime AWACSS	1000	Tray1	1	Unknown	
10		handshake	1000	Tray1	1	Unknown	
11		switch valve to inject	1000	Tray1	1	Unknown	
12		handshake	1000	Tray1	1	Unknown	
13		prime AWACSS	1000	Tray1	1	Unknown	
14		add antibody AWACSS	100	Tray1	2	Unknown	
15		handshake	1000	Tray1	1	Unknown	
16		mess0+	950	Tray1	2	Unknown	
17		handshake	1000	Tray1	1	Unknown	
18		prime AWACSS	1000	Tray1	1	Unknown	
19		prime AWACSS	1000	Tray1	1	Unknown	
20		handshake	1000	Tray1	1	Unknown	
21		switch valve to inject	1000	Tray1	1	Unknown	
22		handshake	1000	Tray1	1	Unknown	
23		prime AWACSS	1000	Tray1	1	Unknown	
24		add antibody AWACSS	100	Tray1	3	Unknown	
25		handshake	1000	Tray1	1	Unknown	
26		mess0+	950	Tray1	3	Unknown	
27		handshake	1000	Tray1	1	Unknown	
28		prime AWACSS	1000	Tray1	1	Unknown	
29		prime AWACSS	1000	Tray1	1	Unknown	
30		handshake	1000	Tray1	1	Unknown	
31		switch valve to inject	1000	Tray1	1	Unknown	
32		handshake	1000	Tray1	1	Unknown	
33		prime AWACSS	1000	Tray1	1	Unknown	

Abb.10: Ausschnitt aus der Samplelist im CycleComposer für die dazugehörige AWACSS-Makroeditor Methode.

Diese Programmierung von Messabläufen erlaubt sowohl die einfache Erstellung komplexer neuer automatisierter Immunoassays als auch die einfache Benutzung eines solchen Systems durch ungeschultes Personal per „Knopfdruck“. Der AWACSS-Makroeditor unterstützt dabei die „drag and drop“ Auswahl von Befehlen aus der Liste (s. Abbildung 9 links) in das Editorfeld (s. Abbildung 9 rechts) und prüft die Syntax.

### Messprogramm

Das AWACSS-Messprogramm wurde von Siemens entwickelt und unterstützt im Wesentlichen die folgenden Funktionen:

- Aufrufen und Ausführen von AWACSS-Makros
- Graphische Darstellung der 32 Messkanäle und der beiden Temperaturkanäle während einer Messung
- Funktionen zur Auswahl und detaillierten Darstellung von beliebigen Signalen
- Anzeige der momentan ausgeführten Makrobefehle
- Laser An/Aus
- Notabschaltung

### Drucken der Oberflächenchemie

Zum Bedrucken der IO-Chips mit den Konjugaten wurde ein TopSpot/E der Firmen HSG-IMIT (Freiburg, Deutschland) und IMTEK (Villingen-Schwenningen, Deutschland) verwendet. Als Druckkopf kam eine Sonderanfertigung, basierend auf einem Standard 96-Druckkopf zum Einsatz, bei dem alle außer den 8 zur IO-Chip-Geometrie passenden Düsen mit Photolack stillgelegt wurden.

## **3.4 Methoden**

### **3.4.1 Oberflächenchemie**

Für die Beschichtung der IO-Chips kamen zwei verschiedene Verfahren zum Einsatz. Zum einen wurde ein im Arbeitskreis etabliertes Protokoll für Einzelanalyt-Messungen verwendet, wobei hier nur ein Analytderivat auf dem kompletten sensitiven Bereich immobilisiert wird (Vollmodifikation) (Lang 1997, Piehler 1996). Zum anderen wurde eine Mehr-Schicht-Oberflächenchemie basierend auf den Methoden von Barzen et al. (2002) entwickelt, die für die orts aufgelöste Immobilisierung verschiedener Analytderivate zum Einsatz kam und somit Multianalyt-Messungen ermöglichte (Multianalyt-Modifikation). Grundsätzlich sei darauf hingewiesen, den sensiblen Bereich des Faserpigtails der IO-Chips sorgfältig mit Parafilm vor Säure und Lösungsmitteldämpfen zu schützen.

Beide Modifikationsmethoden beginnen mit der Reinigung und Aktivierung der IO-Chips. Dazu wird ein IO-Chip (Bereich um den Faserpigtail mit Parafilm umwickelt) in eine frisch zubereitete Piranha-Lösung bis zur Bedeckung des Messfeldbereichs eingetaucht. Nach 20 min wird mit deionisiertem Wasser gut abgespült und im Stickstoffstrom trocken geblasen. Direkt anschließend werden 50  $\mu\text{L}$  GOPTS auf den Messfeldbereich aufgebracht und mit einem Deckgläschen belegt. Dieses Sandwich wird vorsichtig mit Parafilm zum Schutz vor Luftfeuchtigkeit bedeckt und 1 h lang bei RT inkubiert. Anschließend wird der IO-Chip mit trockenem Aceton abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Sodann muss der so aktivierte Transducer sofort weiter umgesetzt werden.

#### 3.4.1.1 *Vollmodifikation*

Der aktivierte IO-Chip wird mit 80  $\mu\text{L}$  AMD-Wasser-Lösung (1:2,5) bedeckt und wiederum mit einem Deckgläschen belegt und 2 bis 4 h lang in Wasserdampf-atmosphäre (Feuchtes Filterpapier in einer Glasschale; IO-Chip auf geeignete Erhöhung legen; Schale mit Parafilm abdecken) inkubiert. Anschließend wird mit deionisiertem Wasser abgespült und im Stickstoffstrom trocken geblasen.

Für die Umsetzung mit Analytderivat werden ca. 3 mg des Derivats in 15  $\mu\text{L}$  trockenem DMF gelöst und mit der 1,5-fachen Molmenge DCC in weiteren 15  $\mu\text{L}$  DMF gemischt. Diese Lösung wird auf den IO-Chip gegeben und wiederum mit einem Deckgläschen belegt und in einer mit DMF gesättigten Atmosphäre für mindestens 2 h gelagert. Dabei sollte der Bereich des Faserpigtails nicht den DMF-Dämpfen ausgesetzt werden. Danach wird der Transducer erst mit DMF und dann mit deionisiertem Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Je nach verwendetem Analytderivat sind die so beschichteten Chips bei RT meist problemlos über viele Wochen bei Raumtemperatur haltbar (Piehler et al. 1996).

#### 3.4.1.2 *Multianalyt-Modifikation*

Aufgrund der relativ kleinen Dimension eines Messfensters des IO-Chips muss die Oberfläche zunächst komplett mit einem Polymer beschichtet werden, da ein nachträg-

liches Beschichten mit AMD zur Unterdrückung von unspezifischer Bindung in den Zwischenbereichen nicht praktikabel ist. Der Messfeldbereich des aktivierten IO-Chips wird daher mit 40  $\mu\text{L}$  einer PEG-DCM-Lösung (4 mg/mL) belegt und nach Verdunstung des Lösungsmittels über Nacht bei 70 °C gelagert (modifiziert nach Piehler 2000). Die Oberfläche wird sorgfältig mit deionisiertem Wasser abgespült und im Stickstoffstrom trocken geblasen. Vor dem eigentlichen Drucken wird die PEG-Oberfläche mit einer Lösung aus 1 molar NHS und 1.5 molar DIC in DMF mindestens 1 h lang aktiviert. Erst direkt vor dem Bedrucken des IO-Chips mit den Konjugaten wird mit trockenem DMF gespült und wiederum trocken geblasen. Konjugate werden aus den Aktivestern der Derivate und Aminodextran (40 kD) hergestellt. Dazu werden etwa 5 mg des Derivats (Analyt mit Carbonsäure an einem Spacer) in 100  $\mu\text{L}$  trockenem DMF gelöst. Man gibt NHS und DCC, beide im 1.1-fachen molaren Überschuss zu dieser Lösung und rührt für einige Minuten. Die Reaktion verläuft quantitativ über Nacht bei RT; es fallen Harnstoffkristalle aus. Anschließend wird die Lösung bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand kann bei -20 °C gelagert werden. Für die Kopplung an AMD werden 50 mg Aminodextran in einer Mischung aus 500  $\mu\text{L}$  deionisiertem Wasser und 500  $\mu\text{L}$  DMF gelöst. Die Aktivesterlösung wird hinzugegeben, gerührt und über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wird das Konjugat mit einem 10-fachen Volumenüberschuss an Methanol ausgefällt und lyophilisiert.

Zum Bedrucken des IO-Chips wurde ein modifizierter TopSpot-Druckkopf (s. Geräte) verwendet. Die acht zur Verfügung stehenden Reservoirs des Druckkopfs wurden mit ca. 10  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Konjugat-Wasser-Lösung (1,5 mg Konjugat werden in 1 mL gefiltertem deionisiertem Wasser gelöst; aliquotiert und bei -20 °C gelagert) befüllt. Der frisch aktivierte IO-Chip wird im TopSpot mit Hilfe einer Halteklammer (Eigenbau) positioniert und mehrfach bedruckt. Anschließend lässt man den Transducer über Nacht unter erhöhter Luftfeuchtigkeit liegen, um die reaktiven Gruppen zu deaktivieren, was eine Kreuzkontamination beim nachfolgenden Spülen mit deionisiertem Wasser verhindert.

Nach dem Einbau eines Transducers wird unabhängig von der Beschichtungstechnik zuerst eine Äquilibrierung der Oberfläche mit Ovalbumin (1 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) und anschließender Regeneration durchgeführt.

### **3.4.2 Markierung der Antikörper**

Um Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Cy5.5<sup>TM</sup>) zu markieren, wird der gelöste Antikörper mit Hilfe von Microcon in Carbonatpuffer (pH 9,5) überführt und zum reaktiven Farbstoff gegeben (s. Anleitung des Herstellers). Hierbei muss sofort für gute Durchmischung gesorgt werden. Nach einer Stunde Schütteln wird die Lösung mit Hilfe der Ausschlusschromatographie vom Farbstoff getrennt. Dazu wird eine Sephadex-Säule mit PBS-Puffer eine Stunde equilibriert. Nach dem zügigen Auftragen des Antikörpers auf die Säule wird die Fraktion mit dem markierten Antikörper nach ca. 2.1 ml Vorlauf aufgefangen. Das Volumen der Fraktion liegt ungefähr bei 2 ml. Die Ausbeute und der Markierungsgrad werden entsprechend den Angaben des Herstellers mit einer UV/Vis-Messung bestimmt. Der Markierungsgrad sollte etwa zwischen 2 und 4 Cy5.5<sup>TM</sup>-Moleküle pro Antikörpermolekül liegen.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse dienen dem Ziel, organische Schadstoffe im Wasser mit einem vollständig automatisierten Biosensorsystem nachzuweisen. Die Gliederung dieses Kapitels gründet sich auf einen dreistufigen Entwicklungsprozess:

1. Systemintegration und Charakterisierung des TIRF Biosensors AWACSS
2. Entwicklung einer orts aufgelösten Oberflächenchemie und Etablierung von Multianalyt-Immunoassays für die Wasseranalytik
3. Validierung

Das Ziel der hier dargestellten Untersuchungen war es, auf Grundlage von statistischen Bewertungen von Kalibrierungen und durch Ergebnisse aus Messungen von Realproben eine Beurteilung der analytischen Leistungsfähigkeit des Biosensorsystems AWACSS zu geben.

### 4.1 Systemcharakterisierung

In diesem Abschnitt sind Ergebnisse gezeigt, die der Charakterisierung des TIRF Biosensors AWACSS dienen und während eines dynamischen Systemintegrationsprozesses entstanden sind. Aufgrund der Einbindung dieser Arbeit in das AWACSS-Projekt konnten nicht alle Fragestellungen erschöpfend beleuchtet werden, da häufig die Ressourcen (besonders die der IO-Chips) begrenzt waren und vorrangig das Projektziel „Aufbau und Validierung eines funktionsfähigen Multianalyt-Biosensorsystems“ angestrebt wurde. Für das bessere Verständnis werden die Ergebnisse in ihrem logischen Zusammenhang präsentiert.

#### 4.1.1 Messwarterfassung

Die 32 analogen Messsignale der Photodioden werden nach der Tiefpassfilterung und Linearverstärkung ebenso wie die beiden Temperatursignale digitalisiert. Dabei werden von jedem der 34 Signale 8 Messwerte pro Sekunde aufgezeichnet und online während einer Messung graphisch dargestellt bzw. am Ende einer Messung automatisch im ASCII-Format abgespeichert. Hier sollen zwei verschiedene Methoden der Signalerfassung und Messwertberechnung erläutert werden.

#### 4.1.1.1 Messwertberechnung im cw-Modus

Wie bereits aus der Gerätebeschreibung des AWACSS hervorgeht, ist für die Signalfilterung (z.B. zur Unterdrückung von 50 Hz Störquellen) lediglich ein Tiefpassfilter pro Messkanal geschaltet. Daher wird die Laserdiode im cw-Modus (engl. continuous wave) betrieben. Für die Signalauswertung kann nun entweder Excel oder das AWACSS-Programm „OfflineCalibration Version 6“ verwendet werden. Ein typischer Signalverlauf einer Messung im cw-Modus ist in Abbildung 11 gezeigt.

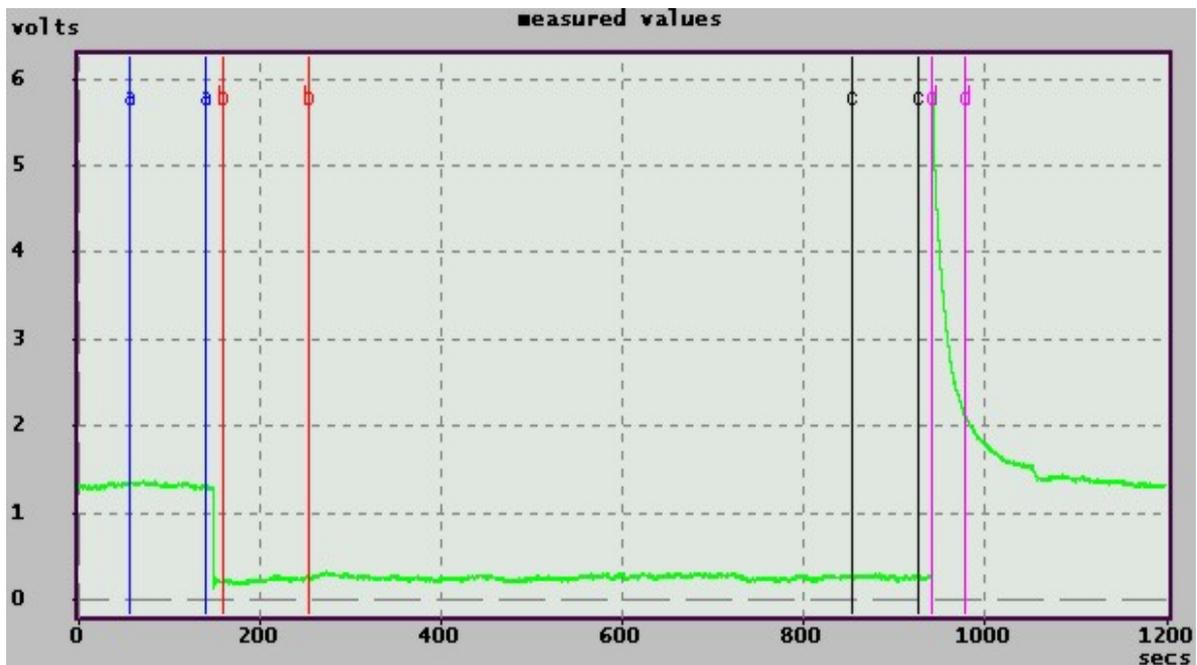


Abb. 11: Messung im CW-Modus mit Cursorbereichen für die Auswertung mit der AWACSS-Software „OfflineCalibration Version6“

Die Offsetbereinigung des eigentlichen Messwerts einer solchen Messung wird folgendermaßen von dem Programm „OfflineCalibration Version 6“ durchgeführt:

Zuerst wird der optische Offset zu Beginn einer Messung aus dem gesamten Offset abzüglich des elektronischen Offsets berechnet, indem die Differenz aus den Mittelwerten der Cursorbereiche a und b gebildet wird. Nach demselben Verfahren wird der vom elektronischen Offset bereinigte Messwert aus den Mittelwerten der Cursorbereiche c und d berechnet. Unter Berücksichtigung des optischen Offsets kann nun das Fluoreszenzsignal in Volt (eigentlicher Messwert) berechnet werden.

Dieses Verfahren setzt die zeitliche Konstanz sowohl des elektronischen als auch des optischen Offsets vor und nach der Messung des Fluoreszenzsignals voraus.

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass vergleichbare Methoden, wie z.B. die Berechnung eines offsetbereinigten Integrals im Signalbereich zu beinahe identischen Ergebnissen führt.

#### 4.1.1.2 Signalrauschen und Drift im cw-Modus

Zur Ermittlung des Signalrauschens wurden für verschiedene IO-Chips alle 32 Signalverläufe einer Messung, wie in Abbildung 12 links dargestellt, ausgewertet. Durch eine mit Origin™ durchgeführte Kurvenanpassung eines Polynoms 5. Ordnung an den Signalverlauf über eine Messzeit von ca. 45 s (s. Abbildung 12 rechts) kann das Rauschen durch die Standardabweichung dieses Polynoms angegeben werden. Das Signalrauschen beträgt für alle 32 Photodiodenkanäle unabhängig vom verwendeten IO-Chip zwischen  $\pm 0,008$  und  $\pm 0,013$  V.

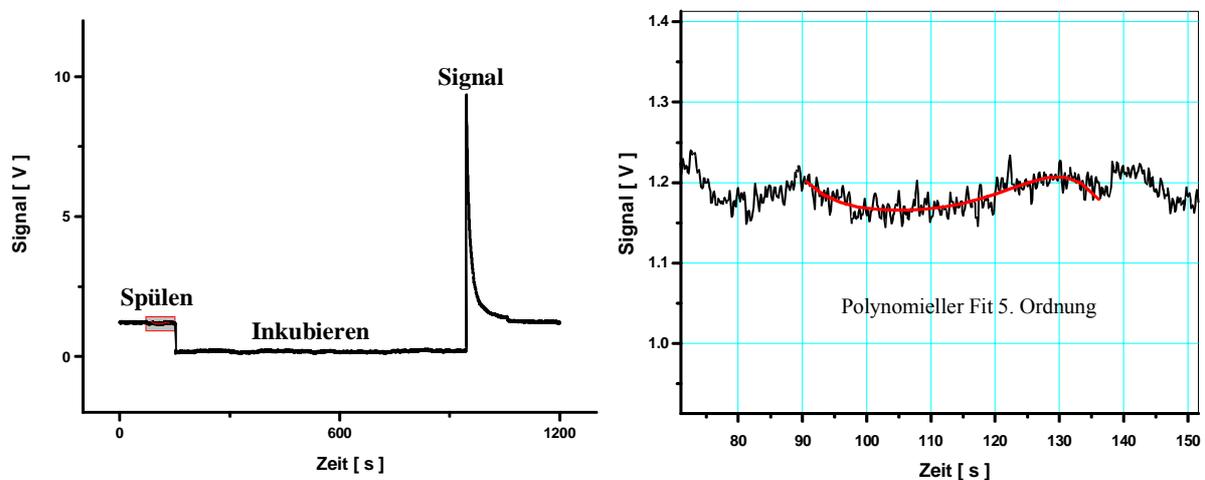


Abb. 12: Ermittlung des Signalrauschens für Messkanal 32 für eine Messung mit IO-Chip 13-2 mit 30 ng mL<sup>-1</sup> a-Estron auf E1,3CME (links) durch Kurvenanpassung eines Polynoms 5. Ordnung (rechts).

Betrachtet man die zeitliche Signaldrift während einer Messung, so stellt man fest, dass diese deutlich größer sein kann als das Rauschen. Innerhalb 10 – 20 Sekunden kann die Signaldrift bis zu 0.15 V betragen. In Abb.7b beträgt die Drift zwischen 72 und 82 Sekunden etwa 0.10 V. Diese Signaldrift ist deutlich größer als das Signalrau-

schen und kann mit dieser Messwertberechnung, wie sie in der Software „AWACSS-OfflineCalibration Version6“ implementiert ist, nicht eliminiert werden. Darüber hinaus ist die Auswertung mit den hier verwendeten Cursorbereichen sehr schlecht reproduzierbar. Die erzielten Ergebnisse variieren um mehrere Prozent in den errechneten Messwerten mit dem Setzen der Cursor. Besonders problematisch ist dies für die Auswertung von Realprobenmessungen, wenn sich das Driftverhalten des Systems zwischen den Messtagen geändert hat. Es ergeben sich somit große Fehler für „Inter-Assay“ Vergleiche, selbst wenn die Cursorbereiche immer konstant gehalten werden.

#### 4.1.1.3 *Messwertberechnung im Modulations-Modus*

Durch den Einsatz einer externen Laserdiode konnte die Laserlichtquelle als Hauptursache für die Signaldrift ausgeschlossen und das Problem somit auf die Drift des elektronischen Offsets zurückgeführt (wahrscheinlich Dunkelstromdrift der Photodioden durch Systemtemperaturschwankungen zusammen mit den Linearverstärkern) werden. Für die Zukunft wird die dafür verantwortliche Elektronik des AWACSS-Geräts thermostatisiert. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass unter diesen Umständen ein Betrieb im cw-Modus vorteilhaft sein kann und nicht zwingend das nachfolgend beschriebene Verfahren die besseren Ergebnisse liefert.

Um während einer Messung ständig den elektronischen Offset zu verfolgen, wurde die Laserdiode mit der Frequenz  $\frac{1}{2}$  Hz moduliert. Zunächst wird das Messsignal mittels eines Softwaretiefpassfilters geglättet (s. Abbildung 13a). Der Bereich zwischen zwei Minima kann nun durch lineare Interpolation als sehr gute Näherung für die Offsetbereinigung des dazwischen liegenden Maximums herangezogen werden. So wird über die gesamte Messung der wahre optische Offset bestimmt (s. Abbildung 13b). In gleicher Weise können nun auch die Datenpunkte des Fluoreszenzsignals sehr robust offsetbereinigt und somit zur Messwertberechnung herangezogen werden (s. Abbildung 13c).

Dieses Verfahren ist in der von Siemens entwickelten AWACSS-Software „OfflineCalibrationVersion 7“ (s. Abbildung14) integriert. Des Weiteren sind in dieser Software eine automatisierte Approximation der Kalibrierfunktion sowie die Berechnung der Nachweisgrenze nach IUPAC und der oberen Arbeitsgrenze nach dem 90% Kriterium implementiert. Diese Auswertungsmethoden sind in Kapitel 4.2.2 genauer erläutert.

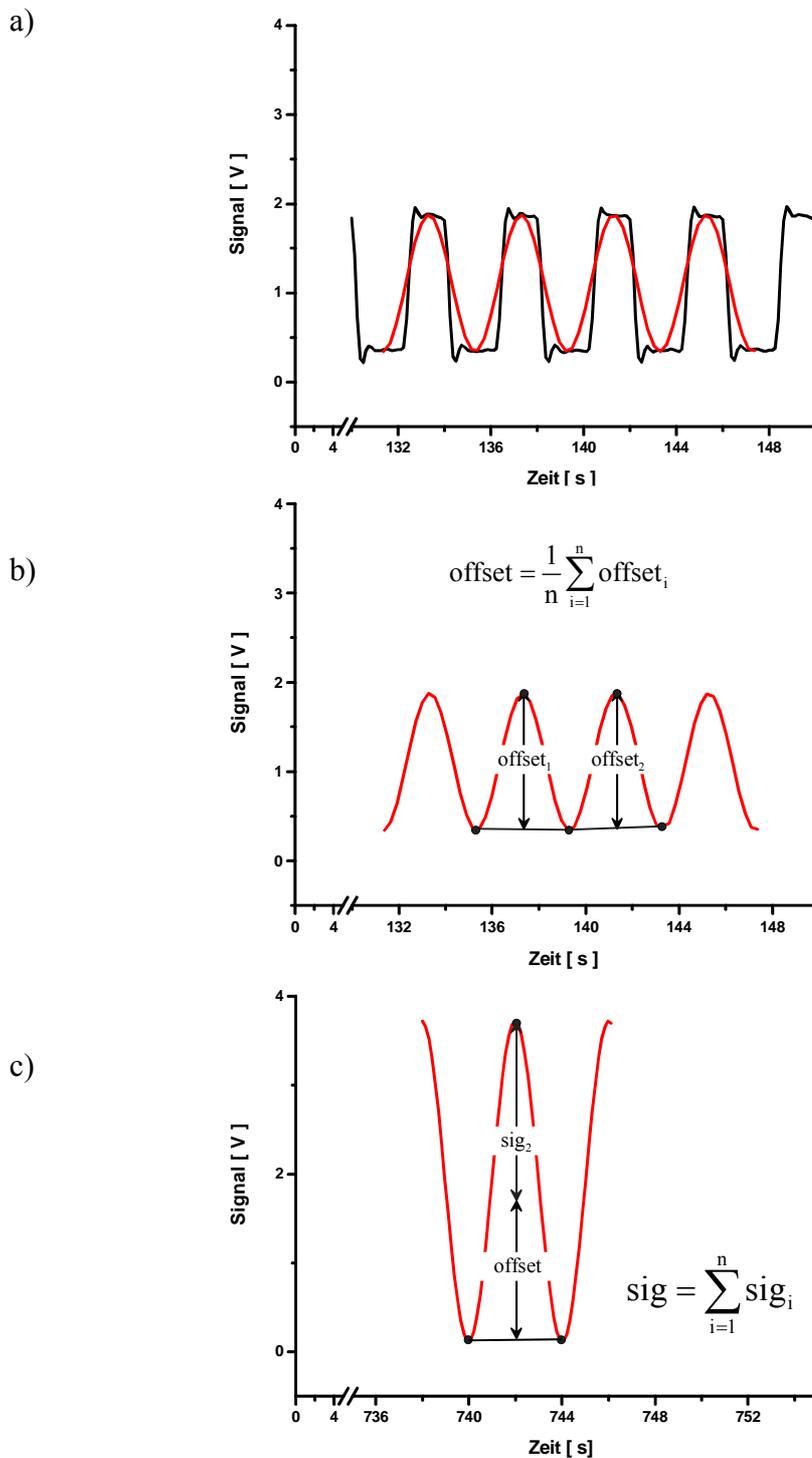


Abb. 13: Verfahren zur Offset - Bereinigung der Messwerte bei moduliertem Laser.

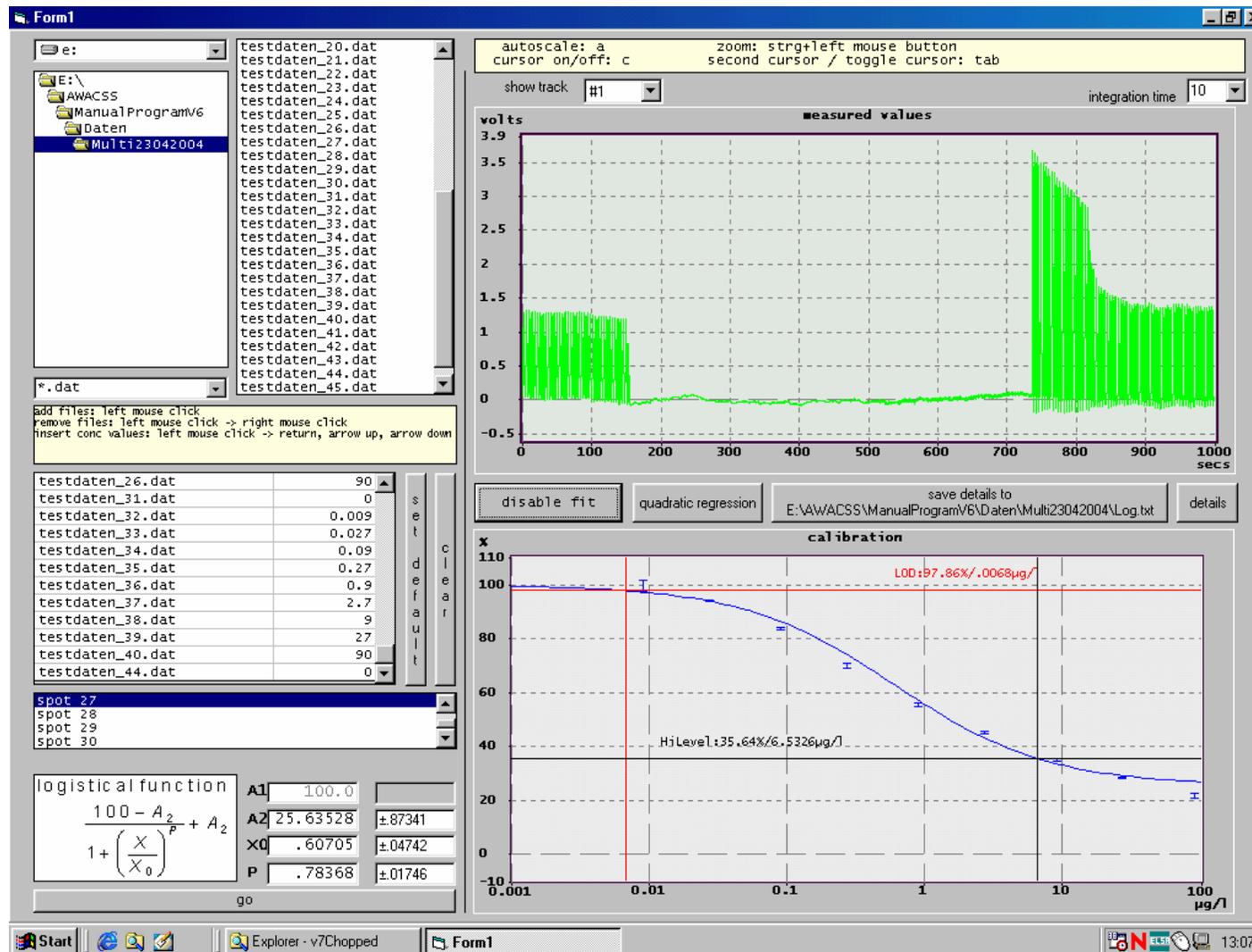


Abb. 14: Benutzeroberfläche der AWACSS-Software „OfflineCalibrationVersion 7“.

### 4.1.2 Systemcharakteristik für verschiedene IO-Chips

Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, standen während des AWACSS-Projekts fünf verschiedene IO-Chips zur Verfügung. Hier werden die grundsätzlichen Unterschiede in der Systemcharakteristik, die sich durch die verschiedenen IO-Chip-Designs ergeben, dargestellt und diskutiert. Für die Bewertung der unterschiedlichen IO-Chips können drei Fragestellungen formuliert werden:

1. Welche Antikörperkonzentrationen sind für maximale Signale in Abhängigkeit der Evaneszenzfeldintensitäten notwendig?
2. Wie gut sind die Signal-Rausch-Verhältnisse an den 32 Messfenstern?
3. Ist die Uniformität der Messfenster für Multianalyt-Messungen ausreichend?

Tabelle 5 fasst die Eigenschaften der verwendeten IO-Chips zusammen.

Tabelle 5: Eigenschaften der IO-Chips.

<b>Seriennummer</b>	<b>Aufweitung der Wellenleiter an den Messfenstern</b> [ $\mu\text{m}$ ]	<b>Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b> [ nm ]	<b>a-Estron</b> [ ng mL <sup>-1</sup> ]	<b>Halbwertszeit des Fluoreszenzsignals</b> [ s ]
13 – 1	2,5	37	-	-
13 – 2	30	0	30	9,2 ± 0,4
13 – 3	60	37	-	-
14 – 1	2,5	0	50	7,5 ± 0,3
14 – 2	30	25	6	2,8 ± 0,3

<sup>1</sup> Für max. Signal (kurz vor Sättigung der PD) an Spot 32 bei identischer Fluss- und Laser-richtung.

Mit dem IO-Chip 14 – 1 wurden die ersten Systemtests durchgeführt, wobei die Glasfaser an diesen Transducer noch ohne Metallhülse positioniert und angeklebt wurde. Mit Hilfe dieses IO-Chips gelangen die ersten Farbstoffmessungen und später auch die erste Messung mit a-Estron mit einer Konzentration von 50 ng mL<sup>-1</sup>. Vergleicht man diesen Transducer mit IO-Chip 13 – 2 der ebenfalls keine Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Schicht besitzt, fallen zwei Unterschiede auf, die nur durch die unterschiedlichen Aufweitungen der Wellen-

leiter an den Messfenstern hervorgerufen werden. Erstens muss für IO-Chip 14 – 2 mehr a-Estron Antikörper für ein maximales Signal eingesetzt werden, und zweitens ist die Halbwertszeit des Fluoreszenzsignals für diesen Chip um ca. 0,7 s kleiner. Die Ursache liegt in der Verteilung der Evaneszenzfeldleistung über unterschiedlich große Flächen an den Messfenstern. Ist die Aufweitung der Wellenleiter kleiner, konzentriert sich mehr Lichtleistung auf einer kleineren Fläche. Es werden wenige Farbstoffmoleküle mit hoher Lichtintensität angeregt und auch dadurch schneller ausgebleicht. Für IO-Chip 13 – 2 führt die stärkere Aufweitung der Wellenleiter zu langsamerem Ausbleichen des Farbstoffs bei gleichzeitiger Anregung über eine 12-mal größere Fläche, was zu einer geringeren einzusetzenden Antikörperkonzentration führt. Eine genauere Beschreibung des Zusammenhangs zwischen den Halbwertszeiten des Fluoreszenzsignals mit der jeweiligen Evaneszenzfeldleistung ist schwierig, da hier kein einfacher exponentieller Zusammenhang angenommen werden darf. Aufgrund von Beschädigungen an dem sehr empfindlichen Faserpigtail des IO-Chips 14 – 1 der ersten Generation konnten keine weiteren Messungen mehr mit diesem Transducer durchgeführt werden.

Die IO-Chips mit den Seriennummern 13 – 1 und 13 – 3 waren aufgrund der „dicken“ Tantalpentoxidschichten weitgehend unbrauchbar. Dies liegt daran, dass ein dünner hochbrechender Film auf der Oberfläche des Wellenleiters zu einer Verschiebung der Feldverteilung in Richtung des Superstrats führt. Wird dieser Film zu dick, dann koppelt ein großer Teil des Laserlichts an den Messfenstern nahe dem Faserpigtail dieser Transducer in das angrenzende Medium (PBS) aus und es kommt zu einer sehr hohen Dämpfung entlang der Wellenleiter. Hieraus ergibt sich ein hoher optischer Offset an den Messfenstern nahe dem Faserpigtail, der nur noch eine sehr geringe Signaldynamik bis zur Sättigung der Photodioden zulässt. Für den Chip 13 – 3 konnte eine Kalibrierung für Estron mit  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  a-Estron erstellt werden, jedoch lieferten nur wenige Spots verwertbare Signale. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden weitere Untersuchungen mit diesen IO-Chips eingestellt.

Mit den beiden IO-Chips 13 – 2 und 14 – 2 konnten sehr viel mehr Untersuchungen und später auch Realprobenmessungen durchgeführt werden, weshalb sich dieses Kapitel nun auf diese beiden Transducer konzentrieren wird. Beide Chips wurden mit einem mechanisch verstärkten Faserpigtail versehen und besitzen dieselbe Aufweitung der Wellenleiter an den Messfenstern von 30  $\mu\text{m}$ , jedoch mit und ohne  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ -Schicht.

Mit den in Kapitel 4.1.1.2 ermittelten Werten für das Signalrauschen lassen sich die Werte für das Signal-Rausch-Verhältnis (SRV) für diese beiden IO-Chips berechnen. In Abbildung 15 sind die SRV Werte für den IO-Chip 14-2 (mit  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ) und 13-2 (ohne  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ) gezeigt. Beide Transducer wurden mit demselben Estronderivat (E1,3CME) beschichtet, jedoch kamen unterschiedliche Konzentrationen des Antikörpers  $\alpha$ -Estron zum Einsatz. Dies ist notwendig, um an den Messfenstern nahe dem Faserpigtail vergleichbare Fluoreszenzintensitäten zu erzeugen.

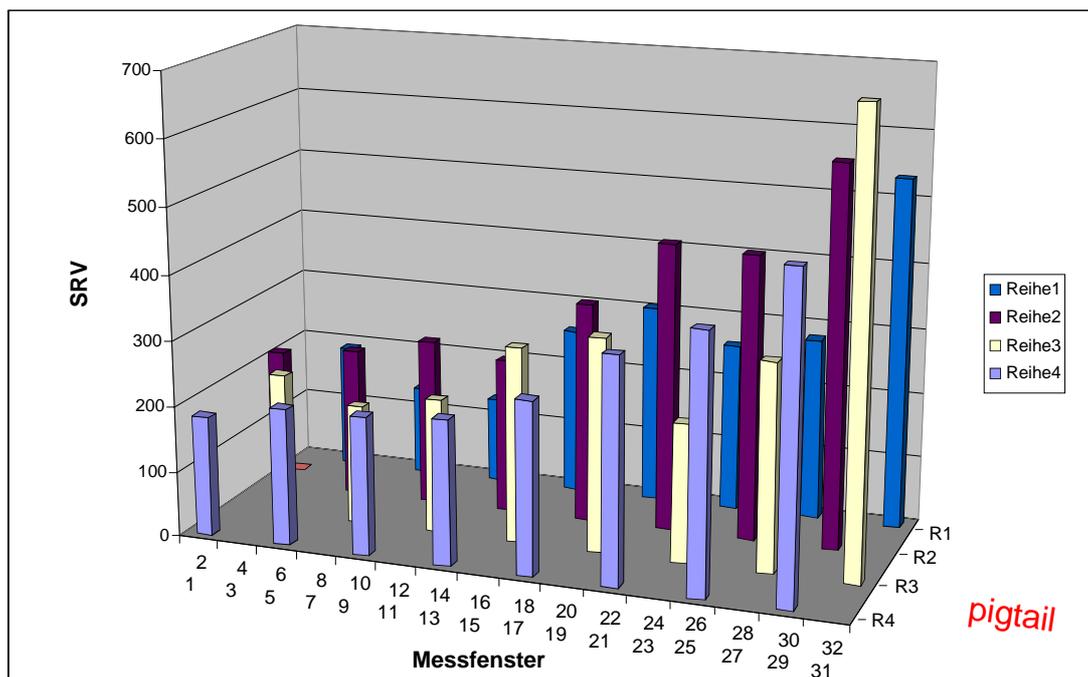


Abb. 15: SRV IO-Chip 14 – 2 (Oberfläche E1,3CME; 6 ng mL<sup>-1</sup>  $\alpha$ -E1).

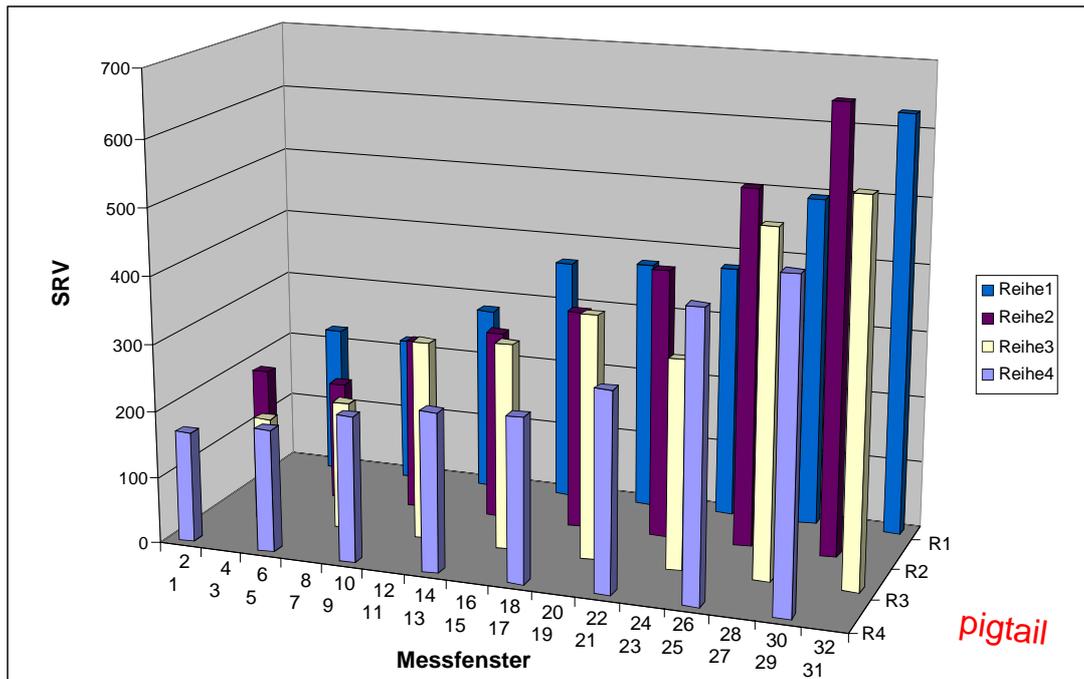


Abb. 16: SRV IO-Chip 13 – 2 (Oberfläche E1,3CME;  $30 \text{ ng mL}^{-1} \text{ a-E1}$ ).

Für beide IO-Chips sind die SRV Werte nahe dem Faserpigtail vergleichbar hoch (ca. 600) und fallen zum Ende des Transducers hin ab (ca. 180). Aufgrund der stärkeren Dämpfung der Evaneszenzfelder entlang der IO-Struktur des Chips 14-2 (durch Auskopplung eines Teils des Laserlichts an den Messfenstern verursacht vom hohen Brechungsindex von Tantalpentoxid) sinken die SRV Werte schneller ab. Grundsätzlich erzielen aber alle 32 Messfenster der beiden IO-Chips sehr gute Signal-Rausch-Verhältnisse. Durch die Tantalpentoxidschicht sind die Evaneszenzfelder des IO-Chips 14 – 2 deutlich verstärkt, was sich in der um den Faktor 5 niedriger einzusetzenden Antikörperkonzentration zeigt. Die geringe Uniformität in der Evaneszenzfeldintensität zwischen den Messfenstern ist somit kein limitierender Faktor für Messungen an 32 Spots. Vielmehr ist die zeitliche Konstanz der Evaneszenzfelder entscheidend. Dies wird besonders deutlich, wenn man unter diesen Bedingungen einen IO-Chip mit Vollmodifikation kalibriert und die Verteilung der Nachweisgrenzen (NWGs) (s. Kapitel 4.2.2) über die einzelnen Messfenster betrachtet. In Abbildung 17 sind die 32 NWGs einer Estronkalibrierung mit dem IO-Chip 14-2 gezeigt (identische Messparameter wie für Abbildung 15). Es lässt sich keine eindeutige Tendenz in der Verschlechterung der NWGs mit einem Absinken des SRV erkennen. Außerdem sind die Evaneszenzfelder an den Messfenstern über die Zeit konstant.

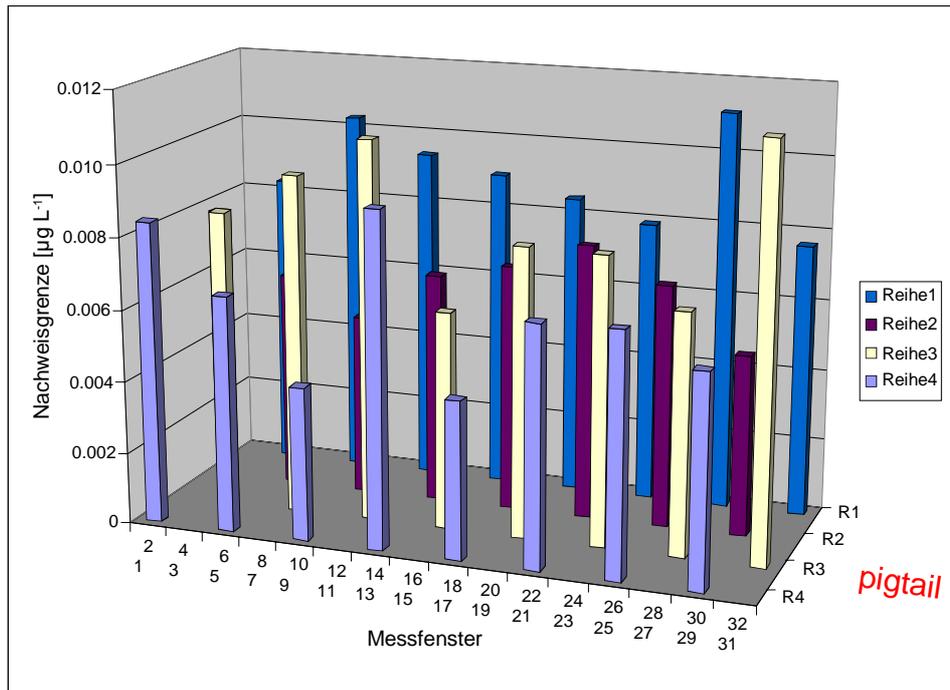


Abb. 17: Nachweisgrenzen für IO-Chip 14-2, Vollmodifikation mit E1,3CME und  $6 \text{ ng mL}^{-1}$  a-Estron.

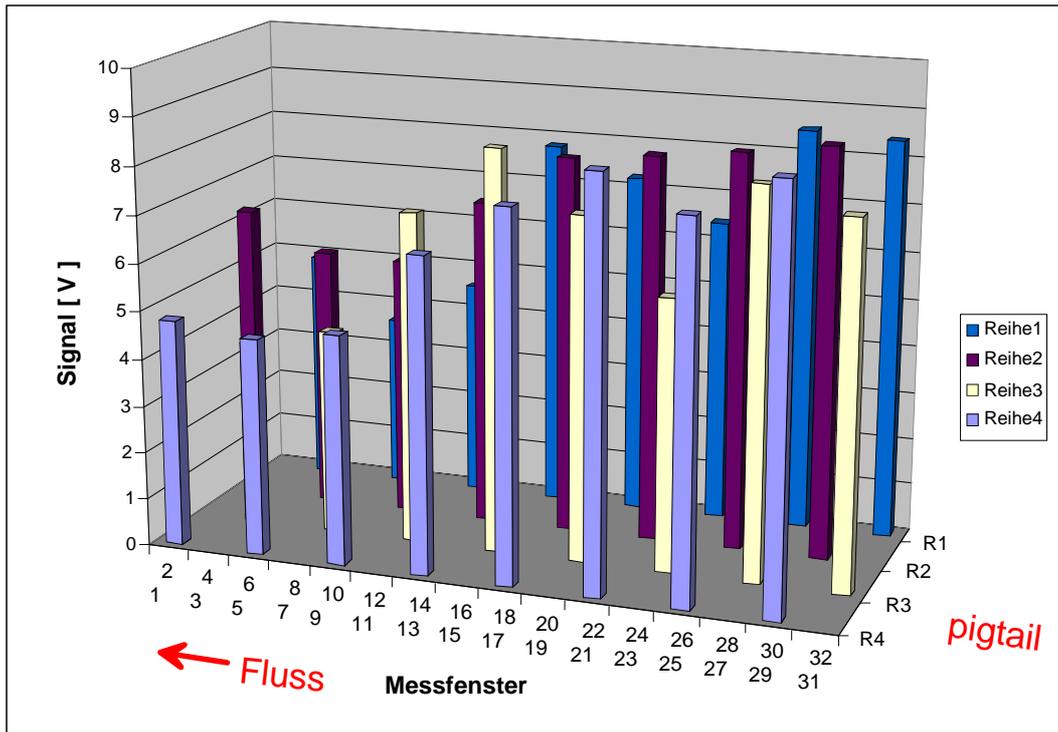
Ein weiterer Faktor, der die Abnahme des SRV vom Faserpigtail hin zum Ende der IO-Chips mit beeinflusst, ist die Flussrichtung mit der die Probe über den Sensor gepumpt wird. Für die gezeigten Ergebnisse sind die Richtung des Laserlichts und die Pumprichtung der Probe durch die Flusszelle gleich. Wird die Probe entgegengesetzt durch die Flusszelle gepumpt, dann ändern sich diese Verhältnisse drastisch. In Abbildung 18 sind Signale von zwei Messungen (a-Estron  $8 \text{ ng mL}^{-1}$ , Vollmodifikation mit E1,3CME) mit dem IO-Chip 14-2 gezeigt, wobei sich nur die Flussrichtungen der Probe unterscheiden. Für die Messung mit Fluss und Laserlicht in gleicher Richtung (Abbildung 16a) ergibt sich ein ähnliches Bild, wie für die gezeigten Verhältnisse des SRV in Abbildung 15. Bei umgekehrtem Fluss der Probe durch die Flusszelle zeigt sich eine deutliche Kompensation dieser abfallenden Fluoreszenzsignale über den Chip. Dieser Effekt scheint sich sogar stärker auf die Uniformität der Messfenster auszuwirken, als die bereits diskutierten Änderungen in den Evaneszentfeldintensitäten.

Als Erklärung für dieses Phänomens kommen zwei Möglichkeiten in Betracht.

1. Die Probenlösung verarmt an Antikörpermolekülen auf dem Weg durch die Flusszelle aufgrund des ständigen Massentransports an die funktionalisierte Oberfläche.
2. Am Ort des Probeneintritts nimmt die Dicke der Diffusionsgrenzschicht wegen der höheren Strömungsgeschwindigkeiten ab. Somit wird der Massentransport in diesen Bereichen erhöht.

Auch wenn die erste mögliche Erklärung immer einen Anteil zu diesem beobachteten Phänomen beisteuern wird, ist der Beitrag sicher sehr gering (Piehler 1997). Deutlich problematischer ist der Einfluss des Strömungsprofils am Einlass der Flusszelle. Eine Aussage darüber, ob es generell günstiger ist, diese „inverse Pumprichtung“ zu benutzen, hängt in Zukunft von dem Verhalten der neuen Flusszellen mit Dichtung ab, die erst zum Ende dieser Arbeit zur Verfügung standen. Für diese Arbeit wurde immer die Flussrichtung identisch zu der des Laserlichts gewählt, da die Signale der Messfenster 32 bis 15 relativ einheitlich hoch bei diesen Tests waren und diese Anzahl an Messstellen für Multianalyt-Messungen als vollkommen ausreichend erschien.

a)



b)

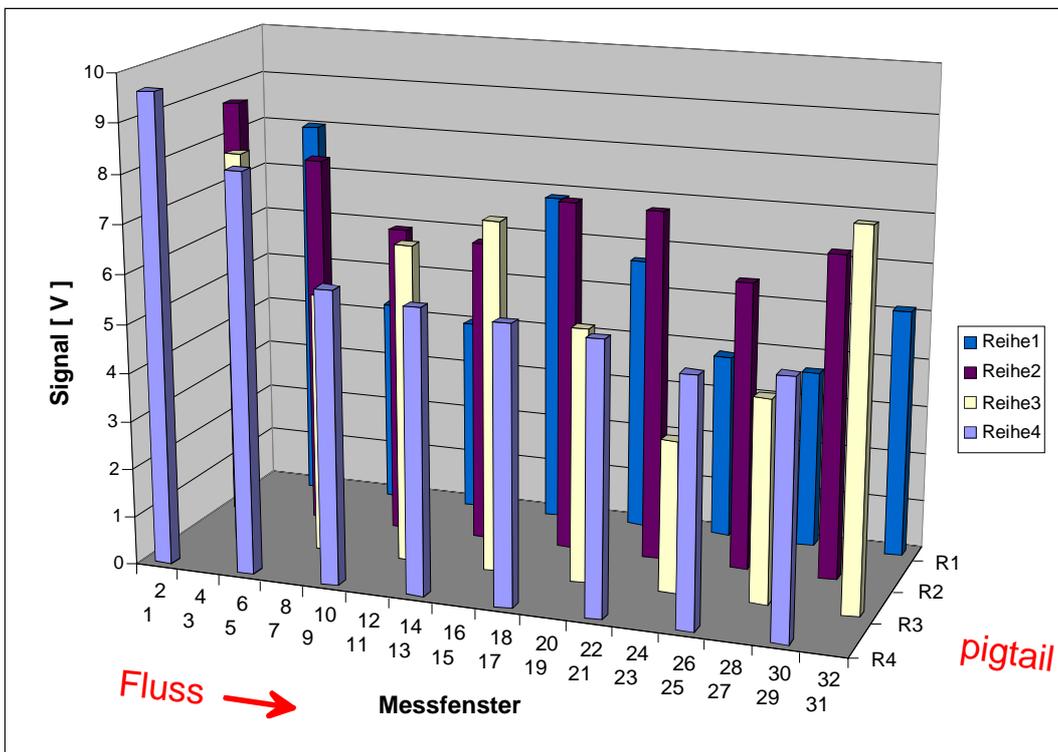


Abb. 18: Messsignale mit dem IO-Chip 14-2 (a-Estron  $8 \text{ ng mL}^{-1}$ , Vollmodifikation mit E1,3CME) bei a) Flussrichtung gleich der Laserrichtung, b) Flussrichtung entgegengesetzt.

## Diskussion

Es wurden fünf verschiedene IO-Chips hinsichtlich ihres Verhaltens bei Messungen mit dem AWACSS-Gerät getestet. Besonders günstig haben sich zwei Chipdesigns erwiesen. Beide IO-Chips (13 – 2 und 14 – 2) besitzen eine Aufweitung der Wellenleiter von 30  $\mu\text{m}$  und sind damit IO-Chips mit schmälere Wellenleitern aufgrund des günstigeren Verhältnisses von Evaneszenzfeldintensität pro Fläche vorzuziehen. Generell kann durch den Einsatz einer hochbrechenden Schicht aus  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  die einzusetzende Antikörpermenge drastisch reduziert werden. Die Werte für das SRV für beide IO-Chips sind für Multianalyt-Messungen unter Ausnutzung aller 32 Messfenster geeignet. Kritisch sollte jedoch in Zukunft die Wahl der Flussrichtung gesehen werden. Der starke Einfluss des Strömungsmusters am Einlass der Flusszelle ist sehr stark an der Systemcharakteristik beteiligt.

Nach einigen hundert Messungen mit den IO-Chips 13 – 2 und 14 – 2 trat eine Trübung der Sensoroberfläche an Bereichen die den Probenlösungen ausgesetzt waren, ausgenommen den Messfenstern, auf. Eine mögliche Erklärung für dieses Problem ist, dass der niedrige pH der Regenerationslösung die Siliziumdioxidschicht zerstört bzw. chemisch verändert. Eine Untersuchung solcher Schichten auf BK7-Glas eines anderen Lieferanten waren jedoch nicht von diesem Problem betroffen.

## 4.2 Kalibrierung

Die Kalibrierung eines Sensorsystems ist die Grundlage für die spätere Interpretation analytischer Messungen. Dabei spielt die Kenntnis über die komplexen intrinsischen Eigenschaften der angewandten Messmethode bei der Erstellung des Designs einer Kalibrierung und ihrer anschließenden statistischen Bewertung eine wichtige Rolle. Diese Eigenschaften ergeben sich im Wesentlichen für die hier gezeigten Ergebnisse aus dem Testformat (Bindungshemmtest) zusammen mit der Immunochemie (s. Kapitel 2.1.7) und den Systemcharakteristika des AWACSS-Geräts (s. Kapitel 4.1). Dieses Kapitel diskutiert praktische Aspekte bei der Durchführung von Einzel- und Multianalyt-Kalibrierungen und stellt verschiedene Verfahren zur Ermittlung der Validierungsparameter gegenüber.

### 4.2.1 Einzelanalyt-Kalibrierung

Zur Systemcharakterisierung wurden Einzelanalyt-Kalibrierungen für Estron mit einem polyklonalen Antikörper  $\alpha$ -Estron aus Schaf durchgeführt. Die IO-Chips wurden dazu mittels des Protokolls für eine Vollmodifikation flächig mit dem Derivat E1,3CME beschichtet. Die Messwertberechnung erfolgte mit dem Programm „Offline Calibration Version 6“ wie in Kapitel 4.1.1.2 beschrieben. Lässt man die bereits diskutierten Störgrößen Signalrauschen und Signaldrift außer Acht und nimmt an, dass alle anderen Geräteparameter zeitlich konstant bleiben, dann sind für die Präzision einer Kalibrierung besonders die Pipettierfehler und die Stabilität der Oberflächenbeschichtung sowie der Antikörper von Bedeutung. Für den eingesetzten HTC-Pal Autosampler wird vom Hersteller eine Pipettiergenauigkeit von  $<0,5\%$  angegeben. Diese wird sich bei der Erstellung von Verdünnungsreihen aufgrund der Fehlerfortpflanzung besonders bei niedrigen Analytkonzentrationen bemerkbar machen. Bei Blindwertmessungen spielt diese aber nur eine untergeordnete Rolle, da hier nur 2 Pipettierschritte notwendig sind.

Für eine Kalibrierung des AWACSS-Geräts wurden zuerst die zu messenden Kalibrierproben mit dem Autosampler vorbereitet. Alle Proben werden dabei mit entgastem deionisiertem Wasser angesetzt. Die Konzentrationsstufen wurden so gewählt,

dass der gesamte dynamische Bereich des Sensorsignals überstrichen wurde und in halblogarithmischer Auftragung (Abszisse logarithmisch) eine äquidistante Punkteverteilung ergab. Zu Beginn einer jeden Einzelmessung einer Kalibrierung mischt der Autosampler zu 900  $\mu\text{L}$  Probe (Blank oder Konzentrationsstufe) 100  $\mu\text{L}$  einer Antikörperstammlösung. Die Antikörperstammlösung wird in 10x PBS mit OVA als Hintergrundprotein (zwischen 10- und 100facher Antikörperkonzentration) angesetzt und in einem auf 4°C thermostatisierten Vorratsgefäß gelagert. Vom Zeitpunkt des Zumischens der Antikörperstammlösung bis zur Messung (wenige Minuten) stellt sich das Gleichgewicht der Antigen-Antikörper-Reaktion ein.

Das Kalibrationsdesign besteht aus neun oder zwölf unabhängigen Blindwertmessungen und sieben oder neun Konzentrationsstufen der Analyten, die jeweils dreifach bestimmt werden. Um die zeitliche Änderung der Antikörperaktivität zu erfassen, werden die Replikas der Konzentrationsstufen in drei aufeinander folgenden Konzentrationsreihen (von der niedrigsten bis zur höchsten Konzentration) vermessen. Vor diesen Konzentrationsreihen, dazwischen und danach wird jeweils eine Gruppe (3 bis 5) von Blindwerten gemessen. Die ersten zwei Blanks, die jeweils auf die höchste Analytkonzentration folgen, können nicht in die Auswertung mit einbezogen werden (die Messwerte sind durch verschleppte Analyte im System verfälscht). Über die zeitliche Änderung der Blindwerte können alle anderen Messungen durch eine geeignete Regression korrigiert werden. Dabei können entweder eine lineare Regression oder eine polynomielle Regression zweiten oder dritten Grades angewendet werden. Entscheidend bei der Auswahl der Regressionsmethode sind die Anzahl der Blanks und eine Minimierung der Fehlersumme aus den Standardabweichungen der einzelnen Konzentrationsstufen. Dieser Aspekt könnte in Zukunft in die AWACSS-Software aufgenommen werden, um automatisierte Kalibrierungen robust auszuwerten. Für alle Konzentrationsstufen werden der Mittelwert  $\bar{y}$  und die Standardabweichungen  $sdy$  aus den Replikamessungen berechnet. Der Mittelwert aus den gemessenen Signalen der Blindwerte nach erfolgter Regression  $y_0$  wird auf 100% gesetzt und alle weiteren Kalibrierproben werden auf diesen Wert normiert:

$$\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i \quad (11)$$

$$sdy = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (12)$$

Die numerische Approximation einer Kalibrierkurve an die Mittelwerte der vermessenen Konzentrationsstufen erfolgt mit der Logistik-Funktion (Dudley et al. 1985).

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2 \quad (13)$$

Hier ist  $A_1$  der höchste  $y$ -Wert,  $A_2$  der kleinste und  $x_0$  der Testmittelpunkt.  $p$  ist der „Steigungsfaktor“. Der Bereich zwischen  $A_1$  und  $A_2$  stellt den dynamischen Signalbereich dar. Der Wendepunkt oder Testmittelpunkt ( $x_0$ ) repräsentiert die Analytkonzentration, bei der das Signal auf 50% des dynamischen Signalbereichs abgenommen hat ( $IC_{50}$ ).

Eine typische Kalibrierkurve für Estron ist in Abbildung 19 gezeigt. Bei der Kurvenanpassung wurde der Parameter  $A_1$  auf 100% festgesetzt. Betrachtet man diese Estronkalibrierung für alle 32 Messfenster des IO-Chips 14 – 2, so ergeben sich meist nur kleine Unterschiede in den ermittelten Logistik-Funktionen. In Abbildung 20 sind diese 32 Kalibrierfunktionen dargestellt. Bis auf die zwei Messfenster 18 und 31 sind alle angepassten Logistik-Funktionen sehr ähnlich. Die stärkste Abweichung zeigt die Auswertung an Messfenster 31, welches sich direkt unter dem Einlass der Flusszelle befindet. Die Ursache hierfür liegt im ungünstigen Strömungsprofil an dieser Stelle und an dem daraus resultierenden Einfluss auf den Massentransport an die Oberfläche.

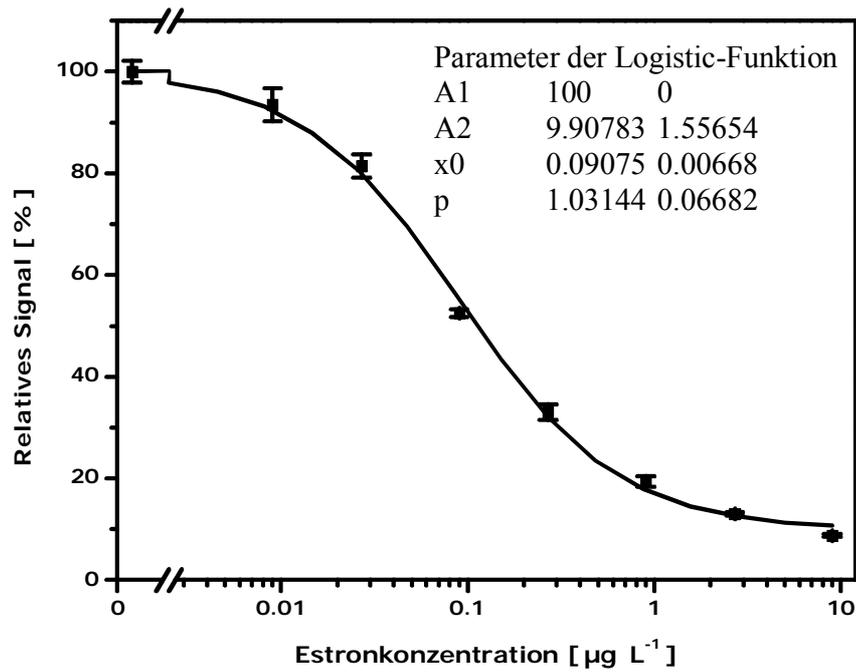


Abb. 19: Estronkalibrierung für Spot 32 IO-Chip 14 – 2 mit  $6 \text{ ng mL}^{-1}$  a-Estron auf E1,3CME.

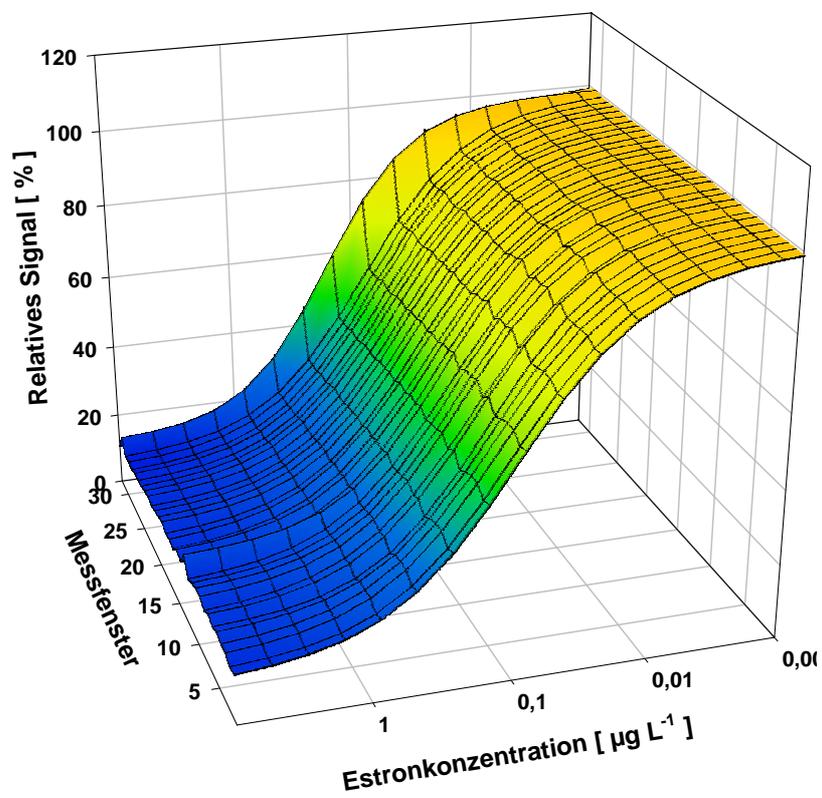


Abb. 20: Angepasste Logistik-Funktionen für eine Estronkalibrierung (Spot 1-32) mit IO-Chip 14 – 2 und  $6 \text{ ng mL}^{-1}$  a-Estron auf E1,3CME.

### 4.2.2 Bewertung von Kalibrierungen

Die Grundlage aller in dieser Arbeit gezeigten Auswertungen von Kalibrierungen mit dem AWACSS-Gerät ist die Anpassung einer Logistik-Funktion an die Mittelwerte aus den normierten Signalen der einzelnen Konzentrationsstufen, wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben. Um jedoch Aussagen über die Reproduzierbarkeit, Präzision und Robustheit des AWACSS-Biosensors treffen zu können, müssen die Ergebnisse bewertet werden. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass es bis jetzt noch keine allgemein anerkannten Richtlinien für die statistische Bewertung von Immunoassays, z.B. von der IUPAC, gibt. Dies wäre für die Zukunft sehr wünschenswert, zumal auch sehr verbreitete Analysemethoden wie der Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ähnlichen Zusammenhängen unterliegen.

#### Arbeitsbereich

Um den zulässigen Arbeitsbereich (ARB) einer solchen Kalibrierung zu bestimmen, stehen zwei verschiedene Methoden zur Verfügung. Häufig wird der Arbeitsbereich für diese Art von Kalibrationskurven als der 10- bis 90%-Bereich des dynamischen Signals angegeben (s. Abbildung 21). Bei dieser ungewichteten Anpassung der Logistik-Funktion war der Parameter  $A_1$  (obere Asymptote) auf 100% festgesetzt. Eine weitere Methode, den Arbeitsbereich zu bestimmen, basiert auf der Berechnung des Präzisionsprofils. Die Standardabweichung der Umkehrfunktion  $sdx$  [GL.15] berechnet sich aus  $sdy$  [GL.12] und der Steigung  $y'$  der ermittelten Logistik-Funktion in dem Punkt, wenn als Näherung ein linearer Zusammenhang angenommen wird (Dudley et al. 1985):

$$y' = -\frac{p}{x} \cdot \frac{A_1 - A_2}{\left[1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^2\right]^2} \cdot \left(\frac{x}{x_0}\right)^p \quad (14)$$

$$sdx = \frac{sdy}{y'} \quad (15)$$

Mit  $sdx$  lässt sich der Variationskoeffizient  $x_{cv,i}$  [GL.16] eines Wertes bestimmen. Aus diesen Variationskoeffizienten resultiert ein Präzisionsprofil, welches die Präzision einer Kalibrierung angibt. Die Präzision entspricht dem höchsten Variationskoeffizienten innerhalb des Arbeitsbereichs.

$$x_{cv,i} = \frac{sdx_i}{x_i} \cdot 100 \quad (16)$$

Der Arbeitsbereich lässt sich nun mit Hilfe des Präzisionsprofils und der Horwitz-Kurve bestimmen. Das Präzisionsprofil spiegelt die Präzision einer Messmethode bei jeder Konzentration wider. Es sagt jedoch nichts über deren Richtigkeit aus. Der Variationskoeffizient ist von der Steigung der Kurve, der Konzentration und von der Standardabweichung der y-Werte abhängig. Basierend auf Auswertungen von AOAC Ringversuchen entwickelte Horwitz eine empirische exponentielle Korrelation zwischen den Standardabweichungen und den Konzentrationen. Eine gültige Konzentrationsbestimmung ist nur dann möglich, wenn das Präzisionsprofil unter der Horwitz-Kurve liegt. Für die Anwendung in der HPLC dürfen die Variationskoeffizienten bei  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$  nicht über dem Wert 43%, bei  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  nicht über 30%, bei  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  nicht über 21% und bei  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  nicht über 15% liegen (Horwitz et al. 1980). Der Arbeitsbereich liegt somit zwischen den Schnittpunkten der Horwitz-Kurve und des Präzisionsprofils, wobei die Auswertung graphisch erfolgt (s. Abbildung 21).

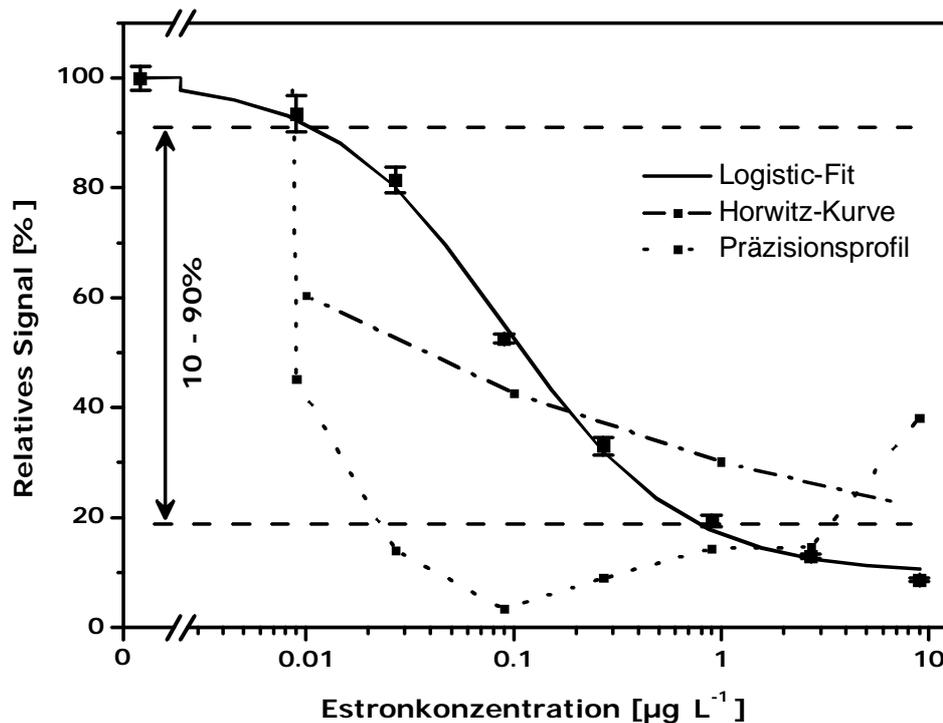


Abb. 21. Arbeitsbereiche für eine Estronkalibrierung mit IO-Chip 14 – 2 gemäß 10- bis 90%-Bereich des dynamischen Signals und der Methode nach Horwitz mit dem Präzisionsprofil.

#### Erkennungs- und Bestimmungsgrenze

In diesem Abschnitt werden die zwei gebräuchlichsten Methoden zur Ermittlung analytischer Kenngrößen beschrieben. Sehr häufig werden die Parameter Erkennungs- und Bestimmungsgrenze in Übereinstimmung mit den IUPAC Empfehlungen (Inczedy 1997) aus dem Mittelwert der Blindwerte  $y_0$  und dessen Standardabweichung berechnet. Die Erkennungsgrenze  $y_{dec}$  lässt sich nach [GL.17] berechnen und stellt den y-Wert der Nachweisgrenze (NWG) dar. Hier wird die allgemein übliche Definition benutzt, bei der der Studentfaktor gleich 1,5 gesetzt wird und die homoskedatische Standardabweichung gilt (Miller et al. 1988). Die Bestimmungsgrenze (BSG)  $y_{dm}$  [GL.18] errechnet sich aus der zehnfachen Blindwertstandardabweichung:

$$y_{dec} = y_0 + 3 \cdot sdy_0 \quad (17)$$

$$y_{dm} = y_0 + 10 \cdot sdy_0 \quad (18)$$

Für ein weiteres Verfahren zur Bestimmung der NWG führt man die Anpassung der Logistik-Funktion für alle vier Parameter ohne Einschränkung durch. So können die zugehörigen Konfidenzintervalle für die Funktionswerte  $\bar{x}$  unter Annahme von normalverteilten Grundgesamtheiten und bei bekannten Varianzen  $\sigma^2$  nach [GL.20] mit [GL.19] berechnet werden. Die Mittelwerte  $w$  seien unbekannt (Kreyszig 1998). Wählt man für die Konfidenzzahl  $z = 95\%$  (d.h. man gestattet, dass 5% der Werte aus der Grundgesamtheit außerhalb des Konfidenzintervalls liegen), dann ergibt sich der Wert 1,960 für die Schranken  $c$  der zweiseitigen Standardnormalverteilung (Sachs 1998). Berechnet man die Konfidenzintervalle für die angepasste Logistik-Funktion der gezeigten Estronkalibrierung (s. o.) mit ORIGIN7<sup>®</sup>, ergibt sich ein Konfidenzband (s. Abbildung 21).

$$a = z\sigma/\sqrt{n} \quad (19)$$

$$KONF = \{\bar{x} - a \leq w \leq \bar{x} + a\} \quad (20)$$

Die Bestimmung der Nachweisgrenze ist bei O`Connell (1992) beschrieben und in Abbildung 22 graphisch illustriert. Dieses Verfahren erlaubt ebenfalls die Bestimmung der niedrigsten Konzentration, die eine signifikante Signalerniedrigung im Vergleich zum Blindwertsignal hervorruft. Des Weiteren kann eine „vertrauenswürdige Nachweisgrenze“ (v-NWG), wie in Abbildung 22 gezeigt, bestimmt werden. Diese v-NWG ist definiert als die niedrigste Konzentration, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine signifikante Signalerniedrigung im Vergleich zum Blindwertsignal hervorruft.

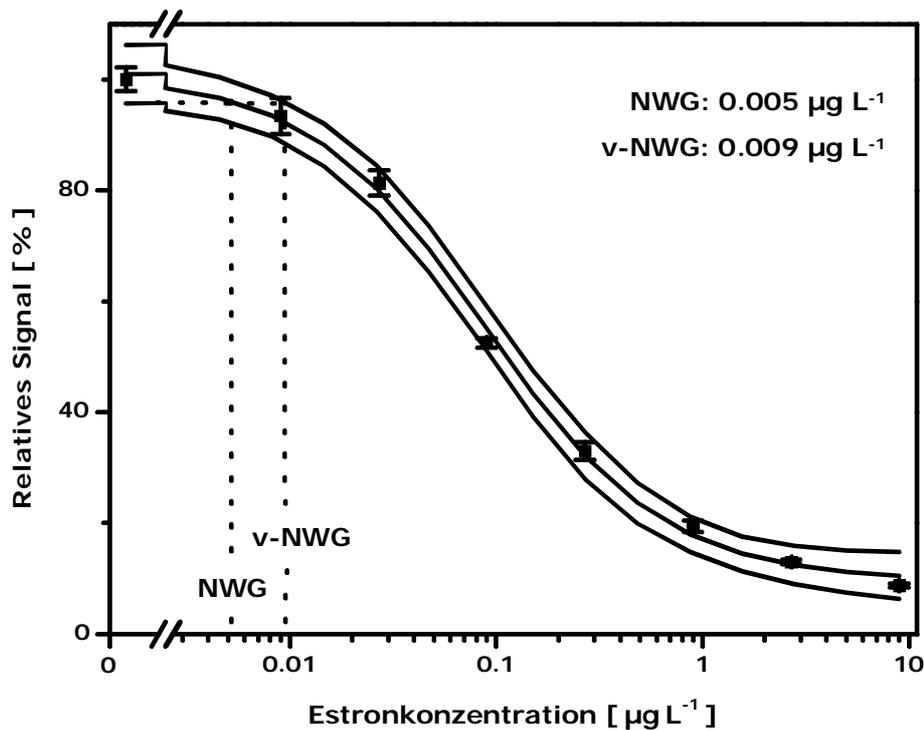


Abb. 22: Bestimmung der NWG und der v-NWG über das Konfidenzband

Bei der Nachweisgrenze handelt es sich eher um eine qualitative bzw. halbquantitative analytische Kenngröße. Die Bestimmungsgrenze gibt hingegen einen Grenzwert an, oberhalb dessen quantitative Bestimmungen möglich sind (Danzer 2001). Bei der Bestimmung der BSG nach IUPAC stellt sich allerdings die Frage, wie sinnvoll dies für die extreme Spurenanalytik mit Immunoassays ist, zumal die Kalibrierung einen nicht-linearen Zusammenhang besitzt. Weiterer Diskussionsbedarf besteht in Zukunft auch bezüglich der Durchführung des Logistik-Fits. Lässt man den Parameter  $A_1$  frei, so kann dieser auch Werte oberhalb 100% annehmen, wie dies in Abbildung 22 der Fall ist. Wird die Standardabweichung der Blindwerte sehr klein, dann kann sich ein Wert für die Erkennungsgrenze nach IUPAC ergeben, der in der Signaldomäne ebenfalls über 100% liegt. Im Extremfall kann dieser Wert sogar außerhalb des Fehlerbereichs der Blindwerte liegen.

Für die Estronkalibrierung sind die verschiedenen bestimmten Validierungsparameter in Tabelle 6 gegenübergestellt. Die ermittelten Arbeitsbereiche unterscheiden sich für die gezeigte Estronkalibrierung nur geringfügig zwischen den verschiedenen Logistik-Funktionen, jedoch erhält man mit dem Verfahren nach Horwitz in beiden Fällen deutlich größere zulässige Konzentrationsbereiche als für die 10 – 90% Bereiche. Die be-

reits angesprochene Problematik der Definition für die BSG nach IUPAC drückt sich hier in einem Wert für die BSG aus, der deutlich oberhalb der unteren Grenzen für die zulässigen Arbeitsbereiche liegt. In diesem Zusammenhang ist es besonders interessant, dass die v-NWG mit der unteren Grenze des Arbeitsbereichs nach Horwitz sehr gut übereinstimmt. Welche Konsequenzen sich daraus für die Ergebnisbewertung ergeben, wird anhand von Realprobenmessungen eingehend im folgenden Kapitel diskutiert.

Tabelle 6: Validierungsparameter einer Estronkalibrierung.

Approximation mit 3 Parametern				Approximation mit 4 Parametern			
A <sub>1</sub> fest	100	[ % ]		A <sub>1</sub>	100.95 ± 1.91	[ % ]	
A <sub>2</sub>	9.91 ± 1.56	[ % ]		A <sub>2</sub>	9.72 ± 1.75	[ % ]	
x <sub>0</sub>	0.09 ± 0.01	[ µg L <sup>-1</sup> ]		x <sub>0</sub>	0.09 ± 0.01	[ µg L <sup>-1</sup> ]	
p	1.03 ± 0.07	[ - ]		p	1.01 ± 0.08	[ - ]	
ARB-% [ µg L <sup>-1</sup> ]	ARB-H [ µg L <sup>-1</sup> ]	NWG <sup>1</sup> [ µg L <sup>-1</sup> ]	BSG <sup>1</sup> [ µg L <sup>-1</sup> ]	ARB-% [ µg L <sup>-1</sup> ]	ARB-H [ µg L <sup>-1</sup> ]	NWG <sup>2</sup> [ µg L <sup>-1</sup> ]	v- NWG [ µg L <sup>-1</sup> ]
0.011 – 0.764	0.009 – 4.3	0.008	0.030	0.010 – 0.781	0.009 – 4.3	0.002	0.012

<sup>1</sup> Bestimmt nach IUPAC Vorgaben

<sup>2</sup> Bestimmt mit Konfidenzband

### Wiederfindungsrate

Um die Richtigkeit einer Kalibrierung festzustellen, lässt sich als Qualitätskontrolle die Wiederfindungsrate ermitteln. Dazu werden Realproben, deren Analytkonzentrationen beispielsweise mit HPLC-Methoden bestimmt wurden, mit dem Biosensor gemessen und die Daten verglichen, oder es werden Matrices verwendet, die den entsprechenden Analyten in nicht nachweisbaren Konzentrationen enthalten und mit diesem Analyten dotiert (aufgestockt).

Die Wiederfindungsrate  $WFR$  [Gl.22] für Testproben ergibt sich aus dem Mittelwert der  $x$ -Werte [Gl.21] der Replikas und dem wahren Wert  $x_w$ .

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (21)$$

$$WFR = \frac{\bar{x}}{x_w} \cdot 100 \quad (22)$$

### 4.2.3 Multianalyt-Kalibrierung

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von Multianalyt-Immunoassays. Zum Aufbau solcher Assays müssen allerdings einige grundlegende Überlegungen angestellt werden. Wie bei Reder (2003) gezeigt, kann die Kalibrierung eines Multianalyt-Immunoassays für binäre und ternäre Gemische mit Neuronalen Netzen erfolgreich durchgeführt werden. Der Einsatz dieser aufwändigen Kalibrierungen ist besonders für Systeme angebracht, die unter dem Einfluss hoher Kreuzreaktivitäten (s. Kapitel 2.1.5) der Antikörper zu verschiedenen Analyten und Derivaten stehen. Diese Methode ist jedoch für quartäre Gemische nicht mehr praktikabel. Daher müssen von vorn herein Antikörper und Analyte bzw. Derivate ausgesucht werden, die untereinander sehr geringe Kreuzreaktivität zeigen. Nur so lässt sich eine größere Anzahl von Analyten simultan kalibrieren und quantifizieren.

#### Auswahl der Antikörper

Aus Untersuchungen mit dem RIANA Biosensor ist bekannt, dass die Analyte Estron, Isoproturon und Atrazin simultan in einem Multianalyt-Immunoassay quantifiziert werden können. Eingehende Studien ergaben, dass keine Kreuzreaktivitäten dieser Antikörper (a-E1, a-ACA, a-IPA) zu den jeweiligen anderen Substanzgruppen vorhanden sind (Rodriguez-Mozaz 2004). Innerhalb dieser Arbeit wurde der a-ACA (Reder, 2003b) Antikörper durch a-ZxBA ausgetauscht. Seine Eigenschaften sind dem des a-ACA Antikörpers sehr ähnlich und es wurden bereits erfolgreich Multianalyt-Immunoassays zusammen mit a-E1 und a-HPVAG durchgeführt. Dieses System aus a-E1, a-ZxBA, a-IPA und a-HPVAG wurde mit a-PRN (Tschmelak 2004b) und a-mixed-SUL (Tschmelak 2004c), beide ebenfalls polyklonal aus Schaf, zu einem Multianalyt-Immunoassay für sechs Analyte ausgebaut. Die quantifizierbaren Analyte kommen dabei aus drei verschiedenen Pestizidklassen (Triazine, Phenylharnstoff, Pesti-

zide und Anilide), endogene Disruptoren (Bisphenol A), Steroidhormone (Estron) und Antibiotika (Sulfamethizole).

Als wichtigstes Qualitätskriterium bei der Auswahl von Antikörpern ist die Affinität zu dem jeweiligen Analyten bzw. zu dem jeweiligen Derivat anzusehen. Je höher die Affinität zum Analyten ist, desto höher ist die Steigung der resultierenden Kalibrierkurve am Testmittelpunkt. Dies führt zu kleinen Fehlern in der Konzentrationsbestimmung innerhalb des dynamischen Bereichs. Eine hohe Affinität der Antikörper zu dem jeweiligen Derivat ist notwendig, um durch die dann zu vernachlässigende Kinetik an der Sensoroberfläche im massentransportkontrollierten Zustand zu messen (s. Kapitel 2.1.7 und Piehler 1997). Aus den Testmittelpunkten der in der Literatur beschriebenen Einzel- und Multianalyt-Kalibrierungen mit diesen sechs Antikörpern (Rodriguez-Mozaz 2004, Reder, 2003, Tschmelak 2004bc), können nach Piehler (1997) die Affinitätskonstanten abgeschätzt werden. Für alle Antikörper ist das Kriterium eines massentransportkontrollierten Betriebszustands gegeben.

### Multianalyt-IO-Chip

Für die hier vorgestellten Ergebnisse zu Multianalyt-Messungen wurde der IO-Chip 13 – 2 nach der Vorschrift „Multianalyt-Modifikation“ (s. Kapitel 3.4.1.2) mit acht verschiedenen Derivaten präpariert (s. Abbildung 23).

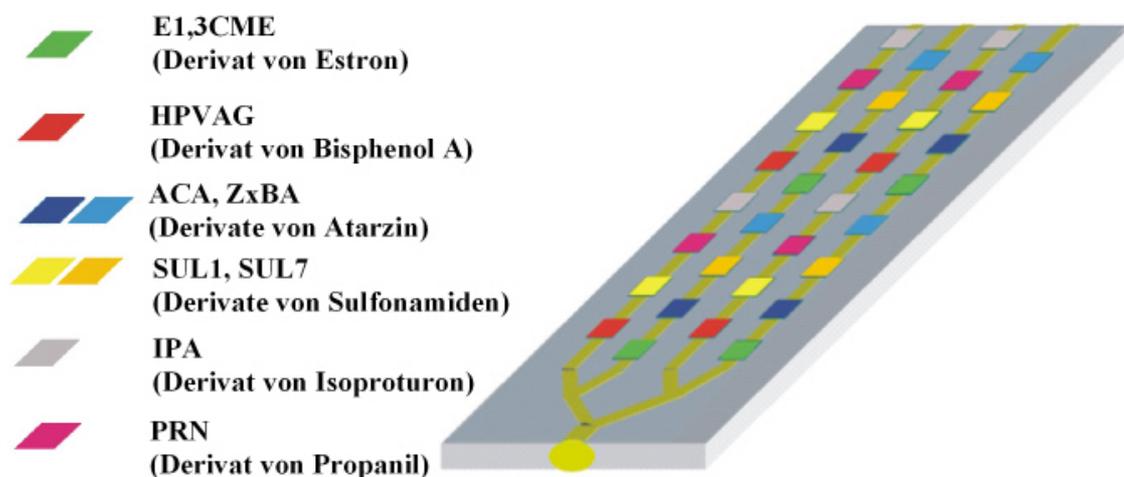


Abb. 23: IO-Chip mit Multianalyt-Modifikation.

Nach der Oberflächenbeschichtung, Äquilibrierung mit Ovalbumin und der anschließenden Regeneration wurden alle Antikörper auf unspezifische Bindung überprüft. Dabei lag die Summe der unspezifischen Signale an einem Messfenster unter einem Prozent, bezogen auf das spezifische Signal.

Bei dieser Multianalyt-Modifikation der IO-Chips wurden die Eigenschaften zweier Biopolymere kombiniert. Polyethylenglykol wird dabei nach der Silanisierung der Glasoberfläche auf den gesamten sensitiven Bereich aufgebracht und schützt so vor der unspezifischen Bindung von Antikörpermolekülen an die Oberfläche. Hierdurch werden die Störeinflüsse bei Multianalyt-Immunoassays, die durch Kreuzkontamination einzelner Messstellen mit unspezifisch gebundenen Antikörpern entstehen, weitestgehend verhindert. Das zweite Polymer Aminodextran trägt die jeweiligen Antigene in großer Zahl. Als stark gequollenes Hydrogel stellt es den massentransportkontrollierten Betriebszustand bei den Messungen sicher. Es wird durch einen neu etablierten Druckvorgang mit einem TopSpot-Gerät orts aufgelöst auf die jeweiligen Messfenster aufgebracht. Andere piezobasierte Drucksysteme konnten nicht in der erforderlichen kurzen Zeit (bevor die reaktive Oberfläche durch Luftfeuchtigkeit deaktiviert wird) dieses komplexe Muster mit ausreichender Reproduzierbarkeit erzeugen. Darüber hinaus erlaubt die Standfestigkeit dieser mehrschichtigen Oberflächenchemie ca. 400 Folgemessungen bzw. Regenerationsschritte.

## Kalibrierung

Das Kalibrationsdesign für Multianalyt-Kalibrierungen war gleich wie das für Einzelanalyt-Kalibrierungen (Kapitel 4.2.1), wobei die Konzentrationsstufen und die Antikörperstammlösung die jeweiligen Reagenzien als Mischungen enthielten. Die Messwerterfassung und -auswertung erfolgte, wie im Kapitel 4.2.1. bzw. 4.2.2 beschrieben, mit der Laserdiode im Modulations-Modus (s. Kapitel 4.1.1.3).

In Abbildung 24 ist eine Multianalyt-Kalibrierung mit  $15 \text{ ng mL}^{-1}$  a-E1,  $60 \text{ ng mL}^{-1}$  a-ZxBA,  $150 \text{ ng mL}^{-1}$  a-IPA,  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  a-HPVAG,  $150 \text{ ng mL}^{-1}$  a-PRN,  $210 \text{ ng mL}^{-1}$  a-mixed-SUL und  $250 \text{ ng mL}^{-1}$  OVA gezeigt. Tabelle 7 zeigt die normierten Mittelwerte und Standardabweichungen zu den Messungen der einzelnen Konzentrationsstufen. Die sehr guten Werte für die Signal-Rausch-Verhältnisse lagen zwischen 250 und 600.

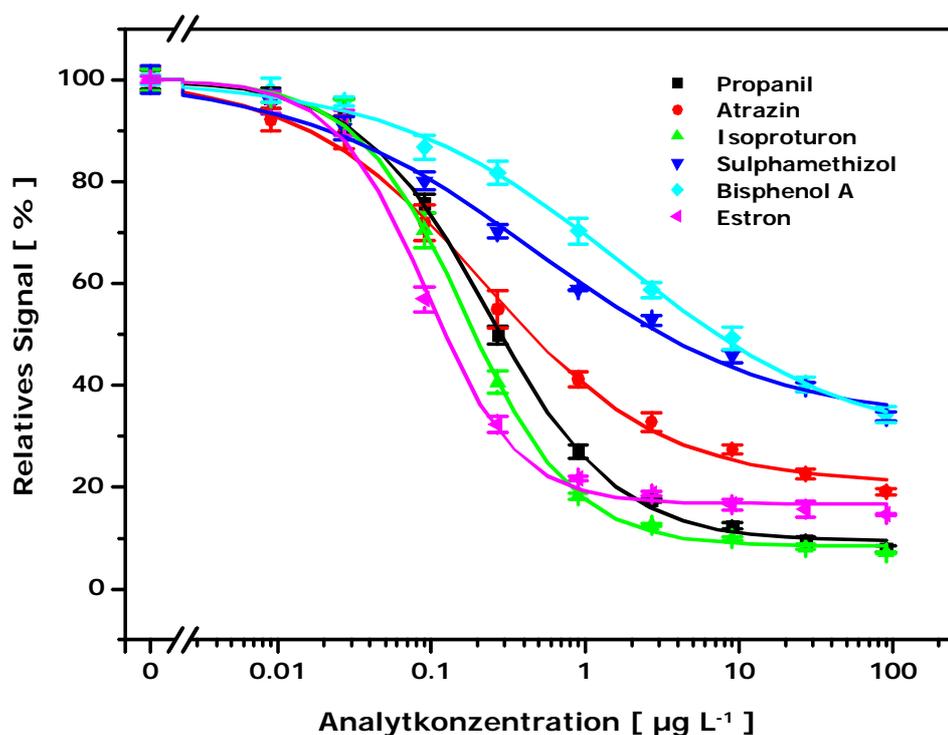


Abb. 24: Multianalyt-Kalibrierung mit dem IO-Chip 13 – 2. Der Parameter  $A_1$  wurde für alle Approximationen der Logistik-Funktion auf 100% festgesetzt.

Tabelle 7: Berechnete relative Signale in Prozent der Multianalyt-Kalibrierung mit Standardabweichungen für alle Analyte und Konzentrationsstufen.

Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Estron	Atrazin	Isoproturon	Bisphenol A	Propanil	Sulfamethizol
0	100.00 $\pm$ 0.56	100.00 $\pm$ 2.37	100.00 $\pm$ 2.04	100.00 $\pm$ 0.93	100.00 $\pm$ 1.91	100.00 $\pm$ 2.79
0.009	95.59 $\pm$ 2.04	92.15 $\pm$ 2.19	96.45 $\pm$ 0.83	98.01 $\pm$ 2.33	96.43 $\pm$ 2.02	95.55 $\pm$ 2.23
0.027	91.62 $\pm$ 2.48	89.66 $\pm$ 3.27	92.05 $\pm$ 3.96	95.84 $\pm$ 0.87	92.87 $\pm$ 3.38	90.49 $\pm$ 2.24
0.09	56.93 $\pm$ 2.48	71.96 $\pm$ 3.49	70.47 $\pm$ 3.48	86.75 $\pm$ 2.27	75.69 $\pm$ 1.83	80.13 $\pm$ 1.80
0.27	32.34 $\pm$ 1.58	54.96 $\pm$ 3.69	40.62 $\pm$ 2.23	81.76 $\pm$ 2.22	49.85 $\pm$ 1.77	70.13 $\pm$ 1.32
0.9	21.69 $\pm$ 0.41	41.15 $\pm$ 1.53	18.24 $\pm$ 0.57	70.34 $\pm$ 2.55	26.95 $\pm$ 1.35	58.67 $\pm$ 0.10
2.7	18.65 $\pm$ 0.46	32.78 $\pm$ 1.86	12.52 $\pm$ 0.27	58.67 $\pm$ 1.54	17.44 $\pm$ 0.36	52.73 $\pm$ 1.06
9	16.53 $\pm$ 1.00	27.41 $\pm$ 0.98	9.85 $\pm$ 0.26	49.31 $\pm$ 2.25	12.41 $\pm$ 0.61	45.70 $\pm$ 1.14
27	15.64 $\pm$ 1.56	22.58 $\pm$ 0.91	8.24 $\pm$ 0.51	40.25 $\pm$ 1.39	9.39 $\pm$ 0.81	39.59 $\pm$ 0.88
90	14.63 $\pm$ 0.23	19.15 $\pm$ 0.63	7.10 $\pm$ 0.24	34.22 $\pm$ 1.64	7.87 $\pm$ 0.68	33.91 $\pm$ 0.92

In Tabelle 8 sind die verschiedenen Validierungsparameter für diese Multianalyt-Kalibrierung zusammengefasst.

Tabelle 8: Validierungsparameter Multianalyt-Kalibrierung.

a)

Estron auf E1,3CME; Messfenster 31							
Approximation mit 3 Parametern				Approximation mit 4 Parametern			
$A_1$ fest	100	[ % ]		$A_1$	$100.16 \pm 1.89$	[ % ]	
$A_2$	$16.72 \pm 1.05$	[ % ]		$A_2$	$16.71 \pm 1.15$	[ % ]	
$x_0$	$0.09 \pm 0.01$	[ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]		$x_0$	$0.09 \pm 0.01$	[ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	
p	$1.46 \pm 0.12$	[ - ]		p	$1.45 \pm 0.15$	[ - ]	
ARB-% [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	ARB-H [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	NWG <sup>1</sup> [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	BSG <sup>1</sup> [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	ARB-% [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	ARB-H [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	NWG <sup>2</sup> [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	v- NWG [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]
0.021 – 0.418	0.009 – 1.3	0.007	0.015	0.020 – 0.420	0.009 – 1.3	0.013	0.021

b)

Atrazin auf ZxBA; Messfenster 19							
Approximation mit 3 Parametern				Approximation mit 4 Parametern			
$A_1$ fest	100	[ % ]		$A_1$	$100.59 \pm 2.08$	[ % ]	
$A_2$	$20.66 \pm 1.65$	[ % ]		$A_2$	$20.52 \pm 1.84$	[ % ]	
$x_0$	$0.22 \pm 0.02$	[ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]		$x_0$	$0.21 \pm 0.03$	[ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	
p	$0.74 \pm 0.05$	[ - ]		p	$0.73 \pm 0.07$	[ - ]	
ARB-% [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	ARB-H [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	NWG <sup>1</sup> [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	BSG <sup>1</sup> [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	ARB-% [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	ARB-H [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	NWG <sup>2</sup> [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	v- NWG [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]
0.011 – 4.1	0.008 – 2.5	0.010	0.069	0.011 – 4.2	0.006 – 2.5	0.005	0.011

c)

Isoproturon auf IPA; Messfenster 18							
Approximation mit 3 Parametern				Approximation mit 4 Parametern			
A <sub>1</sub> fest	100	[ % ]		A <sub>1</sub>	99.81 ± 0.78	[ % ]	
A <sub>2</sub>	8.39 ± 0.52	[ % ]		A <sub>2</sub>	8.42 ± 0.56	[ % ]	
x <sub>0</sub>	0.17 ± 0.01	[ µg L <sup>-1</sup> ]		x <sub>0</sub>	0.17 ± 0.01	[ µg L <sup>-1</sup> ]	
p	1.23 ± 0.04	[ - ]		p	1.24 ± 0.05	[ - ]	
ARB-% [ µg L <sup>-1</sup> ]	ARB-H [ µg L <sup>-1</sup> ]	NWG <sup>1</sup> [ µg L <sup>-1</sup> ]	BSG <sup>1</sup> [ µg L <sup>-1</sup> ]	ARB-% [ µg L <sup>-1</sup> ]	ARB-H [ µg L <sup>-1</sup> ]	NWG <sup>2</sup> [ µg L <sup>-1</sup> ]	v- NWG [ µg L <sup>-1</sup> ]
0.028 – 0.988	0.006 – 5.9	0.020	0.060	0.028 – 0.983	0.007 – 5.8	0.007	0.012

d)

Bisphenol A auf HPVAG; Messfenster 30							
Approximation mit 3 Parametern				Approximation mit 4 Parametern			
A <sub>1</sub> fest	100	[ % ]		A <sub>1</sub>	100.44 ± 0.89	[ % ]	
A <sub>2</sub>	28.10 ± 2.45	[ % ]		A <sub>2</sub>	29.52 ± 2.72	[ % ]	
x <sub>0</sub>	1.70 ± 0.29	[ µg L <sup>-1</sup> ]		x <sub>0</sub>	1.55 ± 0.30	[ µg L <sup>-1</sup> ]	
p	0.58 ± 0.04	[ - ]		p	0.61 ± 0.05	[ - ]	
ARB-% [ µg L <sup>-1</sup> ]	ARB-H [ µg L <sup>-1</sup> ]	NWG <sup>1</sup> [ µg L <sup>-1</sup> ]	BSG <sup>1</sup> [ µg L <sup>-1</sup> ]	ARB-% [ µg L <sup>-1</sup> ]	ARB-H [ µg L <sup>-1</sup> ]	NWG <sup>2</sup> [ µg L <sup>-1</sup> ]	v- NWG [ µg L <sup>-1</sup> ]
0.037 – 77.2	0.020 – 6.2	0.008	0.061	0.043 – 55.6	0.021 – 6.1	0.004	0.010

e)

Propanil auf PRN; Messfenster 22							
Approximation mit 3 Parametern				Approximation mit 4 Parametern			
A <sub>1</sub> fest	100	[ % ]		A <sub>1</sub>	100.34 ± 1.07	[ % ]	
A <sub>2</sub>	9.34 ± 0.78	[ % ]		A <sub>2</sub>	9.28 ± 0.86	[ % ]	
x <sub>0</sub>	0.23 ± 0.01	[ µg L <sup>-1</sup> ]		x <sub>0</sub>	0.23 ± 0.01	[ µg L <sup>-1</sup> ]	
p	1.05 ± 0.04	[ - ]		p	1.03 ± 0.05	[ - ]	
ARB-% [ µg L <sup>-1</sup> ]	ARB-H [ µg L <sup>-1</sup> ]	NWG <sup>1</sup> [ µg L <sup>-1</sup> ]	BSG <sup>1</sup> [ µg L <sup>-1</sup> ]	ARB-% [ µg L <sup>-1</sup> ]	ARB-H [ µg L <sup>-1</sup> ]	NWG <sup>2</sup> [ µg L <sup>-1</sup> ]	v- NWG [ µg L <sup>-1</sup> ]
0.028 – 1.9	0.010 – 6.5	0.019	0.066	0.028 – 1.9	0.013 – 6.2	0.008	0.013

f)

Sulfamethizol auf SUL1; Messfenster 26							
Approximation mit 3 Parametern				Approximation mit 4 Parametern			
A <sub>1</sub> fest	100	[ % ]		A <sub>1</sub>	100.83 ± 0.57	[ % ]	
A <sub>2</sub>	32.88 ± 2.41	[ % ]		A <sub>2</sub>	33.07 ± 1.33	[ % ]	
x <sub>0</sub>	0.47 ± 0.01	[ µg L <sup>-1</sup> ]		x <sub>0</sub>	0.46 ± 0.05	[ µg L <sup>-1</sup> ]	
p	0.57 ± 0.05	[ - ]		p	0.56 ± 0.03	[ - ]	
ARB-% [ µg L <sup>-1</sup> ]	ARB-H [ µg L <sup>-1</sup> ]	NWG <sup>1</sup> [ µg L <sup>-1</sup> ]	BSG <sup>1</sup> [ µg L <sup>-1</sup> ]	ARB-% [ µg L <sup>-1</sup> ]	ARB-H [ µg L <sup>-1</sup> ]	NWG <sup>2</sup> [ µg L <sup>-1</sup> ]	v- NWG [ µg L <sup>-1</sup> ]
0.010 – 22.8	0.012 – 8.2	0.018	0.109	0.009 – 22.6	0.012 – 8.2	0.002	0.012

<sup>1</sup> Bestimmt nach IUPAC-Vorgaben<sup>2</sup> Bestimmt mit Konfidenzband

Diese Multianalyt-Kalibrierung für 6 Substanzen demonstriert die Leistungsfähigkeit von Immunoassays. Für alle Analyte liegen die nach IUPAC berechneten Nachweisgrenzen unter 0.020 µg L<sup>-1</sup>. Besonders wichtig ist hierbei die Unterdrückung der unspezifischen Bindung von Antikörpermolekülen an die Transduceroberfläche. Dies wird durch die hier etablierte Oberflächenmodifikation gewährleistet. Eine eingehende Diskussion dieser Validierungsparameter erfolgt zusammen mit den Ergebnissen zu Realproben.

### 4.3 Validierung mit Realproben

Nach der Vorschrift ISO 9001 bedeutet Validierung die Bestätigung durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass die Anforderungen für einen spezifischen beabsichtigten Gebrauch oder eine spezifische beabsichtigte Anwendung erfüllt worden sind. Für die Analytik gilt insbesondere ISO 7504. Hier bezieht sich Validierung auf Analyseverfahren und beinhaltet den Nachweis, dass ein Verfahren für den vorgesehenen Verwendungszweck geeignet ist. Diese Arbeit folgt zwar nicht den ISO-Vorschriften zur Validierung, jedoch wurden Messungen durchgeführt, die eine Qualitätskontrolle der im vorangegangenen Kapitel vorgestellten Multianalyt-Immunoassays im Sinne einer Validierung erlauben. Hierzu werden Ergebnisse zu Realproben vorgestellt, wobei das Spektrum von aufgestockten Trinkwasserproben über einen Ringversuch bis hin zu einem Feldtest unter realistischen Einsatzbedingungen reicht.

#### 4.3.1 Trinkwasser

Die erste Matrix, die untersucht wurde, war Trinkwasser (Leitungswasser). Hier gelten die Vorschriften der Trinkwasserverordnung wie in Kapitel 1.1 erläutert. Zur Überprüfung des Multianalyt-Immunoassays als Analyseverfahren wurden Trinkwasserproben mit den sechs Analyten Estron, Atrazin, Isoproturon, Bisphenol A, Propanil und Sulfamethizol (vgl. Kapitel 4.2.3) aufgestockt. Die drei Konzentrationsstufen wurden so gewählt, dass je eine unterhalb ( $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ ), auf ( $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) und über ( $0.15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) dem Grenzwert für einzelne Pestizide im Trinkwasser liegt. Bei den Messungen werden diese aufgestockten Proben allerdings technisch bedingt um den Faktor 0.9 verdünnt. Jede Konzentrationsstufe wurde dreifach gemessen und auf Blindwerte mit deionisiertem Wasser bezogen. Als Qualitätskontrolle wurden die Wiederfindungsraten (s. Kapitel 4.2.2) auf Grundlage der Validierungsparameter der Multianalyt-Kalibrierung aus Kapitel 4.2.3 berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Ergebnisse mit aufgestockten Trinkwasserproben.

Analyt	Wahre Kon- zentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Signal [ % ]	Gemess. Konz.		WFR	
			<sup>1</sup> u. <sup>2</sup> [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	<sup>1</sup> u. <sup>2</sup> [ % ]		
Estron	0.045	$77.18 \pm 0.83$	<sup>1</sup> $0.048 \pm 0.002$	<sup>1</sup> $106.2 \pm 3.6$	<sup>2</sup> $0.048 \pm 0.002$	<sup>2</sup> $106.0 \pm 3.6$
			<sup>2</sup> $0.048 \pm 0.002$	<sup>2</sup> $106.0 \pm 3.6$		
	0.090	$53.98 \pm 1.63$	<sup>1</sup> $0.107 \pm 0.006$	<sup>1</sup> $119.4 \pm 6.4$	<sup>2</sup> $0.107 \pm 0.006$	<sup>2</sup> $119.4 \pm 6.4$
			<sup>2</sup> $0.107 \pm 0.006$	<sup>2</sup> $119.4 \pm 6.4$		
	0.135	$43.84 \pm 2.57$	<sup>1</sup> $0.154 \pm 0.015$	<sup>1</sup> $113.8 \pm 11.2$	<sup>2</sup> $0.154 \pm 0.015$	<sup>2</sup> $113.9 \pm 11.3$
			<sup>2</sup> $0.154 \pm 0.015$	<sup>2</sup> $113.9 \pm 11.3$		
Atrazin	0.045	$84.04 \pm 2.39$	<sup>1</sup> $0.034 \pm 0.008$	<sup>1</sup> $86.7 \pm 18.4$	<sup>2</sup> $0.034 \pm 0.008$	<sup>2</sup> $86.5 \pm 18.1$
			<sup>2</sup> $0.034 \pm 0.008$	<sup>2</sup> $86.5 \pm 18.1$		
	0.090	$74.77 \pm 2.50$	<sup>1</sup> $0.078 \pm 0.015$	<sup>1</sup> $87.0 \pm 16.8$	<sup>2</sup> $0.078 \pm 0.015$	<sup>2</sup> $86.4 \pm 16.7$
			<sup>2</sup> $0.078 \pm 0.015$	<sup>2</sup> $86.4 \pm 16.7$		
	0.135	$65.69 \pm 1.37$	<sup>1</sup> $0.151 \pm 0.014$	<sup>1</sup> $111.5 \pm 10.3$	<sup>2</sup> $0.150 \pm 0.014$	<sup>2</sup> $110.8 \pm 10.3$
			<sup>2</sup> $0.150 \pm 0.014$	<sup>2</sup> $110.8 \pm 10.3$		
Isoproturon	0.045	$81.94 \pm 0.67$	<sup>1</sup> $0.053 \pm 0.002$	<sup>1</sup> $117.4 \pm 4.4$	<sup>2</sup> $0.053 \pm 0.002$	<sup>2</sup> $117.6 \pm 4.4$
			<sup>2</sup> $0.053 \pm 0.002$	<sup>2</sup> $117.6 \pm 4.4$		
	0.090	$71.35 \pm 0.95$	<sup>1</sup> $0.087 \pm 0.003$	<sup>1</sup> $96.9 \pm 3.8$	<sup>2</sup> $0.087 \pm 0.003$	<sup>2</sup> $97.2 \pm 3.8$
			<sup>2</sup> $0.087 \pm 0.003$	<sup>2</sup> $97.2 \pm 3.8$		
	0.135	$61.11 \pm 1.41$	<sup>1</sup> $0.129 \pm 0.007$	<sup>1</sup> $98.0 \pm 4.4$	<sup>2</sup> $0.133 \pm 0.006$	<sup>2</sup> $98.1 \pm 4.4$
			<sup>2</sup> $0.133 \pm 0.006$	<sup>2</sup> $98.1 \pm 4.4$		
Bisphenol A	0.045	$95.70 \pm 0.31$	<sup>1</sup> $0.014 \pm 0.002$	<sup>1</sup> $31.6 \pm 4.2$	<sup>2</sup> $0.021 \pm 0.002$	<sup>2</sup> $46.9 \pm 5.4$
			<sup>2</sup> $0.021 \pm 0.002$	<sup>2</sup> $46.9 \pm 5.4$		
	0.090	$86.71 \pm 0.55$	<sup>1</sup> $0.130 \pm 0.011$	<sup>1</sup> $143.8 \pm 12.8$	<sup>2</sup> $0.152 \pm 0.012$	<sup>2</sup> $168.5 \pm 13.7$
			<sup>2</sup> $0.152 \pm 0.012$	<sup>2</sup> $168.5 \pm 13.7$		
	0.135	$86.38 \pm 1.56$	<sup>1</sup> $0.137 \pm 0.033$	<sup>1</sup> $101.8 \pm 24.8$	<sup>2</sup> $0.160 \pm 0.036$	<sup>2</sup> $118.6 \pm 26.6$
			<sup>2</sup> $0.160 \pm 0.036$	<sup>2</sup> $118.6 \pm 26.6$		

Propanil	0.045	86.61 ± 2.63	<sup>1</sup> 0.044 ± 0.007	<sup>1</sup> 96.7 ± 15.9
			<sup>2</sup> 0.043 ± 0.007	<sup>2</sup> 96.4 ± 15.8
	0.090	79.38 ± 1.06	<sup>1</sup> 0.072 ± 0.004	<sup>1</sup> 80.0 ± 3.9
			<sup>2</sup> 0.072 ± 0.004	<sup>2</sup> 79.6 ± 3.9
	0.135	63.81 ± 1.06	<sup>1</sup> 0.156 ± 0.007	<sup>1</sup> 115.8 ± 5.3
			<sup>2</sup> 0.156 ± 0.007	<sup>2</sup> 115.6 ± 5.3
Sulfamethizol	0.045	85.27 ± 0.31	<sup>1</sup> 0.050 ± 0.002	<sup>1</sup> 110.8 ± 5.3
			<sup>2</sup> 0.043 ± 0.001	<sup>2</sup> 96.0 ± 2.0
	0.090	82.47 ± 2.59	<sup>1</sup> 0.077 ± 0.028	<sup>1</sup> 85.6 ± 31.7
			<sup>2</sup> 0.051 ± 0.008	<sup>2</sup> 57.1 ± 8.6
	0.135	77.19 ± 2.28	<sup>1</sup> 0.148 ± 0.041	<sup>1</sup> 109.6 ± 9.8
			<sup>2</sup> 0.068 ± 0.007	<sup>2</sup> 50.1 ± 2.0

<sup>1</sup> Parameter  $A_1$  der Logistik-Funktion bei der Approximation auf 100% festgesetzt.

<sup>2</sup> Parameter  $A_1$  der Logistik-Funktion bei der Approximation frei.

Aus den Validierungsparametern der Multianalyt-Kalibrierung geht hervor, dass die eingesetzten Konzentrationsstufen für alle Kalibrierfunktionen innerhalb der zulässigen Arbeitsbereiche und oberhalb der Nachweisgrenzen liegen. Für Estron wird sogar das LOQ-Kriterium für die niedrigste Konzentrationsstufe erfüllt.

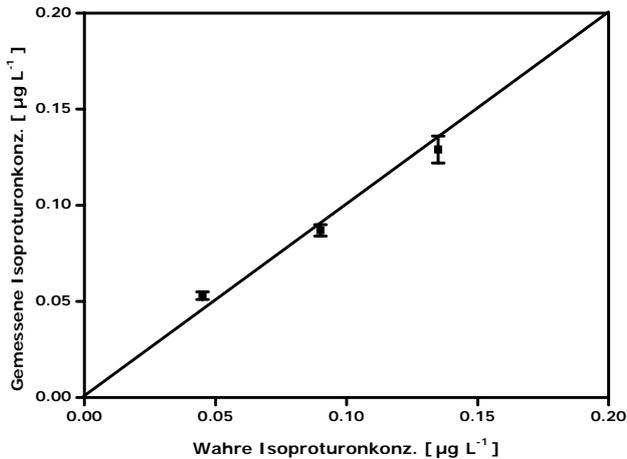
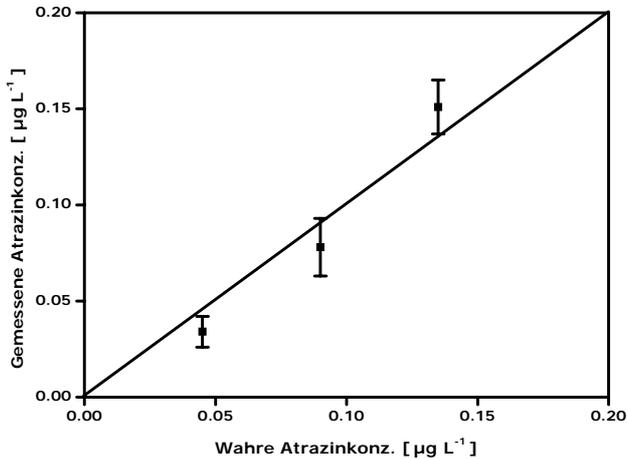
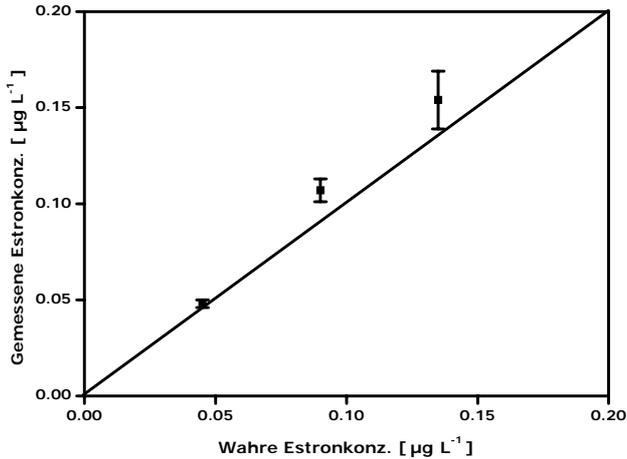
Für Estron, Atrazin, Isoproturon und Propanil stimmen die ermittelten Wiederfindungsraten für die beiden Logistik-Modelle sehr gut überein und liegen innerhalb des von der AOAC International geforderten Bereichs von 70 – 120%. Die Fehler der gemessenen Signale sind zwar sehr klein, jedoch führen selbst diese kleinen Fehler in der Signaldomäne in Bereichen der Kalibrierfunktion mit geringer Steigung teilweise zu hohen Konzentrationsfehlern. Die Analyte Estron, Isoproturon und Propanil können mit guter bis sehr guter Präzision in den Trinkwasserproben quantifiziert werden. Die allgemein höheren Fehler für Atrazin begründen sich mit der geringeren Steigung der Kalibrierfunktion um den Bereich des Testmittelpunkts, die bei kleinen Signalunterschieden zu sehr großen Konzentrationsunterschieden führt.

Die Kalibrierfunktionen von Bisphenol A und Sulfamethizol (s. Abbildung 24) weisen im dynamischen Signalbereich eine noch geringere Steigung als für Atrazin auf. Dies

führt zu größeren Unsicherheiten in der Konzentrationsbestimmung und damit zu den schlechteren Wiederfindungsraten. Daher überrascht es ebenfalls nicht, dass sich die Ergebnisse dieser beiden Analyten zwischen den zugrunde gelegten Logistik-Funktionen deutlich unterscheiden. Für Sulfamethizol ist interessant, dass alle Wiederfindungsraten nur dann innerhalb des gültigen Bereichs liegen, wenn die Auswertung mit der Logistik-Funktion (Approximation mit festgesetztem Parameter  $A_I$ ) erfolgte.

Die Wiederfindungsraten für Bisphenol A sind für die beiden kleineren Konzentrationsstufen außerhalb des geforderten Bereichs. Hier kommt erschwerend hinzu, dass das hier verwendete deionisierte Wasser mit Bisphenol A verunreinigt ist (nach Auskunft vom Technologiezentrum Wasser, Karlsruhe). Jede Puffer- und Wassercharge für die durchgeführten Messungen enthält somit unterschiedliche Mengen von diesem Analyten und stört somit den Immunoassay. Bis auf Bisphenol A konnte dieser Multianalyt-Immunoassay auch zeigen, dass Quantifizierungen unterhalb des LOQ möglich sind. Dieser Befund unterstützt die Vermutung, dass dieses Kriterium für Immunoassays nicht als Validierungsparameter herangezogen werden sollte. Abbildung 25 zeigt die True-Predicted Plots zu den Ergebnissen in Tabelle 9 mit dem Index<sup>1</sup>. Estron zeigt dabei eine Tendenz zur positiven Überbestimmung. Für die anderen Analyten macht diese Auftragung deutlich, dass keine systematischen Fehler vorhanden sind, die sich als Offset zu höheren oder niedrigeren bestimmten Konzentrationen hätten zeigen müssen. Die auf den ersten Blick großen Fehler sollten unter dem Blickwinkel betrachtet werden, dass es sich hierbei um Spurenanalytik handelt. Für Immunoassays sind diese Standardabweichungen in den bestimmten Konzentrationen durchaus tolerabel, zumal auch etablierte Methoden wie GC / HPLC vergleichbare Unsicherheiten (von  $\pm 5$  bis  $\pm 50$  % nach Auskunft des TZW in Karlsruhe) aufweisen.

Für alle folgenden Ergebnisse wurde der Parameter  $A_I$  bei der Approximation der Logistik-Funktion auf 100% festgesetzt.



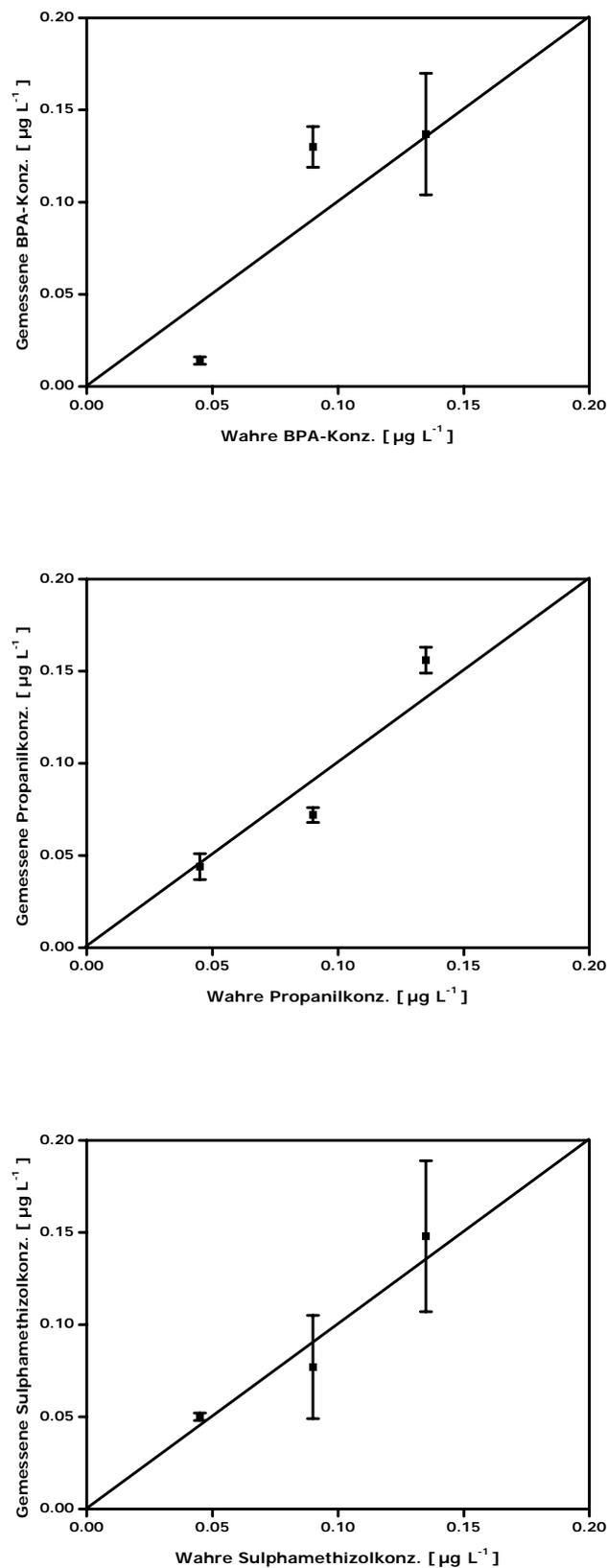


Abb. 25: True-Predicted Plots der Multianalyt-Messungen von drei Konzentrationsstufen in Trinkwasser. Auswertung mit drei approximierten Parametern der Logistik-Funktion.

### 4.3.2 Ringversuch

In einer nächsten Stufe der Validierung des AWACSS-Biosensors wurde ein internationaler Ringversuch mit sechs beteiligten Laboratorien aus dem AWACSS-Konsortium durchgeführt. Es wurden elf verschiedene analytische Systeme eingesetzt: Vier automatisierte online SPE-LC-DAD UV Systeme (Slobodnik et al. 1993), online SPE-LC-FLD, online SPE-LC-MS (Slobodnik et al., 2000), offline SPE/LVI-GC-MS (Korenkova et al. 2001), zwei RIANA Prototypen (Tschmelak et al. 2004a-d), ELISA und AWACSS. Die untersuchten Matrizes waren Milli-Q Wasser und gefriergetrocknete Fraktionen (Teilchengröße bis ca. 63  $\mu\text{m}$  Durchmesser) von Flusssediment aus der Nitra. Diese Proben wurden vom Environmental Institut (Slowakei) zur Verfügung gestellt und mit den Analyten Atrazin, Bisphenol A und Estron aufgestockt. Die Konzentrationsstufen waren 0.1 und 1.0  $\text{mg L}^{-1}$  in den Wassermatrizes und 50 und 500  $\text{ng g}^{-1}$  in Sediment. Um die Degradation der Analyte während des Transports zu verhindern, wurden die Proben direkt auf kleine 10 x 2.0 mm I.D. SPE Kartuschen geladen. Diese Kartuschen sind mit Polymersorptionsmittel gepackt und passen in das automatisierte Probenaufarbeitungsgerät PROSPEKT, das für jedes Labor verfügbar war. Die Sedimentproben wurden zuerst mittels Ultraschallaufschluss in Acetonitril extrahiert und anschließend in Milli-Q Wasser verdünnt, um anschließend auf dieselben Kartuschen geladen zu werden. Alle Proben wurden als Triplika hergestellt und zusammen mit Blankkartuschen an die Teilnehmer verschickt. Die Kartuschen wurden entweder direkt mittels online SPE-LC Systemen gemessen oder mit 1 mL Acetonitril eluiert und anschließend in 20 mL Milli-Q Wasser rekonstituiert. Diese Proben enthielten ca. 5% Acetonitril und wurden mittels RIANA, ELISA und offline SPE/GC-MS untersucht.

In den Tabellen 10 und 11 sind die Ergebnisse aus diesem Ringversuch zusammengefasst, wie sie in Tschmelak (2004e) publiziert wurden. Die Resultate zeigen, dass die Genauigkeit des AWACSS-Biosensors für die Matrizes Milli-Q Wasser und Sediment absolut vergleichbar zu den konventionellen chromatographischen Methoden ist. Die Wiederfindungsraten für Atrazin und Bisphenol A reichen von 82 bis 126% verglichen mit den wahren Konzentrationen und die für Estron waren zwischen 71 und 136%. Allgemein sind die Ergebnisse mit dem AWACSS-Gerät weniger stark in Richtung

höherer Werte verschoben als die Werte für ELISA und RIANA. Eine Auswertung dieses Ringversuchs nach der „Z-score“-Methode (ISO Guide 43 Annex A 1996) als ein Ausdruck der Abweichung der gemessenen von den wahren Werten zeigte, dass keines der Resultate, die mit dem AWACSS-Gerät erhalten wurden, von der Auswertung ausgeschlossen werden würde. Es sei hier angemerkt, dass die Analyse von rekonstituierten Sedimentextrakten mittels online SPE-LC-DAD UV Techniken nur möglich war, weil zeitaufwändige mathematische Dekonvolution und/oder Subtraktion der Blindwertsignale angewendet wurden. Betrachtet man die Reproduzierbarkeit, so zeigten die Resultate die mit dem AWACSS-Gerät gemessen wurden Standardabweichungen kleiner als 17% (s. Tabelle 10). Die einzige Ausnahme hierbei war Bisphenol A bei der niedrigen Konzentrationsstufe mit Sediment (27.8%). Die Resultate liegen gut innerhalb der Spanne derer, die mit den chromatographischen Methoden oder mit den anderen immunochemischen Techniken erzielt wurden (s. Tabelle 10).

Tabell 10: Ringversuchergebnisse mit dem AWACSS-Gerät.

Analyt	Wahre Konz. <sup>a</sup>	Matrix Milli-Q Wasser Gemess. Konz.	WFR		Wahre Konz. <sup>a,c</sup>	Matrix Sediment Gemess. Konz.	WFR	
	[ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	MW [ % ]	SD [ % ] <sup>b</sup>	[ $\text{ng g}^{-1}$ ]	MW [ $\text{ng g}^{-1}$ ]	MW [ % ]	SD [ % ]
Atrazin								
Konz. Stufe1	0.095	0.11	116	9.6	45	49.0	109	5.0
Konz. Stufe2	0.950	1.12	118	8.3	450	384	85	3.6
Bisphenol A								
Konz. Stufe1	0.97	0.8	82	4.0	44.5	51.7	116	27.8
Konz. Stufe2	0.974	1.25	128	16.9	445	423	95	7.5
Estron								
Konz. Stufe1	0.076	0.08	105	7.0	36	25.4	71	3.2
Konz. Stufe2	0.763	1.04	136	4.4	360	333	93	10.7

<sup>a</sup> Korrigiert für die Rückgewinnung der Analyte von den SPE Kartuschen und für die Blindwertmessungen.

<sup>b</sup> Berechnet aus Dreifachmessungen.

<sup>c</sup> Korrigiert für die Zurückgewinnung bei der Extraktion der Sedimente.

Tabelle 11: Vergleich der Atrazin-Bestimmungen in Milli-Q Wasser mittels konventioneller flüssigkeitschromatographiebasierter Analysenmethoden, ELISA, RIANA und dem AWACSS-Gerät. Konzentrationsstufe:  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ ; Anzahl der Messungen:  $n=3$ .

Konventionelle Methoden	MW [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	SD [ % ]
SPE-HPLC-DAD UV (Labor1)	0.11	14.3
SPE-HPLC-DAD UV (Labor2)	0.14	3.5
SPE-HPLC-DAD UV (Labor3)	0.07	20.8
Immunochemische Methoden	MW [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	SD [ % ]
RIANA	0.16	24.1
AWACSS	0.11	9,6
ELISA	0.14	3.6

### 4.3.3 Feldtest

Der AWACSS-Biosensor wurde als Gerät zur Überwachung von Oberflächengewässern konzipiert und gebaut. Mit einem Test unter realistischen Einsatzbedingungen sollte die Leistungsfähigkeit dieses Überwachungssystems überprüft werden. Die Anforderungen dabei sind ein störungsfreier vollständig automatisierter Messbetrieb mit automatisierter Auswertung und anschließender Übertragung der Ergebnisse auf eine Datenbank. Zum Zeitpunkt dieses Feldtests konnten diese drei Funktionseinheiten jedoch nur getrennt voneinander getestet werden.

Als Vorbereitung für diesen Feldtest wurde der IO-Chip 13 – 2, wie in Kapitel 4.2.3 für die Multianalyt-Kalibrierung beschrieben, neu beschichtet. Die simultane Kalibrierung im Labor vor dem eigentlichen Feldtest konnte erfolgreich für die Analyte Atrazin, Isoproturon, Bisphenol A und Estron durchgeführt werden (s. Abbildung 26). Leider waren die Oberflächenmodifikation für die Derivate von Propanil und Sulfamethizole nicht erfolgreich. Die Kalibrierungen für diese Substanzen waren deshalb mit extrem niedrigen Signalen nicht verwertbar. In Tabelle 12 sind die berechneten relativen Signale und die Validierungsparameter zusammengefasst.

Tabelle 12: Berechnete relative Signale in Prozent mit Standardabweichungen und Validierungsparameter für alle Analyte und Konzentrationsstufen der Feldtest-Multianalyt-Kalibrierung.

Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Estron	Atrazin	Isoproturon	Bisphenol A	Einheit
0	100.00 $\pm$ 0.66	100.00 $\pm$ 0.33	100.00 $\pm$ 0.83	100.00 $\pm$ 0.33	[ % ]
0.009	97.56 $\pm$ 1.07	96.14 $\pm$ 1.98	97.74 $\pm$ 2.69	96.14 $\pm$ 1.98	[ % ]
0.027	94.00 $\pm$ 0.16	92.14 $\pm$ 2.13	95.92 $\pm$ 2.04	92.14 $\pm$ 2.13	[ % ]
0.09	83.31 $\pm$ 1.01	79.58 $\pm$ 0.20	88.87 $\pm$ 2.12	79.58 $\pm$ 0.20	[ % ]
0.27	70.43 $\pm$ 1.28	67.45 $\pm$ 1.50	71.19 $\pm$ 0.86	67.45 $\pm$ 1.50	[ % ]
0.9	55.24 $\pm$ 1.45	58.25 $\pm$ 1.85	57.75 $\pm$ 1.39	58.25 $\pm$ 1.85	[ % ]
2.7	44.65 $\pm$ 1.53	49.86 $\pm$ 0.75	42.13 $\pm$ 1.46	49.88 $\pm$ 0.75	[ % ]
9	34.51 $\pm$ 0.78	43.29 $\pm$ 1.17	33.41 $\pm$ 0.55	43.29 $\pm$ 1.17	[ % ]
27	27.66 $\pm$ 0.89	37.37 $\pm$ 0.95	27.76 $\pm$ 0.99	37.37 $\pm$ 0.95	[ % ]
90	21.76 $\pm$ 1.28	33.61 $\pm$ 1.55	23.01 $\pm$ 2.42	33.61 $\pm$ 1.55	[ % ]
A1 fest	100	100	100	100	[ % ]
A2	20.55 $\pm$ 2.49	20.76 $\pm$ 2.04	22.08 $\pm$ 5.65	33.37 $\pm$ 2.16	[ % ]
x0	0.10 $\pm$ 0.025	0.68 $\pm$ 0.09	0.70 $\pm$ 0.28	0.38 $\pm$ 0.07	[ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]
p	1.15 $\pm$ 0.29	0.66 $\pm$ 0.04	0.74 $\pm$ 0.21	0.63 $\pm$ 0.06	[ - ]
ARB-%	0.016 - 0.600	0.029 - 12.7	0.035 - 11.7	0.009 - 13.6	[ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]
ARB-H	0.025 - 16.8	0.007 - 15.8	0.025 - 17.0	0.009 - 6.5	[ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]
NWG	0.003	0.003	0.007	0.001	[ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]
BSG	0.007	0.018	0.040	0.004	[ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]

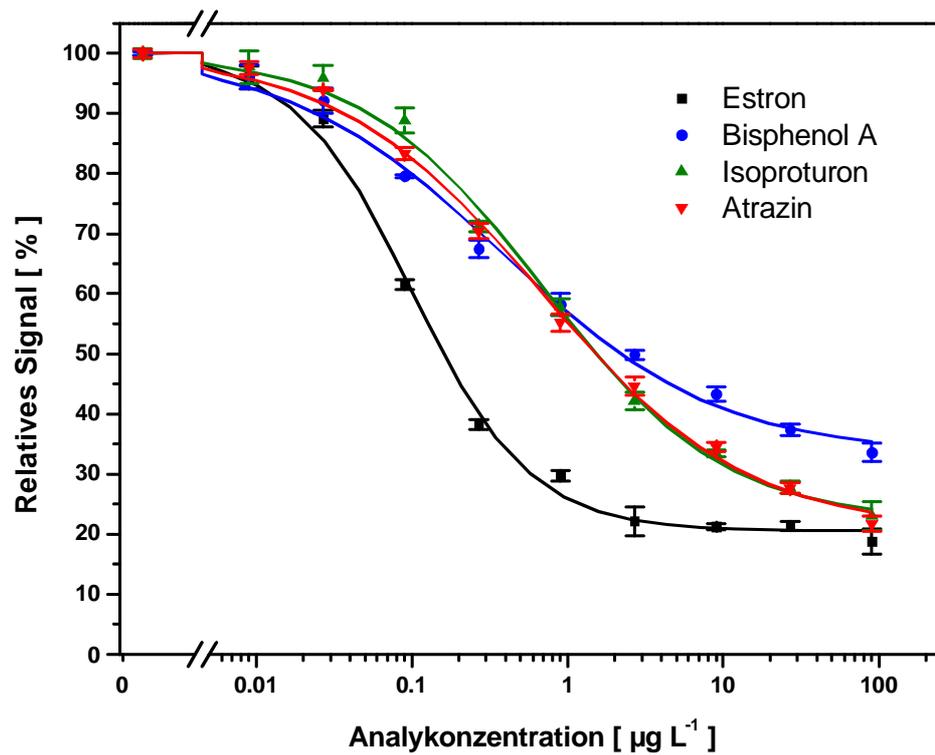


Abb. 26: Multianalyt-Kalibrierung für den Feldtest.

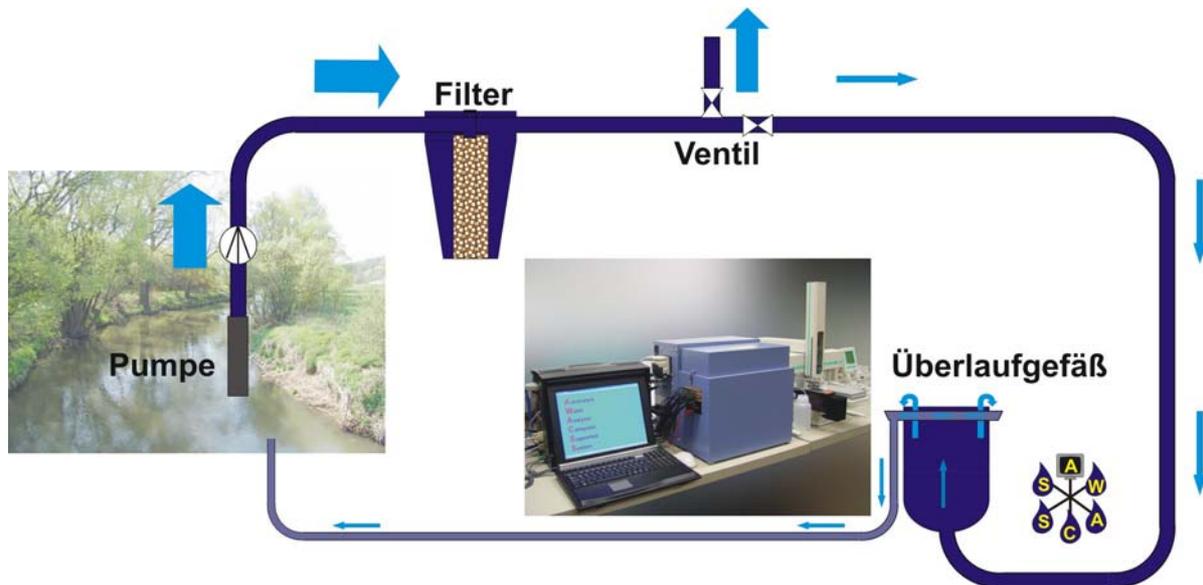


Abb. 27: Automatisiertes Probenahmesystem

In Zusammenarbeit mit dem DVGW TZW in Karlsruhe wurde ein automatisiertes Probenahmesystem entwickelt (s. Abbildung 27). Dieses Probenahmesystem ermöglicht den kontinuierlichen Transfer von Flusswasser zum Autosampler des AWACSS-

Systems. Das Probenahmesystem beinhaltet eine Tauchpumpe, ein Filtersystem mit 1  $\mu\text{m}$  Maschenweite, ein Ventil zur Kontrolle der Flussraten und ein Überlaufgefäß, aus dem der Autosampler die Wasserprobe entnimmt. Der Durchfluss am Überlaufgefäß wurde so eingestellt, dass das gesamte Wasservolumen bis zur nächsten Messung mehrfach ausgetauscht wurde. Während eines Probenahmeexperiments des DVGW TZW am Rhein konnte gezeigt werden, dass dieser Aufbau eine Standzeit von bis zu drei Monaten hat, bevor ein Austausch des Filters notwendig wird. Dies gilt für den Fall, dass die durchschnittliche Turbidität des Flusswassers nicht über 15 Formazine Nephelometric Units (FNU) liegt und dass die Flussrate durch das Überlaufgefäß 1 Liter pro Stunde beträgt.

Als Ort für den Feldtest wurde ein Fluss in einem Trinkwassereinzugsgebiet ausgesucht. Die notwendige Infrastruktur für die Energieversorgung und zum Schutz vor Wettereinflüssen bestand in einer Pumpstation direkt am Ufer. Nach erfolgter Installation des AWACSS-Systems wurden automatisiert Wasserproben und Blindwerte alternierend jeweils als Triplika gemessen. Um die Vergleichbarkeit dieser Messungen zu der Laborkalibrierung zu gewährleisten, wurden alle Einstellungen am Sensorsystem beibehalten. Die verwendeten Antikörper stammten alle aus identischen Chargen. Der einzige Unterschied in den Betriebsbedingungen während des Feldtests war eine um bis zu 15°C niedrigere Umgebungstemperatur als im Labor. Für das Messsystem bedeutet dies eine geringere Temperatur der Elektronik, was sich eher positiv auf das Rauschen der Photodioden auswirkt. In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass bei diesen Versuchsbedingungen die Beeinflussung der Antigen-Antikörper-Reaktion durch solche Temperaturänderungen nicht messbar ist. Es wurde an zwei aufeinander folgenden Tagen gemessen, wobei die Messungen teilweise unbeaufsichtigt über Nacht erfolgten.

Begleitend zu den Messungen mit dem AWACSS-System wurden Wasserproben auf konventionellem Wege genommen und vom DVGW TZW in Karlsruhe anschließend mit HPLC-DAD im Labor untersucht. Die Ergebnisse dieses Feldtests für die Analyte Isoproturon, Atrazin und Bisphenol A sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Für Estron lagen die Konzentrationsbestimmungen für beide Methoden unterhalb der jeweiligen Bestimmungsgrenze (BSG für Estrone mit -HPLC: 1  $\text{ngL}^{-1}$ ; BSG für Estron mit AWACSS: 7  $\text{ngL}^{-1}$ ). Zur besseren Veranschaulichung sind die Ergebnisse für Isopro-

tuon und für Atrazin zusätzlich graphisch in Abbildung 28 dargestellt. Für beide Pestizide wird der EU-Grenzwert für Trinkwasser von  $0.1 \mu\text{gL}^{-1}$  bei keiner Messung überschritten. Der erste HPLC-DAD-Messwert für Isoproturon liegt unterhalb der Bestimmungsgrenze dieser Methode und ist deshalb nicht sehr aussagekräftig. Alle anderen Messwerte für Atrazin und Isoproturon liegen oberhalb der jeweiligen Bestimmungsgrenze. Auf die Berechnung von Wiederfindungsraten wird hier verzichtet, da die wahren Konzentrationen nicht bekannt sind bzw. die HPLC-Ergebnisse auch fehlerbehaftet sind. Beide Methoden weisen vergleichbar große Standardabweichungen auf. Vergleicht man die AWACSS-Messwerte für Isoproturon mit dem zweiten HPLC-Wert, so ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung. Die AWACSS-Messungen 1 bis 3 sowie 4 und 5 liegen jeweils auf demselben Niveau. Eine Trendanalyse für Isoproturon hätte allerdings mehr Messwerte über einen längeren Zeitraum benötigt.

Für Atrazin stimmen die Messwerte beider Methoden zu den jeweiligen Zeitpunkten sehr gut überein. Der scheinbare zwischenzeitliche Anstieg der Atrazinkonzentration kann mit den beiden zur Verfügung stehenden HPLC-Daten nicht nachvollzogen werden. Dennoch sind solche Schankungen in der Atrazinfracht im Flusswasser möglich. Insgesamt scheinen alle AWACSS-Messwerte etwas oberhalb der HPLC-Vergleichswerte (positiver Bias) zu liegen. Dieser Befund ist damit zu erklären, dass beide Antikörper außer den jeweiligen Pestiziden auch deren Abbauprodukte (Metabolite) mit einer gewissen Kreuzreaktivität erkennen.

Für Bisphenol A ergaben sich leider sehr stark verfälschte Messwerte mit dem AWACSS-System, da die verwendeten Schläuche des Probenahmesystems viel von diesem Analyten (als Weichmacher im Kustoffmaterial enthalten) freigesetzt haben. Eine HPLC-DAD-Messung am Ablauf des Probenahmesystems bestätigt dies. Hier kann lediglich die Tendenz nachvollzogen werden, dass die Konzentration an Bisphenol A mit der Verweildauer der Wasserprobe in dem Probenahmesystem dramatisch ansteigt. Bei der Auswahl der Materialien besteht somit noch deutlicher Optimierungsbedarf.

Einige der AWACSS-Messwerte waren auf Grund von Luftblasen im Fluidiksystem nicht verwertbar und sind deshalb hier nicht aufgeführt. Übereinstimmend für alle Analyte ist dieses Problem bei denselben drei Messungen aufgetreten. Nur für den Analyten Atrazin war eine dieser Messungen noch sinnvoll auswertbar. Als Ursache

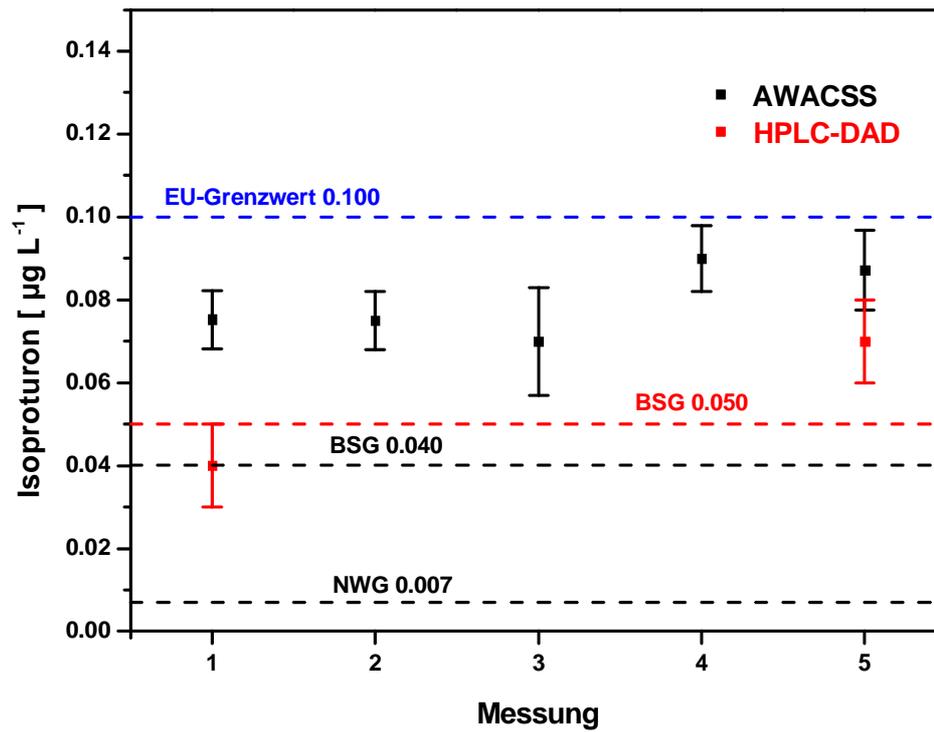
wurden Luftblasen identifiziert, die beim Ansaugen der Wasserprobe aus dem Überlaufgefäß in das Fludiksystem gelangen. Je nach dem, wo sich die Luftblasen in der Flusszelle festsetzen, sind meist mehrere verschiedene Messfenster betroffen. In Zukunft sollte daher der Wasserfluss in das Überlaufgefäß vor der Probennahme mit dem Autosampler abgestellt werden.

Tabelle 13: Feldtestergebnisse für Isoproturon, Atrazin und Bisphenol A.

Analyt / Messung	Im Fluss HPLC-DAD [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Nach Probenahmesystem HPLC-DAD [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	AWACSS [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]
Isoproturon			
Nr.1	$0.04 \pm 0.01^a$	$0.04 \pm 0.01^a$	$0.075 \pm 0.007$
Nr.2			$0.075 \pm 0.007$
Nr.3			$0.070 \pm 0.013$
Nr.4			$0.090 \pm 0.008$
Nr.5	$0.07 \pm 0.01^a$	$0.07 \pm 0.01^a$	$0.087 \pm 0.010$
Atrazin			
Nr.1	$0.030 \pm 0.01^a$	$0.03 \pm 0.01^a$	$0.038 \pm 0.014$
Nr.2			$0.037 \pm 0.010$
Nr.3			$0.048 \pm 0.014$
Nr.4			$0.062 \pm 0.006$
Nr.5			$0.063 \pm 0.004$
Nr.6	$0.03 \pm 0.01^a$	$0.04 \pm 0.01^a$	$0.031 \pm 0.011$
Bisphenol A			
Nr.1	$0.018 \pm 0.01^a$	$1.6 \pm 0.2^a$	$0.127 \pm 0.013$
Nr.2			$0.137 \pm 0.013$
Nr.3			$0.134 \pm 0.013$
Nr.4			$0.133 \pm 0.014$
Nr.5	$0.012 \pm 0.01^a$	$2.7 \pm 0.4^a$	$0.303 \pm 0.21$

<sup>a</sup> Die angegebenen Standardabweichungen sind Erfahrungswerte und wurden nicht aus Mehrfachmessungen berechnet.

a)



b)

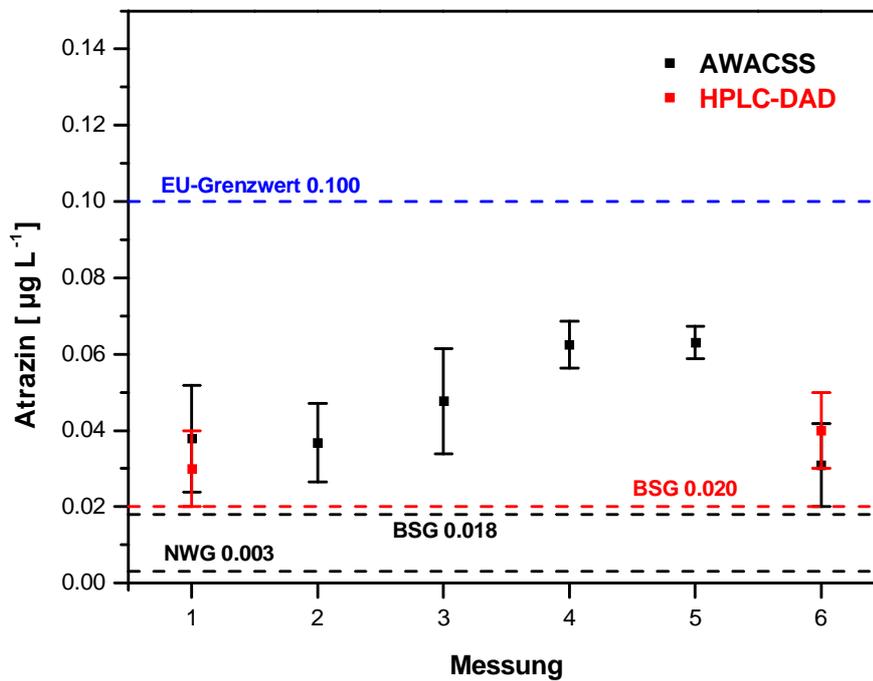


Abb. 28: Feldtestmessungen mit dem AWACSS-Biosensor und Vergleichsmessungen mit HPLC-DAD für a) Isoproturon und b) Atrazin.

Mit diesem Feldtest konnte gezeigt werden, dass das AWACSS-System dazu in der Lage ist, Monitoring an Oberflächengewässern zu leisten. Der automatisierte Messbetrieb verlief weitestgehend störungsfrei. Ebenfalls konnte die AWACSS-Software erfolgreich für die Auswertung der Rohdaten eingesetzt werden. Noch nicht implementiert ist die automatisierte Berechnung der Analytkonzentrationen in den Wasserproben auf Grundlage der approximierten Kalibrierfunktionen. Diese Berechnungen wurden mit Excel durchgeführt und die graphische Aufarbeitung der so erhaltenen Messwerte erfolgte mit dem Programm Origin<sup>®</sup>.

Während dieses Feldtests erfolgte auch ein Verbindungstest zwischen einem AWACSS-Messrechner zur Datenbank in Tübingen via Telefonleitung. Diese Anbindung an eine Datenbank soll in Zukunft der Fernkontrolle von Messstationen und der Datenspeicherung dienen. Die Datenbank verfügt des Weiteren über Möglichkeiten zur Alarmierung bei Grenzwertüberschreitungen nach vordefinierten Szenarien. Ein wichtiger Aspekt hierbei werden Plausibilitätskontrollen sein, die die Zuverlässigkeit und Richtigkeit der gemessenen Konzentrationen überprüfen, bevor ein solcher Alarm ausgelöst werden kann. Denkbar sind einfache Tests, wie zum Beispiel die Erkennung von hohen Standardabweichungen innerhalb einer Replikareihe, die auf Probleme wie die der angesprochenen Luftblasen hindeuten kann. Ebenfalls empfehlenswert ist die gelegentliche Überprüfung der Messgenauigkeit mit Proben bekannter Analytkonzentrationen.

#### **4.3.4 Bewertung zur Validierung**

Bei der Validierung von Immunoassays ist es üblich die Robustheit und Genauigkeit anhand verschiedener Matrizes zu untersuchen (O'Connel 1992). Trinkwassers wurde auf Grund der hier geltenden Grenzwerte für Pestizide als die erste zu untersuchende Matrix gewählt. Das Biosensorsystem AWACSS konnte in einem Multianalyt-Betrieb für sechs Substanzen aus unterschiedlichen Verbindungsklassen erfolgreich kalibriert und nachfolgend zur Bestimmung von aufgestockten Trinkwasserproben eingesetzt werden. Bis auf die Ergebnisse für Bisphenol A konnten alle Analyte mit sehr guten Wiederfindungsraten gemessen werden. Die Ergebnisse erfüllen dabei die strengen Vorgaben der AOAC International. Dabei ist die Nachweisgrenze dieses Sensors teil-

weise besser als die der vergleichend eingesetzten chromatographischen Methoden mit vorheriger Aufkonzentrierung. Die Güte der Präzision hängt stark von den Eigenschaften der verwendeten Antikörper ab. So sind Konzentrationsbestimmungen von Analyten in solchen Konzentrationsbereichen stärker fehlerbehaftet, in denen die Steigung der Kalibrierfunktion gering ist. Dieses Problem ist umso größer, je stärker der polyklonale Charakter eines Antikörper ist.

Ringversuche zwischen akkreditierten Analysenlabors stellen eine sehr gute Möglichkeit der Qualitätssicherung dar und werden von ISO 9001 zertifizierten Instituten regelmäßig durchgeführt. Innerhalb dieser Testreihen konnte das AWACS-System ebenfalls sehr gute Wiederfindungsraten erzielen und dadurch seine volle Vergleichbarkeit der analytischen Funktionalität zu klassischen analytischen Methoden unter Beweis stellen. Eine Untersuchung von Sedimentproben als Extrakte von SPE-Kartuschen erschließt darüber hinaus noch die Möglichkeit, das Probenspektrum in Zukunft auszuweiten.

Wie in Kapitel 1.1 erläutert, wurde das AWACS-System für die kontinuierliche Überwachung von Oberflächengewässern konzipiert. Der dritte Teil dieser Validierung sollte deshalb zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit unter realistischen Einsatzbedingungen dienen. Bei diesem Feldtest eines Fließgewässers wurden vier Substanzen vollständig automatisiert an zwei Tagen mehrfach bestimmt. Der Vergleich der ermittelten Schadstoffkonzentrationen mit Werten eines akreditierten Analysenlabors ergab wiederum eine außerordentlich gute Übereinstimmung. Hier zeigte sich allerdings das für Immunoassays häufig beobachtete Phänomen, dass die Resultate allgemein oberhalb der HPLC-Vergleichswerte liegen. Dieser Befund lässt sich auf die Kreuzreaktivität der eingesetzten Antikörper zu den Metaboliten der eigentlichen Analyten begründen. Zwar sind die Fehler in den bestimmten Analytkonzentrationen mitunter höher als die für die klassische Analysenmethode HPLC-DAD. Dies stellt aber keine Einschränkung bei dem geplanten Einsatz zur Grenzwertüberwachung dar. Verbesserungen der Robustheit dieses Biosensorsystems gegenüber Luftblasen, die bei der Entnahme von Realproben aus einem Überlaufgefäß in die Fluidik gelangen, sind noch notwendig.

---

Insgesamt kann die Validierung folgendermaßen bewertet werden: Mit dem AWACSS-Biosensor steht ein kostengünstiges Wasseranalytatorsystem für die kontinuierliche Überwachung von Oberflächengewässern und Trinkwasser zur Verfügung. Die analytische Leistungsfähigkeit ist zu der klassischer chromatographischer Analyseverfahren (z. B. HPLC-DAD) vergleichbar. Damit werden die Projektvorgaben eindeutig erfüllt. Durch die gelungene Analyse von Flusssediment über eine vorherige Anreicherung auf SPE-Kartuschen konnte eine neue Matrix- bzw. Probenklasse erschlossen werden. Ein Potenzial für den Einsatz bei der Analyse anderer fester Proben besteht. Besonders hervorzuheben ist die kurze Analysenzeit des AWACS-Systems von ca. 18 min pro Einzelmessung. Diese Eigenschaft prädestiniert es zum Einsatz als Prescreeningsystem in Wasseranalysenlabors, um das hohe Probenaufkommen günstiger und schneller zu bewältigen.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Biosensorsystem für vollständig automatisierte ultra-sensitive Multianalyt-Immunoassays realisiert, charakterisiert und auf seine analytische Leistungsfähigkeit hin untersucht. Mit diesem Sensorsystem können ohne vorherige Aufkonzentrierung der Proben simultan mehrere verschiedene organische Schadstoffe in Oberflächengewässern, Grund- und Trinkwasser im unteren  $\text{ng L}^{-1}$  Bereich nachgewiesen werden. Das Sensorsystem AWACSS basiert dabei auf der Fluoreszenzanregung durch innere Totalreflektion (TIRF).

Nach Design und Konstruktion erfolgte als erstes die Systemintegration der einzelnen optischen und fluidischen Komponenten. Dabei wurden verschiedene IO-Chips hinsichtlich ihrer optischen Eigenschaften und den dadurch bedingten Einfluss auf die Immunoassays charakterisiert. Es zeigte sich, dass eine Verteilung der Evaneszenzfeldleistung über eine größere Fläche an den Messfenstern dieser IO-Chips zu besseren Ergebnissen führt. Werden solche IO-Chips mit einer dünnen hochbrechenden Schicht aus  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  versehen, so erhöht sich die Leistung der Evaneszenzfelder und die einzusetzende Antikörpermenge kann drastisch reduziert werden. Die durch diese Schicht bedingte stärkere Dämpfung entlang der Wellenleiter ist für die ermittelten Signal-Rausch-Verhältnisse nicht limitierend. Allerdings führt eine zu dicke Schicht zu verstärktem Auskoppeln von Licht in das angrenzende Medium. Häufig unterschätzt wird der Einfluss des Strömungsprofils in Durchflusszellen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Flusszellen mit einer Höhe von ca.  $30 \mu\text{m}$  traten Störeffekte nahe dem Einlassbereich auf. Hier zeigte sich weiterer Entwicklungsbedarf. Eine anfänglich störende Signaldrift konnte durch eine optimierte Messwerterfassung bei gleichzeitig moduliertem Laser kompensiert werden.

Bei der statistischen Bewertung von Estronkalibrierungen mit einem polyklonalen Antikörper ergaben sich methodisch bedingte Unterschiede in den ermittelten Validierungsparametern. Grundlage dieser Bewertungen ist die Approximation der Vier-Parameter-Logistik-Funktion. Wird dabei die obere Asymptote auf 100% festgesetzt, kann die Berechnung der NWG und der BSG nach den IUPAC Vorgaben erfolgen, die jedoch für lineare Kalibrierfunktionen aufgestellt wurden. Approximiert man alle vier Parameter, so konnten, basierend auf dem Konfidenzintervall einer Kalibrierfunktion,

ebenfalls eine NWG und eine v-NWG bestimmt werden. Dabei wurde allgemein eine gute Übereinstimmung der v-NWG mit dem unteren zulässigen Arbeitsbereich nach Horwitz gefunden. Bei dieser Analytkonzentration ist eine quantitative Messung mit hoher Wahrscheinlichkeit vom Blindwert zu unterscheiden. Das Kriterium nach IUPAC für die Bestimmungsgrenze liefert hierfür deutlich höhere Werte und erscheint für Immunoassays ungeeignet, zumal gezeigt werden konnte, dass selbst bei Multianalyt-Messungen Quantifizierungen unterhalb dieser Bestimmungsgrenze allgemein möglich waren. Eine neue Richtlinie der IUPAC für Immunoassays wäre hier hilfreich.

Wesentlich für den Erfolg dieser Arbeit war die Entwicklung einer mehrschichtigen orts aufgelösten Oberflächenchemie. Bei dieser Multianalyt-Modifikation der IO-Chips wurden die Eigenschaften zweier Biopolymere kombiniert. Polyethylenglykol als erstes Polymer schützt den gesamten sensitiven Bereich vor unspezifischer Bindung von Antikörpermolekülen an die Oberfläche. Hierdurch werden die Störeinflüsse bei Multianalyt-Immunoassays durch Kreuzkontamination einzelner Messstellen mit unspezifisch gebundenen Antikörpern verhindert. Das zweite Polymer Aminodextran trägt die jeweiligen Antigene in großer Zahl. Als stark gequollenes Hydrogel stellt es den massentransportkontrollierten Betriebszustand bei den Messungen sicher. Es wird durch einen neu etablierten Druckvorgang orts aufgelöst auf die jeweiligen Messfenster aufgebracht. Darüber hinaus erlaubt die Standfestigkeit dieser mehrschichtigen Oberflächenchemie ca. 400 Folgemessungen bzw. Regenerationsschritte.

Basierend auf dieser Oberflächenmodifikation konnte erstmalig eine simultane Multianalyt-Kalibrierung mit sechs polyklonalen Antikörpern aus Schaf im Testformat des Bindungshemmtests durchgeführt werden. Die gewählten Analyte kommen dabei aus drei verschiedenen Pestizidklassen (Triazine (Atrazin), Phenylharnstoffe (Isoproturon) und Anilide (Propanil)), endogene Disruptoren (Bisphenol A), Steroidhormone (Estron) und Antibiotika (Sulfamethizol). Für alle Analyte lagen dabei die Nachweisgrenzen nach IUPAC unter  $0.020 \mu\text{g L}^{-1}$ . Bei der nachfolgenden Validierung dieser Kalibrierung mit aufgestockten Trinkwasserproben konnten bis auf Bisphenol A sehr gute Wiederfindungsraten innerhalb des von der AOAC International geforderten Bereichs ermittelt werden. Für den Analyten Bisphenol A konnte eine schwankende Kontaminierung des deionisierten Wassers im Labor als Störquelle identifiziert werden.

Bis auf Estron konnten keine eindeutigen systematischen Fehler bei der Quantifizierung ermittelt werden. Allgemein als problematisch haben sich Antikörper erwiesen, die zu Kalibrierfunktionen mit kleiner Steigung am Testmittelpunkt führen. Hier sind die Fehler in der ermittelten Analytkonzentration deutlich größer. Interessanterweise ergaben sich für Sulfamethizol nur mit festgesetzter oberer Asymptote bei der Approximation gute Wiederfindungsraten, weshalb in dieser Arbeit nur noch diese Strategie weiter verfolgt wurde.

In einer nächsten Stufe der Qualitätskontrolle der analytischen Leistungsfähigkeit wurde ein Ringversuch mit mehreren beteiligten Projektpartnern durchgeführt. Hierbei wurden mit Atrazin und Estron aufgestockte Milli-Q Wasser- und Flusssedimentproben auf SPE-Kartuschen geladen und vor Ort eluiert und rekonstituiert. Der AWACSS-Biosensor konnte bei allen Messungen vollständige Vergleichbarkeit zu den etablierten Analysemethoden (LC und ELISA) unter Beweis stellen. Dabei ist die Erschließung fester Proben als neue Probenklasse hervorzuheben.

Die Erprobung dieses Sensorsystems unter realistischen Einsatzbedingungen stellte den letzten Teil dieser Validierung dar. Hierfür wurde das AWACS-System für die Analyte Atrazin, Isoproturon, Estron und Bisphenol A kalibriert und zusammen mit einem automatisierten Probenahmesystem an einem Fluss installiert. Unter diesen Bedingungen konnten über Nacht unbeaufsichtigte Messungen durchgeführt werden. Für Atrazin und Isoproturon wurden die gefundenen Konzentrationen mit HPLC-DAD Werten bestätigt. Beide Analyte wurden jedoch vom Biosensorsystem leicht überbestimmt, was mit der Anwesenheit von kreuzreaktiven Abbauprodukten erklärt werden kann. Für Estron lagen die Ergebnisse beider Systeme unterhalb der jeweiligen Bestimmungsgrenze. Der Analyt Bisphenol A konnte nicht sinnvoll erfasst werden, da er von Kunststoffschläuchen des Probenahmesystems in großen Mengen freigesetzt wurde.

Diese Validierung ergab, dass die analytische Leistungsfähigkeit dieses Biosensorsystems zu den klassischen Analyseverfahren (z. B. HPLC-DAD) vergleichbar ist. Dabei erfolgt eine Multianalyt-Messung innerhalb von 18 min ohne vorherige Aufkonzentrierung der Probe.

## **Ausblick**

Die bereits in dieser Arbeit angesprochene Verbesserungsmöglichkeit des AWACS-Systems hinsichtlich der temperaturbedingten Drift der Elektronik kann durch eine Thermostatisierung behoben werden. Diese wird zusammen mit einem vereinfachten Probengebungssystem zum Ersatz des Autosamplers bereits zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit aufgebaut. Eine weitere Vereinfachung in der Handhabung verspricht der Einsatz neuer Flusszellen mit einer Dichtung anstelle der aufwändigen Klebprozedur.

Mittelfristig ist auch der Einsatz neuartiger biologischer Erkennungsstrukturen möglich. Humane monoklonale Antikörper können hier die Vorteile der Stabilität gegen biologischen Abbau bei gleichzeitiger hoher Affinität und hoher resultierender Steigung der Kalibrierung am Testmittelpunkt vereinigen. Des Weiteren stellen Aptamere eine viel versprechende Alternative zu den Antikörpern dar. Für alle diese Erkennungsstrukturen gilt, dass bei weiterer Standardisierung der Versuchsbedingungen in Zukunft der Aufwand bei Kalibrierungen deutlich verringert werden kann, zumal das Kalibrierergebnis theoretisch nur von der eingesetzten aktiven Konzentration der jeweiligen Erkennungsstruktur abhängig ist.

Zur Lösung anderer analytischer Probleme kann der Einsatz von Halbleiter-Nanokristallen (Quantum Dots, QDs) als alternative Fluoreszenzmarkierung sinnvoll sein. Erste Schritte in dieser Richtung wurden bereits auf dem 5. Dresdner Sensorsymposium vorgestellt (siehe Anhang). Der Vorteil liegt hierbei in der hohen Stabilität der QDs gegenüber Photoreaktionen und der einstellbaren Fluoreszenzwellenlänge über die Synthesebedingungen.

In Zukunft sollten auch weitere Einsatzgebiete für diesen Biosensor erschlossen werden. Besonders viel versprechend erscheint dies im Bereich der Lebensmittelüberwachung und der klinischen Diagnostik mit Hinblick auf die dort etablierte ELISA-Methode.

## 6 Literaturverzeichnis

- 2000/60/EC: DIRECTIVE 2000/60/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy (2000). *Off. J. E. C.*, **L327**, 1-72.
- 98/83/EC: COUNCIL DIRECTIVE (98/83/EC) of 3 November 1998 relating to the quality of water intended for human consumption (1998). *Off. J. E. C.*, **L330**, 32-54.
- Abraham G.E., (1969) Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 beta. *J. Clin. Endo.*, **29**, 866.
- Abuknesha R.A., Gallacher G., Perry L.A., (1987) The production and characterisation of antisera to 17-hydroxyprogesterone. *J. Steroid Biochem.*, **26**(3), 375-82.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., (1995) Molekularbiologie der Zelle. 3. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Barzen C., (2000) Optimierung eines Fluoreszenz-Immunsensors für den flexiblen Multianalyt-Nachweis. Dissertation, Tübingen.
- Barzen C, Brecht A, Gauglitz G, (2002) Optical multiple-analyte immunosensor for water pollution control. *Biosens. Bioelectron.* **17**: 289-295.
- Beland P., DeGuise S., Girard C., Lagacee A., Martineau D., Michaud R., Muir D., Norstrom R., Pelletier E., Ray S., Shugart L., (1993) Toxic compounds and health and reproductive effects in St. Lawrence Beluga Wales. *J. Great Lakes Res.*, **19**, 766.
- Ben Rejeb S., Fischer-Durand N., Martel A., Le Poulennec B., Lawrence J.F., Hennion M.C., Le Goffic F., (1998) Development of anti-phenylurea antibody purification techniques for improved environmental applications. *Anal. Chim. Acta.*, **376**(1), 41.
- Bjarnason B., Bousios N., Eremin S., Johansson G., (1997) Flow injection enzyme immunoassay of atrazine herbicides in water. *Anal. Chim. Acta*, **347**, 111-120.
- Blomberg K.R., (1991) Mathematical Theory of Complex Ligand-Binding Systems Applied to Free Triiodothyronine Immunoassays. *Anal. Chem.*, **63**, 2581.
- Broley C., (1958) The Plight of the American Bald Eagle. *Audubon Mag.* **60**, **171**, 162.
- Chandan J.K., Esahak A., (1999) High resolution affinity chromatography of an anti-steroid antiserum by gradient elution with propionic acid. *JIM*, **225**, 95.

- Cooper T.G., (1981) Biochemische Arbeitsmethoden. 1. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin.
- Cordis (2005), <http://www.cordis.lu/en/home.html>
- Danzer K., Hobert H., Fischbacher C., Jagemann K.U., (2001), Chemometrik–Grundlagen und Anwendungen. Springer-Verlag, Berlin.
- Dudley R.A., Edwards P., Ekins R.P., Finney D.J., McKenzie I.G.M., Raab G.M., Rodbard D., Rodgers R.P.C., (1985) Guidelines for Immunooassay Data Processing. *Clin. Chem.* 31/8, 1264-1271.
- Falbe F., Regitz M., Roempp Lexikon, Chemie, 10. Auflage, Version 2.0, Thieme INTERACTIVE, Georg Thieme Verlag, 1999, Stuttgart.
- Feldman H., Rodbard D., Levine D., (1972) Mathematical Theory of Cross-Reactive Radioimmunoassay and Ligand-Binding Systems at Equilibrium. *Anal. Biochem.*, **45**, 530.
- Feldman H.A., (1972) Mathematical Theory of Complex Ligand-Binding Systems at Equilibrium: Some Methods for Parameter Fitting. *Ana. Biochem.*, **48**, 317.
- Fukazawa H., Watanabe M., Shiraishi F., Shiraishi H., Shiozawa T., Matsushita H., Terao Y., (2002) Formation of chlorinated derivatives of Bisphenol A in waste paper recycling plants and their estrogenic activities. *J. Health Sci.*, **48**(3), 242-249.
- Griffiths M., (2002) European Water Management Online, Official Publication of the European Water Association (EWA).  
[http://www.ewaonline.de/journal/2002\\_05.pdf](http://www.ewaonline.de/journal/2002_05.pdf)
- Guillette Jr. L.J., Pickford D.B., Crain D.A., Rooney A.A., Percival H.F., (1996) Reduction in Penis Size and Plasma Testosterone Concentrations in Juvenile Alligators living in Contaminated Environment. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **101**, 32.
- Hock B., Niessner R., Eds (1995) Immunochemical Assay of Environmental Pollutants Using Pesticides as an Example. Immunochemical Detection of Pesticides and their Metabolites in the Water Cycle. VCH, Heidelberg, pp 3-24.
- Horwitz W., Kamps L.R., Boyer K.W., (1998) Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**, 1344-1353.
- Inczedy J., Lengyel T., Ure A.M., (1998) Compendium of Analytical Nomenclature. Definitive Rules 1997, "The Orange Book", 3rd ed., Blackwell Science, Oxford.

- ISO Guide 43 Annex A (1996) Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes. International Organisation for Standardisation, Geneva.
- Janeway C., Travers P., (1994) Immunologie. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg.
- Klotz A., Brecht A., Barzen C., Gauglitz G., Harris R.D. Quigley G.R., Wilkinson J.S., Abuknesha R., (1998) Immunofluorescence sensor for water analysis. *Sens. Act. B*, **51**, 181.
- Klotz A., (1998) Fluoreszenzbasiertes optisches Biosensorsystem: Entwurf, Modellierung und Optimierung. Dissertation, Tübingen.
- Korenková E., Matisová E., Slobodník J., (2001) Large volume injection in capillary gas chromatography. *Chem. Listy*, **95**(9), 528-539.
- Körner W., Hanf V., Schuller W., Bartsch H., Zwirner M., Hagenmaier H., (1998) Validation and application of a rapid in vitro assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals. *Chemosph.*, **37**, 2395-2407.
- Krämer P.M., Franke A., Standfuss-Gabisch C., (1999) Flow injection immunoassay analysis (FIIAA): a screening technology for atrazine and diuron in water. *Anal. Chim. Acta*, **399**, 89-97.
- Kreyszig E., (1998) Statistische Methoden und ihre Anwendungen. van den Hoeck & Ruprecht, Göttingen.
- Lang G., (1997) Entwicklung und Optimierung eines optischen Immunoassays zur Pestizidanalytik in aquatischen Medien. Dissertation, Tübingen.
- Larsson D.G.J., Adolfsson-Erici M., Parkkonen J., Pettersson M., Berg A.H., Olsson P.-E., Förlin L., (1999) Ethinylestradiol – an undesired fish contraceptive? *Aqua. Toxicol.* **45**: 91-97.
- Ligler F.S., Golden J.P., Rowe-Taitt C.A., Dodson J.P. (2001) Proceedings of SPIE 4252:32-36.
- Lodisch H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Darnell J., (1996) Molekulare Zellbiologie. 2. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin.
- Miller J.C., Miller J.N., (1988) Basic statistical methods for analytical chemistry. Part1. Statistics of repeated measurements – A review. *Analyst*, **113**, 1351-1356.
- Meusel M., Trau D., Katerkamp A., Meier F., Polzius R., Cammann K., (1998) New ways in bioanalysis – one way optical sensor chip for environmental analysis. *Sens. Act. B*, **51**(1-3), 249-255.

- O'Connell M.A., Belanger B.A., Haaland P.D., (1992) Calibration and assays development using the four-parameter logistic model. *Chemom. Intellig. Lab. Sys.*, **20**, 97-114.
- Oubina A., Gascon J., Barcelo D., (1997) Multianalyte effect in the determination of cross-reactivities of pesticide immunoassays in water matrices. *Anal. Chim. Acta*, **341**, 121.
- Peter C., Meusel M., Grawe F., Katerkamp A., Cammann K., Borchers T., (2001) Optical DNA-sensor chip for real-time detection of hybridization events. *Fresen. J. Anal. Chem.*, **371**, 120-127.
- Piebler J., Brecht A., Geckeler K.E., Gauglitz G., (1996) Surface modification for direct immunoprobes. *Biosens. Bioelectron.*, **11**(6/7), 579-590.
- Piebler J., Brecht A., Ramunas V., Liedberg B., Gauglitz G., (2000) A high-density poly(ethylen glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces. *Biosens. Bioelectron.*, **15**(9-10), 473-481.
- Piebler J., (1997) Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern. Dissertation, Tübingen.
- Hua P., Hole J.P., Wilkinson J.S., Proll G., Tschmelak J., Gauglitz G., Jackson M.A., Abuknesha R., Kaiser J., Kraemmer P., (2004) Integrated optical immunofluorescence multisensor for river pollution. *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering*, **5502**, 275-278.
- Pingoud A., Urbanke C., (1997) Arbeitsmethoden der Biochemie. 1. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin.
- Petrovics M, Eljarrat E, Lopez de Alda MJ, Barcelo D, (2002) Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *J. Chromatogr. A*, **974**, 23-51.
- Plowman TE, Durstchi JD, Wang HK, Christensen DA, Herron JN, Reichert WM, (1999) Multiple-analyte fluoroimmunoassay using an integrated optical waveguide sensor. *Anal. Chem.* 71: 4344-4352.
- Proll G., (2001) Gruppenspezifischer Nachweis von hormonaktiven Substanzen im Wasser mittels eines fluoreszenzbasierten Immunosassays (TIRF). Diplomarbeit, Stuttgart.
- Proll G., Kumpf M., Mehlmann M., Tschmelak J., Griffith H., Abuknesha R., Gauglitz G., (2004) Monitoring an antibody affinity chromatography with a label-free optical biosensor technique. *JIM*, **292**, 35-42.

- Purdom C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R., Sumpter J.P., (1994) Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works. *Chem. Ecol.*, **8**, 275.
- Quigley Q.R., Harris, R.D., Wilkinson J.S., (1997) Sensitivity enhancement of integrated optical sensors by thin high index films. *Proc. 8<sup>th</sup> European conference on integrated optics (ECIO)*, Stockholm, Schweden, 2. April - 4. April, 326-329.
- Reder S., (2003) Multi-Analyt-Bestimmung von endokrinen Disruptoren im Wasser mit Hilfe eines Flureszenz-Immunoassays unter Verwendung von neuronalen Netzen, Dissertation, Tübingen.
- Reder S., Dieterle F., Jansen H., Alcock S., Gauglitz G., (2003) Multi-analyte assay for triazines using cross-reactive antibodies and neural networks. *Biosens. Bioelectron.*, **19**(5), 447-55.
- Rodriguez-Mozaz S., Reder S., Lopez de Alda M., Gauglitz G., Barceló D., (2004) Simultaneous multi-analyte determination of estrone, isoproturon and atrazine in natural waters by the RIVER ANALyser (RIANA), an optical immunosensor. *Biosens. Bioelectron.*, **19**(7), 633-640.
- Roitt I.M., Brodhorff J., Male D.K., (1995) Kurzes Lehrbuch der Immunologie. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Sachs L., (1998) Statistische Methoden: Planung und Auswertung. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York.
- Schmitt H.-M., Brecht A., Piehler J., Gauglitz G., (1997) An integrated system for optical biomolecular interaction analysis. *Biosens. Bioelectron.*, **12** (8), 801-816.
- Schuderer J., Akkoyun A., Brandenburg A., Bilitewski U., Wagner E., (2000) Development of a multichannel fluorescence affinity sensor system. *Anal. Chem.* **72**, 3942-3948.
- Schult K., Katerkamp A., Trau D., Grawe F., Cammann K., Meusel M., (1999) Disposable Optical Sensor Chip for Medical Diagnostics: New Ways in Bioanalysis. *Anal. Chem.*, **71**, 5430-5435.
- Shore L.S., Gurevitz M., Shemesh M., (1993) Estrogen as an environmental pollutant. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **51**, 361-366.
- Silzel J.W., Cercek B., Dodson C., Tsay T., Obrebsik R.J., (1998) Mass-sensing, multianalyte microarray immunoassay with imaging detection. *Clin. Chem.*, **44**, 2036.
- Slobodník J., Groenewegen M.G.M., Brouwer E.R., Lingeman H., Brinkman U.A.Th., (1993) Fully automated multi-residue method for trace-level monitoring of polar

- pesticides by liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **642**(1-2), 359-370.
- Slobodník J., Brinkman U.A.Th., (2000) LC/MS interfacing systems in environmental analysis: applications to polar pesticides. In: Barceló D. (Eds.), (2000) *Environmental Analysis: Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants - Techniques, Applications and Quality Assurance. Elsevier Science*, 935-1001.
- Bahnd S., Surugiu I., Dzgoev A., Ramanathan K., Sundaram P.V., Danielsson B., (2005) Immuno-arrays for multianalyte analysis of chlortriazines. *Talanta*, **65**, 311-336.
- Tschmelak J., Proll G., Gauglitz G., (2004a) Verification of performance with the automated direct optical TIRF immunosensor (River Analyser) in single and multi-analyte assays with real water samples. *Biosens. Bioelectron.*, **20**(4), 743-752.
- Tschmelak J., Proll G., Gauglitz G., (2004b) Ultra-sensitive fully automated immunoassay for detection of propanil in aqueous samples: steps of progress toward subnanogram per liter detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, **379**(7-8), 1004-1012.
- Tschmelak J., Kumpf M., Proll G., Gauglitz G., (2004c) Biosensor for seven sulphonamides in drinking, ground, and surface water with difficult matrices. *Anal. Lett.*, **37**(8), 1701-1718.
- Tschmelak J., Proll G., Gauglitz G., (2004d) Immunosensor for estrone with an equal limit of detection as common analytical methods. *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**(3), 744-745.
- Tschmelak J., Proll G., Riedt J., Kaiser J., Kraemmer P., Bárzaga L., Wilkinson J.S., Hua P., Hole J.P., Nudd R., Jackson M., Abuknesha R., Barceló D., Rodriguez-Mozaz, López de Alda M.J., Sacher F., Stien J., Slobodník J., Oswald P., Kozmenko H., Korenková E., Tóthová L., Krascenits Z., Gauglitz G., (2004e) Automated Water Analyser Computer Supported System (AWACSS) - Part II: Intelligent, remote-controlled, cost-effective, on-line, water-monitoring measurement system. *Biosens. Bioelectron.*, doi:10.1016/j.bios.2004.07.033
- World Health Organization, (2003) *Guidelines for Drinking Water Quality*, 3<sup>rd</sup> Edition. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- UN (2005), <http://www.un.org/works/sustainable/freshwater.html>
- van Emon J.M., Lopez-Avila V., (1992) Immunochemical methods for environmental analysis. *Anal. Chim. Acta*, **64**, 285-292.
- van Oss C.J., (1994) Nature of specific ligand-receptor bonds, in particular the antibody-antigen bond. *Immunochem.*, Marcel Dekker, New York, 581.

van Oss, C.J. (1995) Hydrophobic, hydrophilic and other interactions in epitope-paratope binding. *Molec. Immunol.* **32**, 199.

Winklmaier M., Weller M.G., Mangler J., Schlosshauer B., Niessner R., (1997) Development of a high sensitive enzyme-immunoassay for the determination of triazine herbicides. *Fresen. J. Anal. Chem.*, **358**, 614-622.

Weybridge, (1996) European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife. Weybridge, UK.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

$A$	univalentes Analyt
$A_1$	obere Asymptote an die Kurve
$A_2$	untere Asymptote an die Kurve
ACA	Atrazincapronsäure
a-E1	anti-Estrogen
$Ag$	Antigen
Ag-Ak	Antigen-Antikörper-Komplex
a-HPVAG	ant-Bisphenol A
a-IPA	anti-Isoproturon
$Ak$	Antikörper
AMD	Aminodextran
a-mix-SUL	a-mixed-Sulfonamide
a-PRN	anti-Propanil
ARB	Arbeitsbereich
AWACSS	Automated Water Analyser Computer Supported System
$B$	Bindungsstellen
BPA	Bisphenol A
BSG	Bestimmungsgrenze
$c$	Lichtgeschwindigkeit
$c_{Ag}$	Gleichgewichtskonzentration des Antikörpers
$c_{0,Ag}$	Anfangskonzentration des Antigens
$c_{Ag-Ak}$	Gleichgewichtskonzentration des Antigen-Antikörper-Komplexes
$c_{Ag-AkTM}$	Konzentration des Antigen-Antikörper-Komplexes am Testmittelpunkt
$c_{AiBj}$	Gleichgewichtskonzentration des Komplexes aus dem $i$ ten Analyten und der $j$ ten Bindungsstelle
$c_{Ak}$	Gleichgewichtskonzentration des Antikörpers
$c_{0,Ak}$	Anfangskonzentration des Antikörpers
$c_{0,AkBs}$	Anfangskonzentration der Antikörperbindungsstellen

---

$c_{0,AkMoleküle}$	Anfangskonzentration der Antikörpermoleküle
$c_{Ak,voll}$	Konzentration vollständig besetzter Antikörpermoleküle
$c_{AnalytTM}$	Konzentration des spezifischen Analyten am Testmittelpunkt
$c_{fAi}$	freie Gleichgewichtskonzentration des <i>i</i> ten Analyten
$c_{fAk}$	Konzentration der freien Antikörpermoleküle
$c_{fBj}$	freie Gleichgewichtskonzentration der <i>j</i> ten nicht reagierten Bindungsstelle
$c_{kreuzAnalytTM}$	Konzentration des kreuzreaktiven Analyten am Testmittelpunkt
$c_{tAi}$	Gesamtkonzentration des <i>i</i> ten Analyten
$c_{tBj}$	Gesamtkonzentration der <i>j</i> ten Bindungsstelle
%CR	prozentuale Kreuzreaktivität
d	Atomabstand
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	N,N-Dimethylformamid
$\lambda$	Wellenlänge
$E$	Energie
E1,3CME	Estron-3-carboxymethyl-ether
EDC	Endocrine Disruptors
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FIA	Fließ-Injektions-Analyse
FNU	„Formazine Nephelometric Units“; Einheit für Trübung
GC	Gaschromatographie
GOPTS	3-Glycidyoxypropyl-trimetylsiloxan
$h$	Plank`sches Wirkungsquantum
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPVAG	Derivat von Bisphenol A
$i$	1,2,...,n
IgG	Immunglobulin G
IO-Chip	integriert optischer Transducer
IPA	Derivat von Isoproturon
$j$	1,2,...,m
$K$	Affinitätskonstante

---

$K_{A_i, B_j}$	Affinitätskonstante für eine Teilreaktion
$k_a$	Assoziationsratenkonstante
$k_d$	Dissoziationsratenkonstante
$K_{het}$	Affinitätskonstante zum Derivat an der heterogenen Phase
$\lambda$	Wellenlänge
$MW_{AK}$	Molekulargewicht Antikörper
$n$	Brechungsindex
NWG	Nachweisgrenze
v-NWG	vertrauenswürdige Nachweisgrenze
OVA	Hühner-Ovalbumin
$p$	Steigung im Testmittelpunkt nach der logarithmischen Transformation
$\theta_{grenz}$	Grenzwinkel der Totalreflexion
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD	Photodioden
PML	Polymerlichtleiter
PRN	Derivat von Propanil
ppb	parts per billion (entspricht z.B. $\mu\text{gL}^{-1}$ )
RIANA	River Analyser
RIFS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SRV	Signal-Rausch-Verhältnis
SUL1	Derivat1 eines Sulfonamids
SUL7	Derivat7 eines Sulfonamids
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence
$\nu$	Frequenz
WL	Wellenleiter
WFR	Wiederfindungsrate
$x$	Analytkonzentration
$x_0$	Testmittelpunkt (Analytkonzentration am Wendepunkt)
ZxBA	Derivat von Atrazin

## 7.2 Veröffentlichungen

### 7.2.1 Publikationen

- [1] Proll G., Kumpf M., Mehlmann M., Tschmelak J., Griffith H., Abuknesha R., Gauglitz G. (2004) Monitoring an antibody affinity chromatography with a label-free optical biosensor technique. *Journal of Immunological Methods*, **292**(1-2), 35-42.
- [2] Tschmelak J., Proll G., Riedt J., Kaiser J., Kraemmer P., Bázquez L., Wilkinson J.S., Hua P., Hole J.P., Nudd R., Jackson M., Abuknesha R., Barceló D., Rodriguez-Mozaz S., López de Alda M.J., Sacher F., Stien J., Slobodník J., Oswald P., Kozmenko H., Korenková E., Tóthová L., Krascenits Z., Gauglitz G. (2004) Automated Water Analyser Computer Supported System (AWACSS) - Part I: Project objectives, basic technology, immunoassay development, software design & networking. *Biosensors and Bioelectronics*, accepted.
- [3] Tschmelak J., Proll G., Riedt J., Kaiser J., Kraemmer P., Bázquez L., Wilkinson J.S., Hua P., Hole J.P., Nudd R., Jackson M., Abuknesha R., Barceló D., Rodriguez-Mozaz S., López de Alda M.J., Sacher F., Stien J., Slobodník J., Oswald P., Kozmenko H., Korenková E., Tóthová L., Krascenits Z., Gauglitz G. (2004) Automated Water Analyser Computer Supported System (AWACSS) - Part II: Intelligent, remote-controlled, cost-effective, on-line, water-monitoring measurement system. *Biosensors and Bioelectronics*, accepted.
- [4] Proll G., Tschmelak J., Gauglitz G. (2004) Fully automated immunoassays for water analysis. Trend Article in *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, accepted.
- [5] Proll G., (2004) Optical Sensors: Industrial, Environmental and Diagnostic Applications Narayanaswamy, Ramaier; Wolfbeis, Otto S. (Eds.). A book review in *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, accepted.
- [6] Tschmelak J., Proll G., Gauglitz G. (2004) Immunosensor for estrone with equal limit of detection as common analytical methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **378**(3), 744–745.

- 
- [7] Tschmelak J., Proll G., Gauglitz G. (2004) Verification of performance with the automated direct optical TIRF immunosensor (River Analyser) in single and multi-analyte assays with real water samples. *Biosensors and Bioelectronics*, doi:10.1016/j.bios.2004.04.006.
- [8] Tschmelak J., Kumpf M., Proll G., Gauglitz G., (2004) Biosensor for seven sulphonamides in drinking, ground and surface water with difficult matrices, *Analytical Letters*, **37**(8), 1701-1718.
- [9] Tschmelak J., Proll G., Gauglitz G. (2004) Optical biosensor for pharmaceuticals, antibiotics, hormones, endocrine disrupting chemicals and pesticides in water - assay optimisation process for estrone as example. *Talanta*, accepted.
- [10] Tschmelak J., Proll G., Gauglitz G. (2004) Quantifizierung von Toxinen im Wasser mittels Biosensoren. *GIT Labor-Fachzeitschrift*, **48**(1), 61-64.
- [11] Tschmelak J., Proll G., Gauglitz G. (2004) The quantification of toxins in water using biosensors. *G.I.T. Laboratory Journal*, **8**(1), 40-42.
- [12] Tschmelak J., Proll G., Gauglitz G. (2004) TIRF-Immunoassay mit Fluoreszenzdetektion: frühere Entwicklungen, Stand der Technik und Ausblick in die Zukunft. *LaborPraxis*, **28**(4), 22-24.
- [13] Tschmelak J., Proll G., Kaiser J., Kraemmer P., Hua P., Wilkinson J., Jackson M., Nudd R., Abuknesha R., Gauglitz G., (2004) AWACSS - Automated Water Analyser Computer Supported System, Environmental Technologies Action Plan. *EU Booklet DG Research*, in press.
- [14] Tschmelak J., Proll G., Gauglitz G. (2004) Ultra-sensitive fully automated immunoassay for the detection of propanil in aqueous samples - steps of progress towards a sub-nanogram per liter detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, doi:10.1007/s00216-004-2695-x.
- [15] Tschmelak J., Proll G., Gauglitz G. (2004) Sub-nanogram per litre detection of the emerging contaminant progesterone with a fully automated immunosensor based on evanescent field technique. *Analytica Chimica Acta*, **519**(2), 143-146.

- [16] Hua P., Hole J.P., Wilkinson J.S., Proll G., Tschmelak J., Gauglitz G., Jackson M.A., Nudd R., Kaiser J. and Krämmer P., (2004) Integrated optical fluorescence multisensor for water pollution. *IEEE Photonics Technology Letters*, accepted.
- [17] Willard D., Proll G., Reder S., Gauglitz G. (2003) New and Versatile Optical-Immunoassay Instrumentation for Water Monitoring. *ESPR – Environ Sci & Pollut*, **10**(3), 188-191.
- [18] Nickel M., Leininger S., Proll G., Brümmer F., (2001) Comparative studies on two potential methods for the biotechnological production of sponge biomass. *Journal of Biotechnology*. **92**, 169-178.
- [19] Hülser D., Eckert R., Rütz M.-L., Nonhoff U., Proll G., (2000) Zellen in Kultur: Festnetztelefonierer und Mobilfunker, wie im richtigen Leben. *BIOforum*, **23**, 498-502.

### 7.2.2 Poster

#### 1. Posterpreis beim 3. Biosensor Symposium

Proll G., Reder S., Gauglitz G., Poster: Multianalyt-Biosensor mit Fluoreszenzdetektion zum Umweltmonitoring von endokrinen Disruptoren in Gewässern. 5. Dresdner Sensor Symposium. 10. bis 12. Dezember 2001, Dresden.

#### 1. Posterpreis beim 5. Dresdner Sensor Symposium

Proll G., Willard D., Gauglitz G., Poster: Fluoreszenz Nanopartikel für Immunoassays mit optischen Biosensoren, 3. Biosensor Symposium, Potsdam, Germany, 2003.

Proll G., Tschmelak J., Gauglitz G.: AWACSS - Automated Water Analyser Computer Supported System, WEKNOW Web-based European Knowledge Network on Water, 1<sup>st</sup> WEKNOW Annual Conference on Drinking Water in Europe, Kuopio, Finland, October 12 - 14, 2003.

Tschmelak J., Proll G., Gauglitz G.: Biosensor fuer Propanil in Wasser, ANAKON, Konstanz, Germany, April 2 - 5, 2003.

---

Stien J., Sacher F., Brauch H.-J., Proll G., Reder S., Tschmelak J., Gauglitz G.: Erprobung und Validierung eines Online-Analysatorsystems zur Gewässerüberwachung, Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Stade, Germany, May 26 - 28, 2003.

Tschmelak J., Kumpf M., Proll G., Gauglitz G.: Biosensor fuer sieben Sulphonamide in Trink-, Grund- & Oberflaechenwasser mit komplizierter Matrix, Dresdner Sensor-Symposium DSS, Dresden, Germany, December 8 - 10, 2003.

Tschmelak J., Proll G., Gauglitz G.: Optisches Sensorsystem fuer Propanil in Wasser, Dresdner Sensor-Symposium DSS, Dresden, Germany, December 8 - 10, 2003.

Tschmelak J., Proll G., Gauglitz G.: Biosensor for propanil in water with difficult matrices, 4<sup>th</sup> European Meeting on Environmental Chemistry, Plymouth, England, December 10 - 13, 2003.

Tschmelak J., Proll G., Gauglitz G.: Automated Water Analyser Computer Supported System (AWACSS), NSYCC–NSCRC 2004 Northeast Student Chemistry Student Conference, Boston, USA, April 24, 2004.

Hua P., Hole J., Wilkinson J., Proll G., Tschmelak J., Gauglitz G., Jackson M., Nudd R., Abuknesha R., Kaiser J., Kraemmer P.: Integrated optical immunofluorescence multisensor for river pollution, EWOFS - Second European Workshop on Optical Fibre Sensors, Santander, Spain, June 9 - 11, 2004.

### 7.3 *Vorträge*

Vortrag KIWA Seminar, Utrecht, 2005

Proll G., Tschmelak J., Gauglitz G.: Automated Water Analyser Computer Supported System (AWACSS) – for unattended continuous monitoring of environmental pollution. KIWA Seminar, Utrecht, 2005.

Vortrag Analytica, München, 2004

Proll G., Tschmelak J., Gauglitz G.: Analytical Features of Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Based Immunoassays for Toxins. Analytica, München, 2004.

Vortrag EUROPT(R)ODE, Madrid, 2004

Proll G., Tschmelak J., Gauglitz G.: Automated Water Analyser Computer Supported System (AWACSS). EUROPT(R)ODE, Madrid, 2004.

Vortrag Lifecom, Düsseldorf, 2002

Proll G., Reder S., Gauglitz G.: Multianalyt-Biosensor mit Fluoreszenzdetektion zum Umweltmonitoring von Endokrinen Disruptoren in Gewässern. Lifecom, Düsseldorf, 2002.

Vortrag Bremer Colloquium, Bremen 2001

Proll G., Reder S., Gauglitz G.: Biosensoren für Toxine in Wasser. Bremer Colloquium, Bremen, 2001.

#### **7.4 Akademische Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren:

T. Adamek, F. Brümmer, G. Diekert, B. Föhlisch, T. Frischmuth, G. Gauglitz, H.-D. Görtz, P. Gräber, P. Grathwohl, W. Hauber, D. Hülser, H. Jeske, G. Jung, H.-J. Knackmus, K.-A. Kovar, U. Kull, H. Liebich, C. Mailänder, R. Mattes, H. Oberhammer, M. Reuß, P. Scheurich, R. Schmid, V. Schurig, H. Stegmann, J. Weidlein, H. Wolf, F. Wollnik.

## 7.5 *Lebenslauf*

- Name: Günther Martin Proll
- Geburtsdatum: 22.05.1974
- Geburtsort: Mutlangen
- Schulbildung: 1980 – 1994 Grundschule Mögglingen  
1984 – 1990 Realschule Heubach  
Abschluss: Mittlere Reife  
1990 – 1993 Justus-von-Liebig Aalen  
Abschluss: Fachgebundene Hochschulreife
- Wehrersatzdienst: Juli 1993 – September 1994
- Studium: 1994 – 2001 Studium der Technischen Biologie an der  
Universität Stuttgart
- Studienarbeit: Juni 1997 – Februar 1998  
Titel: Schwämme (Porifera) im Litoral des  
Westmediterrans: Bestimmungsschlüssel und Kultivierung
- Diplomprüfung: Oktober 2001
- Diplomarbeit: Februar 2001 – Oktober 2001  
unter Anleitung von Prof. Dr. Franz Brümmer,  
Biologisches Institut Abt. Zoologie, Universität Stuttgart,  
durchgeführt am Institut für Physikalische und Theoretische  
Chemie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
Titel: Gruppenspezifischer Nachweis von hormonaktiven  
Substanzen im Wasser mittels eines fluoreszenzbasierten  
Immunosassays (TIRF)
- Promotion: November 2001 – Februar 2005  
unter Anleitung von Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut  
für Physikalische und Theoretische Chemie,  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
Titel: Biosensorsystem für vollständig automatisierte  
ultra-sensitive Multianalyt-Immunoassays