

Multidimensionale Biosensoren zur wirkungsbezogenen Analytik von cyanobakteriellen Toxinen

Förderungszeitraum: 01.07.2005-30.06.2006

*Dipl.-Chem. S. Fabel, PD Dr. M.G. Weller, o. Univ.-Prof. R. Nießner
Technische Universität München, Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie,
Marchioninstr. 17, 81377 München*

1. Einleitung

Die Analyse von cyanobakteriellen Toxinen wird durch ihre Vielfalt und Komplexität erschwert. Oft bleiben diese Toxine unerkant, da es an Standards für den analytischen Nachweis mangelt. Microcystine beispielsweise sind von Cyanobakterien gebildete cyclische Heptapeptide, die durch Strukturvariationen in großer Heterogenität auftreten. Als starke Tumorpromotoren und akute Lebergifte stellen sie eine ernstzunehmende Beeinträchtigung der Trinkwasserqualität dar. Eine analytische Bestimmung ist schwierig, da nur wenige Microcystine als Standards zur Verfügung stehen. Eine immunologische Detektionsmethode mit einem gegen eine besonders seltene, für diese Toxine typische Aminosäure gerichteten Antikörper erlaubt es, die Klasse der Microcystine mit hoher Selektivität zu bestimmen [1]. Neben den Microcystinen produzieren Cyanobakterien aber noch eine Vielzahl anderer Peptide, deren biologische Wirkung oftmals nicht oder nur unzureichend bekannt ist.

Die allgemeine Vorgehensweise zur Abschätzung der Giftigkeit einer Umweltprobe beinhaltet die Durchführung von Biotests [2]. Anschließend wird üblicherweise durch eine klassische analytische Methode wie GC oder HPLC die chemische Zusammensetzung der Probe untersucht. Die Schwierigkeit besteht nun darin, die toxische Wirkung des Gemisches mit der Zusammensetzung aus den einzelnen Komponenten in Zusammenhang zu bringen. Die toxikologische Einschätzung der Probe anhand der stofflichen Zusammensetzung kann aber fehlschlagen, wenn Hauptkomponenten oder aktive Metaboliten wegen fehlender Standardreagenzien wie bei den Microcystinen unerkant bleiben. Die totale chemische Analyse ist kostenintensiv, zeitaufwendig und im Spurenbereich aufgrund der enormen Komplexität unmöglich. Üblicherweise wird eine Flut an größtenteils irrelevanten Daten produziert. Auch die Toxizitätstests mit lebenden Organismen haben ihre Nachteile. Die Durchführung benötigt Stunden, wenn nicht gar Tage. Daher können Ergebnisse nicht zeitnah gewonnen werden. Aus den Biotests können auch selten individuelle Informationen über die Substanzen gewonnen werden, die den toxischen Effekt verursacht haben, sondern nur Summenparameter bestimmt werden. Je nach Metabolismus der Testorganismen können die Ergebnisse speziesabhängig sehr unterschiedlich sein.

Eine sinnvolle Verflechtung von chemischer Analyse und Toxizitätstests liefert die wirkungsbezogene Analytik [3,4]. Das Prinzip der wirkungsbezogenen Analytik ist aus der pharmazeutischen Wirkstoffforschung bekannt. Potentielle Schadstoffe können durch eine wirkungsbezogene Detektion im Chromatogramm lokalisiert werden. Durch eine Kombination mit instrumentellen Methoden kann deren Identität aufgeklärt werden und im Falle von verfügbaren Standards eine einzelne Quantifizierung erfolgen. Für die Verknüpfung von chemischer Trennung und toxikologischer Erkennung gibt es in der praktischen Umsetzung verschiedene Möglichkeiten [5], die ähnlich zu immunochromatographischen Methoden sind [6]. Anstelle von Antikörpern werden Reagenzien mit toxikologischer Relevanz, wie zum Beispiel Enzyme oder Rezeptoren angewendet, um durch eine biomolekulare Interaktion einen potentiellen toxischen Effekt anzuzeigen. So konnten beispielsweise mit Hilfe eines Proteinphosphatasesetests, der off-line nach einer chromatographischen Trennung durchgeführt wurde, Microcystine aufgrund ihres Inhibitionssignals erfasst werden [7]. Um einen umfassenderen toxischen Aspekt abzudecken, wäre es auch denkbar, Zellen oder Mikroorganismen in ein Analysensystem einzubinden.

Eine multidimensionale wirkungsbezogene Untersuchung kann durch den Einsatz mehrerer Targets von verschiedenen toxikologischen Effekten durchgeführt werden, indem diese parallel nebeneinander in Biosensoren eingesetzt werden.

Für den Einsatz in der wirkungsbezogenen Analytik sollten die Biosensoren kontinuierlich messen können. Das biomolekulare Target muss dafür nicht notwendigerweise auf einer Oberfläche immobilisiert sein, wie im Sinne der herkömmlichen Definition von Biosensoren. Im Fall der wirkungsbezogenen Analytik hätte die Immobilisierung von Targets, die irreversibel an Analyten binden, nachteilige Auswirkungen auf die Leistung des Detektors, da die Kapazität des Messsystems laufend verändert werden würde. Daher konzentrierten sich die Arbeiten im geförderten Projekt auf die Entwicklung eines kontinuierlich messenden Enzyminhibitionsdetektors, der auf einer homogenen Testdurchführung basiert. Verschiedene homogene Enzyminhibitionsdetektoren gekoppelt an einfache chromatographische Trennungen sind in der Literatur beschrieben worden [8-10]. Anwendungen mit einem Einsatz der empfindlichen Proteinphosphatasen als Targets oder Verwendung in einer multidimensionalen wirkungsbezogenen Analyse sind aber bisher unbekannt.

2. Experimenteller Aufbau

Zur Durchführung einer wirkungsbezogenen Analyse von Wasserproben wurde ein fluidisches System aufgebaut, bei dem ein Enzyminhibitionsdetektor einen möglichen toxischen Effekt anzeigt. Parallel dazu wurden mit einem Elektrosprayionisierungs-Flugzeit-Massenspektrometer (ESI-TOF-MS) die zugehörigen Massenspuren aufgenommen und mit einem Photodiodenarray-Detektor (PDA) die entsprechenden Spektren im UV-Vis-Bereich erfasst (siehe Abbildung 1).

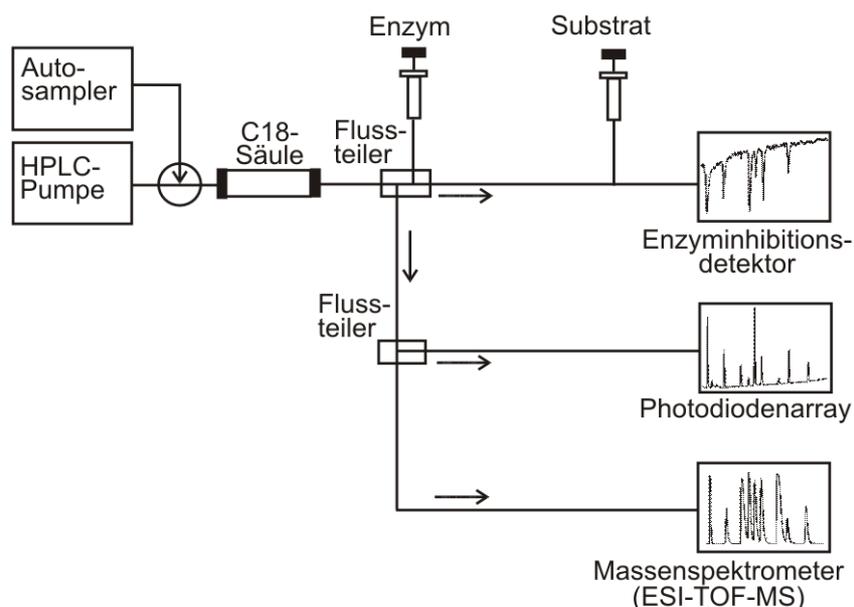


Abbildung 1: Aufbau des fluidischen Systems zur wirkungsbezogenen Analytik mit paralleler Detektion der Enzyminhibition, spektralen Absorption und Massenspektren.

Als Modellsystem wurde ein Enzyminhibitionsdetektor mit Acetylcholinesterase [11] als Zielmolekül konstruiert, mit dem potentiell neurotoxische Schadstoffe identifiziert werden konnten. Vorteil dieses Enzyms ist eine hohe Umsatzzahl, die die benötigten Reaktionszeiten kurz hält. Die Enzyminhibition wurde homogen in Reaktionskapillaren durchgeführt. Enzymlösung wurde zum Eluat der chromatographischen Trennung gepumpt. Nach einer gewissen Inhibitionszeit, die durch das Volumen der Reaktionskapillare und die Fließgeschwindigkeit definiert wurde, wurde eine Lösung des Substrats zudosiert. Der Umsatz des Substrats wurde optisch detektiert und ließ direkte Rückschlüsse auf die verbliebene Aktivität des Enzyms zu. Als Substrat wurde einerseits

Acetylthiocholiniodid (ATCI) verwendet, das nach enzymatischer Hydrolyse zusammen mit Dithionitrobenzoesäure (DTNB) nach Ellman [12] das chromogene Produkt Thionitrobenzoat (TNB) erzeugt, dessen Absorption bei 412 nm detektiert wird. Als weiteres Substrat wurde auch 7-Acetoxy-1-methyl-chinoliniumiodid (AMQI) verwendet [13]. Nach enzymatischem Substratumsatz wurde die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 403 nm und einer Emissionswellenlänge von 502 nm gemessen. Im Chromatogramm des Enzyminhibitionssignals wurde jeweils bei der Anwesenheit von Inhibitoren ein negativer Signalausgang durch eine Reduzierung der Enzymaktivität erzeugt.

Neben den on-line durchgeführten Messungen der Acetylcholinesteraseinhibition wurden weitere Targets einer wirkungsbezogenen Analytik off-line untersucht, indem das Eluat der chromatographischen Trennung mit einem Fraktionensammler auf eine Mikrotiterplatte gegeben wurde. So konnten Inhibitionschromatogramme von Proteinphosphatasen und Leuchtbakterien aufgenommen werden.

3. Ergebnisse

Dass es bisher nur wenige Arbeiten zum Thema wirkungsbezogene Analytik mit homogen durchgeführten On-line-Enzyminhibitionsdetektoren gibt, liegt an den fundamentalen physikalischen Eigenschaften der Nachsäulendetektion. Die größte Schwierigkeit besteht darin, die Bandenverbreiterung aufgrund des laminaren Flusses in den Reaktionskapillaren zu begrenzen.

Um für ein System vorherzusagen, ob laminare oder turbulente Strömungen vorherrschen, kann die Reynoldszahl N_R nach Gleichung 1 berechnet werden, wobei die lineare Fließgeschwindigkeit v [m/s], die Dichte des Mediums ρ [kg/m³], der Radius der Kapillare r [m] und die dynamische Viskosität μ [kg/m·s] einbezogen werden.

$$N_R = \frac{2 \cdot v \cdot \rho \cdot r}{\mu} \quad \text{Gleichung 1}$$

Für ein System mit Reaktionskapillaren mit einem Innendurchmesser von 500 μm ($r = 2.5 \cdot 10^{-4}$ m) und mit gegebener Fließgeschwindigkeit von 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ ($v = 8.48 \cdot 10^{-3}$ m/s) berechnet sich die Reynoldszahl unter der Annahme von Dichte und Viskosität des Mediums von Wasser bei 20°C ($\rho = 998$ kg/m³, $\mu = 1.02 \cdot 10^{-3}$ kg/m·s) zu $R = 4$. Damit herrschen bei den vorgegebenen Parametern mit Sicherheit laminare Strömungen vor. Erst bei einer Höhe von $N_R = 2000$ (ab ca. $v = 48$ mL/min) befände sich das fluidische System in einem kritischen Bereich, bei dem ein Umschlagen des Strömungsprofils zu einem turbulenten Fluss möglich würde. Davon war das aufgebaute System des Enzyminhibitionsdetektors jedoch weit entfernt. Durch die laminare Strömung bildete sich ein parabolisches Flussprofil innerhalb der Reaktionskapillaren aus. Die Konsequenzen sind eine unerwünschte longitudinale Dispersion und eine sehr geringe radiale Dispersion, die aber für das Zudosieren von Reaktionslösung erwünscht wäre. Ein resultierendes Chromatogramm des Enzyminhibitionsdetektors ist in Abbildung 2 gezeigt. Aufgrund der erheblichen Bandenverbreiterung wird eine Bestimmung von Nachweisgrenzen für Einzelsubstanzen unmöglich. Da ein wirkungsbezogener Detektor mit Proteinphosphatasen aufgrund niedriger Umsatzzahlen längere Reaktionszeiten und damit längere Reaktionsschleifen erforderlich macht, ist bei diesem Detektionssystem dann mit einer zusätzlichen Verschlechterung in der Auflösung zu rechnen.

Das Problem der Bandenverbreiterung durch longitudinale Dispersion ist bei Nachsäulen-Reaktoren für die Chromatographie wohlbekannt [14]. Verschiedene Lösungsansätze, wie gestrickte Reaktoren, Festbettreaktoren und Reaktoren mit segmentiertem Fluss wurden in der Literatur beschrieben. Überblicke über moderne Nachsäulenreaktionstechniken sind selten. Ein Grossteil der Literatur wurde in den siebziger und achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts veröffentlicht. Da erst in den letzten Jahren aufgrund des apparativen Fortschritts mikrofluidische Anwendungen möglich geworden sind, sind die in dieser Literatur beschriebenen Ansätze meist bei höheren Flussraten durchgeführt worden. Gerade in der wirkungsbezogenen Analytik, bei der mit wertvollen Biomolekülen gearbeitet wird, ist aber aus Kostengründen eine Miniaturisierung des fluidischen Aufbaus anzustreben. Durch die Anwendung von Flussraten im Bereich von Mikrolitern pro Minute konnte beispielsweise gezeigt werden, dass gestrickte Reaktionsschleifen keinen vorteilhaften Einfluss auf die Leistung des Nachsäulendetektors haben (siehe Abbildung 3).

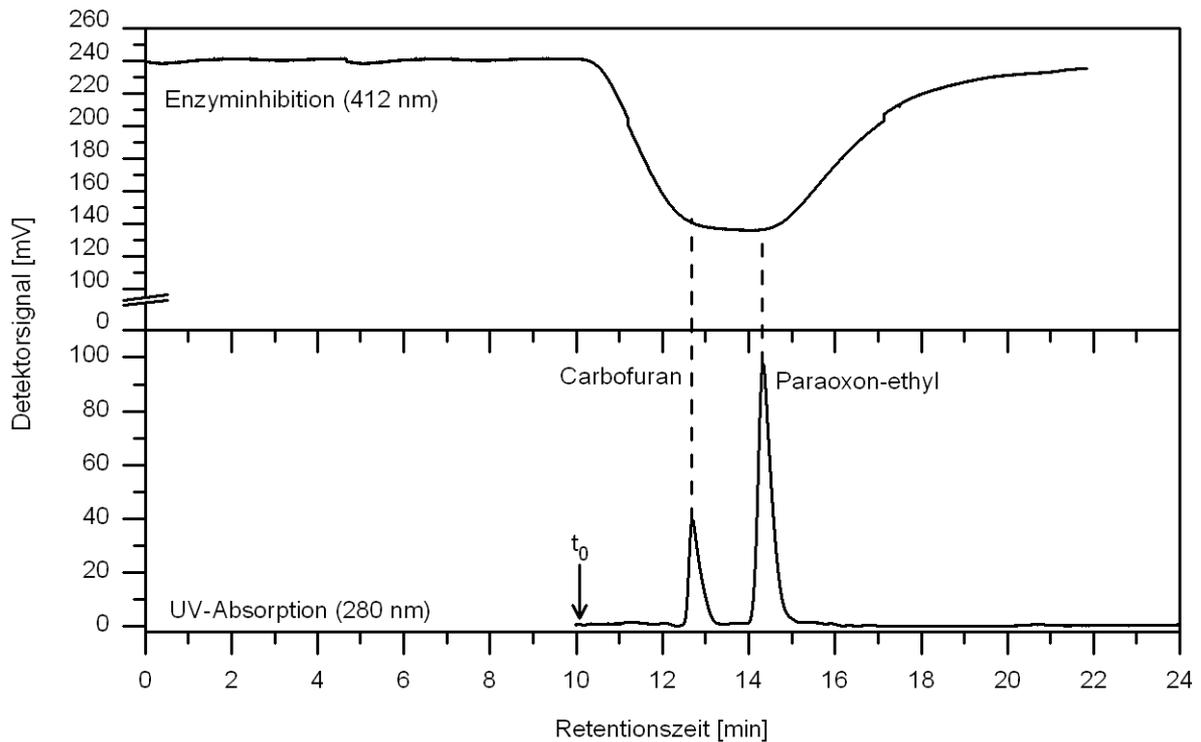


Abbildung 2: Longitudinale Dispersion im Enzyminhibitionsdetektor mit offenen Reaktionsschleifen führte zum Verlust der in der chromatographischen Trennung gewonnenen Auflösung. Ein Gemisch zweier Insektizide wurde isokratisch über eine C18-Säule getrennt. Acetylcholinesterase-Lösung, Substrat ATCI und Reagenz DTNB führten in insgesamt 6 m langen Reaktionskapillaren mit einem Innendurchmesser von 530 μm und einer Flussrate von ca. 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ zum Inhibitionssignal (oben). Parallel dazu wurde die UV-Absorption der Analyten detektiert (unten).

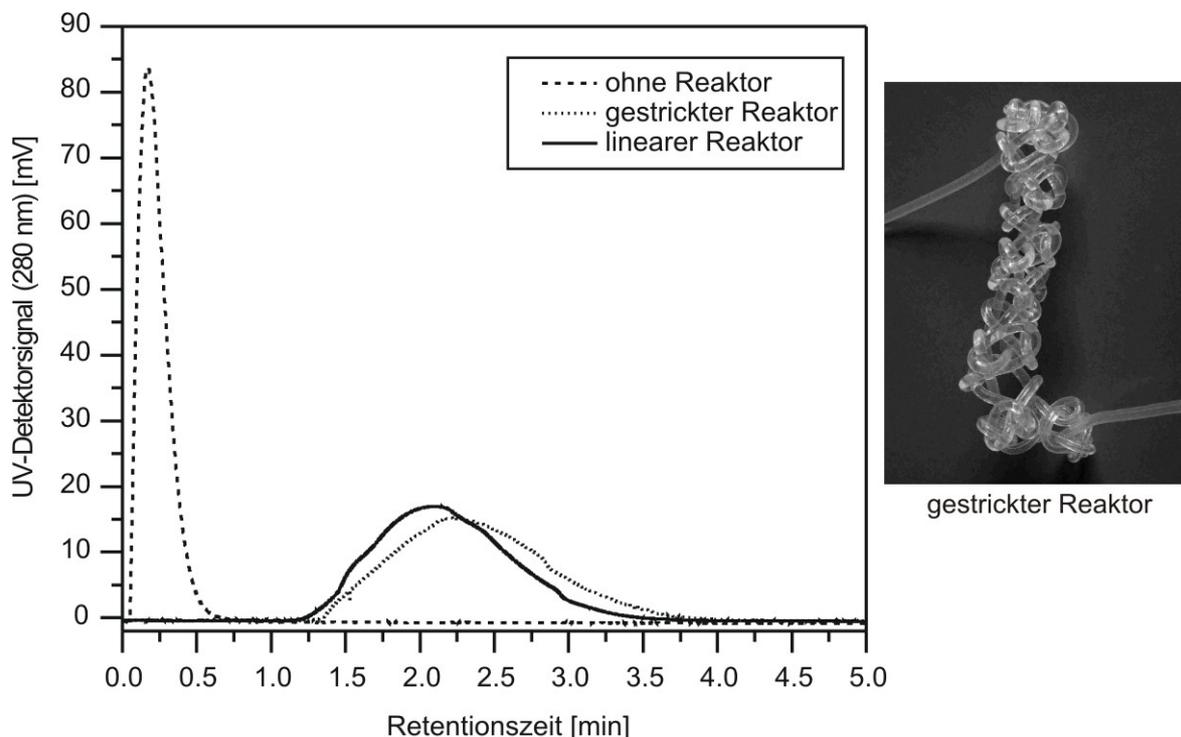


Abbildung 3: Vergleich der Dispersion von linearer und gestrickter Reaktionskapillare (jeweils 1 m Teflonschlauch mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm). Ein bei 280 nm absorbierender Analyt wurde in einen Trägerstrom von 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ eingebracht. Im Vergleich zur Dispersion ohne Anwendung eines Reaktors zeigen beide Reaktortypen eine erhebliche Bandenverbreiterung.

Zur Verringerung der Dispersion im Enzyminhibitionsdetektor wurde daher eine Segmentierung angewendet. Um zu vermeiden, dass Analyt in die Segmentierungsflüssigkeit in Form einer Flüssig-flüssig-Extraktion überführt wird, schied eine Flüssigkeitssegmentierung aus. Daher wurden Gasblasen in Glaskapillaren zur Segmentierung eingespeist (Abbildung 4, a). Die Gassegmentierung wurde von Skeggs 1957 für die Fließinjektionsanalyse eingeführt [15]. Es bilden sich einzelne Reaktionsvolumen aus, die die longitudinale Dispersion chromatographisch getrennter Analyten während des Durchflusses durch die Inhibitionsschleife und Substratumsatzschleife des wirkungsbezogenen Detektors verringern. Durch die Segmentierung wurde zudem die radiale Dispersion in den Kapillaren durch die sogenannte Bolus-Zirkulation verbessert, womit die Vermischung von Enzymlösung und Eluat und später das Zudosieren von Substratlösung im Vergleich zum nicht segmentierten Fluss verbessert wurde (Abbildung 4, b).

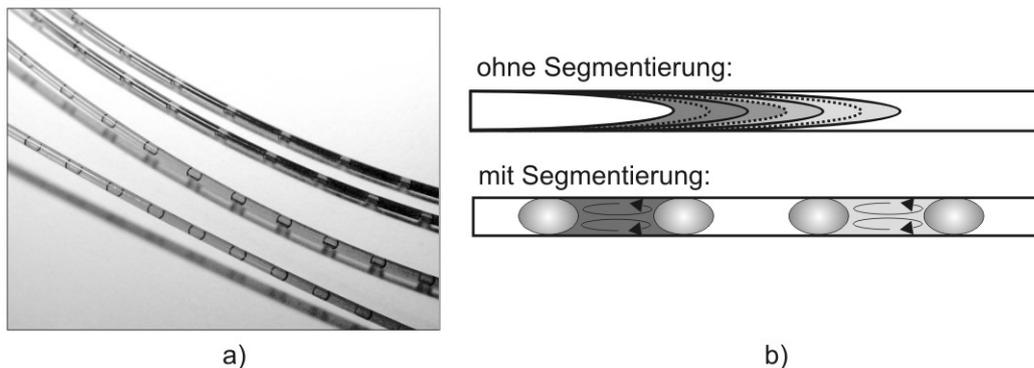


Abbildung 4: Die longitudinale Dispersion im Enzyminhibitionsdetektor wurde durch Einsatz eines gassegmentierten Reaktors entscheidend verringert.

a) Gasblasen zur Segmentierung in einer Glaskapillare mit einem Aussendurchmesser von 660 μm und einem Innendurchmesser von 530 μm . Die Gasblasen wurden mit ca. 5 Hz eingespeist.
b) Oben: Schematische Darstellung der longitudinalen Vermischung zweier Analyten (in verschiedenen Grautönen dargestellt) durch Ausbildung eines parabolischen Strömungsprofils.
Unten: Ausbildung einzelner Reaktionsvolumina durch Segmentierung. Eine Vermischung zweier Analyten, die durch Gassegmente räumlich getrennt sind, ist stark reduziert. Durch die Segmentierung wird eine Bolus-Strömung induziert, die das Durchmischen innerhalb eines Flüssigkeitssegments unterstützt.

Zu Beginn wurden die Gasblasen mit einer Ventilschaltung eingespeist. Im Laufe verschiedener Optimierungsverfahren zeigte sich jedoch, dass eine höhere Frequenz der Segmentierung erforderlich war, um eine bestmögliche Auflösung im Enzyminhibitionsdetektor zu erhalten. Die Gasblasen wurden daher mit einer Frequenz von 5 Hz eingespeist. Das Volumen der Flüssigsegmente betrug $\sim 0.5 \mu\text{L}$. Durch die hochfrequente Segmentierung wurde jedoch die Detektion der Absorption bzw. Fluoreszenz des enzymatischen Substratumsatz gestört. Gasblasen in der Detektorzelle führten zu Reflexionen und machten ein Auswerten des Signals unmöglich. Daher mussten die Gasblasen vor Eintritt in die Detektorzelle entfernt werden. Dazu wurden verschiedene Blasenfiltertypen in der institutseigenen Werkstatt konstruiert (Abbildung 5).

Die zu Beginn konstruierten Trennverfahren von Gas- und Flüssigphase nutzten die größere Verformungsenergie von Gasblasen im Vergleich zu Flüssigsegmenten beim Durchtritt durch enge Kanäle. Dazu wurde ein T-Stück mit verschiedenen großen Bohrungen angefertigt, die einen bevorzugten Durchfluss von Gasblasen durch den größeren Kanal gewährleisten sollten.

Da das System jedoch sehr anfällig gegenüber kleinsten Druckschwankungen im System war, wurden Blasenfiltermodelle mit Insertion einer Membran konstruiert, um eine stabileres und effizienteres Abtrennen der Gasblasen zu erreichen. Der apparative Aufwand war jedoch sehr groß, da jeweils zwei Pumpen an Gas- und Flüssigkeitsausgang benötigt wurden, um die Druckregulierung für eine effiziente Separation von Gas und Flüssigkeit zu erreichen. Zusätzlich verstopften die Membranfilter nach kurzer Zeit. Daher wurde in der optimierten Form des Blasenfilters ein offenes System erstellt, bei dem auf eine störanfällige Membran verzichtet werden konnte. Die unter leichtem Druck stehenden Gasblasen können beim Passieren einer Rinne einfach in die Atmosphäre entweichen (Abbildung 5, c).

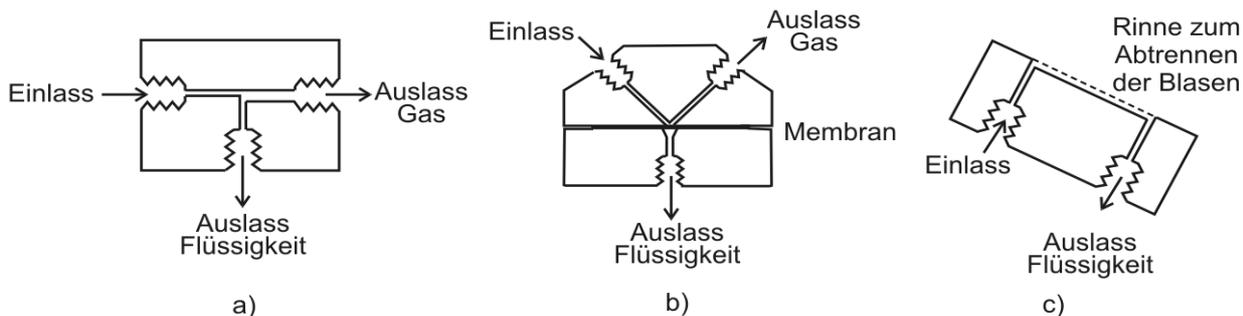


Abbildung 5: Verschiedene Prototypen zum Abtrennen der Gassegmente vor der Detektorzelle wurden konstruiert. a) T-Stück mit verschiedenen großen Bohrungen. b) Y-Stück mit Membran. c) offenes System zum Entweichen der Gasblasen, bevor die Flüssigkeit in die Detektorzelle gesaugt wird.

Ein detailliertes Flussschema des segmentierten Enzyminhibitionsdetektors in seiner optimierten Form ist in Abbildung 6 gezeigt. Die Einspeisung der Luftsegmente erfolgte über eine Schlauchpumpe. Die von Gasblasen befreite Flüssigkeit wurde durch Spritzenpumpen im Pendelbetrieb in die Detektorzelle gesaugt.

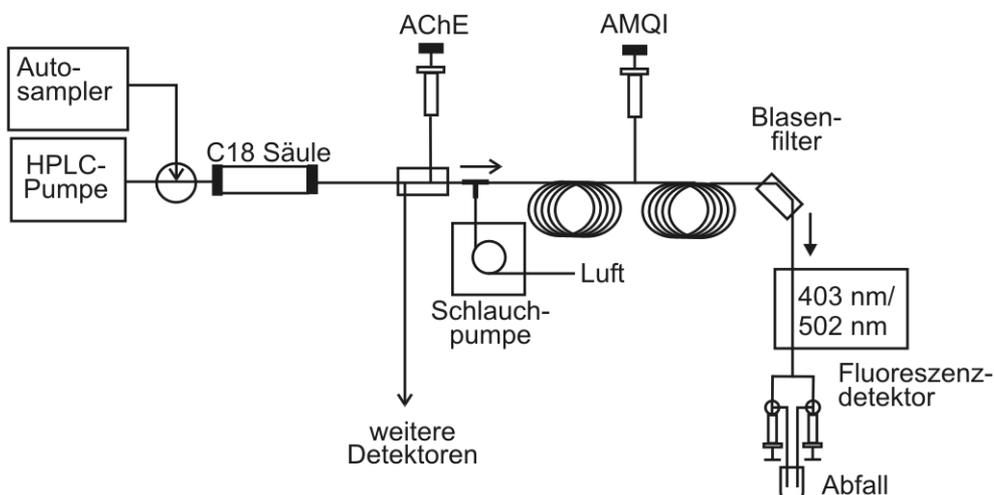


Abbildung 6: Optimierter Aufbau des *Segmented Flow Enzyme Inhibition Detector* (SFEID) im Detail. Es wurde der in Abbildung 5 gezeigte Blasenfilter c) verwendet. Die Reaktionskapillare für die Enzyminhibition hatte eine Länge von 4 m, die Reaktionskapillare für den Umsatz des Substrats hatte eine Länge von 2 m. Die Fließgeschwindigkeit des segmentierten Flusses im Enzymreaktor betrug ca. 150 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Mit diesem Aufbau ist es möglich, komplexe Substanzgemische wirkungsbezogen zu analysieren (siehe Abbildung 7). Eine Wasserprobe wurde mit acht Insektiziden versetzt und chromatographisch mit einem Gradienten aufgetrennt. Da das Eluat zehnfach durch Enzympuffer verdünnt wurde, ist der Effekt der mobilen Phase auf die eingesetzte Acetylcholinesterase gering. Parallel wurden Daten mit dem SFEID, MS und PDA aufgenommen. Für die Auswertung der wirkungsbezogenen Analyse musste die zeitliche Verschiebung der Chromatogramme aufgrund der Reaktionszeit im Enzyminhibitionsdetektor korrigiert werden. Dazu wurde zusätzlich zu dem Insektizidgemisch der Acetylcholinesteraseinhibitor Galanthamin zur Probe dazugegeben, welches unter den chromatographischen Bedingungen nicht auf der Trennsäule retardiert wurde und folglich im Totvolumen eluierte. Anhand eines Vergleichs der Retentionszeiten von Galanthamin im PDA und MS zur Retentionszeit im SFEID, konnte der zeitliche Abstand ermittelt werden und die Chromatogramme übereinandergelegt werden. In Abbildung 7 betrug die zeitliche Verschiebung 8.1 min. Somit fand die Inhibition in ca. 5.4 min und die Umsetzung des Substrats in ca. 2.7 min statt.

Eine Analyse der Halbwertsbreiten der verschiedenen Detektorsignale zeigte, dass die experimentell bestimmten Halbwertsbreiten des PDA-Detektors um durchschnittlich 50% geringer waren, als die Halbwertsbreiten des SFEID-Signals. Dies bedeutet zwar immer noch eine Verringerung der Auflösung um einen Faktor zwei vom PDA zum biochemischen Detektor hin, dennoch ist es eine erhebliche Verbesserung, im Vergleich zu den Ergebnissen ohne Segmentierung oder mit gestricktem Reaktor.

Am Beispiel des Organophosphoresters Dichlorvos wird das Potential einer wirkungsbezogenen Analyse verdeutlicht. Mit konventionellen Detektoren schwer zu erfassende Substanzen können durch ihre biologische Wirkung nachgewiesen werden. Da Dichlorvos nur eine isolierte Doppelbindung hat, zeigt es eine nur sehr geringe Absorption im UV-Vis-Bereich und die Nachweisgrenze beträgt mit dem PDA bezogen auf ein Injektionsvolumen von 20 μL nur 40 ng. Im SFEID ist die Nachweisgrenze des starken Acetylcholinesteraseinhibitors dagegen um einen Faktor zehn niedriger und beträgt 4 ng (Abbildung 7, Peak 4).

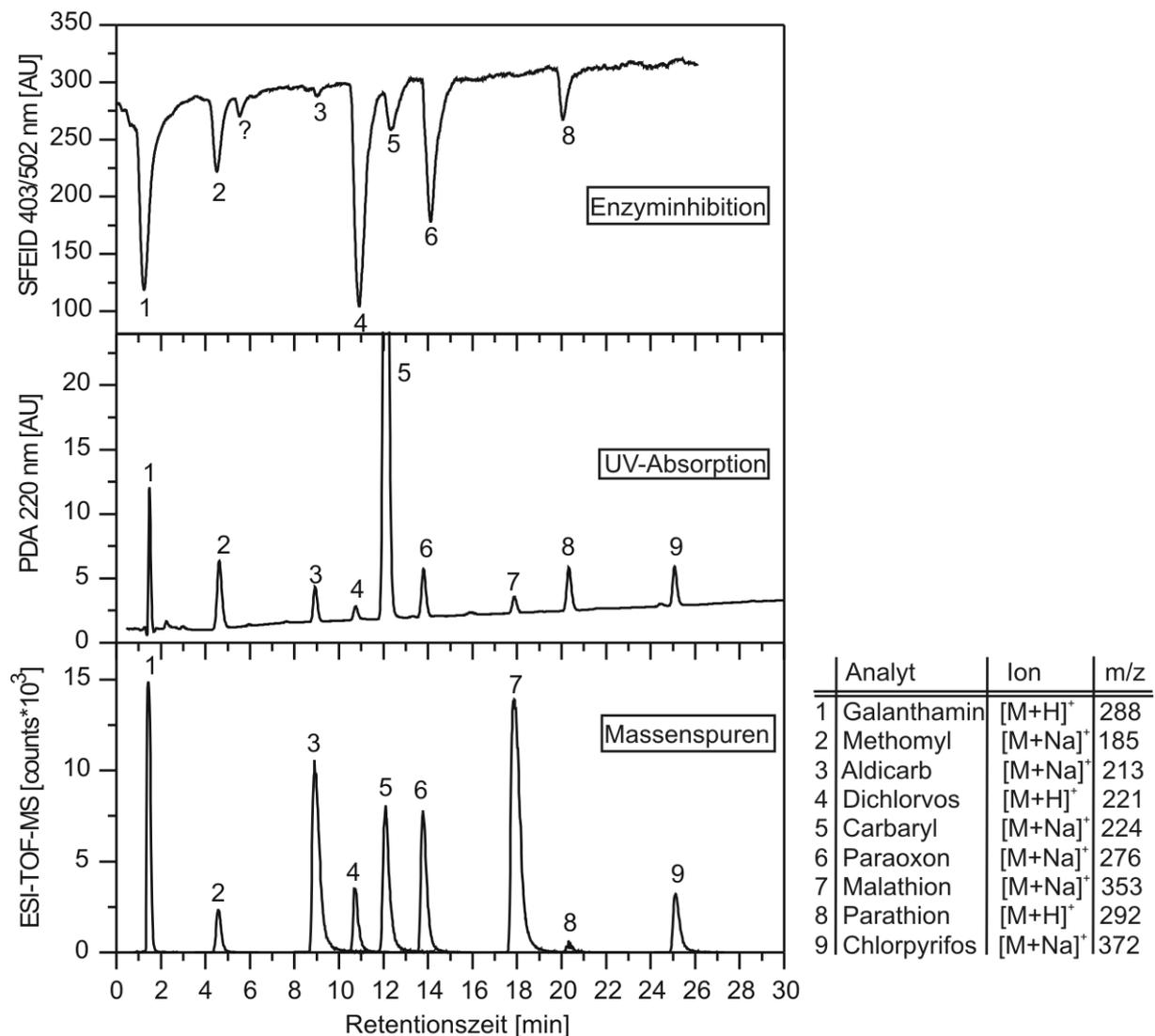


Abbildung 7: Dargestellt sind die Chromatogramme einer wirkungsbezogenen Analyse eines komplexen Substanzgemisches. Mit einem Methanol-Wasser-Gradienten wurden neun Analyten (siehe Tabelle rechts) auf einer C-18-Säule getrennt. Parallel zu ihren inhibitorischen Effekten auf Acetylcholinesterase (oben) wurden die UV-Absorption (Mitte) und Massenspuren (unten) aufgezeichnet. Die Konzentration der Analyten betrug in der Mischung jeweils 20 mg/L. Es wurden 20 μL injiziert.

Mit dem vorgestellten Enzyminhibitionsdetektor wurde ein methanolischer Extrakt von Cyanobakterien *Anabaena flos-aquae* auf seine inhibitorische Wirkung gegen Acetylcholinesterase untersucht. Die gefriergetrocknete Blaualgenprobe wurde freundlicherweise von Dr. Peter Henriksen, Institut für Meeresforschung, Dänemark zur Verfügung gestellt und enthielt eine unbekannte Menge an Anatoxin-a(S) [16]. Der methanolische Extrakt wurde mit zwei Insektiziden Carbofuran und Paraoxon versetzt, um über deren bekannte Retentionszeit eine Übereinanderlagerung von UV-Absorption und Enzyminhibitionssignal vollziehen zu können. Da Anatoxin-a(S) sehr hydrophil ist, konnte es auf der C18-Säule nicht retardiert werden. Ein Inhibitionssignal konnte dem Totvolumen der Säule zugeordnet werden. Obgleich Anatoxin-a(S) unter diesen Bedingungen nicht chromatographiert wurde, ist ein Indiz auf anwesende Neurotoxine vorhanden. Ob nicht noch andere im Extrakt enthaltene Substanzen wie z.B. Ionen für den inhibitorischen Effekt verantwortlich waren, könnte nur durch eine chromatographische Auflösung aufgeklärt werden. Zum Zeitpunkt der Messung stand leider das Massenspektrometer als weiterer aufklärender Detektor nicht zur Verfügung. Die chromatographische Trennung mit einer Umkehrphasen-HPLC konnte im Berichtszeitraum nicht verwirklicht werden. Gerade weil die chromatographische Reinigung von Anatoxin-a(S) so schwierig ist, ist das Toxin nicht als Standard erhältlich und die analytische Bestimmung problematisch.

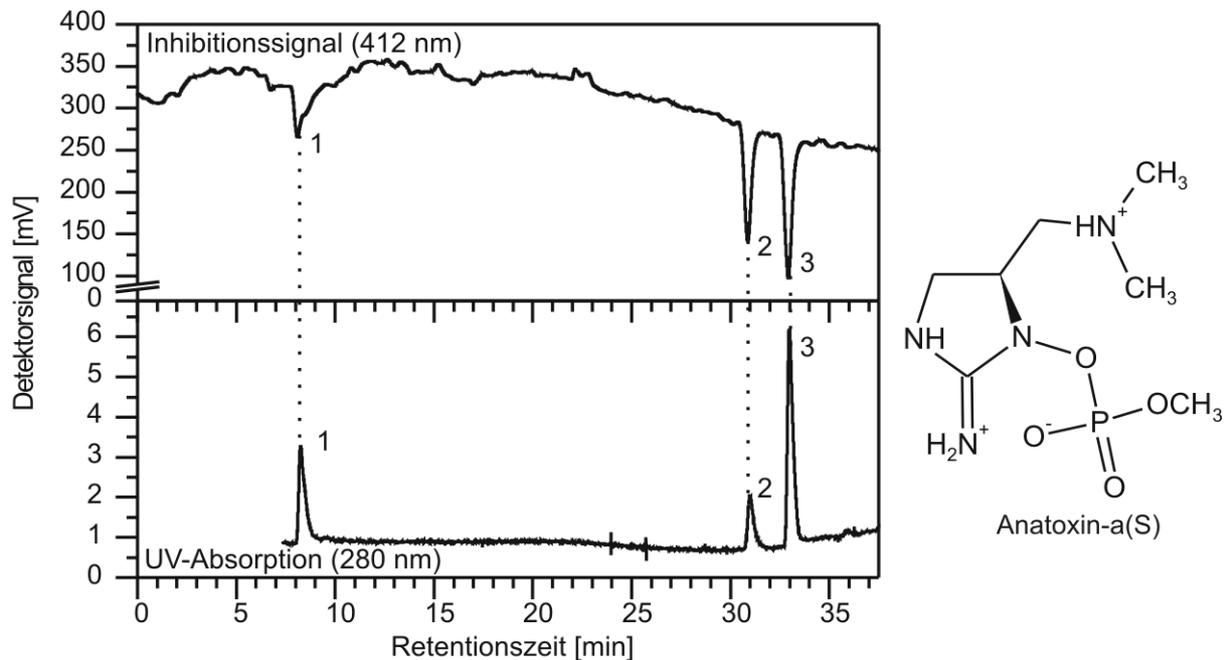


Abbildung 8: Ein methanolischer Extrakt der Cyanobakterien *Anabaena flos-aquae* wurde mit Carbofuran (2) und Paraoxon-ethyl (3) versetzt. Im UV-Detektor wurde eine nicht retardierende Bande (1) erfasst, die eine inhibitorische Wirkung auf Acetylcholinesterase zeigte. Da jedoch keine Retention an der C18-Säule stattgefunden hatte, konnte die Inhibition nicht mit Sicherheit dem Anatoxin-a(S) (siehe Struktur rechts) alleine zugeordnet werden.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen des geförderten Projekts wurde ein Biosensor für die wirkungsbezogene Analyse von Toxinen entwickelt [17]. Der kontinuierlich messende Detektor basierte auf der Hemmung von Acetylcholinesterase, um möglicherweise neurotoxisch wirkende Schadstoffe anzuzeigen. Um die Betriebskosten des Aufbaus zu reduzieren, wurden die verwendeten Reagenzien im Bereich von Mikrolitern pro Minute zudosiert. Aufgrund der daraus resultierenden fluidmechanischen Gegebenheiten, musste der an ein LC-System gekoppelte Enzyminhibitionsdetektor hinsichtlich der Peakverbreiterung optimiert werden. Durch die Dispersion der Analyten wurde die Selektivität und Sensitivität der wirkungsbezogenen Analyse reduziert. Eine Bestimmung der Nachweisgrenzen für Einzelsubstanzen war nicht möglich.

Durch die Einführung einer Luftsegmentierung konnte jedoch die Auflösung verbessert werden. Substanzgemische konnten mit dem entwickelten System anschliessend an eine Gradiententrennung wirkungsbezogen untersucht werden und Nachweisgrenzen von einzelnen Insektiziden exemplarisch bestimmt werden. Die Identifikation der detektierten Hemmstoffe konnte durch eine parallele massenspektrometrische Datenaufnahme unterstützt werden.

In Zukunft soll das hier vorgestellte System auf eine wirkungsbezogene Analytik von Microcystinen durch den Einsatz von rekombinant hergestellten Proteinphosphatasen als Zielmolekül erweitert werden. Nur eine rekombinante Produktion der benötigten Enzyme ermöglicht eine in ihren Kosten vertretbare wirkungsbezogene Analyse mit dem vorgestellten System.

Für eine multidimensionale wirkungsbezogene Analyse müssen mehrere Messkanäle parallel erfasst werden können. Dies erfordert die Konstruktion eines Kapillardetektors, der ohne Entfernen der Segmentierungsblasen auskommt, um den apparativen Aufbau zu vereinfachen. Um möglichst vielseitig in den anwendbaren Zielverbindungen für eine wirkungsbezogene Analyse zu sein, sollten neben Laser-induzierten Fluoreszenzmessungen auch Bio- und Chemielumineszenzmessungen möglich sein.

Danksagung

Die Autoren danken der Max-Buchner-Forschungstiftung und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF 02WU0331), die durch ihre finanzielle Unterstützung die vorgestellte Arbeit ermöglicht haben. Dank gilt auch PD Dr. T.T. Bachmann und Dr. H. Schulze, Universität Stuttgart, für die Überlassung von rekombinanter Acetylcholinesterase aus *Nippostrongylus brasiliensis*.

Literatur

- [1] A. Zeck, M.G. Weller, R. Niessner: Generic Microcystin Immunoassay based on Monoclonal Antibodies against ADDA, *Analyst* **126** (2001) 2002-2007.
- [2] M. Farré, D. Barceló: Toxicity Testing of Wastewater and Sewage Sludge by Biosensors, Bioassays and Chemical Analysis, *Trends Anal. Chem.* **22** (2003) 299-310.
- [3] W. Brack: Effect-directed Analysis: A Promising Tool for the Identification of Organic Toxicants in Complex Mixtures?, *Anal. Bioanal. Chem.* **377** (2003) 397-407.
- [4] U. Bilitewski, G. Brenner-Weiss, P.D. Hansen, B. Hock, E. Meulenber, G. Müller, U. Obst, H. Sauerwein, F.W. Scheller, R. Schmid, G. Schnabl, F. Spener: Bioresponse-linked Instrumental Analysis, *Trends Anal. Chem.* **19** (2000) 428-433.
- [5] G. Brenner-Weiss, U. Obst: Approaches to Bioresponse-linked Instrumental Analysis in Water Analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* **377** (2003) 408-416.

- [6] M.G. Weller: Immunochromatographic Techniques – a Critical Review, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **366** (2000) 635-645.
- [7] A. Zeck, M.G. Weller, R. Niessner: Multidimensional Biochemical Detection of Microcystins in Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* **73** (2001) 5509-5517.
- [8] T. Schenk, N. Appels, D.A. van Elswijk, H. Irth, U.R. Tjaden, J. van der Greef: A Generic Assay for Phosphate-consuming or -releasing Enzymes Coupled on-line to Liquid Chromatography for Lead Finding in Natural Products, *Anal. Biochem.* **316** (2003) 118-126.
- [9] D.A. van Elswijk, O. Diefenbach, S. van der Berg, H. Irth, U.R. Tjaden, J. van der Greef: Rapid Detection and Identification of Angiotensin-converting Enzyme Inhibitors by on-line Liquid Chromatography-Biochemical Detection, Coupled to Electrospray Mass Spectrometry, *J. Chrom. A.* **1020** (2003) 45-58.
- [10] K. Ingkaninan, C.M. de Best, R. van der Heijden, A.J.P. Hofte, B. Karabatak, H. Irth, U.R. Tjaden, J. van der Greef, R. Verpoorte: High-performance Liquid Chromatography with on-line Coupled UV, Mass Spectrometric and Biochemical Detection for Identification of Acetylcholinesterase Inhibitors from Natural Products, *J. Chrom. A.* **872** (2000) 61-73.
- [11] H. Schulze, S. Vorlová, F. Villatte, T.T. Bachmann, R.D. Schmid: Design of Acetylcholinesterases for Biosensor Applications, *Biosens. Bioelectron.* **18** (2003) 201-209.
- [12] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R.M. Featherstone: A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity, *Biochem. Pharmacol.* **7** (1967) 88-95.
- [13] I.K. Rhee, N. Appels, T. Luijendijk, H. Irth, R. Verpoorte: Determining Acetylcholinesterase Inhibitory Activity in Plant Extracts Using a Fluorimetric Flow Assay, *Phytochem. Anal.* **14** (2003) 145-149.
- [14] B. Lillig, H. Engelhardt: Fundamentals of Reaction Detection Systems in I.S. Krull (Hrsg.): Reaction Detection in Liquid Chromatography, Marcel Dekker, New York, USA (1986) 1-61.
- [15] L.T. Skeggs: Persistence ... and Prayer: From the Artificial Kidney to the AutoAnalyzer, *Clin. Chem.* **46** (2000) 1425-1436.
- [16] P. Henriksen, W.W. Carmichael, J.S. An, O. Moestrup: Detection of an Anatoxina(S)-like Anticholinesterase in Natural Blooms and Cultures of Cyanobacteria/blue-green Algae from Danish Lakes and in the Stomach Contents of Poisoned Birds, *Toxicon* **35** (1997) 901-913.
- [17] S. Fabel, R. Niessner, M.G. Weller: Effect-directed Analysis by High-performance Liquid Chromatography with Gas-segmented Enzyme Inhibition, *J. Chrom. A* **1099** (2005) 103-110.