

**BESTIMMUNG DES FORMALDEHYDGEHALTES IM MENSCHLICHEN  
URIN:  
ENTWICKLUNG EINER SCHNELLEN, SELEKTIVEN UND  
KOSTENGÜNSTIGEN FLUORIMETRISCHEN METHODE**

vom Fachbereich C (Mathematik und Naturwissenschaften)

der Bergischen Universität Wuppertal

genehmigte Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

-Doktor der Naturwissenschaften-

(Dr. rer. nat)

vorgelegt von:

**Anne Heinrich**

(Dipl. -Chem.)

aus Neuss

Wuppertal, Juni 2012

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20121218-144350-4

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20121218-144350-4>]

*„Wissenschaft wird immer eine Suche sein, niemals wirklich eine Entdeckung.  
Es ist eine Reise, niemals wirklich eine Ankunft“*

Karl Popper

## ***Danksagung:***

Vielen Menschen gilt der Dank für die Begleitung auf meinem Weg:

Thorsten Benter und der gesamten Arbeitsgruppe der physikalischen Chemie der Bergischen Universität Wuppertal für ihre freundliche Aufnahme und stetige Unterstützung

Michael Tausch und dem gesamten Team der Chemie und ihrer Didaktik der Bergischen Universität Wuppertal für ihre freundliche und hilfsbereite Aufnahme als „Fachfremde“ in ihren Arbeitskreis

Der Bergischen Universität Wuppertal für die Finanzierung meiner Stelle im Rahmen des Netzwerkes QSL

Danke an die Justitiarin und den Ethikrat der Bergischen Universität Wuppertal, die dieses Projekt erst ermöglicht haben

Danke an Jaroslaw Zdziarski, Institut für molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, für die Urinproben von chronischen Blasenentzündung leidenden Menschen

Frau Schefzig, Frau Halbach, Herrn Giebisch, Herrn Felten und Frau Bott von der „Katholischen Grundschule Remscheid- Lüttringhausen“ und dem „Leibniz Gymnasium Remscheid“ für die frühe Erkennung meiner Begabungen und Interessen und stetiger Förderung dieser.

Ulrike für die geduldigen Nachhilfestunden in Zellbiologie

Valerie, Matthias, Hendrik, Nicole, Sonja, Sebastian, Walter und Ana für die angenehme Zeit im Büro, im Labor, beim Mittagessen...

Valerie für ihre unermüdete Unterstützung

Hendrik für die Nachhilfe in Word und Excel

Amitabh und Melanie für die Unterstützung als es „ernst“ wurde

Erwin, Ingrid, Simone und Claudia für die offenen Ohren und vielen netten Gespräche

Klaus, danke für deinen beständigen Glauben an meine Fähigkeiten

Ronnie und der Werkstatt der Bergischen Universität Wuppertal für die Hilfe bei der Konstruktion meiner „Gedanken“

Meiner Familie für die Ermöglichung meiner Ausbildung und dieses Studiums

Tanja, danke einfach für Alles

## ***Inhaltsverzeichnis***

1.	Einleitung und Zielsetzung.....	1
2.	Theoretischer Hintergrund .....	3
2.1.	Krebs .....	3
2.1.1.	Allgemein.....	3
2.1.2.	Urogenitalkrebs .....	3
2.1.2.1.	Prostatakrebs.....	3
2.1.2.2.	Blasenkrebs .....	6
2.2.	Formaldehyd.....	8
2.2.1.	Formaldehyd im gesunden menschlichen Körper und Tumorzellen .....	8
2.2.1.1.	Die Peroxisomen.....	10
2.2.1.1.1.	Angeregter Formaldehyd .....	12
2.2.1.1.2.	Formaldehyd und L-Lysin.....	13
2.2.1.2.	Die Lipidperoxidation.....	14
2.2.1.3.	Der Ein-Kohlenstoffzyklus.....	15
2.2.1.4.	S-Adenosyl-L-methionin (SAM)-Metabolismus.....	18
2.2.1.5.	Der Abbau von Aminoaceton und Methylamin durch SSAO.....	21
2.2.1.6.	Formaldehyd in der nicht enzymatischen Protein-Methylierung.....	21
2.2.1.7.	Formaldehyd im Zusammenhang mit Methylierungssubstanzen .....	21
2.2.1.8.	Cytochrom P 450.....	22
2.2.2.	Formaldehyd in Tumorzellen.....	22
2.2.3.	Formaldehyd und andere Krankheiten.....	23

2.2.4. Formaldehyd als Krankheitsauslöser .....	23
2.2.4.1. Allgemein.....	23
2.2.4.2. Zytotoxizität .....	24
2.2.5. Nachweismethoden für Formaldehyd.....	27
2.2.5.1. Überblick.....	27
2.2.5.1.1. Spektroskopischer und massenspektrometrischer Nachweis .....	32
2.2.5.1.2. Chromotropsäure (1,8-dihydroxynaphtalen-3,6-di-sulfonsäure) .....	33
2.2.5.1.3. Formaldehydnachweise mit Hilfe von Derivatisierungen .....	34
2.2.5.1.3.1. 2,4-Diphenylhydrazon .....	35
2.2.5.1.3.2. 4-Pentafluorophenylhydrazinhydrochlorid.....	35
2.2.5.1.3.3. o-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)-hydroxylamin PFBHA.....	36
2.2.5.1.3.4. N-Methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzo-furazan (MNBDH) .....	37
2.2.5.1.3.5. 3-Methyl-2-benzothiazol-hydrazon .....	38
2.2.5.1.3.6. Cysteamin.....	38
2.2.5.1.3.7. Dopamin.....	39
2.2.5.1.3.8. Dansylhydrazin .....	40
2.2.5.1.3.9. Phenylhydrazin .....	40
2.2.5.1.3.10. Tryptophan.....	40
2.2.5.1.4. Formaldehyd als Katalysator .....	41
2.2.5.1.4.1. Tetrasubstituiertes Amino-aluminium-phtalocyanin (TAAIPc) .....	41
2.2.5.1.4.2. Pararosanilin.....	41
2.2.5.1.5. Enzymatischer Formaldehydnachweis .....	42
2.2.5.2. Die Hantzsche Pyridinsynthese.....	42

2.2.5.2.1.	Das Nash-Reagenz.....	43
2.2.5.2.2.	5,5-Dimethyl-1,3-cyclohexadion (Dimedon).....	46
2.2.5.2.3.	1,3-Cyclohexadion (CHD).....	47
2.2.5.2.4.	Weitere Reagenzien für die Hantzsch – Reaktion.....	48
2.2.6.	Nachweismethoden für Formaldehyd in Urin.....	49
2.2.6.1.	Überblick.....	49
2.2.6.2.	Derivatisierungen.....	51
2.2.6.2.1.	2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH).....	51
2.2.6.2.2.	weitere Derivatisierungen.....	53
2.2.6.2.3.	Formaldehydnachweis in Urin mit Hilfe der Hantzsch - Reaktion.....	54
2.2.6.2.3.1.	Dimedon.....	54
2.2.6.2.3.2.	Das Nash-Reagenz.....	54
2.2.6.3.	SIFT-MS.....	55
2.3.	Urin.....	55
2.3.1.	Allgemeines.....	55
2.3.2.	Urochrome.....	56
3.	Experimenteller Teil.....	60
3.1.	Eingesetzte Chemikalien, Materialien und Probennahme.....	60
3.1.1.	Chemikalien.....	60
3.1.2.	Materialien.....	61
3.1.3.	Probennahme.....	62
4.	Ergebnisse und Diskussion.....	65
4.1.	Stand der Dinge zu Beginn der Arbeit und erste Vorarbeiten.....	65



4.2.	Entwicklung des Gerätes.....	80
4.2.1.	Entwicklungsschritte.....	80
4.2.1.1.	Wässrige Formaldehydlösungen .....	80
4.2.1.2.	Urin .....	85
4.2.1.3.	Urin Messungen ohne T-Stücke.....	85
4.2.1.4.	Urin-Messungen mit T-Stücken.....	89
4.2.2.	Ergebnisse.....	92
4.2.2.1.	Charakterisierung.....	92
4.2.2.2.	Weiterentwicklung.....	92
4.2.2.2.1.	Aufstockverfahren.....	92
4.2.2.2.2.	Wiederfindung.....	95
4.3.	Messkampagnen .....	99
4.3.1.	Kampagnen .....	99
4.3.1.1.	Probelagerung bei -80°C und - 20°C.....	99
4.3.1.2.	Proben von Blasenentzündungspatienten.....	101
4.3.1.3.	Probandenkreis gesunder Menschen .....	104
4.3.2.	Ergebnisse.....	108
4.3.2.1.	Nash – Reagenz – Eigenfluoreszenz .....	108
4.3.2.2.	Nash – Reagenz und Urinfarbstoff .....	109
4.3.2.3.	Blasenentzündungsproben .....	110
4.3.2.4.	Konzentrationsbereich gesunder Menschen .....	111
5.	Zusammenfassung und Fazit .....	114
6.	Literaturverzeichnis .....	116

## **1. Einleitung und Zielsetzung**

Formaldehyd, die erste Verbindung in der homologen Reihe der aliphatischen Aldehyde, ist eine janusköpfige Chemikalie. Auf der einen Seite steht sie im Verdacht, kanzerogen, mutagen und genotoxisch zu sein, auf der anderen Seite aber ist sie ein notwendiger Stoffwechselmetabolit im menschlichen Körper; eine Chemikalie, auf die wie kaum auf eine andere der Ausspruch

„Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift. Nur die Dosis macht, dass etwas kein Gift ist.“[1]

zutrifft. Da in der Literatur immer wieder der Zusammenhang zwischen einem erhöhten Formaldehydgehalt in Körperflüssigkeiten und Geweben auftaucht, die an Krebs erkrankt sind oder direkt in den Krebszellen, wird Formaldehyd als möglicher Indikator in der Literatur diskutiert [2-6].

Das Prostatakarzinom ist der häufigste maligne Tumor beim Mann zwischen 45 und 70 Jahren [7] und die zweithäufigste Todesursache bei Männern in den USA [8]. Bei einer Diagnose in den Stadien  $T_1$ - $T_2N_0M_0$  (TNM-Klassifizierung: tumor node metastasis) besteht eine 90%ige Heilungschance. Für diese Frühstadiumsdiagnostik gibt es bisher nur die Möglichkeit einer Bestimmung einer Prostataverhärtung mithilfe einer Spiegelung, oder die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) durch eine Blutuntersuchung [7]. Blasenkrebs ist die sechsthäufigste Krebserkrankung der Welt [9]. Er tritt überwiegend bei Männern ab dem 60ten Lebensjahr auf; das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Patienten liegt bei 3:1. Ist bereits eine Infiltration des umliegenden Gewebes (TNM - Klassifizierung bis T3), aber noch keine Metastasierung diagnostiziert worden, so liegt die Fünf-Jahres-Überlebensquote bei 45 % [7]. So entstand die Idee, Formaldehyd als Indikator für Krebs in Körperflüssigkeiten messbar zu machen. Dies war die Zielsetzung meiner Diplomarbeit zum Thema: „Entwicklung eines kompakten Messgerätes zum Nachweis von Formaldehyd in biologischen Flüssigkeiten“. Im Verlauf der von Juli 2006 bis Februar 2007 angefertigten Diplomarbeit [10] wurde mit der Entwicklung eines Prototyps für ein Messgerät zum Nachweis von Formaldehyd in biologischen Flüssigkeiten begonnen. Am Ende dieser Arbeit stand ein erster provisorischer Aufbau, mit dem es möglich war, Formaldehyd in Wasser mithilfe der Hantzsch-Reaktion nachzuweisen. Auch erste Messungen von Urin, dem Formaldehyd zugesetzt wurde, verliefen positiv.

Aus dieser Intention heraus soll aus dem provisorischen Aufbau (4.1) ein stabil laufender Prototyp entwickelt werden, mit dem der Formaldehydgehalt in Urin bestimmt werden soll.

In der Vorbereitung auf diese Arbeit wurde festgestellt, dass es weder andere zuverlässige Methoden zum Nachweis von Formaldehyd in Urin generell, noch zuverlässige Daten zum Formaldehydgehalt im Urin gesunder Menschen speziell gibt.

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist also:

- i. Ein zuverlässiges möglichst kostengünstiges, selektives und schnelles Gerät zu entwickeln
- ii. Dieses zu validieren und kontrollieren; da es keine andere Methode gibt, muss dies eigenständig geschehen
- iii. Damit anschließend den Urin potenziell gesunder Menschen zu messen und den Formaldehydgehalt zu bestimmen, um mithilfe dieser Daten Urogenitalkrebserkrankung nichtinvasiv und frühzeitig zu erkennen.

## **2. Theoretischer Hintergrund**

In dem nachfolgenden Kapitel soll dem Leser ein Überblick über den Stand des Wissens gegeben werden.

### **2.1. Krebs**

#### **2.1.1. Allgemein**

Der Begriff Krebs beschreibt allgemein eine maligne Neubildung, ein Karzinom oder ein Sarkom. Unter einem Karzinom versteht man einen vom Epithel, einem Deckgewebe ausgehenden malignen Tumor, der nach Herkunft und Differenzierungsgrad eingeteilt werden kann und sich durch infiltrierendes Wachstum, als Lymphangiosis oder durch Metastasierung verbreitet [7]. Ein Sarkom ist einer von mesenchymalem Gewebe, Fett- Muskel- oder Bindegewebe ausgehender maligner Tumor, d.h. ein bösartiger Tumor, der sich im Gegensatz zu einem gutartigem Tumor durch ein schnelles, invasives Wachstum sowie die Bildung von Metastasen (Tochtergeschwulsten) auszeichnet [11].

#### **2.1.2. Urogenitalkrebs**

In diesem Kapitel soll insbesondere auf auf Prostata- und Blasenkrebs eingegangen werden.

In 2.2.2. wird beschrieben, dass die Erkrankung einer Zelle zu einem erhöhten Formaldehydgehalt in den umgebenden Geweben und Flüssigkeiten führt [2]. Im Falle von Urogenitalkrebs, also Prostata- und Blasenkrebs führt dies zu einem erhöhten Formaldehydspiegel in Urin [12]. Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Gerätes zur Detektion von Formaldehyd in Urin.

##### **2.1.2.1. Prostatakrebs**

Ein Prostatakarzinom ist der häufigste maligne Tumor beim Mann zwischen 45 und 70 Jahren [7] und die zweithäufigste Todesursache bei Männern in den USA [8] und weltweit die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache [13]. Bei einer Diagnose in den Stadien  $T_1$ - $T_2N_0M_0$  (TNM-Klassifizierung: tumor node metastasis) besteht eine 90%ige Heilungschance. Für diese Frühstadiumsdiagnostik gibt es bisher nur die Möglichkeit einer Bestimmung einer Prostataverhärtung mithilfe einer Spiegelung, oder die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) durch eine Blutuntersuchung [7].

Unter dem PSA versteht man das prostataspezifische Antigen, ein Screeningparameter zur Früherkennung von Prostatakarzinomen [7], der seit 1994 eingesetzt wird [14] und 1985 das

erste Mal in einer Veröffentlichung vorgestellt wurde [15]. Erhöhte PSA-Spiegel können auch durch Entzündungen und transurethrale Manipulationen entstehen. Das Problem des PSA liegt darin begründet, dass es eine Protease ist, die auch in der gesunden Prostata enthalten ist [16, 17]. Proteasen sind Enzyme, die die Peptidbindung in Proteinen spalten [18]. Der PSA hat sowohl das Problem von falsch positiven Befunden [15, 17, 19] nur 25 % der Patienten, die sich nach einem positiven PSA-Befund sich einer Biopsie unterziehen müssen, haben Prostatakrebs [14, 16, 19], als auch der falsch negativen Ergebnisse, so dass 15 % der Patienten mit einem niedrigen PSA-Wert durch eine Biopsie aber die Diagnose Prostatakrebs erhielten [14, 16]. Dies liegt daran, dass die Grenze zwischen gesunden und erkrankten PSA-Werten schwer zu ziehen ist, da der PSA individuell unterschiedlich [17] und abhängig vom Alter und BMI (Body Mass Index) [19] ist. Die Grenze zwischen einem positiven und einem negativen PSA-Test liegt derzeit meist bei 4 ng/L [14], so dass man ausgehend von dem obigen Werten bei einem PSA von <4ng/L von einem 15 %igen Krebsrisiko, aber erst bei einem Wert <1 ng/L von einem geringen Krebsrisiko spricht [14]. Weiterhin lässt der PSA die Differenzierung zwischen einer gutartigen Prostatavergrößerung, nicht aggressivem Prostatakrebs und aggressivem Prostatakrebs nicht zu [19]. Nichtsdestotrotz ist der PSA zurzeit immer noch der beste Biomarker, da alle im Folgenden vorgestellten noch in der Entwicklungsphase sind [14, 20].

Neuerdings ist in weiterer Marker bekannt, der EPCA, Early Prostate Cancer Antigen, der deutlich spezifischer als der PSA sein soll. Charakteristisch für alle Krebsarten sind Veränderungen in der Zellkernform und in dem Vorhandensein von unnormalen Zellkernen. Es gibt nun bestimmte Zellkernstrukturproteine, die es möglich machen, gesunde und an Krebs erkrankte Prostatazellen zu unterscheiden [8]. Eines von diesen ist der EPCA, der in Prostatakrebszellen, aber nicht in gesunden Geweben und anderen Krebstypen identifiziert wurde [8]. In einer Studie wurde 2005 herausgefunden, dass er ein 86 % positives Ergebnis bei Prostatakrebspatienten hat [21], auch bei solchen, bei denen eine Biopsie noch negativ verläuft [21]. Er verläuft schon positiv bei Patienten, bei denen erst fünf Jahre später Prostatakrebs diagnostiziert wurde [8, 16]. Er weist eine Sensitivität von 92 % bei Prostatakrebspatienten (11 von 12 erkannt), eine Spezifität von 100 % bei gesunden Patienten und eine Spezifität von 94 % bei den Blasenkrebspatienten auf [16]. Damit ermöglicht diese Methode nicht nur die Differenzierung zwischen gesunden und erkrankten Menschen, sondern auch noch die Differenzierung zwischen Prostata- und anderen Krebsarten [22]. Weiterhin würde es helfen, die Zahl der unnötigen Biopsien zu verringern [8]. Allerdings gibt es auch hier einige Patienten, deren Prostatakrebskrankung nicht erkannt wurde. Dies kann entweder an der Prostatakrebskrankung liegen, nicht alle Arten bilden EPCA, oder die Tumorlast war noch zu gering [16]. Weiterhin gibt es keinen Zusammenhang zwischen dem EPCA-Wert und dem

Entwicklungsstadiums eines Tumors [16]. Der Einsatz von EPCA in der klinischen Praxis befindet sich noch in der Entwicklung [17].

Die nachfolgend vorgestellten Biomarker befinden sich auch ebenfalls noch in der Entwicklungsphase, sollen hier aber kurz vorgestellt werden. Da wären:

- die Serin Protease humanes Kallikrein 2 (hK2), deren Sequenz zu 80% mit dem PSA identisch ist. Auch deren Gehalt ist in Prostatakrebsgeweben erhöht [14] und befindet sich in der Entwicklung [17].
- der Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Rezeptor (uPAR), dessen Gehalt im Plasma bei Männern mit Prostatakrebs deutlich erhöht ist [17].
- Die prostatakrebs spezifischen Autoantikörper, die in dem kritischen Bereich des PSAs von 4 bis 10 ng/mL eine höhere Sensitivität und Spezifität als PSA haben [19]. Diese Autoantikörper sind besser zur Diagnose geeignet als der PSA [14].
- das Prostata spezifische Membran Antigen (PSMA), das bei Vorliegen eines Prostatakarzinoms erhöht ist [17]. Dieser ist bisher allerdings nicht effektiver als der PSA [19].
- Die prostataspezifischen Antikörpern [17]. PCA3 ist eine prostataspezifische mRNA, die bei 95% des Vorliegens einer Prostatakrebserkrankung in dem Prostatakrebsgewebe 60 - 100 fach erhöht ist [23]. Dieser Marker scheint nicht nur das Vorliegen von Prostatakrebs sondern auch das Stadium diagnostizieren zu können [19]. Mittlerweile wird dieser Marker ebenfalls in Urin nachgewiesen [15, 23]. Auch dieser Marker befindet sich noch in der Entwicklung und benötigt Multicentertests [14, 17, 19].
- das GSTP-1 Gen, das im Urin von 79% der prostatakrebs erkrankten Männern erhöht ist [15, 17].
- das TMPRSS2:ERG-Gene scheint ein Biomarker zu sein in den man weitere Forschung investieren sollte [19], da er im Prostatakrebsgewebe erhöht ist [14, 15, 23].
- $\alpha$ -Methylacyl Coenzym A Racemase (AMACR) ist eine Isomerase, deren Gehalt bei allen Prostatakrebsarten erhöht ist. Es scheint eine kritische Rolle in der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren zu spielen [14, 23]. Auf diese peroximale  $\beta$ -Oxidation soll in 2.2.1.1 genauer eingegangen werden.
- die AMACR mRNA Level sind in 88% der Prostatakrebsfälle neunmal höher als in den Geweben gesunder Menschen [14]. Auch dieser Biomarker ist noch in der Entwicklung, speziell versucht man für diesen Marker einen Urintest zu entwickeln [14, 15].
- die Gluthadion - S - Transferase (GSTPI) ist ein Gen, welches ein entgiftendes Enzym decodiert, das zum Schutz der DNA vor freien Radikalen Anwendung findet [23]. In >90% der Prostatakrebsfällen fehlt dieses Gen. Auch hier arbeitet man zurzeit an der Entwicklung [14, 15].

- das Golgi Membran Protein (GOLM1) [14], dessen Gehalt in Prostatakrebsgewebe erhöht ist [15].
- die Telomerase reverse Transcriptase (TERT) ist noch in der Entwicklung [15]. Sie spielt eine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung der telomeren Chromosomenenden [15, 23].
- das Annexin A3, das als Ergänzung zum Serum PSA eingesetzt wird [15, 23]. Aufgrund seines inversen Verhältnisses zu Krebs ist es deutlich spezifischer als PSA [23].
- das Metalloproteinase MMP9 scheint in Prostatakrebsproben erhöht zu sein [15, 23].
- Proteomen [15, 19], deren Erforschung gerade erst beginnt. Diese Proteine eröffnen evtl. die Möglichkeit gesunde und erkrankte Menschen zu differenzieren. Der Nachteil ist nur, dass man zu deren Analytik die Surface-enhanced laser desorption/ ionization (SELDI-TOF) oder matrix-assisted laser desorption/ ionization (MALDI-TOF) benötigt [14].

#### **2.1.2.2. Blasenkrebs**

Blasenkrebs ist die fünft- bis sechsthäufigste Krebserkrankung der Welt [9, 24]. Er tritt überwiegend bei Männern ab dem 60ten Lebensjahr auf, das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Patienten liegt bei 3:1. Ist schon eine Infiltration des umliegenden Gewebes (TNM - Klassifizierung bis T3), aber noch keine Metastasierung diagnostiziert worden, so liegt die Fünf-Jahres-Überlebensquote bei 45 % [7]. Die einzigen nicht invasiven Diagnostiken sind die Harnzytologie, die Ultraschalluntersuchung und die Computertomographie. Die anderen Diagnosemöglichkeiten sind die bimanuelle Untersuchung, die Zystoskopie und transurethrale Biopsie [7]. Dabei waren für lange Zeit die Zystoskopie und die Zytologie die Standardverfahren [9, 25]. Unter Zytologie oder auch Zytodiagnostik versteht man das Herstellen von gefärbten Ausstrichen und die mikroskopische Untersuchung von Einzelzellen [7]. Unter Zystoskopie versteht man die Blasenspiegelung, die augenblickliche Methode der Wahl um Blasenkrebs nicht nur zu diagnostizieren, sondern auch, um sowohl Größe, wie auch die Art des Tumors zu bestimmen [26].

Allerdings ist die Zystoskopie teuer [26, 27], invasiv und unangenehm. Die Zytologie ist stark abhängig vom untersuchenden Zytologen, da es sich um eine quantitative Methode handelt [25]. In einem multiinstitutionalen Test mit 9 Ländern und vier Kontinenten war die Zytologie positiv zwischen 38 % und 65 % [25]. Sie weist zwar eine Spezifität von 80 - 100 % auf, aber nur eine Sensitivität von 40 % - 60 % [28]. Weiterhin hat sie eine niedrige Sensitivität gerade im Bereich der T<sub>≥</sub>2 Tumoren, so dass sie die Blasenspiegelung nicht ersetzen kann [9, 25]. Sie detektiert 75% der hochgradigen, aber nur 8% der geringgradigen Tumore [29]. Gerade in diesem Bereich sind die neu aufkommenden Krebsmarker deutlich stärker [25].

Bladder Tumor Antigen (BTA) Tests gibt es in verschiedenen Varianten, der BTA stat ist ein qualitativer Test mit sofortigem Ergebnis. Der BTA TRAK ist ein quantitativer Test, der geschultes Personal in einem Referenzlabor erfordert [25-27]. Beide Tests beruhen auf der Messung eines im Urin von Blasenkrebspatienten enthaltenen H-Proteins. Allerdings ist dieser Test falsch positiv, wenn Blut im Urin enthalten ist oder bei anderen Erkrankungen, wie dem Vorhandensein von Nierensteinen und Entzündungen und ist nicht zum Screening geeignet, vor allem nicht bei Patienten mit anderen urogenitalen Symptomen [25, 27, 29]. Beide Tests übertreffen die Zytologie in ihrer Sensitivität, aber bleiben in ihrer Spezifität hinter der Zytologie zurück [27].

ImmunoCyt ist ein Test aus einer Kombination aus Zytologie mit einem Immunofluoreszenz Assay. Auch dieser Test muss aufgrund des eingesetzten Fluoreszenzmikroskops in einem Referenzlabor durch geschultes Personal ausgewertet werden [25, 27]. Dieser Test ist aber aufgrund seiner "Neuartigkeit" nur als Ergänzung zur Zytologie oder Blasenspiegelung zu sehen, da er eine Sensitivität von 50 - 100 % und eine Spezifität von 69% - 79 % aufweist [25]. Kombiniert mit der Zytologie detektiert dieser Test allerdings 79 % der geringgradigen Tumore und 99 % der hochgradigen Tumoren [29]. Weiterhin ergibt er allein eingesetzt bei Patienten mit BPH 50 % und mit Blasenentzündung 40 % falsch positive Ergebnisse [25].

Neuerdings gibt es auch hier einen Nuclear Matrix Protein Test, der auf NMP22 testet. Es gibt zwei verschiedene Testarten, den "NMP 22 test" und den "Bladder Cancer Test", beide quantitative Immunoassaytests und den NMP 22 BladderCheck, einen qualitativen vor Ort Test [26, 27]. Nuklear Matrix Proteine sind verantwortlich für den Zellkernaufbau. Der NMP22 ist ein Protein des Zellkern mitotischen Apparates [25], allerdings weist dieser Test für die tägliche Routineanalyse eine zu schlechte Spezifität und Sensitivität auf [9, 30], da das NMP22 von toten und sterbenden Urothelialzellen freigesetzt wird und somit auch bei gutartigen Erkrankungen des Harnwege, wie Steinen, Infektionen, Entzündungen, Hämaturie und Blasenspiegelungen nachzuweisen ist [25, 29]. Somit ist für die Qualität des Nachweises essentiell wo man die Grenze zwischen gesunden und krankhaften Ergebnissen setzt [28]. Kombiniert man allerdings den NMP22 mit der Zytologie, so werden 99% der Tumore diagnostiziert, das sind 5 % mehr als die Kombination aus Zytologie und Blasenspiegelung [29]. Somit bietet sich der NMP22 nicht alleinig aber sehr gut als Kombinationstest an [29].

UroVysion ist ein FISH (fluoreszenz in situ hybridisation) Test, der Genmutationen (Aneuploidie) in den Chromosomen 3, 7 und 17 detektiert. Diese ändern sich in Urogenitaltumoren [25]. FISH übertrifft die Zytologie über alle Stufen und Grade von Urogenitalkarzinomen [25]. Allerdings hat auch diese Methode Nachteile. Da sie abhängig ist von



einer Mindestmenge an abnormalen Zellen, behindern geringe Urinmengen, eine niedrige Tumorlast, oder sich nicht ablösende Tumorzellen den Test [25]. Weiterhin ist sie sehr teuer und muss in einem Labor durchgeführt werden [25, 27, 29].

Auch der Gehalt an Hyaluronsäure im Urin von an Blasenkrebs erkrankten Menschen ist erhöht und gleichzeitig ein sehr günstiger Test.

Der Nachweis von Survivin, CD44v6 und VEGF sollen hier nur kurz Erwähnung finden, da sie noch deutliche Schwierigkeiten im Einsatz als diagnostisches Instrument zum Nachweis von Blasenkrebs aufweisen [28].

Ein weiteres Protein, das zu den NMP's gehört, ist das BLCA-4, dessen Vorkommen in Urin ein Indikator für Blasenkrebs ist [26, 31, 32].

Man kann zusammenfassend sagen, dass die nichtinvasiven Tests die gleiche oder sogar eine höhere Sensitivität für Blasenkrebs, allerdings eine schlechtere Spezifität haben, als die Zytologie [29]. Außerdem sind sie für die Patienten angenehmer. Sie befinden sich alle noch im Entwicklungsstadium, so dass die Zukunft ihren Einsatz zeigen wird [25, 29, 33].

## **2.2. Formaldehyd**

Formaldehyd wurde erstmals von Butlerov 1859 hergestellt und von Hofmann 1868 strukturell beschrieben und 1889 erstmals produziert [34]. Formaldehyd, der kleinste bekannte aliphatische Aldehyd, der aufgrund seines sehr reaktiven Verhaltens seit über 100 Jahre als Methylierungsmittel in der organischen Chemie eingesetzt wird ist für den Menschen ab einer Konzentration von 0,15 ppm wahrnehmbar [35].

### **2.2.1. Formaldehyd im gesunden menschlichen Körper und Tumorzellen**

Formaldehyd ist nicht nur ein Umweltgift, sondern tritt auch als Metabolit im Stoffwechsel tierischer und pflanzlicher Organismen auf [36, 37].

„Formaldehyde, unlike most carcinogens identified in animal cancer tests, is not a synthetic industrial chemical but a normal metabolite in human biochemistry with an elaborate enzymatic system already in place for handling it.”[37]

Weitergehend ist er nicht nur ein Stoffwechselmetabolit sondern ein essentielles Intermediat [35]

„Formaldehyde is also an essential intermediate in cellular metabolism that is required for the biosynthesis of purines, thymidine, and certain amino acids.” [35]

Formaldehyd kann im Körper aus verschiedenen Ausgangsstoffen durch Demethylierung entstehen [38]. Diese Ausgangsstoffe tragen meist  $-N-CH_3$ ;  $-O-CH_3$  oder  $S-CH_3$ -Gruppen. Bei dieser Demethylierung unterscheidet man nun zwei verschiedene Gruppen an Ausgangsstoffen:

1. Endogene, also Stoffe, die im Körper entstehen, wie z.B.  $N^\epsilon$ -methyl-L-lysin
2. Exogene, also Stoffe, die von außen zugeführt werden, wie z.B. Nitrosamine

Dieser auf unterschiedlichen Wegen entstandene Formaldehyd hat nun unterschiedliche Auswirkungen.

1. Die Enzyme die die endogenen Stoffe im Körper zu Formaldehyd abbauen sind spezifisch. So kann z. B. die  $\epsilon$ -Alkyl - lysinase nur  $N^\epsilon$ -methyl-L-lysin und etwa nicht  $N^\alpha$ -methyl-L-lysin oder  $N^\epsilon$ -methyl-D-lysin abbauen. Für den so entstandenen Formaldehyd steht dem Körper ein enzymatisches System zur Verfügung in dem der Formaldehyd auch wieder abgebaut wird, z. B. den Ein-Kohlenstoffzyklus [38].
2. Die exogenen Stoffe aus denen Formaldehyd gebildet wird werden unspezifisch von z.B. Cytochrom P450 [39] zu unter anderem Formaldehyd abgebaut. Für den so entstandenen Formaldehyd gibt es keinen vorgesehenen Abbauweg, in dem er ungefährlich gemacht würde, so dass er mit Zellkomponenten in Formylierungs- und Methylierungsreaktionen reagieren kann. Stehen nun nicht ausreichend Akzeptormoleküle, wie Cystein, Glutathion oder Ascorbinsäure zur Verfügung können diese Reaktionen gefährlich oder sogar kanzerogen sein [38].

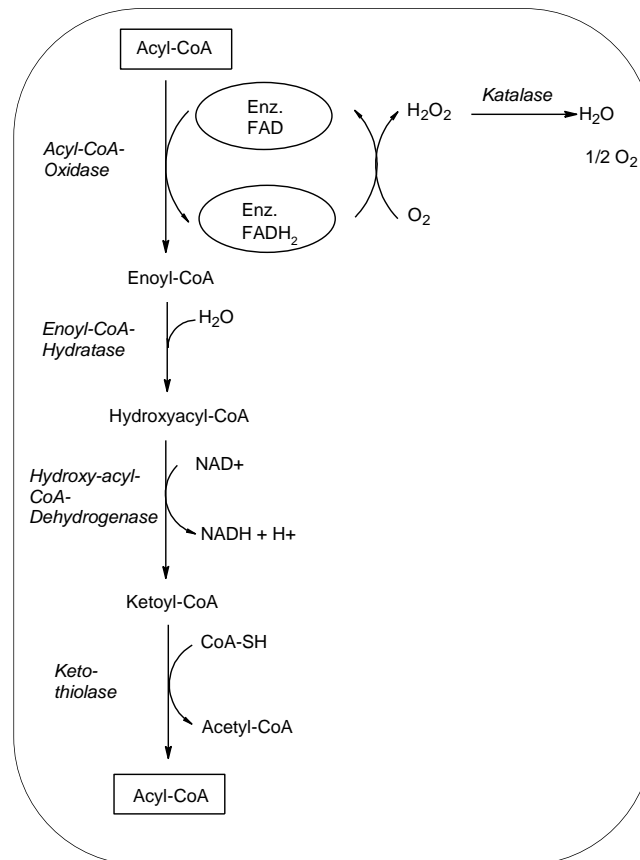
Weiterhin kann Formaldehyd auch noch in einer „Steady state reaction“ von Serin mit der Serin transhydroxymethylase gebildet werden, allerdings bildet sich dann als Zwischenprodukt ein Enzym-Formaldehyd-Komplex, der den Formaldehyd direkt zur Tetrahydrofolsäure transportiert, die mit Formaldehyd zu  $N^5,N^{10}$ -Methyl-THF reagiert und somit am Ein-Kohlenstoffzyklus teilnimmt [38]. Formaldehyd reagiert im Stoffwechsel ansonsten in spontanen Methylierungs-, Formylierungs- und Hydroxymethylierungsreaktionen [38], so methyliert und formyliert Formaldehyd die Amino-Gruppe des Lysins, während es bei Arginin nur die Guanidino-Gruppe hydroxymethylieren kann [38].

Wie oben schon erwähnt spielt Formaldehyd im Ein-Kohlenstoff-Zyklus eine wichtige Rolle [40], [41]. Bei dessen Bildung spielen spezifische Zellorganellen, die Peroxisomen (Abb. 2-1) und die Demethylierung von  $N^G$ -methyl-L-arginin [36, 41], sowie  $N^G$ -methyl-L-lysin [41] eine wichtige Rolle. Weiterhin wird Formaldehyd im S-adenosyl-L-methionin (SAM) Metabolismus [41-43] und dem Abbau von Aminoaceton und Methylamin durch SSAO [42] gebildet. Formaldehyd selbst spielt allerdings eine wichtige Rolle in der nicht enzymatischen Protein Methylierung [34].



die allerdings kein Elektronentransportsystem für die Energiegewinnung besitzen. Unter Organellen versteht man membranumgebene Reaktionsräume der Zelle, die besondere Aufgaben haben [11]. Die Peroxisomen enthalten flavinhaltige Oxidasen, die Peroxidasen, die Wasserstoff von verschiedenen Substraten abspalten und auf molekularen Sauerstoff unter Bildung von Wasserstoffperoxid übertragen. Auf diese Art werden in den Peroxisomen Fettsäuren zu kleineren Molekülen gespalten. Diese werden dann in der Zelle zu den Mitochondrien transportiert und können dort zur Zellatmung genutzt werden. Die Peroxisomen liegen vorwiegend in den Leberzellen vor, da sie für den Abbau schädlicher Substanzen, wie Alkohol zuständig sind [45]. Bei diesem Prozess entsteht Wasserstoffperoxid der dann von Katalasen zu Sauerstoff und Wasser abgebaut wird und ebenfalls ein Zellgift ist. Die Peroxisomen enthalten noch weitere Enzyme, die hier aber keine Rolle spielen.

Der erwähnte Abbau von Fettsäuremolekülen durch  $\beta$ -Oxidation in den Peroxisomen ist im Gegensatz zur mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation auf langkettige und mehrfach ungesättigte Fettsäuren spezialisiert. Dafür setzen die Peroxisomen z. B. anstelle der Flavin-Adenin-Nucleotid (FAD) abhängigen Acyl-CoA-Dehydrogenase in den Mitochondrien eine FAD abhängige Acyl-CoA-Oxidase ein (Abb. 2-2). Die folgende Abbildung zeigt den Mechanismus der peroxidalen  $\beta$ -Oxidation langkettiger Fettsäuren.

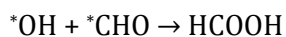
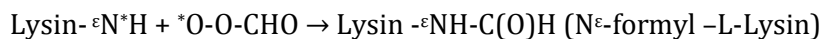
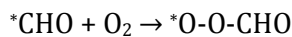
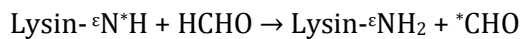
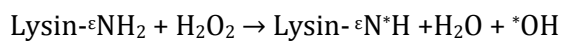


**Abbildung 2-2: Mechanismus der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation langkettiger Fettsäuren**

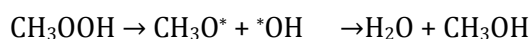
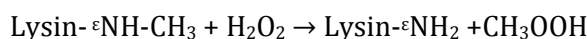
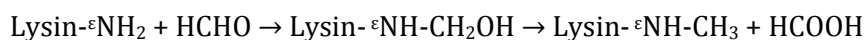
Das Coenzym A verkürzt die Alkylkette des Fettsäuremoleküls um 2 Kohlenstoff – Einheiten, wird zum Acetyl CoA und wird zur erneuten Biosynthese in die Zellflüssigkeit, das Cytosol transportiert [46]. Dabei werden pro Durchgang zwei Moleküle des oben schon angesprochene Wasserstoffperoxids freigesetzt. Dessen Entgiftung übernehmen die Katalasen, die mit Hilfe des Wasserstoffperoxids organische Metabolite, wie Phenole und Alkohole oxidieren. Dabei entstehen aus z.B. Methanol Formaldehyd, oder sogar Essigsäure [47]. Die Katalase kann aber bei niedrigen Wasserstoffperoxidkonzentrationen auch als Peroxidase reagieren und in einer Disproportionierung aus zwei Molekülen Wasserstooperoxid ein Molekül Wasser und ein Molekül Sauerstoff bilden. Bei dieser stufenweisen Sauerstoffreduktion bilden sich auch reaktive Sauerstoffintermediate, die zu Lipidperoxidation führen [46](2.2.1.2).

#### **2.2.1.1.1. Angeregter Formaldehyd**

Weiterhin entsteht in der Reaktion zwischen  $\text{H}_2\text{O}_2$  und HCHO angeregter Formaldehyd und Sauerstoff [43]. Es wird diskutiert, dass die  $\epsilon$ -Gruppe des Lysins extrem beeinflussbar von angeregtem Formaldehyd und Sauerstoff ist, der durch Cytochrom P450 aus kanzerogenen Stoffen, wie z. B. Methylnitrosaminen gebildet wird [43]. Für die Entstehung von angeregtem Formaldehyd ist das System aus Wasserstoffperoxid, Formaldehyd und Lysin bedeutend [48]



und



### 2.2.1.1.2. Formaldehyd und L-Lysin

Wie bereits in 2.2.1.1.1. angesprochen reagiert Formaldehyd mit Lysin zu N<sup>ε</sup>-formyl -L-Lysin [49]. Arginin und Lysin können Formaldehyd abfangen. Dabei bilden sich Mono-, Di- und Tri-hydroxymethylarginine (HMA) und Mono-, Di- und Tri- methyllysin (MML; DML; TML) [50], nach dem folgenden Schema [38]:

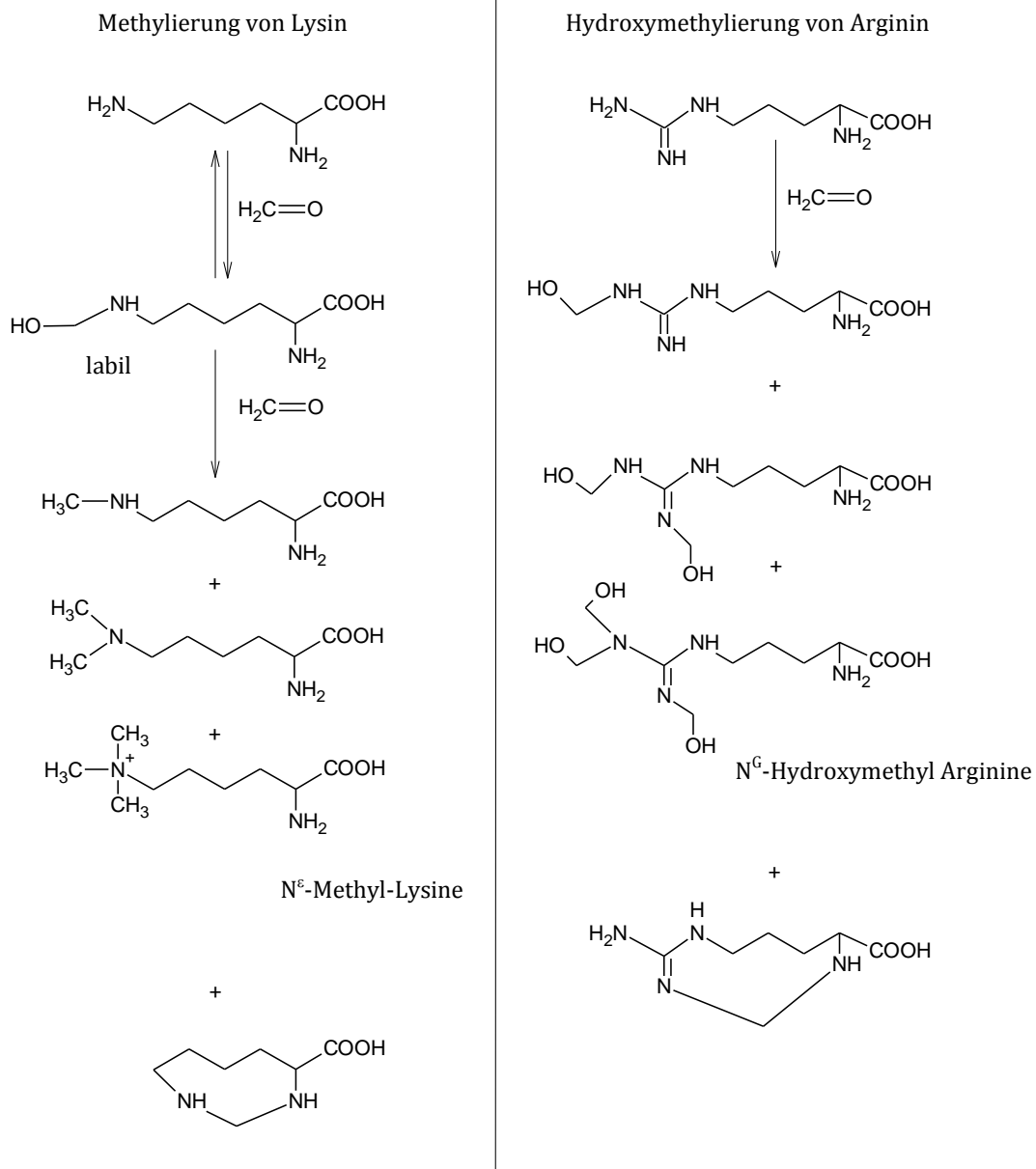


Abbildung 2-3: Methylierung von Arginin und Lysin

### 2.2.1.2. Die Lipidperoxidation

Die Lipidperoxidation gefährdet die ungesättigten Lipide der Zellwand, da durch ROS (Reaktive Oxygen Species) wie Singlett-Sauerstoff, Triplett-Sauerstoff, Hydroxyradikale, Peroxyradikale oder Alkoxy-Radikale

- Diese Lipide angegriffen werden und
- Zellgifte, wie Formaldehyd und Acetaldehyd, aber auch Malonaldehyd, und Acrolein (Abb. 2-3) [51] entstehen.

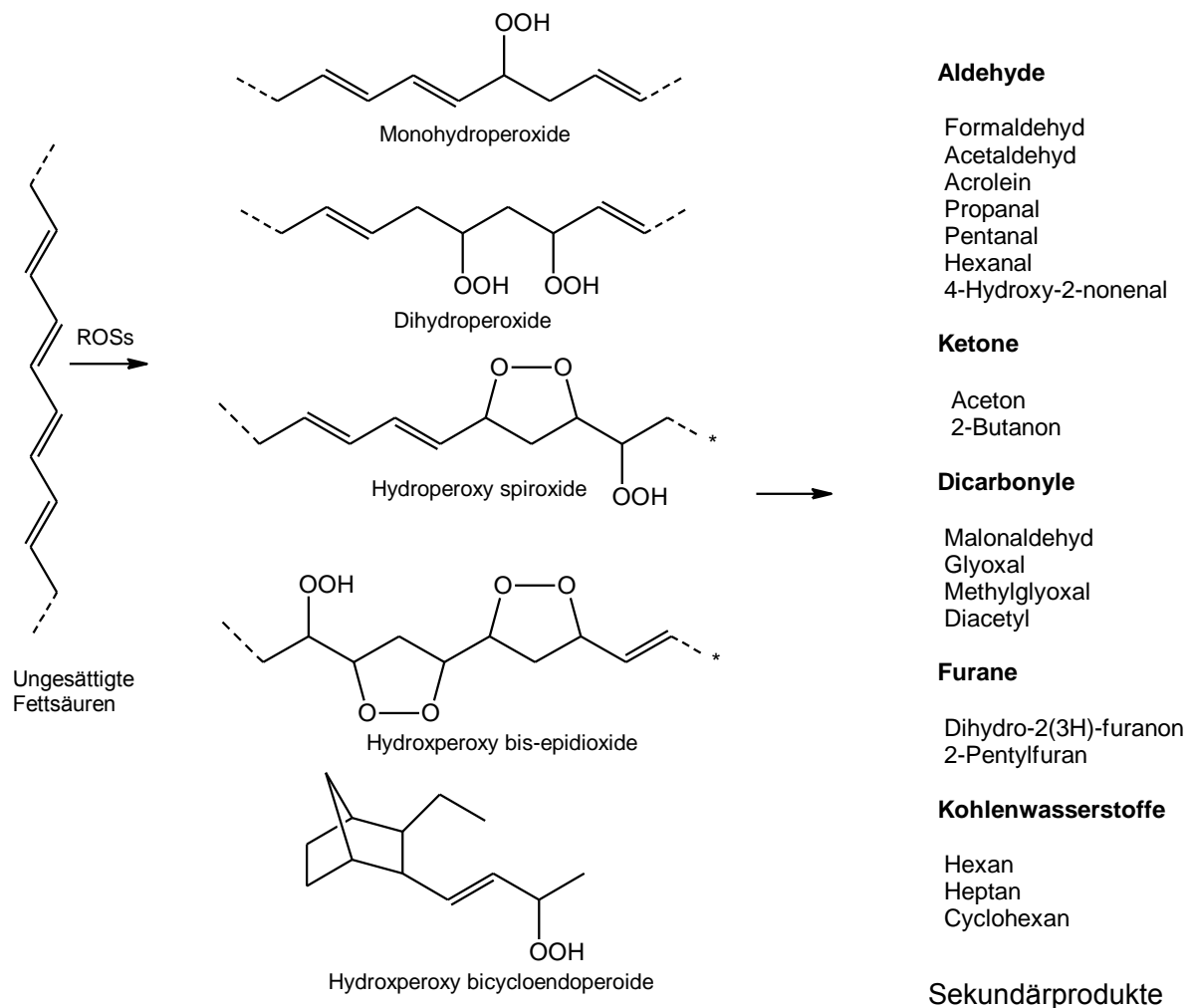
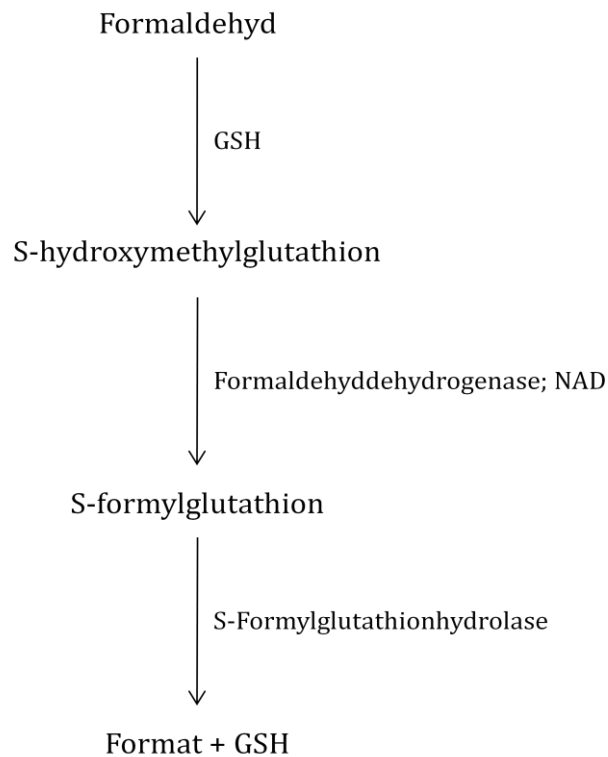


Abbildung 2-4: Produkte der Lipidperoxidation ungesättigter Fettsäuren

Gerade Formaldehyd wird im Zusammenhang mit vielen Krankheiten, wie Alzheimer, Diabetes, Arthritis, Aids, aber auch Krebs diskutiert [51, 52]. Somit führt eine erhöhte Lipidperoxidation zu einem erhöhten Formaldehydgehalt in Urin [53]. Allerdings kann Formaldehyd im menschlichen Körper auch in seine unreaktive Form überführt werden, indem

es zu Formiat oxidiert wird [35, 52]. Dabei reagiert Formaldehyd nicht enzymatisch mit GSH zu S-hydroxymethylglutathion. Dieses wird dann von Formaldehyd dehydrogenase NAD abhängig zu S-formylglutathion oxidiert, welches durch die S-formylglutathion zu Formiat und GSH hydrolysiert wird [54].



**Abbildung 2-5: Abbau von Formaldehyd zu Formiat**

2005 wurde festgestellt, dass die Formaldehyddehydrogenase aus zwei Enzymen besteht, der, S-(hydroxymethyl)glutathion Dehydrogenase (EC 1.1.1.284) und der S-(hydroxymethyl)glutathion Synthase (EC 4.4.1.22)[55]

### **2.2.1.3. Der Ein-Kohlenstoffzyklus**

Wie in 1 angesprochen, spielt Formaldehyd im Körper eine wichtige Rolle, so in den Leberzellen im Ein-Kohlenstoffzyklus als Substrat der Biosynthese von Purinen, Thymidin und Aminosäuren [35, 56], die im Anschluss in der DNA und RNA verwendet werden. Aus diesem Grund ist der Formaldehydgehalt in der Leber zwei bis viermal höher als im Blut des Menschen [56]. Zu diesem Ein-Kohlenstoffzyklus gehören neben Formaldehyd, die Glutathion (GSH)-Addukte S-hydroxymethyl-GSH, S-Formyl-GSH, die Tetrahydrofolat-Addukte N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methyl-THF, N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Formyl-THF, N<sup>5</sup>-hydroxymethyl-THF, Serin, Methionin, Histamin und Methylamin [56]. THF kann man sich dabei als Trägersubstanz vorstellen, die des Formaldehyd als Substrat in Serin, Ribulose-5-phosphat oder Dihydroxyaceton überträgt [57]. THF selbst ist ein Coenzym,



das aus dem wasserlöslichen Vitamin Folsäure mithilfe der Dihydrofolatreduktase gebildet wird. Es besteht aus einem substituiertem Pteridin, einem p-Aminobenzoat und Glutamat [44].

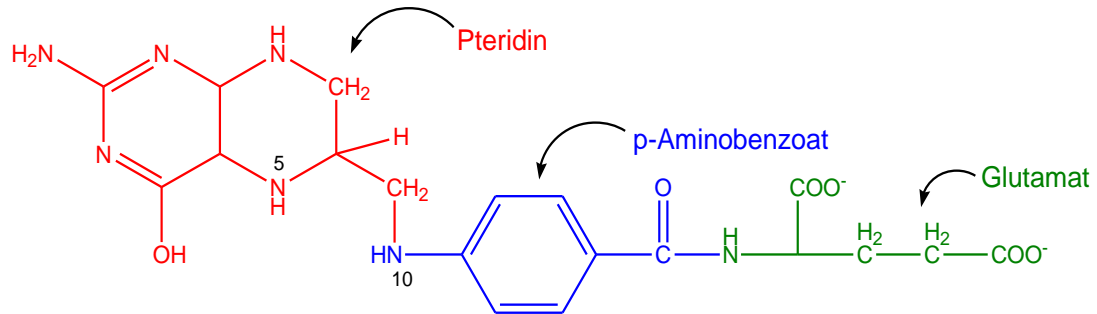


Abbildung 2-6: Struktur Tetrahydrofolat

Als Überträger von C<sub>1</sub>-Körpern in verschiedenen Oxidationsstufen hat THF zwei reaktive Zentren, an denen C<sub>1</sub> Körper gebunden werden können. Diese verschiedenen THF-C<sub>1</sub>-Moleküle können im Körper, wie die nachfolgende Abbildung zeigt, ineinander überführt werden (Abb. 2-5).

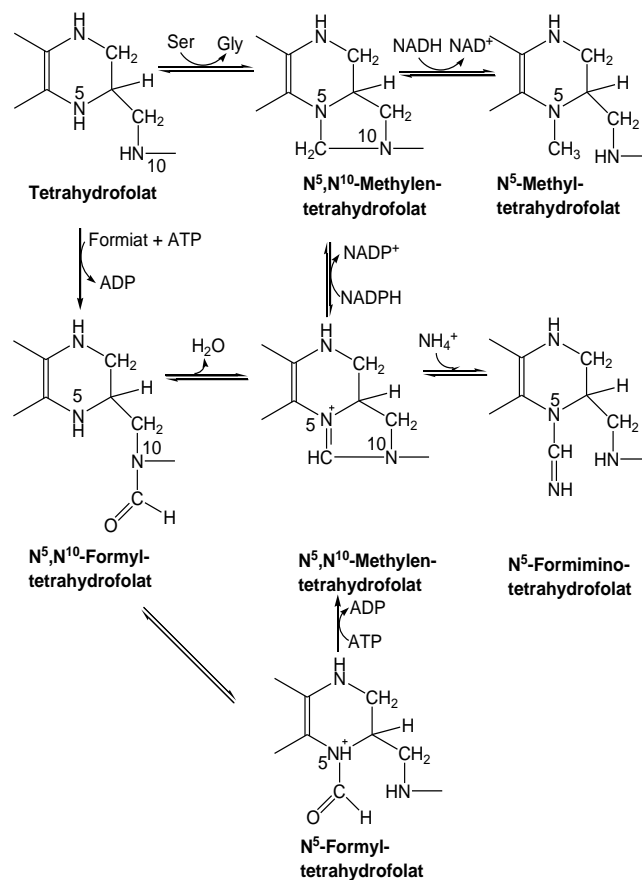


Abbildung 2-7: Umwandlungen der Ein-Kohlenstoff-Einheiten am Tetrahydrofolat

Dabei entstehen die drei wichtigsten Überträgermoleküle [44]:

- N<sup>10</sup>-Formyl-THF als Carbonsäureüberträger, in Form von Formylgruppen
- N<sup>5</sup>N<sup>10</sup>-Formyl-THF als Aldehydüberträger, in Form von Hydroxymethylgruppen
- N<sup>5</sup>-Methyl-THF als Alkoholüberträger, in Form von Methylgruppen

Die wohl wichtigsten von THF unterstützten Biosynthesen sind:

- die Biosynthese von Methionin aus Homocystein durch den Übertrag einer Methylgruppe des N<sup>5</sup>-Methyl-THF [41]
- die Thymin-Synthese durch N<sup>5</sup>N<sup>10</sup>-Formyl-THF [58]
- der Übertrag von dem Methylkohlenstoff zur Bildung des Desoxythymidylat aus Desoxyuridylat (dUMP) mithilfe von N<sup>5</sup>N<sup>10</sup>-Formyl-THF unter Oxidation zum Dihydrofolat. Mit Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH) als Reduktionsmittel und der Dihydrofolat-Reduktase wird dann das Dihydrofolat wieder zum Tetrahydrofolat reduziert

Die folgende Abbildung zeigt eine schematische Übersicht dieser (Abb. 2-6).

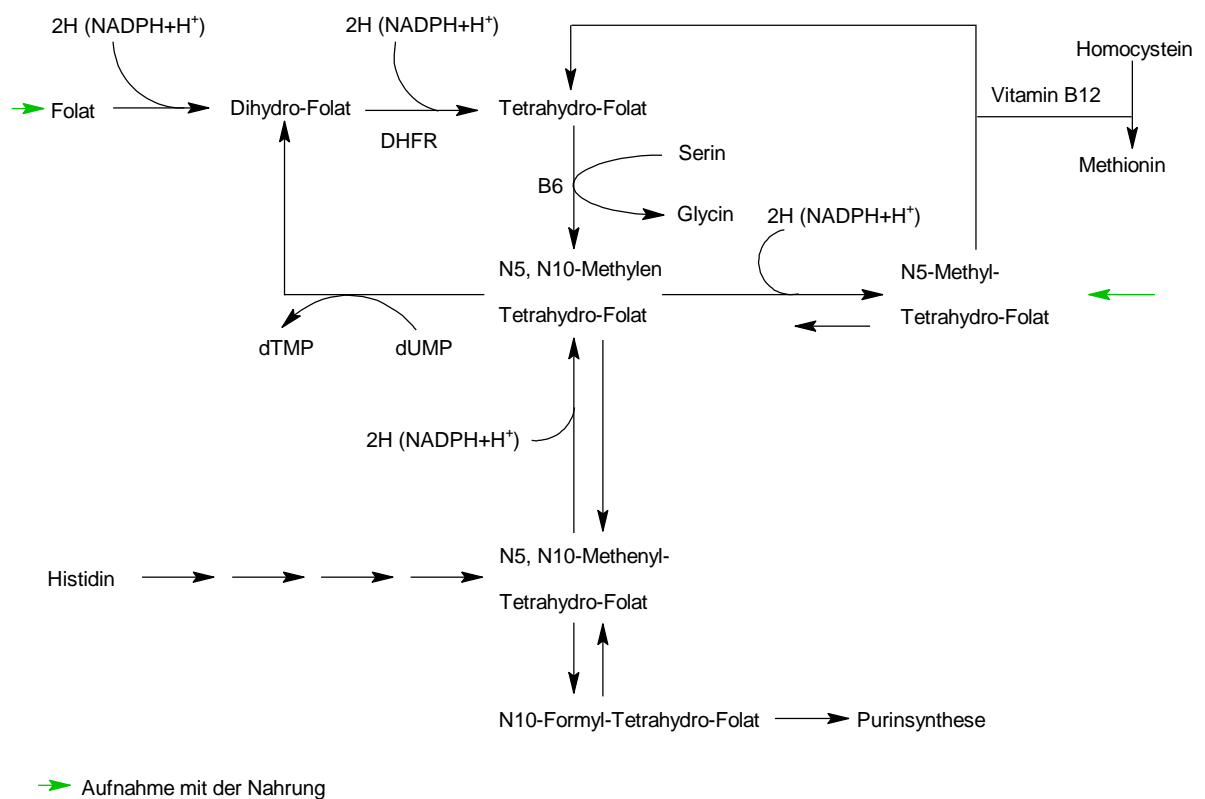
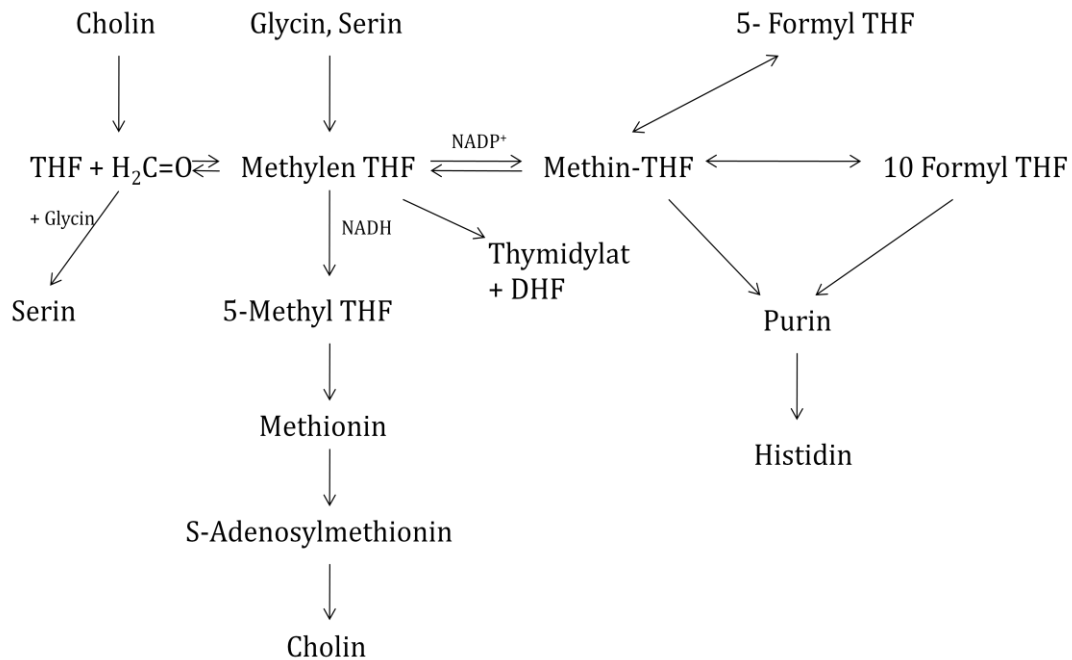


Abbildung 2-8: Tetrahydrofolatstoffwechsel

Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über den Ein - Kohlenstoffzyklus [40]



**Abbildung 2-9: Schematische Darstellung des Ein Kohlenstoffzykluses**

Weiterhin wird Formaldehyd auch bei der Demethylierung von N<sup>G</sup>-methyl-L-lysin zu L-Lysin gebildet [41], aber bei der Bildung von N<sup>G</sup>-formyl-L-Lysin abgebaut [59]. Aus Formaldehyd und GSH bildet sich mithilfe der Formaldehyd-dehydrogenase dann S-formylgluthadion [60]. Das in der später beschriebenen Transmethylierungsreaktion entstehende Formaldehyd wird in der enzymatischen Reaktion von Histamin zu N-Methylhistamin gebildet und formt in dieser Reaktion Formaldemethon aus Dimedon [42]. Weiterhin wird für diese Reaktion die Guanidin - Gruppe von L-Arginin benötigt [42].

#### **2.2.1.4. S-Adosyl-L-methionin (SAM)-Metabolismus**

SAM wird in der cytosolischen enzymatischen Reaktion von L-Methionin und ATP gebildet und wirkt als Methyl-Donator in fast allen Transmethylierungsreaktionen, wie auch der DNA - Methylierung [42], wobei als Nebenprodukt Formaldehyd [43] entsteht (Abbildung 2-10)

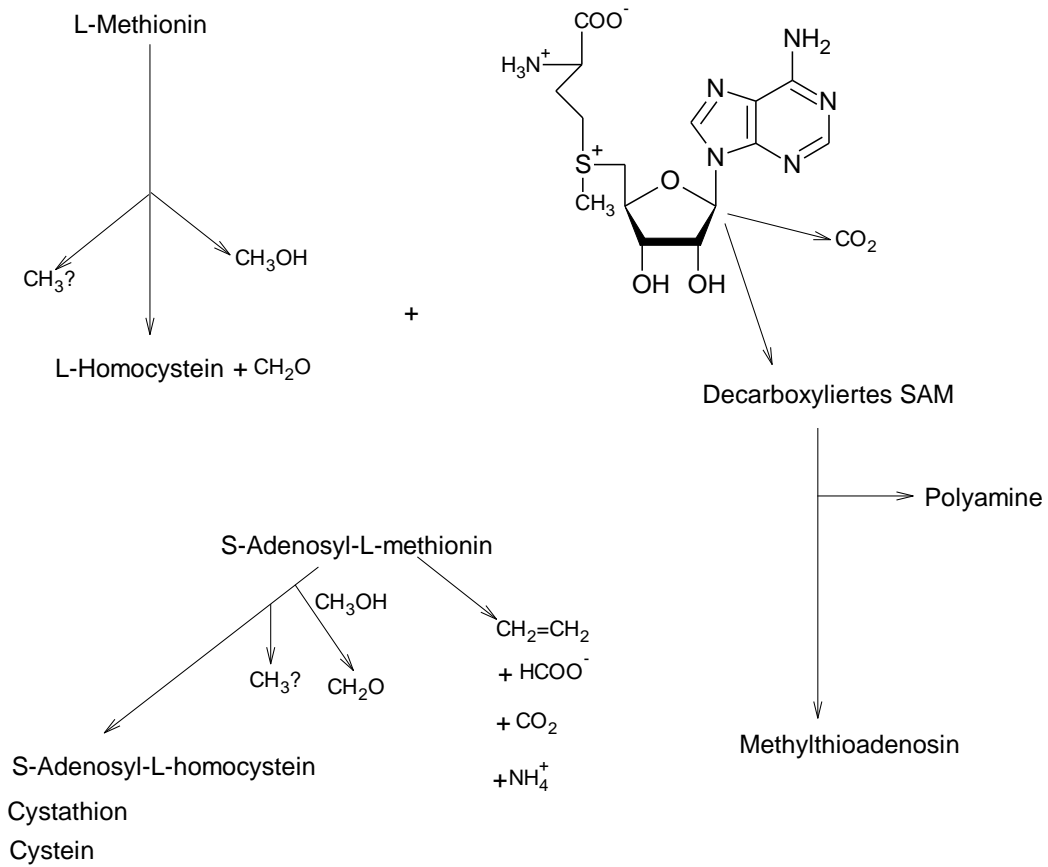


Abbildung 2-10: Metabolische Wege von SAM [42]

Bei der Demethylierung vom SAM wird ebenfalls Formaldehyd gebildet (Abbildung 2-11).

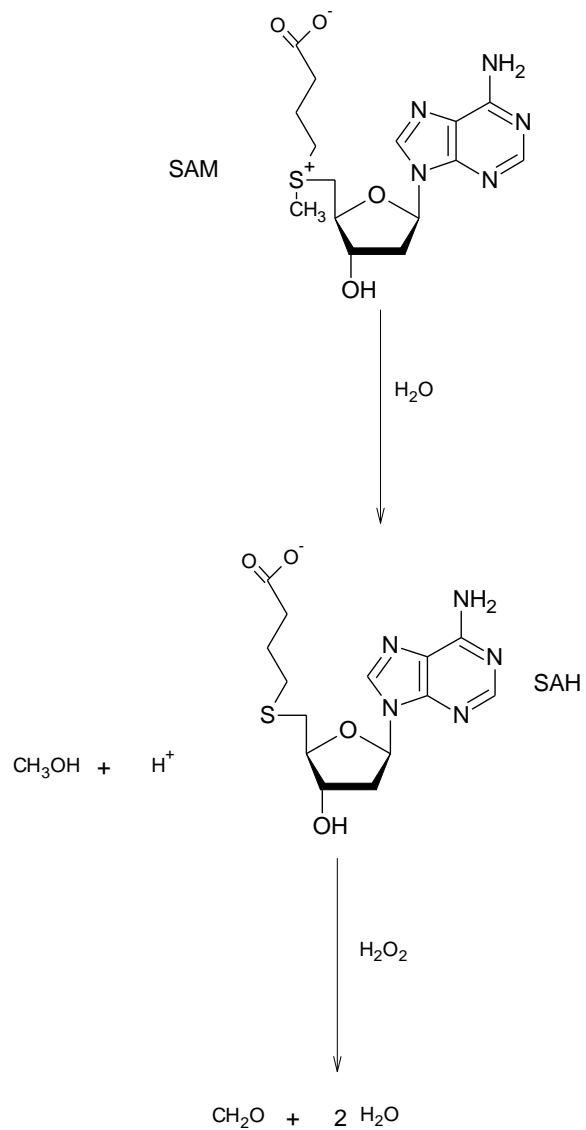


Abbildung 2-11: Demethylierung von SAM [42]

Der so gebildete Formaldehyd ist der Methylgruppenüberträger in einigen enzymatischen Transmetylierungsreaktionen [59].

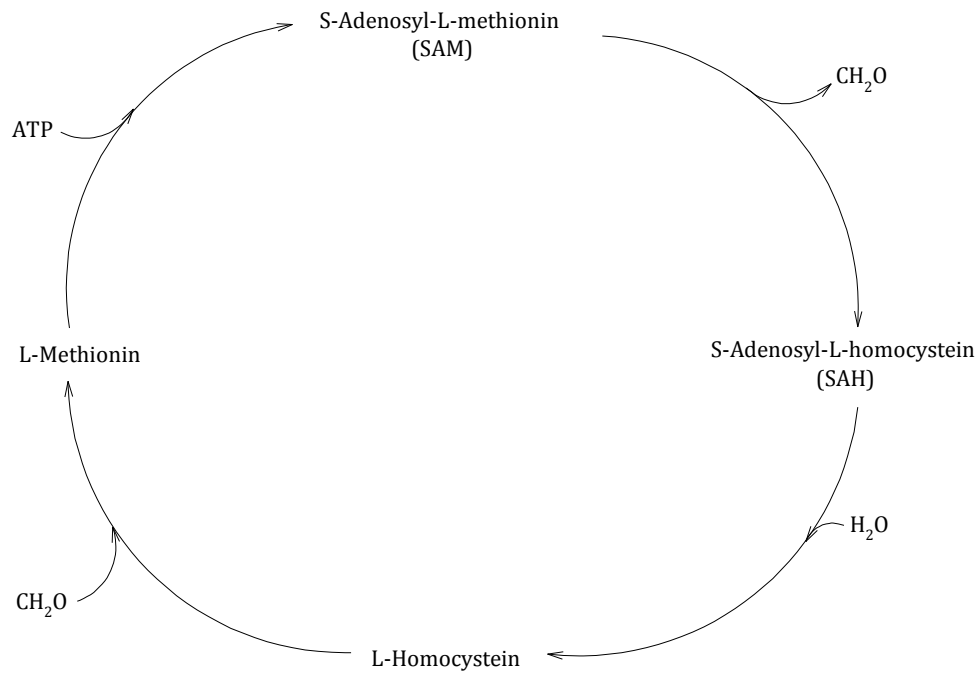


Abbildung 2-12: SAM-Metabolismus

SAM ist der wichtigste Überträger von Methylgruppen, da es durch die positive Ladung am Schwefel direkt an der Methylgruppe im Vergleich mit THF die Abgabe deutlich fördert [18].

#### 2.2.1.5. Der Abbau von Aminoaceton und Methylamin durch SSAO

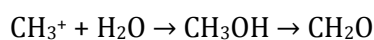
Liegt eine erhöhte SSAO - Aktivität vor, so führt dies zu oxidativem Stress und Protein-Verlinkung [42]. Weiterhin wird Formaldehyd auf mannigfaltigen Wegen als Hydroxymethylgruppe in vielen verschiedenen Molekülen eingebaut und so abgebaut [42].

#### 2.2.1.6. Formaldehyd in der nicht enzymatischen Protein-Methylierung

Formaldehyd ist nicht nur ein spontanes Methylierungsmittel sondern auch ein simultanes Formylierungsmittel für Aminosäuren, aliphatische Amine und Nucleinsäurebasen speziell für L-Lysin und L-Arginin. Diese beiden Aminosäuren wirken als Antagonisten für Formaldehyd [34]. Die methylierten Derivate von L-Lysin steigern die Zellproliferation, die methylierten Derivate der L-Arginin entgegen hemmen sie [34].

#### 2.2.1.7. Formaldehyd im Zusammenhang mit Methylierungssubstanzen

Formaldehyd wird auch aus der direkt methylierenden Species  $\text{CH}_3^+$  gebildet, indem  $\text{CH}_3^+$  mit Gewebswasser zu Methanol reagiert, welches in vivo zu Formaldehyd oxidiert wird [61].



Da  $\text{CH}_3^+$  auch beim Abbau von Hydrazinen und Nitroso-Verbindungen entsteht, entsteht hier ebenfalls Formaldehyd [34].

#### **2.2.1.8. Cytochrom P 450**

Wie schon in der 1 erwähnt, gibt es einen unspezifischen Weg auf dem Formaldehyd, dort gebildet wird, „wo er nicht hingehört“, nämlich aus Stoffen, die dadurch kanzerogen werden, da der Körper an dieser Stelle keinen Abbauweg für Formaldehyd vorgesehen hat [38]. Diese Cytochrom P 450 Isoenzyme verbrauchen Wasserstoffperoxid und bilden angeregten Formaldehyd. Dieser angeregte Formaldehyd ist ein Biradikal [62], wobei die C-O-Bindung Biradikalcharakter aufweist. Dieses Biradikal extrem reaktiv gegenüber der DNA und RNA und reagiert noch schneller mit dieser unter in 2.2.4.2 angesprochenen Reaktionen.

#### **2.2.2. Formaldehyd in Tumorzellen**

Tong et al. bestimmten 2010 den Formaldehydgehalt in Rattenbrustkrebszellen, menschlichen Lungenkrebszellen, Brustdrüsenkrebszellen, Knochenmarkkrebszellen und fanden heraus, dass in jeder Krebszelle der Formaldehydgehalt gegenüber gesunden Zellen signifikant erhöht war [12]. Der Stoffwechsel einer an Krebs erkrankten Zelle ist auf viele Arten anders als der einer gesunden Zelle [63]. Wie schon in Abschnitt 2.2.1.3. erläutert, ist Formaldehyd eine wichtige Komponente im Ein-Kohlenstoffzyklus. 1977 stellten Thorndike et al. fest, dass Lymphozyten mehr Formaldehyd produzieren als Granulozyten. Ihr Verdacht war die Existenz eines Enzyms, das  $\text{N}^5$ -Methyl-THF in Tetrahydrofolat und Formaldehyd überführt [64], denn in Lymphozyten ist die Übertragung einer Methylgruppe auf Amine enzymatisch, da  $\text{N}^5$ -Methyl-THF enzymatisch zu  $\text{N}^5\text{N}^{10}$ -Formyl-THF oxidiert wird und nicht abhängig von der Methyltransferase ist. Dabei zerfällt das Zwischenprodukt in Tetrahydrofolat und Formaldehyd. Es gibt in diesem Zyklus zwei Enzyme, deren Gehalt in krebserkrankten Lymphozyten deutlich erhöht ist, die  $\text{N}^5\text{N}^{10}$ -Formyl-THF-Reduktase und die  $\text{N}^5$ -Methyl-THF-Homo-cysteine-Methyltransferase. Beide produzieren Formaldehyd, wodurch der erhöhte Formaldehydgehalt im Urin leukämiekranker Menschen zu erklären ist. Weiterhin ist der Zellstoffwechsel einer Tumorzelle erhöht, wodurch der Formaldehydspiegel in der Zelle und der Zellumgebung erhöht ist. So wurde in der Atemluft von Brustkrebs und Lungenkrebspatienten ein signifikant erhöhter Formaldehydgehalt gegenüber gesunden Probanden festgestellt [65] und ein erhöhter Formaldehydgehalt in diesen Krebszellen [12]. Fuchs et al. haben allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen an Lungenkrebs erkrankten und nicht Lungenkrebspatienten festgestellt [66].

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die folgenden Faktoren den Formaldehydgehalt in Krebszellen und Zellumgebung erhöhen:

- die gestiegene Zellteilungsrate und der damit verbundene beschleunigte Zellstoffwechsel
- eine erhöhte Lipidperoxidation
- im Fall von Leukämie, die erhöhte Zahl Formaldehyd produzierender Enzyme

Da Formaldehyd ein Stoffwechselmetabolit ist, ist der Formaldehydgehalt nur in der Zelle und der Zellumgebung erhöht. Also in der Atemluft bei Brust- und Lungenkrebs [3] und in Urin bei Urogenitalkrebs wie Prostata- oder Blasenkrebs und Leukämie [2, 64].

### **2.2.3. Formaldehyd und andere Krankheiten**

Formaldehyd scheint auch im Zusammenhang mit anderen Krankheiten zu stehen, wie:

- Karies in verschiedenen Entwicklungsstadien [67-69] und paradontösen Zähnen, dies führt zu einem erhöhten Formaldehydgehalt in Speichel und Zahnmaterial [70, 71]
- Diabetes [72, 73]
- In virus- oder mikrobakteriell befallenen Geweben und Geweben, die Hitze ausgesetzt waren oder mit schädigenden Substanzen versetzt wurden ist der Formaldehydgehalt deutlich erhöht, bei einer gleichzeitigen Erniedrigung der als formaldehydproduzierend bekannten methylierten Substanzen [74].

### **2.2.4. Formaldehyd als Krankheitsauslöser**

#### **2.2.4.1. Allgemein**

Formaldehyd ist eine janusköpfige Chemikalie, denn Formaldehyd ist nicht nur ein Stoffwechselmetabolit und eine Indikator, sondern selbst auch ein Verursacher von Krankheiten.

„...formaldehyd has a “double face”, it is indispensable in biological systemy, but under certain conditions (e.g., in excited state, in random methylation reaction or when its local concentration is increased to a high level etc.) it may be deleterious, toxic, mutagenic, or a carcinogenic compound.”[61]

Formaldehyd gilt als stark allergieauslösende Chemikalie [75] und ist, als eine der die oberen Atemwege am stärksten reizende Chemikalie, vom Menschen schon ab einer Konzentration von 0,15ppm wahrnehmbar [35]. Eine Exposition führt je nach der Konzentration, der man ausgesetzt war, zu



- Augenreizungen und Reizungen der oberen Atemwege [76-78]
- Kopfschmerzen [76-78]
- Schwindel [76-78]
- Müdigkeit [76-78]
- Gedächtnisverlust [76-78]
- Durst [76-78]
- Husten [76-78]
- Asthma [76-78]
- Bewusstseinsverlust [76-78]
- Gefäßkollaps [76-78]
- Lungenentzündung [76-78]
- Blutungen [76-78].
- Einer Schädigung des Frontalen Cortex und Hippocampus [79].
- in den Lungenzellen beim Einatmen Apoptosis [80]
- chronische irreversible neurologische Beeinträchtigung [81], bei längerer Exposition

Gasförmiger Formaldehyd kann in der Nase absorbiert [76] und in den Nasenschleimhäuten durch Formaldehyddehydrogenase mithilfe von NAD<sup>+</sup> und GSH zu Formiat oxidiert werden [35, 82, 83].

#### **2.2.4.2. Zytotoxizität**

Der im Körper entstandene überschüssige Formaldehyd kann viele metabolische Reaktionsschritte besonders bei der Umsetzung von Aminosäuren und im Citratcyclus [84] stören. Formaldehyd hemmt:

- die Oxidation von Succinat, Glutamat,  $\alpha$ -Oxoglutarat und Pyruvat
- die Dinitrophenol stimulierte Adenosin-Triphosphatase (ATPase)
- die ATP-abhängige Rücknahme des Elektronentransportes in den submitochondrialen Partikeln
- den Phosphattransport
- die Leucyl-RNA-Synthetase und damit die Protein-Biosynthese

Weiterhin greift Formaldehyd die NAD-Flavin-Region der Atmungskette an. Alle diese Auswirkungen sind dafür verantwortlich, dass Formaldehyd selbst als zytotoxisch, mutagen und kanzerogen klassifiziert wird [35, 57, 76, 85, 86].

Neben der Hemmung der oben genannten Prozesse kann Formaldehyd aber auch „klassisch chemisch“ schädigen, indem er mit Aminosäuren, Proteinen, Nukleosiden, Nukleotiden,

Nukleinsäuren und Nukleoproteinen reagiert und kovalente Bindungen mit DNA und RNA bildet. Dies begründet seine Mutagenität und Genotoxizität [35, 74, 82, 83, 87, 88]. Als Beispiel ist in Abbildung 2-13 die Reaktion zwischen Formaldehyd und Adenin gezeigt [89].

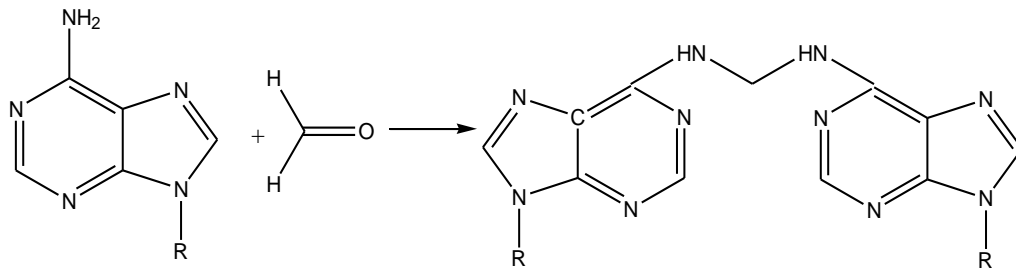


Abbildung 2-13: Reaktion von Formaldehyd mit Adenin

Durch solche Veränderungen der DNA kann es zu Punktmutationen am genetischen Material, Brüchen der DNA und Chromosomenaberrationen kommen [76, 85, 87, 88].

Zusammenfassend kann man sagen, dass Formaldehyd selbst die DNA und RNA auf zwei Wegen methylieren kann [34]:

1. Methylierung über den Ein-Kohlenstoff-Zyklus, Formaldehyd wird enzymatisch in S-Adenosyl-L-Methionin eingebaut
2. Direkte spontane Methylierung
  - 2.1. Direkt über S-Adenosyl-L-methionin
  - 2.2. Durch direkte spontane Methylierungsreaktionen von Formaldehyd mit Proteinen und Basen in Nucleinsäuren, wie oben beschrieben

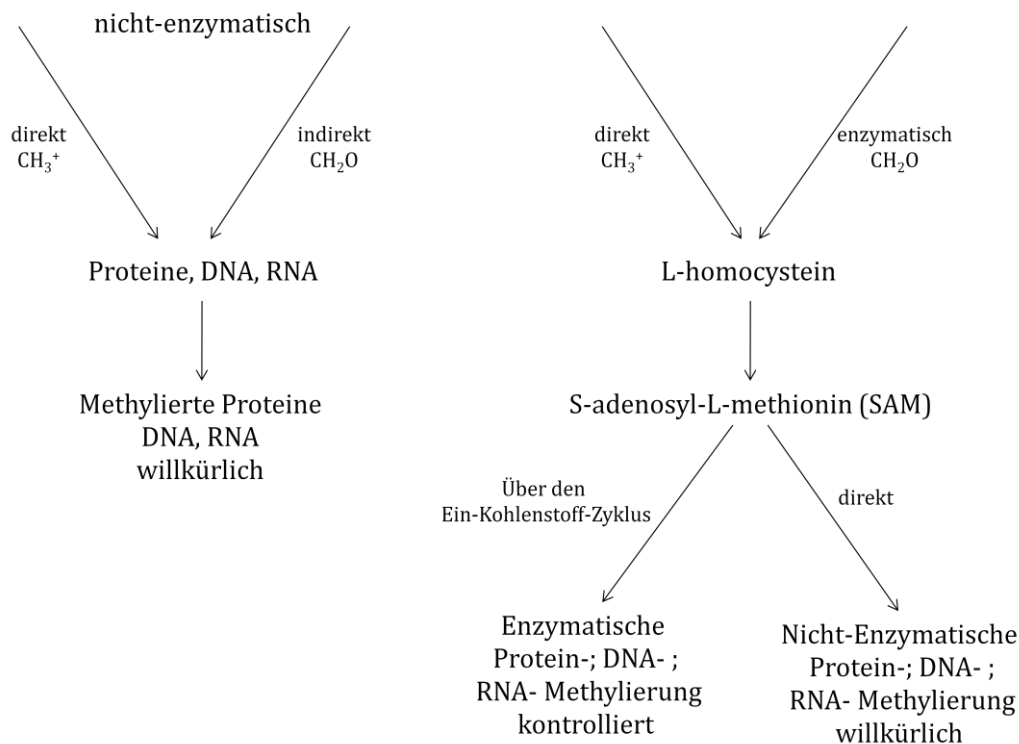
Aufgrund der in vivo Reaktion von  $\text{CH}_3^+$ , das bisher als der ultimative carcinogene Metabolit gilt,

„The liberated  $\text{CH}_3^+$  is assumed to be the ultimate carcinogenic metabolite methylating the macromolecular cellular components such as proteins, DNA, RNA, etc.”[34]

ist es schwierig, zwischen  $\text{CH}_3^+$  und Formaldehyd als methylierendes Agens zu unterscheiden.

„Our results strongly suggest that it is difficult to differentiate between the direct methylation with  $\text{CH}_3^+$  and direct methylation with formaldehyde in in vivo experiments, because both compounds could be liberated simultaneously from DMN (N-Methyl-diazohydroxid) in in vivo metabolism.”[34]

Die folgende Abbildung verdeutlicht nochmals die verschiedenen Methylierungswege des Formaldehyds [61].



**Abbildung 2-14: direkte, nicht enzymatische und enzymatische Methylierung**

Eine weitere Komponente der Kanzerogenität von Formaldehyd ist die Erhöhung der Zellumsatzzahl und die damit verbundene Erhöhung des Zellwachstums, der Proliferation des Zellgewebes [35, 85]. Gleichzeitig ist diese Genotoxizität von Formaldehyd umstritten [90-94], so dass Schmid et al. zwar die formaldehydinduzierten DNA Crosslinks und auch den Schwester-Chromatid-Austausch nachgewiesen, aber die cytogenetischen Effekte in Blutkulturen als unwahrscheinlich eingestuft haben [95]. Costa et al. haben herausgefunden, dass die Genotoxizität beim Einatmen zumindestens nicht ausgeschlossen werden kann. [96], wohingegen Costa et. al und Speit et al. nach Inhalation von Formaldehyd keinerlei signifikante genotoxische Effekte auf Broncho-alveolar-Zellen [93], bzw. keine systematischen genotoxische Effekte im Blut [92] nachweisen konnten. Die Kanzerogenität ist zumindestens für Tieren in Form von ausgelösten Nasaltumoren [90], aber noch nicht bei Menschen belegt [97] und auch von einigen Quellen bestritten [91]. Heck et. al widersprechen ebenfalls dem leukemieauslösendem Effekt von eingeatmetem Formaldehyd [56].

## **2.2.5. Nachweismethoden für Formaldehyd**

### **2.2.5.1. Überblick**

Es gibt eine Vielzahl an Nachweismöglichkeiten für Formaldehyd in verschiedenen Matrizen. Dabei sollte man direkte und indirekte Nachweismöglichkeiten unterscheiden. Direkte Nachweismöglichkeiten sind:

- Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer (FTIR) [98, 99]
- Selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS) [2, 100, 101]
- Resonance Enhanced Multi-Photon Ionization mass spectrometry (REMPI-MS) [102]
- Polarographie [103]

Es gibt nur so wenige direkte Formaldehydnachweise, da der Stoßquerschnitt so klein ist [104], dass ein spektroskopischer Nachweis enorm aufwändig und komplex ist. Alle diese Möglichkeiten wurden hier aufgrund ihres großen technischen Aufwandes außerachtgelassen.

Für den indirekten Formaldehydnachweis gibt es eine deutlich größere Zahl an Nachweismöglichkeiten. Um einen verständlichen Überblick zu geben, sollte man im ersten Schritt die Detektionsart und die vorhergehende Derivatisierung von Formaldehyd differenzieren. Folgende Detektionsarten werden benutzt:

- UV-VIS-Absorption [51, 72, 77, 105-130] [108, 131-136]
- Massenspektrometrie [51, 113, 133, 137-153]
- Polarographie [154]
- Electron Capture Dissociation (ECD) [141, 147, 155-157]
- Flammenionisationsdetektor (FID) [150, 158-160]
- Fluoreszenz [118, 161-164] [165-168] [164] [69, 166-172]
- Nitrogen phosphorus detector (NPD) [4, 51, 86, 173-178]
- Amperometrie [179]
- Elektrochemisch [73]
- Radiometrisch [180]
- Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) [151, 152]

Folgende Derivatisierungsreagenzien werden eingesetzt:

- Chromotropsäure [105, 107, 181, 182]
- Diphenylhydrazon (DNPH) [51, 72, 77, 108-113, 137, 154, 155]
- 4-Pentafluorophenylhydrazinhydrochlorid (PFPH) [113, 138, 139]

- O-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)-hydroxylamin (PFBHA) [51, 140-148, 156, 158-160]
- N-methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzo-furazan (MNBDH) [114, 115]
- 3-Methyl-2-benzothiazol-hydrazon (MBTH) [116-119]
- Cysteamin [4, 51, 86, 173-178]
- Dopamin
- Dansylhydrazin [161]
- Phenylhydrazin [120, 121]
- Tryptophan [122]
- Brilliantgrün [123]
- Malachitgrün [124]
- Tetrasubstituiertes Amino-aluminium-phtalocyanin (TAAIPc) [162]
- Pararosanilin [125-127]
- Formaldehyddehydrogenase [128, 179]
- 2,4-Pentadion [129-131, 150, 157, 164-169, 183]
- 5,5-Dimethyl-1,3-cyclohexadion (Dimedon) [69, 73, 132, 133, 135, 136, 149, 151, 180, 184, 185]
- 1,3-Cyclohexadion (CHD) [166]
- Acetoanilid [170-172]

Für eine bessere Verständlichkeit folgt eine tabellarische Übersicht, in deren Anschluß sich eine Übersicht derjenigen Kombinationen befindet, die nur einmal aufgetreten sind

Derivatisierung	UV-VIS	APCI-MS	ECD	MS	FID	Fluoreszenz	NPD	Elektro-chemisch
2,4-Pentadion	[129] [130, 131]	[149]	[157]	[150]	[150]	[163, 164] [165-168] [167-169]		
Acetoanilid						[170-172]		
Brilliantgrün	[123]							
CHD						[166]		
Chromotropsäure	[105-107]							
Cysteamin							[4, 51, 86, 173-178]	
Dansylhydrazin						[161]		
Dimedon	[108, 132, 134-136]			[133]		[69]		[73]
DNPH	[51, 72, 77, 108-113]	[137]	[155]					
Dopamin								[73]
Formaldehyd-dehydrogenase	[128]							[179]
Malachitgrün	[124]							
MBTH	[116-119]					[118]		
MNBDH	[114, 115]							
Pararosanilin	[125-127]							
PFBHA			[147, 156]	[51, 143-147]	[158-160]			
PFPH				[113, 139]				
Phenylhydrazin	[120, 121]							
TAAIPc	[162]							
Tryptophan	[122]							

- Polarographie mit DNPH [154]
- ID-MS mit PFPH [138]
- CI-Iontrap-MS mit PFBHA [140]
- NCI-MS mit PFBHA [141, 148]
- MI-MS mit [142]
- ESI-MS mit 2,4 Pentadion [149]
- Radiometrisch mit Dimedon [180]
- OPLC mit Dimedon [67-69, 151]
- NMR mit Dimedon [151, 152]
- EI-MS mit Dimedon [151, 152]
- Maldi-MS mit Dimedon [153]

Oft setzt eine solche Vorbereitung eine sich anschließende Trennung voraus. Die folgenden Trennmethode werden benutzt:

- High pressure liquid chromatography (HPLC) [72, 77, 108-110, 112, 113, 137] [114, 115] [73] [161] [130, 131, 149] [73, 132, 134, 135, 153]
  - Gaschromatographie (GC) [155] [113, 138, 139] [141, 148] [158-160] [51, 143-147] [4, 51, 86, 173-178] [150] [129] [157]
- Over pressure liquid chromatography (OPLC) [136, 152] [151] [67-69, 153]
- Dünnschichtchromatographie (DC) [180]
- Liquid chromatography (LC) [133]

Auch hier soll eine nachfolgende tabellarische Übersicht gegeben werden:

Derivatisierung	keine	HPLC	GC	OPLC	DC	LC
2,4-Pentadion	[163, 164] [165-168] [167-169]	[130, 131, 149]	[150] [129] [157]			
Acetoanilid	[170-172]					
Brilliantgrün	[123]					
CHD	[166]					
Chromotropsäure	[105-107]					
Cysteamin			[4, 51, 86, 173-178]			
Dansylhydrazin		[161]				
Dimedon	[185]	[73, 132, 134, 135, 153]		[136, 152] [151] [67-69, 153]	[180]	[133]
DNPH	[154] [137]	[72, 77, 108-110, 112, 113, 137]	[155]			
Dopamin		[73]				
Formaldehyddehydrogenase	[179] [128]					
Malachitgrün	[124]					
MBTH	[116-119]					
MNBDH		[114, 115]				
Pararosanilin	[125-127]					
PFBH			[113, 138, 139]			
PFBHA	[140] [142]		[141, 148] [158-160] [51, 143-147]			
Phenylhydrazin	[120, 121]					
TAAIPc	[162]					
Tryptophan	[122]					



Mit all diesen Möglichkeiten ist Formaldehyd in

- Luft [106, 111, 112, 114, 118, 125, 126, 137, 140, 157, 159, 161, 165-168, 185-193]
- Abgasen [98, 110, 175]
- Rauch [143]
- Regenwasser [119]
- Wasser [155, 170-172]
- Abwasser [124, 194]
- Urin [2, 53, 72, 73, 77, 100, 132, 169, 180, 195-204]
- Speichel [69, 108]
- Atemluft [183]
- Gewebe [6, 51, 205, 206]
- Fisch [128, 176]
- Ausgasungen von Holzverbundwerkstoff [207, 208]
- Zigarettenrauch [86, 177]
- Kosmetik und Haushaltschemikalien [139, 209]
- Fingerfarben [129, 150]
- emittiert von Kleidung [130]
- in Algen [151]
- Pflanzen [135, 136]
- Pilzen [152]
- Weintrauben [153]
- Gefäßsporenpflanzen [134]
- feuchten Babytüchern [131]

nachgewiesen worden. Auf die einzelnen Detektionsmöglichkeiten soll hier nicht weiter eingegangen werden. Im Folgenden sollen allerdings die verschiedenen Derivatisierungsmöglichkeiten, sowie die verschiedenen weiteren Möglichkeiten Formaldehyd nachzuweisen vertiefend erläutert werden.

#### **2.2.5.1.1. Spektroskopischer und massenspektrometrischer Nachweis**

Begonnen werden soll dieser Überblick mit den wenigen direkten Formaldehydnachweisen. Formaldehyd lässt sich auch spektroskopisch nachweisen. So wurde 1978 während einer Smogperiode in Claremont, Kalifornien mit einer Langwegabsorptionszelle Formaldehyd mit FTIR neben anderen Stoffen wie Salpetersäure, Ameisensäure, PAN und Ozon bestimmt [99]. FTIR-Spektroskopie wurde auch zum Nachweis von Formaldehyd in Autoabgasen eingesetzt [98]. Formaldehyd wurde in Luft auch durch REMPI-MS nachgewiesen [102].

### 2.2.5.1.2. Chromotropsäure (1,8-dihydroxynaphtalen-3,6-di-sulfonsäure)

Einer der ältesten Formaldehydnachweise ist der Chromotropsäurenachweis, der 1937 von Edwin Eegriwe vorgestellt wurde. Chromotropsäure reagiert mit Formaldehyd zu einem violetten Komplex, der bei 580 nm colorimetrisch detektiert werden kann [105]. Der Mechanismus der ablaufenden Reaktionen wurde erstmals von Georghiou et al. 1988 vorgestellt. Sie postulierten, dass sich in einem ersten Schritt ein Formaldehyd-Chromotropsäure-Addukt (A) bildet. Anschließend wird dieses Addukt durch konzentrierte Schwefelsäure zu einem Dibenzoxanthen ähnlichem Produkt (B) dehydriert. Dieses wird darauffolgend ebenfalls durch die Schwefelsäure zum Monokation (C) oxidiert, das die Hückel-Regel befolgt und somit besonders stabil ist [181]. Die Schwefelsäure erfüllt also zwei Aufgaben, sie dehydriert und oxidiert, so dass der Einsatz von konzentrierter Schwefelsäure nötig wird [181]. Diese sollte zwischen 86% und 96% liegen [182] und hat einen größeren Einfluss auf die Ausbeute, als die Chromotropsäurekonzentration. Die Färbung ist weiterhin abhängig von der Formaldehydkonzentration und der Temperatur.

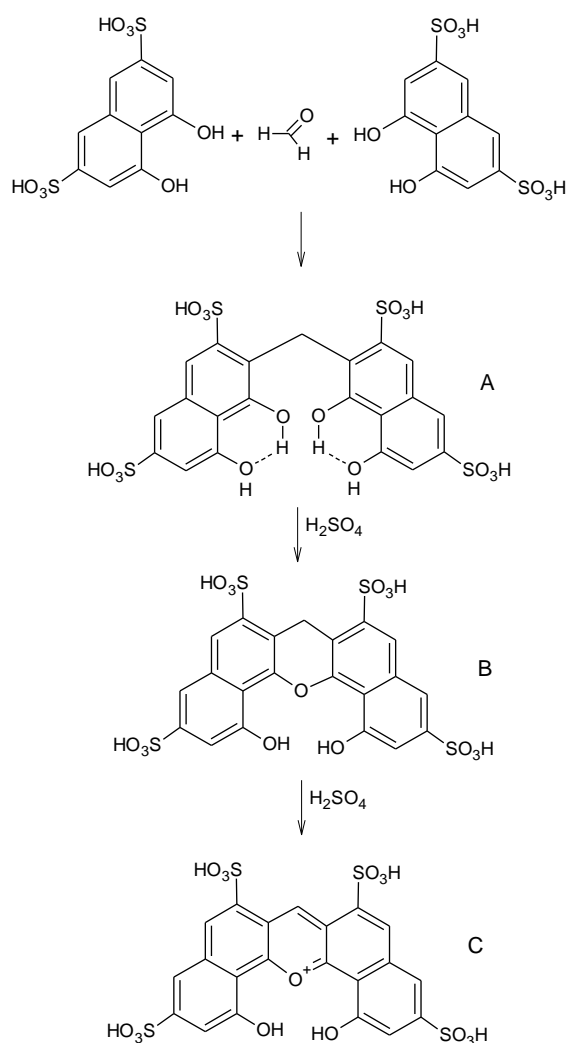


Abbildung 2-15: Mechanismus Chromotropsäurenachweis

1962 stellten Sawicki et al. Variationen dieses Nachweises vor, indem sie Chromotropsäure durch 6-Amino-1-naphtol-3-sulfonsäure (J-Acid), bzw. 6-Anilin-1-naphtol-3-sulfonsäure ersetzten. Dadurch erzielten sie eine größere Empfindlichkeit gegenüber Formaldehyd [107]. Clermont et al. nutzten 1976 und Silberstein 1990 den Chromotropsäurenachweis um Formaldehyd aus Holzprodukten nachzuweisen [207, 208] und Pretto et al. stellten die Möglichkeit 2000 vor, die Reaktion in einem Tropfen Chromotropsäure ablaufen zu lassen. Dabei wird die Farbänderung des Tropfens mit einer LED als Lichtquelle und Photodioden als Detektoren beobachtet. So wurde der Bedarf an Chemikalien für den Nachweis drastisch erniedrigt [106]. 2004 entdeckten Gigante et al. eine Möglichkeit auf die Schwefelsäure zu verzichten, indem sie diese durch eine Mischung aus Phosphorsäure und Wasserstoffperoxid, sowie der Behandlung in einer Mikrowelle ersetzten [210].

Der größte Nachteil des Chromotropsäurenachweises sind die drastischen Reaktionsbedingungen, da in heißer konzentrierter Schwefelsäure [184, 211] oder einer Mischung aus Phosphorsäure und Wasserstoffperoxid [210] gearbeitet wird. Ein weiterer Nachteil liegt darin, dass andere Aldehyde und Ketone den Nachweis stören und dieser somit nicht für Proben, die andere Aldehyde oder Ketone enthalten geeignet ist [212]. Aus diesem Grund zogen Gryllaki-Berger et al. 1992 die Hantzsch Reaktion dem Chromotropsäurenachweis zum Nachweis von Formaldehyd in Haushaltschemikalien vor, da der Chromotropsäurenachweis einen zu großen Anteil an Fehlfärbungen oder falsch-positiven Ergebnissen aufweist [209]. Weiterhin stören auch Nitrite und Nitrate den Nachweis durch Fehlfärbungen [213]. Auch Rodriguez et al. gaben der Hantzsch-Reaktion mit dem Nash-Reagenz, sowie dem Nachweis mit MBTH den Vorzug vor dem Chromotropsäurenachweis, da diese beiden Nachweise sensitiver, schneller und leichter zu handhaben sind [118].

#### **2.2.5.1.3. Formaldehydnachweise mit Hilfe von Derivatisierungen**

Aufgrund seiner guten Wasser- und Fettlöslichkeit in Verbindung mit der hohen Flüchtigkeit wird Formaldehyd oft erst nach dem Ablaufen einer Derivatisierungsreaktion nachgewiesen [51, 146]. Diese Derivatisierungen bieten den Vorteil, dass konventionelle Detektoren, wie z.B. ein UV/VIS-Detektor im Anschluss einer GC-Trennung eingesetzt werden können [158]. Die Bildung von Hydrazonen ist dabei eine der beliebtesten Derivatisierungen. Formaldehyd reagiert dabei in einer nukleophilen Addition an den Carbonylkohlenstoff des Formaldehyds durch verschiedene Hydrazine, die im Folgenden vorgestellt werden sollen, zu einem Hydrazone.

### 2.2.5.1.3.1. 2,4-Diphenylhydrazin

Das am häufigsten eingesetzte Hydrazin ist 2,4-Diphenylhydrazin (DNPH) [51, 108, 140]. Dessen Reaktionsprodukt wird nach HPLC-Trennung durch UV/VIS-Detektion nachgewiesen. DNPH wird unter sauren Bedingung zum Hydrazone derivatisiert [77].

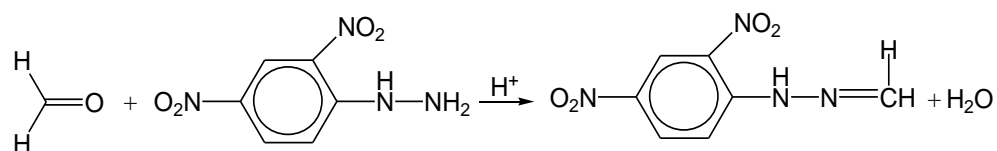


Abbildung 2-16: Reaktion von Formaldehyd mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu 2,4-Dinitrophenylhydrazon

Da hier oft noch eine nachfolgende Trennung eingesetzt wird, lassen sich mehrere Aldehyde nebeneinander nachweisen [72, 77, 108-110, 112, 113, 137]. Anschließend werden verschiedene Detektionsmethoden, wie ein APCI-MS-System (atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry) im negativen Ionisierungsmodus [137] oder auch UV-Detektoren eingesetzt [72, 108-113]. Eine weitere Möglichkeit ist das gebildete Hydrazone polarographisch nachzuweisen. Da Formaldehyd in seiner hydratisierten Form  $[\text{CH}_2(\text{OH})_2]$ , aber polarographisch nicht bestimmbar ist, kann die Derivatisierung zu dem Hydrazone auch zur indirekten Formaldehydbestimmung mithilfe der Wechselstromvoltammetrie mit stationärer Quecksilberelektrode benutzt werden [154]. Formaldehyd kann aber auch polarographisch gemessen werden, indem man im alkalischen Medium misst, da dann das Gleichgewicht auf der Seite der deprotonierten, polarographisch bestimmbaren Form  $[\text{H}_2\text{C}(\text{OH})\text{O}^-]$  liegt [103]. Auch der Nachweis des gebildeten Hydrazons durch GC-ECD wurde durchgeführt und ist für einen Nachweis in Wasser sehr gut geeignet, da durch die GC viele störende Substanzen abgetrennt werden [155].

### 2.2.5.1.3.2. 4-Pentafluorphenylhydrazinhydrochlorid

Derivatisiert man Formaldehyd mit PFPH, so bildet sich ein Hydrazone (Abb. 2-9), welches mit GC-MS oder auch mit Headspace GC-MS oder ID-MS nachgewiesen werden kann [113, 138, 139].

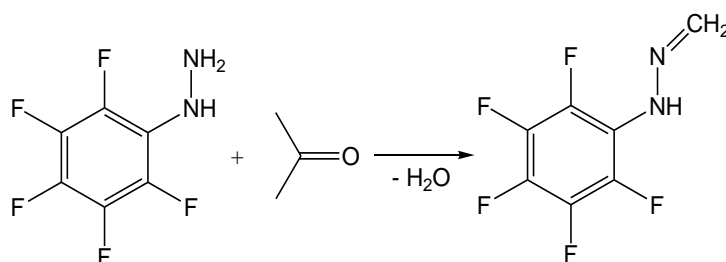


Abbildung 2-17: Reaktion von Formaldehyd mit Pentafluorphenylhydrazin zum Hydrazone

Wird Formaldehyd in städtischer Umgebung gemessen, so werden mit PFPH beschichtete Kieselerdepatronen eingesetzt, durch die Luft geleitet wird. Anschließend werden die Patronen mit einem Dichlormethan-Acetonitril-Gemisch gespült, dieses eingedampft, wieder in Trichlormethan gelöst und auf eine GC gegeben [113]. Für eine sich anschließende GC-Untersuchung eignet sich eine Derivatisierung mit PFPH eher als die mit DNPH, da die meisten anderen Carbonyle, die neben Formaldehyd nachgewiesen werden sollen, mit DNPH schwerer flüchtige Derivate bilden [51].

#### 2.2.5.1.3.3. *o*-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)-hydroxylamin PFBHA

Während der Derivatisierung von Formaldehyd mit PFBHA entsteht ein Oxim [158]

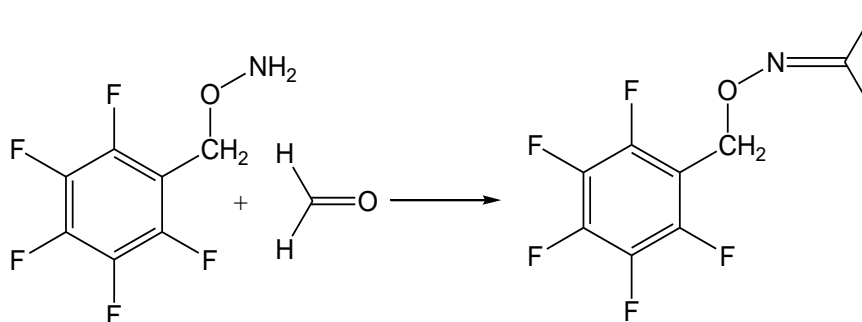


Abbildung 2-18: Reaktion von Formaldehyd mit PFBHA zum Oxim

Das gebildete Oxim wurde anschließend mit CI-Ion-Trap-MS [140], GC-NCI-MS [141] oder MIMS [142] nachgewiesen. Für Headspace-Untersuchungen von Kosmetika und Bauprodukten [158] oder Innenraumluftuntersuchungen [159] werden direkt mit PFBHA beschichtete Festphasenextraktionsfasern eingesetzt und das gebildete Derivat dann mit GC-FID nachgewiesen. Zur Untersuchung chinesischer Räucherstäbchen [143] oder Luft [160] wird die SPME-GC-MS, bzw. SPME-GC-FID eingesetzt. Bei der Untersuchung von wässrigen Proben wird die Aufgabeeinheit einer MIMS direkt in der Flüssigkeit eingesetzt und mit EC im negativen Ionenmodus gekoppelt [142] oder eine HS-GC/MS durchgeführt [145] und für wässrige Extrakte von Haushaltsprodukten [144] oder Wasser, bzw. Rattenurin nach Gabe von Chemikalien, die oxidativen Stress auslösen [141] ebenfalls die HS-GC/MS (im NCI-Modus) eingesetzt. Weiterhin wurde für die Untersuchung in wässriger Phase eine HS-SPME-GC-MS eingesetzt [146]. Die Headspace-Methode wurde für die Analyse verschiedener Carbonyle mit einer ECD gekoppelt [156]. Für die Untersuchung von Luft wird ein Tenax TA Kugel mit PFBHA beschichtet und das Oxim anschließend mit Hexan desorbiert und mit einer GC vermessen [147]. Die Derivatisierung mit PFBHA wird auch zum Nachweis von Carbonylen in pharmazeutischen Produkten kombiniert mit einer SHS-GC-(NCI)-MS eingesetzt [148]. Die Detektion mit der PFBHA-Derivatisierung ist oft bevorzugt, wenn verschiedene Carbonyle gleichzeitig nachgewiesen

werden sollen [214] und der Derivatisierung mit PFBH bei Derivatisierungen auf der Faser vorzuziehen [146].

#### 2.2.5.1.3.4. *N*-Methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzofurazan (MNBDH)

Eine häufig auf Formaldehyd untersuchte Matrix ist Luft. Da sowohl Stickstoffdioxid als auch Ozon die Reaktion von Formaldehyd mit dem häufig eingesetzten DNPH stören, indem sie mit dem Reagenz und dem gebildeten Hydrazon reagieren [114], benutzen Büldt et al. MNBDH, das durch Ozon und Stickstoffdioxid zum leicht abtrennbaren *N*-methyl-4-amino-7-nitrobenzofurazan (MNBDA) reagiert und somit den Nachweis nicht stört.

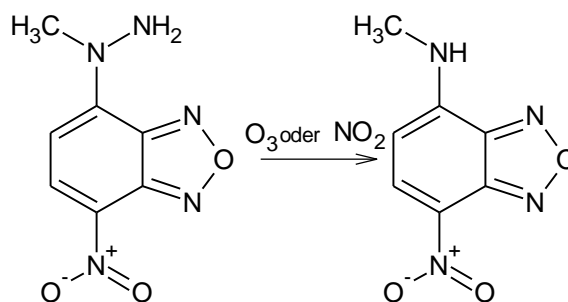


Abbildung 2-19: Reaktion von MNBDH zu MNBDA

MNBDH reagiert mit Formaldehyd zum Hydrazon, das nach HPLC-Trennung mit einem UV/VIS-Spektrometer nachgewiesen werden kann.

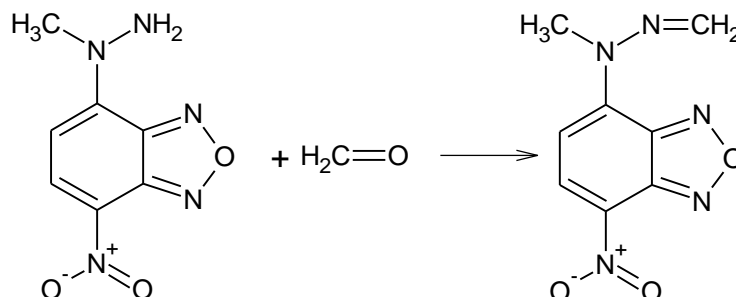


Abbildung 2-20: Reaktion von Formaldehyd mit MNBDH

Anschließend stellten Büldt et al. eine Alternative zu den mit DNPH beschichteten Sammelvorrichtungen vor, indem Sie mit MNBDA beschichtete Glasfaserfilter benutzten, auf denen die Derivatisierung abläuft. Das gebildete Hydrazon wird desorbiert und nach HPLC-Trennung mit einem UV/VIS-Detektor bei 474 nm bestimmt [115]. Die Derivatisierung mit MNBDH weist neben den oben genannten Vorteilen auch noch eine höhere Selektivität, niedrigere Nachweisgrenzen und eine kürzere Reaktionszeit als bei Verwendung von DNPH auf [114].

### 2.2.5.1.3.5. 3-Methyl-2-benzothiazol-hydrason

Mit 3-Methyl-2-benzothiazol-hydrason kann Formaldehyd zu 3-Methyl-2-benzothiazin reagieren, das zum reaktiven Kation oxidiert wird und mit dem Thiazin zu einem blauen Farbstoff reagiert, der dann colorimetrisch bestimmt werden kann [116]. Auch Kamata et al. setzten diese Nachweismethode zur Detektion von Formaldehyd ein [117] und Rodriguez et al. fanden eine Möglichkeit diesen Nachweis als "Stopped Flow technique" zu nutzen, wodurch die Reaktionszeit von 30 min. auf 3 s. verkürzt werden konnte [118]. 2008 entwickelte Murai et al. die Methode insofern weiter, als das sie nach der Reaktion das Produkt als Kation abfiltrieren. Anschließend wird der Filter gespült und die Absorption der Lösung gemessen. So wird die Reaktionszeit auf 20 min verkürzt [119]. Die Reaktion läuft in drei Schritten ab (Abbildung 2-21). Ein Molekül 3-Methyl-2-benzothiazol-hydrason (A) reagiert mit Formaldehyd zum Azin (B) und ein Molekül 3-Methyl-2-benzo-thiazol-hydrason (A) wird zum Kation oxidiert (C). Aus B und C wird dann der blaue Farbstoff (D) gebildet, der bei 670 nm detektiert wird [117].

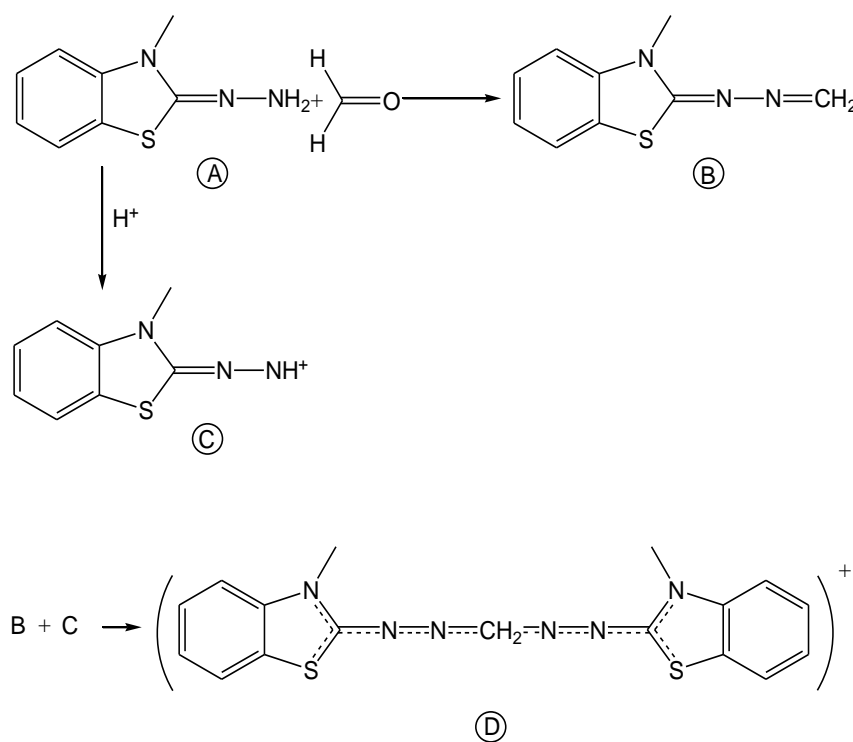


Abbildung 2-21: Reaktion von Formaldehyd mit 3-Methyl-2-benzothiazol-hydrason

### 2.2.5.1.3.6. Cysteamin

Die Derivatisierung von Formaldehyd mit Cysteamin benutzten Ebeler et al. zum Nachweis von Formaldehyd in Gewebeproben, wobei das gebildete Thiazolidin [51] durch GC/NPD (Stickstoff-Phosphor-Detektor) nachgewiesen wird [4]. Die gleiche Vorgehensweise nutzten Tamura et al., um Formaldehyd als das am häufigsten gebildete Produkt der Lipidperoxidation nachzuweisen [173] und Wong et al. für den Nachweis von Formaldehyd als

Lipidperoxidationsprodukt von Fettsäureethylestern [174]. Yasuhara et.al nutzten 1994 und 1995 diese Methode um Formaldehyd in Autoabgasen [175] und der Headspace über erhitztem Fisch [176] nachzuweisen. Her [86] und Miyake [177] setzte diese Methode zum Nachweis von Formaldehyd in Zigarettenrauch ein. Niyati-Shirkhodaee setzten diese Methode ein um Formaldehyd als Produkt von Triolein, dem Hauptbestandteil des Unterhautfettgewebes, nach UV-Bestrahlung nachzuweisen [178]. 1998 veröffentlichten Huang et al. den Mechanismus der vorliegenden Reaktion. Bei pH 7,2 liegt Cysteamin als Zwitterion vor, so dass der Amino-Stickstoff des Cysteamins den Carbonylkohlenstoff angreifen kann. Dabei bildet sich im sauren die gute Abgangsgruppe Wasser. Der nun positiv geladene Kohlenstoff wird vom negativ geladenen Schwefel angegriffen und es bildet sich das Thiazolidin.

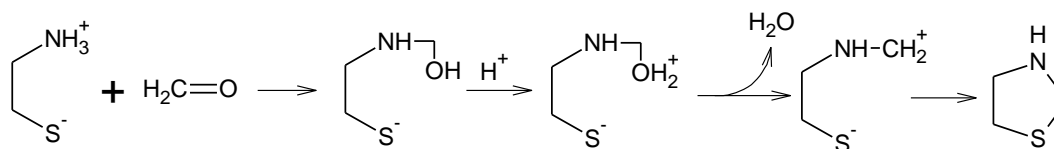


Abbildung 2-22: Reaktion von Formaldehyd mit Cysteamin

Diese Methode hat den Vorteil, dass bei milden Reaktionsbedingungen gearbeitet werden kann und dass sich flüchtige Derivate bilden, womit eine GC-Detektion möglich wird [51].

#### 2.2.5.1.3.7. Dopamin

Lässt man Formaldehyd mit Dopamin reagieren, so lässt sich mit anschließender HPLC-Trennung und elektrochemischer Detektion Formaldehyd in Gewebeproben und Flüssigkeiten nachweisen [73].

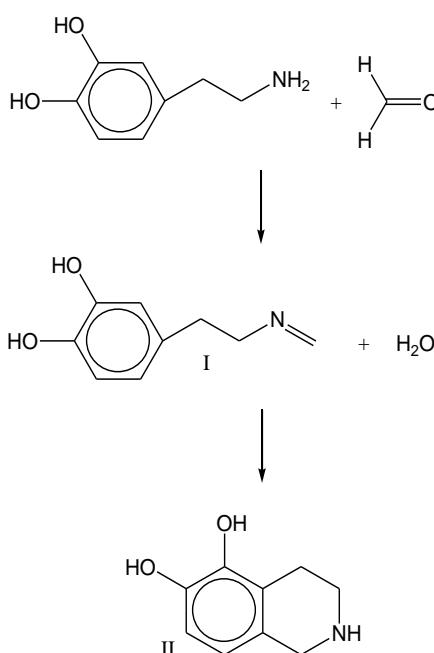


Abbildung 2-23: Reaktion von Formaldehyd mit Dopamin zu Tetrahydroisochinolin



### 2.2.5.1.3.8. *Dansylhydrazin*

Für Luftuntersuchungen auf Aldehyde und Ketone setzt man mit Dansylhydrazin (1-dimethyl-aminonaphtalin-5-sulfonylhydrazin, DNSH) beschichtete Kieselerde ein, auf deren Oberfläche dann direkt die Umsetzung zu den Hydazonverbindungen stattfindet [161]. Diese werden anschließend mit RP-HPLC getrennt und mit einem Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm untersucht [161], wodurch eine Differenzierung der Aldehyde und Ketone möglich wird.

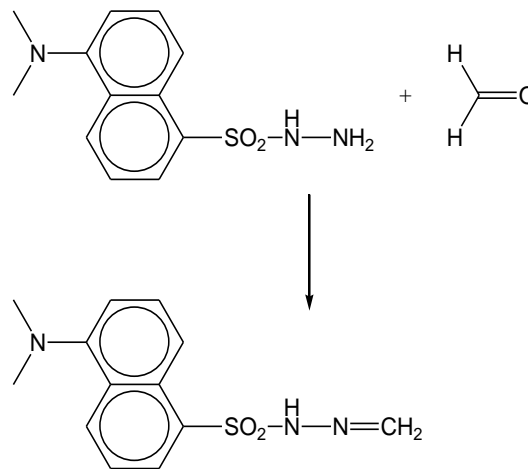


Abbildung 2-24: Reaktion von Formaldehyd mit DNSH

### 2.2.5.1.3.9. *Phenylhydrazin*

1951 stellten Tanenbaum und Bricker die Möglichkeit vor, Formaldehyd mit Hilfe von Phenylhydrazin und rotem Blutlaugensalz (Kaliumeisencyanat) nachzuweisen [120]. Die zu untersuchende Probe wird mit Phenylhydrazinhydrochlorid Lösung versetzt, eine Minute stehengelassen und rotes Blutlaugensalz, sowie Natriumhydroxidlösung addiert. Nach 20 Minuten kann die Messung durchgeführt werden. Auch Feldman et al. setzten diese Methode zum Nachweis von Formaldehyd ein [121].

### 2.2.5.1.3.10. *Tryptophan*

Tryptophan reagiert mit Formaldehyd in Anwesenheit von Schwefelsäure und Eisen zu einem violetten Farbstoff dessen Konzentration sich dann spektrometrisch bestimmen lässt [122]. Dafür wird die zu untersuchenden Probe mit einer ethanolischen Tryptophanlösung, konzentrierter Schwefelsäure und Eisenchloridlösung versetzt.

#### 2.2.5.1.4. Formaldehyd als Katalysator

Formaldehyd lässt sich auch indirekt durch seinen Einfluss auf chemische Reaktionen nachweisen. So katalysiert Formaldehyd die Oxidation von Brilliantcresylblau durch Bromat. Der Abbau des Farbstoffes lässt sich photometrisch bei 630 nm beobachten und wird zum Nachweis von Formaldehyd in Industrieabwässern eingesetzt [123].

Die Reaktion von Malachitgrün und Sulfid dagegen wird durch Formaldehyd gehemmt, auch dieser Effekt lässt sich photometrisch bei 613 nm beobachten [124].

##### 2.2.5.1.4.1. Tetrasubstituiertes Amino-aluminium-phtalocyanin (TAAIPc)

Gibt man Formaldehyd oder Sulfid zu tetrasubstituiertem Amino-aluminium-phtalocyanin (TAAIPc), so wird dessen Fluoreszenz so vermindert, dass man mithilfe einer Fluoreszenzmessung den Formaldehydgehalt bestimmen kann [162]. Der Mechanismus, der zugrundeliegenden Reaktion soll nach Zhang et al. der gleiche, wie bei dem Nachweis von Formaldehyd mit Pararosanilin sein [125].

##### 2.2.5.1.4.2. Pararosanilin

Formaldehyd und Pararosanilin in salzsaurer Lösung reagieren nach 60 min. bei 25°C zu einem Carbinolamin [125].

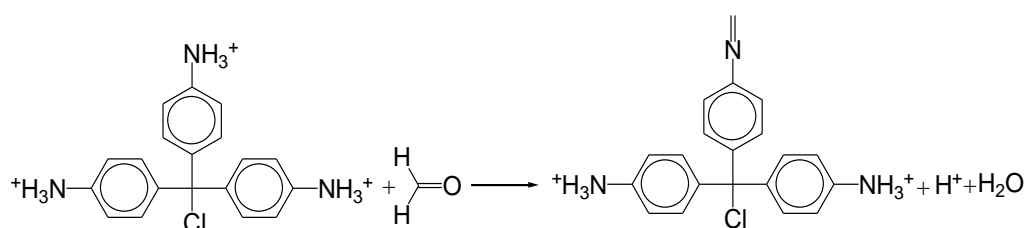


Abbildung 2-25: Bildung des Carbinolamin

Dazu wird eine Hydrogensulfidlösung gegeben, wodurch das Carbinolamin durch direkten nukleophilen Angriff des Hydrogensulfid zu einem Chromophor, einer Alkylsulfonsäure reagiert [125].

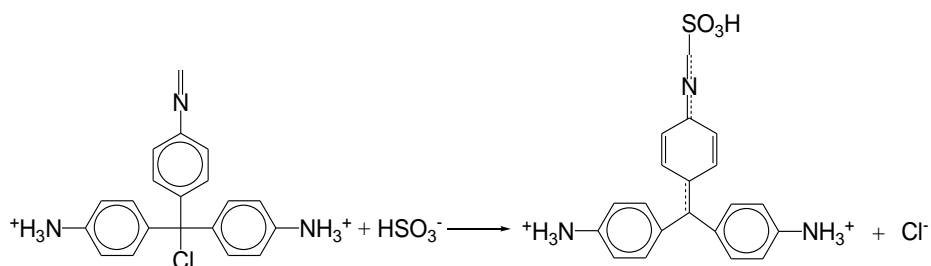


Abbildung 2-26: Bildung der Alkylsulfonsäure

Dieses lässt sich mit einer Absorptionsmessung bei 570 nm nachweisen. 1989 stellten Munoz et al. eine Variante der Pararosanilin-Methode als „Flow injection Methoden“ vor [126]. Baker et al. entwickelten 1994 einen optischen Formaldehydsensor, der mit auf Cellulose-Phosphat immobilisiertem Pararosanilin arbeitet [127].

#### **2.2.5.1.5. Enzymatischer Formaldehydnachweis**

Wie schon im Kapitel 2.2.1.2 erwähnt kann Formaldehyd durch die Formaldehyddehydrogenase unter Bildung von NADH aus Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD<sup>+</sup>) abgebaut werden. NADH absorbiert Licht der Wellenlänge von 370 nm, so dass sich auch hier eine Absorptionsmessung anbietet [128]. Man kann der Proben aber auch Fe (III) Ionen zusetzen, welche durch das gebildete NADH zu Fe (II) reduziert werden. Diese kann man dann amperometrisch mit einer Kohle-Elektrode gegen eine Silber-Silberreferenzelektrode bestimmen [179].

#### **2.2.5.2. Die Hantzsch Pyridinsynthese**

1882 wurde die Hantzsch Pyridinsynthese, eine Synthesemethode zur Darstellung eines Heterozyklus [215], von Hantzsch zur Darstellung pyridinartiger Verbindungen vorgestellt [216]. Seit 1971 wird sie in der pharmazeutischen Industrie zur Synthese des Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten Nifedipin eingesetzt [217, 218]. Bei der Hantzsch-Pyridinsynthese handelt es sich um eine Ringschlussreaktion zwischen einer  $\beta$ -Ketocarbonylverbindung, einem Aldehyd und einem aliphatischen Amin zu einem Dihydropyridinderivat. Es gibt verschiedene Möglichkeiten Formaldehyd mit Hilfe dieser Hantzsch - Reaktion nachzuweisen. Zum einen mit Hilfe des Nash-Reagenzes, das aus einer wässrigen Lösung aus Ammoniumacetat, Eisessig und einem  $\beta$ -Ketocarbonyl besteht zum Anderen die folgenden  $\beta$ -Ketocarbonylverbindungen, wobei 2,4-Pentadion den „Klassiker“ darstellt.

- 2,4 - Pentadion [129-131, 150, 157, 164-169, 183]
- Dimedon [69, 73, 132, 133, 135, 136, 149, 151, 180, 184, 185]
- CHD [166]
- Acetoacetanilid [170-172]

Mithilfe der Hantzsch-Reaktion wurde Formaldehyd

- in Speichel [69]
- in Urin [73, 132, 169, 180]
- in der Atemluft [183]
- in Fingerfarben [129, 150]
- in der Atmosphäre [157, 165-168, 185]

- in Raumluft [164]
- emittiert von Kleidung [130]
- in Algen [151]
- in Pflanzen [135, 136]
- in Gewässern [170-172]
- in feuchten Babytüchern [131]

nachgewiesen.

### 2.2.5.2.1. Das Nash-Reagenz

Erstmalig wurde die Hantzsch-Reaktion nicht zur Synthese pyridinartiger Verbindungen, sondern zum Nachweis von Formaldehyd durch Nash 1953 eingesetzt. Dabei benutzte Nash eine Lösung aus 2,4-Pentadion, Eisessig und Ammoniumacetat, die mit Formaldehyd zu 3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidin (DDL) reagiert:



Die möglichen Reaktionsschritte sind in der folgenden Grafik abgebildet, wobei der genaue Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist [219].

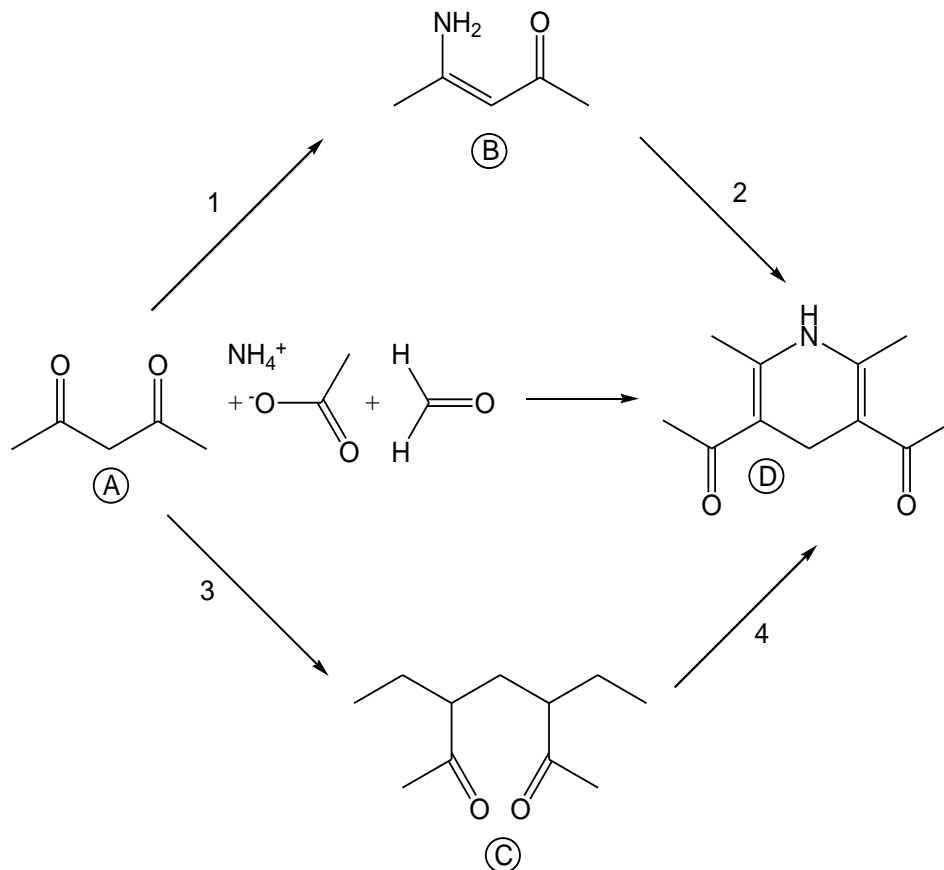


Abbildung 2-27: Reaktionsmechanismus unter Verwendung von 2,4 Pentadion

Im ersten Schritt bildet sich aus 2,4-Pentadion (A) und Ammoniumacetat in einer essigsäuren Lösung 1 4-Amino-3-penten-2-on (B), welches dann unter Wasserabspaltung mit Formaldehyd und einem weiteren Molekül 2,4-Pentadion in Reaktion 2 zu DDL (D) weiterreagiert. 4-Amino-3-penten-2-on ist auch als Fluoral P bekannt, das in wässriger Lösung wieder zu 2,4-Pentadion und Ammonium hydrolysiert [167].

Die Reaktion ist auch in einem Schritt durchführbar, womit auch eine andere Reaktionsabfolge möglich wird. Dabei reagieren in Reaktion 3 zwei Moleküle 2,4-Pentadion zuerst mit einem Molekül Formaldehyd zu 3,3'-Methylen-bis-(2,4-Pentadion) (C), welches mit Ammoniumacetat in Reaktion 4 unter Wasserabspaltung und Ringschluss zu DDL (D) abreagiert. Dabei ist bei Formaldehyd in niedrigen Konzentrationen Schritt 3 der Geschwindigkeitsbestimmende [165]. Dies ist der Mechanismus der klassischen Hantzsch-Reaktion.

Nash hat DDL zu dem damaligen Zeitpunkt nur colorimetrisch bei 412 nm detektiert, erst Belman beobachtete 1963 die Fluoreszenz bei 510 nm und führte Fluoreszenzmessungen zum Nachweis von Formaldehyd durch [163]. 1994 wurden die Fluoreszenzeigenschaften von Kelly et. al nochmals untersucht, wobei eine vierfach höhere Fluoreszenz bei 410 nm beobachtet wurde, wenn man das Anregungsmaximum bei 254 nm benutzt [164]. Diese Wellenlänge von 254 nm ist mit LED's schwieriger zu realisieren, als die Anregung bei 420 nm.

In der Literatur sind verschiedene Nash-Zusammensetzungen genannt

**Tabelle 2-1: Zusammensetzung 1L Nash Reagenz**

Ammoniumacetat	Eisessig	2,4-Pentadion	Reagenz
15,4 g	pH=6	0,2 mL	[219]
24 g	0,46 mL;	0,32 mL	[163]
15 g	0,3 mL	0,2 mL	[167]
15,4 g	1,5 mL	10 mL	[220]
43 g	0,96 mL	0,087 mL	[165]
7,7 g	0,25 mL	0,2 mL	[169]
154 g	3 mL	2 mL	[168]

Dies entspricht:

- 7,7 g – 154 g Ammoniumacetat
- 0,2 mL – 3 mL Eisessig
- 0,087 mL – 2 mL 2,4 Pentadion

Im Verlauf von 4.3.2.1. wird die für diese Arbeit eingesetzte Zusammensetzung erläutert werden.

Die Hantzsch-Reaktion mit dem Nash-Reagenz wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen in verschiedenen Matrizen und Anwendungsgebieten eingesetzt. Das in der Hantzsch-Reaktion gebildete DDL wurde erstmals kolorimetrisch und dann fluorometrisch detektiert. Später wurden zur Detektion von DDL auch noch die folgenden anderen analytischen Methoden eingesetzt:

- HPLC-Trennung und massenspektrometrische Bestimmung im positiven Ionenmodus sowohl mithilfe von APCI-MS als auch mit ESI-MS [149]
- GC-UV-VIS [129]
- GC-FID und GC-MS [150] zur Detektion von Formaldehyd in Fingerfarben,
- HPLC-UV-VIS zur Detektion der Emission von Formaldehyd aus Kleidung [130]
- GC-ECD zur Bestimmung von Formaldehyd in Raumluft [157].
- Kolorimetrisch in feuchten Babytüchern nachgewiesen [131]
- Mithilfe der Fluoreszenz von DDL in der Atmosphäre [165-168], in Raumluft [164] und in Urin [169]

Die Fluoreszenzdetektion von Formaldehyd mit Hilfe dieser Methode wurde bisher von folgenden Arbeitsgruppen beschrieben:

- Dong und Dasgupta [165] zum Nachweis in atmosphärischem Wasser
- Kelly et al. [164] und Li et al. [167] zum Nachweis in Luft
- Bisgaard et al. in der Atmosphäre [168]
- Short und Benter [169] in Urin

Weiterhin wurde die Hantzsch-Reaktion auch zum Nachweis von Triglyceriden als Krankheitsindikatoren vorgestellt. Dafür wurden die extrahierten Triglyceride mit Ammoniumacetat und Formaldehyd versetzt wobei ebenfalls DDL gebildet wird. Dieses wird dann durch Absorptionsmessungen bestimmt [221]. Kawai et al. setzten die Hantzsch-Reaktion mit dem Nash-Reagenz zur Detektion von Wasserstoffperoxid in Lösungen ein, indem sie diese Lösungen zuerst mit Katalase versetzten, die Wasserstoffperoxid in Formaldehyd umsetzt und

dann das Formaldehyd detektierten [222]. Auch zur Stabilisierung von kleinen Mengen Formaldehyd in wässriger Lösung wurde die Hantzsch-Reaktion eingesetzt. Die Lösung in der Formaldehyd enthalten war wurde mit Nash-Reagenz versetzt und das so gebildete DDL war bis zu sieben Tagen haltbar [223].

#### 2.2.5.2.2. 5,5-Dimethyl-1,3-cyclohexadion (Dimedon)

Setzt man nun anstatt 2,4-Pentadion Dimedon ein, so bildet sich mit Formaldehyd 3,3,6,6-Tetramethyl-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydro-1,8-acridindion (TDA), ebenfalls ein Dihydropyridinderivat. Dieses hat ein um einen Faktor 100 stärkeres Fluoreszenzsignal als DDL, ist aber unselektiv, da es auch mit anderen aliphatische Aldehyde reagiert [184, 219]. Die möglichen Reaktionswege sind in Abbildung 2-28 aufgezeigt [219].

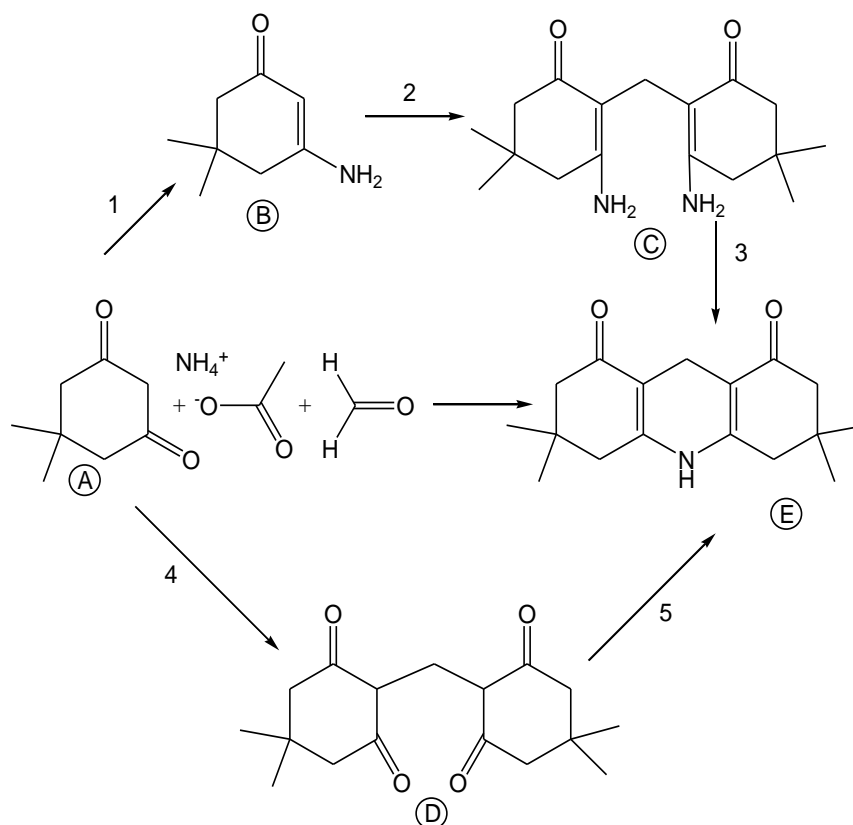


Abbildung 2-28: mögliche Reaktionsmechanismen mit Dimedon

Im ersten möglichen Reaktionsweg reagiert Dimedon (A) zunächst mit Ammoniumacetat (Reaktion 1) zu 5,5-Dimethyl-3-aminocyclohex-2-en-1-on (B), welches mit Formaldehyd in Reaktion 2 zu 2,2'-Methylen-bis-(5,5-dimethyl-3-aminocyclohex-2-en-1-on) (C) und dann unter Ringschluss (Reaktion 3) zu TDA (E) reagiert.

Der zweite mögliche Reaktionsweg ist die Reaktion von 2 Molekülen Dimedon (A) mit einem Molekül Formaldehyd zu Bis-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyl)methan (D), welches dann mit Ammoniumacetat zu TDA (E) weiterreagiert.

Je nach Reaktionsbedingungen liegt das Anregungsmaximum bei 395 nm, bzw. bei 465 nm und das Emissionsmaximum bei 460 nm, bzw. 520 nm [184]. Die beiden verschiedenen Anregungs- bzw. Emissionsmaxima erhält man durch die Zugabe von Tetraethylammoniumhydroxid. Dadurch liegt TDA als Anion vor, dessen Anregungs- und Emissionsmaxima bathochrom verschoben sind.

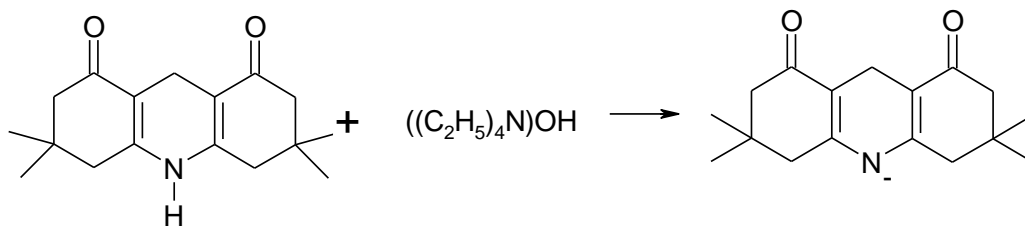


Abbildung 2-29: Bildung des Anions

Die Hantzsch-Reaktion mit Dimedon ist zum Nachweis von Formaldehyd

- In Speichel [69]
- Urin [73, 132, 180]
- In Zahnmaterial und Speichel mit OPLC [67-69]
- In frischen und gekochten Shiitake Pilzen spektrometrisch [133]
- In der Luft [185].
- In Algen mithilfe der Dünnschichtchromatographie und der OPLC [151]
- Mithilfe der HPLC [134, 135] und der OPLC [136, 152] in Pflanzen [135, 136, 152], Pilzen [152], Weintrauben [153] und Gefäßsporenpflanzen [134]

eingesetzt worden.

#### 2.2.5.2.3. 1,3-Cyclohexadion (CHD)

Anstatt 2,4 Pentadion kann auch CHD eingesetzt werden, das mit Formaldehyd und Ammoniumacetat zu 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-Deca-hydro-1,8-acridindion reagiert.



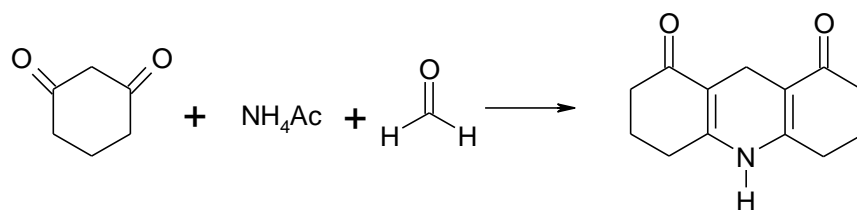


Abbildung 2-30: Reaktion von Formaldehyd mit CHD

Auch hier lässt sich das Anregungs- und Emissionsmaximum durch Zugabe von Tetraethylammoniumhydroxid bathochrom verschieben. Daraus resultiert eine Verschiebung des Anregungsmaximums von 395 nm zu 460 nm und des Emissionsmaximums von 460 nm zu 505 nm.

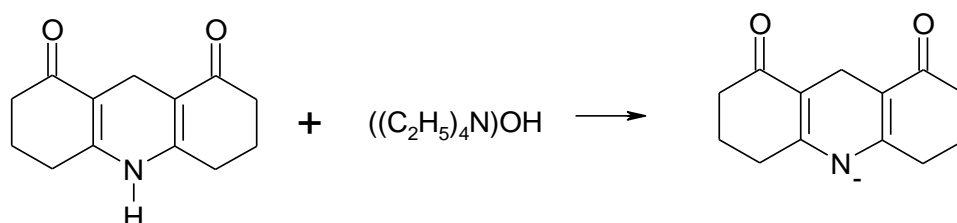


Abbildung 2-31: Bildung des Anions

Auch hier ist eine Fluoreszenzsteigerung um den Faktor 100 gegenüber DDL zu beobachten nur lässt sich das Reagenz aufgrund der Keto-Enol-Tautomerie erst nach 24 Std. verwenden [167].

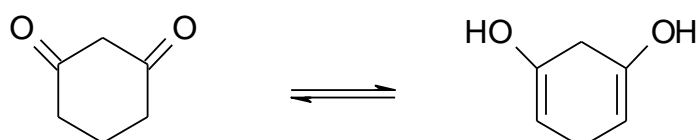


Abbildung 2-32: Keto-Enol-Tautomerie von CHD

Der größte Vorteil der Durchführung mit Hilfe von 2,4-Pentadion liegt bei der Selektivität und Schnelligkeit, denn auch CHD ist nicht selektiv gegenüber Formaldehyd, so dass bei diesen beiden Methoden ein Trennschritt vor der Detektion nötig wäre, der beim Einsatz von 2,4-Pentadion wegfällt.

#### 2.2.5.2.4. Weitere Reagenzien für die Hantzsch – Reaktion

Als neuere Entwicklung wurde Acetoacetanilid (AAA) zur Detektion von Formaldehyd eingesetzt [170-172]. Dabei reagiert ein Molekül AAA mit Formaldehyd und ein weiteres

Molekül AAA mit Ammoniak zu einem Enamin-Intermediat, woraus sich nach der Ringschlussreaktion unter Wasserabspaltung das Dihydropyridin-Derivat bildet.

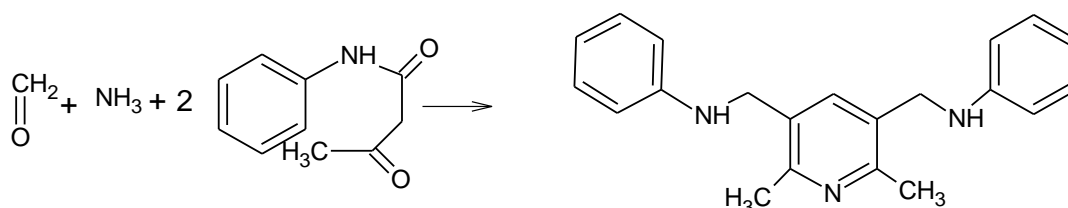


Abbildung 2-33:Hantzsch-Reaktion mit AAA

Die maximale Absorptionswellenlänge liegt bei 368 nm und die Anregungs- und Emissionswellenlängen bei 370 nm und 470 nm und das Produkt wurde fluorometrisch bestimmt.

## 2.2.6. Nachweismethoden für Formaldehyd in Urin

### 2.2.6.1. Überblick

Formaldehyd wird bisher entweder durch eine Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) oder mit 5,5-Dimethyl-cyclohexan-1,3-dion (Dimedon) mit anschließender HPLC-Trennung und UV-VIS-Detektion bei 330 nm oder 365 nm [53, 72, 77, 132, 196, 199-202], SIFT-MS nach dem Headspace-Verfahren [2, 100] oder radiometrisch nach dem Einsatz von  $^{14}\text{C}$ -Dimedon in Urin nachgewiesen [180]. Weiterhin wird Formaldehyd mit Hilfe der Headspace-GC [198] oder der GC-NCI-MS [141] nach Derivatisierung mit O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine (PFBHA), HPLC nach Derivatisierung mit Dopamin [73], fluorometrisch nach Derivatisierung mithilfe der Hantzsch - Reaktion [169], spektrometrisch nach Derivatisierung mit Tryptophan [197] oder Phenylhydrazin [195, 203] nachgewiesen. Wie auch schon im Überblick der Möglichkeiten Formaldehyd generell nachzuweisen soll auch an dieser Stelle mit Hilfe einer Tabelle Übersichtlichkeit gegeben werden

Tabelle 2-2: Derivatisierung und dazugehörige Detektionsmöglichkeiten

Derivatisierung	UV-VIS	SIFT-MS	radiometrisch	NCI-MS	Fluoreszenz	ECD	Elektrochemisch
Dimedon	[132, 200]		[180].				
DNPH	[53, 72, 77, 196, 201, 202]						
Dopamin							[73]
keine		[2, 100]					
Nash					[169]		
PFBHA				[141]		[198] [141]	
Phenylhydrazin	[195, 203]						
Tryptophan	[197]						

Nach der Derivatisierung schließt sich meistens ein Trennschritt an. Auch dazu soll im Folgenden ein Überblick für Verständlichkeit sorgen:

**Tabelle 2-3: Derivatisierung und dazugehörige Trennmethode**

Derivatisierung	HPLC	SIFT	DC	GC	keine
Dimedon			[180]		
DNPH	[53, 72, 77, 132, 196, 199-202]				
Dopamin	[73],				
keine		[2, 100]			
Nash					[169]
PFBHA				[198] [141]	
Phenylhydrazin					[195, 203]
Tryptophan					[197]

Alle bisherigen Methoden Formaldehyd in Urin nachzuweisen, bringen einen großen apparativen Aufwand mit sich [2, 53, 72, 73, 77, 100, 132, 169, 180, 196-202]. Die Problematik der Methoden, die mit Derivatisierung arbeiten, liegt in der komplexen Probenvorbereitung sowie dem apparativen Aufwand. Die hier vorgestellte Methode nutzt eine Derivatisierung, die innerhalb einer Minute vonstatten geht und keines Trennschrittes bedarf. Die Probe wird zentrifugiert, bei Bedarf mit Wasser verdünnt und anschließend in das Gerät gegeben, in dem die Derivatisierung abläuft.

Ein weiteres Problem, das alle Verfahren aufweisen, die mit dem Headspace-Verfahren arbeiten, ist der in diesem Konzentrationsbereich nicht linear verlaufende Henry - Koeffizient für Formaldehyd in Wasser. Beim Einsatz der Headspace-Probennahme erfolgt die Probennahme in der Gasphase über der Urinprobe (Headspace-Verfahren) [2, 100, 198]. Schon bei sehr kleinen Konzentrationen zeigt die Löslichkeit von Formaldehyd in Wasser deutliche Abweichung vom idealen Verhalten, da Formaldehyd nicht nur gelöst vorliegt, sondern auch in einem Gleichgewicht mit Methandiol [215]. Dadurch wird durch die Gasphasenmessung eine zu niedrige Formaldehydkonzentration in der flüssigen Phase mithilfe des Henry'schen Gesetzes berechnet [169].

Formaldehyd wurde sowohl in

- Menschlichen Urin [2, 100, 132, 169, 180, 195, 197, 198, 202-204]
- Urin von Ratten [53, 72, 141, 196, 200, 201]
- Urin von Kaninchen [73]

nachgewiesen. Es wurde in Urin untersucht, um seine Ausscheidung

- In Folge von chemisch induzierten oxidativen Stress [196, 201]
- Nach der Gabe von Malondialdehyd [199]

- Im Zusammenhang mit Diabetes [72]
- Als Stoffwechselmetabolit während der N-Demethylierung [73, 200]
- Nach der Gabe von Methenamin [195, 197]
- Im Zusammenhang von Urogenitalkrebs [2]

nachzuweisen.

Die Streuung der in der Literatur angegebenen Formaldehydwerte für Urin gesunder Menschen schwanken stark und sollen hier aufgezeigt werden. Folgende Konzentrationen, bzw. Konzentrationsbereiche werden angegeben:

- 12,1-205 µg/L [77]
- 64,78 µg/24h [202]
- 2,5-4,0 mg/L [180]
- 56,85-144,57 µg/L [198]
- <10 ppb [2]
- 40-1400 µmol/L, entspricht 1,17 mg/L bis 42 mg/L [169]

Dies entspricht einem Bereich von 12,1 µg/L – 42 mg/L.

### **2.2.6.2. Derivatisierungen**

#### **2.2.6.2.1. 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH)**

Im Folgenden sollen die verschiedenen Methoden Formaldehyd mithilfe der Derivatisierung mit DNPH beschrieben werden. Alle verschiedenen Durchführungen weisen einen großen Nachteil auf, die sehr aufwändige Probenvorbereitung mit einer Reaktionszeit von einigen Stunden [169].

Um Formaldehyd, Acetaldehyd, Malondialdehyd und Aceton simultan in Rattenurin messen zu können, stellten Shara et al. 1992 eine Methode basierend auf der Derivatisierung mit DNPH vor [53]. Urin wird mit salzsaurer DNPH-Lösung und Pentan versetzt, 30 Minuten geschüttelt und mit weiterem Pentan extrahiert. Nach Abdampfen der Pentanphase unter Stickstoff wird wieder in Acetonitril aufgenommen und auf eine HPLC gegeben. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen der Gabe von chemisch induziertem oxidativen Stress und dem Gehalt an Formaldehyd, Malondialdehyd, Acetaldehyd und Aceton in Urin nachgewiesen [53].

Bagchi et al. setzten 1993 die Methode von Shara et al. ein, um Malondialdehyd, Formaldehyd, Acetaldehyd und Aceton simultan in Rattenurin nach der Gabe von 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin, nachzuweisen [196]. Dies ist eine der Chemikalien, die

auch Shara et al. einsetzen, um oxidativen Stress auszulösen. Dafür wird der Urin mit salzsaurer DNPH-Lösung und nach 10 min Rühren mit Trichloressigsäure versetzt und für 20 min zentrifugiert. Anschließend wird dreimal mit Pentan extrahiert, unter Stickstoff eingedampft wieder in Acetonitril aufgenommen und auf die HPLC gegeben.

Akubue et al. stellten 1994 die Möglichkeit vor, Formaldehyd parallel mit Malondialdehyd, Acetaldehyd und Aceton nach Malondialdehydgabe in Rattenurin zu messen [199]. Dafür setzten sie ein HPLC - System ein, das aus einer Derivatisierung mit anschließender HPLC-Trennung und UV-VIS-Detektion (330 nm) besteht. Dafür wird die Probe behandelt, wie bei Shara et al. beschrieben.

DeAndrade et al. stellten 1999 eine Möglichkeit vor, Formaldehyd und Acetaldehyd in humanem Urin nach Trennung mit HPLC oder GC nach Derivatisierung mit DNPH mithilfe eines UV-VIS-Detektors zu messen [77]. Dafür werden die Urinproben zentrifugiert, 1,0 ml Urin in saurer DNPH Lösung aufgenommen, Phosphorsäure hinzugegeben, auf pH 2 eingestellt und mit Acetonitril versetzt und für 20 min ins Ultraschallbad gegeben. Dabei wurden Formaldehydgehalte zwischen 12,1 - 205 µg/l gemessen.

Für die simultane Messung von Formaldehyd und Methylglyoxal in Rattenurin, die Deng et al. 1999 vorstellten, wird die Urinprobe mit DNPH und einer Lösung Propionaldehyd als internem Standard gemischt [72]. Anschließend wird die Lösung 10 min bei 37°C gehalten, mit Pentan ausgeschüttelt und das Pentan wieder abgedampft. Die getrocknete Probe wird in Wasser aufgenommen und mit der HPLC vermessen. Diese Methode diente der Untersuchung des Zusammenhanges zwischen dem Formaldehydgehalt in Urin und einer Diabeteserkrankung.

Lengyel et al. stellten 2003 ebenfalls eine Methode vor, Formaldehyd in Rattenurin nachzuweisen [200]. Sie untersuchten die Produktion von Formaldehyd während der N-Demethylierung von (-)-Deprenyl, somit als Stoffwechselmetabolit, der eine Rolle im oxidativen Stress spielen könnte. Dafür wird der Urin mit Propionaldehyd als interner Standard, DNPH - Lösung und einer Acetatpufferlösung versetzt und für 10 min. bei Raumtemperatur gehalten. Anschließend wird die Lösung über eine SPE (solid phase extraction) gegeben und mit Methanol wieder aufgenommen. Nach Trocknen unter Stickstoff bei 37°C wird in Acetonitril gelöst und auf die HPLC gegeben.

Moser et al stellten 1993 eine Methode zur simultanen Bestimmung von Malondialdehyd, Formaldehyd, Acetaldehyd und Aceton in Rattenurin nach Gabe von Ethanol zur Untersuchung des oxidativen Stresses vor [201]. Dafür wird der Urin mit salzsaurer DNPH - Lösung und Pentan versetzt, 30 Minuten geschüttelt und mit weiterem Pentan extrahiert. Nach Eindampfen unter

Stickstoff und Wiederaufnahme in Acetonitril wird der Gehalt mittels HPLC-UV-VIS bestimmt [201].

Um den Formaldehydgehalt in Urin nach der Gabe von Creatin messen zu können, stellten Poortsman et al. 2005 eine Methode vor, die ebenfalls auf der Derivatisierung mit DNPH beruht [202]. Creatin steht im Verdacht, durch die metabolische Produktion von Formaldehyd und Methylamin cytotoxisch zu sein.

2010 stellten Banos et al. eine Möglichkeit vor sieben Aldehyde (Formaldehyd, Acetaldehyd, Hexalaldehyd, Butanaldehyd, Acrolein, Propionaldehyd, Crotonaldehyd und Valeraldehyd) mithilfe der LC-ESI-MS/MS gleichzeitig nachzuweisen [204]. Sie geben dafür die zu messende Urinprobe, nachdem ihr ein interner Standard zugesetzt wurde und sie auf pH 1,5 eingestellt wurde, in ein Eisbad und anschließend auf eine mit DNPH präparierte Säule. Die gebildeten Hydrazone werden mit Acetonitril wieder von der Säule gespült und in eine LC gegeben, an die eine MS im negativen Ionenmodus angeschlossen ist.

#### **2.2.6.2.2. weitere Derivatisierungen**

Greenfield et al. stellten 1969 eine Methode zur Bestimmung von Formaldehyd in Urin nach der Gabe von Methenamin vor [195]. Dafür wird die Probe mit Ammoniumhydroxid, rotem Blutlaugensalz und Natriumhydroxid versetzt. Nach Schütteln werden die Proben stehengelassen und nach 15 min mit Isopropanol aufgefüllt und bei 515 nm vermessen. Diese Methode benötigt große Mengen Chemikalien. Diese Methode wurde auch 1971 von Jackson et al. zur Bestimmung von Formaldehyd neben Methenamin vorgestellt [203].

Gollamudi et al. stellten 1979 eine Methode vor Hexamethylentetramin und Formaldehyd in Urin parallel zu messen [197]. Der mit Formaldehyd verdünnte Urin wird dreimal mit Quecksilberchlorid geschüttelt, verdünnt, zentrifugiert und beim dritten Mal der Überstand abfiltriert. Das Filtrat wird mit Tryptophan - Reagenz und Eisenchlorid - Lösung versetzt. Die erhaltene Lösung wird 90 min bei 70°C erhitzt und anschließend bei 575 nm photometrisch vermessen. Diese Methode birgt nicht nur den Nachteil einer aufwändigen Probenaufbereitung, sondern auch noch die Problematik der Giftigkeit der eingesetzten Chemikalien.

2007 stellten Takeuchi et al. eine Methode zur Bestimmung von Formaldehyd in Urin vor, die die Headspace - Probennahme im Anschluss an eine Derivatisierung einsetzt [198]. Dafür wird der Urin mit o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine (PFBHA) versetzt und für vier Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wird für 30 min bei 60°C erhitzt und die Gasphase analysiert. DeZwart setzte diese Methode ein, um Formaldehyd als Produkt der Lipidperoxidation in Rattenurin nach Gabe von Tetrachlormethan nachzuweisen [141]. Dafür werden die Urinproben mit Schwefelsäure versetzt, für 10 min stehen gelassen und mit

Natriumwolframat versetzt, um die Proteine auszufällen. Anschließend wird die Probe zentrifugiert, mit PFBHA in Natriumacetatpuffer für eine Stunde stehengelassen. Dann wird mit Heptan und 3-Bromfluorbenzol als internem Standard 30 s gerührt, die Heptanschicht abgetrennt, mit Salzsäure die PFBHA-Reste entfernt, die Heptanphase getrocknet und anschließend in die GC eingespritzt.

### **2.2.6.2.3. Formaldehydnachweis in Urin mit Hilfe der Hantzsch - Reaktion**

#### **2.2.6.2.3.1. Dimedon**

Im Folgenden sollen die verschiedenen Methoden Formaldehyd mithilfe der Derivatisierung mit Dimedon beschrieben werden. Alle diese verschiedenen Durchführungen haben einen großen Nachteil, die sehr aufwändige Probenvorbereitung.

1994 bestimmten Sardi et al. den Formaldehydgehalt in menschlichem Urin mithilfe der Derivatisierung mit Dimedon [132]. Urin und die Dimedon - Lösung werden gemischt, gefiltert und anschließend in Methanol aufgenommen und nach HPLC-Trennung mit einem UV-VIS-Detektor vermessen.

Für eine von Szarvas et al. 1986 vorgestellte Methode, die die Derivatisierung mit radioaktiv markierten Dimedon nutzt ist eine aufwändige Probenvorbereitung nötig [180]. Zuerst wird der Urin mit dem radioaktiven Dimedon Reagenz und Salzsäure versetzt und 10 Minuten unter Rückfluss gekocht. Anschließend wird dreimal mit Diethylether extrahiert und die Extraktion mithilfe einer DC getrennt. Die DC-Spots des Dimedon - Formaldehyd - Produkts werden in Toluol aufgenommen und anschließend radiometrisch vermessen. Mit dieser Methode wurden in menschlichem Urin Formaldehydgehalte zwischen 2,5 - 4,0 mg/l gemessen.

Eine weitere Methode, die eine Derivatisierung nutzt, ist die von Yu et al. 2003 vorgestellte [73]. Sie nutzt die Derivatisierung mit Dimedon zur Bestimmung von Formaldehyd in Mäuse- und Kaninchenurin als Deaminierungsprodukt aus Methylamin mit Semicarbazid-sensitiver Aminoxidase (SSAO). Dafür wird der Urin mit Dopamin in Phosphatpuffer versetzt und 5 Minuten auf 60°C erhitzt. Es folgt eine aufwändige Reinigung mithilfe von Aluminiumoxidkügelchen, bevor die Probe auf eine HPLC gegeben wird.

#### **2.2.6.2.3.2. Das Nash-Reagenz**

Short et al. stellten 2005 eine Möglichkeit zum einfachen Nachweis von Formaldehyd in Urin vor [169]. Sie setzten dafür ein Gerät (AL4001 HCHO analyzer Aero Laser) zum Nachweis von Formaldehyd in der Atmosphäre ein, indem sie direkt die Flüssigphase mit dem Gerät untersuchten. Das Messverfahren beruht dabei auf der Hantzsch-Reaktion mit Quecksilberlampe

als Lichtquelle und einem Photomultiplier als Detektor. Für die Untersuchung von Urinproben werden diese direkt mit einer Peristaltikpumpe in die Messzelle gebracht. Dieser Aufbau beseitigt alle Probleme der vorherigen Methoden. Die Durchführung ist schnell und das Gerät vergleichsweise günstig. Für die Entwicklung des hier vorgestellten Gerätes wird diese Methode aufgegriffen. Es wurden Konzentrationen im Bereich von 40-1400  $\mu\text{Mol}$  gemessen (entsprechend 1,17 mg/L bis 42 mg/L).

### **2.2.6.3. SIFT-MS**

Eine weitere Methode ist die der SIFT MS mit der Headspace - Probennahme, die Spanel [2] und Smith [100] einsetzten. Nachdem Smith et al. 1996 diese neue Methode zur Spurengasanalyse in Luft und Atemluft vorstellten [101], wandten sie diese Methode 1999 auf die Gasphase über Urin an [100]. Dafür werden die Urinproben auf 40°C erhitzt und anschließend Proben aus dem Gasraum vermessen. Im gleichen Jahr veröffentlichten Spanel et al. Messungen von Formaldehyd in Urinproben von an Prostata- und Blasenkrebs erkrankten Menschen mit der gleichen Probendurchführung. Neben dem apparativen Aufwand ist hier der schon beschriebene nicht lineare Henry-Koeffizient das größte Problem.

Alle Methoden haben also entweder den Nachteil einer aufwändigen und zeitintensiven Probenvorbereitung, einer fehlerhaften Probennahme oder kostenintensiver Geräte. Die hier vorgestellte Methode hat alle diese Nachteile nicht. Die Probenvorbereitung ist einfach, es wird direkt in der Flüssigphase gemessen und der Aufbau ist günstig.

## **2.3. Urin**

### **2.3.1. Allgemeines**

Hauptaufgabe der Niere ist die Ausscheidung von Wasser und wasserlöslicher Substanzen in Form von Urin. Jeder erwachsene Mensch produziert pro Tag 0,5 L-2,0 L Urin [11], der zu 95% aus Wasser besteht [11] und gelb bis bernsteinfarben durch Urochrom, dem Stoffwechselprodukt der Galle und Urobilin, einem Abbauprodukt des Hämoglobins gefärbt ist [224]. Der pH-Wert des Urins schwankt zwischen 4,8 und 7,5, im Mittel also 5,8 [11]. Da die Menge und die Zusammensetzung des Urins von der Ernährung und anderen Faktoren abhängt und damit einem Tag - und - Nacht - Rhythmus folgt, spricht man meist von 24h-Urin [11]. In Urin finden sich viele verschiedene wasserlösliche Substanzen, wie Elektrolyte und organische Bestandteile. Zu den Elektrolyten zählen vor allem Kationen<sup>1</sup>, wie Natrium (~60-200 mmol [7]), Kalium (~30-100 mmol [7]), Magnesium (~1-10 mmol [7]) und Ammonium (~30-40 mmol [7]),

---

<sup>1</sup> die nachfolgenden Ionenkonzentrationen beziehen sich auf den 24 Stunden Urin eines Erwachsenen Menschen



und Anionen, wie Chlorid (~120-240 mmol [7]), Sulfat (~18-22 mmol [7]) und Hydrogenphosphat. Die organischen Bestandteile bestehen überwiegend aus stickstoffhaltigen Organika, wie Harnstoff [11] (~20 g [7]), das Ausscheidungsprodukt des Aminosäurestickstoffs, Harnsäure[11] (~500 mg [7]), das Endprodukt des Purinstoffwechsels [11], Kreatinin [224] (~1,2 - 1,8 g [7]), aus dem Abbau von Phosphat in den Muskelfasern und Urobilinogen aus dem Hämoglobinabbau [224].

### **2.3.2. Urochrome**

Unter Urochrome versteht man alle den Harn färbenden, stickstoffhaltigen Stoffwechselprodukte [7]. Die Farbe des Harns wird in der Hauptsache von den Urochromen A und B, sowie zu einem kleinen Teil durch Uroerythrin und Urobilin hervorgerufen [225]. Dabei weist Urochrom B die größte Harnfähigkeit auf, gefolgt von Uroerythrin (Urorubin), Urobilinogen und Bilirubin [225].

Urobilinogen, Urobilin und Bilirubin sind verschiedene Stufen von Abbauprodukten des Hämoglobins. Die Hämoproteine, zu denen das Hämoglobin gehört, sind stark gefärbt und weisen eine starke Eigenfluoreszenz auf [226].

Menschliche Erythrozyten haben eine Lebensdauer von ungefähr 120 Tagen und werden dann in der Milz abgebaut. Während dieses Abbauprozesses wird von dem Protohäm durch die mikrosomale Hämoxxygenase mit  $O_2$  und NADPH (Nicotinamidadeninucleotidphosphat), dem wichtigsten Elektronendonator bei reduktiven Biosynthesen [44], Kohlenmonoxid abgespalten, wobei Biliverdin (A), ein Gallenfarbstoff [227], entsteht. Biliverdin wird dann von der Biliverdin-Reduktase mit NADPH als Reduktionsmittel zu wasserunlöslichem Bilirubin (B) reduziert [44]. Dieser Abbauweg ist in Abbildung 2-34 gezeigt.

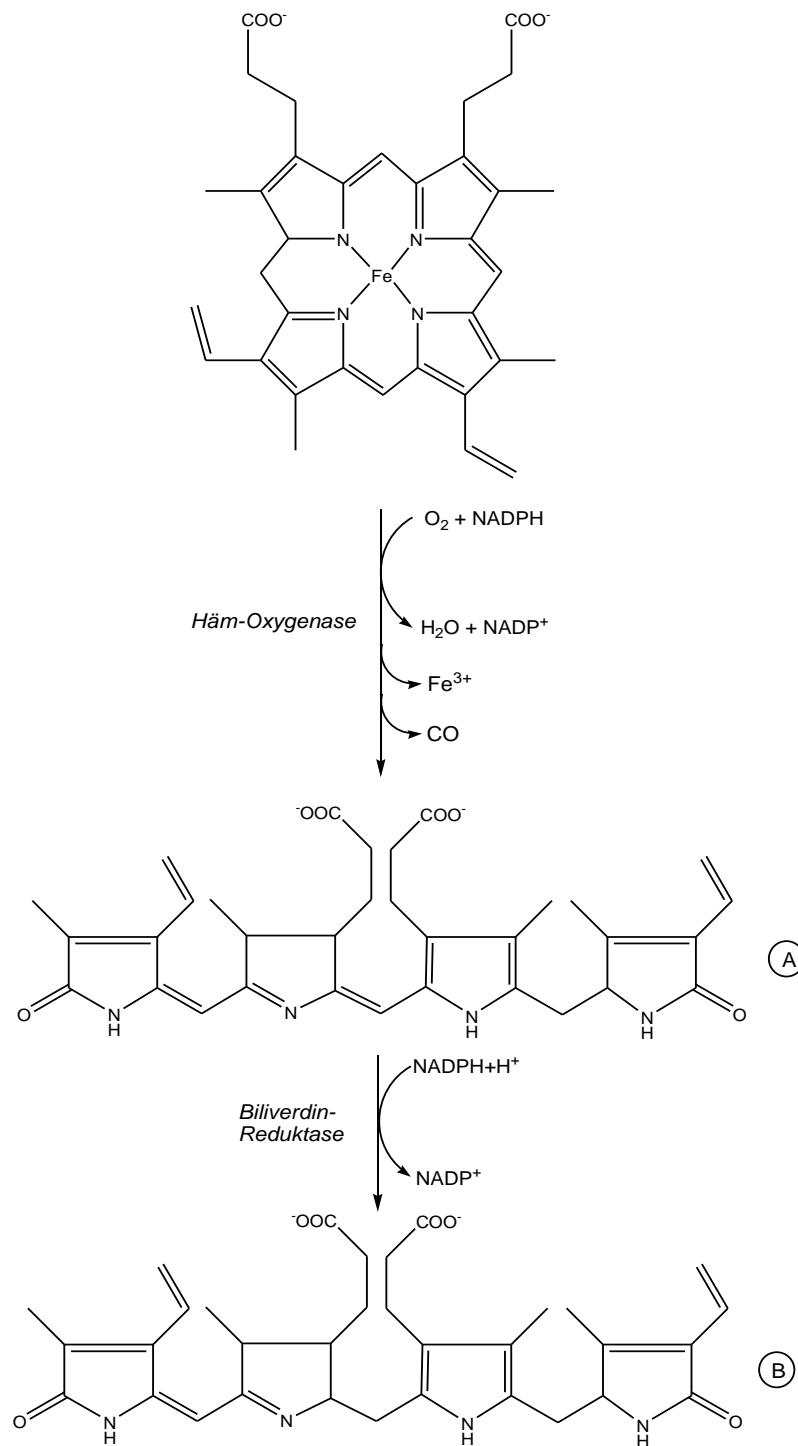


Abbildung 2-34: Bilirubinsynthese

Das so entstandene unkonjugierte Bilirubin wird reversibel an Serumalbumin gebunden und zur Leber transportiert. Dort wird es nach Bindung an Ligandin oder Z-Protein durch mikrosomale UDP-Glukuronyltransferase mit Glukuronsäure zu Bilirubinglukuronid verknüpft. Letzteres wird auch als konjugiertes Bilirubin bezeichnet und erreicht durch die Verknüpfung mit den Zuckermolekülen eine höhere Wasserlöslichkeit. Es wird mit der Galle in den Darm ausgeschieden. Bei gesunden Menschen liegt die tägliche Bilirubinausscheidung bei 200–300

mg. Ist die Bilirubin-Ausscheidung höher, so liegt eine Leberschädigung vor [228]. Abbildung 2-35 zeigt das Anregungs- und Absorptionsspektrum von Bilirubin. Es ist deutlich zu sehen, dass die Spektren denen des DDLs ähneln.

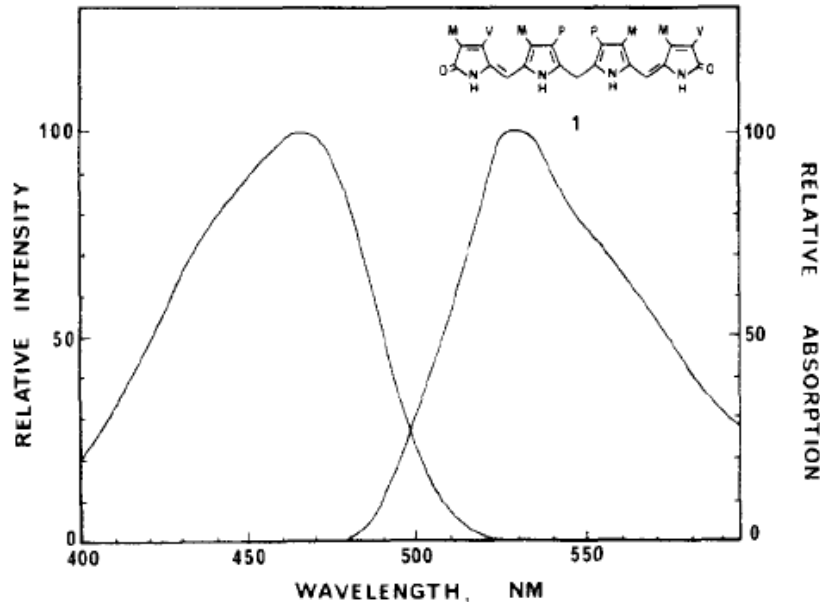


Abbildung 2-35: Absorptions- und Emissionsspektrum von Bilirubin [229]

Im Darm wird Bilirubin, wie sein Oxidationsprodukt das Biliverdin zu Urobilinogen umgewandelt [230].

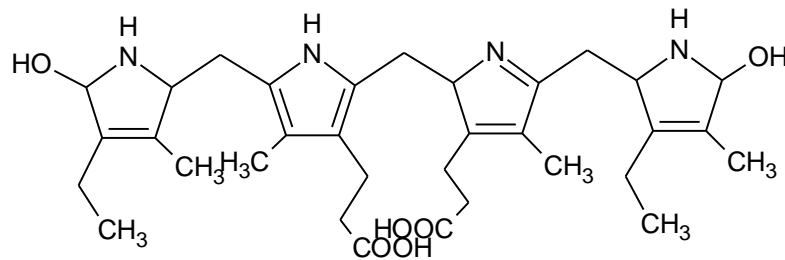
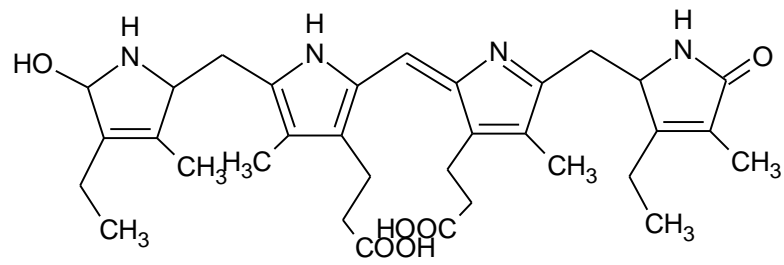


Abbildung 2-36: Urobilinogen

Urobilinogen wird im Darm zu Urobilin und Stercobilin umgewandelt, wobei Urobilin über die Niere und Stercobilin über den Darm ausgeschieden wird. Urobilin wurde 1878 erstmals als orangegelber [231] Urinfarbstoff identifiziert [232, 233] und ist die somit oxidierte Form des farblosen Urobilinogen [230, 232].



**Abbildung 2-37: Urobilin**

Der Zink-Komplex eines Urobilin-Analogen weist eine starke Fluoreszenz bei 529,8 nm bei einer Anregungswellenlänge von 380,8 nm auf [234].

### 3. Experimenteller Teil

In diesem Kapitel soll kurz ein Überblick der eingesetzten Materialien, Chemikalien, der durchgeführten Probenvorbereitung und ein Überblick über den Geräteaufbau gegeben werden. Die vertiefenden Beschreibungen der Messdurchführung sowie Veränderungen am Gerät und die Begründungen desgleichen finden sich in 4, da die Entwicklung des Gerätes und der Messdurchführung ein Ergebnis der hier vorgestellten Arbeit sind.

#### 3.1. Eingesetzte Chemikalien, Materialien und Probennahme

Die folgenden Tabellen zeigen die eingesetzten Chemikalien und Materialien.

##### 3.1.1. Chemikalien

Tabelle 3-1: eingesetzte Chemikalien

	Chemikalie	Menge	Reinheit	EC-Nummer	Hersteller
100 mL Nash-Reagenz	Ammoniumacetat	25,67 g	97,7 %	211-162-9	Sigma Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
	Essigsäure	0,5 mL	99,8 %	200-580-7	Merck Eurolab GmbH Darmstadt, Deutschland
	2,4-Pentadion	0,05 mL	99,5 %	2046340	Fluka Sigma Aldrich Chemie Taufkirchen, Deutschland
1 L Stammlösung Formaldehydlösung (350,3mg/L)	1 ml 37% HCHO in Wasser 47083-U LB44267				Supelco Deisendorf Deutschland
	Milliporewasser				hergestellt mit Simplicity185 Millipore Molsheim Frankreich

### 3.1.2. Materialien

Tabelle 3-2: Komponenten

Komponente	Bezeichnung	Sonstiges	Hersteller
Leuchtdiode	M3L1-HU-30	Emissionsmaximum 395 nm	Roithner Lasertechnik, Wien, Österreich
Peristaltikpumpe	ISM827		Ismatec Wertheim-Mondfeld Deutschland
Pumpenschlauch	070535-07I	Innendurchmesser (ID) 0,64 mm	Ismatec Wertheim-Mondfeld Deutschland
Flüssigkernwellenleiter	AF Teflon®2400		DuPont, Bad Homburg, Deutschland
Halterung für Flüssigkernwellenleiter		PVC	Werkstatt Bergische Universität Wuppertal, Deutschland
Halterung für Dioden		Aluminium	Werkstatt Bergische Universität Wuppertal, Deutschland
T-Stücke	502472 MicroTee	PEEK	Supelco, Sigma Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
Glasfaser	P300-2-SR		Ocean Optics, Dunedin, Florida, USA
Kapillarschlauch	S1810-10	ID 0,8mm	Bohlender GmbH, Grünsfeld, Deutschland
Teflonschlauch		0,8 mm (AD); 0,3 mm (ID)	
Spektrometer	USB4000		Ocean Optics, Dunedin, Florida, USA
Zentrifuge	4K15 C		Sigma Zentrifugen Osterode am Harz Deutschland

#### *Nash – Reagenz*

240 g Ammoniumacetat werden in 250 ml Wasser und 5 ml Eisessig gelöst. Nach vollständigem Auflösen werden 0,5 ml 2,4-Pentadion hinzugegeben und auf 1 L mit Milliporewasser aufgefüllt. Das so erhaltene Nash - Reagenz wird im Kühlschrank für max. 6 Monate gelagert.

#### *Formaldehyd - Lösung*

1 ml 37%tige Formaldehydlösung in Wasser wird in einem Liter Milliporewasser gelöst. Aus dieser Stammlösung (350,3 mg/L) wird die Verdünnungsreihe in den Konzentrationen

1,8 mg/L; 2,5 mg/L; 3,2 mg/L; 3,5 mg/L; 7,0 mg/L; 10,5 mg/L für das Aufstockverfahren hergestellt. Die Lösungen werden im Kühlschrank gelagert.

### 3.1.3. Probennahme

Die Proben werden nach der Abgabe entweder direkt gemessen oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , bzw bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bei den Proben der Blasenentzündungskampagne eingefroren und für die Messungen über Nacht im Kühlschrank aufgetaut. Vor dem Messen werden die Proben bei den nachfolgenden Einstellungen zentrifugiert.

- 4500 rpm, entspricht  $3500 \times g$
- $4^{\circ}\text{C}$  Temperatur
- 2 x 10 min Zeitdauer

#### Aufbau

Das Gerät besteht aus einer Aufgabeneinheit, in der die Probe, das Nash - Reagenz und die Aufstocklösungen in T-Stücken gemischt werden, einer Reaktionseinheit, in der die Hantzsch - Reaktion bei einer Temperatur von  $80^{\circ}\text{C}$  in einer Dauer von einer Minute abläuft und dabei entstehende Gasblasen abgetrennt werden und der Messeinheit, die aus einer Durchflusskapillare, sowie sieben LEDs als Anregungslichtquellen und einer Glasfaser zur Fluoreszenzdetektion besteht.

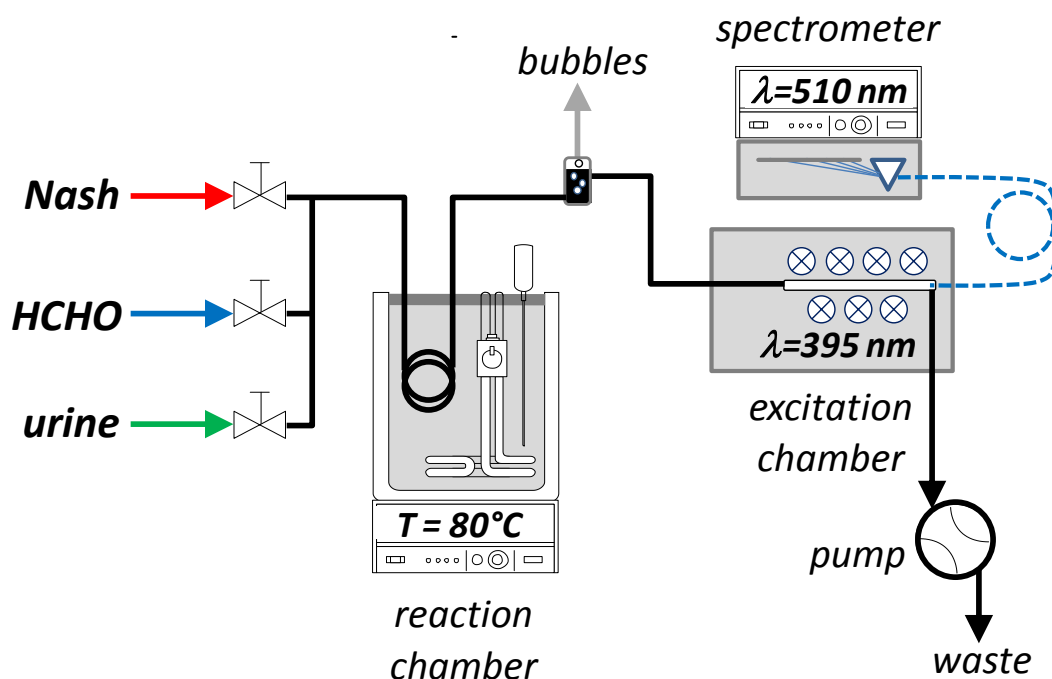


Abbildung 3-1: Schematische Zeichnung des Gerätes [235]

Im Folgenden werden mehrere Schnittdarstellungen des Kernstückes des Aufbaus, der Anregungseinheit gegeben. Eine ausführlichere Beschreibung findet sich in 4.

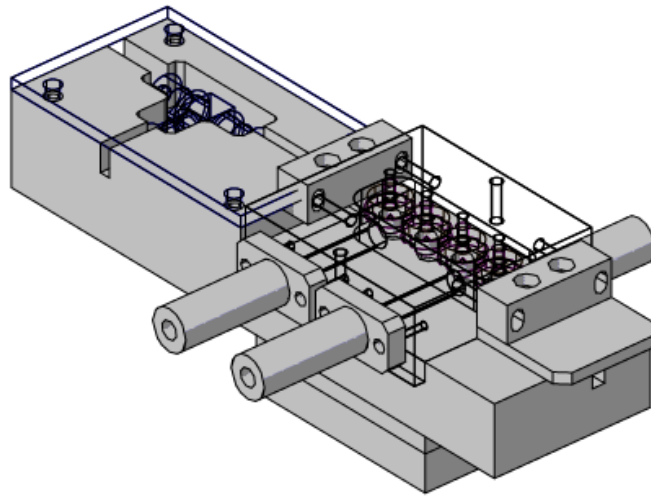


Abbildung 3-2: Schnittdarstellung der Anregungseinheit

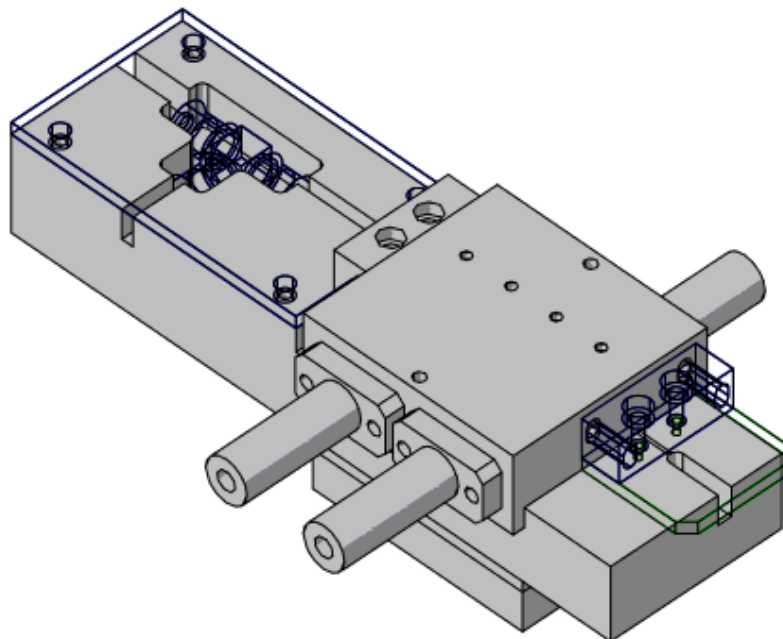


Abbildung 3-3: Schnittdarstellung der Anregungseinheit



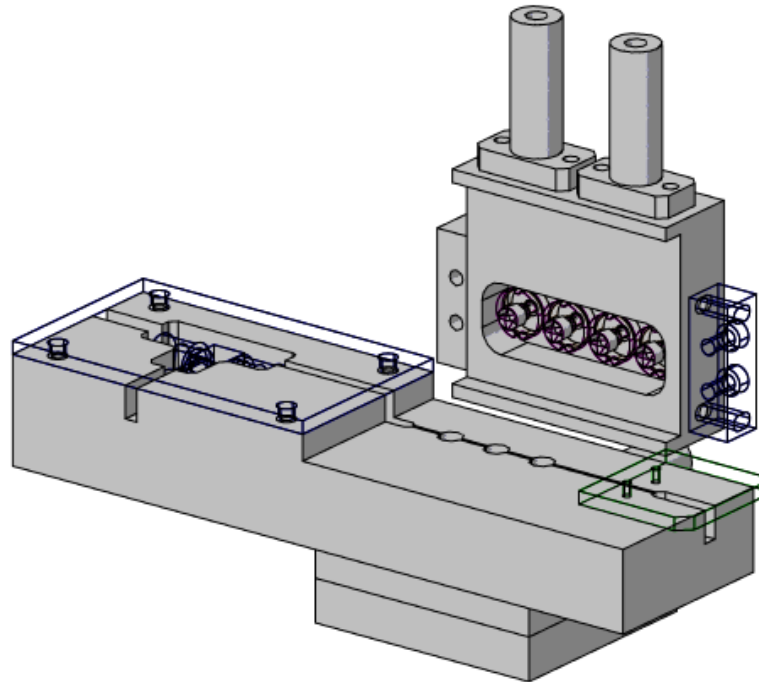


Abbildung 3-4: Schnittdarstellung der Anregungseinheit

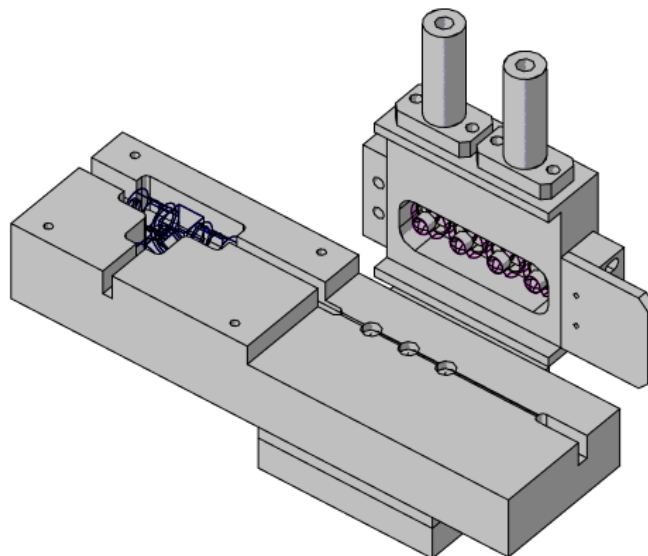


Abbildung 3-5: Schnittdarstellung der Anregungseinheit

### *Messprozedere*

Das Messprozeder hat sich im Laufe der Messungen mehrfach geändert und ist dann im jeweiligen Kapitel beschrieben und begründet.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Stand der Dinge zu Beginn der Arbeit und erste Vorarbeiten

Zu Beginn der Forschungen, die zur Anfertigung dieser Doktorarbeit führte, standen die Ergebnisse einer Diplomarbeit [10]. Diese sollen zum Einstieg hier kurz aufgeführt werden. Abbildung 4-1 zeigt das Gerätes am Ende der Diplomarbeit, die von Juli 2006 bis Februar 2007 in der Abteilung der physikalischen Chemie der Bergische Universität Wuppertal entstand.

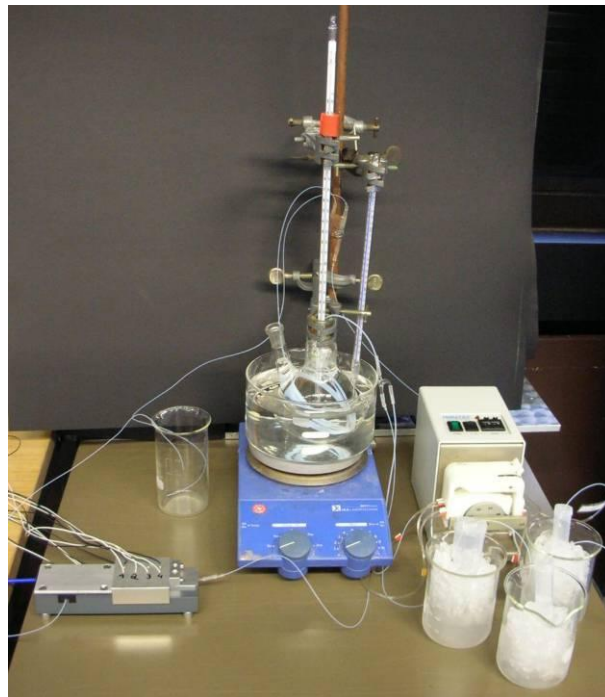
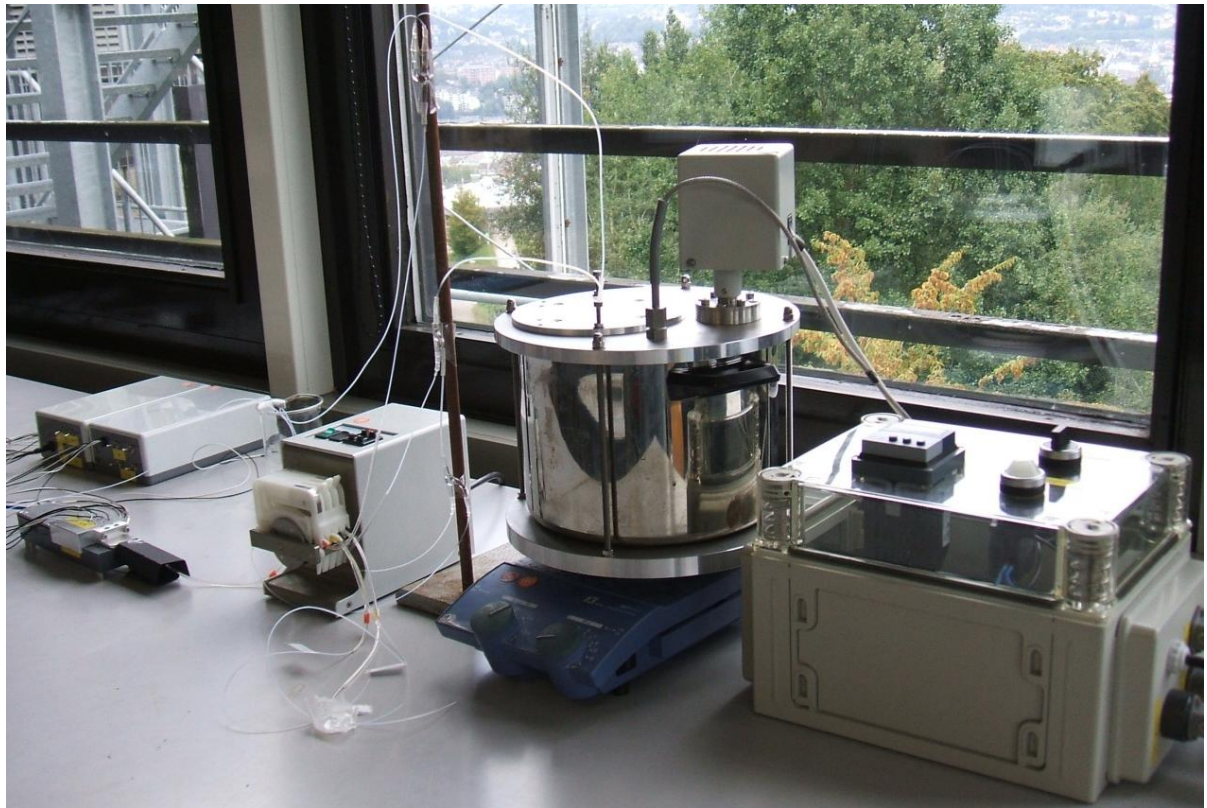


Abbildung 4-1: Gerät Stand Diplomarbeit [10]

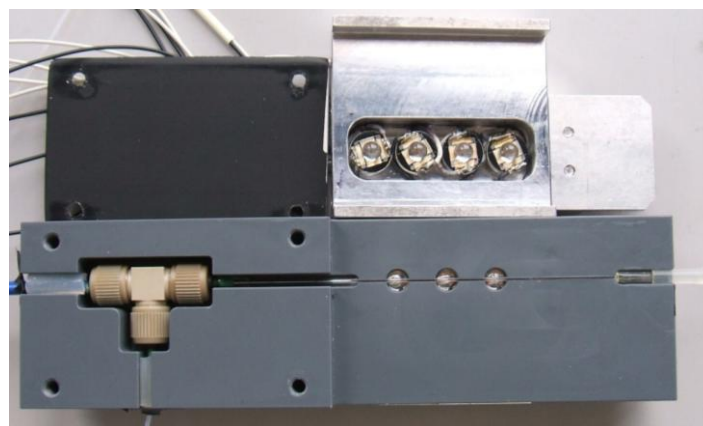
Es wurden erste Messungen von Formaldehydlösungen mithilfe der Hantzsch – Reaktion durchgeführt. Anschließend wurden erste Messungen mit Urin durchgeführt, wobei festgestellt wurde, dass Urin eine Eigenfluoreszenz aufweist, die das Messen mithilfe des Aufstockverfahrens nötig macht und es wurden erste Urinproben gemessen, die mit Formaldehyd versetzt worden waren.

Nach Beendigung dieser Diplomarbeit wurde das Gerät stabiler konstruiert und in einer verbesserten Ausführung neu aufgebaut (Abbildung 4-2).



**Abbildung 4-2: Gerät 2007**

Dafür wurde das zentrale Element des Gerätes (Abbildung 4-3) die Anregungseinheit, unverändert gelassen. Diese besteht aus einer Kapillare, durch die die Probenlösung gepumpt wird. In dieser Kapillare befindet sich eine Glasfaser mit der das Signal an ein UV-VIS-Spektrometer weitergeleitet wird. Insgesamt 7 LEDs befinden sich versetzt angeordnet über und unter der Kapillare, so dass diese komplett ausgeleuchtet wird. Die LEDs sind einzeln ansteuerbar.



**Abbildung 4-3: Anregungszelle**

Deutlich verändert wurde allerdings die Reaktionseinheit, in der die Reaktion abläuft



**Abbildung 4-4 Vergleich Reaktionseinheit alt (links) und neu (rechts)**

Die Reaktionseinheit wurde in eine stabile Form überführt. Dafür wurde das doppelte Wasserbad, das über zwei Thermometer manuell gesteuert wurde, durch einen mit Wasser gefüllten Kochtopf ersetzt. Der Schlauch, in dem die Reaktion abläuft, wurde wie in obiger Abbildung zu sehen aufgewickelt und in das Wasserbad getaucht. Die Temperatur dieses Wasserbades wird über ein Thermoelement PT100 und einen daran angeschlossenen Regler gesteuert und auf der gewünschten Temperatur gehalten.



**Abbildung 4-5: Temperaturregler**

Die verschiedenen Lösungen werden über T-Stücke miteinander vermischt, allerdings mussten diese während der Entwicklung zeitweise ausgebaut werden.

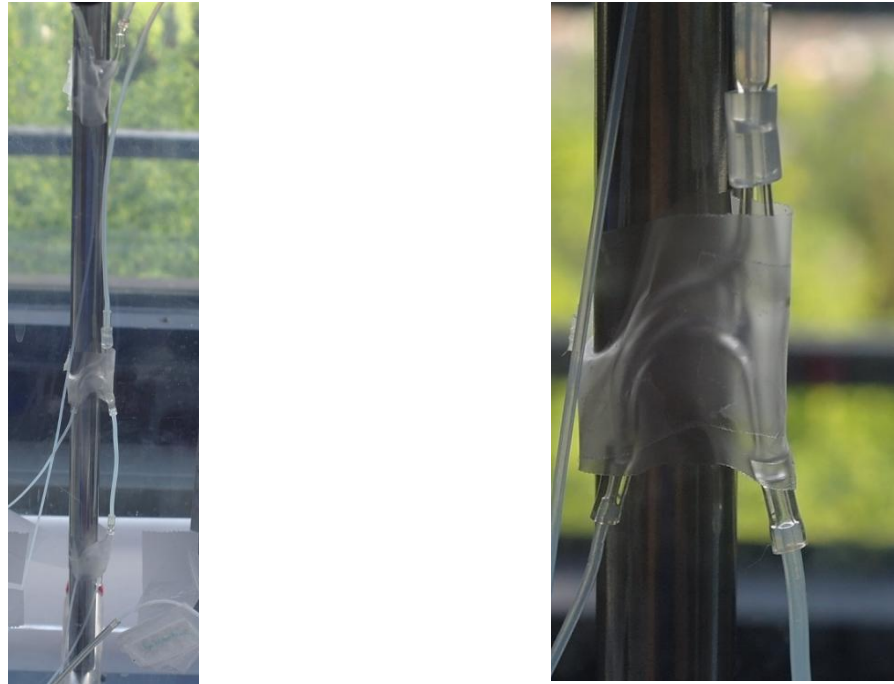


Abbildung 4-6: T-Stücke

Mit diesem Aufbau wurden dann erste Testmessungen durchgeführt, um den messbaren Bereich einzugrenzen. Dafür wurden 5 verschiedene Formaldehydkonzentrationen eingesetzt:

- 35,03 mg/L
- 3,503 mg/L
- $3,503 \times 10^{-1}$  mg/L
- $3,503 \times 10^{-2}$  mg/L
- $3,503 \times 10^{-3}$  mg/L

Die Spectra suite Einstellungen betragen in diesen Messungen

- Integration time: 100 ms
- Average: 100
- Boxcar width: 21

Die Fließgeschwindigkeit der Pumpe ist auf 5 eingestellt, die Spektren wurden minütlich aufgezeichnet.

Die zu messenden Proben wurden hergestellt, indem Formaldehydlösung mit 35,03 mg/L und die Formaldehydlösung mit 3,503 mg/l verdünnt wurden. Anschließend wurde die

Formaldehydlösung durch zwei Schläuche und das Nash-Reagenz durch einen Schlauch in die Apparatur gepumpt.

Für die ersten Messungen werden die Konzentrationen dann auf die folgenden geändert: 1,7 mg/L; 2,4 mg/L; 3,1 mg/L; 3,5 mg/L; 7,0 mg/L; 10,4 mg/L; 14,0 mg/L; 17,5 mg/L; 21,0 mg/L; 24,5 mg/L; 28,0 mg/L; 31,5 mg/L; 35 mg/L

Für jede Konzentration werden drei Spektren aufgenommen die Daten dann als Textdatei gespeichert und in Excel konvertiert.

```
SpectraSuite Data File
+++++
Date: Wed Aug 29 10:34:27 CEST 2007
User: Anne
Dark Spectrum Present: No
Reference Spectrum Present: No
Number of Sampled Component Spectra: 1
Spectrometers: USB4C01506
Integration Time (usec): 100000 (USB4C01506)
Spectra Averaged: 100 (USB4C01506)
Boxcar Smoothing: 21 (USB4C01506)
Correct for Electrical Dark: No (USB4C01506)
Strobe/Lamp Enabled: No (USB4C01506)
Correct for Detector Non-linearity: No (USB4C01506)
Correct for Stray Light: No (USB4C01506)
Number of Pixels in Processed Spectrum: 3648
>>>>Begin Processed Spectral Data<<<<
178,19          1313,24
178,41          1313,24
178,63          1313,24
178,85          1312,48
179,06          1317,99
179,28          1655,58
179,5          1793,63
179,72          1695,49
179,93          1682,16
180,15          1659,39
180,37          1687,16
180,59          1762,36
180,8          1753,86
181,02          1705,57
181,24          1648,59
181,46          1695,33
181,67          1790,76
181,89          1664,18
182,11          1710,93
182,32          1702,11
182,54          1692,18
182,76          1671,78
182,98          1679,97
183,19          1689,38
183,41          1699,6
183,63          1709,4
183,85          1718,5
184,06          1719,46
184,28          1719,24
184,5          1720,28
184,71          1720,95
184,93          1723,37
185,15          1725,05
185,37          1724,73
185,58          1723,02
185,8          1726,17
186,02          1729,26
```

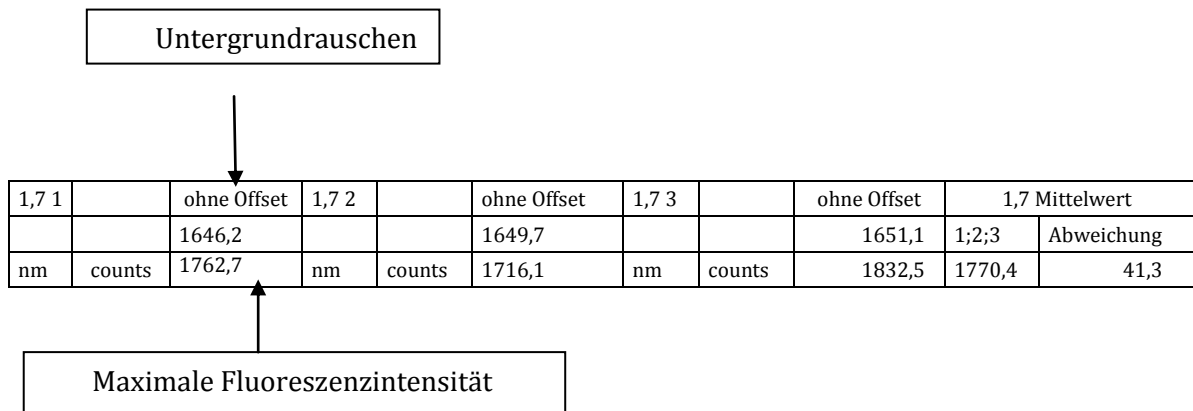
Abbildung 4-7: Excelausgabe des Spektrums

In Excel wurde dann eine Untergrundkorrektur vorgenommen, indem für jede Messreihe die niedrigste gemessene Intensität als Untergrundrauschen festgelegt wurde und diese dann von allen Messwerten eines aufgenommenen Spektrums abgezogen wurde.

1,7 1		ohne Offset
		1646,23
	nm	counts
		1762,74
	178,19	1313,24
	178,41	1313,24
	178,63	1313,24
	178,85	1312,48
	179,06	1317,99
	179,28	1655,58
	179,5	1793,63
	179,72	1695,49
	179,93	1682,16
	180,15	1659,39
	180,37	1687,16
	180,59	1762,36
	180,8	1753,86
	181,02	1705,57
	181,24	1648,59
	181,46	1695,33
	181,67	1790,76
	181,89	1664,18
	182,11	1710,93
	182,32	1702,11
	182,54	1692,18
	182,76	1671,78
	182,98	1679,97
	183,19	1689,38
	183,41	1699,6
	183,63	1709,4
	183,85	1718,5
	184,06	1719,46
	184,28	1719,24
	184,5	1720,28
	184,71	1720,95
	184,93	1723,37
	185,15	1725,05
	185,37	1724,73
	185,58	1723,02
	185,8	1726,17
	186,02	1729,26
	186,24	1728,63
	186,45	1726,93
	186,67	1728,76
	186,89	1728,03
	187,1	1728,66

Abbildung 4-8: Excel-Untergrundrauschen-Korrektur

Dies wurde für jeden Messpunkt einzeln durchgeführt, da das Untergrundrauschen während der Messung in der Intensität steigt. Anschließend wurde die maximale Intensität eines Spektrums im Wellenlängenbereich bestimmt und aus den je drei Messwerten pro Konzentration der Mittelwert gebildet.



Diese Mittelwerte wurden dann gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen und so die Linearität der Messung bestimmt.

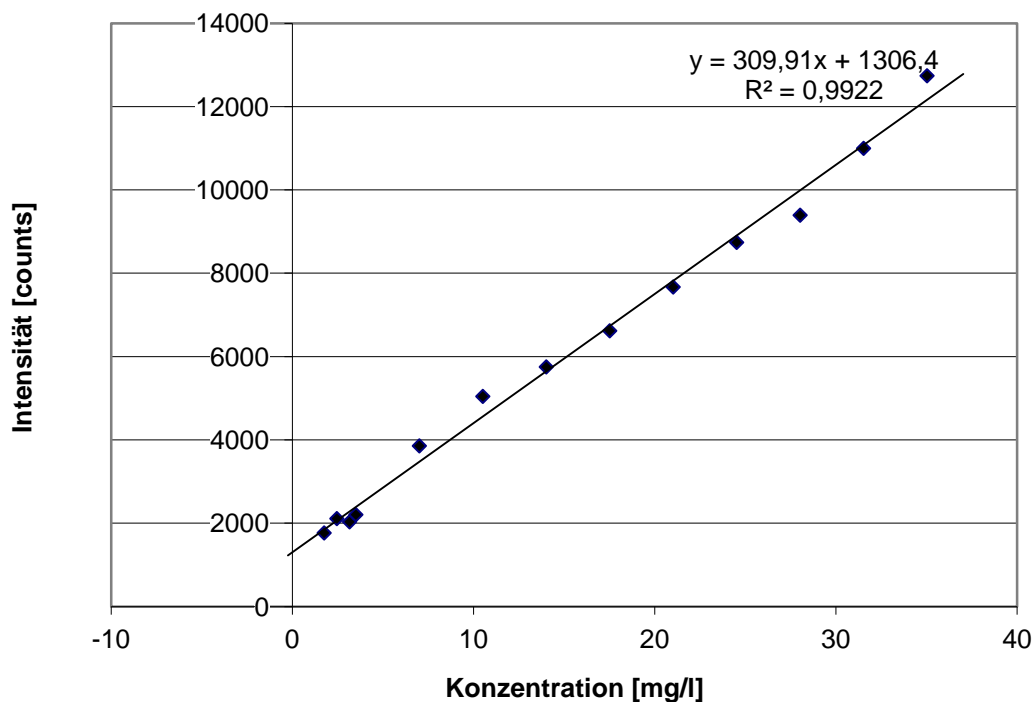


Abbildung 4-9: Abbildung einer kompletten Messung

Die Fehler in der y-Achse sind so klein, dass die Fehlerbalken nicht erkennbar sind und der Fehler in der x-Achse beträgt 0,1 mg/l.



Weiterhin wurde das Verhalten der LED-Lichtintensität gegen die Zeit beobachtet (Abbildung 4-10).

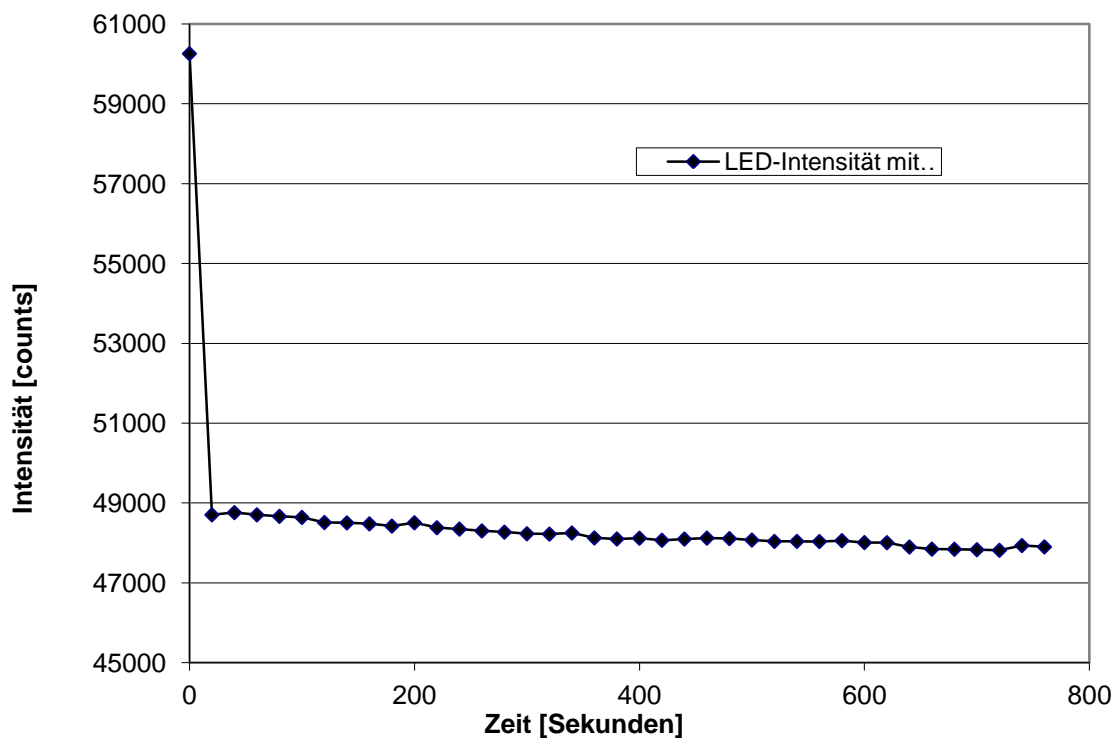


Abbildung 4-10: Signalintensität der LED gegen die Zeit

Dabei stellte sich heraus, dass die LEDs vor Beginn der Messungen für einige Sekunden angeschaltet sein müssen, damit das Signal konstant bleibt. Bei ersten Messungen wurde allerdings festgestellt, dass das Anregungslicht so stark ist, dass die Absorption des Lichtes für die Anregung so gering gegenüber der abgegebenen Lichtmenge ist, dass die Signalstärke der LEDs keine Rolle spielt.

Bei den Messungen trat das Problem auf, dass sich in der Messkapillare immer wieder Gasbläschen bildeten, die die Messungen erheblich störten. Da hier ein Flüssigkernwellenleiter eingesetzt wird, verhindern schon kleinste Gasblasen diese Lichtleitung und es kommt zu starken Schwankungen des Signals. Um die Ursache dafür festzustellen, wurde das Temperaturverhalten der LEDs gegen die Zeit beobachtet, da die LEDs während der Messung konstant über einige Stunden in Betrieb waren. Dazu wurden im Gerät zwei Thermoelemente PT100 zur Temperaturüberwachung eingebaut.

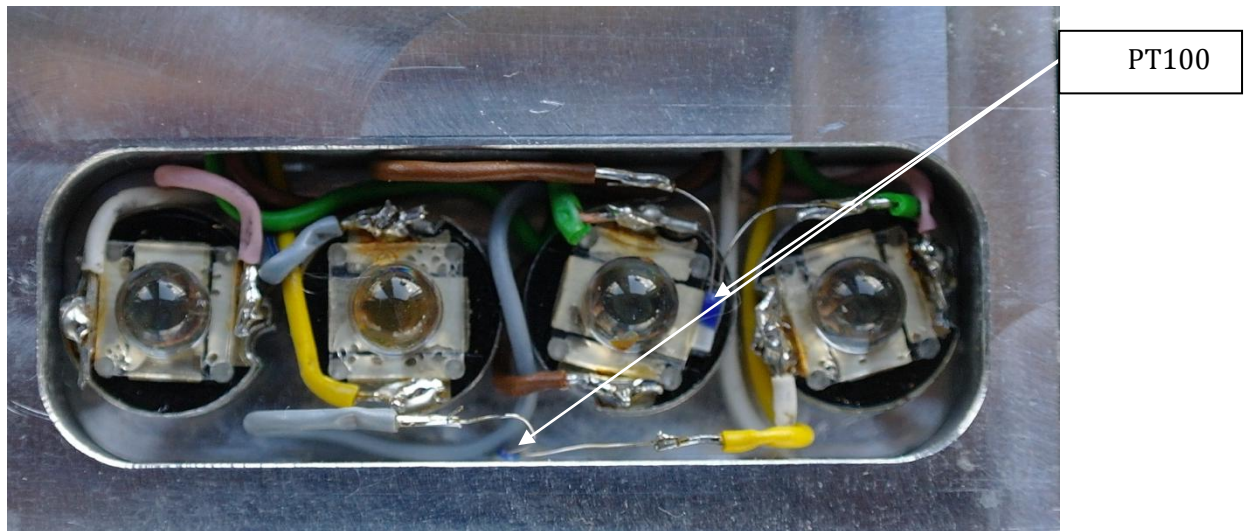


Abbildung 4-11: LEDs und Halterung mit Thermoelement PT100

Die folgende Grafik (Abbildung 4-12) zeigt die Ergebnisse.

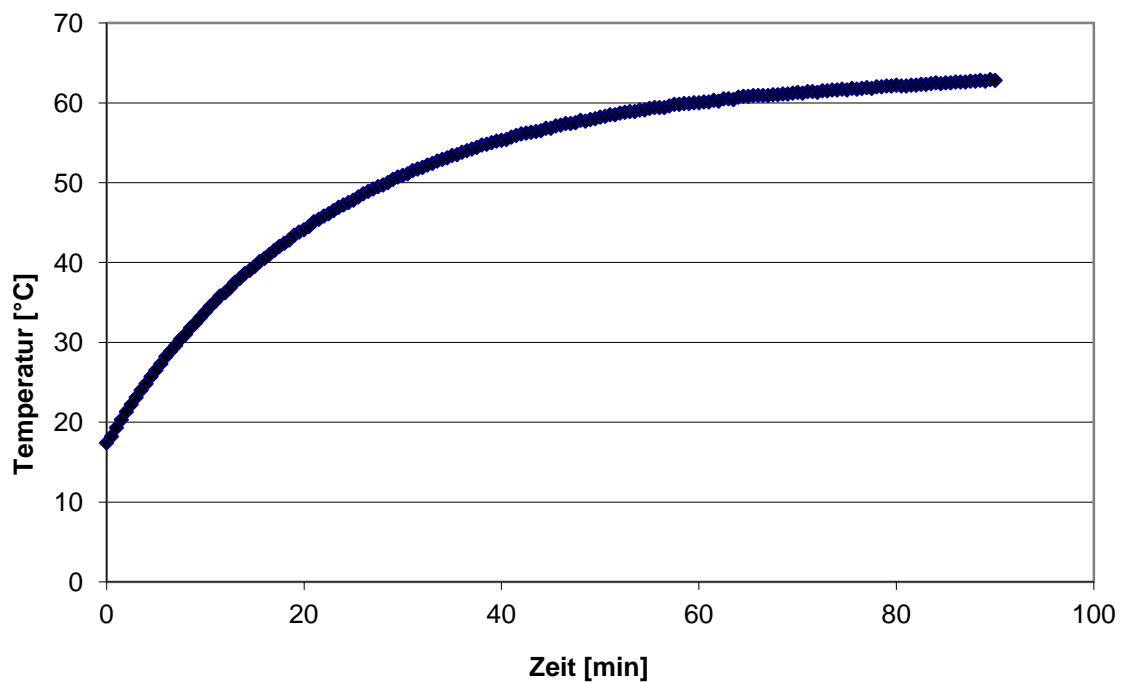


Abbildung 4-12: Temperatur der LED in Abhängigkeit von der Betriebsdauer

Dabei stellte sich heraus, dass sich die LEDs deutlich aufheizten, da in dem Geräte eine Wärmeabfuhr nicht möglich war. Daraufhin wurde das Gerät mit Lüftern versehen und gleichzeitig Transformatoren vor die LEDs eingebaut, da deren Temperatur auch spannungsabhängig ist.

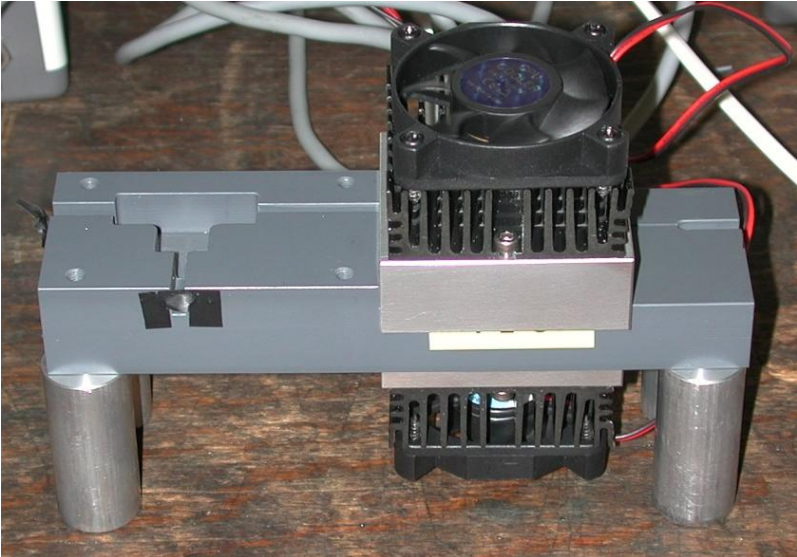


Abbildung 4-13: Skelett Anregungseinheit

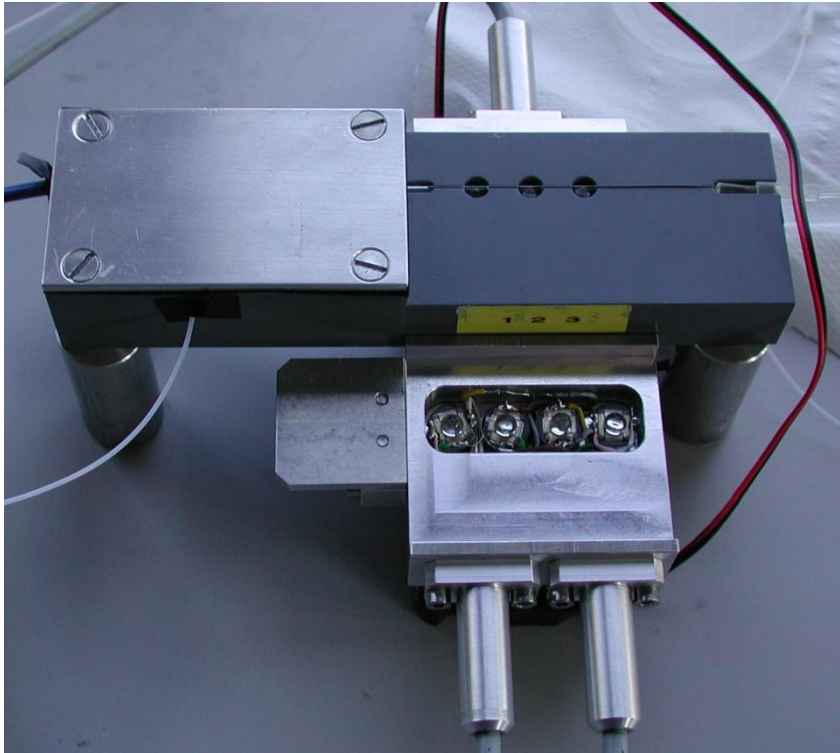


Abbildung 4-14: Anregungseinheit geöffnet

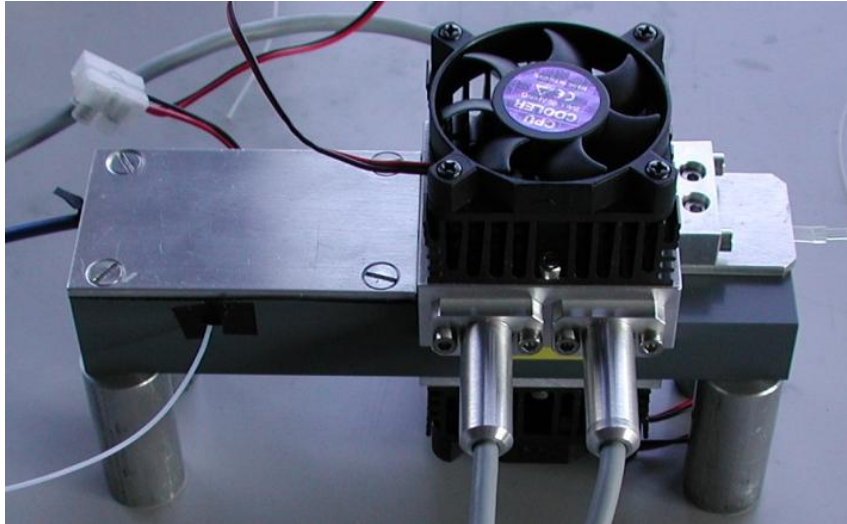


Abbildung 4-15: Anregungseinheit komplett geschlossen

Nun wurde die Temperaturentwicklung gegen die Zeit mit und ohne Kühlung gemessen.

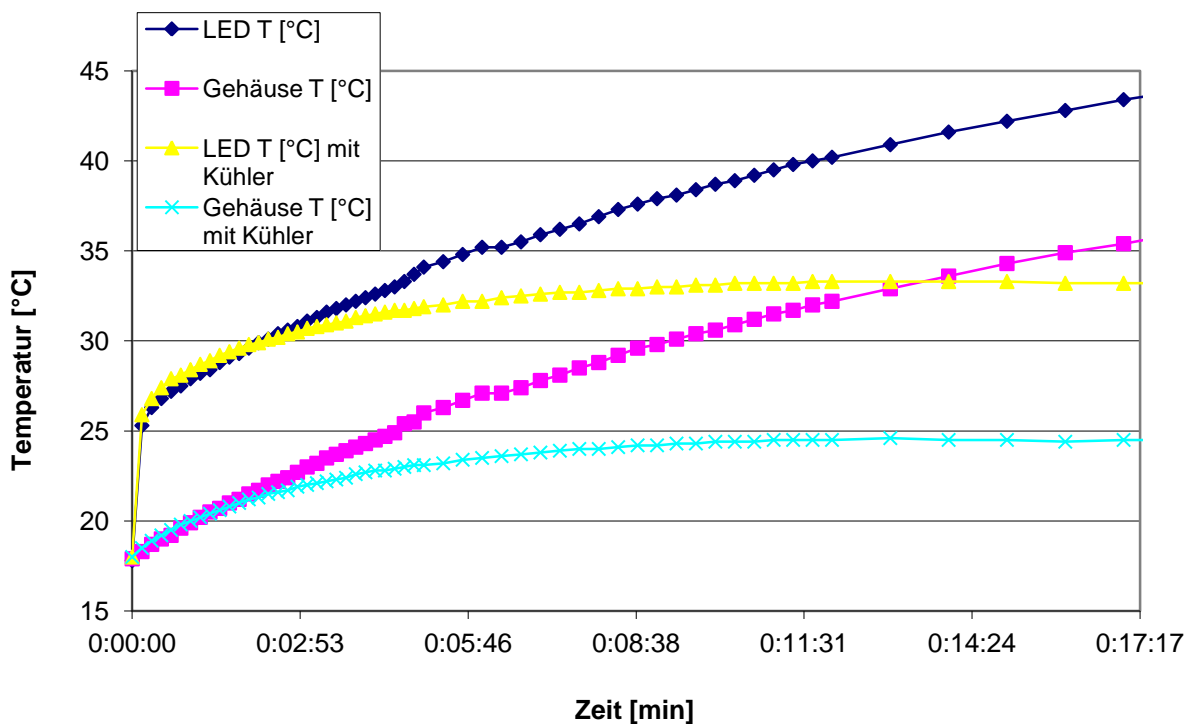


Abbildung 4-16: Temperaturentwicklung der LEDs und des Metallgehäuses gekühlt und ungekühlt

Es ist deutlich erkennbar, dass nach spätestens 5 Minuten so eine konstante Temperatur von 25°C in der Kapillare gewährleistet werden kann, so dass sich dadurch keine Gasblasen mehr bilden sollten.

Nun wurde mit ersten Messungen begonnen und an Excel-Makros gearbeitet, die die Auswertung erleichtern sollten. Diese befinden sich ausführlich im Anhang. Dafür wurde

1. Ein Makro entwickelt, das die Prospec-Dateien (Format des Spectra-Suite-Programmes) in eine Excel-Datei überführt ( Anhang)
2. Ein Makro entwickelt, das dann unter Nachfrage des Speicherortes, ein vom ersten Makro erzeugtes Exceldatenblatt öffnet, die Daten kopiert und dann in ein ebenfalls entwickeltes Auswertungsblatt unter Nachfrage der Speicherposition einfügt (Anhang).

Dieses Auswertungsblatt ist so vorbereitet, dass automatisch das Untergrundrauschen abgezogen, die maximale Intensität der Fluoreszenz bestimmt und aus diesen der Mittelwert berechnet wird (Abbildung 4-17).

1,7 1		ohne Offset		1,7 2		ohne Offset		1,7 3		ohne Offset	1,7 Mittelwert
	0	0			0	0			0	0	1;2;3
nm	counts	0		nm	counts	0		nm	counts	0	0 0
		0				0				0	0 #DIV/0!
		0				0				0	0 0
		0				0				0	1;2;3
		0				0				0	0 0
		0				0				0	0 #DIV/0!

Abbildung 4-17: Auswertungsvorlage

Weiterhin werden diese Werte direkt in einen Bereich des Excelblattes kopiert, aus dem dann direkt die graphische Darstellung der Linearität generiert wird, sowie die Abweichungen der Mittelwerte absolut und prozentual berechnet werden. Weiterhin wird die Konzentration der eingegebenen Formaldehydlösung sowie die Konzentration der Lösung im Gerät, die durch Zugabe von Wasser verdünnt ist berechnet in den nachfolgenden Abbildungen von Excelauswertungsblätter sind noch alle Nachkommastellen enthalten, diese wurden für die weitere Auswertung gerundet.

Konzentration [mg/l]	Konzentration korr [mg/l]	Intensität am Max	Konzentration [mmol/l]	Konzentration korr [mmol/l]		
0	0	0	0	0		
1,7515	1,1677	0	0,0583	0,0389		
2,4521	1,6347	0	0,0817	0,0544		
3,1527	2,1018	0	0,1050	0,0700		
3,503	2,3353	0	0,1167	0,0778		
7,006	4,6707	0	0,2333	0,1556		
10,509	7,006	0	0,3410	0,2333		
14,012	9,3413	0	0,4667	0,3111		
17,515	11,6767	0	0,5833	0,3889		
21,018	14,012	0	0,7000	0,4667		
24,521	16,3473	0	0,8167	0,5444		
28,025	18,6833	0	0,9334	0,6222		
31,527	21,018	0	1,0500	0,7000		
35,03	23,3533	0	1,1667	0,7778		
Konzentration	Konzentration korr	Intensität am Max	Fehler ausgewählt	Fehler ausgewählt prozentual	Gesamtfehler	Gesamtfehler prozentual
0		0	0	#DIV/0!	0	#DIV/0!
1,7515		0	0	#DIV/0!	0	#DIV/0!
2,4521		0	0	#DIV/0!	0	#DIV/0!
3,1527		0	0	#DIV/0!	0	#DIV/0!
3,503		0	0	#DIV/0!	0	#DIV/0!
7,006		0	0	#DIV/0!	0	#DIV/0!
10,509		0	0	#DIV/0!	0	#DIV/0!
14,012		0	0	#DIV/0!	0	#DIV/0!
17,515		0	0	#DIV/0!	0	#DIV/0!
21,018		0	0	#DIV/0!	0	#DIV/0!
24,521		0	0	#DIV/0!	0	#DIV/0!
28,025		0	0	#DIV/0!	0	#DIV/0!
31,527		0	0	#DIV/0!	0	#DIV/0!
35,03		0	0	#DIV/0!	0	#DIV/0!

Abbildung 4-18: Auswertungsvorlage

An diesem Punkt der Berechnung kam erstmals die Fragestellung auf, wie man die Reproduzierbarkeit der Messungen überprüfen kann. In dieser Messdurchführung wird das Aufstockverfahren angewandt. Nimmt man nun eine bekannte Konzentration der Formaldehydlösung und setzt diese gleich Null, so sollte mit den nachfolgenden Konzentrationen als Aufstockverfahren die bekannte Konzentration berechnet werden.

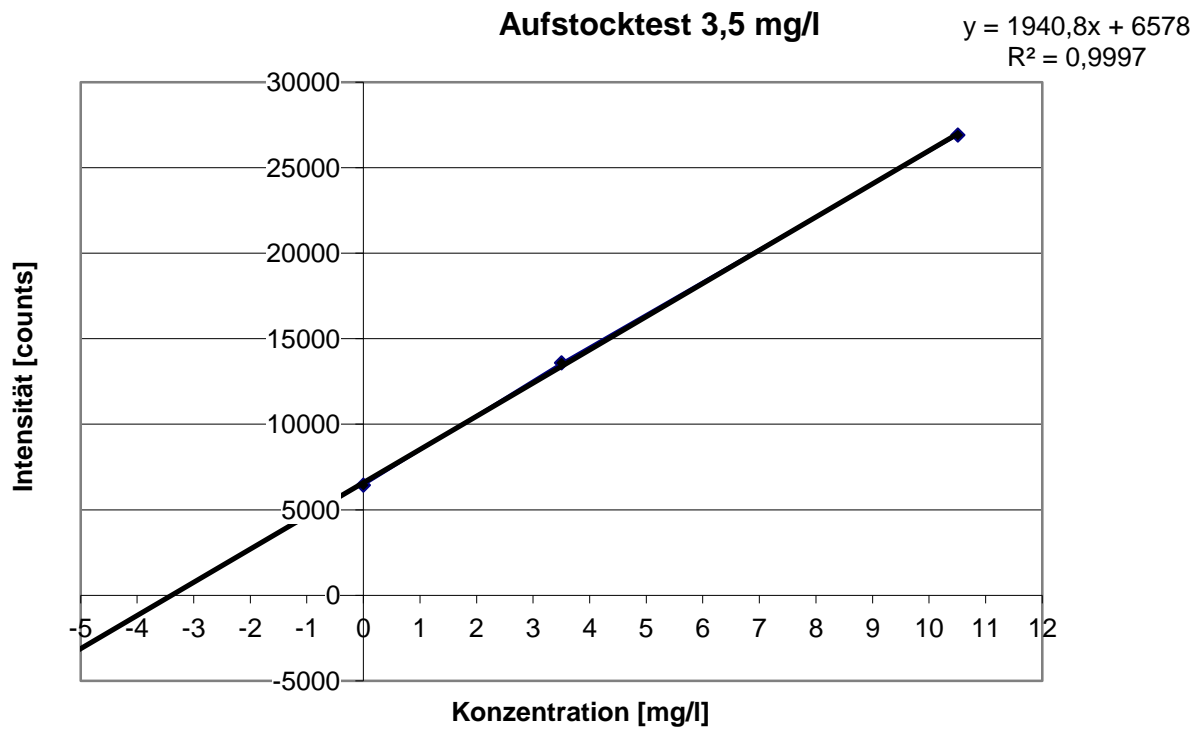


Abbildung 4-19: Überprüfung der Messqualität

Das Excelauswertungsblatt wird so erweitert, dass die obige graphische Auswertung direkt für die folgenden Konzentrationen generiert wird:

- 1,7515 mg/L
- 3,503 mg/L
- 7,006 mg/L
- 10,509 mg/L

Test Aufstockung				
Konzentration echt		Konzentration -1,7515	Intensität	
	1,7515		0	0
	2,4521		0,7006	0
	3,1527		1,4012	0
Test Aufstockung				
Konzentration echt		Konzentration -3,503	Intensität	
	3,503		0	0
	7,006		3,503	0
	10,509		7,006	0
Test Aufstockung				
Konzentration echt		Konzentration -7,006	Intensität	
	7,006		0	0
	10,509		3,503	0
	14,012		7,006	0
Test Aufstockung				
Konzentration echt		Konzentration -10,509	Intensität	
	10,509		0	0
	14,012		3,503	0
	17,515		7,006	0

Abbildung 4-20: Auswertungsvorlage

Leider war das Gasblasenproblem mit dem Einbau der Kühlung zwar gemindert, aber nicht vollständig behoben worden. Es gelang erst, als herausgefunden wurde, dass die für das Gerät neu gekaufte Glasfaser mit Aluminium ummantelt war. Dieses reagiert mit der in dem Nash – Reagenz enthaltenen Säure aufgrund der Wärmeeinwirkung unter Wasserstoffbildung und bildet die beobachteten Gasblasen [236].



Mit dem Einsatz einer neuen polyimidummantelten Glasfaser war das Problem behoben und die Messgeräteentwicklung konnte beginnen.



## **4.2. Entwicklung des Gerätes**

### **4.2.1. Entwicklungsschritte**

#### **4.2.1.1. Wässrige Formaldehydlösungen**

Nach Einbau der neuen Glasfaser mit einem Durchmesser von 300 µm wurden nun erste Messungen mit wässrigen Formaldehydlösungen durchgeführt. Um wirklich alle Fehlerquellen auszuschließen, wurden alle T-Stücke, bis auf das T-Stück zur Gasblasenentfernung wieder ausgebaut und die Lösungen extern im Verhältnis 1:1 Formaldehydlösung mit Nash-Reagenz gemischt. Diese wurden dann durch einen Schlauch in das Gerät gepumpt. Nach 4 min. 30 sec., dies ist die Zeit, die die Lösung von den Gefäßen bis zum Erreichen der Anregungseinheit benötigt, wurden die Lösungen getauscht und drei Spektren im Abstand von einer Minute aufgenommen. Spectra suite hat dabei die Einstellungen:

- Integration time: 100 ms
- boxcar: 10
- scan to average: 30

Für diese Messungen wurden die folgenden Konzentrationen gewählt:

- 1,7515 mg/L
- 2,4521 mg/L
- 3,1527 mg/L
- 3,503 mg/L
- 7,006 mg/L
- 10,509 mg/L
- 14,012 mg/L
- 17,515 mg/L
- 21,018 mg/L
- 24,521 mg/L
- 28,025 mg/L
- 31,527 mg/L

Dabei wurde festgestellt, dass Konzentrationen über 21,018 mg/L nicht mehr messbar sind (Abbildung 4-21), da die Lösung dann zu konzentriert ist.

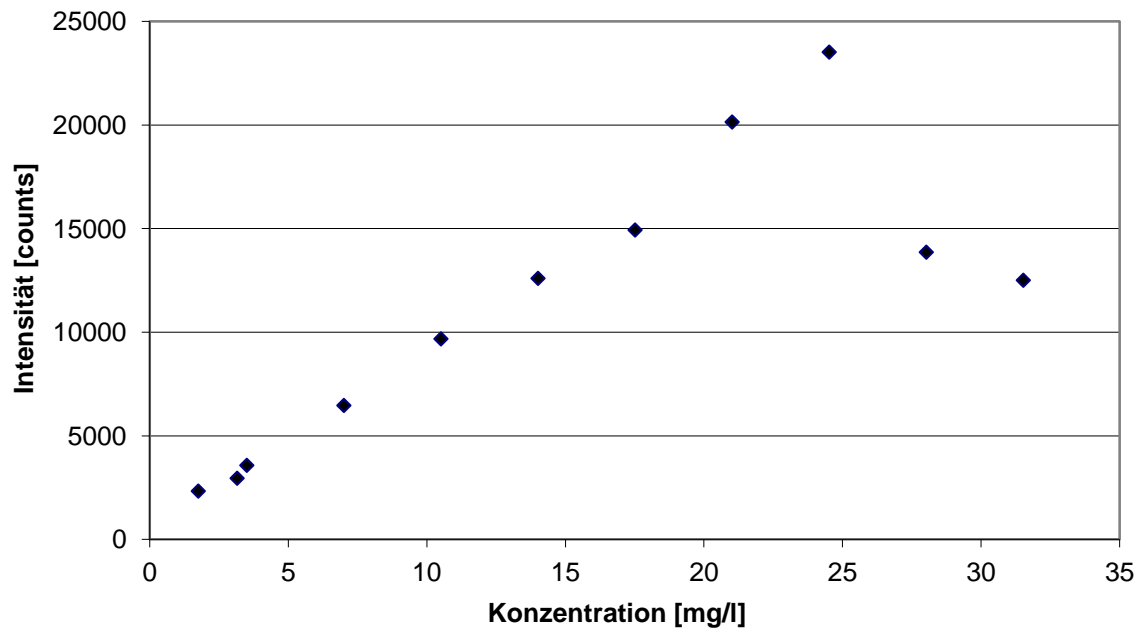


Abbildung 4-21: Bestimmung des linearen Bereiches

Und nachfolgend wurden die Formaldehydlösungen mit den Konzentrationen:

- 24,521 mg/L
- 28,025 mg/L
- 31,527 mg/L

nicht mehr gemessen.

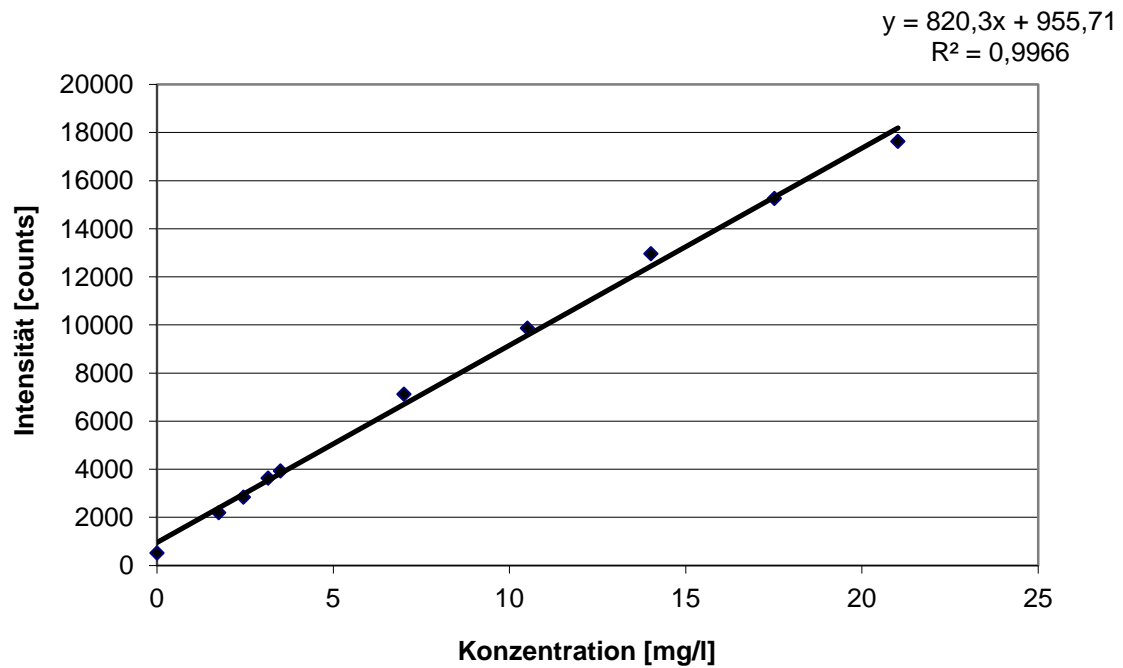


Abbildung 4-22: Linearitätsbereich

Da bei diesen Messungen auffiel, dass der Messwert für 21,018 mg/L nicht mehr ganz in der Linearität liegt, wurden für die Bestimmung der Qualität der Messreihe nur noch die Messwerte bis zur Formaldehydkonzentration 17,515 mg/L berücksichtigt. Nun wurde aufbauend auf diese ersten Ergebnisse das Excelauswertungsblatt geändert, indem Vorlagenblätter mit Bezügen versetzt wurden, so dass aus den mit Hilfe des Makros eingefügten Rohdaten direkt die drei Spektren einer jeweiligen Konzentration in einem Blatt dargestellt wurden, wodurch eventuelle Ausreißer durch Schwankungen, Luftblasen oder Schwebstoffe im Gerät direkt erkannt werden konnten. Beispielhaft ist das Spektrum für 1,7515 mg/L gezeigt (Abbildung 4-23)

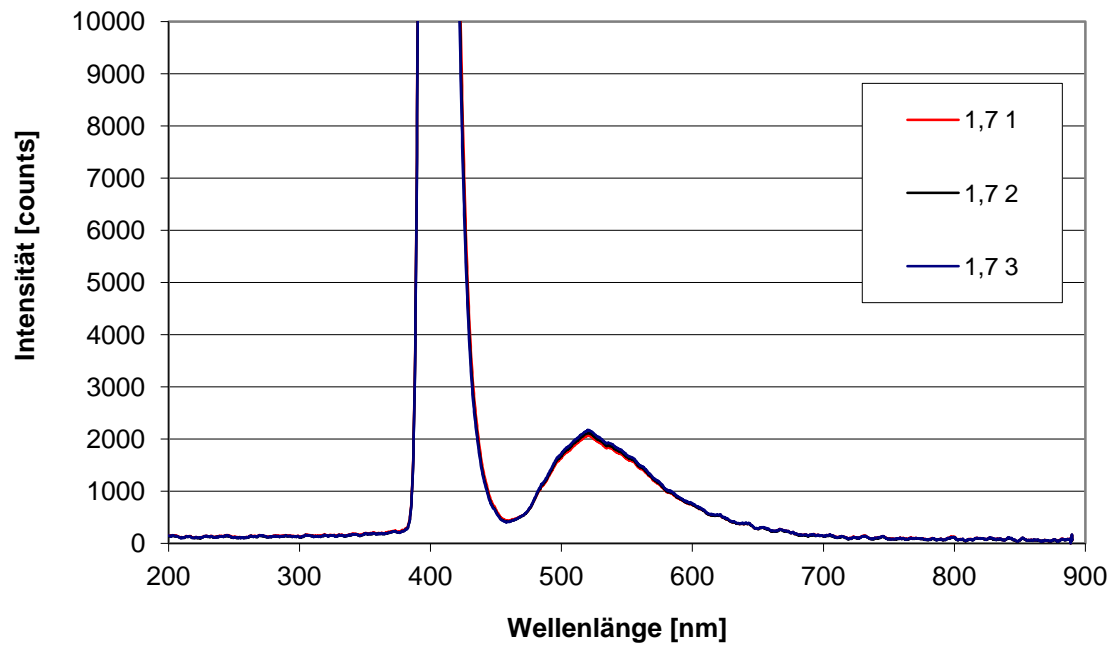


Abbildung 4-23: Spektren einer Konzentration

In der nachfolgend Abbildung (Abbildung 4-24) sieht man deutlich für das dritte Spektrum (7 mg/L 3), wie sich durch eine Gasblase das Signal des Anregunglichtes deutlich verbreitert hat und das Signal der Fluoreszenz abgeschwächt wird.

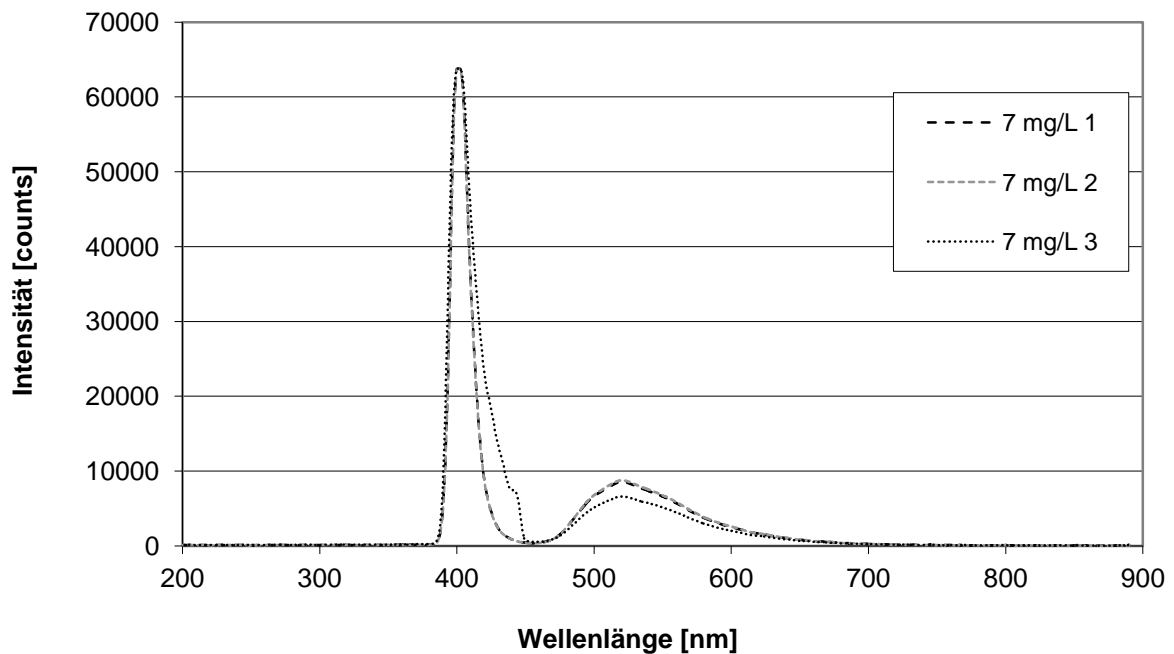


Abbildung 4-24: durch Gasblasen verändertes Spektrum

Für jede Konzentration gibt es eine solche Übersicht. Weiterhin wird direkt die angesprochene Überprüfung der Messreihe durchgeführt.

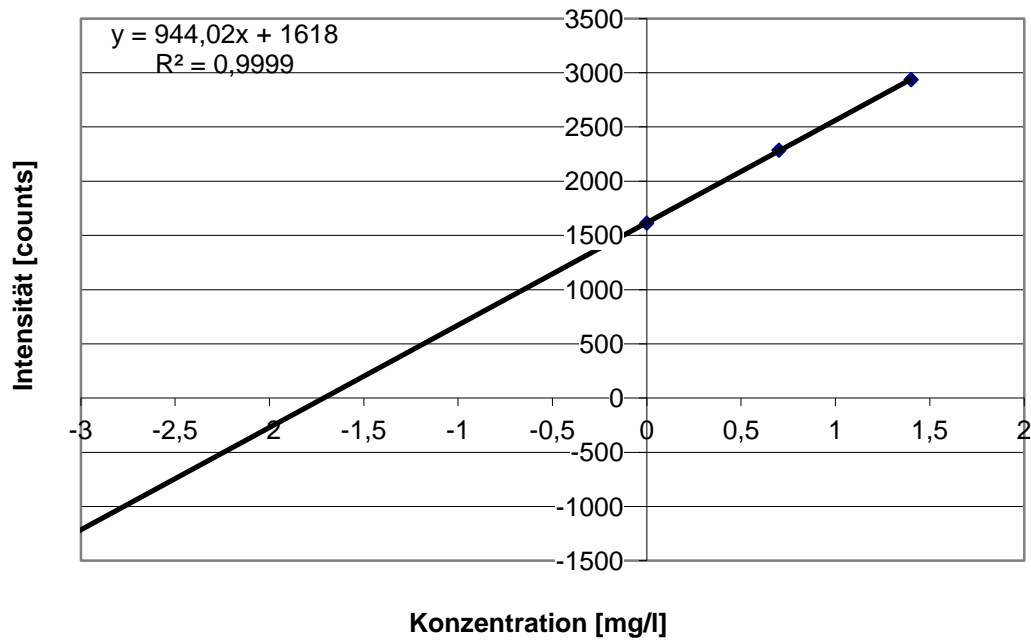


Abbildung 4-25: Aufstocktest

Anschließend wird die Linearität der Messung graphisch dargestellt, wobei einmal der gesamte Konzentrationsbereich (Abbildung 4-26) einmal nur die niedrigen Konzentrationen (Abbildung 4-27) dargestellt werden.

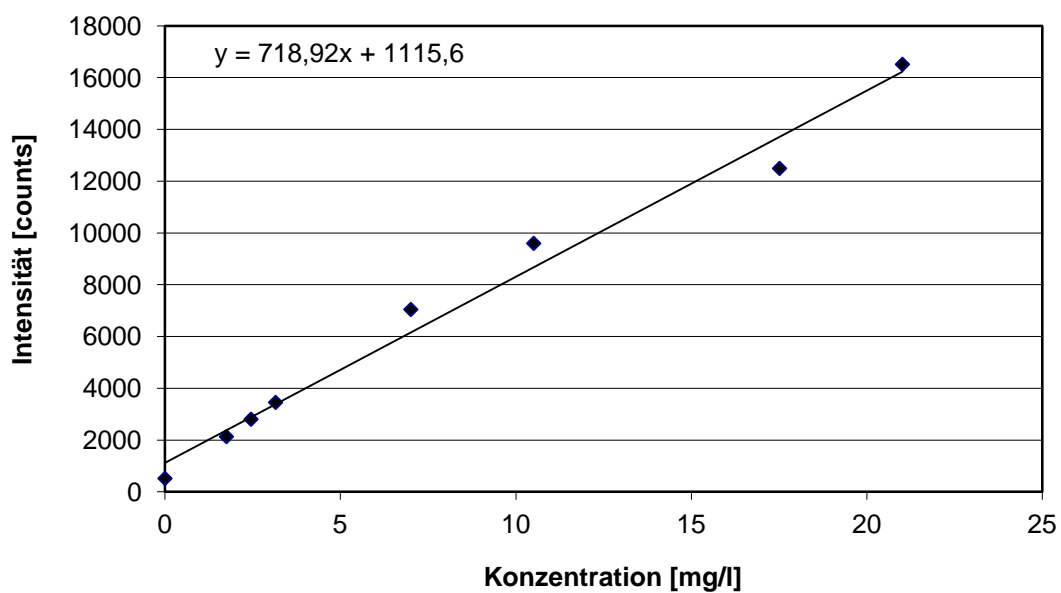


Abbildung 4-26: komplette Messdurchlauf

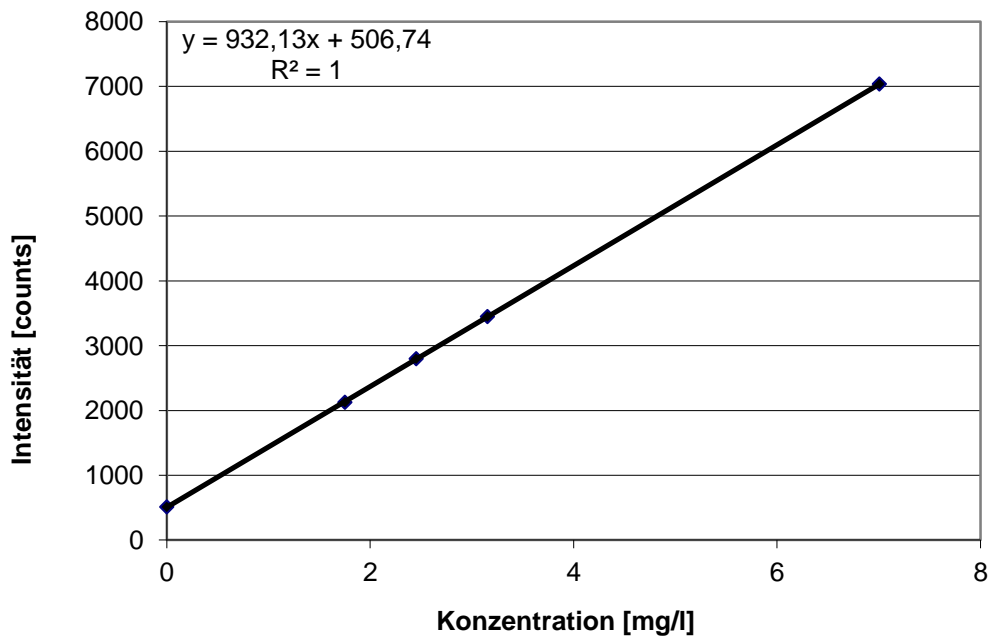


Abbildung 4-27: Linearer Messbereich

Man erkennt dann deutlich, welche Messpunkte bei einer späteren Urinanalyse genutzt werden sollten. Soweit vorbereitet wurden nun die ersten Urinproben gemessen.

#### 4.2.1.2. *Urin*

#### 4.2.1.3. *Urin Messungen ohne T-Stücke*

Auch für die Urinmessungen wurden zuerst die T-Stücke, bis auf das T-Stück zur Gasblasenentfernung nicht verwendet, sondern die Urinprobe extern mit Nash-Reagenz und Formaldehydaufstocklösung versetzt. Dafür wurden 1 mL Urin mit 3 mL Wasser gemischt, um das Untergrundspektrum von Urin bestimmen zu können. 1 ml Urin wurden mit 1 mL Wasser und 2 mL Nash-Reagenz gemischt, um das Formaldehydspektrum aufzunehmen und 1 mL Urin wurden mit 1 mL Aufstocklösung und 2 mL Nash-Reagenz gemischt. Es wurden auch hier drei Spektren pro Konzentration aufgenommen und drei komplette Messreihen pro Probe durchgeführt. Die verschiedenen Lösungen wurden weiterhin nach 4 min 30 sec gewechselt.

Um dies zu berücksichtigen wurde das Excel-Auswertungsblatt dahin gehend geändert, dass auch die Urinwerte direkt berechnet werden. Dies soll einmal exemplarisch an einer Messung beschrieben werden. Zuerst wurde auch hier die Linearität der Messung betrachtet (Abbildung 4-28)

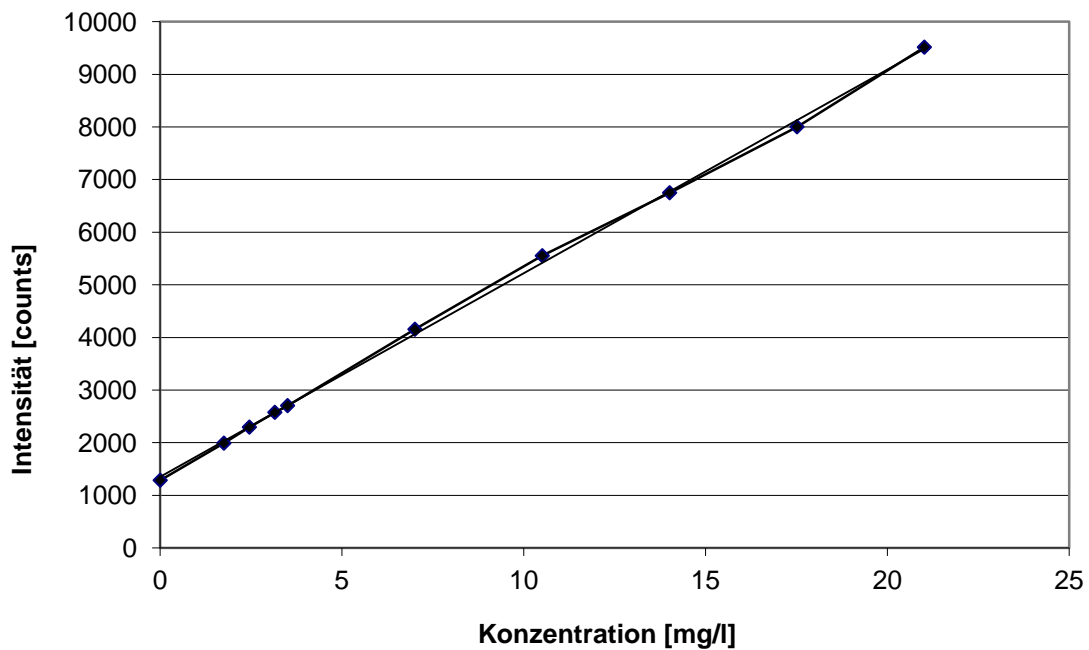


Abbildung 4-28: komplette Messdurchlauf

So sind Außreißer direkt erkennbar. Dann wird die Qualität der einzelnen Messpunkte durch die Überprüfung der Aufstocklösung durchgeführt. Dafür wird eine Aufstocklösung „Null“ gesetzt, so dass der x-Achsenabschnitt den Formaldehydgehalt der Aufstocklösung + dem Formaldehydgehalt in der Urinprobe ergeben sollte.

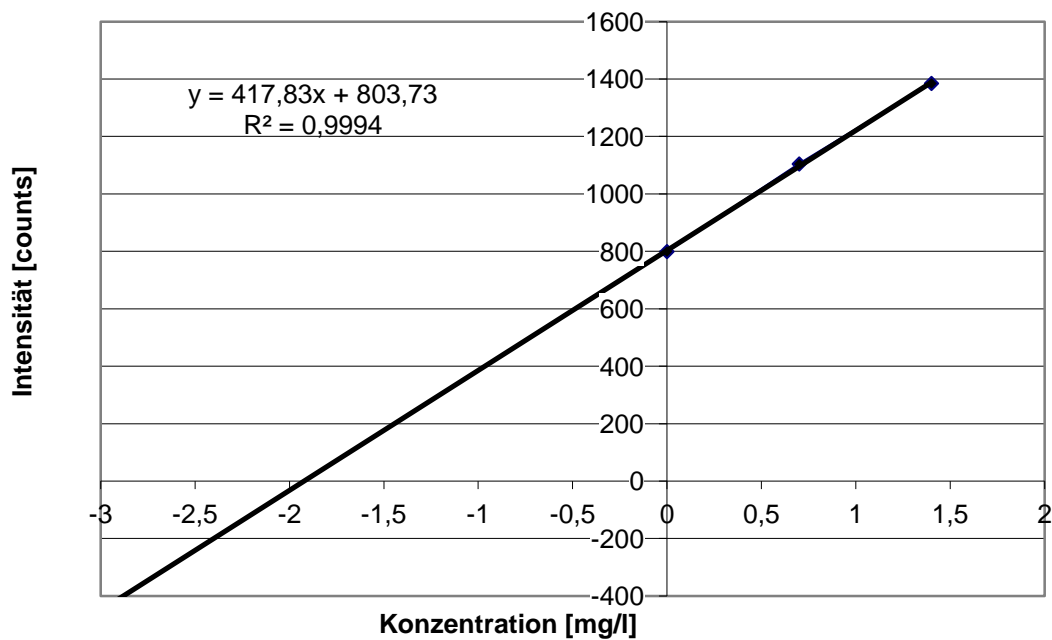


Abbildung 4-29: Aufstockverfahren komplett

Zieht man nun das Urinsignal ab, so sollte man nun die hier gewählten 1,7 mg/L erhalten.

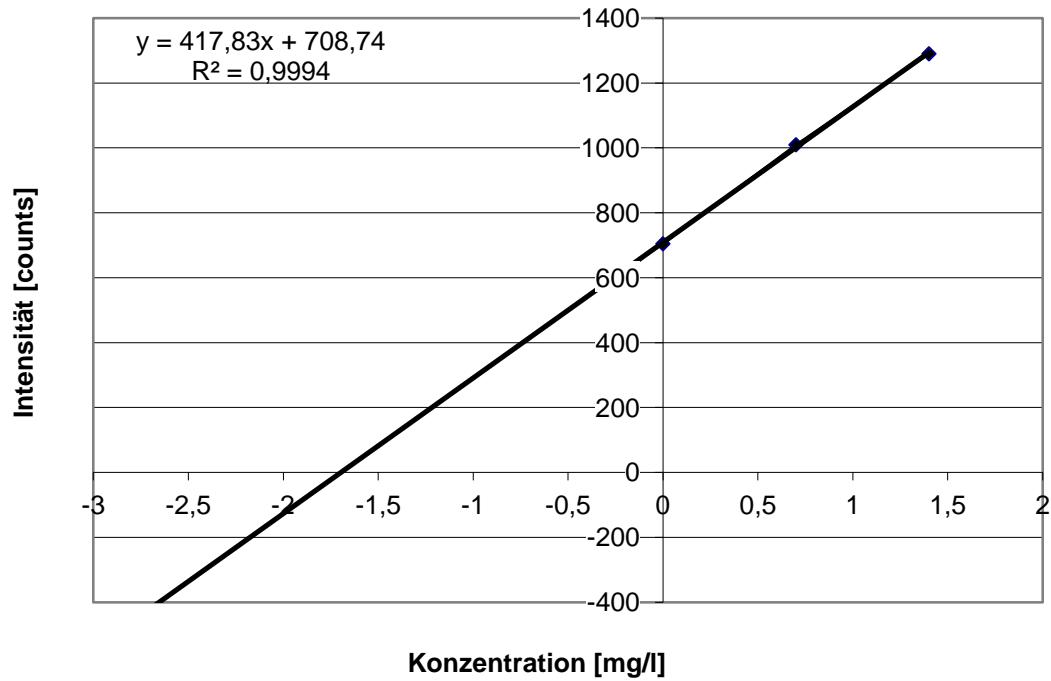


Abbildung 4-30: Aufstockverfahren nach Abzug des Urinwertes

Um nun den Formaldehydgehalt in der Urinprobe zu bestimmen wird das echte Aufstockverfahren, das auch unter dem Begriff Standardaddition bekannt ist durchgeführt.



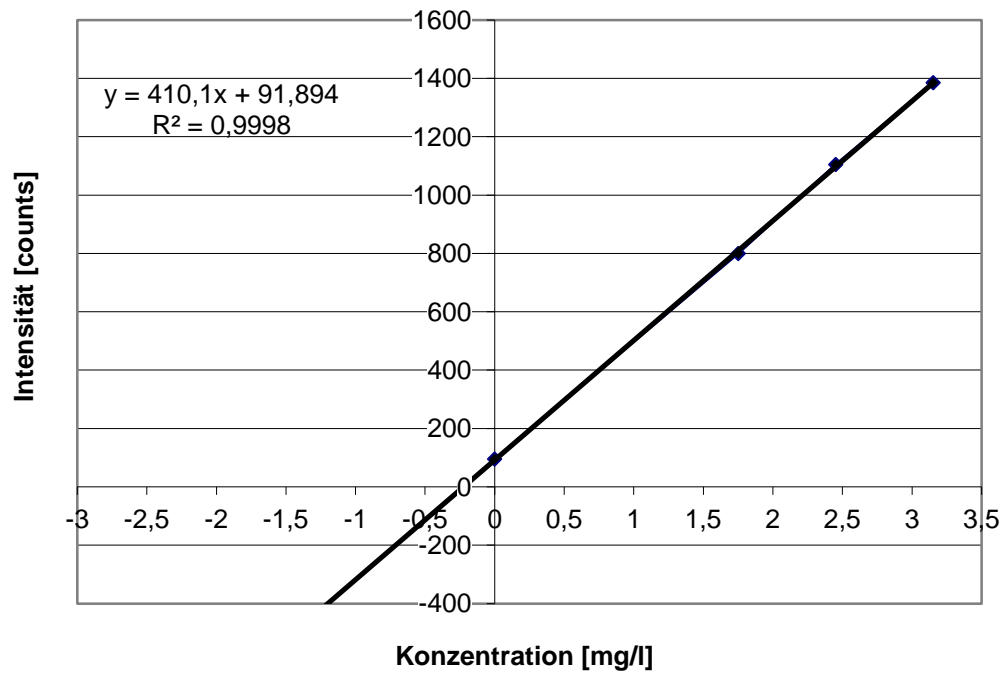


Abbildung 4-31: Standardaddition

Um bei der Fülle der so entstehenden Daten den Überblick zu behalten, wurde nun zuerst in Word ein Auswertungsblatt entwickelt, in das die Daten eingetragen werden können (siehe Anhang). Aus diesem wurde dann ein Excelblatt entwickelt, in dem sich direkt die Rechenbezüge<sup>2</sup> finden.

Urinmessung									
Datum:									
Person:									
Bemerkung :	alle Werte in [mg/l]								
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Mittelwert	Fehler abs	Fehler %	abs Abweichung	proz. Abweichung
1,7515					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!		
1,7 - Urin					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!	#DIV/0!	#DIV/0!
1,7 Urin					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!		
2,4521					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!		
2,4 - Urin					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!	#DIV/0!	#DIV/0!
2,4 Urin					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!		
3,1527					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!		

<sup>2</sup> Diese Rechenbezüge erkennt man an #DIV/0!; bzw. #Zahl!

3,1 - Urin					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!	#DIV/0!	#DIV/0!
3,1 Urin					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!		
3,503					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!		
3,5 - Urin					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!	#DIV/0!	#DIV/0!
3,5 Urin					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!		
7,006					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!		
7,0 - Urin					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!	#DIV/0!	#DIV/0!
7,0 Urin					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!		
Urinwert	Fehler abs	Fehler %							
#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!							
Abweichung der Aufstockung									
	1,7515	2,4521	3,1527	3,503	7,006				
absolut	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!				
prozentual	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!				
x:	Intensität - Urinuntergrund								
	x = 0								
	Achsenabschnitt: x + Urinkonzentration								
x - Urin:	Intensität - Urin								
	x = 0								
	Achsenabschnitt: x								
	Überprüfung der Aufstockung								
x Urin:	Intensität - Urinuntergrund								
	Urin = 0								
	Achsenabschnitt: Urinkonzentration								
	"echtes" Aufstockverfahren								

Abbildung 4-32: Auswertungsblatt Urin

#### 4.2.1.4. Urin-Messungen mit T-Stücken

Nach den bis hierhin beschriebenen Vorarbeiten wurden nun die T-Stücke wieder eingesetzt. Die Urinprobe, die Aufstocklösungen und das Nash-Reagenz wurden durch je einen Schlauch in das Gerät gepumpt und in den T-Stücken gemischt. Dadurch wird eine deutliche Arbeitserleichterung mit verbundener Zeitersparnis erreicht.



Abbildung 4-33: T-Stück

Weiterhin wurde die Messdurchführung dahin gehend geändert, dass der Schlauch, der die Aufstocklösung führt, alle 10 min in eine neue Lösung gegeben wird und bei 2, 3 und 4 Minuten ein Spektrum aufgenommen wird, so dass auch hier pro Konzentration 3 Spektren aufgenommen werden und pro Probe 3 Messdurchläufe durchgeführt werden.

Beispielhaft sei hier einmal das oben beschriebene Auswertungsblatt einer Urinmessung gezeigt, wobei hier nur die Excelergebnisse angezeigt werden. Die überflüssigen Nachkommastellen wurden bei der Bearbeitung gerundet

Urinmessung									
Datum:	22.8.08								
Person:	2								
Bemerkung	alle Werte in [mg/l]								
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Mittelwert	Fehler abs	Fehler %	abs Abweichung	proz. Abweichung
1,7515	1,9447	1,9178			1,9312	0,0134	0,6960		
1,7 - Urin	1,7031	1,7133			1,7082	0,0051	0,2988	0,04328	-2,4710
1,7 Urin	0,2389	0,2020			0,2204	0,0185	8,3939		
2,4521	2,5332	2,5670			2,5500	0,0169	0,6622		
2,4 - Urin	2,2997	2,3662			2,3330	0,0332	1,4240	0,1191	-4,8564
2,4 Urin	0,2356	0,2011			0,2183	0,0173	7,9063		
3,1527	3,2835	3,2091			3,2463	0,0378	1,1452		
3,1 - Urin	3,0468	3,0117			3,0293	0,0176	0,5800	0,1234	-3,9137
3,1 Urin	0,2104	0,1616			0,1860	0,0244	13,129		
3,503	3,7579	3,6906			3,7243	0,0337	0,9037		
3,5 - Urin	3,5149	3,4878			3,5014	0,0135	0,3864	0,0016	-0,0463
3,5 Urin	0,2463	0,1985			0,2224	0,0239	10,7598		

7,006	8,0439	8,0294			8,0367	0,0073	0,0905		
7,0 - Urin	7,7794	7,8071			7,7933	0,0139	0,1778	-0,7873	11,2371
7,0 Urin	0,4014	0,2802			0,3408	0,0606	17,7921		
Urinwert	Fehler abs	Fehler %							
0,211821	0,0214	10,0866							
Abweichung der Aufstockung									
	1,7515	2,4521	3,1527	3,503	7,006				
absolut	0,0433	0,1191	0,1234	0,0016	0,7873				
prozentual	2,4710	4,8564	3,9137	0,0463	11,237				
x:	Intensität - Urinuntergrund								
	x = 0								
	Achsenabschnitt: x + Urinkonzentration								
x - Urin:	Intensität - Urin								
	x = 0								
	Achsenabschnitt: x								
	Überprüfung der Aufstockung								
x Urin:	Intensität - Urinuntergrund								
	Urin = 0								
	Achsenabschnitt: Urinkonzentration								
	"echtes" Aufstockverfahren								

Abbildung 4-34: Beispielhaftes Urinauswertungsblatt

Weiterhin wurde bei den Messungen mit Urin festgestellt, dass bei längerem Stehen der Urinprobe während der Messungen im Messverlauf Schwebstoffe ausfallen. Um dies zu verhindern, wurden die Urinproben zur Probenvorbereitung zentrifugiert.

## **4.2.2. Ergebnisse**

### **4.2.2.1. Charakterisierung**

Die in 4.2 teilweise vom 1.2.1.1 bis 1.2.1.3 von mir in Zusammenarbeit mit Frau Nicole Karpensky im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführten Messungen, wurden von ihr zur Validierung des Gerätes eingesetzt [237]. Zum besseren Verständnis werden hier die Ergebnisse kurz aufgeführt. Es wurden Messungen von Formaldehyd in Wasser; mit und ohne T-Stücke in Urin durchgeführt und im Anschluß, die Abweichung von der bekannten Formaldehydkonzentration, sowie die Abweichung des erhaltenen Formaldehydgehaltes einer Urinprobe berechnet und die Fehlerrechnung durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse sind:

- Das Verfahren ist in der Matrix Wasser durchführbar
- dort beträgt die Abweichung 14% vom bekannten Wert
- Das Verfahren ist für die Matrix Urin anwendbar
- Die Abweichung von den bekannten Formaldehydkonzentration beträgt 7 %
- Die Schwankungen der erhaltenen Formaldehydkonzentration in Urin beträgt:
  - Bei den manuellen Messungen 36%
    - Mit dem, siehe 4.2.2.2.2, später wieder entferntem Wiederfindungskriterium: 12%
  - Bei den automatisierten Messungen 13 %
    - Mit dem, 4.2.2.2.2, später wieder entferntem Wiederfindungskriterium: 9%

### **4.2.2.2. Weiterentwicklung**

#### **4.2.2.2.1. Aufstockverfahren**

Um nun herauszufinden, ob das Aufstockverfahren überhaupt durchgeführt werden muss, oder ob nicht eine Ein-Punkt-Kalibrierung ausreichend ist, werden nun alle Steigungen aller bisheriger Messungen verglichen (siehe Anhang). Dabei kann festgestellt werden, dass die Steigung

- abhängig von den Geräteeinstellungen, wie z.B. Fluß, integration time, scan to average und boxcar width ist
- abhängig von der Probe ist
- So stark zwischen den verschiedenen Messungen differiert, dass Unterschiede der erhaltenen Formaldehydkonzentrationen des Urins bei Berechnung mit verschiedenen Steigungen sowohl die angenommene Genauigkeit (0,1 mg/L), als auch die Fehler der Methode, sowohl prozentual, als auch absolut überschreitet. So würde man bei

Messungen ohne Aufstockverfahren, sondern mit Kalibrierung als „Falsch“ zu klassifizierende Ergebnisse erhalten.

Zur Belegung dieser Ergebnisse werden drei Messreihen mit erhaltenen großer, mittlerer und kleiner Formaldehydkonzentration ausgewählt und bei der Aufstockreihe 1,7mg/L mit der dazugehörigen Steigung, der höchsten gemessenen Steigung (06-16-09 -2-) und der niedrigsten gemessenen Steigung (04-27-09 -2-) berechnet und im Anschluß die Differenzen absolut und prozentual berechnet.

Aus den Messdaten (siehe Anhang) ergibt sich folgende Darstellung:

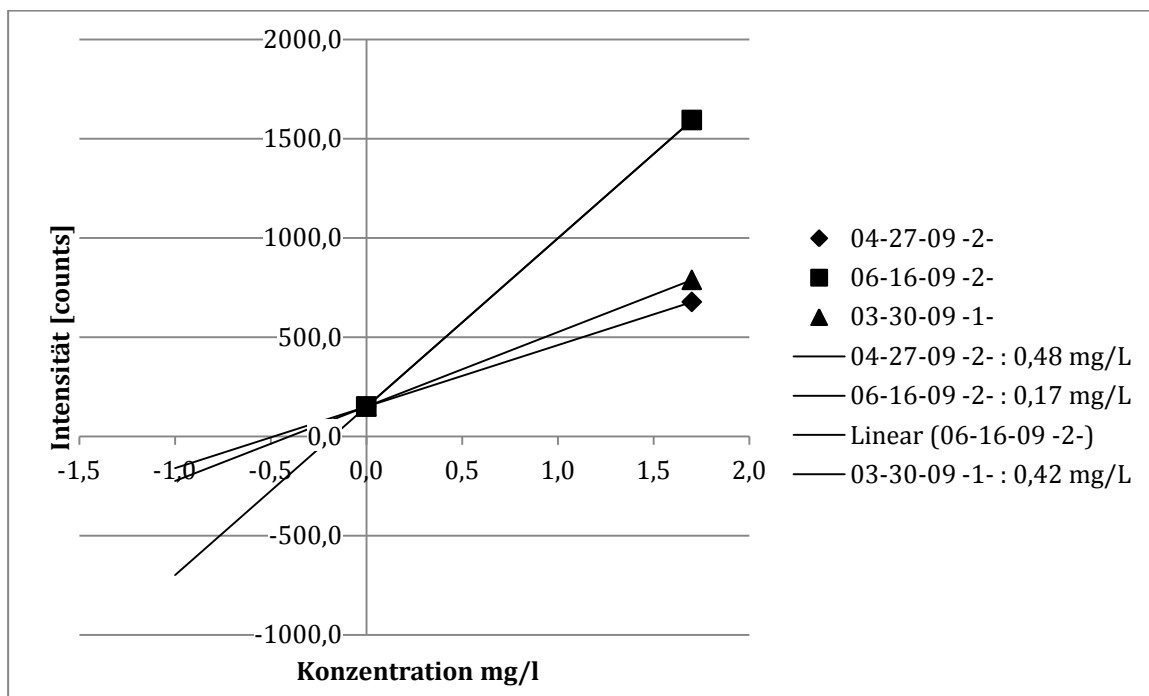


Abbildung 4-35: Niedriger Formaldehydgehalt

Formaldehydgehalt berechnet mit der höchsten Steigung abzüglich des Formaldehydgehaltes der Probe

0,25 mg/L

60 %

Formaldehydgehalt der Probe abzüglich Formaldehydgehalt berechnet mit der kleinsten Steigung

0,06 mg/L

14 %

Formaldehydgehalt berechnet mit der größten Steigung abzüglich des Formaldehydgehaltes berechnet mit der kleinsten Steigung

0,31 mg/L

75 %

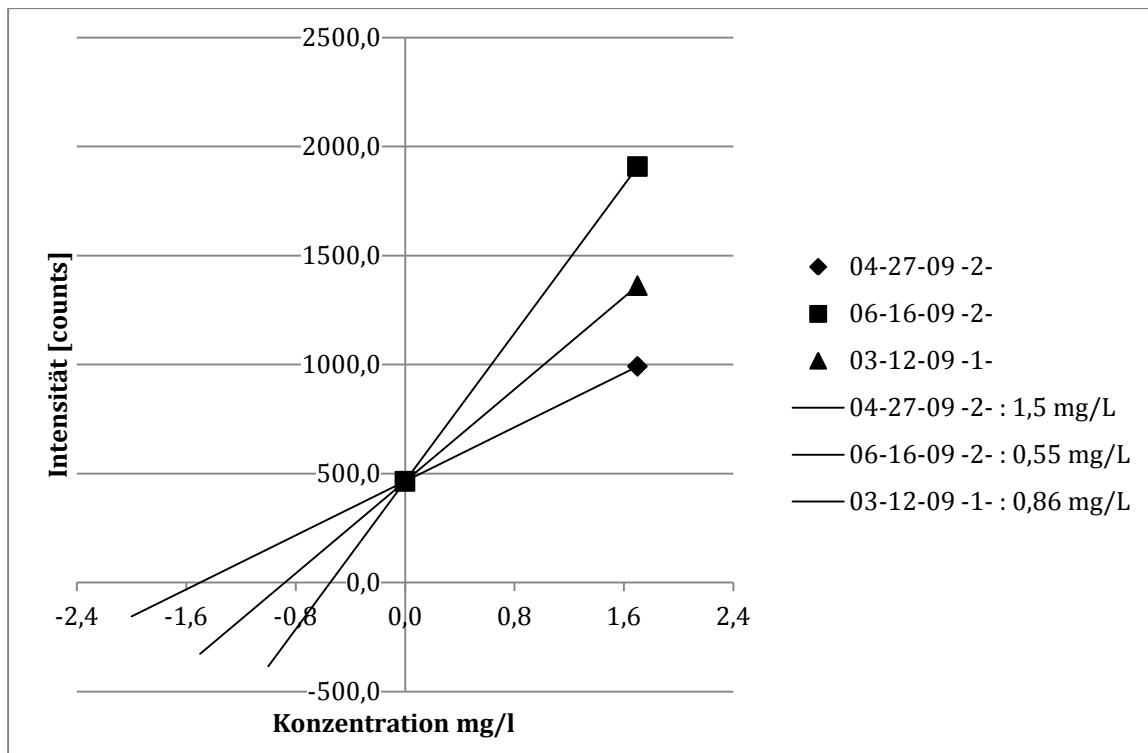


Abbildung 4-36: Mittlerer Formaldehydgehalt

Formaldehydgehalt berechnet mit der höchsten Steigung abzüglich des Formaldehydgehaltes der Probe

0,64 mg/L

74 %

Formaldehydgehalt der Probe abzüglich Formaldehydgehalt berechnet mit der kleinsten Steigung

0,31 mg/L

36 %

Formaldehydgehalt berechnet mit der größten Steigung abzüglich des Formaldehydgehaltes berechnet mit der kleinsten Steigung

0,95 mg/L

110 %

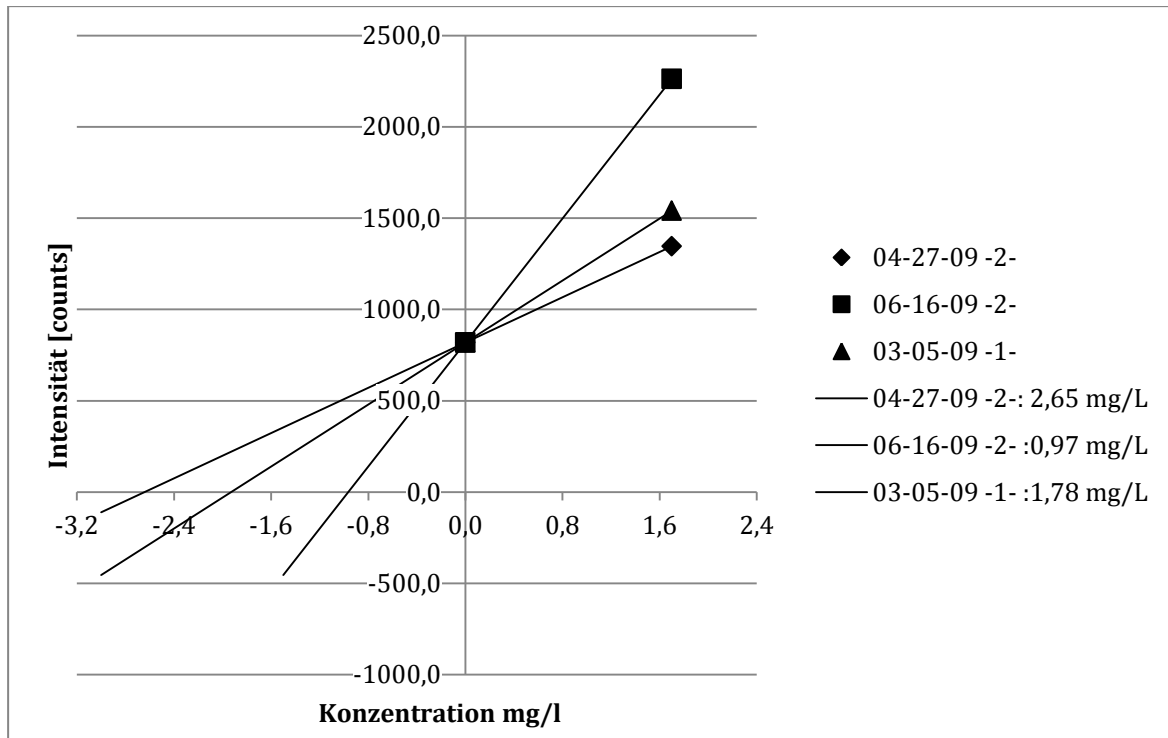


Abbildung 4-37: Hoher Formaldehydgehalt

Formaldehydgehalt berechnet mit der höchsten Steigung abzüglich des Formaldehydgehaltes der Probe

0,87 mg/L

49 %

Formaldehydgehalt der Probe abzüglich Formaldehydgehalt berechnet mit der kleinsten Steigung

0,81 mg/L

46 %

Formaldehydgehalt berechnet mit der größten Steigung abzüglich des Formaldehydgehaltes berechnet mit der kleinsten Steigung

1,68 mg/L

94 %

Daraus folgt, dass das Aufstockverfahren durchgeführt werden muss. Weiterhin fällt auch auf, dass in den meisten Messungen die Steigung ab einem Wert von 17 mg/L nicht mehr linear verläuft, so dass nur noch die Aufstocklösungen von 1,7 mg/L bis 14 mg/L durchgeführt werden.

#### 4.2.2.2.2. Wiederfindung

Wie schon beschrieben, ist es möglich die Aufstockung zu überprüfen und damit die Zuverlässigkeit eines Messpunktes zu überprüfen. Dafür wurde das in 4.2.1.3 vorgestellte



Urinauswertungsblatt dahingehend geändert, dass es nicht einfach nur den Mittelwert aller erhaltenen Urinmesswerte bildet, sondern diese auch noch differenziert, in den Mittelwert aller Messwerte, den aller Messwerte, die nicht stärker, als +/- 0,1 mg/L von der bekannten Aufstockkonzentration abweichen und den aller Messwerte, die nicht stärker als +/- 0,2 mg/L abweichen.

Urinmessung									
Datum:	22.8.08								
Person:	2								
Bemerkung :	alle Werte in [mg/l]								
	Messung 1	Messung 2	Messung 2	Messung 4	Mittelwert	Fehler abs	Fehler %	abs Abweichung	proz. Abweichung
1,7515	1,9447	1,9178			1,9313	0,0134	0,6960		
1,7 - Urin	1,7031	1,7133			1,7082	0,0051	0,2988	0,0433	-2,4710
1,7 Urin	0,2390	0,2020			0,2205	0,0185	8,3939		
2,4521	2,5332	2,5670			2,5501	0,0169	0,6622		
2,4 - Urin	2,2998	2,3662			2,3330	0,0332	1,4240	0,1191	-4,8564
2,4 Urin	0,2356	0,2011			0,2183	0,0173	7,9063		
3,1527	3,2835	3,2092			3,2463	0,0372	1,1452		
3,1 - Urin	3,0469	3,0117			3,0293	0,0175	0,5800	0,1234	3,9138
3,1 Urin	0,2105	0,1616			0,1861	0,0244	13,1293		
3,503	3,7579	3,6906			3,7243	0,0336	0,9037		
3,5 - Urin	3,5149	3,4878			3,5014	0,0135	0,3864	0,0016	-0,0463
3,5 Urin	0,2464	0,1985			0,2224	0,0239	10,760		
7,006	8,0439	8,0294			8,0367	0,0073	0,0905		
7,0 - Urin	7,7794	7,8071			7,7933	0,0139	0,1778	-0,7873	11,2372
7,0 Urin	0,4015	0,2802			0,3408	0,0606	17,792		
10,509					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!		
10,509 - Urin					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!	#DIV/0!	#DIV/0!
10,509 Urin					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!		
Urinwert	Fehler abs	Fehler %		Urinwert	Fehler abs	Fehler %			
0,2376	0,0433	18,2213	Q: +/- 0,2	0,2376	0,0433	18,2212			
			Q: +/- 0,1	0,2376	0,0433	18,2212			
Abweichung der Aufstockung									
	1,7515	2,4521	3,1527	3,503	7,006				

absolut	0,0433	0,1191	0,1234	0,0016	0,7873				
prozentual	2,4710	4,8564	3,9137	0,0463	11,2372				
x:	Intensität - Urinuntergrund								
	x = 0								
	Achsenabschnitt: x + Urinkonzentration								
x - Urin:	Intensität - Urin								
	x = 0								
	Achsenabschnitt: x								
	Überprüfung der Aufstockung								
x Urin:	Intensität - Urinuntergrund								
	Urin = 0								
	Achsenabschnitt: Urinkonzentration								
	"echtes" Aufstockverfahren								

Abbildung 4-38: Urinauswertungsblatt

Vergleicht man auch hier die Messungen, so fällt auf, dass in den meisten Fällen die Differenz der erhaltenen Urinkonzentrationen unkorrigiert zu korrigiert unter dem angenommenen Fehler liegt. Dabei zeigt

Abbildung 4-39 die Überschreitung der Differenz von 0,1 mg/ L , die die Messgenauigkeit des Gerätes beschreibt und

Abbildung 4-40 die Differenz prozentual, wobei die Grenze bei dem 15% Fehler des Gerätes liegt.

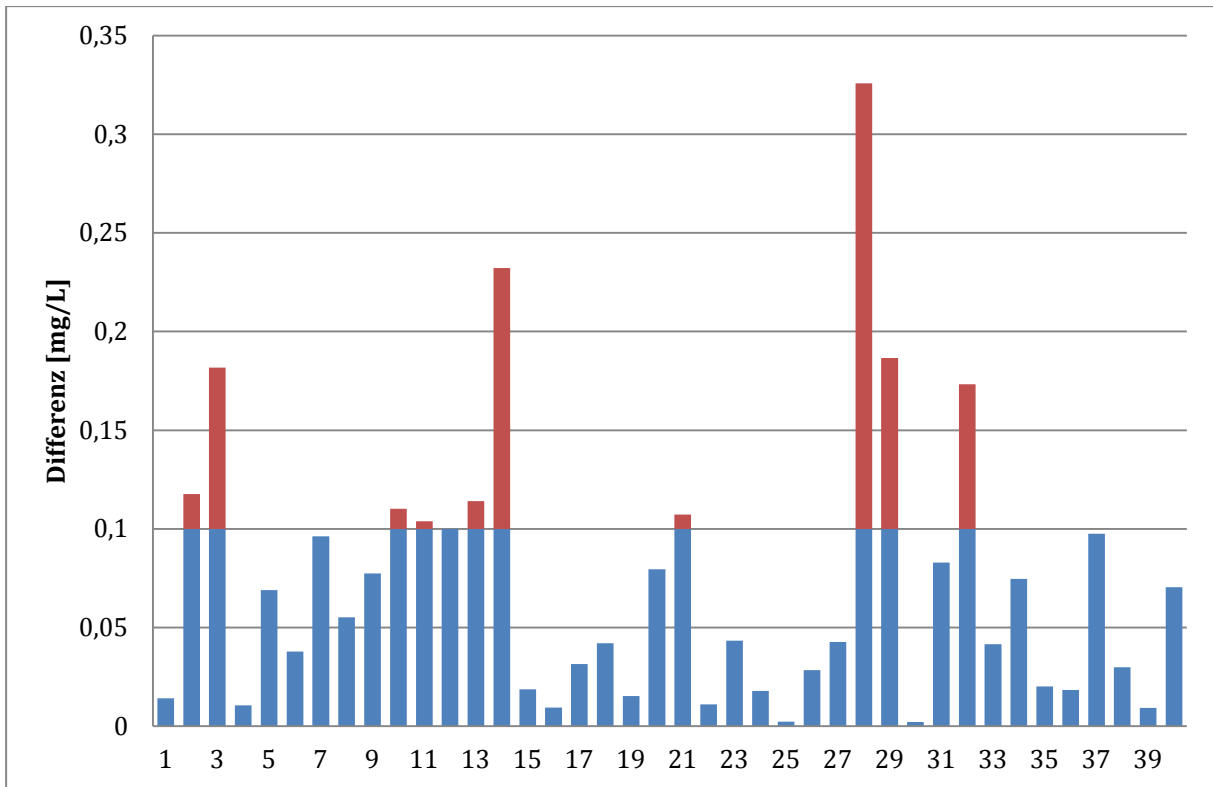


Abbildung 4-39: Differenz korrigiert zu unkorrigiert absolut

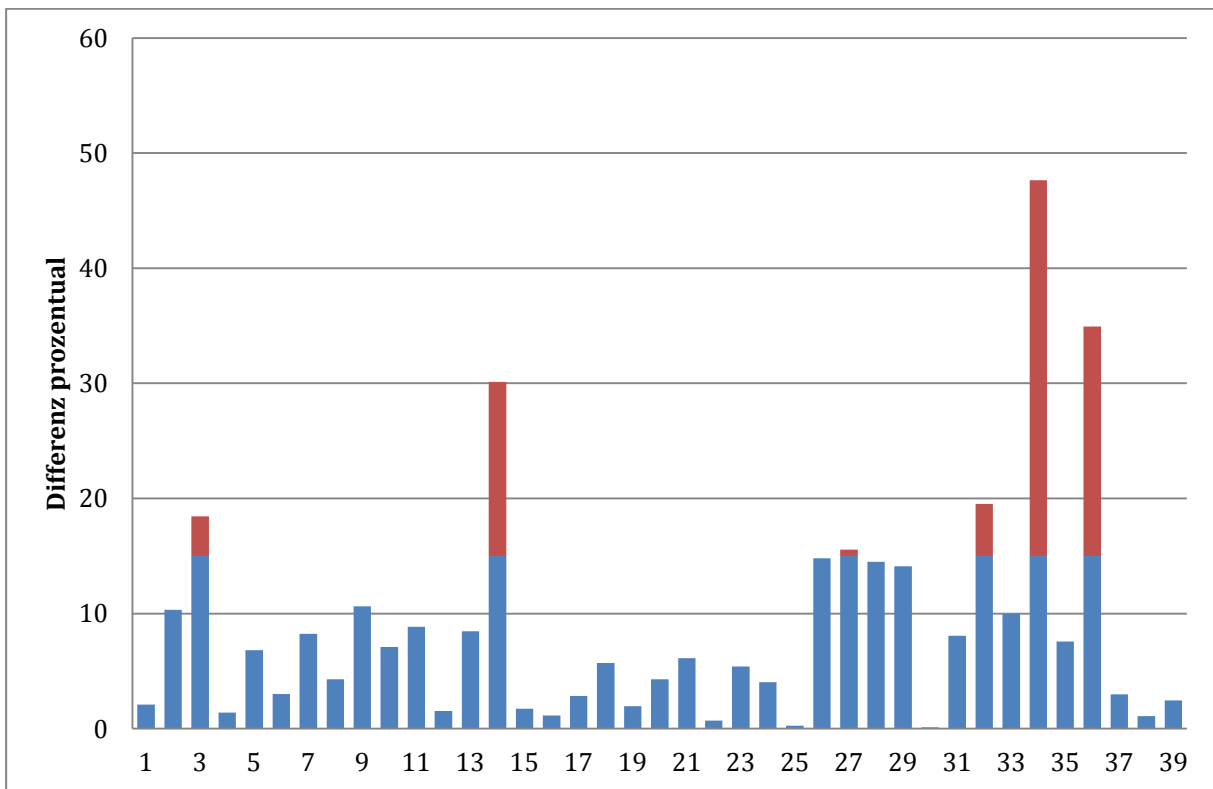


Abbildung 4-40: Differenz korrigierter und unkorrigierter Urinwert prozentual

Daraus folgt, dass diese Korrektur nicht mehr durchgeführt werden muss. Die Messdurchführung, die für die Messung der Urinproben von gesunden Menschen eingesetzt wird wird also auf folgende Einstellungen festgelegt:

- Wenn möglich 3 Messdurchläufe pro Probe
- Aufstockung von 1,7 mg/L bis 14 mg/L
- Integration time: 100 ms
- Scan to Average: 15
- Boxcar width: 10
- Fluß:15
- Aufstocklösungswechsel nach 5 Minuten Spektrum bei Minute 0;1;2
- keine nachfolgende Korrektur mehr

### **4.3. Messkampagnen**

#### **4.3.1. Kampagnen**

##### **4.3.1.1. Probelagerung bei -80°C und – 20°C**

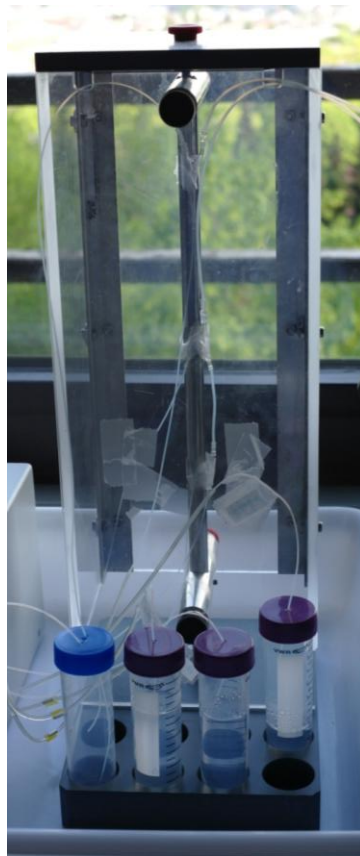
Um die in 4.3.1.2 durchgeführten Messungen überhaupt durchführen zu können musste überprüft werden, ob Urinproben eingefroren und nach dem Auftauen noch der Formaldehydgehalt bestimmt werden kann. Dafür wurden Urinproben einer Probandin mit Formaldehyd versetzt, der Formaldehydgehalt bestimmt, eingefroren aufgetaut und erneut der Formaldehydgehalt bestimmt

Urintestmessung für tiefgefrorenes Urin																	
Schwankung :	das ist die Mittelwertabweichung der zur Berechnung des Urinwertes eingesetzten Urinwerte einer Messung																
Fehler 15 %:	dies ist der Fehler, den ich für die Methode ansetze: 5 % aus den Fehlern der Pipette (Nicole S.IV) + 7% (Nicole S. 35) + 3% Sicherheit																
HCHO-Wert:	0,2 Abweichung																
Datum	Tage bis Auftauen	frisch	Schwankung	Fehler (15 %)	direkt aufgetaut	Schwankung	Fehler (15 %)	später aufgetaut	Schwankung	Fehler (15 %)	Differenz gleicher Tag	Schwankung Beide addiert	Fehler beide addiert	Differenz später	Schwankung Beide addiert	Fehler beide addiert	
16.12.2008	29	0,58	0,05	0,087	x	x	#WERT!	0,37	0,06	0,0555	#WERT!	#WERT!	#WERT!		0,21	0,11	0,1425
26.01.2009	10	1,05	0,08	0,1575	0,79	0,05	0,1185	0,96	0,47	0,144	0,26	0,13	0,276	0,09	0,55	0,3015	
10.02.2009	7	1,26	0,1	0,189	1,07	0,04	0,1605	1,07	0,03	0,1605	0,19	0,14	0,3495	0,19	0,13	0,3495	
12.02.2009	4	1,26	0,11	0,0165	x	x	#WERT!	1,44	0,04	0,216	#WERT!	#WERT!	#WERT!	-0,18	0,0565	0,2325	
18.02.2009	8	1,3	0,55	0,0825	1,23	0,03	0,1845	1,07	0,04	0,1605	0,07	0,1125	0,267	0,23	0,1225	0,243	
02.03.2009	2	0,82	0,12	0,018	1,09	0,17	0,1635	0,8	0,16	0,12	-0,27	0,188	0,1815	0,02	0,178	0,138	
03.03.2009	10	0,71	0,03	0,0045	x	x	#WERT!	0,76	0,03	0,114	#WERT!	#WERT!	#WERT!	-0,05	0,0345	0,1185	
05.03.2009	4	1,79	0,07	0,0105	1,67	0,1	0,2505	1,56	0,08	0,234	0,12	0,1105	0,261	0,23	0,0905	0,2445	

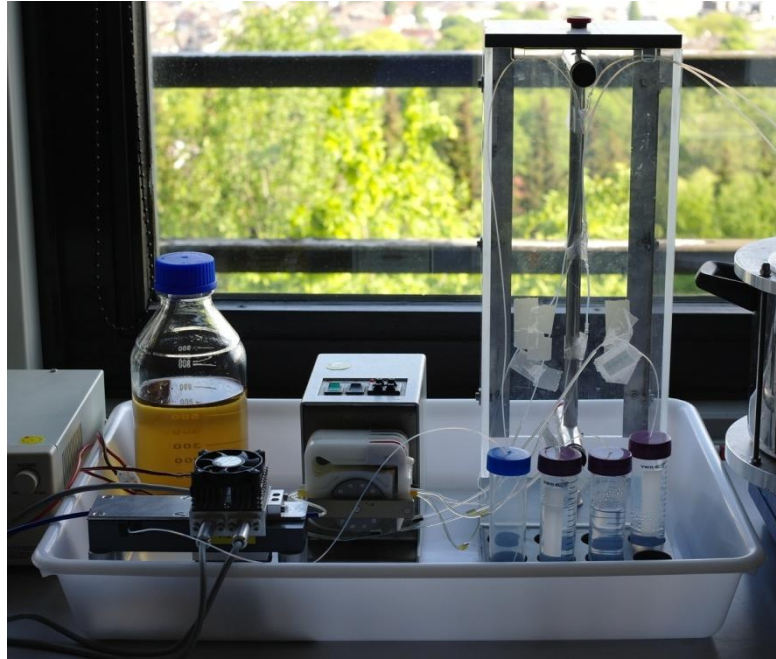
Es ist deutlich erkennbar, dass sich die Differenzen im Bereich des angenommenen Fehlers des Gerätes befinden. Im Anschluß an diese Testmessung, können die nachfolgenden Messungen durchgeführt werden. Dafür wird die Messdurchführung dahin gehend geändert, dass der Fluß auf 15 eingestellt wird und sich somit die Durchflussdauer auf 4 Minuten verringert. Die Spektren werden bei 0.00 min, 0.45 min und 1.30 min aufgenommen und die Aufstocklösung bei 4.00 min gewechselt.

#### **4.3.1.2. Proben von Blasenentzündungspatienten**

In Zusammenarbeit mit der Universität Würzburg ist es nun möglich, Urinproben vom Menschen zu untersuchen, die an chronischer Blasenentzündung leiden. Diese Urinproben werden auf Trockeneis verschickt und bei  $-60^{\circ}\text{C}$  gelagert. Da es sich dabei um Urinproben handelt, die gentechnisch veränderte Bakterien enthalten könnten (die Bakterien werden vor dem Versand schon einmal zentrifugiert) musste das Gerät entsprechend umgebaut werden. Das gesamte Gerät wird in eine Plastikwanne gesetzt, so dass bei eventuellem Auslaufen der Probe diese aufgefangen werden kann. Weiterhin werden die T-Stücke, da diese sich manchmal lösen, mit einer Plexiglasvorrichtung abgesichert.



**Abbildung 4-41: Abschirmung vor Urinspritzern**



**Abbildung 4-42: Erweiterter Aufbau**

Weiterhin wird aller entstehende Abfall autoklaviert. Nach diesen Vorsichtsmaßnahmen werden die zugesandten Proben vermessen. Es werden insgesamt 13 Proben von 5 verschiedenen Personen gemessen. Die Proben werden bis zum Messen bei  $-60^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt, was siehe 4.3.1.1 möglich ist. Tabelle 4-1 zeigt die Ergebnisse, die in 4.3.2.3 diskutiert werden.

**Tabelle 4-1: Überblick der untersuchten Proben**

		Bemerkung	Gehalt [mg/l]	Schwankung [mg/l]	Schwankung proz.	15% Fehler	Gehalt Original (bei verdünnten Proben)				
							Gehalt	Schwankung abs.	15%Fehler		
KA 09/03/23			0,75	0,08	10,91	0,1125					
KA 09/03/23		6 Tage Kühlschrank	0,37	0,02	6,6	0,0555					
KA 09/03/25 1/2		erste Testmessung									
KA 09/03/25 2/2		Messung 2	0,26	0,02	7	0,039					
KA 09/03/25 2/2		nach 24 Std. Kühlschrank	0,23	0,08	4	0,0345					
KA 09/03/25 2/2		Mittelwert	0,23	0,2	10	0,0345					
						0					
POS 09/03/23						0					
						0					
POS 09/03/25 1/2						0					
POS 09/03/25 2/2			Nichts			#WERT!					
						0					
SR 2008 11-17-08 8.00			nicht messbar			#WERT!					
SR 2008 11-17-08 8.00		1:1 Wasser	nicht messbar			#WERT!					
SR 2008 11-17-08 8.00		1:5 Wasser	1,92	0,005	0,26	0,288		11,54	0,03	1,731	
SR 2008 11-17-08 8.00		1:5 Wasser	16 Std Kühlschrank	2,53	0,08	3,25	0,3795		15,16	0,49	2,274
SR 2008 11-17-08 8.00		1:9 Wasser	18 Std Kühlschrank	1,14			0,171		11,36		1,704
SR 2008 11-17-08 8.00		1:5 Wasser	14 Tage Kühlschrank	1,99	0,06	3,06	0,2985		11,95	0,37	1,7925
SR 2008 11-17-08 8.00		1:9 Wasser	14 Tage Kühlschrank	0,94	0,06	6,28	0,141		9,44	0,59	1,416



Während dieser Messungen wird weiterhin ein Makro für Excel entwickelt, das die komplette Auswertung von der Umformatierung von Text in eine Exceldatei bis hin zum Einfügen der Daten an die vorhergesehene Stelle sowohl in der Excelvorlage, als auch im Urinauswertungsblatt übernimmt (siehe Anhang). Dies führt zu einer deutlichen Beschleunigung der Auswertung.

#### **4.3.1.3. Probandenkreis gesunder Menschen**

Wie auch in 2.2.6.1 beschrieben, gibt es kaum Literatur über den Formaldehydgehalt in Urin und die dort genannten Konzentrationsbereiche differieren stark.

- 12,1-205 µg/L [77]
- 64,78 µg/24h [202]
- 2,5-4,0 mg/L [180]
- 56,85-144,57 µg/L [198]
- < 10 ppb [2]
- 40-1400 µmol/L, entspricht 1,17 mg/L bis 42 mg/L [169]

Dies entspricht einem Bereich von 12,1 µg/L – 42 mg/L.

Um aber eine erkrankte von einer gesunden Urinprobe zu unterscheiden, werden Daten über die Konzentrationsbereiche im Urin gesunder Menschen benötigt. Dafür wird zuerst mithilfe der Justiziarin der Bergischen Universität Wuppertal ein Einwilligungsformular für Probanden erarbeitet (siehe Anhang) und dann nach Genehmigung des Ethikrates der Bergischen Universität Wuppertal mit Messungen begonnen, deren Diskussion sich in 4.3.2.4 findet. Für die Auswertung werden die Proben entweder frisch oder nach Lagerung im Tiefkühlschrank bei -20°C und Auftauen über Nacht im Kühlschrank zentrifugiert und in bis zu 3 Messreihen gemessen, so dass Urinauswertungsblätter für alle Probanden entstehen. Hier sei eines exemplarisch gezeigt

Urinmessung									
Messdatum:	25.1.10								
Probennahmedatum	23.1.10								
Person:	16								
Bemerkung:	alle Werte in [mg/l]								
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Mittelwert	Fehler abs	Fehler %	abs Abweichung	proz. Abweichung
1,7515	1,8444	1,8560			1,8502	0,0058	0,3146		
1,7 - Urin	1,7744	1,6736			1,7240	0,0504	2,9241	0,0275	-1,5715
1,7 Urin	0,072531	0,176644			0,1246	0,0520	41,7829		
2,4521	2,2581	2,2452			2,2516	0,0065	0,2875		
2,4 - Urin	2,1944	2,0804			2,1373	0,0570	2,6682	0,3147	-12,8346
2,4 Urin	0,05301	0,1618			0,1074	0,0544	50,5962		
3,1527	3,5846	3,7046			3,6446	0,0600	1,6466		
3,1 - Urin	3,5083	3,5001			3,5042	0,0041	0,1169	-0,3515	11,1492
3,1 Urin	0,1664	0,2868			0,2265	0,0602	26,5555		
3,503	3,7795	3,8962			3,8378	0,0583	1,5201		
3,5 - Urin	3,7056	3,6980			3,7018	0,0038	0,1018	-0,1988	5,6755
3,5 Urin	0,1324	0,2524			0,1924	0,0600	31,1921		
7,006	6,9663	7,0814			7,0239	0,0576	0,8199		
7,0 - Urin	6,8948	6,8898			6,8923	0,0025	0,0362	0,1137	-1,6231
7,0 Urin	0,0643	0,1856			0,1249	0,0606	48,5493		
10,509					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!		
10,509 - Urin					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!	#DIV/0!	#DIV/0!
10,509 Urin					#DIV/0!	#ZAHL!	#ZAHL!		
Urinwert	Fehler abs	Fehler %		Urinwert, echt (bei verdünnten Proben)					
0,1552	0,0597	38,4674		0,3104					

Abbildung 4-43: Urinauswertungsblatt

Die nachfolgende Abbildung gibt einen Überblick über alle Messungen, die im Rahmen der Messreihe durchgeführt wurden, rosa unterlegt sind dabei die Proben, deren Formaldehydgehalt so gering war, dass er aufgrund des Fehlers des Gerätes als negativ bestimmt wurde.



4	8						
	10		01.02.2010	19.01.2010	7:00		0,02938739
	14						
	15	gemess 1:1	25.01.2010	23.01.2010	13:00	0,06108899	0,12217799
	18	G>U;gem1:1	10.02.2010	09.02.2010	morgens	-0,03148724	
	22		22.02.2010	19.02.2010	09:30		0,03271751
	23	G>U	23.02.2010	19.02.2010	08:50		0,02152569
	8	gemess 1:3	24.02.2010	23.02.2010	08:30	0,0621328	0,24853121

### 4.3.2. Ergebnisse

#### 4.3.2.1. Nash – Reagenz – Eigenfluoreszenz

Wie in 2.2.5.2.1 dargelegt, gibt es keine feste Zusammensetzung für das Nash-Reagenz. Die von mir verwendete Zusammensetzung (siehe 3) hat folgende Vorteile:

- keine Eigenfluoreszenz
- wenig Chemikalien
- nach Nash [220]
  - o pH 6,4
  - o im Konzentrationsverhältnis für einen kompletten Reaktionsverlauf

Der für diese Messungen wichtige Vorteil, ist der der nichtvorhandenen Eigenfluoreszenz, da auch die Eigenfluoreszenz der Urinproben berücksichtigt werden muss. Die nachfolgende Graphik, zeigt deutlich, dass das Signal von Wasser im erwarteten Fluoreszenzbereich mit dem des Nash-Reagenzes identisch ist.

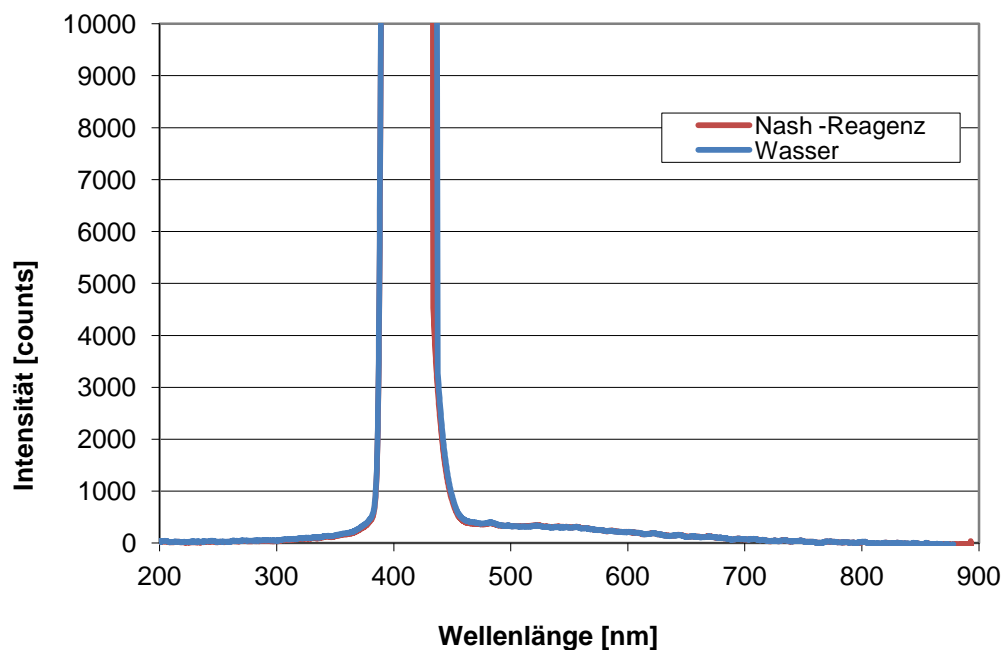


Abbildung 4-44: Spektrum des Nash-Reagenzes

#### 4.3.2.2. Nash – Reagenz und Urinfarbstoff

Während den Messungen des Urines von gesunden Probanden fällt auf, dass es einige Proben gibt, bei denen das Fluoreszenzsignal von reinem Urin über dem Fluoreszenzsignal von Urin mit dem Nash-Reagenz liegt. Daraus ergibt sich ein negativer Formaldehyd Gehalt. Die Vermutung liegt nun nahe, dass ein Bestandteil des Nash – Reagenzes mit dem Urinfarbstoff reagiert. Um dies zu überprüfen, wird eine Urinprobe mit jedem Bestandteil des Nash-Reagenzes in der Konzentration, wie es im Nash-Reagenz vorliegt versetzt, und jeweils zuerst das Fluoreszenzsignal des Wassers, also das Untergrundrauschen, dann das Fluoreszenzsignal des Urin bestimmt, und als dritten Messpunkt das Fluoreszenzsignal von Urin mit Nash; Urin mit Ammoniumacetat/Essigsäure und Urin mit 2,4-Pentadion gemessen. Das Ergebnis zeigt die nachfolgende Grafik (Abbildung 4-45):

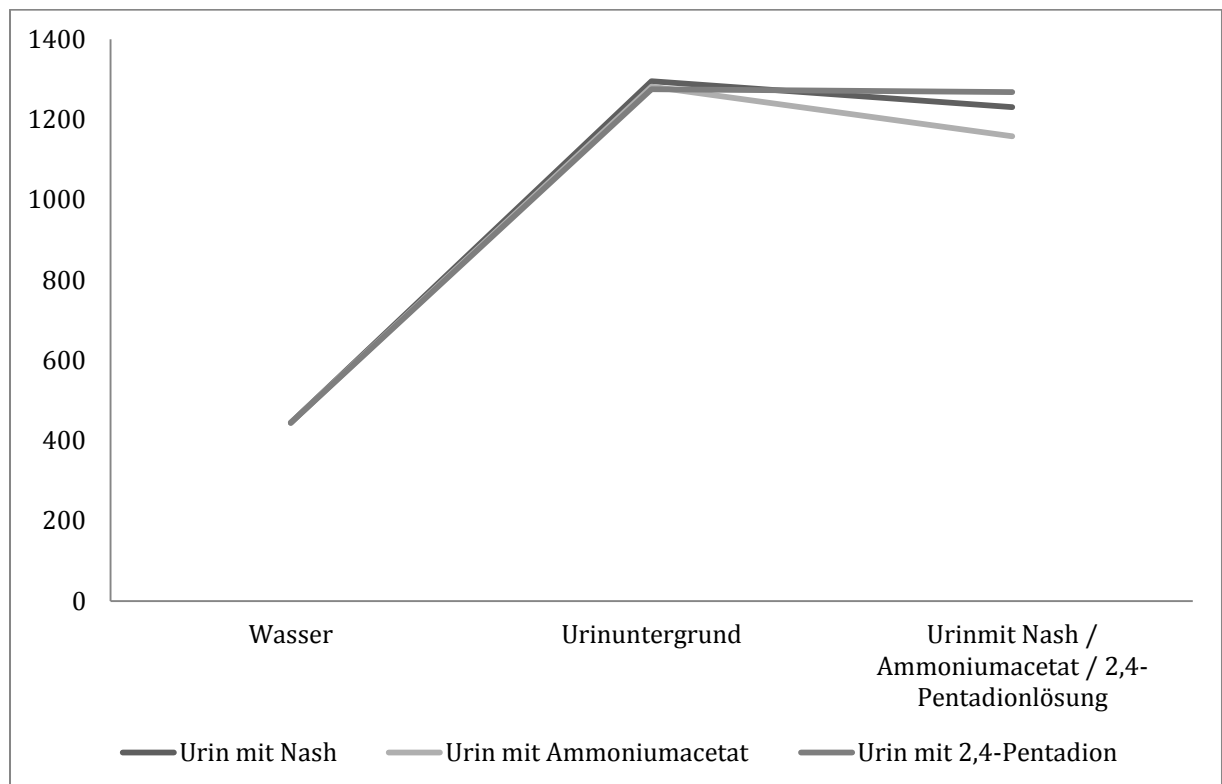


Abbildung 4-45: Schwächung der Eigenfluoreszenz von Urin

Dabei wird festgestellt, dass

- Bei Zugabe von Nash und der Ammoniumacetat/ Essigsäurelösung das Signal sinkt, bei der Zugabe von 2,4 – Pentadionlösung es aber konstant bleibt.
- Bei der Zugabe von der Ammoniumacetat/ Essigsäurelösung sinkt das Signal stärker, als bei der Zugabe von Nash-Reagenz.

Daraus folgt wiederum, dass:

- Formaldehyd mit der Ammoniumacetat/ Essigsäurelösung nicht reagiert, man sieht also nur das Signal der Reaktion von Urin und der Ammoniumacetat/ Essigsäurelösung, in der das Signal abgesenkt wird,
- mit Nash sieht man das Signal der Reaktion des Urinfarbstoffes mit der Ammoniumacetat/ Essigsäurelösung und das Signal der Reaktion von Formaldehyd und dem Nash-Reagenz, das hinzukommt.

Die Differenz vom abgesenkten Signal des Urines durch die Pufferlösung und dem Signal der Urinproben mit dem Nash-Reagenz ergibt also das Formaldehydsignal. Aufgrund dieser Erkenntnis sind die für 4.3.1.3 gemessenen Urinproben gesunder Probanden nochmals gemessen worden und zur Bestimmung der Urinuntergrundsignals dann Urin nicht mit Wasser, sondern mit der Lösung aus Ammoniumacetat und Eisessig in Wasser durchgeführt worden.

#### 4.3.2.3. *Blasenentzündungsproben*

Wie schon in 4.3.1.2 beschrieben, wurden nun die Proben von Menschen mit chronischer Blasenentzündung gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-46 gezeigt.

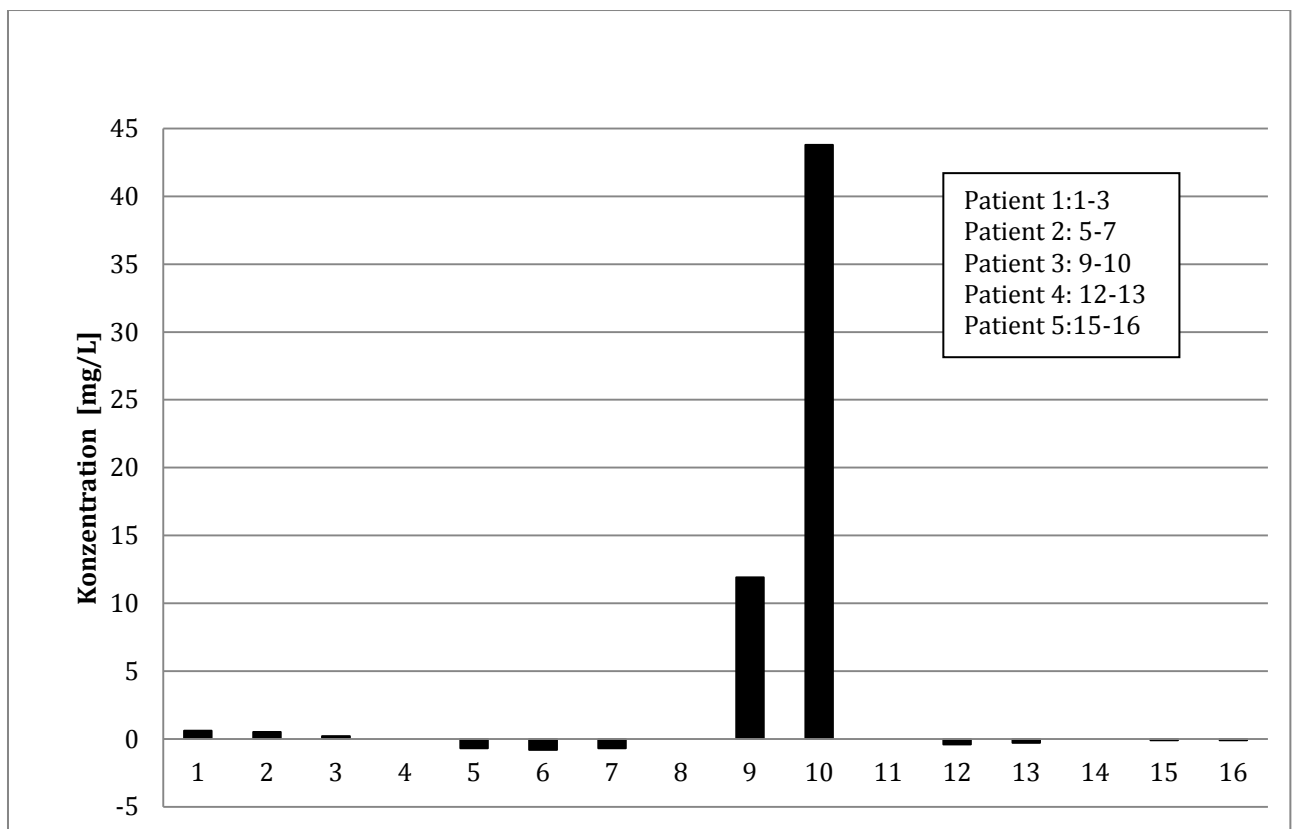


Abbildung 4-46: Messergebnisse des Probandenkreis „Blasenentzündung“

Bei diesen Messergebnissen ist zu beachten, dass ein Patient Medikamente eingenommen hatte, die den Gehalt an Formaldehyd in Urin künstlich erhöhen, dies ist Proband 3, in dessen Urin ein Gehalt von 12 mg/L und zu einem späteren Zeitpunkt der Medikamenteneinnahme 44 mg/L Formaldehyd in der Urinprobe bestimmt wurde. Die Proben der Patienten 2, 4 und 5 enthalten nicht messbare Mengen an Formaldehyd in Urin und der erste Patient wies eine Konzentration von 0,5 mg/L Formaldehyd in Urin auf. Wichtig ist dabei zu sagen, dass genau dieser Patient formaldehydresistente Bakterien in seinem Urin aufwies, so dass ein erhöhter Formaldehydspiegel erwartet wurde. Bei den Patienten 2, 4 und 5 werden negative Formaldehydgemenge in Urin gemessen, da zu diesem Zeitpunkt die Problematik, dass die Lösung aus Eisessig und Ammoniumacetat den Urinfarbstoff abbaut noch nicht bekannt war. Damit ist die Methode in einer Blindstudie bestätigt worden.

#### 4.3.2.4. Konzentrationsbereich gesunder Menschen

Wie in 4.3.1.3 beschrieben werden die Proben gesunder Menschen gemessen, die Ergebnisse finden sich dort.

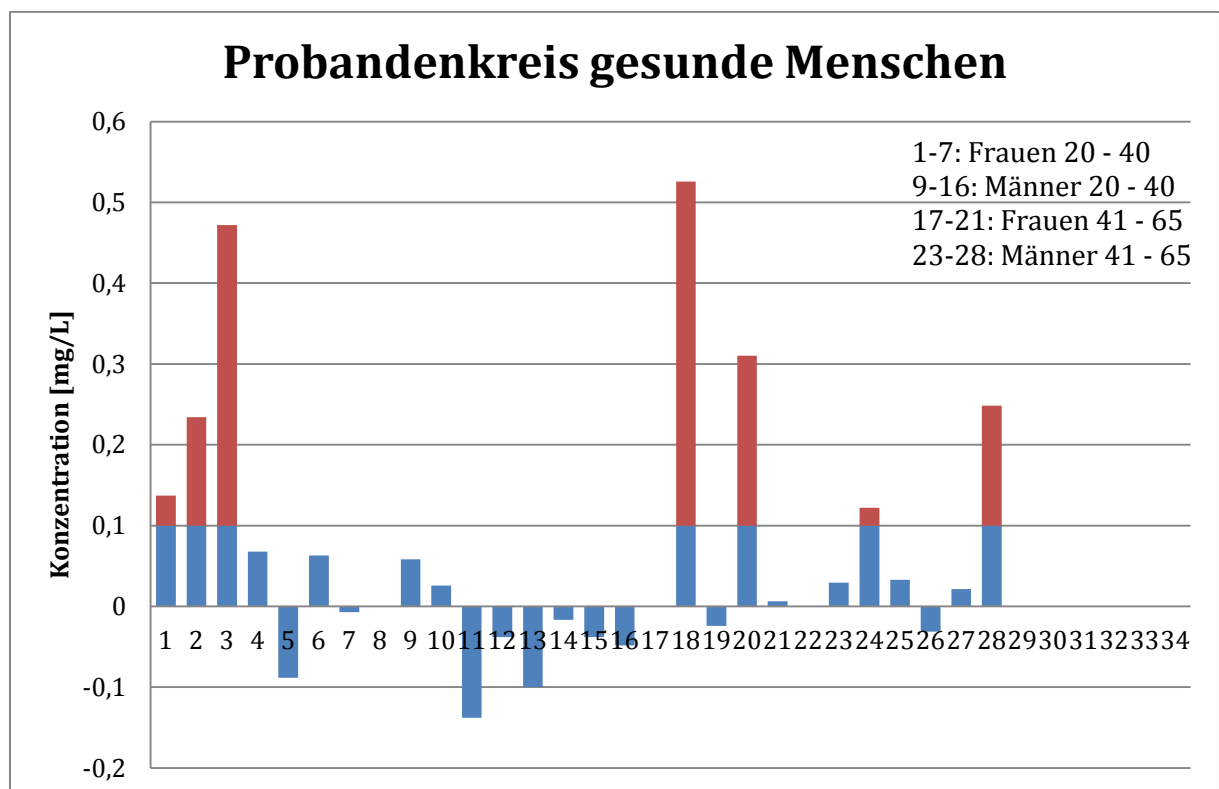


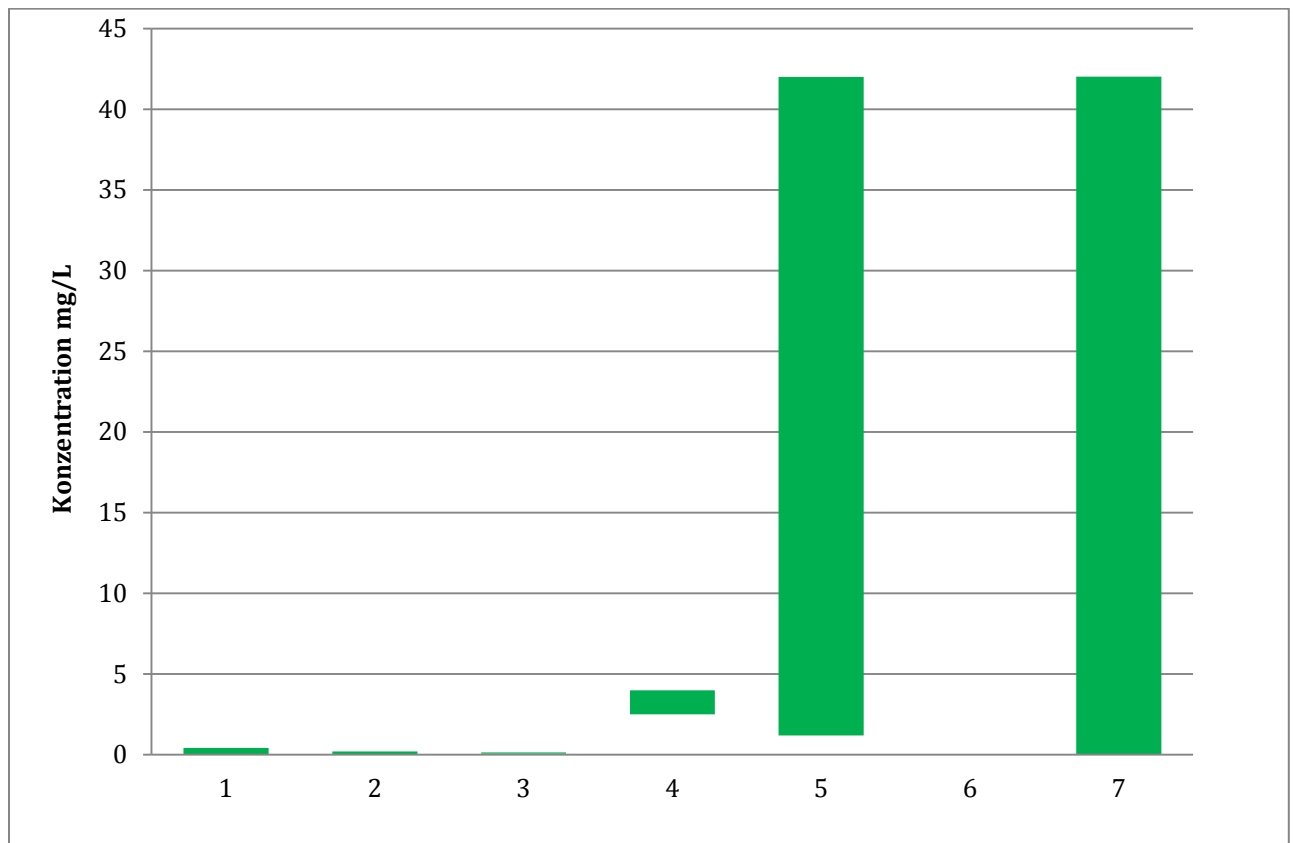
Abbildung 4-47: Messergebnisse des Probandenkreises „gesunder Menschen“

Alle bestimmten Formaldehydgemenge bewegen sich zwischen der Nachweisgrenze von 0,1 mg/L oder im Rauschen bis zu 0,5 mg/L Formaldehyd in Urin. Blau eingezeichnet ist der Bereich an Formaldehydgemenge, der sich in der Nachweisgrenze, also +/-0,1 mg/L Formaldehyd, rot der



Bereich, der bestimmt werden kann. Damit sollte zuerst einmal eine Differenzierung zwischen gesunden und an Krebs erkrankten Menschen gut möglich sein, da der Formaldehydgehalt im Urin von an Urogenitalkrebs erkrankten Personen erhöht ist [2].

Mithilfe dieser Messungen sollte der Gehalt an Formaldehyd in Urin von gesunden Menschen bestimmt werden. Die folgende Abbildung zeigt wie sich die Messergebnisse im Vergleich zu den Literaturwerten verhalten:



**Abbildung 4-48: Streuung der Werte für den Formaldehydgehalt in menschlichem Urin**

Bei den mit 1 gekennzeichneten Werten handelt es sich um die in dieser Arbeit erhaltenen Werte. Bei 2 handelt es sich um eine Messung von Formaldehyd in Urin [77], wobei nicht näher angegeben ist, wie sich der Probandenkreis zusammengesetzt hat. Die Ergebnisse beruhen auf 32 Probanden und detektierten Formaldehydgehalten zwischen 12,1 ng/mL und 293 ng/mL, also 12,1 µg/L und 293 µg/L. Diese Ergebnisse erklären, warum auch hier so viele Proben an der Nachweisgrenze der Methode liegen, was eine Differenzierung zwischen an Prostata- oder Blasenkrebs erkrankten Menschen vereinfacht. Als 3 sind die Ergebnisse aus einer Veröffentlichung gekennzeichnet, die ebenfalls von Urinproben gesunder Probanden stammen [198]. Für diese Kampagne wurden die Proben von 13 Probanden gemessen und ein Bereich von 56,85 µg/L bis 144,57 µg/L detektiert. Interessant ist dabei zu sehen, dass die Proben der 4 Frauen (von 60,84 µg/L bis 144,57 µg/L) im Mittel mehr Formaldehyd aufwiesen, als die der 9

männlichen Probanden (von 56.85  $\mu\text{g/L}$  bis 70.57 $\mu\text{g/L}$ ), ein Phänomen, das während dieser Arbeit ebenfalls beobachtet wurde. In dieser Veröffentlichung sind die Ergebnisse der einzelnen Proben nicht einzeln aufgeführt, sondern lediglich die Bereiche, so dass hier keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob es sich evtl. um einen Ausreißer handelt. Die in 4 aufgezeigten Ergebnisse stammen aus einem Artikel von Szarvas et al. [180]. In dieser Kampagne wurden Formaldehydkonzentrationen im Bereich von 2,5 mg/L bis 4,0 mg/L bestimmt. Leider wird in dieser Veröffentlichung nicht auf die oder den Probanden eingegangen, so dass an dieser Stelle die große Abweichung nicht erklärt werden kann. Ebenso liefert 5 stark von den hier bestimmten Werte abweichende Formaldehydkonzentrationen [169]. Es werden dort Werte von 39  $\mu\text{M}$  bis 1400  $\mu\text{M}$  genannt, dies entspricht 1,17 mg/L bis 42 mg/L. Auf eine weitere Veröffentlichung soll hier nochmals eingegangen werden. Spanel und Smith haben 1999 Untersuchungen an Urinproben von gesunden Menschen und Menschen mit Prostatatumoren oder Blasen Tumoren durchgeführt [2]. Die absoluten Werte sind hier nicht zu beurteilen, da auch diese Methode, die schon in 2.2.6.1 beurteilte Headspace einsetzt, wodurch die Ergebnisse falsch berechnet sind. Was aber von größer Bedeutung ist, ist dass auch dort der Formaldehyd Gehalt gesunder Probanden (14 Personen) an der Nachweisgrenze liegt, der der Patienten mit Prostatatumoren um einen Faktor 2,5 höher (24 Patienten) und der der Patienten mit Blasen Tumoren sogar um einen Faktor 8,5 (14 Patienten) die ist durch die räumliche Nähe der Tumore zu Urin erklärbar, da Formaldehyd wie in 2.2.1 bereits erläutert im Körper auch wieder abgebaut werden kann. Aufgrund der Patientenzahl handelt es sich um eine belastbare Studie und die Tatsache, dass in den verschiedensten Stadien diese deutlich erhöhten Werte detektiert wurden, spricht deutlich für den Einsatz von Formaldehydmessungen in Urin als erstes Anzeichen für eine eventuelle Urogenitalkrebserkrankung .

## **5. Zusammenfassung und Fazit**

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Messung des Formaldehydgehaltes im Urin von nicht an Urogenitalkrebs erkrankten Menschen, da bekannt ist, dass der Formaldehydgehalt in Tumorzellen und deren Umgebung erhöht ist. Daraus folgt, dass im Fall von Urogenitalkrebs der Formaldehydgehalt im Urin erhöht ist. Der Formaldehydgehalt im Urin eines möglichen Krebspatienten wäre somit ein erstes Indiz für eine vorliegende Urogenitalkreberkrankung. Um dies aber feststellen zu können bedarf es einer belastbaren Methode, die möglichst selektiv einfach, kostengünstig und schnell arbeiten sollte und nicht zu speziell geschultes Personal erfordert und Vergleichswerte des Formaldehydgehaltes im Urin gesunder Patienten. Diese existiert jedoch bisher nicht.

Es wurde also im Rahmen dieser Arbeit eine Methode weiterentwickelt und validiert, die in meiner Diplomarbeit vorgestellt wurde, so dass mittlerweile ein Prototyp existiert, der in Zukunft zur Produktion gebracht werden könnte. Weiterhin wurde die Meßdurchführung optimiert, so dass eine Urinprobe innerhalb von 2 Stunden und 15 min. vermessen werden kann, wenn man drei Messreihen pro Probe messen möchte. Ein Messdurchlauf dauert 45 Minuten. Da die einzige Probenvorbereitung, die benötigt wird, eine Zentrifugation von zweimal 10 Minuten ist, braucht man also insgesamt ungefähr 3 Stunden. Dies ließe sich aber in der Zukunft auch noch verbessern, wenn z. B. keine drei Meßdurchläufe mehr vonnöten wären, die für diese Arbeit zur „Belastbarkeit“ der Daten führen sollte. Das vorliegende Gerät ist kostengünstig, da sich für eine so selektive Methode in Form der Hantzsch Reaktion mit dem Nash Reagenz entschieden wurde, so dass ein Trennschritt unnötig wird. Man benötigt also keine HPLC oder ähnliches, wie andere Methoden es tun. Weiterhin wurde im Verlauf der Arbeit ein Excelmakro geschrieben, das die komplette Auswertung übernimmt. Dies könnte in Zukunft von einem Informatiker verbessert werden, so dass man eine „Ja/ Nein“ Entscheidung treffen lassen könnte. Weiterhin wurde im Verlauf das Nash-Reagenz angepasst, so dass zu der Eigenfärbung und -fluoreszenz des Urins nicht eine Eigenfärbung des Nash-Reagenzes hinzugekommen ist. Nachdem festgestellt wurde, dass die Essigsäure des Nash-Reagenzes die Urinfärbung schwächt, wurde auch dieses Problem behoben. Ein weiterer Schritt war die Feststellung, dass man Urinproben tiefgekühlt lagern kann, ohne dass sich der Formaldehydgehalt ändert. Da es nur wenige andere Methoden gibt, den Formaldehydgehalt in Urin zu bestimmen, würde mithilfe des „Wiederfindung“ ein Instrument geschaffen, die Methode selbst zu überprüfen. Und nach einer belastbaren Anzahl an Messungen wurde ein zuvor eingeführtes Wiederfindungskriterium überflüssig und konnte wieder entfernt werden, was die Auswertung nochmals beschleunigte. In Zusammenarbeit mit dem Institut für molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg wurden dann Urinproben von Menschen mit einer chronischen Blasenentzündung vermessen

und die Proben eines Probanden, dessen Formaldehydgehalt im Urin künstlich erhöht worden war, erkannt. Damit wurde die Methode nochmals bestätigt. Um nun den Formaldehydgehalt erkrankter und nicht erkrankter Menschen differenzieren zu können, wurde eine Kohorte Urinproben potentiell gesunder Menschen vermessen. Die Ergebnisse sind nach Geschlecht und Alter differenziert und fügen sich gut in die wenigen Daten bisherigen Wissens ein.

Für die Zukunft könnte dieser Prototyp in ein kleines kompaktes Gerät zum medizinischen Gebrauch umgewandelt werden. Weiterhin könnten dann in Zusammenarbeit mit einer Klinik der Formaldehydgehalt in Urinproben von an Urogenitalkrebs erkrankter Menschen bestimmt werden und so eine neue Früherkennungsdiagnostik entwickelt werden für zwei Krebsarten die im Frühstadium ausgezeichnete Heilungschancen besitzen. Auch eine Zusammenarbeit mit der Sportmedizinischen Abteilung der Bergischen Universität Wuppertal ist angedacht, um

- den Formaldehydgehalt im Urin von Hochleistungssportler zu messen, da diese ähnlich wie Tumorzellen, einebeschleunigte Proliferation ihrer Zellen aufweisen.
- aus Interesse den Formaldehydgehalt im Urin von Diabetikern zu bestimmen
- die Methode auf Blut anwendbar zu machen, um zu überprüfen, wie der Formaldehydgehalt im Blut gesunder bzw. krebserkrankter Menschen ist.

Abschließend kann man sagen, dass die Zielsetzung erfolgreich umgesetzt werden konnte und dieses Thema auch in Zukunft noch viel Bearbeitungspotential aufweist.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Paracelsus, *Septem Defensiones Die Selbstverteidigung eines Außenseiters*. 1589/ 2003, Basel: Schwabe & Co AG Verlag Basel.
2. Spanel, P., D. Smith, T.A. Holland, W. Al Singary, and J.B. Elder, *Analysis of formaldehyde in the headspace of urine from bladder and prostate cancer patients using selected ion flow tube mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1999. **13**(14): p. 1354-1359.
3. Ebeler, S.E., A.J. Clifford, and T. Shibamoto, *Quantitative analysis by gas chromatography of volatile carbonyl compounds in expired air from mice and human*. *Journal of Chromatography B*, 1997. **702**(1-2): p. 211-215.
4. Ebeler, S.E., S.H. Hinrichs, A.J. Clifford, and T. Shibamoto, *Volatile Carbonyl Levels in Tissues of Transgenic Mice with Nerve Sheath Tumors*. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 1994. **654**(1): p. 9-18.
5. Gordon, S.M., J.P. Szidon, B.K. Krotoszynski, R.D. Gibbons, and H.J. O'Neill, *Volatile Organic-Compounds in Exhaled Air from Patients with Lung-Cancer*. *Clinical Chemistry*, 1985. **31**(8): p. 1278-1282.
6. Kato, S., P.J. Burke, T.H. Koch, and V.M. Bierbaum, *Formaldehyde in human cancer cells: Detection by preconcentration-chemical ionization mass spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2001. **73**(13): p. 2992-2997.
7. Dörner, T., J. Feldkamp, J. Kunze, R. Pfitzmann, M. Radke, B. Schönberger, G. Springer, E. Straube, and W. Straube, *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 260 ed. 2004, Berlin: Walter de Gruyter GmbH&Co.KG.
8. Dhir, R., B. Vietmeier, J. Arlotti, M. Acquafondata, D. Landsittel, R. Masterson, and R.H. Getzenberg, *Early identification of individuals with prostate cancer in negative biopsies*. *Journal of Urology*, 2004. **171**(4): p. 1419-1423.
9. Tritschler, S., S. Scharf, A. Karl, D. Tilki, R. Knuechel, A. Hartmann, C.G. Stief, and D. Zaak, *Validation of the diagnostic value of NMP22 I BladderChek I test as a marker for bladder cancer by photodynamic diagnosis*. *European Urology*, 2007. **51**(2): p. 403-408.
10. Heinrich, A., *Entwicklung eines kompakten Messgerätes zum Nachweis von Formaldehyd in biologischen Flüssigkeiten*, in *Fachbereich C Physikalische Chemie*. 2007, Bergische Universität Wuppertal: Wuppertal.
11. Koolman, J. and K.-H. Röhm, *Taschenatlas der Biochemie*. 4. ed. 2009, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
12. Tong, Z.Q., W.H. Luo, Y.Q. Wang, F. Yang, Y. Han, H. Li, H.J. Luo, B. Duan, T.L. Xu, Q.L. Maoying, H.Y. Tan, J. Wang, H.M. Zhao, F.Y. Liu, and Y. Wan, *Tumor Tissue-Derived Formaldehyde and Acidic Microenvironment Synergistically Induce Bone Cancer Pain*. *Plos One*, 2010. **5**(4): p. -.
13. <http://www.thieme.de/viamedici/aktuelles/artikel/psa.html>.
14. Reed, A.B. and D.J. Parekh, *Biomarkers for prostate cancer detection*. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 2010. **10**(1): p. 103-114.
15. Ploussard, G. and A. de la Taille, *Urine biomarkers in prostate cancer*. *Nature Reviews Urology*, 2010. **7**(2): p. 101-109.
16. Paul, B., R. Dhir, D. Landsittel, M.R. Hitchens, and R.H. Getzenberg, *Detection of prostate cancer with a blood-based assay for early prostate cancer antigen*. *Cancer Research*, 2005. **65**(10): p. 4097-4100.
17. Nogueira, L., R. Corradi, and J.A. Eastham, *Other biomarkers for detecting prostate cancer*. *Bju International*, 2010. **105**(2): p. 166-169.
18. Horn, F., I. Moc, N. Schneider, C. Grilhösl, S. Berghold, and G. Lindenmeier, *Biochemie des Menschen*. 2003, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
19. You, J.J., P. Cozzi, B. Walsh, M. Willcox, J. Kearsley, P. Russell, and Y. Li, *Innovative biomarkers for prostate cancer early diagnosis and progression*. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 2010. **73**(1): p. 10-22.

20. Loeb, S. and W.J. Catalona, *Prostate-specific antigen screening: pro*. Current Opinion in Urology, 2010. **20**(3): p. 185-188.
21. Uetsuki, H., H. Tsunemori, R. Taoka, R. Haba, M. Ishikawa, and Y. Kakehi, *Expression of a novel biomarker, EPCA, in adenocarcinomas and precancerous lesions in the prostate*. Journal of Urology, 2005. **174**(2): p. 514-518.
22. Leman, E.S., G.W. Cannon, L.J. Sokoll, D.W. Chan, H.E. Janes, L.A. Mangold, A.W. Partin, and R.H. Getzenberg, *EPCA-2: A highly specific serum marker for prostate cancer*. Journal of Urology, 2006. **175**(4): p. 275-275.
23. Jamaspishvili, T., M. Kral, I. Khomeriki, V. Student, Z. Kolar, and J. Bouchal, *Urine markers in monitoring for prostate cancer*. Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 2010. **13**(1): p. 12-19.
24. [www.tumor.de](http://www.tumor.de).
25. Karam, J.A., Y. Lotan, and S.F. Shariat, *Urine cytology and commercially available urine-based markers for monitoring of bladder urothelial carcinoma*. Labmedicine, 2007. **38**(1): p. 48-52.
26. Lintula, S. and K. Hotakainen, *Developing biomarkers for improved diagnosis and treatment outcome monitoring of bladder cancer*. Expert Opinion on Biological Therapy, 2010. **10**(8): p. 1169-1180.
27. Proctor, I., K. Stoeber, and G.H. Williams, *Biomarkers in bladder cancer*. Histopathology, 2010. **57**(1): p. 1-13.
28. Sun, Y., D.L. He, Q. Ma, X.Y. Wan, G.D. Zhu, L. Li, Y. Luo, H. He, and L. Yang, *Comparison of seven screening methods in the diagnosis of bladder cancer*. Chinese Medical Journal, 2006. **119**(21): p. 1763-1771.
29. Konety, B. and Y. Lotan, *Urothelial bladder cancer: biomarkers for detection and screening*. Bju International, 2008. **102**(9b): p. 1234-1241.
30. Stier, K., *TATI und NMP22 als Tumormarker des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms*, in *Klinik der Urologie der medizinischen Fakultät Charite*. 2011, Charite Universitätsmedizin Berlin: Berlin. p. 91.
31. Konety, B.R., T.S.T. Nguyen, R. Dhir, R.S. Day, M.J. Becich, W.M. Stadler, and R.H. Getzenberg, *Detection of bladder cancer using a novel nuclear matrix protein, BLCA-4*. Clinical Cancer Research, 2000. **6**(7): p. 2618-2625.
32. Konety, B.R., T.S.T. Nguyen, G. Brenes, A. Sholder, N. Lewis, S. Bastacky, D.M. Potter, and R.H. Getzenberg, *Clinical usefulness of the novel marker BLCA-4 for the detection of bladder cancer*. Journal of Urology, 2000. **164**(3): p. 634-639.
33. Lotan, Y. and C.G. Roehrborn, *Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: Results of a comprehensive literature review and meta-analyses*. Urology, 2003. **61**(1): p. 109-118.
34. Walker, J.F., *Formaldehyde*. 3 ed. 1964, London: Reinhold.
35. Heck, H.D., M. Casanova, and T.B. Starr, *Formaldehyde Toxicity - New Understanding*. Critical Reviews in Toxicology, 1990. **20**(6): p. 397-426.
36. Szende, B., E. Tyihak, L. Trezl, E. Szoke, I. Laszlo, G. Katay, and Z. Kiraly-Veghely, *Formaldehyde generators and capturers as influencing factors of mitotic and apoptotic processes*. Acta Biologica Hungarica, 1998. **49**(2-4): p. 323-329.
37. Havender, W.R., *Formaldehyde Regulation*. Science, 1984. **224**(4649): p. 552-&.
38. Trezl, L., L. Hullan, Z.M. Jaszay, T. Szarvas, I. Petnehazy, B. Szende, J. Bocsi, Z. Takats, K. Vekey, and L. Toke, *Antagonistic reactions of arginine and lysine against formaldehyde and their relation to cell proliferation, apoptosis, folate cycle and photosynthesis*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2003. **244**(1): p. 167-176.
39. Jones, A.R. and P.M. Mashford, *The Fate of "N-Methyl-N'-(Hydroxymethyl)Thiourea in the Rat*. Xenobiotica, 1983. **13**(2): p. 73-79.
40. Neuberger, A., *The metabolism of glycine and serine*, in *Comprehensive Biochemistry Amino acid and sulphur metabolism*, A. Neuberger and L.L.M. van Deenen, Editors. 1981, Elsevier: Amsterdam. p. 257-303.

41. Csiba, A., L. Trezl, E. Vari, and G. Teglas, *Possible Role of the Control of Arginase and Methionine Adenosyl Transferase in the Transport Processes of Endogenous Formaldehyde and in Hypermethylation*. Medical Hypotheses, 1982. **8**(4): p. 409-412.
42. Tyihak, E., L. Albert, Z.I. Nemeth, G. Katay, Z. Kiraly-Veghely, and B. Szende, *Formaldehyde cycle and the natural formaldehyde generators and capturers*. Acta Biologica Hungarica, 1998. **49**(2-4): p. 225-238.
43. Tyihak, E., S. Rozsnyay, E. Sardi, G. Gullner, L. Trezl, and R. Gaborjanyi, *Possibility of Formation of Excited Formaldehyde and Singlet Oxygen in Biotic and Abiotic Stress Situations*. Acta Biologica Hungarica, 1994. **45**(1): p. 3-10.
44. Stryer, L., *Biochemie*. 4. Auflage ed. 1996, Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akademischer Verlag.
45. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molekularbiologie der Zelle*. 2004, Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
46. Doeneke, D., J. Koolman, G. Fuchs, and W. Gerok, *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. 15. Auflage ed. 2005, Stuttgart, New York: Thieme.
47. Van Dijken, J.P., R. Otto, and W. Harder, *Oxidation of methanol, Formaldehyde and formate by catalase purified from methanol-grown Hansenula polymorpha*. Arch. Microbiol., 1975. **106**: p. 221-226.
48. Tyihak, E., L. Trezl, and B. Szende, *Formaldehyde cycle and the phases of stress syndrome*. Stress of Life, 1998. **851**: p. 259-270.
49. Tyihak, E., L. Trezl, and P. Kolonits, *The Isolation of N-Epsilon-Formyl-L-Lysine from the Reaction between Formaldehyde and L-Lysine and Its Identification by Oplc and Nmr-Spectroscopy*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1985. **3**(4): p. 343-349.
50. Tyihak, E., L. Trezl, and I. Rusznak, *Spontaneous N-Epsilon-Methylation of L-Lysine by Formaldehyde*. Pharmazie, 1980. **35**(1): p. 18-20.
51. Shibamoto, T., *Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006. **41**(1): p. 12-25.
52. Pappas, P., P. Stepanou, V. Vasiliou, P. Karamanakos, and M. Marselos, *Ontogenesis and expression of ALDH activity in the skin and the eye of the rat*, in *Advances in experimental medicine and biology 414 Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism 6*, H. Weiner, et al., Editors. 1997, Plenum Press: New York. p. 73-80.
53. Shara, M.A., P.H. Dickson, D. Bagchi, and S.J. Stohs, *Excretion of Formaldehyde, Malondialdehyde, Acetaldehyde and Acetone in the Urine of Rats in Response to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-Para-Dioxin, Paraquat, Endrin and Carbon-Tetrachloride*. Journal of Chromatography-Biomedical Applications, 1992. **576**(2): p. 221-233.
54. Uotila, L. and M. Koivusalo, *Expression of formaldehyde dehydrogenase and S-formylgluthathione hydrolase activities in different rat tissues*, in *Advances in experimental medicine and biology 414 Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism 6*, H. Weiner, et al., Editors. 1997, Plenum Press: New York. p. 365-371.
55. ; Available from: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/2/1/1.html>.
56. Heck, H., *The implausibility of leukemia induction by formaldehyde: a critical review of the biological evidence on distant-site toxicity*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2004. **40**(92): p. 92-106.
57. Auerbach, C., M. Moutschendammen, and J. Moutschen, *Genetic and Cytogenetical Effects of Formaldehyde and Related Compounds*. Mutation Research, 1977. **39**(3-4): p. 317-362.
58. Zubay, G., *Biochemie*. 2000, London, Frankfurt a.M.: Mc Graw Hill.
59. Tyihak, E., *Formaldehyde cycle and the phases of stress syndrome*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1985. **851**(1): p. 259-270.
60. Koivusalo, M., M. Baumann, and L. Uotila, *Evidence for the Identity of Glutathione-Dependent Formaldehyde Dehydrogenase and Class-iii Alcohol-Dehydrogenase*. Febs Letters, 1989. **257**(1): p. 105-109.
61. Trezl, L., *Nonenzymatic protein methylation and its biological significance in protein methylation*, in *Protein methylation*, W.K. Paik and S. Kim, Editors. 1990, CRC Press: Boca Raton. p. 407-434.

62. Trezl, L. and J. Pipek, *Formation of Excited Formaldehyde in Model Reactions Simulating Real Biological-Systems*. Theochem-Journal of Molecular Structure, 1988. **47**: p. 213-223.
63. Jelski, W., L. Chrostek, M. Smitkowski, and W. Markiewicz, *The activity of class I, II, III and IV alcohol dehydrogenase isoenzymes and aldehyde dehydrogenase in breast cancer*. Clinical and Experimental Medicine, 2006. **6**(2): p. 89-93.
64. Thorndike, J. and W.S. Beck, *Production of Formaldehyde from N5-Methyltetrahydrofolate by Normal and Leukemic Leukocytes*. Cancer Research, 1977. **37**(4): p. 1125-1132.
65. Wehinger, A., A. Schmid, S. Mechtcheriakov, M. Ledochowski, C. Grabmer, G.A. Gastl, and A. Amann, *Lung cancer detection by proton transfer reaction mass-spectrometric analysis of human breath gas*. International Journal of Mass Spectrometry, 2007. **265**(1): p. 49-59.
66. Fuchs, P., C. Loeseken, J.K. Schubert, and W. Miekisch, *Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer*. International Journal of Cancer, 2010. **126**(11): p. 2663-2670.
67. Rozylo, T.K., A. Zabinska, L. Kwietniewski, T. Bachanek, and A. Jamrozek-Manko, *OPLC investigation of formaldehyde levels in the hard tissues of the teeth in rare pathological cases*. Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc, 2001. **14**(2): p. 130-133.
68. Rozylo, T.K., A. Zabinska, and I. Rozylo-Kalinowska, *Use of OPLC for quantitation of HCHO, as the dimedone adduct, in human saliva in different dental pathologies*. Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc, 2002. **15**(1): p. 19-22.
69. Rozylo, T.K., A. Zabinska, E. Tyihak, and I. Rozylo-Kalinowska, *The possibility of quantitative OPLC measurement of levels of formaldehyde in human saliva*. Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc, 2000. **13**(5): p. 394-396.
70. Rozylo, T.K., R. Siembida, Z.I. Nemeth, L. Albert, and E. Tyihak, *HPLC-OPLC-MS investigation of change of formaldehyde and its generators in human teeth of different physiological stage*. Biomedical Chromatography, 2000. **14**(3): p. 173-179.
71. Rozylo, T.K., R. Siembida, A. Szyszowska, and A. Jambrozek-Manko, *The increase of formaldehyde level in some rare pathological cases of teeth determined with the use of quantitative TLC*. Acta Biologica Hungarica, 1998. **49**(2-4): p. 317-322.
72. Deng, Y.L. and P.H. Yu, *Simultaneous determination of formaldehyde and methylglyoxal in urine: Involvement of semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated deamination in diabetic complications*. Journal of Chromatographic Science, 1999. **37**(9): p. 317-322.
73. Yu, P.H., C. Cauglin, K.L. Wempe, and D. Gubisne-Haberle, *A novel sensitive high-performance liquid chromatography/electrochemical procedure for measuring formaldehyde produced from oxidative deamination of methylamine and in biological samples*. Analytical Biochemistry, 2003. **318**(2): p. 285-290.
74. Szende, B., *Possible role of formaldehyde in the apoptotic and mitotic effect of 1-methyl-ascorbigen*. Pathology Oncology Research, 1995. **1**(1).
75. Agathos, M., *Formaldehyde Contact Allergy*. Contact Dermatitis, 1982. **8**(1): p. 79-80.
76. Ma, T.H. and M.M. Harris, *Review of the Genotoxicity of Formaldehyde*. Mutation Research, 1988. **196**(1): p. 37-59.
77. deAndrade, J.B., *Determination of formaldehyde and acetaldehyde in urine by HPLC*. American Laboratory, 1999: p. 22-27.
78. Cockcroft, D.W., V.H. Hoepfner, and J. Dolovich, *Occupational Asthma Caused by Cedar Urea Formaldehyde Particle Board*. Chest, 1982. **82**(1): p. 49-53.
79. Ahmet, G., *Vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in frontal cortex and hippocampus: Biochemical and histological studies*. Journal of Chemical Neuroanatomy, 2005. **29**(3): p. 179-178.
80. Sandikci, M., K. Seyrek, H. Aksit, and H. Kose, *Inhalation of formaldehyde and xylene induces apoptotic cell death in the lung tissue*. Toxicology and Industrial Health, 2009. **25**(7): p. 455-461.
81. Kilburn, K.H., *Neurobehavioral Impairment and Seizures from Formaldehyde*. Archives of Environmental Health, 1994. **49**(1): p. 37-44.
82. Buddecke, E., *Grundriss der Biochemie*. 1974, Berlin: Walter De Gruyter.
83. Calvert, J., L. Albright, E. Brennan, S. Brooks, C.o. Aldehydes, B.o.T.a.E.H. Hazards, A.o.L. Sciences, and N.R. Council, *Formaldehydes and other aldehydes*. 1981, Washington,D.C.: National Academy Press.



84. Schauenstein, E., H. Esterbauer, and H. Zollner, *Aldehydes In Biological Systems: Their Natural Occurrence and Biological Activities*, ed. J.R. Lagnado. 1977, London: Pion Limited.
85. Monticello, T.M. and K.T. Morgan, *Cell-Proliferation and Formaldehyde-Induced Respiratory Carcinogenesis*. Risk Analysis, 1994. **14**(3): p. 313-319.
86. Her, J.Y., H.W. Jang, and K.G. Lee, *Determination of Formaldehyde in Cigarette Smoke and Inhibitory Effect of Plant Volatile Extracts on the Formation of Formaldehyde*. Food Science and Biotechnology, 2009. **18**(2): p. 471-474.
87. Nielsen, G.D. and P. Wolkoff, *Cancer effects of formaldehyde: a proposal for an indoor air guideline value*. Archives of Toxicology, 2010. **84**(6): p. 423-446.
88. Jakab, M.G., T. Klupp, K. Besenyi, A. Biro, J. Major, and A. Tompa, *Formaldehyde-induced chromosomal aberrations and apoptosis in peripheral blood lymphocytes of personnel working in pathology departments*. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2010. **698**(1-2): p. 11-17.
89. Goldschmidt, B.M., *Role of Aldehydes in Carcinogenesis*. Journal of Environmental Science and Health Part C-Environmental Carcinogenesis Reviews, 1984. **2**(2): p. 231-249.
90. Feron, V.J., H.P. Til, F. Devrijer, R.A. Woutersen, F.R. Cassee, and P.J. Vanbladeren, *Aldehydes - Occurrence, Carcinogenic Potential, Mechanism of Action and Risk Assessment*. Mutation Research, 1991. **259**(3-4): p. 363-385.
91. Bachand, A.M., K.A. Mundt, D.J. Mundt, and R.R. Montgomery, *Epidemiological studies of formaldehyde exposure and risk of leukemia and nasopharyngeal cancer: A meta-analysis*. Critical Reviews in Toxicology, 2010. **40**(2): p. 85-100.
92. Speit, G., J. Zeller, O. Schmid, A. Elhajouji, L. Ma-Hock, and S. Neuss, *Inhalation of formaldehyde does not induce systemic genotoxic effects in rats*. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2009. **677**(1-2): p. 76-85.
93. Neuss, S., J. Zeller, L. Ma-Hock, and G. Speit, *Inhalation of formaldehyde does not induce genotoxic effects in broncho-alveolar lavage (BAL) cells of rats*. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2010. **695**(1-2): p. 61-68.
94. Speit, G. and O. Schmid, *Local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated epithelial cells*. Mutation Research-Reviews in Mutation Research, 2006. **613**(1): p. 1-9.
95. Schmid, O. and G. Speit, *Genotoxic effects induced by formaldehyde in human blood and implications for the interpretation of biomonitoring studies*. Mutagenesis, 2007. **22**(1): p. 69-74.
96. Costa, S., P. Coelho, C. Costa, S. Silva, O. Mayan, L.S. Santos, J. Gaspar, and J.P. Teixeira, *Genotoxic damage in pathology anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde*. Toxicology, 2008. **252**(1-3): p. 40-48.
97. Marsh, G.M., A.O. Youk, J.M. Buchanich, L.D. Cassidy, L.J. Lucas, N.A. Esmen, and I.M. Gathuru, *Pharyngeal cancer mortality among chemical plant workers exposed to formaldehyde*. Toxicology and Industrial Health, 2002. **18**(6): p. 257-268.
98. Haack, L.P., D.L. Lacourse, and T.J. Korniski, *Comparison of Fourier-Transform Infrared Spectrometry and 2,4-Dinitrophenylhydrazine Impinger Techniques for the Measurement of Formaldehyde in Vehicle Exhaust*. Analytical Chemistry, 1986. **58**(1): p. 68-72.
99. Tuazon, E.C., A.M. Winer, and J.N. Pitts, *Trace Pollutant Concentrations in a Multiday Smog Episode in the California South Coast Air Basin by Long Path-Length Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy*. Environmental Science & Technology, 1981. **15**(10): p. 1232-1237.
100. Smith, D., P. Spanel, T.A. Holland, W. Al Singari, and J.B. Elder, *Selected ion flow tube mass spectrometry of urine headspace*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1999. **13**(8): p. 724-729.
101. Smith, D. and P. Spanel, *The novel selected-ion flow tube approach to trace gas analysis of air and breath*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1996. **10**(10): p. 1183-1198.

102. Liu, J.B., H.T. Kim, and S.L. Anderson, *Multiphoton ionization and photoelectron spectroscopy of formaldehyde via its 3p Rydberg states*. Journal of Chemical Physics, 2001. **114**(22): p. 9797-9806.
103. Norkus, E., A. Vaskelis, and R. Pauliukaite, *Polarographic determination of formaldehyde according to the anodic oxidation wave in alkaline solutions*. Electroanalysis, 1999. **11**(6): p. 447-449.
104. Rogers, J.D., *Ultraviolet Absorption Cross Sections and Atmospheric Photodissociation Rate constants of formaldehyde*. Journal of Physical Chemistry, 1990. **94**: p. 4011-4015.
105. Eegriwe, E., *Reaktionen und Reagenzien zum Nachweis organischer Verbindungen IV*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1937. **110**(1-2): p. 22-25.
106. Pretto, A., M.R. Milani, and A.A. Cardoso, *Colorimetric determination of formaldehyde in air using a hanging drop of chromotropic acid*. Journal of Environmental Monitoring, 2000. **2**(6): p. 566-570.
107. Sawicki, E., S. Mcpherson, and T.R. Hauser, *Spectrophotometric Determination of Formaldehyde and Formaldehyde-Releasing Compounds with Chromotropic Acid, 6-Amino-1-Naphthol-3-Sulfonic Acid (J Acid), and 6-Anilino-1-Naphthol-3-Sulfonic Acid (Phenyl J Acid)*. Analytical Chemistry, 1962. **34**(11): p. 1460-&.
108. Zhang, H.-J., *Determination of low-aliphatic aldehyde derivatizatives in human salvia using polymer monolith microextraction coupled to high-performance liquid chromatography*. Analytica Chimica Acta, 2006. **565**: p. 129-135.
109. Fung, K. and D. Grosjean, *Determination of Nanogram Amounts of Carbonyls as 2,4-Dinitrophenylhydrazones by High-Performance Liquid-Chromatography*. Analytical Chemistry, 1981. **53**(2): p. 168-171.
110. Lipari, F. and S.J. Swarin, *Determination of Formaldehyde and Other Aldehydes in Automobile Exhaust with an Improved 2,4-Dinitrophenylhydrazine Method*. Journal of Chromatography, 1982. **247**(2): p. 297-306.
111. Levin, J.O., K. Andersson, R. Lindahl, and C.A. Nilsson, *Determination of Sub-Part-Per-Million Levels of Formaldehyde in Air Using Active or Passive Sampling on 2,4-Dinitrophenylhydrazine-Coated Glass-Fiber Filters and High-Performance Liquid-Chromatography*. Analytical Chemistry, 1985. **57**(6): p. 1032-1035.
112. Sandner, F., W. Dott, and J. Hollender, *Sensitive indoor air monitoring of formaldehyde and other carbonyl compounds using the 2,4-dinitrophenylhydrazine method*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2001. **203**(3): p. 275-279.
113. Cecinato, A., N. Yassaa, V. Di Palo, and M. Possanzini, *Observation of volatile and semi-volatile carbonyls in an Algerian urban environment using dinitrophenylhydrazine/silica-HPLC and pentafluorophenylhydrazine/silica-GC-MS*. Journal of Environmental Monitoring, 2002. **4**(2): p. 223-228.
114. Buldt, A. and U. Karst, *N-methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzofurazan as a new reagent for air monitoring of aldehydes and ketones*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(9): p. 1893-1898.
115. Buldt, A., R. Lindahl, J.O. Levin, and U. Karst, *A diffusive sampling device for the determination of formaldehyde in air using N-methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzofurazan (MNBDH) as reagent*. Journal of Environmental Monitoring, 1999. **1**(1): p. 39-43.
116. Sawicki, E., W. Elbert, T.R. Hauser, and T.W. Stanley, *3-Methyl-2-Benzothiazolone Hydrazone Test - Sensitive New Methods for Detection, Rapid Estimation, and Determination of Aliphatic Aldehydes*. Analytical Chemistry, 1961. **33**(1): p. 93-&.
117. Kamata, E., *Determination of Formaldehyde by Means of 3-Methyl-2-Benzothiazolone Hydrazone. A New Procedure Involving Extraction*. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1965. **38**(11): p. 2005-&.
118. Rodriguez, I.C., S.R. Bravo, and D.P. Bedito, *Selective monitoring of formaldehyde in air by use of the stopped-flow technique*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 1995. **61**(4): p. 331-341.
119. Murai, K., M. Okano, H. Kuramitz, N. Hata, T. Kawakami, and S. Taguchi, *Membrane Solubilization Technique for Spectrophotometric Determination of Trace Formaldehyde in Rainwater*. Analytical Sciences, 2008. **24**(11): p. 1455-1459.

120. Tanenbaum, M. and C.E. Bricker, *Microdetermination of Free Formaldehyde*. Analytical Chemistry, 1951. **23**(2): p. 354-357.
121. Feldman, M.I., *Determination of Free Formaldehyde in the Presence of Its Compounds with Amino Acids and Proteins*. Biochemistry-Moscow, 1958. **23**(6): p. 867-872.
122. Chrastil, J. and J.T. Wilson, *Sensitive Colorimetric Method for Formaldehyde*. Analytical Biochemistry, 1975. **63**(1): p. 202-207.
123. Ensafi, A.A. and S. Abassi, *Sensitive reaction rate method for the determination of low levels of formaldehyde with photometric detection*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1999. **363**(4): p. 376-379.
124. Afkhani, A. and M. Rezaei, *Sensitive spectrophotometric determination of formaldehyde by inhibition of the malachite green-sulfite reaction*. Microchemical Journal, 1999. **63**(2): p. 243-249.
125. Miksch, R.R., D.W. Anthon, L.Z. Fanning, C.D. Hollowell, K. Revzan, and J. Glanville, *Modified Pararosaniline Method for the Determination of Formaldehyde in Air*. Analytical Chemistry, 1981. **53**(13): p. 2118-2123.
126. Munoz, M.P., F.J.M.D. Rueda, and L.M.P. Diez, *Determination of Formaldehyde in Air by Flow-Injection Using Pararosaniline and Spectrophotometric Detection*. Analyst, 1989. **114**(11): p. 1469-1471.
127. Baker, M.E.J. and R. Narayanaswamy, *Development of an Optical Formaldehyde Sensor-Based on the Use of Immobilized Pararosaniline*. Analyst, 1994. **119**(5): p. 959-961.
128. Bechmann, I.E., *Determination of formaldehyde in frozen fish with formaldehyde dehydrogenase using a flow injection system with an incorporated gel-filtration chromatography column*. Analytica Chimica Acta, 1996. **320**(2-3): p. 155-164.
129. Reche, F., M.C. Garrigos, A. Sanchez, and A. Jimenez, *Simultaneous supercritical fluid derivatization and extraction of formaldehyde by the Hantzsch reaction*. Journal of Chromatography A, 2000. **896**(1-2): p. 51-59.
130. Voncina, B., N. Majcen, A.M. Le Marechal, D.B. Voncina, and D. Bezek, *Free formaldehyde determination using HPLC*. Advanced Materials Forum Ii, 2004. **455-456**: p. 801-804.
131. Piletta-Zanin, P.A., F. Pasche-Koo, P.C. Auderset, D. Huggengerger, J.H. Saurat, and C. Hauser, *Detection of formaldehyde in moistened baby toilet tissues. Contact Dermatitis*, 1998. **38**(1): p. 46-46.
132. Sardi, E. and E. Tyihak, *Simple Determination of Formaldehyde in Dimeedone Adduct Form in Biological Samples by High-Performance Liquid-Chromatography*. Biomedical Chromatography, 1994. **8**(6): p. 313-314.
133. Mason, D.J., M.D. Sykes, S.W. Panton, and E.H. Rippon, *Determination of naturally-occurring formaldehyde in raw and cooked Shiitake mushrooms by spectrophotometry and liquid chromatography-mass spectrometry*. Food Additives and Contaminants, 2004. **21**(11): p. 1071-1082.
134. Adrian-Romero, M., G. Blunden, B.G. Carpenter, S. Lucas, and E. Tyihak, *The use of HPLC for the detection and quantification of formaldehyde in the Pteridophyta*. Acta Biologica Hungarica, 1998. **49**(2-4): p. 303-308.
135. Adrian-Romero, M., G. Blunden, B.G. Carpenter, and E. Tyihak, *HPLC quantification of formaldehyde, as formaldemethone, in plants and plant-like organisms*. Chromatographia, 1999. **50**(3-4): p. 160-166.
136. Maday, E., E. Tyihak, and E. Szoke, *Occurrence of formaldehyde in intact plants, micropropagated plants and hairy root cultures of chamomile (Matricaria recutita L.)*. Plant Growth Regulation, 2000. **30**(2): p. 105-110.
137. Zurek, G., H. Luftmann, and U. Karst, *HPLC-APCI-MS with calibration based on stable isotope-labelled internal standards for the quantification of carbonyls in air samples*. Analyst, 1999. **124**(9): p. 1291-1295.
138. Rivero, R.T. and V. Topiwala, *Quantitative determination of formaldehyde in cosmetics using a combined solid-phase microextraction-isotope dilution mass spectrometry method*. Journal of Chromatography A, 2004. **1029**(1-2): p. 217-222.

139. Rivero, R.T. and V. Topiwala, *Quantitative determination of formaldehyde in cosmetics using combined headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography*. Journal of Cosmetic Science, 2004. **55**(4): p. 343-350.
140. Yu, J.Z., H.E. Jeffries, and R.M. Lelacheur, *Identifying Airborne Carbonyl-Compounds in Isoprene Atmospheric Photooxidation Products by Their Pfbha Oximes Using Gas-Chromatography Ion-Trap Mass-Spectrometry*. Environmental Science & Technology, 1995. **29**(8): p. 1923-1932.
141. DeZwart, L.L., J. Venhorst, M. Groot, J.N.M. Commandeur, R.C.A. Hermanns, J.H.M. Meerman, B.L.M. VanBaar, and P.E. Vermeulen, *Simultaneous determination of eight lipid peroxidation degradation products in urine of rats treated with carbon tetrachloride using gas chromatography with electron-capture detection*. Journal of Chromatography B, 1997. **694**(2): p. 277-287.
142. Choudhury, T.K., T. Kotiaho, and R.G. Cooks, *Detection of Low-Molecular-Weight Aldehydes in Aqueous-Solution by Membrane Introduction Mass-Spectrometry*. Talanta, 1992. **39**(6): p. 573-580.
143. Liou, S.W., C.Y. Chen, T.T. Yang, and J.M. Lin, *Determination of particulate-bound formaldehyde from burning incense by solid phase microextraction*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2008. **80**(4): p. 324-328.
144. Sugaya, N., K. Sakurai, T. Nakagawa, N. Onda, S. Onodera, M. Morita, and M. Tezuka, *Development of a headspace GC/MS analysis for carbonyl compounds (aldehydes and ketones) in household products after derivatization with o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)-hydroxylamine*. Analytical Sciences, 2004. **20**(5): p. 865-870.
145. Sugaya, N., T. Nakagawa, K. Sakurai, M. Morita, and S. Onodera, *Analysis of aldehydes in water by head space-GC/MS*. Journal of Health Science, 2001. **47**(1): p. 21-27.
146. Wang, Q., J. O'Reilly, and J. Pawliszyn, *Determination of low-molecular mass aldehydes by automated headspace solid-phase microextraction with in-fibre derivatisation*. Journal of Chromatography A, 2005. **1071**(1-2): p. 147-154.
147. Tsai, S.W. and S.S.Q. Hee, *A new passive sampler for aldehydes*. American Industrial Hygiene Association Journal, 1999. **60**(4): p. 463-473.
148. Li, Z., L.K. Jacobus, W.P. Wuelfing, M. Golden, G.P. Martin, and R.A. Reed, *Detection and quantification of low-molecular-weight aldehydes in pharmaceutical excipients by headspace gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 2006. **1104**(1-2): p. 1-10.
149. Zurek, G. and U. Karst, *Liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of aldehydes derivatized by the Hantzsch reaction*. Journal of Chromatography A, 1999. **864**(2): p. 191-197.
150. Reche, F., M.C. Garrigos, A. Sanchez, and A. Jimenez, *Determination of formaldehyde in finger-paints for children use by SFE combined with spectrophotometric and chromatographic techniques*. Analytical Letters, 2001. **34**(8): p. 1311-1322.
151. Tyihak, E., G. Blunden, M.H. Yang, T.A. Crabb, and E. Sardi, *Formaldehyde, as its dimedone adduct, from Ascophyllum nodosum*. Journal of Applied Phycology, 1996. **8**(3): p. 211-215.
152. Katay, G., M. Adrian-Romero, Z.I. Nemeth, G. Blunden, E. Tyihak, and L. Albert, *Spectroscopic and OPLC identification and measurement of formaldehyde and potential formaldehyde generators in macroscopic fungi*. Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc, 2002. **15**(1): p. 28-33.
153. Kiraly-Veghely, Z., E. Tyihak, L. Albert, Z.I. Nemeth, and G. Katay, *Identification and measurement of resveratrol and formaldehyde in parts of white and blue grape berries*. Acta Biologica Hungarica, 1998. **49**(2-4): p. 281-289.
154. Dedov, A.G., N.K. Zaitsev, P.M. Zaitsev, A.V. Pavlyuk, and S.G. Suslov, *Indirect determination of formaldehyde by alternating-current voltammetry at a hanging mercury drop in the presence of oxygen*. Journal of Analytical Chemistry, 2000. **55**(6): p. 583-585.
155. Velikonja, S., I. Jarc, L. Zupancickralj, and J. Marsel, *Comparison of Gas-Chromatographic and Spectrophotometric Techniques for the Determination of Formaldehyde in Water*. Journal of Chromatography A, 1995. **704**(2): p. 449-454.

156. Sowinski, P., W. Wardencki, and M. Partyka, *Development and evaluation of headspace gas chromatography method for the analysis of carbonyl compounds in spirits and vodkas*. *Analytica Chimica Acta*, 2005. **539**(1-2): p. 17-22.
157. Bolta, S.V., L. Zupancic-Kralj, and J. Marsel, *Gas chromatographic determination of formaldehyde in air using solid-phase microextraction sampling*. *Chromatographia*, 1998. **48**(1-2): p. 95-100.
158. Martos, P.A. and J. Pawliszyn, *Sampling and determination of formaldehyde using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization*. *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(11): p. 2311-2320.
159. Koziel, J.A., J. Noah, and J. Pawliszyn, *Field sampling and determination of formaldehyde in indoor air with solid-phase microextraction and on-fiber derivatization*. *Environmental Science & Technology*, 2001. **35**(7): p. 1481-1486.
160. Alvarez, E.G. and M. Valcarcel, *Research into conditions of quantitvity in the determination of carboniles in complex air matrices by adsorptive solid phase microextraction*. *Talanta*, 2009. **77**(4): p. 1444-1453.
161. Schmied, W., M. Przewosnik, and K. Bachmann, *Determination of Traces of Aldehydes and Ketones in the Troposphere Via Solid-Phase Derivatization with Dnsh*. *Fresenius Zeitschrift Für Analytische Chemie*, 1989. **335**(5): p. 464-468.
162. Zhan, X.Q., D.H. Li, Q.Z. Zhu, H. Zheng, and J.G. Xu, *Sensitive fluorimetric determination of formaldehyde by the co-quenching effect of formaldehyde and sulfite on the fluorescence of tetra-substituted amino aluminium phthalocyanine*. *Analyst*, 2000. **125**(12): p. 2330-2334.
163. Belman, S., *Fluorimetric Determination of Formaldehyde*. *Analytica Chimica Acta*, 1963. **29**(2): p. 120-&.
164. Kelly, T.J. and C.R. Fortune, *Continuous Monitoring of Gaseous Formaldehyde Using an Improved Fluorescence Approach*. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1994. **54**(4): p. 249-263.
165. Dong, S. and P.K. Dasgupta, *Fast Fluorometric Flow-Injection Analysis of Formaldehyde in Atmospheric Water*. *Environmental Science & Technology*, 1987. **21**(6): p. 581-588.
166. Li, J.Z., P.K. Dasgupta, Z. Genfa, and M.A. Hutterli, *Measurement of atmospheric formaldehyde with a diffusion scrubber and light-emitting diode-liquid-core waveguide based fluorometry*. *Field Analytical Chemistry and Technology*, 2001. **5**(1-2): p. 2-12.
167. Li, J.Z., P.K. Dasgupta, and W. Luke, *Measurement of gaseous and aqueous trace formaldehyde - Revisiting the pentanedione reaction and field applications*. *Analytica Chimica Acta*, 2005. **531**(1): p. 51-68.
168. Bisgaard, P., L. Molhave, B. Rietz, and P. Wilhardt, *Quantitative-Determination of Formaldehyde in Air Using the Acetylacetone Method*. *Analytical Letters Part a-Chemical Analysis*, 1983. **16**(17-1): p. 1457-1468.
169. Short, L.C. and T. Benter, *Selective measurement of HCHO in urine using direct liquid-phase fluorimetric analysis*. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2005. **43**(2): p. 178-182.
170. Li, Q., M. Oshima, and S. Motomizu, *Flow-injection spectrofluorometric determination of trace amounts of formaldehyde in water after derivatization with acetoacetanilide*. *Talanta*, 2007. **72**(5): p. 1675-1680.
171. Li, Q., P. Sritharathikhun, M. Oshima, and S. Motomizu, *Development of novel detection reagent for simple and sensitive determination of trace amounts of formaldehyde and its application to flow injection spectrophotometric analysis*. *Analytica Chimica Acta*, 2008. **612**(2): p. 165-172.
172. Li, Q., P. Sritharathikhun, and S. Motomizu, *Development of novel reagent for Hantzsch reaction for the determination of formaldehyde by spectrophotometry and fluorometry*. *Analytical Sciences*, 2007. **23**(4): p. 413-417.
173. Tamura, H., K. Kitta, and T. Shibamoto, *Formation of Reactive Aldehydes from Fatty-Acids in a Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oxidation System*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1991. **39**(3): p. 439-442.

174. Wong, J.W., H.C.H. Yeo, and T. Shibamoto, *Determination of Malonaldehyde and Formaldehyde Formed from Fatty-Acid Ethyl-Esters Upon Microwave and Thermal Heating*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991. **39**(12): p. 2260-2262.
175. Yasuhara, A. and T. Shibamoto, *Gas-Chromatographic Determination of Trace Amounts of Aldehydes in Automobile Exhaust by a Cysteamine Derivatization Methods*. Journal of Chromatography A, 1994. **672**(1-2): p. 261-266.
176. Yasuhara, A. and T. Shibamoto, *Quantitative-Analysis of Volatile Aldehydes Formed from Various Kinds of Fish Flesh during Heat-Treatment*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995. **43**(1): p. 94-97.
177. Miyake, T. and T. Shibamoto, *Quantitative-Analysis by Gas-Chromatography of Volatile Carbonyl-Compounds in Cigarette-Smoke*. Journal of Chromatography A, 1995. **693**(2): p. 376-381.
178. Niyatishirkhodaee, F. and T. Shibamoto, *Invitro Determination of Toxic Aldehydes Formed from the Skin Lipid, Triolein, Upon Ultraviolet-Irradiation - Formaldehyde and Acrolein*. Journal of Toxicology-Cutaneous and Ocular Toxicology, 1992. **11**(4): p. 285-292.
179. Weng, J.L., M.H. Ho, and W.K. Nonidez, *Amperometric Determination of Formaldehyde Via the Hexacyanoferrate (Iii)-Coupled Dehydrogenase Reaction*. Analytica Chimica Acta, 1990. **233**(1): p. 59-63.
180. Szarvas, T., E. Szatloczky, J. Volford, L. Trezl, E. Tyihak, and I. Rusznak, *Determination of Endogenous Formaldehyde Level in Human-Blood and Urine by Dimedone-C-14 Radiometric Method*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry-Letters, 1986. **106**(6): p. 357-367.
181. Georghiou, P.E. and C.K.J. Ho, *The Chemistry of the Chromotropic-Acid Method for the Analysis of Formaldehyde*. Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie, 1989. **67**(5): p. 871-876.
182. West, P.W. and B. Sen, *Spectrophotometric Determination of Traces of Formaldehyde*. Fresenius Zeitschrift Fur Analytische Chemie, 1956. **153**(3): p. 177-183.
183. Riess, U., U. Tegtbur, C. Fauck, F. Fuhrmann, D. Markewitz, and T. Salthammer, *Experimental setup and analytical methods for the non-invasive determination of volatile organic compounds, formaldehyde and NOx in exhaled human breath*. Analytica Chimica Acta, 2010. **669**(1-2): p. 53-62.
184. Sawicki, E. and R.A. Carnes, *Spectrophotofluorimetric Determination of Aldehydes with Dimedone and Other Reagents*. Mikrochimica Acta, 1968(1): p. 148-&.
185. Sakai, T., S. Tanaka, N. Teshima, S. Yasuda, and N. Ura, *Fluorimetric flow injection analysis of trace amount of formaldehyde in environmental atmosphere with 5,5-dimethylcyclohexane-1,3-dione*. Talanta, 2002. **58**(6): p. 1271-1278.
186. Ahonen, I., E. Priha, and M.L. Aijala, *Specificity of Analytical Methods Used to Determine the Concentration of Formaldehyde in Workroom Air*. Chemosphere, 1984. **13**(4): p. 521-525.
187. Altshuller, A., D.L. Miller, and S.F. Sleva, *Determination of Formaldehyde in Gas Mixtures by Chromotropic Acid Method*. Analytical Chemistry, 1961. **33**(4): p. 621-&.
188. Bisgaard, P., L. Molhave, B. Rietz, and P. Wilhardt, *A Method for Personal Sampling and Analysis of Nanogram Amounts of Formaldehyde in Air*. American Industrial Hygiene Association Journal, 1984. **45**(6): p. 425-429.
189. Friedfeld, S., M. Fraser, D. Lancaster, D. Leleux, D. Rehle, and F. Tittel, *Field intercomparison of a novel optical sensor for formaldehyde quantification*. Geophysical Research Letters, 2000. **27**(14): p. 2093-2096.
190. Hak, C., I. Pundt, S. Trick, C. Kern, U. Platt, J. Dommen, C. Ordonez, A.S.H. Prevot, W. Junkermann, C. Astorga-Llorens, B.R. Larsen, J. Mellqvist, A. Strandberg, Y. Yu, B. Galle, J. Kleffmann, J.C. Lorzer, G.O. Braathen, and R. Volkamer, *Intercomparison of four different in-situ techniques for ambient formaldehyde measurements in urban air*. Atmospheric Chemistry and Physics, 2005. **5**: p. 2881-2900.
191. Kennedy, E.R. and R.H. Hill, *Determination of Formaldehyde in Air as an Oxazolidine Derivative by Capillary Gas-Chromatography*. Analytical Chemistry, 1982. **54**(11): p. 1739-1742.

192. Lazrus, A.L., K.L. Fong, and J.A. Lind, *Automated Fluorometric-Determination of Formaldehyde in Air*. Analytical Chemistry, 1988. **60**(10): p. 1074-1078.
193. Trapp, D. and C. Deserves, *Intercomparison of Formaldehyde Measurements in the Tropical Atmosphere*. Atmospheric Environment, 1995. **29**(22): p. 3239-3243.
194. Zou, Y.Q., X.S. Zhang, L. Fucai, D. Yuan, and T. Me, *Direct spectrophotometric determination of formaldehyde in leather wastewater by flow injection analysis with chromotropic acid*. Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists, 2007. **91**(4): p. 142-144.
195. Greenfield, W., R. Berg, and R. Moore, *Determination of Urinary Formaldehyde Following Administration of Methenamine Salts*. Clinical Chemistry, 1969. **15**(12): p. 1180-&.
196. Bagchi, D., M.A. Shara, M. Bagchi, E.A. Hassoun, and S.J. Stohs, *Time-dependent effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on serum and urine levels of malondialdehyde, formaldehyde, acetaldehyde and acetone in rats*. Toxicology and Applied Pharmacology, 1993. **123**(1): p. 83-88.
197. Gollamudi, R., M.C. Meyer, and A.B. Straughn, *Simultaneous determination of methenamine and formaldehyde in the urine of humans after methenamine administration*. Biopharmaceutics & Drug Disposition, 1979. **1**(1): p. 27-36.
198. Takeuchi, A., T. Takigawa, M. Abe, T. Kawai, Y. Endo, T. Yasugi, G. Endo, and K. Ogino, *Determination of formaldehyde in urine by headspace gas chromatography*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2007. **79**(1): p. 1-4.
199. Akubue, P.I., D. Bagchi, W.J. Ihm, and S.J. Stohs, *Excretion of Malondialdehyde, Formaldehyde, Acetaldehyde, Acetone and Methyl Ethyl Ketone in the Urine of Rats Given an Acute Dose of Malondialdehyde*. Archives of Toxicology, 1994. **68**(5): p. 338-341.
200. Lengyel, J., H. Kalaisz, I. Szarvas, C. Peltz, and A. Szarkane-Bolehovszky, *HPLC analysis of metabolically produced formaldehyde*. Journal of Chromatographic Science, 2003. **41**(4): p. 177-181.
201. Moser, J., D. Bagchi, P.I. Akubue, and S.J. Stohs, *Excretion of Malondialdehyde, Formaldehyde, Acetaldehyde and Acetone in the Urine of Rats Following Acute and Chronic Administration of Ethanol*. Alcohol and Alcoholism, 1993. **28**(3): p. 287-295.
202. Poortmans, J.R., A. Kumps, P. Duez, A. Fofonka, A. Carpentier, and M. Francaux, *Effect of oral creatine supplementation on urinary methylamine, formaldehyde, and formate*. Medicine and Science in Sports and Exercise, 2005. **37**(10): p. 1717-1720.
203. Jackson, J. and T.A. Stamey, *Riker Method for Determining Formaldehyde in Presence of Methenamine*. Investigative Urology, 1971. **9**(2): p. 124-&.
204. Banos, C.E. and M. Silva, *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of low-molecular mass aldehydes in human urine*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. **878**(7-8): p. 653-658.
205. Cordis, G.A., D. Bagchi, N. Maulik, and D.K. Das, *High-Performance Liquid-Chromatographic Method for the Simultaneous Detection of Malonaldehyde, Acetaldehyde, Formaldehyde, Acetone and Propionaldehyde to Monitor the Oxidative Stress in Heart*. Journal of Chromatography A, 1994. **661**(1-2): p. 181-191.
206. Kato, S., P.J. Burke, D.J. Fenick, D.J. Taatjes, V.M. Bierbaum, and T.H. Koch, *Mass spectrometric measurement of formaldehyde generated in breast cancer cells upon treatment with anthracycline antitumor drugs*. Chemical Research in Toxicology, 2000. **13**(6): p. 509-516.
207. Clermont, L.P. and M.N. Carroll, *Improved Chromotropic-Acid Determination of Formaldehyde Evolution from Wood Composites*. Forest Products Journal, 1976. **26**(8): p. 35-37.
208. Silberstein, S., *Comparison of the Chromotropic-Acid and Pararosaniline Methods for Measuring Formaldehyde Concentrations of Pressed-Wood Product Emissions*. American Industrial Hygiene Association Journal, 1990. **51**(2): p. 102-106.
209. Gryllaki-Berger, M., C. Mugny, D. Perrenoud, A. Pannatier, and E. Frenk, *A Comparative-Study of Formaldehyde Detection Using Chromotropic-Acid, Acetylacetone and Hplc in Cosmetics and Household Cleaning Products*. Contact Dermatitis, 1992. **26**(3): p. 149-154.

210. Gigante, A.C., M.A. Gotardo, J.O. Tognolli, L. Pezza, and H.R. Pezza, *Spectrophotometric determination of formaldehyde with chromotropic acid in phosphoric acid medium assisted by microwave oven*. *Microchemical Journal*, 2004. **77**(1): p. 47-51.
211. Bricker, C.E. and H.R. Johnson, *Spectrophotometric Method for Determining Formaldehyde*. *Industrial and Engineering Chemistry-Analytical Edition*, 1945. **17**(6): p. 400-402.
212. Dahlquist, I., S. Fregert, and B. Gruvberger, *Reliability of the Chromotropic-Acid Method for Qualitative Formaldehyde Determination*. *Contact Dermatitis*, 1980. **6**(5): p. 357-358.
213. Cares, J.W., *Determination of Formaldehyde by Chromotropic Acid Method in Presence of Oxides of Nitrogen*. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 1968. **29**(4): p. 405-&.
214. Strassnig, S., T. Wenzl, and E.P. Lankmayr, *Microwave-assisted derivatization of volatile carbonyl compounds with O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine*. *Journal of Chromatography A*, 2000. **891**(2): p. 267-273.
215. Allinger, N.L., M.P. Cava, D.C. de Jongh, C.R. Johnson, N.A. Lebel, and C.L. Stevens, *Organische Chemie*. 2. Auflage ed. 1980, Berlin: Walter de Gruyter.
216. Hantzsch, A., *Über die Synthese pyridinartiger Verbindungen aus Acetessigäther und Aldehydammoniak*. *Justus Liebig Annalen der Chemie*, 1882. **215**(1-7).
217. Bossert, F. and W. Vater, *Dihydropyridines, New Group of Strongly Working Coronary Therapeutics*. *Naturwissenschaften*, 1971. **58**(11): p. 578-&.
218. Goldmann, S., *Entdeckung der Calcium-Antagonisten*. *Pharmazie Unserer Zeit*, 2005. **34**(5): p. 366-373.
219. Compton, B.J. and W.C. Purdy, *The Mechanism of the Reaction of the Nash and the Sawicki Aldehyde Reagent*. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, 1980. **58**(21): p. 2207-2211.
220. Nash, T., *The Colorimetric Estimation of Formaldehyde by Means of the Hantzsch Reaction*. *Biochemical Journal*, 1953. **55**(3): p. 416-421.
221. Erikson, J.M. and H.G. Biggs, *1,4-Dihydro-3,5-Diacetyl Lutidine - Basis for Triglyceride Determination in Biological Samples*. *Journal of Chemical Education*, 1973. **50**(9): p. 631-632.
222. Kawai, S. and C. Tsutsui, *Fluorometric-Determination of Hydrogen-Peroxide with Catalase-Hantzsch Reaction System Using Methyl Acetoacetate*. *Bunseki Kagaku*, 1984. **33**(2): p. E73-E76.
223. Rietz, E.B., *The Stabilization of Small Concentrations of Formaldehyde in Aqueous-Solutions*. *Analytical Letters Part a-Chemical Analysis*, 1980. **13**(12): p. 1073-1084.
224. Tortora, G.J. and B.H. Derrickson, *Anatomie und Physiologie*. 2008, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA.
225. Fritz, K., *Demonstration of Urochrome-B in Urine*. *Therapie Der Gegenwart*, 1978. **117**(2): p. 273-&.
226. Eder, M. and P. Gedigk, *Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie*. 32 ed. 1986, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo: Springer Verlag.
227. Pschyrembel, W., *Klinisches Wörterbuch*. 259 Auflage ed. 2002, Berlin: Walther de Gruyter.
228. Morgan, H.C., *Urine Chemistry .2. Bilirubin and Urobilinogen*. *Veterinary Medicine & Small Animal Clinician*, 1967. **62**(8): p. 737-&.
229. Cu, A., *On The Fluorescence of Bilirubin*. *Journal of American Chemical Society*, 1975. **97**(9).
230. Thews, G., E. Mutschler, and P. Vaupel, *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. 3 ed. 1989, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
231. Kotal, P. and J. Fevery, *Quantitation of Urobilinogen in Feces, Urine, Bile and Serum by Direct Spectrophotometry of Zinc Complex*. *Clinica Chimica Acta*, 1991. **202**(1-2): p. 1-9.
232. Hager, C.B. and A.H. Free, *Urine Urobilinogen as a Component of Routine Urinalysis*. *American Journal of Medical Technology*, 1970. **36**(5): p. 227-&.



233. Schmidt, M., G. Frohlich, D. Schmidt, and W. Stich, *Urobilin Body Metabolism of Humans .1. New Method for Determination of Urobilin Bodies in Human Serum and Urine*. Blut, 1971. **22**(3): p. 120-&.
234. Floch, L., F. Nydegger, A. Gossauer, and C. Kratky, *Syntheses of Bile-Pigments .17. Synthesis of a Non-Racemizable Urobilin Derivative*. Helvetica Chimica Acta, 1994. **77**(2): p. 445-452.
235. Heinrich, A. and T. Benter, *in Vorbereitung*.
236. Wiberg, N., *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. 101 ed. 1995, Berlin: Walter de Gryter.
237. Karpensky, N., *Validierung der fluorimetrischen Bestimmung von Formaldehyd in Urin*, in *Fachbereich C Physikalische Chemie*. 2008, Bergische Universität: Wuppertal.

# ANHANG

**Abkürzungsverzeichnis:**

<b>Chemikalien</b>	
AAA	Acetoacetanilid
CHD	1,3 Cyclohexadion
Chromotropsäure	1,8-Dihydroxynaphtalen-3,6-di-sulfonsäure
Dansylhydrazin	1-Dimethyl-aminonaphtalin-5-sulfonylhydrazin
DDL	3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidin
Dimedon	5,5-Dimethyl-1,3-cyclohexadion
DNPH	2,4 Dinitrophenylhydrazin
J-Acid	6-Amino-1-naphtol-3-sulfonsäure
MBTH	3-Methyl-2-benzothiazol-hydrazon
MNBDH	N-Methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzo-furazan
PFBHA	o-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)-hydroxylamin
PFPH	4-Pentafluorophenylhydrazinhydrochlorid
ROS	Reactive Oxygen Species
TAAIPc	Tetrasubstituiertes Amino-aluminium-phtalocyanin
TDA	3,3,6,6-Tertamethyl-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydro-1,8-acrindion
<b>Biologische und medizinische Fachbegriffe</b>	
AMACR	A-Methylacyl Coenzym A Racemase
ATP	Adenosintriphosphat
BTA	Bladder Tumor Antigen Test
CoA	Coenzym A
DML	Dimethyllysin
DNA	Desoxyribunukleinsäure
dTMP	Desoxythymidylat
dUMP	Desoxyuridylat
EPCA	Early Prostate Cancer Antigen
FAD	Flavinadenindinucleotid
GOLM1	Golgi Membran Protein
GSH	Gluthation
GSTPI	Gluthadion - S - Transferase
hK2	Humanes Kallikrein 2
HMA	Hydroxymethylarginin
MML	Monomethyllysin
MMP9	Metalloproteinase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NADH	Nikotinamidadeninnukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NMP22	Nuklear Matrix Protein 22
PSA	Prostataspezifisches Antigen
PSMA	Prostata Spezifisches Membran Antigen
SAH	S-Adenosyl-L-homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
TERT	Telomerase reverse Transcriptase
THF	Tetrahydrofolat
TML	Trimethyllysin
TNM	Tumor Node Metastasis

uPAR	Urokinase-Typ Plasminoge Aktivator Rezeptor
<b>Methoden und Techniken</b>	
APCI-MS	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Mass Spectrometry
DC	Dünnschichtchromatographie
ECD	Eletron Capture Dissociation
ESI-MS	ElektronenSpray Ionisation Massenspektrometrie
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GC-NCI-MS	Gaschromatographie Negative Chemische Ionisations Massenspektrometrie
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
LC	Liquidchromatography
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assistent-Laser-Desorption-Ionization-Mass Spectrometry
MS	Massenspektrometrie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
NPD	Nitrogen Phosphorus Detection
OPLC	Over Pressure Liquid Chromatography
SELDI-TOF-MS	Surface-Enhanced-Laser-Desorption-Ionization- Masspectrometry
SIFT-MS	Selected Ion Flow Tube Masspectrometry

**Abbildungsverzeichnis:**

Abbildung 2-1: Vergleich Peroxisom-Mitochondrium.....	10
Abbildung 2-2: Mechanismus der peroxisomalen $\beta$ -Oxidation langkettiger Fettsäuren.....	11
Abbildung 2-3: Methylierung von Arginin und Lysin .....	13
Abbildung 2-4: Produkte der Lipidperoxidation ungesättigter Fettsäuren .....	14
Abbildung 2-5: Abbau von Formaldehyd zu Formiat.....	15
Abbildung 2-6: Struktur Tetrahydrofolat .....	16
Abbildung 2-7: Umwandlungen der Ein-Kohlenstoff-Einheiten am Tetrahydrofolat.....	16
Abbildung 2-8: Tetrahydrofolatstoffwechsel .....	17
Abbildung 2-9: Schematische Darstellung des Ein Kohlenstoffzykluses .....	18
Abbildung 2-10: Metabolische Wege von SAM [42] .....	19
Abbildung 2-11: Demethylierung von SAM [42].....	20
Abbildung 2-12: SAM-Metabolismus .....	21
Abbildung 2-13: Reaktion von Formaldehyd mit Adenin .....	25
Abbildung 2-14: direkte, nicht enzymatische und enzymatische Methylierung .....	26
Abbildung 2-15: Mechanismus Chromotropsäurenachweis.....	33
Abbildung 2-16: Reaktion von Formaldehyd mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu .....	35
Abbildung 2-17: Reaktion von Formaldehyd mit Pentafluorphenylhydrazin zum Hydrazone .....	35
Abbildung 2-18: Reaktion von Formaldehyd mit PFBHA zum Oxim.....	36
Abbildung 2-19: Reaktion von MNBDH zu MNBDA.....	37
Abbildung 2-20: Reaktion von Formaldehyd mit MNBDH .....	37
Abbildung 2-21: Reaktion von Formaldehyd mit 3-Methyl-2-benzothialon-hydrazone.....	38
Abbildung 2-22: Reaktion von Formaldehyd mit Cysteamin.....	39
Abbildung 2-23: Reaktion von Formaldehyd mit Dopamin zu Tetrahydroisochinolin .....	39
Abbildung 2-24: Reaktion von Formaldehyd mit DNSH .....	40
Abbildung 2-25: Bildung des Carbinolamin.....	41
Abbildung 2-26: Bildung der Alkylsulfonsäure .....	41

---

Abbildung 2-27: Reaktionsmechanismus unter Verwendung von 2,4 Pentadion .....	43
Abbildung 2-28:mögliche Reaktionsmechanismen mit Dimedon .....	46
Abbildung 2-29: Bildung des Anions.....	47
Abbildung 2-30: Reaktion von Formaldehyd mit CHD .....	48
Abbildung 2-31: Bildung des Anions.....	48
Abbildung 2-32: Keto-Enol-Tautomerie von CHD .....	48
Abbildung 2-33:Hantzsch-Reaktion mit AAA.....	49
Abbildung 2-34: Bilirubinsynthese.....	57
Abbildung 2-35: Absorptions- und Emissionsspektrum von Bilirubin [229].....	58
Abbildung 2-36: Urobilinogen .....	58
Abbildung 2-37: Urobilin .....	59
Abbildung 3-1: Schematische Zeichnung des Gerätes [235].....	62
Abbildung 3-2: Schnittdarstellung der Anregungseinheit .....	63
Abbildung 3-3: Schnittdarstellung der Anregungseinheit .....	63
Abbildung 3-4: Schnittdarstellung der Anregungseinheit .....	64
Abbildung 3-5: Schnittdarstellung der Anregungseinheit .....	64
Abbildung 4-1: Gerät Stand Diplomarbeit [10].....	65
Abbildung 4-2: Gerät 2007 .....	66
Abbildung 4-3: Anregungszelle .....	66
Abbildung 4-4 Vergleich Reaktionseinheit alt (links) und neu (rechts) .....	67
Abbildung 4-5: Temperaturregler.....	67
Abbildung 4-6: T-Stücke.....	68
Abbildung 4-7: Excelausgabe des Spektrums.....	69
Abbildung 4-8: Excel-Untergrundrauschen-Korrektur .....	70
Abbildung 4-9: Abbildung einer kompletten Messung.....	71
Abbildung 4-10: Signalintensität der LED gegen die Zeit.....	72
Abbildung 4-11: LEDs und Halterung mit Thermoelement PT100.....	73
Abbildung 4-12: Temperatur der LED in Abhängigkeit von der Betriebsdauer .....	73

---

Abbildung 4-13: Skelett Anregungseinheit .....	74
Abbildung 4-14: Anregungseinheit geöffnet.....	74
Abbildung 4-15: Anregungseinheit komplett geschlossen .....	75
Abbildung 4-16: Temperaturentwicklung der LEDs und des Metallgehäuses gekühlt und ungekühlt.....	75
Abbildung 4-17: Auswertungsvorlage.....	76
Abbildung 4-18: Auswertungsvorlage.....	77
Abbildung 4-19: Überprüfung der Messqualität.....	78
Abbildung 4-20: Auswertungsvorlage.....	79
Abbildung 4-21: Bestimmung des linearen Bereiches.....	81
Abbildung 4-22: Linearitätsbereich .....	82
Abbildung 4-23: Spektren einer Konzentration.....	83
Abbildung 4-24: durch Gasblasen verändertes Spektrum .....	83
Abbildung 4-25: Aufstocktest .....	84
Abbildung 4-26: komplette Messdurchlauf.....	84
Abbildung 4-27: Linearer Messbereich.....	85
Abbildung 4-28: komplette Messdurchlauf.....	86
Abbildung 4-29: Aufstockverfahren komplett.....	86
Abbildung 4-30: Aufstockverfahren nach Abzug des Urinwertes .....	87
Abbildung 4-31: Standardaddition.....	88
Abbildung 4-32: Auswertungsblatt Urin .....	89
Abbildung 4-33: T-Stück .....	90
Abbildung 4-34: Beispielhaftes Urinauswertungsblatt.....	91
Abbildung 4-35: Niedriger Formaldehydgehalt.....	93
Abbildung 4-36: Mittlerer Formaldehydgehalt .....	94
Abbildung 4-37: Hoher Formaldehydgehalt.....	95
Abbildung 4-38: Urinauswertungsblatt.....	97
Abbildung 4-39: Differenz korrigiert zu unkorrigiert absolut.....	98

---

Abbildung 4-40: Differenz korrigierter und unkorrigierter Urinwert prozentual .....	98
Abbildung 4-41: Abschirmung vor Urinspritzern .....	101
Abbildung 4-42: Erweiterter Aufbau .....	102
Abbildung 4-43: Urinauswertungsblatt.....	105
Abbildung 4-44: Spektrum des Nash-Reagenzes .....	108
Abbildung 4-45: Schwächung der Eigenfluoreszenz von Urin.....	109
Abbildung 4-46: Messergebnisse des Probandenkreis „Blasenentzündung“ .....	110
Abbildung 4-47: Messergebnisse des Probandenkreises „gesunder Menschen“ .....	111
Abbildung 4-48: Streuung der Werte für den Formaldehydgehalt in menschlichem Urin ...	112



## ***Einwilligungserklärung***

### Einwilligung zur Verwendung meiner Urinprobe

Hiermit erkläre ich, dass ich dem Lehrstuhlinhaber der Physikalischen Chemie, sowie einer Doktorandin (Anne Heinrich) dieses Arbeitskreises freiwillig eine Urinprobe zur Verfügung stelle. Im Rahmen der Messungen wird der Formaldehydgehalt in der Urinprobe bestimmt und die daraus erhaltenen Messdaten wissenschaftlich publiziert. Für diese Publikation werden die Messdaten Personenkreisen zugeordnet, so dass ein Rückschluss auf den Proband nicht mehr möglich ist.

Nach den Messungen der Probe wird diese vernichtet.

Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass die Probe nach der Bestimmung des Formaldehydgehaltes vernichtet wird und ausschließlich der Formaldehydgehalt der Probe bestimmt wird.

Für die Zuordnung in einen Probandenkreis mache ich die folgenden Angaben.

Ich bin

männlich

weiblich

20 – 40 Jahre alt

41 – 65 Jahre alt

(Zutreffendes bitte ankreuzen)

Alle an der Durchführung der Messungen oben genannten beteiligten Personen sind über diese Schritte informiert worden und unterliegen der Schweigepflicht.

Diese Erklärung kann ich jederzeit bis zur Vernichtung der Probe bei dem Lehrstuhlinhaber widerrufen.

Unterschrift:

Unterschrift:

\_\_\_\_\_  
Proband

\_\_\_\_\_  
Lehrstuhlinhaber der Phys. Chemie

***Makro zum Öffnen der ProSpec Dateien mit Excel***

```
Sub ÖffnenVonProspecDateienInExcel()
```

```
,
```

```
' Makro3 Makro
```

```
' Makro am 09.10.2007 von Universität Wuppertal aufgezeichnet
```

```
Dim Dateipfad As String
```

```
Dateipfad = InputBox("Bitte geben Sie einen Dateipfad ein.", _
```

```
"Auswahl Dateipfad", _
```

```
"E:\Promotion\Promotion\Spektren\--\--.ProcSpec")
```

```
Workbooks.OpenText Filename:= _
```

```
    Dateipfad _
```

```
    , Origin:=xlMSDOS, StartRow:=1, DataType:=xlDelimited, TextQualifier:= _
```

```
    xlDoubleQuote, ConsecutiveDelimiter:=False, Tab:=True, Semicolon:=False, _
```

```
    Comma:=False, Space:=False, Other:=False, FieldInfo:=Array(1, 1), _
```

```
    TrailingMinusNumbers:=True
```

```
Dim Speicherort As String
```

```
Speicherort = InputBox("Bitte geben Sie einen Speicherort ein.", _
```

```
"Auswahl Speicherort", _
```

```
"E:\Promotion\Promotion\Spektren\--\--.xls")
```

```
ActiveWorkbook.SaveAs Filename:= _
```

```
    Speicherort _
```

```
    , FileFormat:=xlNormal, Password:="", WriteResPassword:="",
```

```
ReadOnlyRecommended:=False _
```

```
    , CreateBackup:=False
```

```
End Sub
```

***Makro zum Einfügen von Exceldaten aus einem noch geschlossenen******Datenblatt in ein schon geöffnetes Datenblatt unter Nachfrage des******Speicherortes***

Sub EinfügenVonSpektrenAusExcelAnEinenAngefragtenPlatzBeiGeöffnetemDatenblatt()

```
Dim Dateipfad As String
Dateipfad = InputBox("Bitte geben Sie einen Dateipfad ein.", _
"Auswahl Dateipfad", _
"E:\Promotion\Promotion\Spektren\--\--.xls")
Workbooks.OpenText Filename:= _
Dateipfad _
, Origin:=xlWindows
Range("A18:B18").Select
Range(Selection, ActiveCell.SpecialCells(xlLastCell)).Select
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("Gesamt").Activate
Sheets("Daten").Select
Dim Ort As String
Ort = InputBox("Bitte geben sie die Speicherposition ein.", _
"Auswahl Ort", _
"--")
Sheets("Daten").Select
Range(Ort).Select
ActiveSheet.Paste

End Sub
```

**Auswertungsblatt Urinmessung**

Urinmessung

Datum:

Person:

Bemerkung:

	-1-	-2-	-3-	-4-	Mittelwert	Fehler (abs)	Fehler (proz.)
1,7							
1,7 - Urin							
1,7 Urin							
2,4							
2,4 - Urin							
2,4 Urin							
3,1							
3,1 - Urin							
3,1 Urin							
3,5							
3,5 - Urin							
3,5 Urin							
7,0							
7,0 - Urin							
7,0 Urin							
Mittelwert Urin							
Fehler (abs)							
Fehler (proz)							

X: Intensität - Urinuntergrund  
 $X = 0$   
 Achsenabschnitt:  $X + \text{Urinkonzentration}$

X - Urin: Intensität - Urin  
 $X = 0$   
 Achsenabschnitt: X  
 Überprüfung der Aufstockung

X Urin: Intensität - Urinuntergrund  
 Urin = 0  
 Achsenabschnitt: Urinkonzentration

## **Makro für die komplett durchlaufende Auswertung**

Sub EinfügenAllesComputerZuhause()

' Makro9 Makro

' Makro am 27.07.2009 von Anne Heinrich geändert

```
'  
    ChDir "C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\Vorlagen"  
    Workbooks.Open Filename:= _  
        "C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\Vorlagen\Urin Verdünnungsreihe  
1,7 - 21 mg HCHO.xls"  
    ChDir "C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--"  
    ActiveWorkbook.SaveAs Filename:= _  
        "C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- Gesamt.xls", _  
        FileFormat:=xlNormal, Password:="", WriteResPassword:="", _  
        ReadOnlyRecommended:=False, CreateBackup:=False  
    Workbooks.Open Filename:= _  
        "C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- Wasser 1.xls"  
    Range("A18:B3665").Select  
    Selection.Copy  
    Windows("-- Gesamt.xls").Activate  
    Sheets("Daten").Select  
    Range("A4").Select  
    ActiveSheet.Paste  
    Workbooks.Open Filename:= _  
        "C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- Wasser 2.xls"  
    Range("A18:B3665").Select  
    Selection.Copy  
    Windows("-- Gesamt.xls").Activate  
    Sheets("Daten").Select  
    Range("E4").Select  
    ActiveSheet.Paste  
    Workbooks.Open Filename:= _  
        "C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- Wasser 3.xls"  
    Range("A18:B3665").Select  
    Selection.Copy  
    Windows("-- Gesamt.xls").Activate  
    Sheets("Daten").Select  
    Range("I4").Select  
    ActiveSheet.Paste  
    Workbooks.Open Filename:= _  
        "C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- Grund 1.xls"  
    Range("A18:B3665").Select  
    Selection.Copy  
    Windows("-- Gesamt.xls").Activate  
    Sheets("Daten").Select  
    Range("N4").Select  
    ActiveSheet.Paste  
    Workbooks.Open Filename:= _  
        "C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- Grund 2.xls"  
    Range("A18:B3665").Select  
    Selection.Copy  
    Windows("-- Gesamt.xls").Activate  
    Sheets("Daten").Select
```

```
Range("R4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
    "C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- Grund 3.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("V4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
    "C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- Urin 1.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("AA4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
    "C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- Urin 2.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("AE4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
    "C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- Urin 3.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("AI4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
    "C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 1,7 1.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("AO4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
    "C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 1,7 2.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("AS4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
    "C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 1,7 3.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
```

```
Range("AW4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 2,4 1.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("BC4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 2,4 2.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("BG4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 2,4 3.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("BK4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 3,1 1.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("BQ4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 3,1 2.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("BU4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 3,1 3.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("BY4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 3,5 1.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
```

```
Range("CE4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 3,5 2.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("CI4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 3,5 3.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("CM4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 7 1.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("DA4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 7 2.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("DE4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 7 3.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("DI4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 10 1.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("DO4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 10 2.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
```



```
Range("DS4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 10 3.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("DW4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 14 1.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("EB4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 14 2.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("EF4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 14 3.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("EJ4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 17 1.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("EO4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 17 2.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("ES4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
"C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 17 3.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
```

```
Range("EW4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
    "C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 21 1.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("FB4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
    "C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 21 2.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("FF4").Select
ActiveSheet.Paste
Workbooks.Open Filename:= _
    "C:\Users\Anne\Documents\Promotion\Promotion\Spektren\--\-- 21 3.xls"
Range("A18:B3665").Select
Selection.Copy
Windows("-- Gesamt.xls").Activate
Sheets("Daten").Select
Range("FJ4").Select
ActiveSheet.Paste
```

End Sub

			Datum	Gesamt (Werte bis 10 mg/l)	1,7	2,4	3	3	4,	,9	,6	7	1
							,1	,5	2	,9	,6	7	0
neue Glasfaser			05- 25-08	1132,9	2 008,1		1 134					9 46,61	8 20,91
			0 5-27- 08 -2-	918,28	8 81,15							9 03,34	7 02,67
			0 5-27- 09 -3-	905,32	1 070,6							7 97,38	7 54,28
			0 6-03- 08 -1-	940,43	8 65,81	1 006,5	9 24,22					7 95,63	7 02,12
			0 6-03- 08 -2-	906,52	1 085,1 8	9 77,58	8 65,59					7 49,08	7 40,91
			0	875,58	8	9	8					7	6

			6-03-08 -3-		41,62		13,22		55,87						31,53		65,81	
			0 6-03-08 -4-	872,12	9 44,02		9 31,02		8 36,6						7 77,9			
			0 6-04-08 -1-	891,59	1 025,1 2		1 049,9 9		9 07,64		8 47,29				8 33,75		7 69,84	
			0 6-04-08 -2-	912,11	8 98,12		1 037,4 8		9 73,93		8 63,97				7 58,24		7 32,47	
			0 6-10-08 -1-	806,42	1 565,7 2				7 82,25		7 77,68				7 43,51		5 68,04	
			0 6-10-08 -2-	794,58	9 08,05		1 011,1 1		8 00,8		7 46,47				7 06,38		6 84,19	
			0 6-10-	822,48	9 73,55		1 237,8		8 48,32		7 62,83				6 86,69		7 16,81	

			08-3-				6													
			0	821,68	9		8		7		8					7		6		
			6-10-		08,35		67,94		92,59		06,37					43,19		21,8		
			08-4-																	
			0	865,76	1		1		8		8					8		7		
			6-11-		001,0		100,1		81,26		16,56					00,55		53,8		
			08-1-		4		5													
			0	888,84	9		9		9		8					7		7		
			6-11-		31,71		43,58		42,52		54,29					40,1		12,98		
			08-2-																	
			0	885,02	9		8		9		8					7		6		
			6-11-		35,67		46,84		31,4		54,8					37,16		94,3		
			08-3-																	
			0	873,57	1		1		4		5		95							
			6-17-		073,3		124		80,26		91,38		9,5		076		096			
			08-1-		9										,76		,15			
			0	884,54	1		9		4		7		95							
			6-17-		022,8		35,2		67,32		03,79		7,66		99,		056			
			08-2-		9										29		,05			

			0 6-17- 08 -3-	871,63	9		1		6	8	10							
					72,1		14,07		38,77	34,09	45,51	56,49	77,94					
			0 6-18- 08 -1-	816,67	9	9		4		6	94	44,18	32,84					
					53,08		74,68		92,91	74,22	0,96							
			0 6-18- 08 -2-	834,66	9	8		6		8	86	21,69	77,04					
					98,46		44,93		20,63	17,61	3,52							
			0 6-18- 08 -3-	845,01	9	8		5		7	94	82,53	067,68					
					56,27		80,49		63,02	90,36	9,65							
					<b>m</b>	<b>reine</b>	<b>m</b>	<b>reine</b>	<b>m</b>	<b>reine</b>	<b>m</b>	<b>reine</b>			<b>m</b>	<b>reine</b>	<b>m</b>	<b>reine</b>
					<b>it</b>	<b>Aufstocklö</b>	<b>it</b>	<b>Aufstocklö</b>	<b>it</b>	<b>Aufstocklö</b>	<b>it</b>	<b>Aufstocklös</b>			<b>it</b>	<b>Aufstocklö</b>	<b>it</b>	<b>Aufstocklö</b>
					<b>Urin</b>	<b>sungen</b>	<b>Urin</b>	<b>sungen</b>	<b>Urin</b>	<b>sungen</b>	<b>Urin</b>	<b>ungen</b>			<b>Urin</b>	<b>sungen</b>	<b>Urin</b>	<b>sungen</b>
					<b>wert</b>		<b>wert</b>		<b>wert</b>	<b>wert</b>				<b>wert</b>		<b>wert</b>		
Urinproben			0 6-25- 08 -1-	406,7	4	4	417,8	4	390	4	411,4	4			3	370,1		
300er Faser					10,1	3	06,78		09,4	8	06,76	06,56			85,24	8		

Steigung mit Urin als Nullwert	0	384,6	3	428,0	3	460,9	3	400,3	3					3			
	6-25- 08 -2-		90,34	1	98,3	3	99,58	9	81,2	67, 88				81,08			
	0	411,22	4	430,9	4	431,0	4	402,2	4					3	379,5		
	6-25- 08 -3-		11,78	8	13,27	4	07,42		10,46	10, 24				88,99	8		
	0	425,14	4	463,6	4	461,1	3	414,2						3	446,0		
	6-27- 08 -1-		18,28	5	44,47	8	11,69	3						80,16	2		
	0	380,99	3	345,5	4	426,4			3					3	469,2		
	6-27- 08 -2-		78,93	7	11,47	6			81,74	73, 42				90,5	5		
	0	333,74	3	358,1	3	351,5	3	307,0	3					3	326,6		
	7-01- 08 -1-		44,55	4	48,47	4	25,53	1	30,83	25, 3				28,31	3		
	0	336,12	3	351,2	3	360,6	3	343,1	3					3	326,3		
	7-01- 08 -2-		29,33	3	31,87	1	38,18	6	34,2	33, 31				05,21	3		
	0	358,93	3	328,8	3	358,8	3	374,1	3					3	321,7		
	7-01-									56,							

			08 -3-		43,59	9	50	7	62,32	3	57,47	72				27,09	8		
			0	329,29	3	367,9	3	310,8	3	339,2	3					3	315,1		
			7-01-		55,54	8	45,74	2	42,87	8	36,94	34,				35,4	4		
			08 -4-									29							
			0	386,53	3	401,8	3	468,6	3	386,2	3					3	366,6		
			7-02-		79,07	1	87,01	7	86,88		83,54	79,				71,14			
			08 -1-									56							
			0	423,08	4	462,5	4	465,9	4	424,1	4					3	357,9		
			7-02-		35,73	1	41,86	4	31,84	2	21,2	09,				88,02	8		
			08 -2-									07							
			0	436,43	4	434,7	4	500,9	4	455,4	4					4	421,3		
			7-08-		27,43	9	41,59	7	48,33	9	32,79	21,				31,2	3		
			08 -1-									43							
			0	433,69	4	459,5	4	436,3	4	446,9	4					4	407,1		
			7-08-		28,24	7	30,77	1	39,16	9	31,06	27,				09,26	2		
			08 -2-									61							
			0	478,03	4	463,0	4	459,9	4	494,9	4					4	453,0		
			7-09-		75,32	4	79,26	2	86,74	8	77,15	71,				57,31	1		
			08 -1-									78							



			0 7-09- 08 -2-	469,33	4 78,54	8 512,0	4 79,25	6 531,5	4 63,99	3 449,1	4 68,83	67, 42				4 54,71	458,4		
			0 7-15- 08 -1-	357,27	3 58,52	8 345,7	3 70,42	5 387,4	3 75,92	3 383,1	3 54,97	39, 62				3 33,31	326,5		
			0 7-15- 08 -2-	315,78	3 52,57	9 355,6	3 39,12	3 226,3	3 08,33	5 283,2	3 20,12	19, 48				3 07,54	291,2		
			0 7-15- 08 -3-	307,3	3 21,48	6 292,9	3 09,8	7 218,6	2 85,63	5 265,5	3 12,52	24, 29				2 98,39	323,5		
			0 7-16- 08 -1-	458,21	4 60,24	4 448,8	4 63,17	6 436,6	4 63,41	1 465,5	4 57,98	53, 09				4 44,4	428,3		
			0 7-16- 08 -2-	434,93	4 30,27	7 414,3	4 31,69	4 390,4	4 37,19	4 443	4 34,83	34, 01				4 16,86	410		
			0 7-16-	421,82	4	402,5	4	428,9			4	21,				4	400,2		

			08 -3-		21,04	2	26,67	7			22,8	98				11,78	9		
			0	313,81	2	287,9	3	318,1	3	314,2	3					2	287,2		
			7-22-		94,35	3	02,3		07,95	6	12,16	14,				98,26	9		
			08 -1-									76							
			0	360,37	3	294,2	3	311,2	3	374,5	3					3	344,5		
			7-22-		43,31	1	50,1	4	61,51	1	60,37	60,				47,13	4		
			08 -2-									97							
			0	354,13	3	296,4	3	355,5	3	362,7	3					3	317,4		
			7-22-		35,28	3	44,8	2	52,43	3	53,47	53,				42,38	9		
			08 -3-									95							
		Urinproben mit T-Stücken	0	161,1	1	150,1	1	156,2			1					1	174,4		
			8-05-		52,55	4	55,03	7			61,27	66,				70,17	3		
			08 -1-									3							
			0		8	30,97	7	3,55	1	-30,31	5								
			8-05-		1,97		3,34		7,23		3,77	0,7							
			08 -2-									2							
			0	182,03	1	165,6	1	180,7			1					1	206,3		
			8-08-		77,65	7	79,31				82,73	85,				86,17	2		
			08 -1-									1							

			0 8-11- 08 -1-	277,92	2 49,32	4 217,0	2 73,85	2 286,9	2 78,18	287,3						1 86,91	148,9 4		
neue Umsteckzeiten			0 8-12- 08 -1-	348,68	3 67,5	3 376,6	3 63,92	3 362,1	3 48,24	338,3						3 41,75	316,0 3		
			0 8-18- 08 -1-	298,33	1 52,6	2 158,1	2 00,89	2 447	2 77,67	2 345,9	2 83,08	03, 74				2 77,59	290,2 9		
			0 8-18- 08 -2-	296,99	2 90,76	4 268,7	2 97,83	2 319,7	2 97,19	2 297,5	2 99,12	98, 57				2 91,33	294,9 2		
			0 8-19- 08 -1-	350,28	3 39,38	3 346,9	3 46,07	3 360,5	3 58,62	3 370,6	3 47,66	42, 77				3 30,3	324,0 7		
			0 8-19- 08 -2-	340,22	3 33,36	7 330,1	3 38,07	3 320,9	3 45,95	3 354,7	3 38,73	34, 84				3 26,28	316,8 3		
			0 8-20-	287,54	2	281,2	2	320,6	2	294,3	2	82,				2	277,5		



			0	210,63	2	327,4	2	212,3	2	215,9	2				1	178,2		
			8-26-08-2-		39,76	9	37,41	4	25,62	9	11,84	98,9			87,42	3		
			0	275,03	2	271,7	2	326,5	2	277,4	2				2	289,4		
			8-27-08-1-		56,17	2	68,23	6	72,68		71,72	69,87			69,57	4		
			0	286,62	2	257,8	2	317,0	2	278,3	2				2	290,1		
			8-27-08-2-		63,41	6	77,38	9	76,77	8	84,19	85,39			80,42	4		
Einfriermesungen			1	273,57	3	333,0	2	186,8	2	277,7	2				2	213,1		
			2-16-08-1-		16,07	3	91,04	4	85,14	7	77,95	76,79			66,43	4		
			1	276,73	3	338,3	2	185,8	2	285,7	2				2	207,2		
			2-16-08-2-		20,85	3	96,13	4	91,58	1	80,88	77,61			69,16	3		
			1	269,88	3	308,8	3	267,4	2	270,5	2				2	280,0		
			2-16-08-3-		21,55	7	11,89	2	90,03	4	73,72	57,63			79,21	6		
			1	277,75	3	342,0	2	264,9	2	282,0	2				2	271,0		
			2-16-								69,							

			08 -4-		30,1	8	86,96	4	79,59	9	69,67	23				71,68	6		
	Blasenentzün- dung		0 1-07- 09 -1-	227,15	2 05,31	302,3 7	1 98,45	230,0 5	2 14,54	225,6	2 23,01					2 20,94	235,3 8		
			0 1-07- 09 -2-	226,09	2 04,42	283,4 1	1 90,86	156,0 3	2 29,43	260,5	2 22,37					1 66,38	166,3 8	2 25,89	268,3 8
	12-16-08 aufgetaut		0 1-13- 09 -1-	285,37	3 40,57	340,8 6	2 97,18	273,9 5	2 98,7	281,9	2 91,29					2 84,83	284,8 4	2 90,29	290,8 2
			0 1-13- 09 -2-	284,15	3 36,64	340,1 4	2 98,93	278,9 8	3 00,13	285,4	2 89,15					2 82,6	272,4 7	2 77,4	277,5 6
			0 1-13- 09 -3-	270,88	3 32,8	285,6 2	3 19,6	218,9 7	3 04,89	292,7	2 76,34					2 95,99	301,4 1	2 88,76	337,8 3
			0 1-13- 09 -4-	278,62	3 30,22	337,0 9	3 14,5	270,3	2 89,7	266,2	2 83,04					2 83,04	274,1 3	2 84,09	285,3 6

	Blasentzündung	0 1-20- 09 -1-	298,04	2 97,85	4 300,4	2 98,96	2 313,8	2 99,37	2 299,3	2 97,71	96, 66				3 01,51	2 305,9	2 95,15	284,1
	vom 11.01.09 aufgetaut	0 1-20- 09 -2-	309,66	3 07,92	3 318,6	3 05,41	3 289,0	3 24,51	3 340,8	3 08,24	04, 27				2 92,43	2 257,6	2 98,03	295,8
	fris ch	0 1-26- 09 -1-	355,61	3 99,69	3 410,3	3 97,11	3 428,6	3 59,43	3 325,2	3 58,29	46, 05				3 46,39	3 324,4	3 29,26	295,7
		0 1-26- 09 -2-	356,18	3 84,27	3 400,3	3 81,02	3 406,4	3 55,88	3 332,5	3 57,9	52, 07				3 55,49	3 351,3	3 55,48	335,6
	01-26-09 aufgetaut	0 1-26- 09 -3-	347,66	3 78,78	3 313,9	3 93,35	3 414,9	3 81,74	3 374,5	3 81,23	57, 41				3 51,71	3 329,1	3 39,23	310,9
		0 1-26- 09 -4-	353,82	3 88,84	3 398,6	3 88,67	3 400,0	3 55,94	3 334,4	3 56,73	51, 31				3 58,26	2 361,8	2 75,68	286,8
	akute Blasentzündung	0 1-27-	286,11	2	268,7	2	302,5	2	286,0	2	85,				2	253,7		

	g	09 -1-		90,85	8	99,18	3	87,22	5	87,21	17				86,1	7		
		0	305,02	3	319,5	3	305	3	292,0	3					3	306,1		
		1-27-		14,94	2	07,32		06,17	9	05,48	01,				06,58	8		
		09 -2-									02							
	01-26-09	0	358,45	4	364,2	4	403,5	3	370,5	3					3	359,0	3	339,3
	aufgetaut	2-04-		07,69		12,43	2	89,05	5	71,35	59,				74,14	6	58,49	2
		09 -1-									81							
		0	362,85	4	447,9	4	339,5	3	392,2	3					3	389,3	3	348,9
		2-04-		22,44	2	01,66	1	95,98	1	90,98	89,				91,26	3	55,46	5
		09 -2-									77							
	fris	0	342,5	3	318,6	3	398,5	3	317,1	3					3	321,7	3	290,3
	ch	2-10-		54	8	55,57	7	35,74	8	45,45	45,				33,6	4	19,19	6
		09 -1-									77							
		0	337,1	3	388,7	3	431,8	3	352,7	3					3	348,0	3	330,1
		2-10-		86,25	5	81,67	6	65,36	5	54,16	45,				51,04	4	40,59	6
		09 -2-									58							
	02-10-09	0	362,3	3	399,5	3	448,8	3	353,8	3					3	343,0	3	303,9
	aufgetaut	2-10-		95,52	5	99,48	2	65,14	1	64,07	52,				56,04	1	35,25	
		09 -3-									72							







			09 -4-		62,67	4		62,52	7	55,58	7								
			0	279,59	3	321,8	3	294,1	2	286,9	2					2	254,3	2	245,8
			2-24- 09 -1-		29,82	9		20,59	6	96,47	9	81,9	64, 46			84,69	4	95,23	1
			0	219,83	2	254,0	2	268,2	2	233,2	2					2	136,5	1	70,31
			2-24- 09 -2-		96,74	4		95,64	6	61,64	6	62,31	29, 29			02,04	8	72,86	
	02-18-09		0	318,52	3	325,8	3	380,4	3	330,6	3					3	312,1	3	301,1
	aufgetaut		2-25- 09 -1-		47,01	2		54,08	5	41,08	8	41,07	23, 18			23,69	8	15,83	1
			0	331,82	3	359,4	3	324,9	3	336,2	3					3	316,0		
			2-25- 09 -2-		59,56	2		59,39	2	41,42	4	34,57	30, 93			34,56	1		
	neue T- Stücke		0	254,08	2	238,8	2	297,5	2	279,4	2					2	276,6		
			3-02- 09 -1-		72,06	6		72,77	6	76,93		57,83	45, 04			61,69	3		
			0	295,63	2	265,2	2	315,3	3	324,6	2					2	257,8		
			3-02- 09 -2-		82,09	2		89,29	5	07,94	1	93,71	88, 97			93,24	3		

	03-02-09	0	286,11	3	318,7	3	287,3	2	261,7	2				2	311,6	2	292,3
	aufgetaut	3-02-09 -3-		05,13	9	05,13		78,76		88,2	89,31			95,2		92,6	4
		0	266,1	2	305,0	2	212,7	2	250,3	2				2	271,2	2	260,9
		3-02-09 -4-		88,31	1	78,76	8	63,26	5	68,09	67,6			68,28	2	68,01	1
		0	374,35	3	351,0	3	338,5	3	393,2	3				3	356,3	3	370,6
		3-03-09 -1-		95,3	7	90,38	1	91,6	3	91,6	95,47			73,27	4	74,25	4
		0	361,9	3	299,5	3	362,1	3	358,9	3				3	355,5	3	355,2
		3-03-09 -2-		37,99	8	54,77	8	54,93	9	60,7	61,77			56,88	7	58,24	
	03-03-09	0	197,02	1	206,5	1	225,4	1	204,5	1				1	187,1	2	215,7
	aufgetaut	3-03-09 -3-		90,41	9	91,42	7	99,10	6	95,64	96,18			93,1	9	00,11	8
		0	192,8	1	246,4	1	170,9	1	183,7	1				1	188,8	1	130,7
		3-03-09 -4-		89,36		80,8	9	83,24	2	91,69	00,23			87,74	4	72,65	5
	03-02-09	0	185,27	1	154,2	1	189,2	1	176,5	1				1	205	1	185,9
		3-04-									85,						

	aufgetaut	09 -1-		92,15	4	85,41		79,5		85,87	72				91,8		88,64	2
		0	185,14	1	191,7	1	181,1	1	179,5	1					1	194,5		
		3-04-		84,1	7	81,9	7	81,81	6	83,44	77,				85,5			
		09 -2-									02							
	scan to av von 30 auf 15	0	424,43	4	486,2	4	395,9	4	430,9	4					4	406,4	4	405,7
		3-05-		59,35	1	52,37	6	40,45	6	25,08	11,				22,83	9	18,82	6
		09 -1-									66							
	Fluß 15 auf 10	0	438,06	4	510,0	4	441,8	4	409,9	4					4	456,4	4	428,3
		3-05-		73,52	7	61,13	7	34,77	2	40,63	38,				41,82	4	33,77	5
		09 -2-									79							
	03-05-09 aufgetaut	0	413,56	4	440,4	4	475,9	4	403,1	4					4	403,0	4	367,5
		3-05-		41,46	6	36,16		21,85	7	15,04	04,				16,97	6	06,72	7
		09 -3-									58							
		0	419,44	4	469,6	4	494,8	4	394,8	4					4	421,8	4	397,2
		3-05-		65,06	2	56,46	7	24,29	1	21,54	09,				24,31	8	18,97	2
		09 -4-									93							
	03-05-09 aufgetaut	0	440,67	4	492,6	4	429,8	4	460,6	4					4	431,2	4	457,2
		3-09-		60,91	2	47,93	1	52,81	6	51,9	44,				40,37	7	45,02	2
		09 -1-									28							

			0	405,91	4	429,5	4	315,8	4	412,1	4				4	410,6	3	369,2
			3-09-09 -2-		44,28	3	29,11	2	19,62	2	20,14	19,37			13,45	4	99,42	5
	03-03-09		0	527,61	5	481,2	5	604,8	5	565,3	5				5	495,2	5	538,0
	aufgetaut		3-12-09 -1-		39,17	9	59,65	2	60,88	1	59,86	43,82			24,78		26,72	6
			0	476,97	5	532,9	5	390,1	5	497,7	5				4	468,2	4	474,1
			3-12-09 -2-		29,14	4	11,65	8	03,92	5	04,48	06,87			83,01	1	79,03	5
	Proben		0	375,19	3	394,2	3	385,4	3	410,3	3				3	347,1	3	370,9
	Jarek		3-30-09 -1-		78,58	3	83,67	2	84,07	8	75,52	80,23			73,04	2	71,18	4
(			0	375,24	3	334,4	3	368,8	3	361,1	3				3	358,3	3	355,6
zentrifugiert			3-30-09 -2-		41	6	45,43	5	53,98	6	56,16	59,65			56,09	4	55,82	3
)																		
			0	509,09	4	488,3	4	500,3	5	538,4	5				4	495,3		
			4-15-09 -1-		53	6	62,82		02,91	3	02,78	13,75			99,81	3		



			0 4-27- 09 -1-	371,53	5 00,08	558,9	4 98,08	366,6 9	3 78,88	349,3 5	3 82,99	27, 15							
			0 4-27- 09 -2-	309,81	1 56,74	141,9 6	3 88,4	1062, 39	2 81,76	184,0 6									
		1: 1 Wasse r	0 4-27- 09 -3-	324,69	3 71,54	502,5			3 15,4	257,5 5	3 16,47	42, 21							
		1: 5 Wasse r	0 4-27- 09 -4-	390,78	4 85,74	460,0 6	4 82,21	477,0 4	4 3,21	419,5	3 92,22	49, 14				4 01,24	380,0 7	4 03,05	443,6 8
	04- 27-09 aufgetau t	1: 5 Wasse r	0 4-28- 09 -1-	421,87	4 34,38	468,3 2	4 20,26	414,7	4 22,66	422,3 5						4 19,03	414,3 4	3 97,85	339,7 4
		1: 9	0 4-28-	428,81	4 87,93	400,2 8	4 83,36	401,8	4 79,56	478,0 3	4 33,66	02,				4 17,25	356,4	4 11,73	379,8 1



		Wasser	09 -2-									23							
	04-27-09 aufgetaut	1:5 Wasser	0 5-11- 09 -1-	455,54	4 41,21 3	472,0	4 75,35 2	561,4	4 77,3	469,7	4 53,87	50				4 42,95 3	433,1	4 14,11 6	323,1
		1:9 Wasser	0 5-11- 09 -2-	459,53	5 47,64 6	551,7	5 24,01 2	451,0	4 98,27 7	490,7	4 97,91	76, 97				4 55,29 2	414,9	4 57,54 1	441,8
			0 5-12- 09 -2-	708,74	7 58,9 9	751,0	7 85,53 5	855,7	7 87,21 6	741,3	7 10,68	82, 74				7 12,69 1	703,8	7 13,02 4	696,6
			0 5-12- 09 -3-	684,05	7 55,87 7	752,8	7 71,07 1	754,7	7 22,03	685,3	6 83,83	36, 48				6 81,04 4	642,2	6 76,54 4	655,4
	05-12-09 aufgetaut		0 5-18- 09 -1-	714,9	7 87,25 9	752,8	7 18,58 9	536,1	7 43,83 5	768,4	7 21,06	16, 3				6 89,26 4	626,2	6 82,36 4	630,6





			0	451,66	4	451,1	4	479,0	4	628								
			6-09-09-2-		40,56	5	49,95	3	50,21									
			0	690,35	6	677,7	7	823,7	6	668,3	6							
			6-09-09-3-		77,53	2	14,79	9	86,69	9	85,46	25,92						
			0	794,3	8	819,0	8	704,9	8	807,7	7				7	692,6	7	611,9
			6-15-09-1-		17,04	5	20,19	6	10,27	1	93,61	75,89			58,86	9	29,83	8
			0	787,52	8	880,3	8	864,4	8	787,8	7				7	733,8	7	641,3
			6-15-09-2-		33,09		32,18	6	12,32	7	85,5	55,79			90,11	5	38,34	9
		z u konzen triert	0															
		1: 9 Wasse r	0	848,91	9	579,0	9	980,8	8	3255,								
			6-16-09-2-		88,14	8	64,32	1	64,82	57								

		1:	0	785,81	7	791,5	7	397,8	7	782,9	7					7	710,6	7	632,1
		15	6-16-		74,17	1	80,79	2	88,72	1	89,8	88,				86,39	1	19,38	7
		Wasser	09 -3-									29							
			0	680,55	6	649,0	6	711,4	6	1194,									
			6-19-		53,52	3	77,27	9	76,9	54									
			09 -1-																
			0	655,59	6	625,8	6	635	6	1050,									
			6-19-		38,16	7	52,83		51,55	93									
			09 -2-																
			0	649,79	6	609,8	6	607,7	6	1032,									
			6-19-		37,18	9	65,19	9	44,79	84									
			09 -3-																
			0	799,25	7	748,8	8	711,4	8	825,3	7					8	766,5	7	581,7
			6-23-		96,45	3	15,31	1	15,63	6	96,99	77,				00,27		56,42	
			09 -1-									13							
			0	752,59	7	704,8	8	859,3	7	764,3	7					7	678,7		
			6-23-		87,43	8	36	8	90,86	6	49,2	92,				36,1	3		
			09 -2-								01								