

# **Möglichkeiten und Grenzen des modularen Ausbaus eines Kinetik-Surface Plasmon Resonanz- Instrumentes zur quantitativen Rückstandsanalytik**

Vom Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften der

Bergischen Universität Wuppertal

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Greta Dau

Wuppertal

2010

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20100339

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3A468-20100339>]

## **Abstract**

In this work, a Reichert single-channel surface plasmon resonance (SPR) apparatus, which originally was developed for kinetic analysis, was tested in the field of residue analysis. Parallel to the examination of the separate components this system is assembled of, these components were improved continuously in close cooperation with the manufacturing company and, thus, adjusted to the standards for residue analysis. For this purpose, diverse pumps, including pump syringes, were tested and, finally, the Reichert pump SR7500 with its own software was identified as pump that fulfilled most residue analytical needs. Similarly, maintenance, cleaning and support protocols were developed especially for the autosampler but also for the entire system. The performance characteristics of the Reichert system was compared to the Biacore Q apparatus, which is widely used in routine residue analytical laboratories. While the first was advantageous with regard to acquisition cost, the latter was superior with ease of use and reliability. The residue analytical work in this thesis was focused on beta-lactam antibiotics with the application of direct and indirect formats utilizing different biosensor surfaces including synthesis and characterization of different beta-lactam-protein conjugates for antibody-based SPR biosensor analysis.

## **Danksagung**

Die vorgelegte Arbeit wurde in der Zeit von April 2005 bis einschließlich Februar 2009 im Fach Lebensmittelchemie des Fachbereichs Mathematik und Naturwissenschaften der Bergischen Universität Wuppertal in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Michael Petz angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Petz für die Überlassung des Themas zur weitgehend freien Bearbeitung sowie für die dargebotene Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Usleber, Universität Gießen, danke ich für die zur Verfügungstellung des Ceftiofur Antikörpers und eines entsprechenden Ceftiofur-BSA-Konjugates.

Herr Tom Ryan, Firma Reichert Depew USA, unterstützte mich durch zahlreiche Besuche, Reparaturmaßnahmen und Diskussionen sowie durch die Überlassung von verschiedenen Verbrauchsmaterialien.

Herr Erk Gedig, Firma Xantec Münster, stand bei Fragen bezüglich der Sensorchips beratend zur Seite.

Herrn Volker Wulff, BU Wuppertal, danke ich für die Durchführung der MALDI-TOF-MS Messungen.

Frau Dr. Erika Müller-Seitz gilt mein besonderer Dank für die vielen hilfreichen und unterstützenden Gespräche und Diskussionen zu jeder Zeit der Arbeit.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützte diese Arbeit finanziell.

Meinen Kollegen, insbesondere Frau Ulrike Andree, Frau Claudia Rometsch, Frau Caroline Wischnewski, Herrn Roland Thiele, Herrn Dieter Riegel und Herrn Georg Dierkes, gilt mein Dank für das hervorragende Arbeitsklima, die entgegengebrachte Unterstützung, die tröstenden Worte und die Motivation weiterzumachen besonders in den Tiefphasen der Arbeit.

Meiner Familie, insbesondere meinem Mann Dirk gilt mein Dank fürs Zuhören, Aufbauen und für die Begleitung auf diesem Weg des Studiums und der Promotion und die damit verbundene finanzielle Unterstützung.

Ihnen allen danke ich herzlich an dieser Stelle.

Es gibt so viele Dinge, die man nicht mit Geld bezahlt,  
wohl aber mit einem Lächeln, einer Aufmerksamkeit,  
einem "Danke"

für Dirk und Jonatan Magnus

# INHALTSVERZEICHNIS

1. EINFÜHRUNG .....	5
1.1. SPR – OBERFLÄCHENPLASMONRESONANZ .....	5
1.1.1. Hersteller.....	5
1.1.2. Messprinzip.....	6
1.2. BETA-LACTAME .....	9
1.2.1. Wirkungsweise, Resistenzmechanismus, Anwendung .....	9
1.2.2. Ampicillin .....	12
1.2.3. Ceftiofur.....	13
1.2.4. Analytik von $\beta$ -Lactamen .....	16
2. ZIELSETZUNG .....	18
3. GERÄTEKOMPONENTEN-EINZELBETRACHTUNG .....	19
3.1. SR7000 .....	20
3.1.1. Software .....	20
3.1.2. SPR-Komponenten .....	24
3.2. ENDURANCE AUTOSAMPLER.....	28
3.2.1. Probengefäße .....	34
3.2.1.1. Vials .....	34
3.2.1.2. Mikrotiterplatten .....	36
3.3. PUMPEN UND PUMPENSPRITZEN.....	37
3.3.1. PHD 22/2000 Harvard Apparatus.....	37
3.3.2. neMESYS Cetoni.....	40
3.3.3. SR7500 Reichert .....	42
3.3.3.1. SR7500 Nr. 1.....	42
3.3.3.2. SR7500 Nr.2.....	44
3.3.4. Pumpenspritzen.....	46
3.4. SENSORCHIPS .....	50
3.4.1. C80m.....	52
3.4.2. C150d.....	52
3.4.3. CMD150d .....	52
3.4.4. CMD200d .....	52

3.4.5. HC1000m.....	53
3.4.6. CM5 .....	53
3.4.7. Goldsensorchips.....	54
3.4.8. Self-assembled Monolayer .....	54
3.4.9. Goldchip Biacore .....	56
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	57
4.1. IMMOBILISIERUNG .....	57
4.2. VORKONZENTRIERUNGS-VERSUCHE.....	57
4.2.1. Einfluss von pH-Wert und Ionenstärke bei der Immobilisierung.....	59
4.2.2. Einfluss der Flussgeschwindigkeit bei der Immobilisierung.....	62
4.2.3. Einfluss der Zusammensetzung der Immobilisierungslösung .....	64
4.3. RÜCKSTANDSANALYTIK MITTELS REICHERT-SPR.....	67
4.3.1. Charakterisierung der Konjugate .....	67
4.3.2. Prüfung der Antikörperbindungsfähigkeit mittels ELISA.....	68
4.3.3. Charakterisierung des Konjugates aus Ampicillin und BSA.....	69
4.3.4. Direkter Assay .....	71
4.3.4.1. Ceftiofur .....	71
4.3.4.2. Ampicillin .....	73
4.3.5. Kompetitiver Assay mit polyklonalem Antikörper .....	74
4.3.5.1. Abhängigkeit der Antikörperbindung von der eingesetzten Konzentration .	76
4.3.5.2. Überprüfung der Kreuzreaktivität des Antikörpers .....	77
4.3.5.3. Ergebnisse – kompetitiver Assay.....	77
4.3.6. Kompetitiver Assay mit monoklonalem Antikörper .....	79
4.4. RÜCKSTANDSANALYTIK MITTELS BIACORE-SPR .....	81
4.4.1. Direkter Assay .....	81
4.4.2. Kompetitiver Assay .....	82
4.5. WECHSELWIRKUNG VON MATRIX MIT CHIPOBERFLÄCHEN .....	85
4.5.1. Minimierung der Matrixwechselwirkungen durch Variation der Verdünnung ...	85
4.5.2. Minimierung der Matrixwechselwirkungen durch Variation der Sensorchips ....	86
4.6. REGENERATION .....	89
4.7. VERGLEICH DER REICHERT-SPR MIT EINEM BIACORE Q-GERÄT.....	93
4.8. ZUSAMMENSTELLUNG DER ARBEITSPARAMETER FÜR DIE REICHERT-SPR .....	96

5. ZUSAMMENFASSUNG .....	98
6. MATERIAL UND METHODEN .....	101
6.1. GERÄTE SPR .....	101
6.1.1. Pumpen .....	101
6.1.2. Autosampler.....	102
6.1.3. Oberflächenplasmonresonanzgeräte .....	102
6.2. ZUBEHÖR.....	103
6.2.1. Kapillaren.....	103
6.2.2. Pumpenspritzen.....	104
6.3. CHEMIKALIEN SPR.....	106
6.3.1. Immobilisierungsreagenzien .....	106
6.3.2. Arbeitsreagenzien SPR-Analyse.....	107
6.4. HERSTELLUNG DER IMMUNOREAGENZIEN .....	111
6.4.1. Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	111
6.4.2. Chemikalien .....	111
6.4.3. Arbeitsvorschriften der Konjugatsynthesen.....	114
6.4.3.1. Natriumperiodat-Kopplung .....	114
6.4.3.2. Carbodiimid-Kopplung .....	114
6.5. CHARAKTERISIERUNG DER KONJUGATE .....	116
6.5.1. Proteinbestimmung nach Bradford .....	116
6.5.1.1. Reagenzien, Materialien, Geräte.....	116
6.5.1.2. Arbeitsvorschrift: Proteinbestimmung.....	116
6.5.2. Prüfung der Antikörperbindungsfähigkeit.....	117
6.5.2.1. Geräte .....	117
6.5.2.2. Reagenzien .....	117
6.5.2.3. Durchführung .....	119
6.5.3. Charakterisierung des Konjugates aus Ampicillin und BSA .....	120
6.5.3.1. Reagenzien, Geräte .....	120
6.5.3.2. Probenvorbereitung.....	120
6.6. AUFARBEITUNG VON LEBENSMITTELN .....	122
6.6.1. Chemikalien und Geräte .....	122
6.6.2. Aufarbeitung .....	123

6.7. RÜCKSTANDSANALYTIK .....	125
6.7.1. Standardimmobilisierungsprotokolle.....	125
6.7.2. Verdünnungen Ampicillin-Antikörper .....	127
6.7.4. Verdünnungen Ampicillin .....	128
6.7.6. Herstellung eines Self-assembled Monolayer.....	129
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	131
8. TABELLENVERZEICHNIS .....	136
9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	137
10. LITERATUR .....	140
11. ANHANG.....	145

# 1. Einführung

## 1.1. SPR – Oberflächenplasmonresonanz

### 1.1.1. Hersteller

Oberflächenplasmonresonanz-Geräte sind seit über 25 Jahren kommerziell erhältlich. Das erste Gerät wurde 1990 von der Firma Pharmacia Biosensors AB (später Biacore bzw. GE Healthcare) in den Handel gebracht [1]. In den folgenden Jahren wurden diese Geräte weiterentwickelt und neben dem Marktführer Biacore konnten sich weitere Hersteller für Oberflächenplasmonresonanz-Geräte etablieren. Einer dieser Anbieter ist die Firma Reichert (Depew, NY USA). Ein Ein-Kanal-Oberflächenplasmonresonanz-Gerät (SR7000) dieser Firma stand für die Arbeiten zur Verfügung.



Abbildung 1: SPR-Gerät SR7000 Firma Reichert (Depew, NY USA), mit Autosamplern und Pumpe [2]

Das SR7000 ist der SPR-Detektor und wurde 2006 standardmäßig durch den Endurance Autosampler (Spark Holland) und die Pumpe PHD 22/2000 (Harvard Apparatus) ergänzt (Abbildung 1). In dieser Zusammenstellung wurde dieses Gerät für kinetische Untersuchungen angeboten. In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob sich diese Gerätezusammenstellung auch für den Bereich der quantitativen Rückstandsanalytik von Tierarzneimitteln eignet.

Weitere Hersteller von SPR-Geräten bzw. Geräten basierend auf der SPR-Messtechnik sind neben Biacore und Reichert, Autolab (Metrohm), ThermoScientific, GenOptics oder auch Microspectra (Craic Technologies).

### 1.1.2. Messprinzip

Das Messprinzip der Oberflächenplasmonresonanz beruht auf der Totalreflexion des Lichtes [3-6]. Sobald ein Lichtstrahl aus einem optisch dichteren Medium auf ein optisch dünneres Medium trifft, wird er gebrochen (Snelliussches Brechungsgesetz). Geschieht dies oberhalb des Grenzwinkels der Totalreflexion kann die elektromagnetische Welle nicht mehr in das optisch dünnere Medium eindringen, sondern wird vollständig an der Grenzfläche reflektiert. An der Grenzfläche werden dabei elektromagnetische Wellen in das optisch dünnere Medium abgegeben. Diese stehen senkrecht zur Grenzfläche und werden als evaneszente Wellen bzw. als evaneszentes Feld beschrieben. Die Anordnung der optischen Medien (Prisma = dichteres Medium; Goldschicht/Flusszelle = dünneres Medium) und der Flusszelle sind in Abbildung 2 dargestellt.

Ist die Grenzfläche mit einem dünnen Metallfilm wie der Goldschicht auf dem Sensorchip beschichtet, können die evaneszenten Wellen in diesen eindringen und dort elektromagnetische Oberflächenplasmonwellen anregen. Oberflächenplasmonen, hervorgerufen durch die Anregung von freien Elektronen in Metallen zu Plasmaschwingungen um die Ionenkerne, sind Oberflächenwellen (evaneszente Wellen), bei denen die longitudinalen elektronischen Schwingungen (Längsschwingungen) parallel zur Oberfläche des Metalls angeregt werden. Voraussetzung für die Anregung des Plasmons durch die Energie des Photons sind gleiche Wellen- und Partikel-Eigenschaften. Diese Oberflächenplasmonen breiten sich entlang der Metalloberfläche aus, wobei ihre Intensität mit der Ausbreitungslänge exponentiell abnimmt. Bei einer Lichtwellenlänge von 633 nm zum Beispiel breiten sich Oberflächenplasmonen auf Gold etwa 9  $\mu\text{m}$  weit aus [7].

Für einen spezifischen Einfallswinkel und eine definierte Wellenlänge wird die Oberflächenplasmonresonanz als Abnahme der Intensität des reflektierten Lichtes bei diesem Winkel sichtbar. Dieser spezifische Winkel ist der SPR-Winkel ( $\theta_{\text{SPR}}$ ).

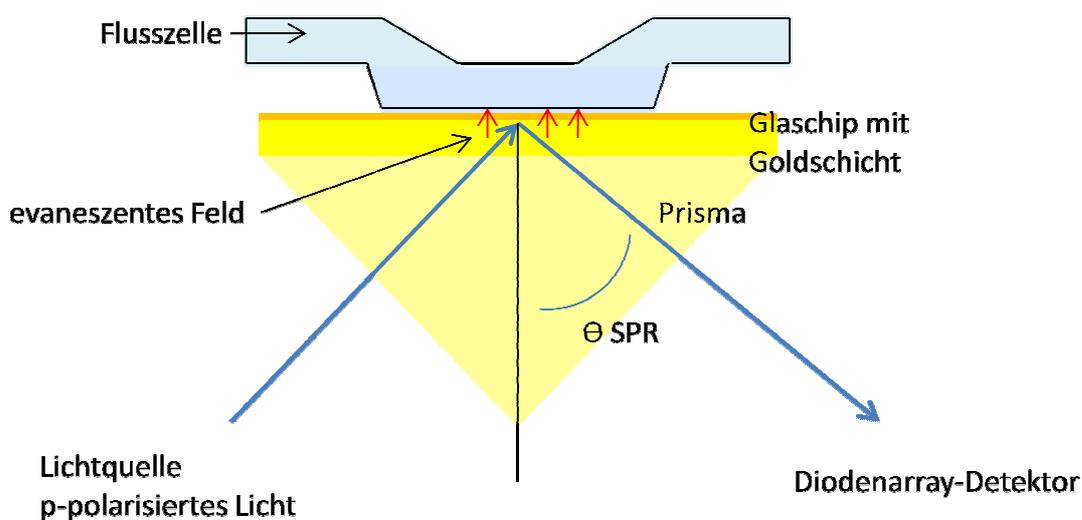
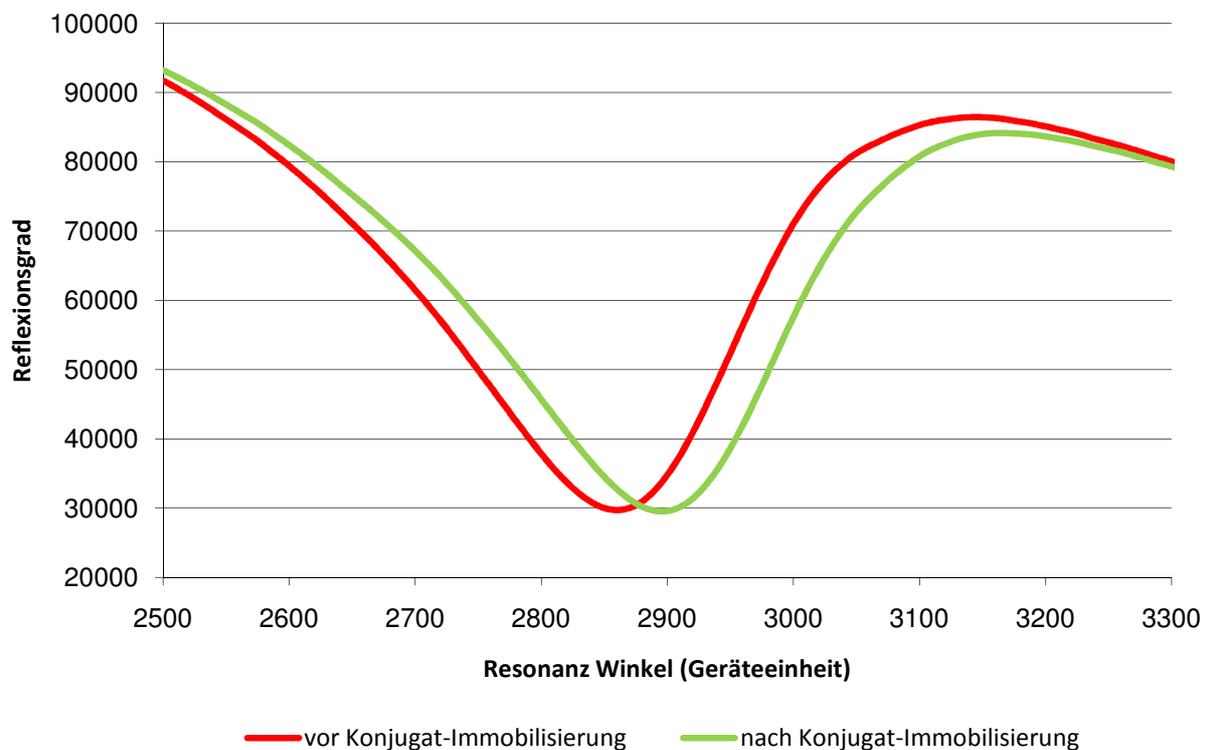


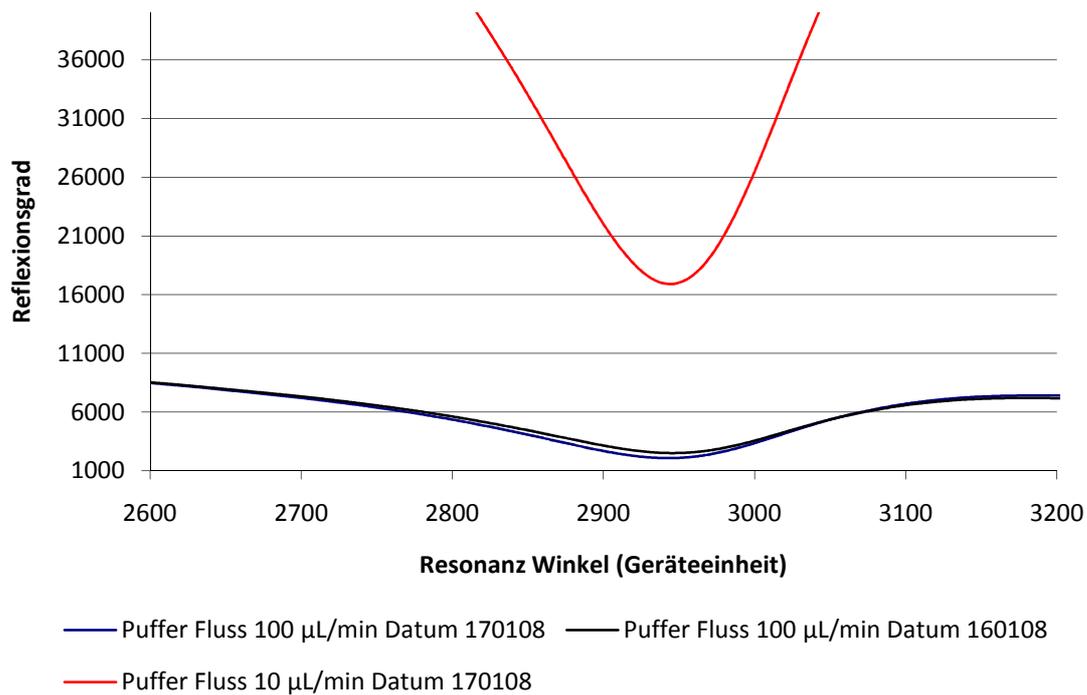
Abbildung 2: Anordnung des Messsystems in der Reichert SPR

Die Wellenlänge des eingestrahlt Lichtes, die Art und Dicke der Metallschicht, die optischen Eigenschaften des Prismas und der Brechungsindex des Mediums im evaneszenten Feld über dem Goldchip beeinflussen den Winkel des Intensitäts-Minimums ( $\theta_{\text{SPR}}$ ). Sobald alle anderen Einflussparameter konstant gehalten werden, ist die Winkeländerung nur noch durch die Änderung des Brechungsindex im evaneszenten Feld abhängig. Diese Änderung kann dann als Verschiebung des SPR-Winkels gemessen werden.

Die Änderung des Brechungsindex korreliert dabei mit einer Massenänderung auf der Chipoberfläche, hervorgerufen durch eine Immobilisierung oder durch eine Analytanbindung während der Analyse. Dabei wird der SPR-Winkel zu größeren Winkeln hin verschoben (Abbildung 3). Hingegen hat eine Änderung der Fließgeschwindigkeit des Puffers wie erwartet keinen Einfluss auf den SPR-Winkel (Abbildung 4). Es erfolgt nur eine Verschiebung im Bereich des Reflexionsgrades (y-Achse).



**Abbildung 3: Verschiebung des SPR-Winkels vor und nach einer Immobilisierung eines Ampicillin-Glucoseoxidase-Konjugates; Reflexionsgrad wird durch den Photodioden-Array-Detektor (Multiplifier) detektiert**



**Abbildung 4: SPR-Winkel bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten des Puffers**

Innerhalb des evaneszenten Feldes über der Goldoberfläche können somit Brechungsindexänderungen, welche mit Massenänderungen auf der Chipoberfläche korrelieren, detektiert werden. Spezifische und unspezifische Wechselwirkungen außerhalb des evaneszenten Feldes werden nicht detektiert. [siehe auch 3.4.]

Der Surface Plasmon Resonanz-Winkel bzw. die Änderung des Winkels ausgedrückt in  $\mu\text{RIU}$  gegen die Zeit aufgetragen ergibt die Darstellung als Sensorgramm (Abbildung 12). Eine  $\mu\text{Refractive-Index-Unit}$  ( $\mu\text{RIU}$ ) entspricht dabei einer Winkeländerung von  $7,3 \cdot 10^{-5}$  Grad. Da diese Änderung in engen definierten Zeitabständen (2 s) gemessen werden, erfolgen die Untersuchungen in Echtzeit.

Auf die einzelnen Gerätekomponenten und deren Zusammenspiel wird in Kapitel 3 näher eingegangen.

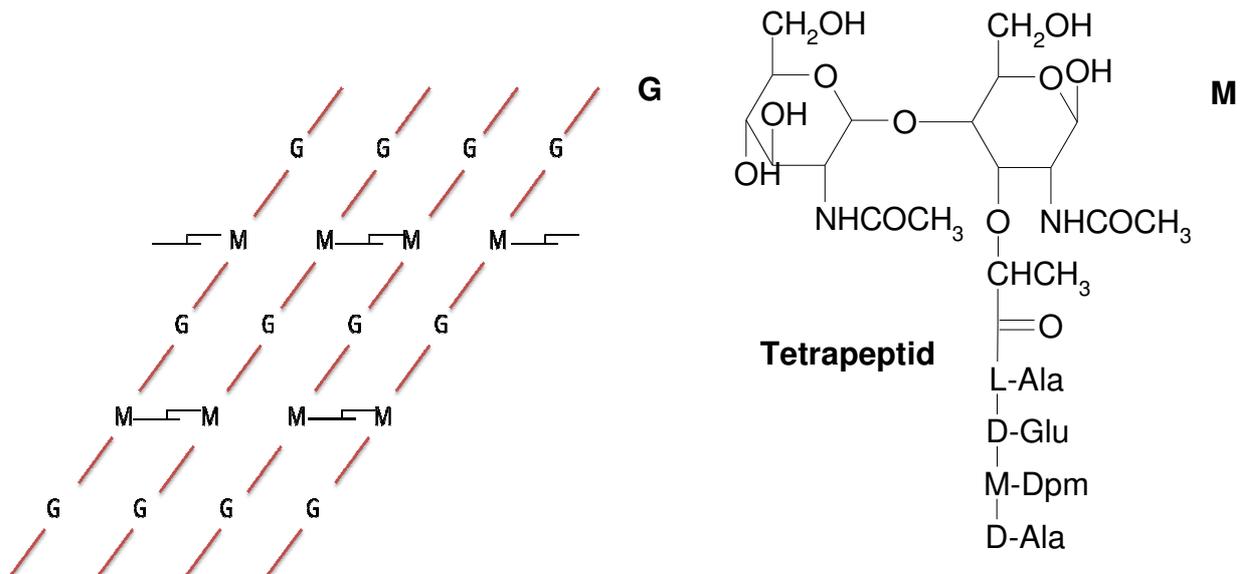
## **1.2. beta-Lactame**

Die SPR als Echtzeit-Analytikverfahren, in der markierungsfrei Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen beobachtet werden können, bietet für die Rückstandsanalytik ein breites Einsatzgebiet. Dieses beruht auf der hohen Spezifität und Empfindlichkeit der verwendeten Biosensoren, die es in vielen Fällen erlauben z.B. Tierarzneimittelrückstände wie  $\beta$ -Lactam Antibiotika in komplexen Matrices ohne eine aufwendige Probenaufarbeitung nachzuweisen [8, 9]. Der Biosensor besteht dabei aus einem für den Analyten spezifischen Bindungspartner, wie Antikörper, Enzyme oder Proteinen, und einem Messwandler, welcher im Falle der SPR ein optisches Messsignal produziert. Neben der markierungsfreien Arbeit liegt ein weiterer Vorteil in der möglichen Automatisierung, welche einen hohen Probendurchsatz ermöglicht.

### **1.2.1. Wirkungsweise, Resistenzmechanismus, Anwendung**

Die  $\beta$ -Lactame gehören zur Gruppe der Antibiotika. Unter dem Sammelbegriff  $\beta$ -Lactam-Antibiotika werden Antibiotika, die einen  $\beta$ -Lactamring im Grundgerüst enthalten, zusammengefasst [10, 11]. Es handelt sich dabei um die Penicilline und Cephalosporine.

Sie wirken durch den Eingriff in die Zellwandbiosynthese der Bakterienzelle bei Bakterien [10-13]. Die Zellwand bei Bakterien ist aus Peptidoglycanschichten (Murein-Sacculus) aufgebaut. Diese kommen nur in Bakterienzellen vor, daraus resultiert die Unschädlichkeit dieser Antibiotika für höher entwickelte Organismen (Mensch, Tier). Der Murein-Sacculus fungiert als Stützskelett der Zellwand. Bei gram-positiven Bakterien besteht die Zellwand aus etwa 40 dieser Peptidoglycanschichten und macht etwa 30-70 % der Trockenmasse der Zellwand aus. Bei diesen geraden, unverzweigten heteropolymeren Polysaccharid-Ketten, alternierende Folge von N-Acetylglucosamin (G) und N-Acetylmuraminsäure (M), sind die Tetreptidseitenketten der Muraminsäure über Interpeptidketten miteinander verbunden, wodurch die Stabilität und die Druckbeständigkeit der Zellwand bedingt werden (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Struktur des Mureins und schematische Darstellung der quervernetzten Holmen der Zellwand**

Die Verknüpfung erfolgt dabei jeweils zwischen dem M-Dpm (m-Diaminopimelinsäure) einer Muraminsäure und dem D-Ala (D-Alanin) der benachbarten Muraminsäure.

Der Wirkmechanismus der  $\beta$ -Lactame ist in Abbildung 6 (Weg a) schematisch dargestellt. Hierbei wird die durch die Transpeptidasen erfolgende Quervernetzung des Mureinnetzes unterbunden. Damit erreicht die Bakterienzellwand keine Stabilität und zerplatzt unter dem osmotischen Druck. Nur neu gebildete Zellen werden zerstört, da bei ruhenden und nicht mehr wachsenden Zellen der Mureinaufbau abgeschlossen ist.

Die Transpeptidasen in der Zelle nutzen einen dem Chymotrypsin sehr ähnlichen Reaktionsmechanismus, an dem Serin-Reste beteiligt sind. Sobald ein  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum dieses aktive Zentrum der Transpeptidase erreicht, erfolgt eine Übertragung des Protons des Serinrestes auf den Stickstoff des  $\beta$ -Lactam-Ringes. Es resultiert eine Ringöffnung durch den Angriff des aktiven Sauerstoffatoms der Hydroxylgruppe am Carbonyl-Kohlenstoffatom. Das Enzym wird durch Ausbildung einer kovalenten Bindung mit dem  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum inaktiviert. Ein analoges enzymatisches Prinzip nutzt die Zelle auch zur Inaktivierung der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika durch  $\beta$ -Lactamasen bei der Entwicklung von Resistenzen (Abbildung 6, Weg b).

Der  $\beta$ -Lactam-Ring ist sehr instabil gegenüber sehr hohen bzw. sehr niedrigen pH-Werten. Bei der Herstellung von halbsynthetischen Derivaten konnte dies teilweise verhindert werden, sodass neben der typischen intravenösen bzw. intramuskulären Gabe auch eine orale Gabe möglich ist.

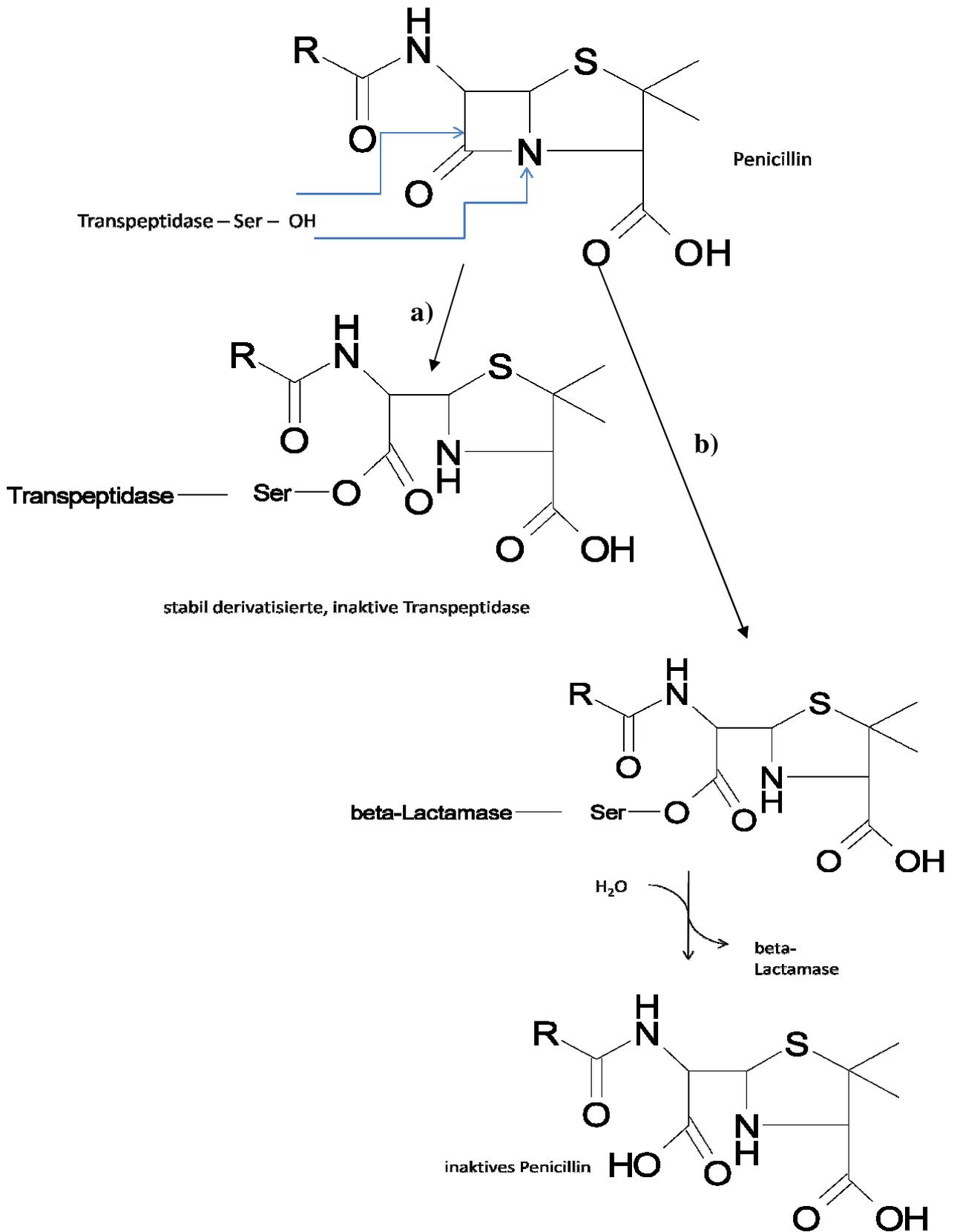


Abbildung 6: Wirkmechanismus von  $\beta$ -Lactamen bei der Zellwandsynthese (a) und Resistenzmechanismus durch Spaltung der  $\beta$ -Lactame (b) (in Anlehnung an [12])

Die Vorteile bei der Verwendung von  $\beta$ -Lactamen als Antibiotika liegen an dem speziellen Angriffsort, sowie an der langen Halbwertszeit im Körper und der damit einhergehenden Verteilung, in wirkungsrelevanten Dosen, in fast alle Organe. Somit erreichen sie ein breites Wirkungsfeld im Körper. Sie bekämpfen daher ein großes Spektrum an Erregern. Die Einteilung der  $\beta$ -Lactame erfolgt in verschiedene Gruppen. Die Penicilline wurden 1929 von Fleming in der Pilzkolonie *Penicillium notatum* entdeckt, die Cephalosporine wurden 1953 in der Pilzart *Cephalosporium acremonium* gefunden. Bis auf einzelne Ausnahmen werden  $\beta$ -Lactame ausschließlich von Pilzen gebildet. Sowohl Penicilline als auch Cephalosporine werden in der Veterinär- und Humanmedizin bei bakteriellen Infektionen eingesetzt. In dieser Arbeit wurde mit jeweils einem Vertreter aus der Gruppe der Penicilline (Ampicillin) und der Gruppe der Cephalosporine (Ceftiofur) gearbeitet.

### 1.2.2. Ampicillin

Ampicillin gehört zur Gruppe der Penicilline. Diese besitzen jeweils die Grundstruktur der 6-Aminopenicillansäure (Abbildung 7). Es handelt sich dabei um ein synthetisches Penicillin-Derivat, welches erstmals 1961 gewonnen wurde [14]. Es ist gegen gram-positive und gram-negative Bakterien wirksam, ist jedoch durch  $\beta$ -Lactamasen inaktivierbar. In Abbildung 7 ist die Struktur dargestellt.

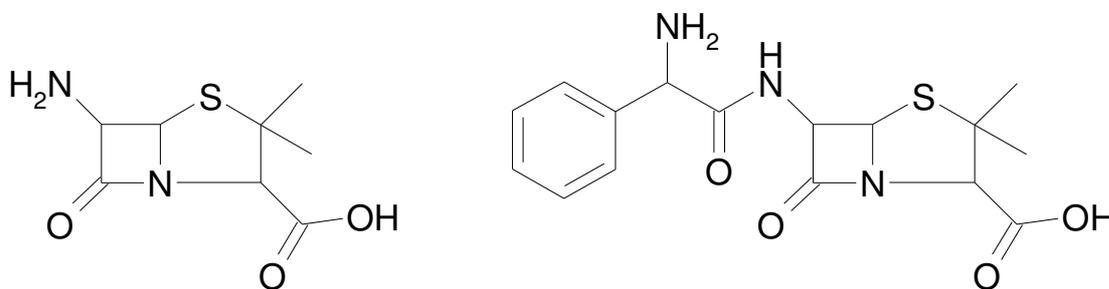


Abbildung 7: Struktur der 6-Aminopenicillansäure und Struktur des Ampicillin

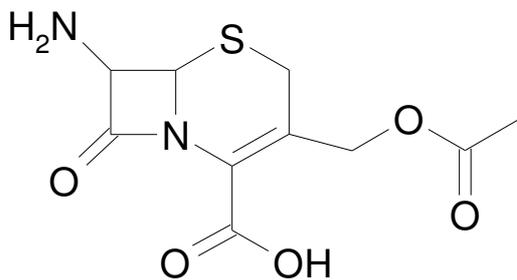
Die Höchstmengende (Maximum Residue Limit = MRL) liegt für Ampicillin bei allen zur Lebensmittelgewinnung genutzten Arten bei:

**Tabelle 1: MRL Werte für Ampicillin [15]**

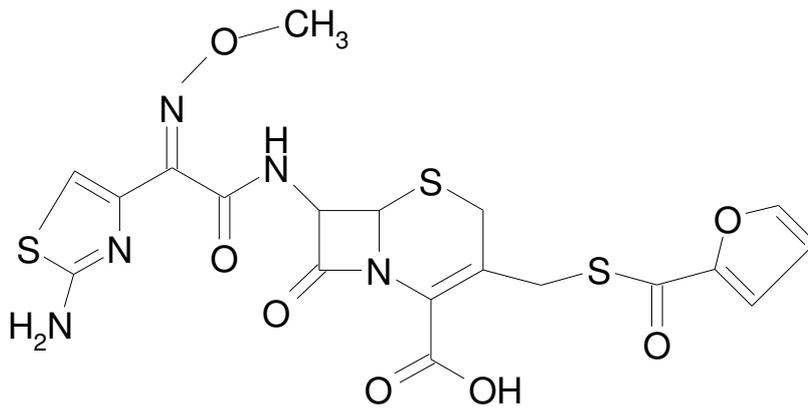
Matrix	MRL [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]
Leber	50
Niere	50
Fett	50
Muskel	50
Milch	4

### 1.2.3. Ceftiofur

Ceftiofur gehört zu der Gruppe der Cephalosporine. Sie besitzen, analog zu den Penicillinen, die gemeinsame Grundstruktur der 7-Aminocephalosporansäure (Abbildung 8). Beispielhaft ist in Abbildung 9 die Struktur von Ceftiofur dargestellt. Bei Ceftiofur handelt es sich um ein Cephalosporin der dritten Generation (Definition WHO 2005). Es wurde für die Tiermedizin entwickelt, ist in Wasser löslich und säurestabil [16]. Ceftiofur wird im Körper sehr schnell (2-4 Stunden) in das ebenfalls aktive Desfuroylceftiofur (Abbildung 10) umgewandelt. Dieses kann dann z.B. unter Dimerbildung oder Bindung an verschiedene Proteine metabolisieren, wobei die entstehenden Metaboliten weniger aktiv sind [16-20].

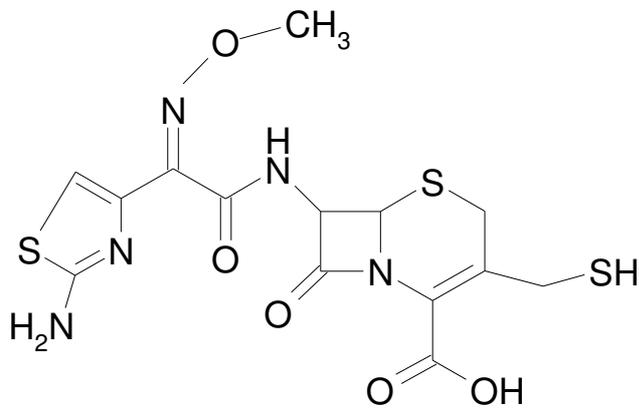


**Abbildung 8: Struktur 7-Aminocephalosporansäure**



**Abbildung 9: Struktur Cefotiofur**

Die Höchstmengen (MRL) für Cefotiofur bei allen zur Lebensmittelgewinnung genutzten Säugetieren sind in Tabelle 2 zusammengestellt und werden als Summe aller den Betalactamring enthaltenden und als Desfuroylcefotiofur gemessenen Rückstände erfasst [15].



**Abbildung 10: Struktur Desfuroylcefotiofur**

**Tabelle 2: MRL Werte für Ceftiofur als Summe aller den Betalactamring enthaltenden und als Desfuroylceftiofur gemessenen Rückstände [15]**

<b>Matrix</b>	<b>MRL [<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>]</b>
Leber	2000
Niere	6000
Fett <sup>1</sup>	2000
Muskel	1000
Milch	100

<sup>1</sup> bei Schweinen bezieht sich dieser Wert auf „Haut und Fett in natürlichen Verhältnissen“

#### 1.2.4. Analytik von $\beta$ -Lactamen

In der Literatur gibt es eine Vielzahl von Methoden zur Rückstandsanalytik in Lebensmitteln und von Immunosensor-Verfahren in der Lebensmittelanalytik [21, 22].

Für  $\beta$ -Lactame gibt es verschiedene Nachweis- und Bestimmungsmöglichkeiten. Die einfachste Nachweismethode für Antibiotika bildet der Hemmstofftest auf mit Bakterien beimpften Nährböden [13]. In der Milchindustrie wird zum Beispiel vor allem der Brillantschwarz-Reduktionstest für den schnellen Nachweis an Tierarzneimittelrückständen wie  $\beta$ -Lactamen genutzt [23].

Mittlerweile gibt es viele quantitative Nachweismöglichkeiten, wie den klassischen, chromatographischen Methoden wie der HPLC, LC/MS [24, 25], ICP-MS [26] bzw. LC/MS/MS [27, 28].

Ebenso gibt es eine Reihe von Rezeptortests. Diese beruhen teilweise auf Konkurrenzreaktion zwischen den Antibiotika bzw. ihren Konjugaten mit Antikörpern oder auch auf penicillinbindende Proteine. Antikörperreaktionen werden dabei beispielsweise im Charm II Rezeptortest für  $\beta$ -Lactame oder in Fluoreszenz-Immunoassays [29] verwendet.

Penicillinbindende Proteine fanden Anwendung in Arbeiten von Lamar [30] in ELISA Untersuchungen und in Arbeiten von Cacciatore [8] bei optischen Biosensorverfahren der SPR.

Um genaue Aussagen über den Gehalt an aktiven Antibiotikarückständen zu erhalten, ist es bei allen Analysen wichtig, dass nur  $\beta$ -Lactame mit intaktem  $\beta$ -Lactamring detektiert werden, da nur diese eine Wirksamkeit gegen Bakterien zeigen und den rechtlichen Regelungen unterliegen.

**Tabelle 3: Übersicht über in der Arbeit genutzte Antikörper und Konjugate**

<b>Antikörper</b>	<b>Bezugsort</b>
Ceftiofur-Antikörper (Cf-AK)	Usleber, Gießen
Ampicillin-Antikörper monoklonal (mAmAK)	Abcam, Antikörper ab9251
Ampicillin-Antikörper polyklonal (pAmAK)	Randox, Antikörper PAS9567
markierter sek. Antikörper für ab9521 (sek. AK mouse IgG; HRP-markiert)	Abcam, ab6728
<b>Konjugate</b>	<b>Bezugsort</b>
Ceftiofur-BSA-Konjugat	Usleber, Gießen
Ceftiofur-BSA-Konjugat (Cf-BSA 1)	selbst hergestellt
Ceftiofur-BSA-Konjugat (Cf-BSA 2)	selbst hergestellt
Ampicillin-GOD-Konjugat (Am-GOD 1)	selbst hergestellt
Ampicillin-GOD-Konjugat (Am-GOD 2)	selbst hergestellt
Ampicillin-BSA-Konjugat (Am-BSA 1)	selbst hergestellt

## 2. Zielsetzung

Die Surface Plasmon Resonanz (SPR) wurde bereits in den Arbeiten von Cacciatore [8, 31], Möller [32, 33] und Andree [34, 35] zur Analytik von Tierarzneimittelrückständen verwendet. Diese Arbeiten wurden jeweils mit Geräten der Firma Biacore durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit war das Ziel, die gewonnenen Erkenntnisse über die Arbeitsweise der SPR aus diesen Arbeiten auf ein Gerätesystem der Firma Reichert zu übertragen, welches bisher hauptsächlich für kinetische Untersuchungen verwendet worden war. Bei den Untersuchungen sollte ein Hauptaugenmerk auf die einzelnen Gerätekomponenten, Pumpe – Autosampler – SPR, mit ihren Eigenschaften und Variationsmöglichkeiten im Hinblick auf die Verwendung in der Rückstandsanalytik gelegt werden. Dabei wurde das Ziel verfolgt, diese Komponenten, ihre Arbeitsweise und die Messparameter den Anforderungen der Rückstandsanalytik anzupassen. Dazu wurden die Ergebnisse und Erfahrungen für die Weiterentwicklung der Einzelkomponenten und der Softwareprogramme dem Hersteller Reichert mitgeteilt, um in gemeinsamen Diskussionen eine Optimierung zu erreichen. Ebenfalls sollte ein Wartungsprotokoll für die Routineanalytik erarbeitet werden.

Neben den Gerätekomponenten wurden die Zubehörmaterialien betrachtet. Hierbei galt es, optimale Arbeitsmaterialien zu finden und diese auf ihre Praxistauglichkeit hin zu untersuchen. Dazu sollten verschiedene Pumpenspritzen, Kapillaren als auch Probengefäße wie Glasfläschchen (GC-Vials) und Mikrotiterplatten getestet werden.

Die in der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Arbeitsweise der Gerätekomponenten und der Software-Programme sollten mit denen des Biacore Q Gerätes verglichen werden, um das Potenzial der Reichert SPR zu beurteilen.

Anschließend sollten Analysen im Bereich der Tierarzneimittelrückstände mit Ceftiofur bzw. Ampicillin und den entsprechenden Antikörpern und Konjugaten durchgeführt werden. Die dafür benötigten Konjugate galt es herzustellen und soweit möglich zu charakterisieren. Hierfür sollten unter anderem Bindungsstudien (ELISA) und MALDI-TOF-MS-Messungen durchgeführt werden.

Grundlegend sollten für die Analytik von Tierarzneimittelrückständen mittels SPR Einflussmöglichkeiten durch die Wahl der Sensorchips, die Variation der Immobilisierungsparameter und der Regenerationsbedingungen aufgezeigt werden.

Bei der Sensorchipauswahl war das Ziel, das Verhalten der unterschiedlichen Matrices wie Muskel, Leber und Niere auf den verschiedenen Chipoberflächen zu testen, um Bedingungen zu ermitteln, die zu möglichst geringen unspezifischen Bindungen (Matrixinterferenzen) führen.

### 3. Gerätekomponenten-Einzelbetrachtung

Das Surface Plasmon Resonanz-System der Firma Reichert setzt sich aus drei einzelnen Gerätekomponenten zusammen (Abbildung 11). Es umfasst das Surface Plasmon Resonanz Gerät, einen manuellen Probengeber bzw. alternativ einen Autosampler zur Probeninjektion und eine Pumpe zur Förderung des Laufpuffers. In dieser Arbeit wurde mit einem Autosampler für die Probeninjektion gearbeitet, mit dem eine Temperierung der Proben möglich war.

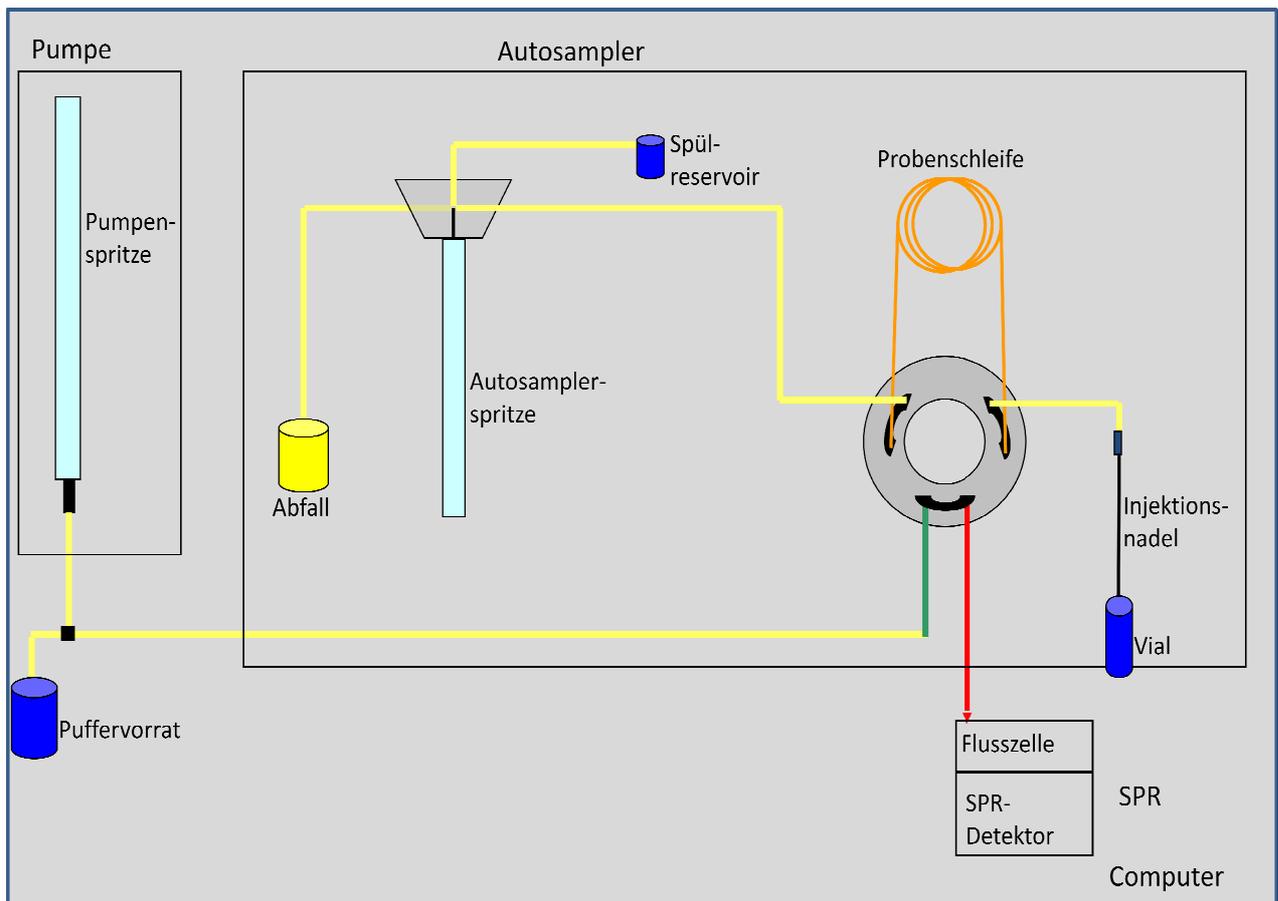


Abbildung 11: schematische Darstellung des SPR-System-Aufbaus (die Farben der Kapillardarstellungen entsprechen den Kapillargrößen, siehe 6.2.1.)

### **3.1. SR7000**

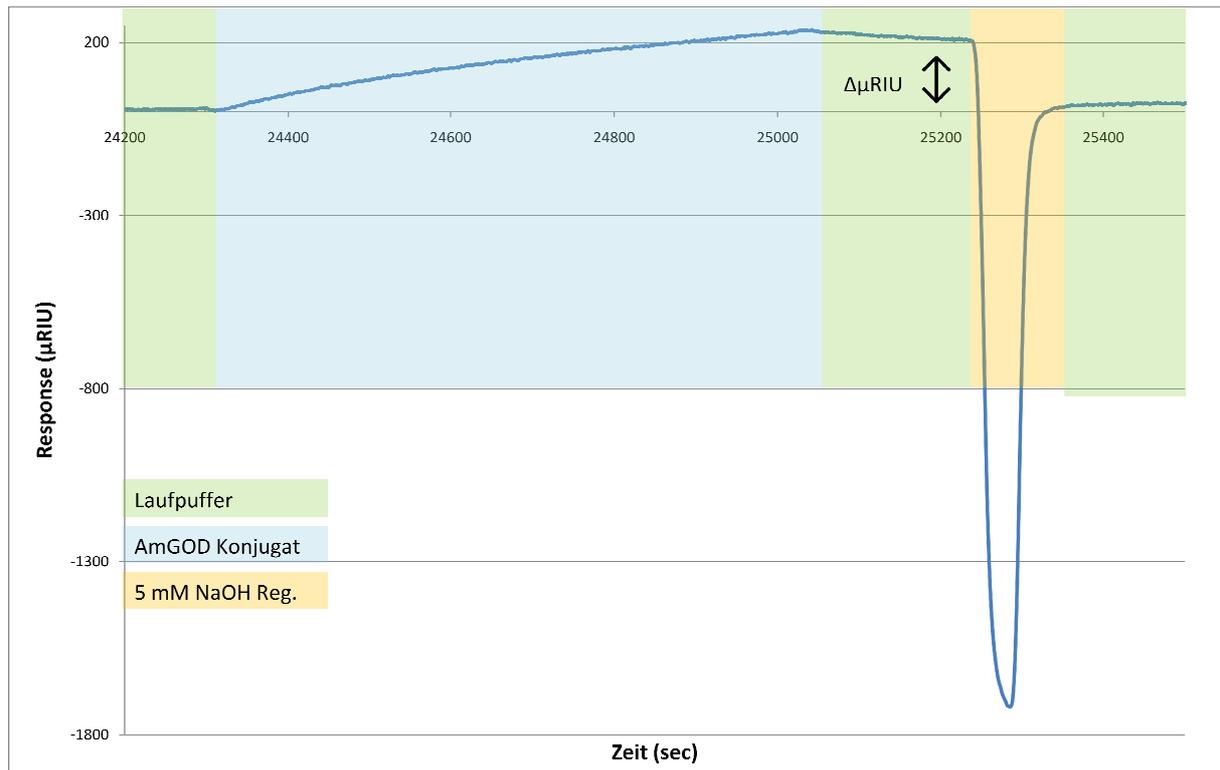
Das SR7000 Oberflächenplasmonresonanz-Gerät bildet die Mess- und Auswerteeinheit und damit das Herzstück des Systems. Bei dem SR7000 handelt es sich um ein Ein-Kanalsystem, bei dem im Unterschied zu einem Zwei-Kanal-Gerät (SR7000DC) Änderungen des Messsignals durch *bulk-shifts* und nicht-spezifische Bindungen mittels einer Referenzflusszelle nicht ausgeglichen, dafür aber erkannt werden können.

Messgröße für die Änderung des Brechungsindex und damit die Verschiebung des SPR-Winkels ist die  $\mu$ Refractive-Index-Unit ( $\mu$ RIU). Hierbei entspricht 1  $\mu$ RIU bzw. eine Winkeländerung von  $7,3 \cdot 10^{-5}$  Grad gleich 0,73 Response Units (RU). Gemessen werden kann in einem Refractive Index Bereich von 1,33 bis 1,38 und einem Temperaturbereich von 10 - 90 °C.

Bei der SPR handelt es sich um ein Durchflusssystem, bei dem eine kontinuierliche Messung des Brechungsindex erfolgt. Der Brechungsindex wird in Form des Messsignals in  $\mu$ RIU am Computer dargestellt. Während der Analyse wird die Veränderung der Zusammensetzung der durch die Messzelle fließenden Lösung und der damit verbundenen Brechungsindexänderung detektiert (vergleiche Abbildung 2). Diese Änderung wird als Veränderung des  $\mu$ RIU Signals als Datensignal über den Computer ausgegeben.

#### **3.1.1. Software**

Die Auswertung erfolgt dabei über eine Software, in der die Messgröße, die  $\mu$ Refractive-Index-Unit, gegen die Zeit aufgetragen wird. Das erhaltene Bild wird als Sensorgramm bezeichnet. Ein Sensorgramm bezeichnet die Gesamtheit aller Messpunkte eines Laufes. Ein Lauf setzt sich hierbei aus einem bzw. mehreren Zyklen zusammen. Ein Zyklus wiederum umfasst in dieser Arbeit jeweils die Injektion der Probenlösung mit anschließender Injektion der Regenerationslösung inklusive aller Spülvorgänge. Zwischen den einzelnen Injektionen fließt jeweils der Laufpuffer durch das System (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Schema eines Zyklus bestehend aus Analytinjektion (AmGOD Konjugat 25 µg/mL) und Regeneration (5 mM NaOH) mit Laufpufferphasen, Laufpufferphase zwischen Analytinjektion und Regeneration entspricht der Dissoziationsphase mit Messpunkt für  $\Delta\mu\text{RIU}$  (Brechungsindexänderung durch Bindung des Analyten)

Im Verlauf der Arbeit konnten Weiterentwicklungen der zunächst gelieferten Software (SPR\_V2.21a alpha) eingesetzt werden. So wurde mit dem ersten Upgrade eine Software (SPR\_V4012) geliefert, in der es zusätzlich zur Aufzeichnung des Sensorgramms möglich war, manuell den Anfangs- bzw. Endpunkt einer Injektion zu markieren. Weiterhin ermöglicht es das erste Upgrade der Auswertesoftware, einzelne Zyklen eines Laufes übereinanderzulegen und als lesbare Datei für die Scrubber-Software zu speichern. Mit der zur Verfügung stehenden Testversion der Scrubber-Software (BioLogic Software, Australien) können die Injektionen auf einen gemeinsamen Null- und Startpunkt korrigiert werden (Abbildung 13).

Die dabei entstehende Datei kann in einem Format gespeichert werden, das in Excel auslesbar ist und dann zur Auswertung auch auf anderen Computern bereit steht (Abbildung 14). Im Excelformat ist es im Anschluss auch möglich, die zu einem bestimmten Zeitpunkt erhaltenen Refraktionsindexwerte abzulesen. Dies stellt einen sehr aufwendigen Weg der Datenauswertung dar, vor allem bei mehr als 21 Analysen, da die SPR-Software hier ein Limit setzt, die Auswertung in mehreren Teilblöcken erfolgen muss und ein Abgleich der Daten auf einen gemeinsamen Nullpunkt in Excel per Hand durchzuführen ist. Ein gemeinsamer Nullpunkt entspricht dabei dem gemeinsamen Startpunkt für die Injektionen und gewährleistet somit eine vergleichbare Auswertung der Messsignale am gewählten Messpunkt.

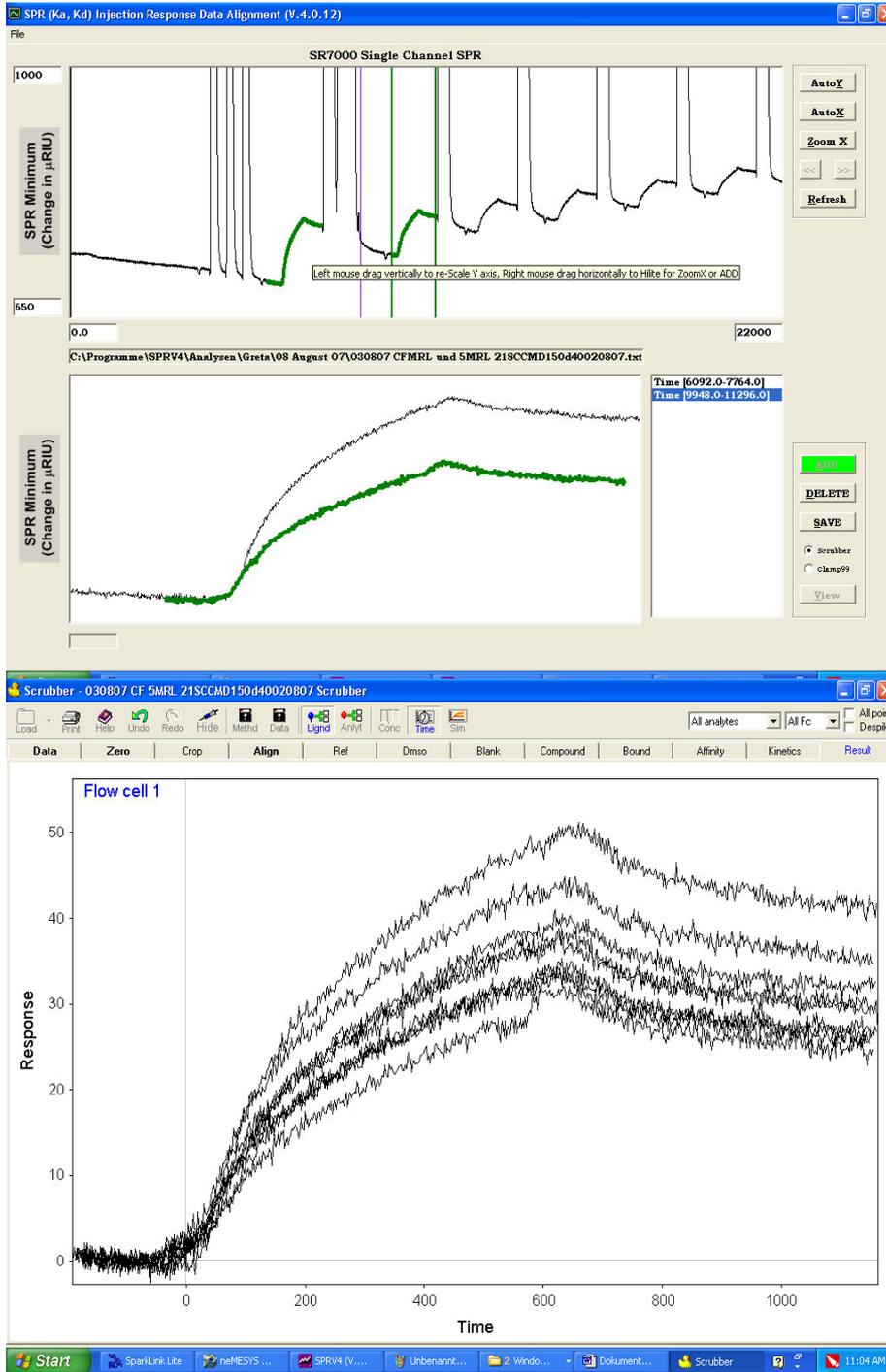


Abbildung 13: Screenshot der SPR Auswerte- und Scrubber-Software

Im oberen Bereich der Abbildung ist ein Sensorgramm eines Laufes mit mehreren Zyklen zu sehen. Aus diesem können dann einzelne Injektionen (z.B. Probeninjektionen, grün unterlegt) markiert und für die weitere Auswertung übereinander gelegt werden. Dieser Arbeitsschritt erfolgt in der SPR-Software.

Die in der SPR-Software übereinander gelegten Injektionen können dann in die Scrubber-Software transportiert werden (untere Abb.). In dieser erfolgt der computerunterstützte Abgleich der einzelnen Injektionen auf einen gemeinsamen Nullpunkt, sowohl auf der x- als auch auf der y-Achse. Der Nullpunkt der x-Achse definiert dabei den einheitlichen Startpunkt der Injektionen. Der Abgleich in y-Richtung ist wichtig, da die Brechungsindexänderung vor und nach der Injektion als Differenz  $\Delta\mu\text{RIU}$  ermittelt

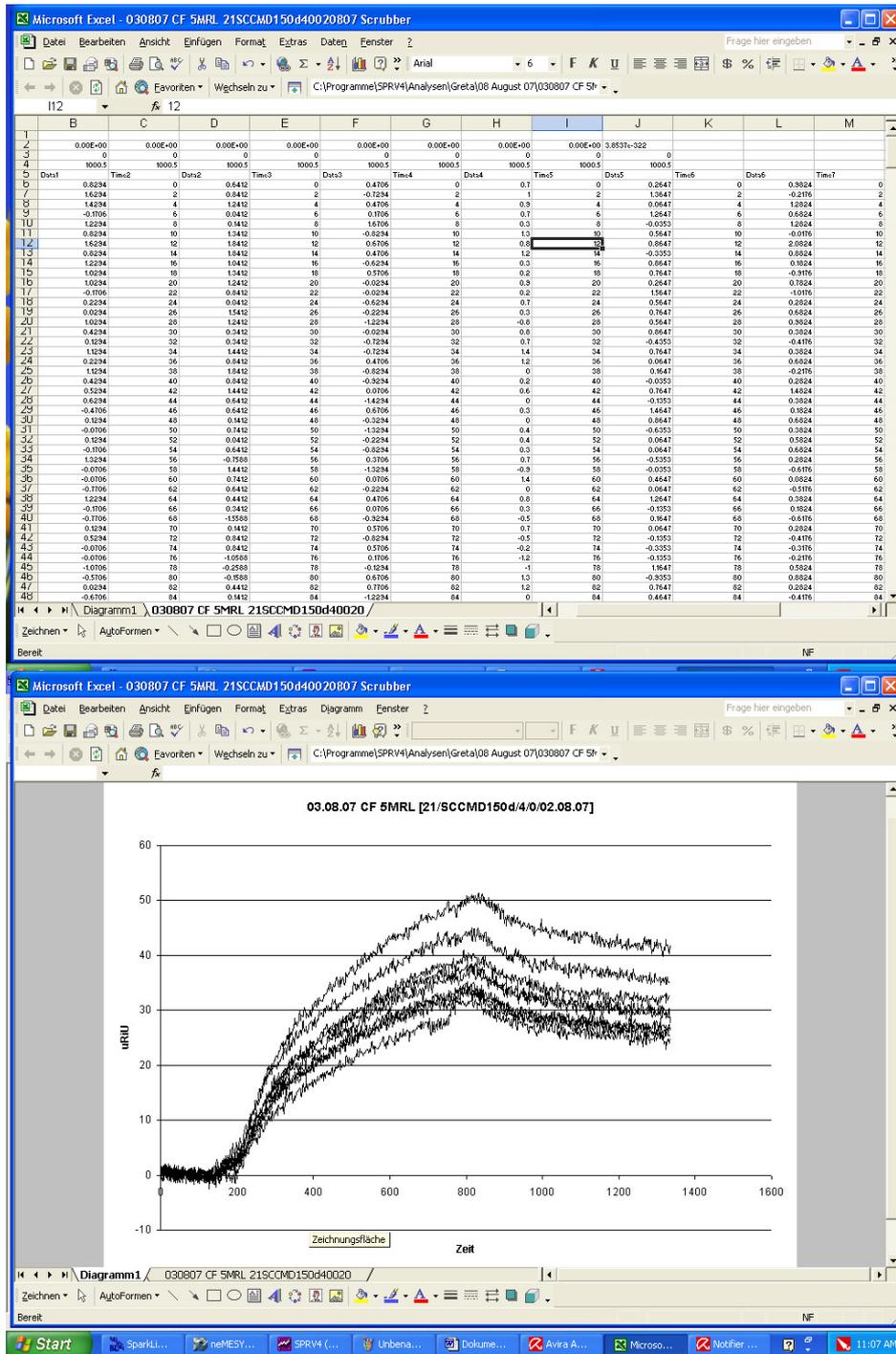


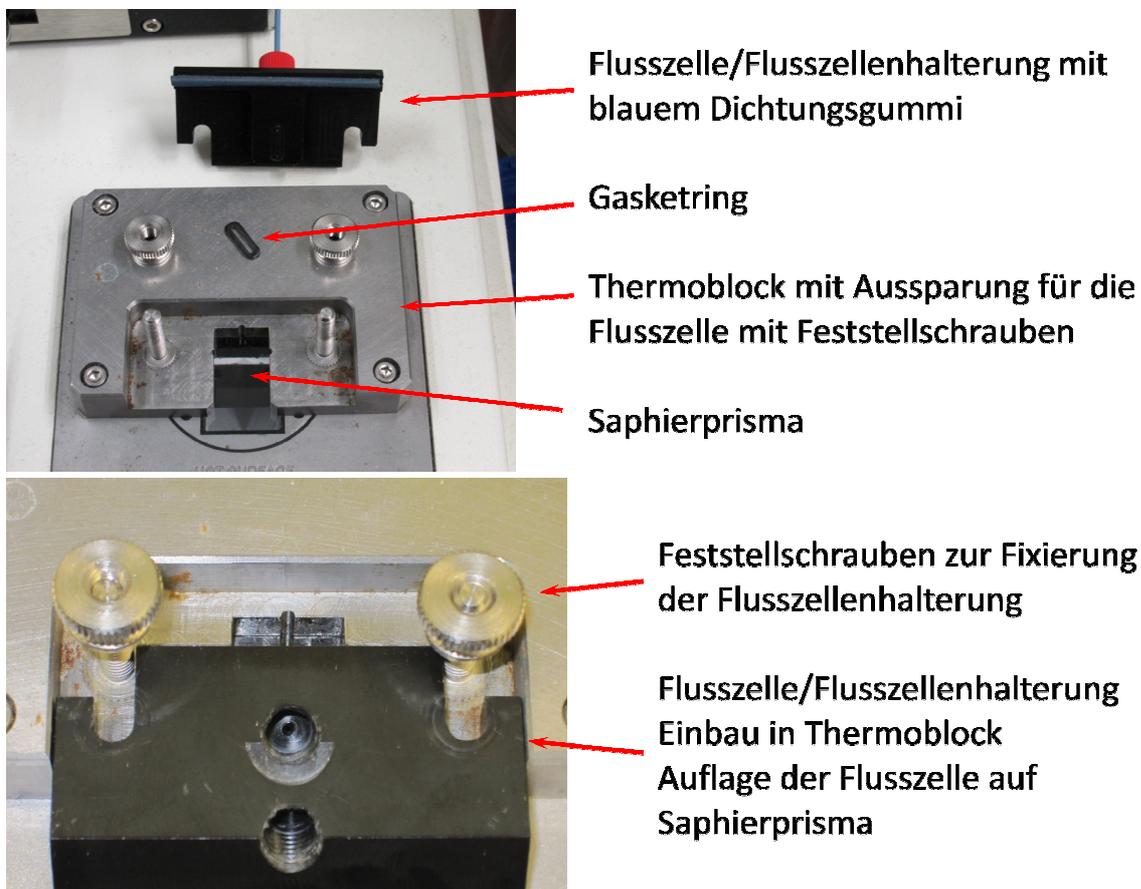
Abbildung 14: Screenshot der entstehenden Exceldatei

Die in der Scrubber-Software abgeglichenen Injektionen können im Anschluss in eine Exceldatei transportiert werden. In dieser stehen die Daten zur Auswertung zur Verfügung. Zum Einen können die Daten graphisch dargestellt werden (untere Abb.), wie sie in der SPR-Software enthalten wurden. Zum Anderen liegen in der Exceldatei die gesamten einzelnen Datenmesspunkte vor. Zur genauen Datenauswertung können im Folgenden alle Messpunkte der einzelnen Injektionen zu einem definierten (frei wählbaren) Zeitpunkt herangezogen und verglichen werden. Hierbei wird in der Regel der Injektionsstartpunkt (Nullpunkt) mit einem Messpunkt am Injektionsende verglichen. Da die Daten zum Injektionsbeginn auf der y-Achse auf einen gemeinsamen Nullpunkt gesetzt wurden, geben die einzelnen Messpunkte jeweils bereits die Brechungsindexänderung in  $\mu\text{RIU}$  an.

Ein weiteres Update der SPR Software (Version SPR4 V4.0.16c) bot zusätzlich die Möglichkeit der Aufnahme des SPR-Minimums (log-file) und der damit verbundenen Kontrolle des korrekten Chipeinbaus bzw. der Verschiebung des SPR-Minimums nach Immobilisierung.

### 3.1.2. SPR-Komponenten

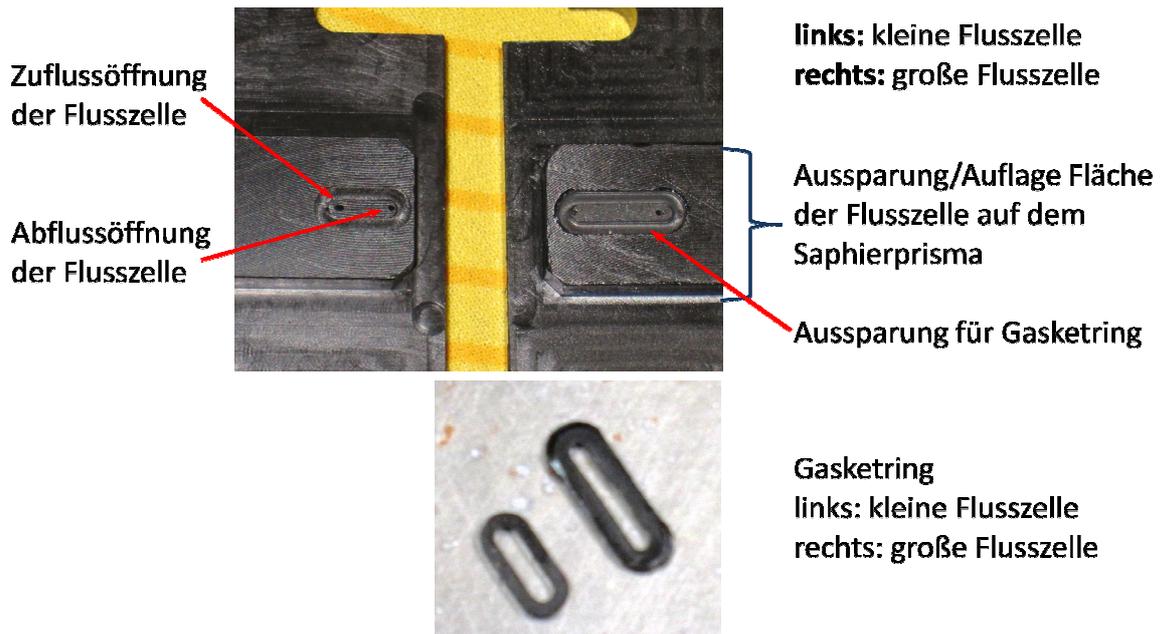
Mittelpunkt eines SPR-Gerätes ist die Messeinheit, welche sich aus einer Lichtquelle (LED, Filter, Polarisator), welche p-polarisiertes Licht ausstrahlt, einem Saphirprisma, einem Sensorchip und einer Flusszelle in einer Flusszellenhalterung zusammensetzt [Abbildung 15]. Die Messeinheit ist in einen Metallthermoblock eingefasst und wird auf eine definierte Temperatur (25°C) temperiert, sodass sich keine Messungenauigkeiten der Brechungsindices durch Temperaturschwankungen ergeben. Der festgelegte maximale Rahmen der Schwankungen liegt bei  $\pm 0,01$  °C. Außerhalb dieser Grenzen greift das Gerät korrigierend ein. Der genaue Temperaturverlauf ist in der SPR-Software (SPR\_V4016c) für den aktuellen Lauf abrufbar und mit diesem auch archivierbar.



**Abbildung 15: Messeinheit der SPR, Thermoblock mit Saphirprisma inklusive Flusszellenhalterung**

Im Zusammenspiel zwischen Sensorchipgröße und Flusszellengröße ergeben sich verschiedene Einbauvarianten und damit unterschiedliche Verwendungsmöglichkeiten einzelner Sensorchips bzw. ihrer Chipoberflächen.

Die Größe des Prismas (12x12 mm) und die Aussparung für die Flusszellenhalterung beschränken die maximale SPR-Sensorchip-Größe auf eine Breite von 12 mm. Zum Einbau stehen zwei unterschiedlich große Flusszellen zur Verfügung, eine große mit den Maßen 9x1,5 mm und eine kleine mit 6x1,5 mm (Abbildung 16).

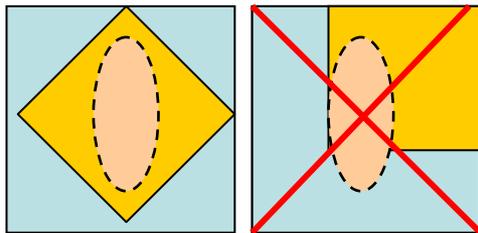


**Abbildung 16: Flusszellenhalterung mit Flusszelle, kleine und große Variante mit den entsprechenden Gasket-Ringen**

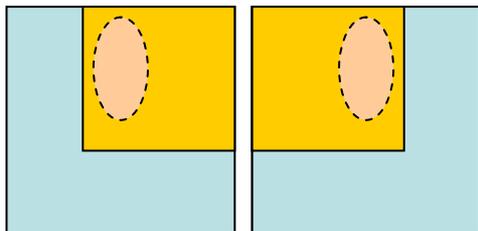
Beim Einbau des Sensorchips wird zur Sicherung des optischen Kontaktes bzw. der optischen Verbindung zwischen Saphirprisma und dem Glas des Sensorchips Dispersionsöl verwendet. Versuche, alternativ zum verwendeten Dispersionsöl mit einer Silikonfolie zu arbeiten, ergaben keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Die minimale Dicke der im Handel erhältlichen Silikonfolie betrug 0,5 mm, was sich als zu hoch herausstellte. Beim Einbau der SPR-Chips wird dabei der größte Druck durch den die Flusszelle umgebenden Gasket-Ring ausgeübt, die Silikonfolie wird an entsprechender Stelle gedrückt und gibt an den nicht unter Druck stehenden Stellen nach, sodass sich eine Spannung aufbaut, welche zum Zerschlagen des SPR-Chips führt. Daher wurde bei allen weiteren Arbeiten Dispersionsöl verwendet. Dabei erwies sich bei der SPR-Sensorchip-Größe von 12x12 mm die Verwendung von 0,5 bis 0,8  $\mu\text{L}$  Dispersionsöl als vorteilhaft, beim Einbau eines 9x9 mm SPR-Chips hingegen ein geringeres Volumen (0,3 - 0,5  $\mu\text{L}$ ). Zuviel Dispersionsöl führte dazu, dass dieses sich auf dem Prisma ausbreitet und sich an den Seiten des SPR-Sensorchips auf die Oberfläche des Chips saugt, dort die Messungen beeinflusst und eine Weiterverwendung des Chips unmöglich macht. Der Gasket-Ring dichtet die Flusszelle in der Flusszellenhalterung auf dem Sensorchip ab (Abbildung 16).

Bei einer SPR-Chip-Größe von 12x12 mm wird die Verwendung der großen Flusszelle als optimal angesehen, da dann eine größere Chipoberfläche zur Immobilisierung und anschließender Analytdetektion zur Verfügung steht. Weiterhin wird die mögliche Kontaktzeit zwischen Probenlösung und Chipoberfläche durch das größere Volumen der Flusszelle (900 nL) erhöht.

Bei einem SPR-Chip geringer Größe, z.B. 9x9 mm, und Verwendung der großen Flusszelle wird der Chip in der Diagonalen auf das Prisma gelegt. Unter Nutzung der kleinen Flusszelle ergeben sich zwei weitere Einbauvariationen. Dann ist ein Einbau an dem jeweiligen linken bzw. rechten Rand des Prismas möglich (Abbildung 17). Dies bietet den Vorteil, dass der SPR-Chip nach dem Einbau und der Verwendung auf der rechten Prismaseite nochmals auf der linken Prismaseite eingebaut und dort erneut belegt werden kann. Allerdings erfordert diese Art des Einbaus die Verwendung der kleinen Flusszelle, da eine Dichtigkeit mit der großen Flusszelle nicht mehr erreicht werden kann. Es kommt in diesem Fall zu keinem vollständigen Abschluss der Flusszelle durch den Gasket-Ring (Dichtungsring) auf dem Sensorchip.



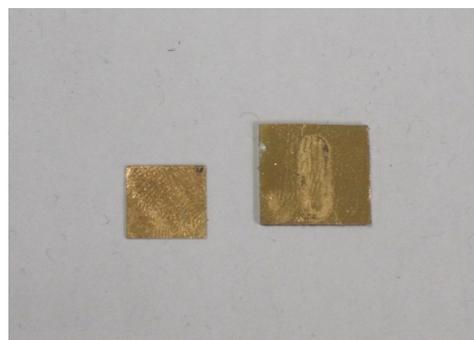
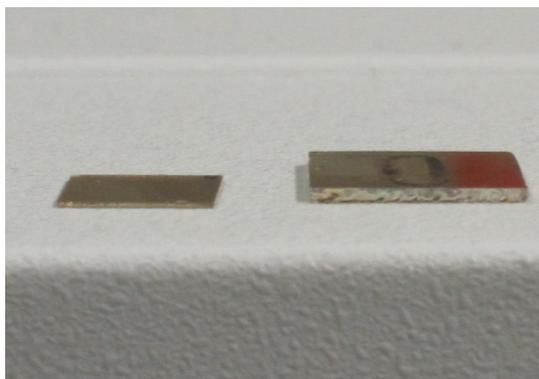
Verwendung der großen Flusszelle bei einem 9x9 mm SPR-Chip



Verschiedene Einbauvarianten eines 9x9 mm SPR-Chips bei Verwendung der kleinen Flusszelle

**Abbildung 17: schematische Darstellung des Prismas und den verschiedenen SPR-Chip Einbauvarianten eines SPR-Chips 9x9 mm (orange); dargestellt: Prismafläche in blau, Flusszelle in beige**

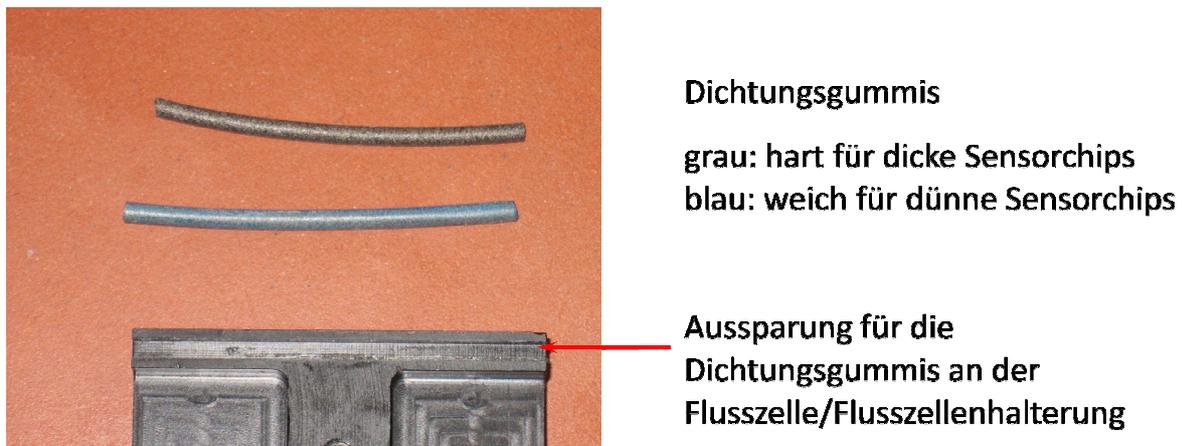
Nach dem Einbau des SPR-Chips und dem Aufsetzen der Flusszelle wird diese gleichmäßig mit zwei Schrauben festgezogen (vergleiche Abbildung 15). Die Gleichmäßigkeit ist für eine optimale Druckverteilung durch den Gasket-Ring auf dem Chip wichtig, damit dieser nicht zerbricht.



**Vergleich der Sensorchips Seiten- und Aufsicht  
links jeweils: Xantec-Sensorchips, dünn, Abmaß 9x9 mm  
rechts jeweils: Reichert-Sensorchips, dick, Abmaß 12x12 mm**

**Abbildung 18: Sensorchip-Vergleich bezüglich der Größe und der Dicke**

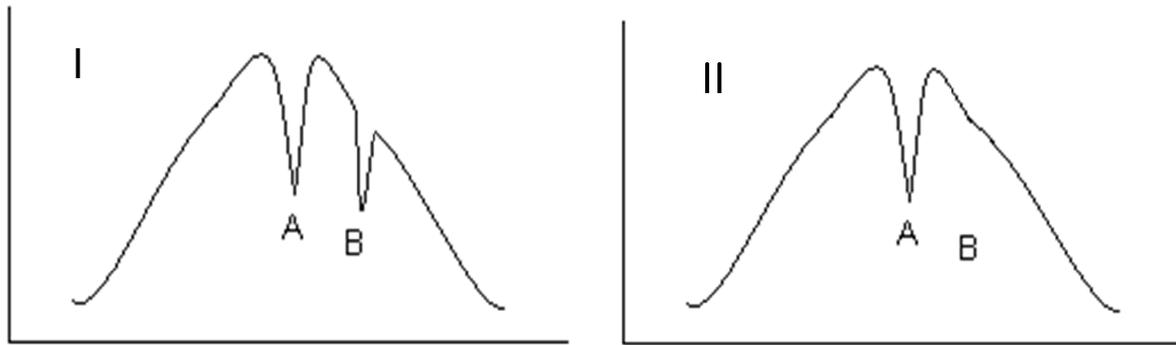
Je nach Dicke der Glasschicht des Sensorchips ist ebenfalls die Verwendung des Dichtungsgummis an dem Flusszellenaufsatz zu beachten (Abbildung 18). Bei dünneren Glasschichten, wie die der Xantec Sensorchips (circa 0,3 mm), ist die weichere Dichtung zu nutzen, da diese stärker nachgibt und damit eine vollständige Abdichtung zum Prisma bzw. dem umgebenden Thermoblock ermöglicht. Die Sensorchips der Firma Reichert hingegen weisen eine dickere Glasschicht von etwa 1 mm auf, sodass bei diesen die festere Dichtung genutzt werden kann (Abbildung 19). Die Dichtungen stellen dabei das planare Aufsetzen der Flusszellenhalterung auf das Saphirprisma sicher und damit auch das planare Aufliegen der Flusszelle auf dem Sensorchip.



**Abbildung 19: Dichtungsgummis der Flusszellenhalterung zum Saphirprisma bzw. Thermoblock**

Um das Auftreten von Luftblasen zu vermeiden, wird unter Pufferfluss die Kapillarverbindung vom Autosampler unter leichtem Druck an die Flusszelle geschraubt. Dies erfolgt mit einem Fluss von 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Bei höheren Flüssen besteht die Möglichkeit bzw. wurde beobachtet, dass an die Goldoberfläche gebundene Polymerketten kollabieren und sich nicht mehr aufrichten.

Die Überprüfung des Einbaus erfolgt im Anschluss direkt an dem SPR-Gerät. Bei erfolgreichem Einbau liegt das ablesbare Resonanz-Minimum (Resonance minimum pixel number) bei 2700-2900. In der graphischen Darstellung an dem SPR-Gerät ist neben dem eventuell auftretenden Mismatch-Minimum das SPR-Minimum, welches bei circa  $32^\circ$  liegt, sichtbar (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** schematische Darstellung der SPR Anzeige des SPR Winkels ( $32^\circ$ ) zur Überprüfung des richtigen Chipeinbaus A = Mismatch-Minimum, B = SPR-Minimum, x-Achse: Resonanz Winkel; y-Achse: Reflexionsgrad; I: richtig eingebauter Chip; II: falsch eingebauter Chip

Das Mismatch-Minimum entsteht durch den Brechungsunterschied zwischen dem Saphirprisma und dem Glaschip. Das Auftreten dieses Minimums ist abhängig von der Art des Glaschips und entsteht nur bei den Sensorchips der Firma Reichert, welche eine dickere Glasschicht (1 mm) besitzen, nicht bei denen der Firma Xantec (0,3 mm).

Bei einem fehlerhaften Einbau des Sensorchips mit der beschichteten Oberfläche nach unten oder dem Auftreten einer Luftblase zwischen dem Prisma und dem Chip oder zwischen Chip und Flusszelle fehlt das SPR-Minimum (Abbildung 20).

### ***3.2. Endurance Autosampler***

Der Endurance Autosampler der Firma Spark Holland wird von der Firma Reichert als Alternative zur manuellen Injektionseinheit angeboten. Dieser Autosampler kann sowohl direkt am Gerät als auch über eine mitgelieferte Software (Sparklink Lite 1.10) über einen PC betrieben werden. Auf die problematische Kommunikation zwischen den Softwarekomponenten der einzelnen Geräte wird in Abschnitt 4.7. eingegangen.

Der Autosampler bietet die Möglichkeit, den Probenhalter über die Plattenhalterung und ein Peltierelement im Bereich zwischen  $4\text{ }^\circ\text{C}$  und  $40\text{ }^\circ\text{C}$  zu temperieren, um wärmeempfindliche Injektionslösungen wie Antikörperlösungen z.B. auf Raumtemperatur zu halten. Die Temperierung auf  $4\text{ }^\circ\text{C}$  war ungeeignet, da es zu einer starken Kondenswasserbildung des Wassers der Raumluft an der Plattenhalterung führte. Durch die Temperierung wird ebenfalls gewährleistet, dass die Injektionslösungen annähernd die Temperatur der Messzelle aufweisen. Bei der Verwendung von Mikrotiterplatten wird die eingestellte Temperatur direkt über die Plattenhalterung übertragen. Hingegen gewährleistet bei Verwendung von Vials ein Metallplattenteller, in welchen die Vials eingestellt werden, eine bessere Temperaturübertragung. In den durchgeführten Arbeiten wurde eine Temperatur von  $20\text{ }^\circ\text{C}$  als Arbeitstemperatur gewählt. Diese liegt somit etwas unterhalb der Messzellentemperatur von  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . Bedingt durch eine schlechtere Übertragung der Temperatur von der Metallplattenhalterung auf die Kunststoffmikrotiterplatten ergab sich für die Injektionslösungen

somit in etwa die Temperierung auf die Messzelltemperatur. Dies ist wichtig, da der Brechungsindex der Lösungen und damit das Messsignal temperaturabhängig sind.

Die Möglichkeit, sowohl mit Mikrotiterplatten als auch mit Vials zu arbeiten, bietet ein breites Spektrum an möglichen Injektionsvolumina (1-1000 µL). Die obere Volumengrenze ergibt sich durch das Volumen der verwendeten Autosamplerspritze, einer 1 mL Spritze mit Stahlkolben und Schraubanschluss der Firma Kloehn, Las Vegas, USA. Die untere Volumengrenze ergibt sich durch die genutzte Injektionsart. Drei Injektionsarten sind wählbar: Full Loop, Partial Loop und die Pick-Up Injektion. Die dabei verwendbaren maximalen Injektionsvolumina lassen sich anhand der in Tabelle 4 dargestellten Angaben abschätzen.

**Tabelle 4: maximale Injektionsvolumina in Abhängigkeit von der Injektionsart**

Injektionsart	maximales Injektionsvolumen	benötigtes Probenvolumen
Full Loop	Probenschleifenvolumen	doppeltes Probenschleifenvolumen
Partial Loop	50% des Probenschleifenvolumens	50% des definierten Probenschleifenvolumens*
Pick-Up	(Probenschleifenvolumen – 3x needle tubing Volumen)/2	ergibt sich aus Probenschleifenvolumen**

\*Es ist möglich, dem Gerät ein anderes Probenschleifenvolumen zu definieren, als das tatsächlich vorhandene. Somit ist es möglich das tatsächliche Probenschleifenvolumen vollständig zu nutzen ohne zu viel Probenlösung zu benötigen. In der Arbeit wurde daher oft mit einer Probenschleife mit einem tatsächlichen Volumen von 90 µL gearbeitet, wobei dem Gerät eine Probenschleife von 260 µL definiert wurde. Dies ermöglichte in der partial loop Injektionsart ein maximales Arbeitsvolumen von 130 µL. (Arbeitsvolumen: 90 µL Probenschleifenvolumen + 40 µL Spülvolumen, Erklärung siehe Abbildung 23)

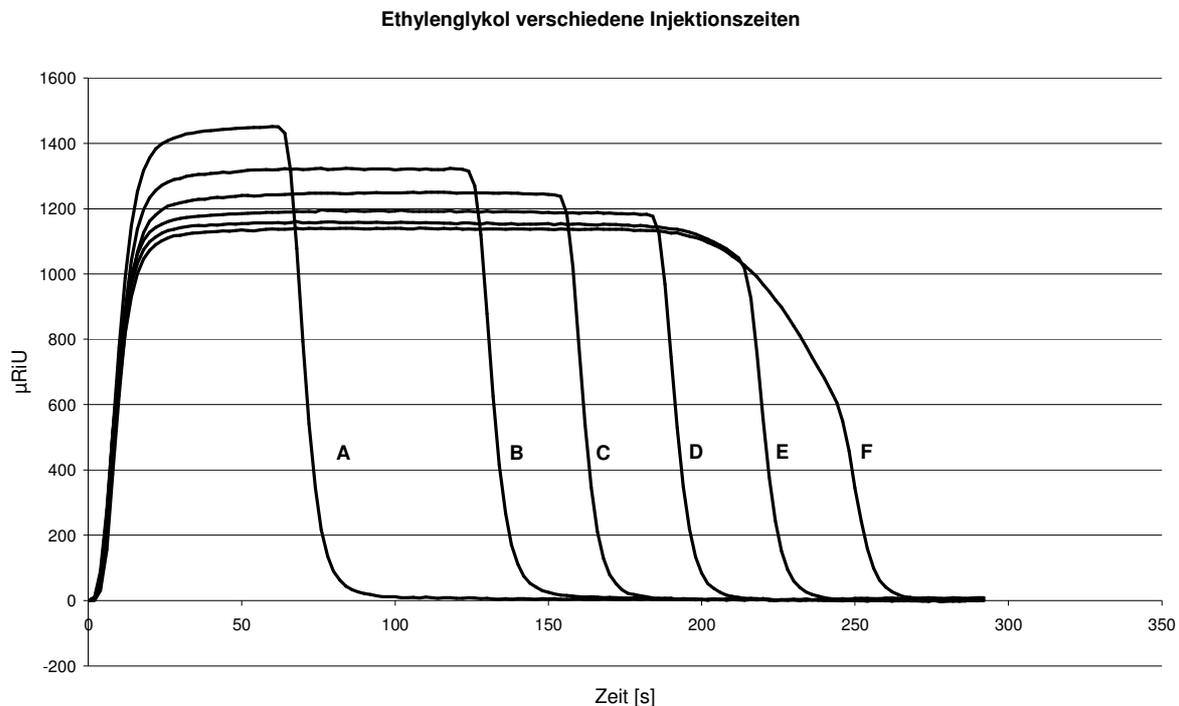
\*\*Das *needle tubing* Volume (15 µL) ist dabei das Volumen der feinen Kapillare zwischen Rheodyneventil und Injektionsnadel.

Die für die jeweilige Verwendung (Mikrotiterplatte oder Vial) optimalen Arbeitsparameter wurden ermittelt und unter Punkt 3.2.1. ausführlich dargestellt.

Die Signalformen der erhaltenen Sensorgramme sind stark abhängig von der Injektionsart und der Injektionszeit. Diese sollten klar, deutlich und scharf abgetrennt sein und sind nur mit einer optimal gewählten Injektionszeit zu erhalten.

Die wählbare Injektionszeit ist hierbei abhängig vom Fluss und vom Volumen der Probenschleife. Dies wird in Abbildung 21 verdeutlicht. Hier sind verschiedene Injektionszeiten

unter Beibehaltung eines konstanten Flusses und gleichem Probenschleifenvolumen dargestellt. Es ändern sich somit durch die unterschiedlichen Injektionszeiten nur die injizierten Volumina.



**Abbildung 21: Injektionen von Ethylenglykol in Puffer; Chip: Xantec, SC C150D; Belegung: Ceftriaxon-Antikörper; Probenschleifenvolumen 90 µL (def. 260 µL); Fluss 25 µL/min, Pumpe Harvard Apparatus**

**A: partial loop mit wash 1 min, B: partial loop mit wash 2 min, C: partial loop mit wash 2,5 min, D: partial loop mit wash 3 min, E: partial loop mit wash 3,5 min, F: partial loop mit wash 4 min; „mit wash“ definiert hierbei jeweils einen zusätzlichen Spülschritt der Injektionsnadel nach der Injektion**

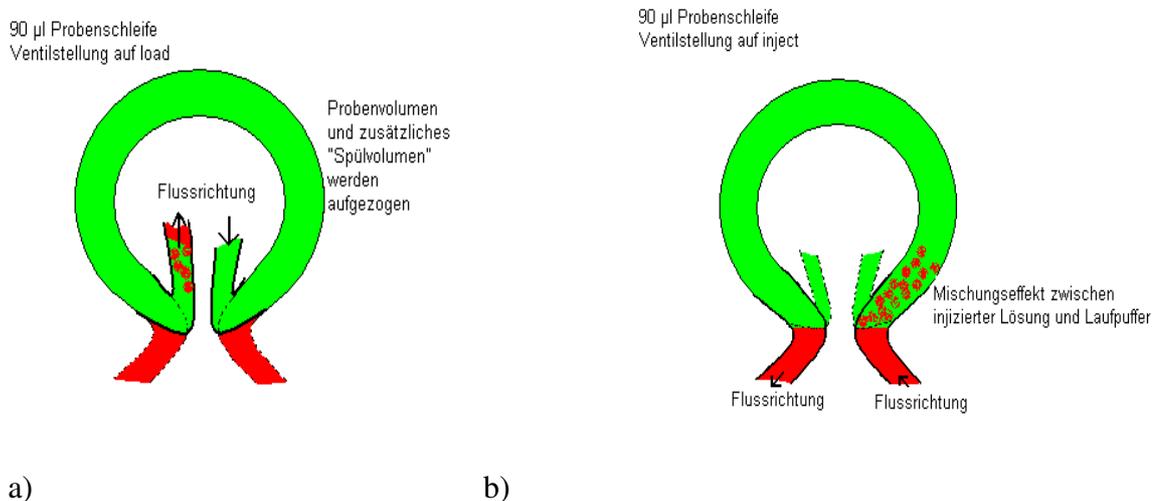
Angestrebt wird eine möglichst lange Injektionszeit, damit die Kontaktzeit bzw. das Kontaktvolumen zwischen der injizierten Lösung und der Chipoberfläche möglichst maximal ist. Dies entspricht in der Rückstandsanalytik oft einer maximalen Ausnutzung des vorhandenen Probenvolumens. Wird hierbei die Injektionszeit zu lang gewählt, treten Mischungseffekte zwischen der injizierten Lösung und dem Laufpuffer auf. Dies führt zu langsam abnehmenden Signalen (siehe Abbildung 21, E-F). Diese Mischungseffekte treten je nach Fluss und Innendurchmesser der Probenschleife circa bei den letzten 5-10 µL der injizierten Lösung auf. Analoge Signale sind auch bei geringen Flüssen als dem hier verwendeten 25 µL/min zu beobachten. Jedoch nehmen die Mischungseffekte mit zunehmendem kleinerem Fluss ab (kleiner 10 µL/min). Dies resultiert aus dem geringeren Druck innerhalb der Kapillaren durch die geringere Flussrate.

Aus dem Sensorgramm kann die maximale Injektionszeit, bei der ein stabiles Signalniveau noch vorhanden ist, abgelesen werden. Klare und deutliche Signale bei einem Fluss von

25  $\mu\text{L}/\text{min}$  sind nur mit einer Injektionszeit von weniger als 3 Minuten erreichbar (siehe Abbildung 21, A-D). Das heißt, für die Injektion können 75  $\mu\text{L}$  (3 min x 25  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) der 90  $\mu\text{L}$  Probenschleife genutzt werden. Da bei kleineren Flussraten diese Mischungseffekte geringer ausfallen, können größere Volumina genutzt werden (10  $\mu\text{L}/\text{min}$  etwa 85  $\mu\text{L}$ ; 2,5  $\mu\text{L}/\text{min}$  gesamtes Volumen der 90  $\mu\text{L}$  Probenschleife).

Bei der Wahl der maximalen Injektionszeit, abgelesen nach der Ventilschaltung aus dem Sensorgramm, ist jeweils die Zeit zwischen der Ventilschaltung und dem Signalbeginn zu beachten. Diese Zeitverzögerung zwischen Injektionsstart und Signalstart ist abhängig vom Fluss, dem Innendurchmesser und damit dem Volumen der Zuleitung zwischen Ventil und Flusszelle (etwa 6  $\mu\text{L}$ , rote Kapillare i.D.: 0,12 mm; L: 53 cm). Bei einem Fluss von 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  entspricht diese Zeitverzögerung etwa 20 Sekunden. Von diesen Resultaten ausgehend wird bei einem Fluss von 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  als optimale Injektionsdauer eine Zeit von 2,5 - 3 Minuten für die Analysen gewählt.

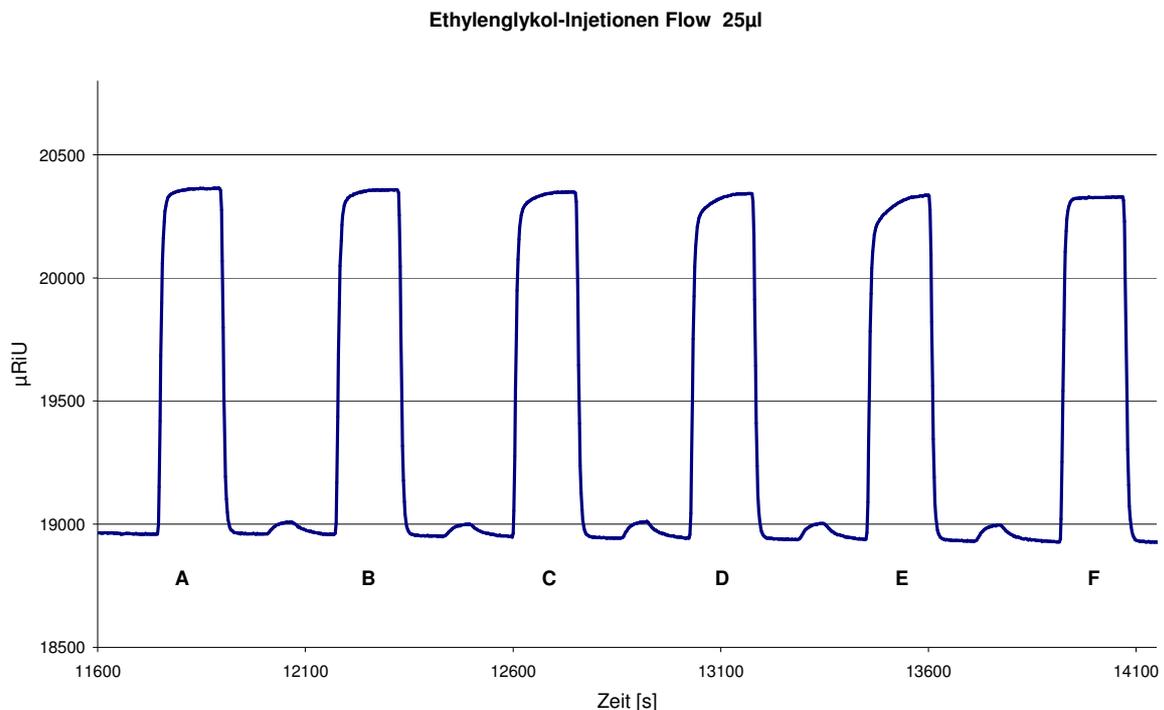
Ferner ist zum Erreichen einer guten, deutlichen Signalform nicht nur die Zeit der Injektion zu berücksichtigen, die Injektionsart muss ebenfalls auf das Volumen der Probenschleife abgestimmt werden, da ein Mischungseffekt nicht nur im hinteren Signalbereich, sondern auch im vorderen Bereich auftreten kann. Dies ist in Abbildung 22 schematisch und in Abbildung 23 im Sensorgramm dargestellt.



**Abbildung 22: a) Mischungseffekt im vorderen Probenschleifenbereich b) Mischungseffekt im hinteren Probenschleifenbereich; grün entspricht der zu injizierenden Lösung, rot dem Laufpuffer**

Damit dieser Mischungseffekt im vorderen Bereich des Signals nicht oder möglichst gering auftritt, muss das von der Autosamplerspritze aufgezogene Volumen größer sein als das Volumen der Probenschleife bzw. sollte über dem zu verwendenden Injektionsvolumen liegen. In Abbildung 23 sind vergleichend verschiedene Injektionsarten dargestellt, wobei zu erkennen ist, dass eine optimale Signalform im vorderen Bereich zu erhalten ist, sobald eine Injektionsart

gewählt wird, bei der die Probenschleife mit einem Mehrfachen ihres Volumens gespült wird (Abbildung 23, F). Dies erfordert jedoch ein hohes Probenvolumen und ist gerade bei nur kleinen zur Verfügung stehenden Volumina sehr ungünstig. Es empfiehlt sich daher eine Injektionsart zu verwenden, bei welcher das benötigte Volumen gering gehalten werden kann, gleichzeitig aber der Mischungseffekt im vorderen Bereich weitestgehend eliminiert wird. Bei einem Probenschleifenvolumen von 90  $\mu\text{L}$  erwies sich eine Injektionsart mit einem Volumen, welches sich aus dem Probenschleifenvolumen und einem „Spülvolumen“ von 40  $\mu\text{L}$  zusammensetzt, als optimale Möglichkeit. Bei der verwendeten Probenschleife von 90  $\mu\text{L}$  würde dies einer Injektionsart mit einem Volumen von 130  $\mu\text{L}$  entsprechen, welches als minimales Arbeitsvolumen angenommen werden sollte, damit der Mischungseffekt zwischen dem Laufpuffer und der injizierten Lösung zum Signalbeginn möglichst gering bzw. eliminiert ist. Geringere Volumina zum Spülen erwiesen sich als ungünstiger, wie Abbildung 23 A – E zeigen.

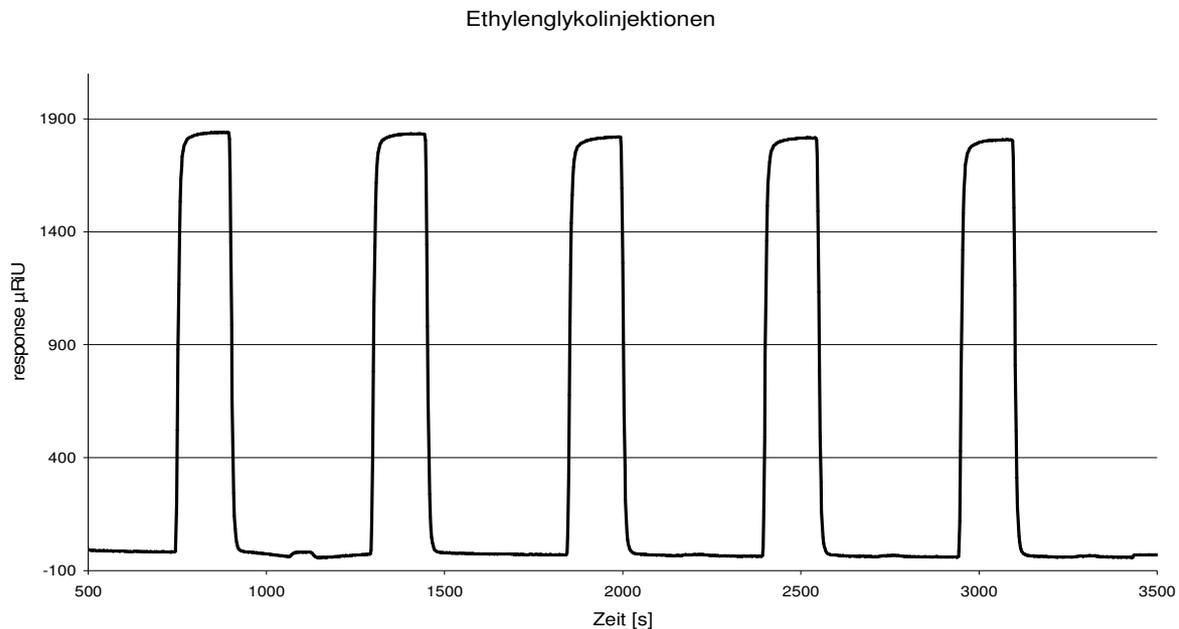


**Abbildung 23: Ethylenglykolinjektionen, Injektionsdauer 2,5 min; Fluss 25  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; Probenschleifenvolumen 90  $\mu\text{L}$  (def. 260  $\mu\text{L}$ ); A: 130  $\mu\text{L}$  partial loop, B: 120  $\mu\text{L}$  partial loop, C: 110  $\mu\text{L}$  partial loop, D: 100  $\mu\text{L}$  partial loop, E: 90  $\mu\text{L}$  partial loop, F: 260  $\mu\text{L}$  full loop (entspricht einem aufgezogenen Volumen von 520  $\mu\text{L}$ ); zwischen den Ethylenglykolinjektionen erfolgten jeweils Pufferinjektionen**

Injektionsarten mit leicht höherem Spülvolumen von über 40  $\mu\text{L}$  brachten keine wesentlichen Signalverbesserungen, würden aber zu Lasten des höheren Probenverbrauchs gehen.

Dass dieses Spülvolumen ausreichend und die Injektionen somit reproduzierbar sind, auch bei Wiederholungsanalysen, ist in Abbildung 24 dargestellt. Hierbei wurde die partial loop

Injektionsart mit einem Volumen von 130  $\mu\text{L}$  und einer Injektionsdauer von 2,5 min verwendet, wobei jeweils reine Pufferinjektionen als Spülschritte eingefügt sind.



**Abbildung 24: Ethylenglykolinjektionen, Fluss 25  $\mu\text{L}/\text{min}$ , Probenschleifenvolumen 90  $\mu\text{L}$  (def. 260  $\mu\text{L}$ ); Injektionsart: 130  $\mu\text{L}$  partial loop 2,5 min**

Ausgehend von diesen Ergebnissen ergibt sich somit ein Mindestprobenvolumen im Vial bzw. in der Kavität von 185  $\mu\text{L}$ . Diese setzen sich aus den ermittelten 130  $\mu\text{L}$ , dem 45  $\mu\text{L}$  Totvolumen des Autosamplers zwischen Autosamplernadel und Rheodyneventil und einem Restvolumen im Vial bzw. der Mikrotiterplatte von 10  $\mu\text{L}$  zusammen. Das Restvolumen wurde in Versuchen ermittelt und stellt das zu verbleibende Mindestvolumen dar, um Luftblasen während des Aufziehens der Probe zu vermeiden. (siehe Injektionsnadeltiefe bei Mikrotiterplatten Abschnitt 3.2.1.2.)

Der Endurance Autosampler ist relativ wartungsfrei, einziger Schwachpunkt ist die Probeninjektionsnadel. Als Probeninjektionsnadel wurden zwei verschiedene Varianten getestet, eine Kunststoffinjektionsnadel (Peek-Nadel) und eine Silica-coated/steel Injektionsnadel.

Die Peek-Probennadel zeichnet sich dabei durch hohe Flexibilität und einen geringeren Anschaffungspreis aus. Ein weiterer Vorteil der hohen Flexibilität der Kunststoffinjektionsnadel liegt in ihrer geringen Anfälligkeit gegen äußere Einwirkungen wie bei Blockierung der Beweglichkeit des Plattentellers. In diesem Fall trifft die Nadel nicht das Septum sondern den Deckel. Hierbei gibt die Injektionsnadel nach und verbiegt sich, wird aber nicht beschädigt. Nachteilig wirkt sich diese Eigenschaft dagegen nach einer gewissen Zeit aus,

da sich bei längerer Verwendung bzw. Nutzung minimale Pufferkristallreste an der Außenwand absetzen und damit die Peeknadel in der Führungsnadel (Prepuncturing-Nadel) blockiert, sodass sich diese beim Versuch der Injektion verbiegt. Sie ist deshalb der Silica-coated/steel-Probenadel in der Robustheit im Langzeitbetrieb unterlegen.

Der beschriebene Nachteil konnte bei der steel-Injektionsnadel nicht festgestellt werden, was zu einer Verminderung an Fehlinjektionen bzw. Fehlläufen und einer längeren Nutzungsdauer führte. Jedoch ist sie aufgrund ihrer Starrheit anfällig gegen äußere Widerstände. Weiterhin wurden hierbei schneller Verstopfungserscheinungen durch Pufferkristalle beobachtet, welche jedoch durch ein Spülen des Autosamplersystems mit Wasser ein Mal wöchentlich zusätzlich zu den normalen Wartungsintervallen vermieden werden kann.

Der Einbau bzw. Wechsel der Probennadeln als auch der Prepuncturing-Nadel konnte ohne Probleme durchgeführt werden.

### **3.2.1. Probengefäße**

Der Endurance Autosampler ist in der Lage mit Vials und mit Mikrotiterplatten als Probengefäß zu arbeiten.

Für die jeweilige Verwendung sind die optimalen Einstellungen bezüglich Injektionsnadeltiefe und Füllgeschwindigkeit der Pumpenspritze zu ermitteln. Die Injektionsnadeltiefe wird in Millimetern angegeben und bezeichnet den Abstand zwischen Injektionsnadel und Plattenhalterung. Die Füllgeschwindigkeit wurde mit einem Scalefactor (Multiplikationsfaktor) von 0,5 und einer Spritzengeschwindigkeit der Stufe „low“ als optimal sowohl für Vials als auch für Mikrotiterplatten ermittelt. Bei der verwendeten Autosamplerspritze mit einem Volumen von 1000  $\mu\text{L}$  ergibt sich damit folgende Füllgeschwindigkeit.

Geschwindigkeitsstufe „low“ für eine 1000  $\mu\text{L}$  Spritze bedeutet eine Füllgeschwindigkeit von 1255  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Handbuch Endurance Autosampler). Multipliziert man diese mit den eingestellten Scalefactor von 0,5 erhält man die reale Füllgeschwindigkeit von 627,5  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Bei weiteren getesteten Einstellungen z.B. eine Spritzengeschwindigkeit der Stufe „high“, ergaben sich Probleme durch kleinste Luftblasen beim Befüllen der Spritze.

#### **3.2.1.1. Vials**

Für die Verwendung von Vials steht ein Plattenteller für 48 Vials zur Verfügung, wobei der Außendurchmesser der Vials maximal 12 mm betragen und die maximale Höhe (inkl. Deckel) 47 mm nicht übersteigen darf. Diesen Anforderungen entsprechen die gängigen Glasvials mit einem Volumen von 1,5 ml.

Zunächst wurde mit Weißglas-Vials der Firma CS Chromatographie gearbeitet. Hierbei konnten bei Injektionen des Laufpuffers deutliche Signale beobachtet werden, obwohl keine zu erwarten waren, da hierdurch keine Brechungsindexänderung vorliegen sollte (Abbildung 25).

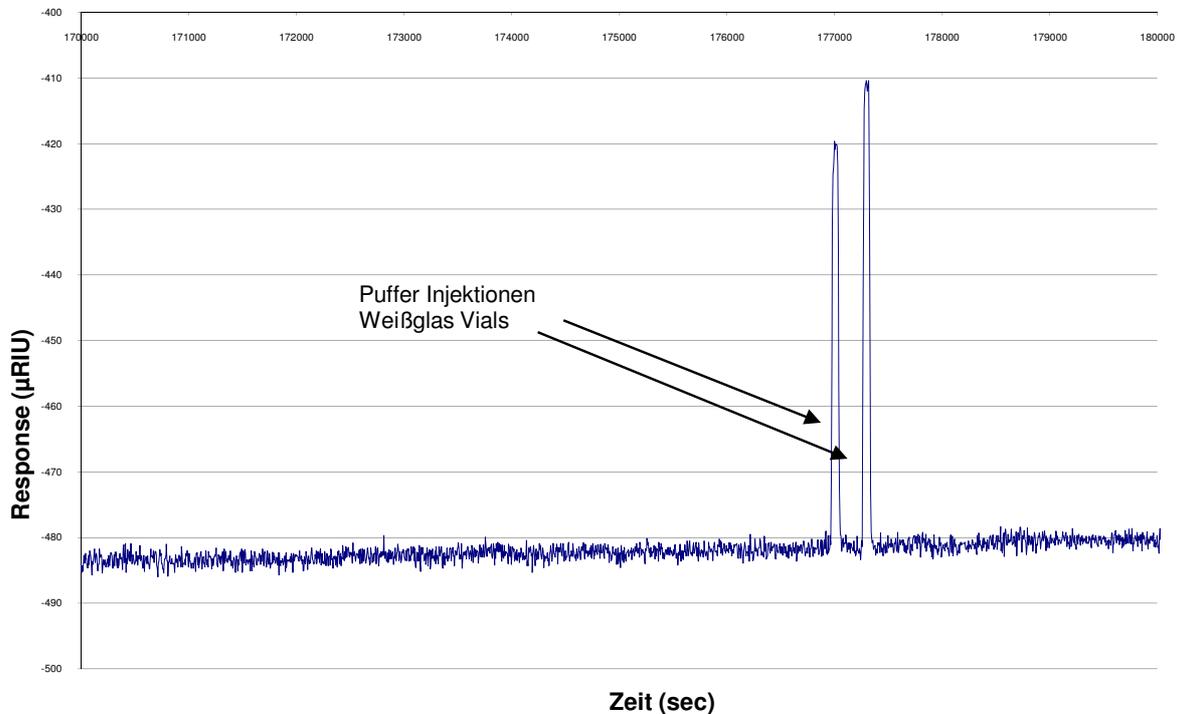


Abbildung 25: Pufferinjektion aus Glasvials CS Chromatographie

Diese Signale wurden auch bei Injektionen aus Braunglas-Vials beobachtet. Die Signale waren jedoch nicht reproduzierbar, weder in der Signalhöhe noch in der Richtung der SPR-Winkel-Verschiebung (positive und negative Signale). Daher wurde eine herstellungsbedingte Verunreinigung der Probenvials vermutet. Spülen der Probenvials mit Isopropanol, Wasser und Puffer führte zu einer Verbesserung bis hin zum Ausbleiben der Signale.

In Rücksprache mit der Firma Reichert wurden als Alternative Glasvials der Firma Agilent getestet. Diese erzeugten keine Signale durch Brechungsindexänderungen während einer Pufferinjektion. Durch die Zeit- und Lösemittel-Einsparung konnte der etwas höhere Anschaffungspreis ausgeglichen werden.

Die Einstellung für die Injektionsnadeltiefe wurden bei Inbetriebnahme durch Ryan [36] mitgeteilt. Sie beträgt bei der Verwendung von Vials 3 mm. Die Injektionsnadel stoppt 3 mm über dem Plattenhalter, kurz über dem Glasboden, der genauso wie die Dicke des Plattentellerbodens mit einbezogen werden muss.

### 3.2.1.2. Mikrotiterplatten

Bei der Verwendung von Mikrotiterplatten (MP) stehen 96-well Platten der hohen bzw. niedrigen Ausführung und 384-well Platten zur Verfügung. Wegen des Arbeitsvolumens von 175  $\mu\text{L}$ , d.h. des vorgelegten Volumens von mindestens 185  $\mu\text{L}$  (siehe Kapitel 3.2.), und des notwendigen Abstandes zur Verschlussfolie wurde mit den hohen 96-well Platten gearbeitet. Diese fassen ein Volumen von 360  $\mu\text{L}$  pro Kavität. Eine Nadeltiefe von 1 mm führte zu einer Fehlermeldung, da die Nadel auf dem Mikrotiterplattenboden aufsetzte. Ein Arbeiten mit einer Nadeltiefe von 2 mm war ohne Probleme möglich. Diese Nadeltiefe wurde demnach als Arbeitseinstellung gewählt, da hierdurch auch das vorgelegte Volumen (Füllhöhe) bei 185  $\mu\text{L}$  gehalten werden konnte.

Im Zuge der Umstellung auf die Mikrotiterplatte wurde auch eine Anpassung der Pufferinjektionen zum Spülen der Probenschleife vorgenommen. Puffer wurde in den vier Transportvials, welche im hinteren Bereich des Plattenhalters positioniert werden können, vorgelegt. Der Puffer wurde zwar über die Probenschleife aufgezogen, im Anschluss aber direkt in den Abfall abgelassen, ohne Ventilschaltung auf „*inject*“. Auch hierfür wurden die bestmöglichen Einstellungen bezüglich der Nadeltiefe, der Füll- und Ablassgeschwindigkeit und des benötigten Spülvolumens ermittelt. Die bereits ermittelte Nadeltiefe von 3 mm für Glasvials im Plattenteller konnte übernommen werden. Die Füll- und Ablassgeschwindigkeiten sind über den Autosampler regelbar. Für die Füllgeschwindigkeit zum Spülen der Probenschleife wurde Stufe 1 (500  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) gewählt, da es bei höheren Geschwindigkeiten zur Luftblasenbildung kam. Beim Ablassen konnte mit einer Geschwindigkeitsstufe von 5 (7680  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) gearbeitet werden. Das Spülvolumen sollte dabei mindestens 450  $\mu\text{L}$  betragen. Das in einem Transportvial enthaltene Volumen von 10,5 mL Puffer reichte somit für 20 Spülvorgänge. Bei der Nutzung aller vier Transportvials waren somit 80 Spülvorgänge möglich.

Eine weitere Modifikation in der Methodenprogrammierung ermöglichte das Spülen der Autosamplerspritze ohne die Nutzung der Transportvials. Dazu wurde ein Methodenschritt programmiert, welche die AS-Spritze und die Probenschleife mit einem Volumen von 1000  $\mu\text{L}$  und zusätzlich die AS-Spritze von außen mit 300  $\mu\text{L}$  spült ohne das eine Ventilschaltung erfolgte. Das benötigte Pufferlösungsvolumen wurde dabei direkt aus dem Laufpuffervorrat entnommen. Damit waren unbegrenzt viele Spülschritte in der Programmierung des „*runtable*“ möglich.

### ***3.3. Pumpen und Pumpenspritzen***

In den Anfangsjahren der SPR-Technologie wurde sie hauptsächlich zu kinetischen Analysen genutzt, immer mehr jedoch auch zu Konzentrationsbestimmungen in der Rückstandsanalytik [8, 33, 35, 37, 38]. Durch diese veränderte Anwendung ergeben sich neue Anforderungen an die Leistung einzelner Gerätekomponenten, vor allem an die verwendeten Pumpensysteme. Wird bei kinetischen Analysen vorrangig mit Systemflüssen größer als 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  gearbeitet [39], sind bei der Rückstandsanalytik niedrigere und hochkonstante Flüsse im Bereich von 2,5 - 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  erforderlich. Daher ist eine hinreichende Leistungsfähigkeit des Pumpensystems entscheidend, wobei folgende Anforderungen an die Spritzenpumpe und die verwendete Pumpenspritze erfüllt sein sollten:

- niedriger Systemfluss, welcher von der Pumpe konstant und reproduzierbar betrieben wird,
- schnelle und konstante Druckeinstellung im gesamten System nach der Spritzenbefüllung und
- eine lange Betriebszeit mit einer einzigen Pumpenspritzenbefüllung.

#### **3.3.1. PHD 22/2000 Harvard Apparatus**

Die Pumpe PHD 22/2000 der Firma Harvard Apparatus wurde als Standardpumpe für die Nutzung mit dem SR7000 durch die Firma Reichert vertrieben.

Die Pumpe wird nicht über eine Computersoftware, sondern direkt am Gerät gesteuert. Zusätzlich ist diese Pumpe in der Lage, ein Signal von der Autosampler-Software zu empfangen. Dadurch ergeben sich folgende Programmierungsmöglichkeiten. Zum Einen ist ein programmierbarer *auto refill* zur Wiederbefüllung der Pumpenspritze möglich. Dazu wird ein *refill* durchgeführt und es wird ein Volumen programmiert, nach dessen Erreichen der nächste *refill* der Pumpenspritze erfolgen soll. Zum Anderen ist es möglich in der Autosampler Software einen Programmschritt zu programmieren, der einerseits die Signalgebung zum *refill* an die Pumpe beinhaltet, wie auch eine Wartezeit, bis dieser abgeschlossen ist. Die Dauer eines *refills* ist dabei vom Volumen der Pumpenspritze und der wählbaren, von der Software vorgegebenen *refill*-Geschwindigkeit abhängig. [Vergleiche Pumpenspritzen Punkt 3.3.4.] Im Mittel ergab sich eine Wartezeit von einer Minute.

Die erste Programmierungsmöglichkeit (*auto refill*) erwies sich als optimal um längere Standzeiten ohne Analysen, z.B. Wochenenden, zu überbrücken. Während einer Analysenserie hingegen war diese Möglichkeit nicht vorteilhaft, da der *auto refill* nur volumen-, aber nicht zeitgesteuert abläuft und somit auch während einer Injektion oder eines Analysenlaufes erfolgen kann.

Für den Analysenbetrieb wurde auf die zweite Möglichkeit (Steuerung über Autosampler) zurückgegriffen. In diesem Fall konnte die maximale Betriebszeit mit einer

Pumpenspritzenfüllung je nach Fluss berechnet und ein rechtzeitiger entsprechender Programmierschritt im *runtable* eingefügt werden. Der *runtable* umfasst alle programmierten Injektionen, Waschzeiten und Wartezeiten einer Analyse. Dieser wird vor Laufbeginn geschrieben und kann als Exceldatei gespeichert werden.

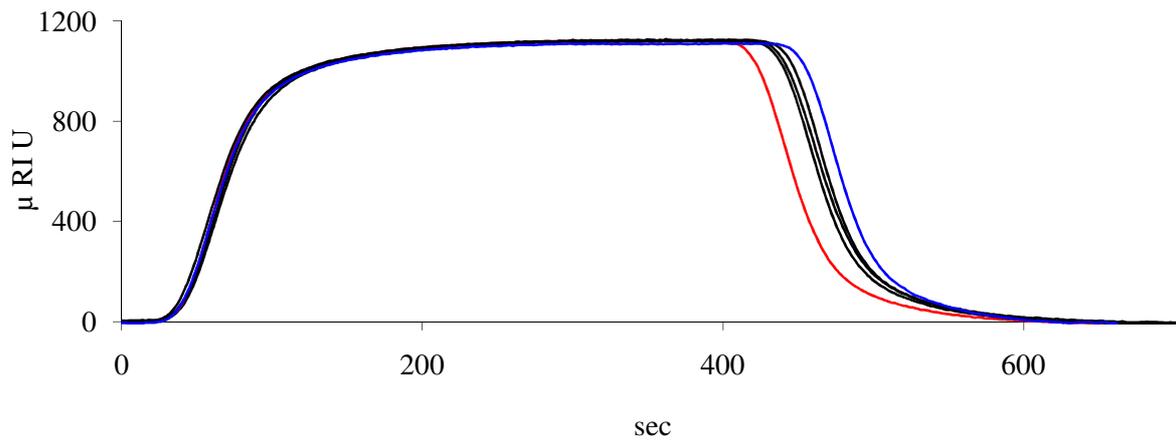
Alle in diesem System verwendeten Pumpenspritzen werden bei dieser Pumpe durch Einspannen in die dafür vorgesehene Halterung fixiert. Dies war jedoch teilweise nur mit einem gewissen Geschick und Kraftaufwand möglich. Für den Einbau waren Spritzen mit einem in der Geometrie festgelegten Kolbenstempel und ausgeprägten Schmetterlingsflügeln am Spritzenkörper erforderlich (Abbildung 26).



**Abbildung 26: exemplarische Pumpenspritze mit klar definiertem Kolbenstempel und ausgeprägten Schmetterlingsflügeln**

Bei der Verwendung dieser Standardpumpe traten Probleme bei niedrigen Flüssen (kleiner  $10 \mu\text{L}/\text{min}$ ) auf. Diese konnten nicht konstant gefördert werden, was sich in unterschiedlichen Injektionszeiten und damit unreproduzierbaren Signallängen widerspiegelte (Abbildung 27). Dieses Problem trat unabhängig vom Typ der Pumpenspritze auf, bei einigen getesteten Spritzen jedoch verstärkt. [Vergleiche 3.3.4.]

Ein weiterer Nachteil entstand durch das verwendete Zweiwegeventil zwischen Pumpe und Pufferreservoir bzw. Autosampler, da dieses bei der Nutzung der Pumpe mit kleinen Systemflüssen und damit geringeren Systemdrücken keine vollständige Dichtigkeit aufwies.



**Abbildung 27: Pumpe Harvard App. PHD 22/2000; Injektionen 1% Ethylenglykol in Puffer; 90  $\mu\text{L}$  Probenschleife (def. 260  $\mu\text{L}$ ); 8 min Injektionsdauer; Anzahl Injektionen 6; Fluss 2,5  $\mu\text{L}/\text{min}$**

Da diese Probleme nicht gelöst werden konnten, wurde nach 13 Monaten die neMESYS Pumpe von Cetoni durch die Firma Reichert als Austauschpumpe angeboten.

### 3.3.2. neMESYS Cetoni

Die Pumpe neMESYS der Firma Cetoni (Korbußen, Deutschland) wird über eine Computersoftware gesteuert und besitzt im Gegensatz zur Harvardpumpe ein elektronisch gesteuertes Zwei-Wege-Ventil, welches sowohl bei kleinen Flüssen von  $2,5 \mu\text{L}/\text{min}$  als auch bei sehr hohen Flüssen von größer  $1 \text{ mL}/\text{min}$  eine hohe Dichtigkeit aufweist.

In dem separaten Computerprogramm dieser Pumpe können im Gegensatz zur Harvardpumpe verschiedene Spritzenspezifikationen (z.B. Spritzenvolumina, Füllgeschwindigkeit) gespeichert werden, sodass diese schnell abrufbar sind. Dieses Programm kommuniziert jedoch nicht mit der Software des Autosamplers, wodurch die mögliche Arbeitszeit auf eine Pumpenspritzenfüllung beschränkt wird und dann ein manuell gesteuerter *refill* durchgeführt werden muss, der zur Wiederbefüllung der Spritze mit gleichzeitiger Schaltung des Zwei-Wege-Ventils führt. Die Möglichkeit der Programmierung eines *auto refills* ist bei dieser Pumpe nicht gegeben.

Wie auch im System mit der Harvardpumpe wird in diesem System werksseitig die für salzhaltige Lösungen geeignete Pumpenspritze (Hamilton 1005 TLL SL 5 mL) von Hamilton eingesetzt. Im Vergleich zur Harvardpumpe kann durch die Anbringung einer Schraube an der Pumpenspritzenhalterung die Spritze nicht durch Einspannen in eine Halterung, sondern durch Verschraubung fixiert werden (Abbildung 28).

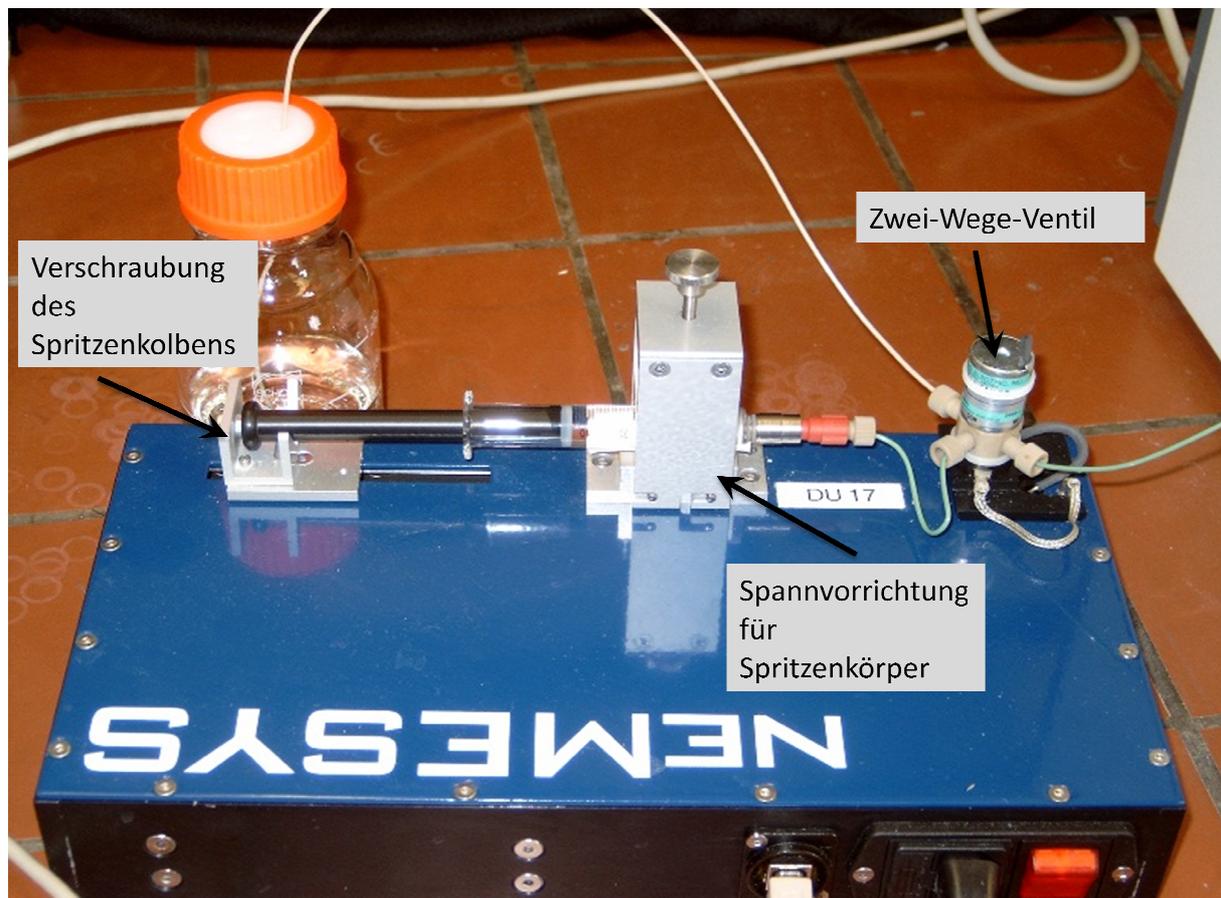
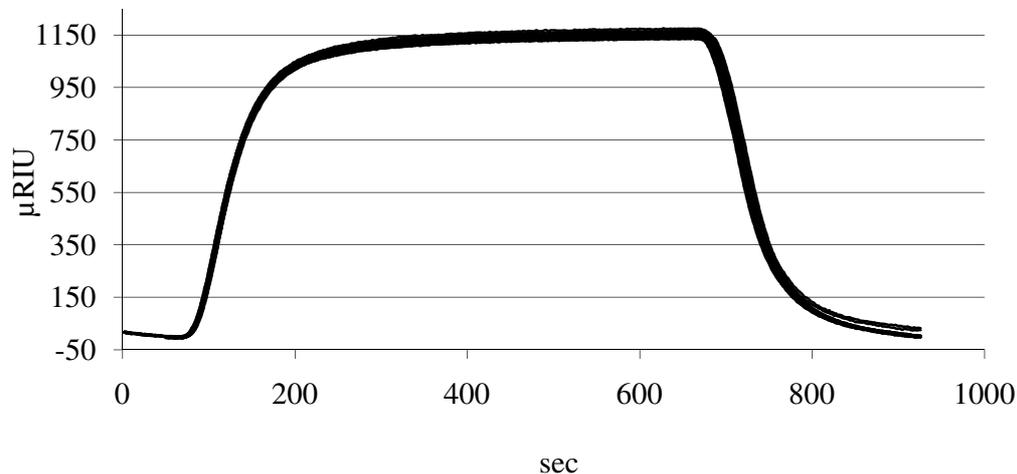


Abbildung 28: neMESYS Pumpe; Cetoni, Deutschland

Diese Pumpe fördert im Vergleich zur Harvardpumpe auch niedrige Systemflüsse und liefert reproduzierbare und konstante Signallängen, wie in Abbildung 29 zu sehen ist.



**Abbildung 29:** neMESYS Pumpe Firma Cetoni; Injektionen 1% Ethylenglykol in Puffer; 90 µl Probenschleife (def. 260 µL); 8 min Injektionsdauer; Anzahl Injektionen 10; Fluss 2,5 µL/min

Nach etwa acht Monaten im routinemäßigen Laborbetrieb mit dieser Pumpe traten jedoch Schwierigkeiten durch eine instabile Basislinie auf.

Als Verursacher der Basislinienprobleme konnten bis auf die Pumpe alle weiteren Systemkomponenten durch Tests ausgeschlossen werden. Diese Tests umfassten unter anderem den Wechsel der Pumpenspritze, Fittings und Kapillaren und die Überbrückung des Zwei-Wege-Ventils. Der Grund für die Probleme an der Pumpe konnte jedoch nicht eindeutig lokalisiert werden. Die Tests ergaben jedoch eine leichte Verstärkung der Probleme durch das elektronisch gesteuerte Zwei-Wege-Ventil, das heißt, dieses konnte die auftretenden Druckschwankungen nicht ausgleichen, sondern verstärkte sie. Die Basislinienprobleme traten dabei nicht nur im unteren Flussbereich (2-10 µL/min) sondern über den gesamten Arbeitsbereich (2-100 µL/min) auf.

Da weiteres Arbeiten mit dieser Pumpe nicht mehr möglich war, wurde diese gegen eine neu entwickelte Pumpe (SR7500) der Firma Reichert ausgetauscht. Diese war ausgehend von den Erfahrungen mit der Harvard- als auch mit der neMESYS-Pumpe und den in der Rückstandsanalytik gestellten Anforderungen zwischenzeitlich entwickelt worden.

### 3.3.3. SR7500 Reichert

Die Pumpe SR7500 der Firma Reichert wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Harvard speziell für die Anforderungen in der Rückstandsanalytik hergestellt. Diese Pumpe verfügt, zusätzlich zur Steuerung über eine PC-Software, über eine eingebaute Computereinheit, welche es der Pumpe ermöglicht den Pumpenbetrieb aufrecht zu erhalten, wenn die PC-Software bzw. der Computer abgeschaltet werden, sodass ein kontinuierlicher Fluss auch dann gewährleistet ist, wenn der Computer abstürzt oder abgeschaltet wird. Die Programmierung bzw. die Änderung dieser ist jedoch nur über die PC-Software möglich. Die PC-Software zur Pumpensteuerung ist dabei sehr einfach gehalten. Nach einer Initialisierung der Pumpe und der Auswahl einer Spritzengröße (500, 1000 bzw. 5000  $\mu\text{L}$ ) gibt es die Möglichkeit des einfachen Laufes, eines *refills* oder die Programmierung eines *auto refills*. Dieser wird dann automatisch nach Entleerung der Spritze durchgeführt. Hierbei ist die Pumpe in der Lage eine vollständige Entleerung der Spitze durch die Kolbenposition zu erkennen. Die Pumpensoftware verfügt nicht über eine Kommunikationsmöglichkeit mit dem Autosampler. Da der *refill* jedoch mit einer Geschwindigkeit von 25000  $\mu\text{L}/\text{min}$  bei einer Spritzengröße von 500  $\mu\text{L}$  durchgeführt werden kann, ergeben sich keine Störungen während einer Injektion (*refill*-Dauer 0,02 min). Die wählbaren Flussraten gemäß Herstellerangaben für die verwendete 500  $\mu\text{L}$  Spritze liegen dabei im Bereich von 0,1 bis 3000  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Dabei hängt die maximale Flussrate zusätzlich von den Verwendung findenden Kapillaren im System ab. [Vergleiche Seite 103] Bei dieser Pumpe wird eine spezielle, sehr kurze Pumpenspritze von Hamilton verwendet. Diese Pumpenspritze weist Vorteile zu den bisher verwendeten auf, auf welche unter dem Punkt 3.3.4. Pumpenspritzen näher eingegangen wird.

#### 3.3.3.1. SR7500 Nr. 1

Nach Inbetriebnahme der Pumpe traten sofort Probleme auf. Sobald ein automatischer *refill* programmiert und gleichzeitig mit einer Flussrate von kleiner als 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  gearbeitet wurde, lief der Puffer nicht durch die *Outlet*-Kapillare der Pumpe Richtung Autosampler bzw. Flusszelle, sondern direkt über die *Inlet*-Kapillare zurück ins Pufferreservoir. Dies führte dazu, dass keine Signale nach einer Injektion einer 140 mM Natriumchloridlösung in PBS-Puffer in der SPR detektiert wurden, da im System kein Fluss vorhanden war. (Es erfolgte ein Wechsel von Ethylenglykolinjektionen zu Natriumchloridinjektionen – NaCl ist Bestandteil des PBS-Puffers, da diese noch reproduzierbarer waren und das System nicht durch andere Moleküle zusätzlich verunreinigt wurde.) Beobachtet wurde die fehlerhafte Flussrichtung des Puffers sowohl bei einem Fluss von 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  als auch bei einem Fluss von 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  nach einem automatisch durchgeführtem *refill*. Bei Flüssen über 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  konnte dieses Problem nicht beobachtet werden.

Zunächst wurde der Arbeitsfluss mit Autosampler ohne Flusszelle geprüft. Dazu wurden verschiedene Arbeitsflüsse eingestellt und die Flussrichtung nach einem *refill* visuell ausgewertet. Beobachtet wurde der Fluss dabei mindestens jeweils 4 Minuten lang nach dem *auto refill*. Zwischen den einzelnen Messungen wurde durch eine Flusserrhöhung auf 250  $\mu\text{L}/\text{min}$  ein Fluss Richtung Autosampler (*Outlet*-Kapillare) sichergestellt.

Um Beschädigungen der Chipoberfläche durch erhöhte Flüsse zu vermeiden und die Flusszelle als Ursache ausschließen zu können, wurde die Zuflusskapillare aus der Flusszelle geschraubt und als Beobachtungspunkt für die Richtung *outlet* gewählt.

**Tabelle 5: Flussrichtungstest nach *auto refill* SR7500 Nr. 1**

programmierter Fluss [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Beobachtungen nach einem <i>refill</i> beim jeweils programmierten Arbeitsfluss
5	kein Fluss Richtung AS, sondern aus <i>Inlet</i> -Kapillare; nach Flussumstellung auf 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ Fluss Richtung AS
10	kein Fluss Richtung AS, sondern aus <i>Inlet</i> -Kapillare.; nach Flussumstellung auf 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ Fluss Richtung AS
15	kein Fluss Richtung AS, sondern aus <i>Inlet</i> -Kapillare; nach Flussumstellung auf 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ Fluss Richtung AS
20	kein Fluss Richtung AS, sondern aus <i>Inlet</i> -Kapillare; nach Flussumstellung auf 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ Fluss Richtung AS
25	Fluss Richtung AS, kein Rückfluss aus <i>Inlet</i> -Kapillare
30	Fluss Richtung AS, kein Rückfluss aus <i>Inlet</i> -Kapillare
50	Fluss Richtung AS (durch frühere Beobachtung bereits bestätigt)

Es konnte ermittelt werden, dass das Problem unabhängig von der Flusszelle (SPR) auftritt und erst ab einem Arbeitsfluss von  $\geq 25 \mu\text{L}/\text{min}$  das Problem nicht mehr zu beobachten ist.

Dann wurde der Arbeitsfluss auch ohne Autosampler geprüft, wobei als Beobachtungspunkt das Ende der orangefarbenen Kapillare (Zufluss zum AS) gewählt wurde. Auch hier konnte als Flussrichtung nach dem *refill* die Richtung *Inlet* festgestellt werden. Eine Behebung des Problems konnte dabei auch nicht durch die Erhöhung des hydrostatischen Rückdrucks erfolgen (Anheben des Pufferreservoirs).

Schließlich wurde vermutet, dass nicht der höhere 250  $\mu\text{L}/\text{min}$  Fluss, sondern die Impulsgebung durch die Durchführung des Stopp/Start-Befehles für die Pumpenfunktion das Problem behoben hat. Dies konnte in weiteren Versuchen bestätigt werden. Es war nicht notwendig den Fluss zu erhöhen um das Problem zu vermeiden, es reicht aus die Pumpe zu stoppen und neu zu starten. Daraus ergeben sich unpraktikable Arbeitsbedingungen, da entweder mit 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  und somit einem Fluss oberhalb der angestrebten Flussgeschwindigkeit ( $\leq 10 \mu\text{L}/\text{min}$ ) gearbeitet oder die Pumpe manuell bedient werden muss.

Durch Versuche im Labor des Herstellers konnte ein Fehler in der Programmierung der eingebauten Computereinheit der Pumpe festgestellt werden und zwar nur für niedrige, nicht aber für hohe Flüsse.

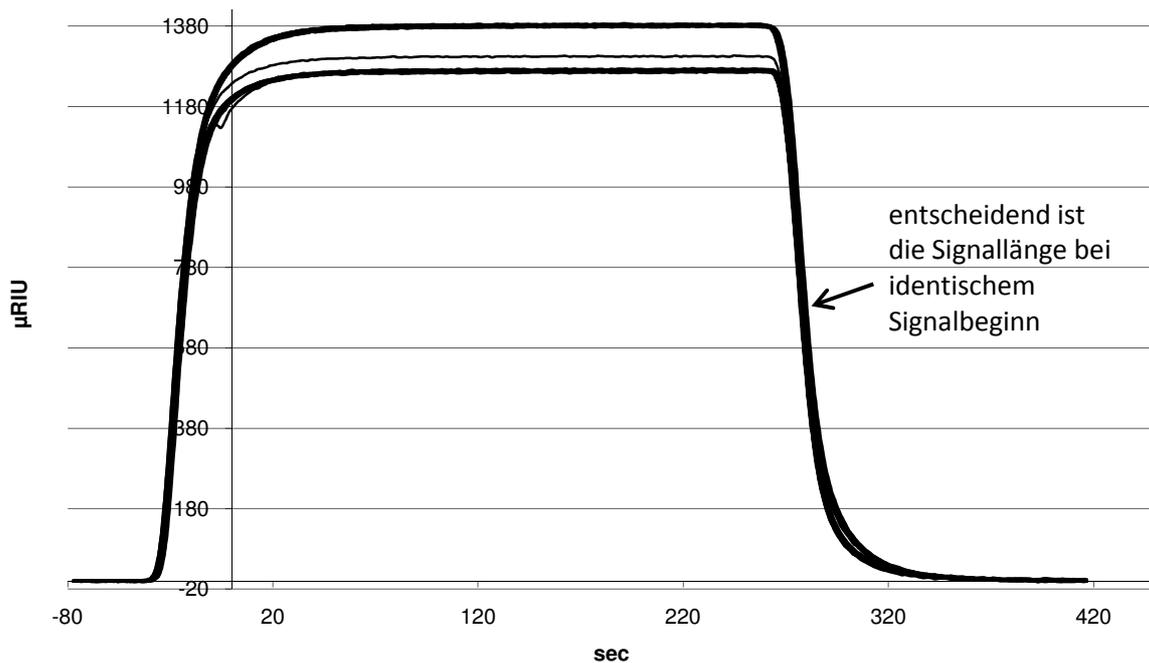
### **3.3.3.2. SR7500 Nr.2**

Es erfolgte ein Austausch der SR7500 Pumpe. Bei der Überprüfung der förderbaren Flüsse der zweiten gelieferten Pumpe wurde das oben beschriebene Problem nicht mehr beobachtet. Diese Pumpe funktionierte im gewählten Arbeitsbereich von 2 – 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Nach etwa einem Monat Gebrauch, wobei die Pumpe durch die Möglichkeit des automatischen *refills* im Dauerbetrieb genutzt wurde, trat jedoch ein neues Problem bei einem Neustart der Pumpe und der Software auf. Ein Neustart muss erfolgen, wenn der PC ausgeschaltet war und die Pumpe wieder über die PC-Software gesteuert werden soll. Der Neustart beinhaltet dabei auch einen Initialisierungsschritt. Während dieses Neustarts mit anschließender Initialisierung traten sehr laute Geräusche auf, welche sich akustisch auf die Pumpenmechanik zurückführen ließen. Die Geräusche traten jeweils bei der Ventilschaltung zwischen *refill* und *infuse* Stellung (Laufrichtung AS) auf. Die Ventilschaltung war vorher lautlos durch die Pumpe durchgeführt worden. Auch durch Abnahme der Pumpenverkleidung konnte der Grund für dieses Geräusch nicht lokalisiert werden. In Rücksprache mit dem Hersteller wurde jedoch weiter mit der Pumpe gearbeitet, wobei zunächst die Förderleistung, ausgedrückt durch die Reproduzierbarkeit der Signale und durch die Gesamtflussmenge, überprüft werden sollte.

Beim Neustart der Pumpe und der Software wies ein langsames Blinken der Statuslampe an der Pumpe auf einen Fehlerzustand hin. Ohne Veränderungen vorzunehmen, funktionierte der Neustart beim fünften Wiederholversuch und die Pumpe konnte mit der Software in Betrieb genommen und die Tests mit Natriumchlorid durchgeführt werden.

Hierzu wurden Natriumchloridinjektionen (140 mM in PBS-Puffer) bei Flüssen von 5 bzw. 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  durchgeführt und mit früher aufgenommenen Daten verglichen.



**Abbildung 30: NaCl 140 mM in PBS Puffer, Fluss 10 µL/min; 05.05.08 und 20.05.08; 90 µl Probenschleife (def. 260 µL)**

Dabei konnten keine Unterschiede im Signalverlauf bzw. der Signallänge beobachtet werden (Abbildung 30) und es wurde mit dieser Pumpe vorerst weitergearbeitet. Die geringen Höhenabweichungen ergeben sich durch kleine Unterschiede in der Einwaage des NaCl zum Laufpuffer. Eine exakte Einwaage ist hierbei nicht notwendig, da durch die Erhöhung des NaCl-Anteils im Puffer nur eine deutliche Brechungsindexänderung hervorgerufen werden sollte.

Die aufgetretenen Geräusche wurden im Verlauf der Zeit etwas leiser, waren aber stets vorhanden. Etwa sechs Wochen nach dem Auftreten der Geräusche wurden bei der Durchführung der Systemreinigung (Maintenance, siehe Anhang) eine Undichtigkeit am Pumpenventil und Rostspuren an dieser Austrittsstelle sichtbar. In Rücksprache mit dem Hersteller (Firma Reichert) wurde diese Pumpe zur Überprüfung eingesandt und gleichzeitig eine baugleiche Ersatzpumpe Typ SR7500 Nr.3 zur Verfügung gestellt, die bis zum Abschluss der Arbeiten dann störungsfrei über 12 Monate verwendet werden konnte.

### 3.3.4. Pumpenspritzen

Neben der Pumpe werden auch an die Pumpenspritzen hohe Anforderungen gestellt. Die Pumpenspritzen sollten folgende Eigenschaften aufweisen:

- robust sein, auch für den Dauerbetrieb,
- möglichst großes Füllvolumen und damit eine lange Betriebszeit ohne *refill*,
- hohe Einbaustabilität,
- hohe Festigkeit der Spritzenwandungen (Druckunempfindlichkeit nach *refill*) und des Kolbens,
- eine hohe Dichtigkeit auch bei großen Drücken aufweisen,
- hohe Resistenz gegenüber Puffersalzen.

Die verschiedenen Pumpenspritzen waren sowohl aus Glas als auch aus Kunststoff und wurden mit der PHD 22/2000 (Harvard Apparatus) getestet.

Von der Firma Reichert wurden verschiedene Glas- bzw. Kunststoffspritzen vorgeschlagen. Verwendung sollten Spritzen finden, welche ein möglichst langes Arbeiten ohne *refill* ermöglichen, um Unterbrechungen im Systemfluss zu minimieren, welche Verschiebungen bzw. Schwankungen der Basislinie hervorrufen. Des Weiteren müssen sich der Druck im System und damit auch der gewünschte Fluss schnell einstellen. Sonst werden Differenzen in den Signallängen beobachtet. Diese sind in der Regel umso stärker ausgeprägt, je niedriger der Fluss gewählt wird.

Die Bauart der Harvard Apparatus Pumpe war für ein Spritzenvolumen von mehr als 10 mL ungeeignet, da dann eine sichere Befestigung der Spritze nicht mehr erreicht wurde.

Es wurden mehrere Kunststoffspritzen verschiedener Hersteller (Braun, BD, Terumo) getestet (Tabelle 6). Bei der Verwendung von Kunststoffspritzen, die den Vorteil haben sehr kostengünstig zu sein, ergaben sich jedoch Probleme mit der benötigten schnellen Druckeinstellung nach dem *refill*. Da der Kunststoffkolben und die Spritzenwandungen relativ elastisch sind, dauerte es sehr lange, bis sich ein konstanter Druck und damit der voreingestellte Fluss im System wieder aufgebaut hatten. Dieses Problem wurde auch nicht durch ein vermindertes Spritzenvolumen gelöst (getestet 10 mL, 3 mL, 2.5 mL, 1 mL). Dies wurde getestet, da die Wandungen mit Abnahme des Spritzenvolumens etwas stabiler werden. Ein weiteres Problem bei der Verwendung von Kunststoffspritzen stellte die Dichtung des Kolbens dar (Abbildung 26), denn diese Dichtung löste sich nach einer Betriebszeit der Spritze von 2-3 Tagen von der Kolbenspitze ab, sodass die Spritze komplett erneuert werden musste. Zudem trat bei den Kunststoffspritzen teilweise eine unruhige Basislinie auf.

**Tabelle 6: Übersicht der getesteten Kunststoffspritzen (Hersteller und Volumina)**

Hersteller	Spritzenbeschreibung
BD	3 mL Syringe mit Luer-Lock Tip
	10 mL Syringe mit Luer-Lock Tip
Braun	Omrifix Einmalspritze Luer lock 10 ml
	Omrifix Einmalspritze Luer lock 5 ml
	Omrifix Einmalspritze Luer lock 2,5 ml
Terumo	Syringe U 40 Insulin 1 ml

Es wurde daher angenommen, dass Glasspritzen günstiger sind, um einen schnelleren konstanten Druckaufbau in der Spritze nach dem *refill* zu erreichen (Tabelle 7). Weiterhin sollten bei diesen Spritzen keine Probleme mit sich lösenden Kolbendichtungen auftreten.

Aus diesem Grund wurde eine Ganzglasspritze ohne separate Dichtung mit Luer-Lock-Metallkonus „Fortuna Optima“ mit einem Volumen von 5 mL getestet. Diese Spritze erwies sich für den Gebrauch in der Pumpe jedoch als ungeeignet, da bei höheren Flüssen ( $>10 \mu\text{L}/\text{min}$ ) ein so starker Druck in der Spritze auftrat, dass der Laufpuffer am Glasspritzenkolben vorbei gedrückt wurde und in die Pumpe lief. Auch niedrige Flüsse wurden mit dieser Spritze und einer Ersatzspritze nicht konstant gefördert, sodass bei einigen Probeninjektionen sehr starke Verdünnungen mit dem Laufpuffer auftraten und Probensignale nicht mehr erkennbar waren.

Ein weiterer Schwachpunkt bei der Verwendung der Fortuna Glasspritze wurde beim *refill* deutlich, da selbst bei der Durchführung des *refill* mit  $0,6 \text{ mL}/\text{min}$  (Fülldauer circa 8 Minuten) Luftblasen am Glaskolben vorbei in das System gezogen wurden. Die Anzahl der Luftblasen vergrößerte sich bei jedem weiteren *refill*, sodass die Spritze nicht mehr mit Laufpuffer sondern fast nur noch mit Luft gefüllt war. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde die ebenfalls vorliegende 10 mL Spritze dieser Firma nicht mehr getestet.

Von der Firma Reichert wurde weiterhin die Verwendung einer Spritze von VICI (Gas Syringe Serie C 2 mL) empfohlen. Hierbei handelt es sich um eine Glasspritze mit Stahlkolben und Teflondichtung. Der Schwachpunkt dieser Spritze war der in den Glaskolben eingeklebte Lueranschluss, welcher schon bei relativ geringen Flüssen von circa  $150 \mu\text{L}/\text{min}$ , die beim Spülvorgang benötigt werden, dem sich aufbauendem Druck nachgab und aus dem Glaskolben der Spritze geschoben wurde.

Die ebenso empfohlenen Spritzen der Firma Hamilton (Hamilton 1005 TLL 5 mL und 1002 TLL 2,5 mL) besitzen einen Glaskörper mit einem Teflon-beschichteten Aluminiumkolben, welcher mit einer Präzisionsdichtung aus Teflon versehen ist. Bei diesen Spritzen traten während der Nutzung unter dem vorhandenen Systemdruck Undichtigkeiten an der Kolbendichtung auf, sodass Puffer unter die Teflonummantelung des Aluminiumkolbens gelangte. Dieser kristallisierte dort unter der Ummantelung aus und löste diese ab. Dies führte zu einer Verdickung des Kolbens, wodurch es zur Schwergängigkeit des Kolbens und damit zum Defekt der Spritze kam.

In Rücksprache mit der Firma Hamilton wurde ferner ein Spritzenmodell getestet, das explizit für salzhaltige Lösungen hergestellt wurde (Hamilton 1005 TLL SL 5 mL). Dabei handelt es sich um eine Glaskörper-Spritze mit einem Polyamidkolben und einer PE Dichtung. Auch hier sind bei höheren Flüssen (25 – 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) und dem damit verbundenen hohen Druck minimale Undichtigkeiten der Kolbendichtung in der Spritze festzustellen. Da bei dieser Spritze jedoch die geringsten Probleme und Beeinträchtigungen des Systemflusses auftraten und keine anderen Alternativen vorhanden waren, wurde mit dieser bis zur Umstellung auf die Reichert SR7500 Pumpe weiter gearbeitet.

Diese Spritze konnte auch in der neMESYS Pumpe (Cetoni) sehr stabil eingebaut werden. Dies war möglich durch eine kleine Modifikation, vorgenommen durch die Firma Reichert, in der der Drehknauf zur Befestigung des Spritzenkolbens (Einspannen) direkt durch eine Schraube ersetzt wurde (Verschraubung, Abbildung 28).

Eine optimale Spritze wäre demnach eine Glasspritze mit Stahlkolben und Teflondichtung, bei der der Luer-Lock Anschluss in den Glaskörper integriert und nicht eingeklebt ist, wie sie z.B. in Biacore-Geräten Verwendung finden. Hier werden Spritzen der Firma Hamilton genutzt. In Verwendung mit der PHD 22/2000 bzw. der neMESYS Pumpe wiesen diese Spritzen jedoch ein zu geringes Nennvolumen (5 mL) auf.

**Tabelle 7: Übersicht der getesteten Glasspritzen (Hersteller und Volumina)**

<b>Hersteller</b>	<b>Spritzenbeschreibung</b>
Poulten & Graf	Fortuna Optima Ganzglasspritze Luer Lock Tip 5 ml Fortuna Optima Ganzglasspritze Luer Lock Tip 10 ml
VICI	Gas Syringe Serie C Luer 2mL RN
Hamilton	Hamilton 1005 TLL 5 mL Hamilton 1002 TLL 2,5 mL Hamilton 1005 TLL SL 5 mL without Stop Hamilton 1001.5TLLX 500 µL Syringe W/STP

Mit der Umstellung des Pumpensystems auf die SR7500 Pumpe mit den schnellen *refill* Raten, dem programmierbaren *auto refill* und dem stabilen Befestigungssystem, konnte eine weitere Hamiltonspritze getestet werden. Die Hamilton 1001.5 TLLX erfüllt fast alle oben aufgeführten Anforderungen. Das geringe Nennvolumen von 500 µL stellt auf Grund der verbesserten Pumpeneigenschaften bezüglich des *refills* kein Problem dar.

### **3.4. Sensorchips**

Die Messparameter können durch die Wahl unterschiedlicher Sensorchips stark beeinflusst werden. Die Sensorchips sind prinzipiell aus einer Glasschicht (mechanischer Träger) mit aufgedampfter Goldschicht, einer Haftvermittlerschicht (z.B. Alkylthiole) und der Sensorchipbelegung (z.B. Polycarboxalate wie Polyacrylsäure) aufgebaut. Dies ist auch in der Tetracyclin-Analytik detailliert beschrieben [35]. Dabei sind verschiedene Varianten möglich. [zu Größe und Einbau Vergleiche auch 3.1.2.]

Den größten Einfluss haben dabei:

- die Art der Belegung des Sensorchips,
- die Belegungsdichte und
- die Höhe der Schicht.

Bei der Art der Belegung kann dabei unterschieden werden zwischen einer monomolekularen (planaren), einer dreidimensional belegten Oberfläche und einer reinen Goldoberfläche, die frei wählbar belegt werden kann. Planare Oberflächen haben gegenüber den dreidimensionalen zwar eine verminderte Oberflächenkapazität und können somit nur eine einfache Schicht Liganden binden, bieten aber dadurch gleichzeitig den Vorteil, dass dadurch keine Diffusionsprozesse an der Sensormatrix zu erwarten sind. Dreidimensionale Oberflächen (Hydrogele) ermöglichen einer mehrschichtigen Ligandenbindung durch eine größere Oberflächenkapazität und bieten durch diese bessere Ausnutzung des evaneszenten Feldes oft eine höhere Signalempfindlichkeit.

**Tabelle 8: Übersicht getesteter Sensorchips**

<b>Chipbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
C80m	Xantec	SC C80M
C150d	Xantec	SC C150D
CMD150d	Xantec	SC CMD150D
CMD200d	Xantec	SC CMD200D
HC1000m	Xantec	SCHC1000M
CM5	Biacore	BR-1003-99
Goldchip	Biacore	BR-1005-42
Goldchip	Reichert	13206060
SR7000	Reichert	13206061

Die Bezeichnung der Sensorchips erfolgt dabei firmenspezifisch.

Bei der Firma Xantec z.B. deutet die Buchstabenkombination des Namens die Belegung des Sensorchips an. Zum Beispiel steht CMD für Carboxymethyldextran-Hydrogel oder C für lineares Polycarboxylat-Hydrogel. Die nachfolgende Zahl beschreibt die Höhe bzw. Dicke der Belegung. Sie entspricht der Belegungshöhe in Nanometern (150 = 150 nm). Der abschließende Buchstabe definiert die Belegungsdichte: **l**ow (niedrig), **m**edium (mittel) und **d**ense (hoch) [40, 41].

Diese Kombinationen bieten dem Anwender eine große Anzahl an Möglichkeiten, eine optimale Chiplösung für das vorliegende analytische Problem zu finden. Für direkte Assayformate mit kleinen Analyten ist eine hohe Beladungsdichte zu wählen, um möglichst viel Ligand an die Chipoberfläche zu binden. Bei sehr komplexen Assayformaten bzw. sehr großen Liganden sind kleinere Belegungsdichten zu wählen, um eine sterische Hinderung zu vermeiden. Die Wahl der Belegungsart und deren Höhe ist ein weiterer Ansatzpunkt. Belegungen wie die C-Belegung (lineares Polycarboxylat-Hydrogel) eignen sich sehr gut für Liganden, welche ionische Wechselwirkungen zeigen. Durch die hohen ionischen Wechselwirkungen mit der Chipoberfläche erfolgt bereits im Vorfeld der Immobilisierung eine Anreicherung der Liganden dicht über der Chipoberfläche. Diese unterstützen den eigentlichen Immobilisierungsvorgang. [Vergleiche 4.2.]

Der HC-Sensorchip (Polycarboxylat-Hydrogel, bioinert) wird von der Herstellerfirma für die Analytik von kleinen Liganden (direkter Assay) empfohlen, wenn hohe unspezifische Bindungen zu erwarten sind. Der HC1000m bietet neben einer hohen Immobilisierungskapazität durch die mittlere Belegungsdichte und die große Belegungshöhe, in die kleine Liganden sehr gut eindringen können, den Vorteil eines Filtereffektes. Dieser Filtereffekt besteht darin, dass große Moleküle bzw. partikuläre Kontaminanten nicht weit in das Hydrogel eindringen können und somit außerhalb des evaneszenten Feldes bleiben und die Analytik nicht störend beeinflussen [41].

#### **3.4.1. C80m**

Auf dem Sensorchip C80m der Firma Xantec befinden sich linear angeordnete Polymerketten mit einer hohen Anzahl an Carboxylfunktionen. Diese sind mitteldicht angeordnet und ergeben eine Belegungshöhe von 80 nm.

Sie besitzen zwar keine hohe Bindungskapazität, wurden jedoch zu einigen Vorversuchen eingesetzt, um eine Vorkonzentrierung des Ceftiofur-Antikörpers (CfAK) auf einer unbelegten Chipoberfläche in Abhängigkeit vom pH-Wert des Immobilisierungspuffers zu untersuchen.

#### **3.4.2. C150d**

C150d Sensorchips weisen eine hohe Belegungsdichte und eine Belegungshöhe von 150 nm auf. Die Belegung bildet auch hier ein lineares Polycarboxylat-Hydrogel.

Dieser Sensorchip zeichnet sich durch eine hohe Immobilisierungskapazität aus und kann gut ionische Wechselwirkungen mit den Liganden eingehen. Daher eignet er sich für einfache und direkte Assayformate wie Antikörper-Antigen-Untersuchungen [40].

#### **3.4.3. CMD150d**

Der CMD150d mit einem Carboxymethyl-dextran-Hydrogel zeigt die gleichen Eigenschaften wie ein C150d Chip. Zusätzlich zeichnet er sich durch eine hohe chemische Stabilität aus und ist somit für starke Regenerationsbedingungen (hoher oder niedriger pH-Wert) geeignet [40].

#### **3.4.4. CMD200d**

Der CMD200d weist gegenüber dem CMD150d eine etwas längere Kettenlänge auf und bietet daher etwas mehr Immobilisierungsfläche.

### **3.4.5. HC1000m**

Die Oberfläche dieses Sensorchips besteht aus einem linear angeordneten Polycarboxylat-Hydrogel mit verringerter Ladungsdichte, aufgrund der mittleren Belegungsdichte.

Dieser Sensorchip weist den oben beschriebenen Filtereffekt mit einer nahezu maximalen Immobilisierungskapazität auf. Es ist jedoch im Vergleich zu den C bzw. CMD Chips anfällig gegen drastische Regenerationsbedingungen, welche zu einer Kollabierung und damit Zerstörung des langkettigen Hydrogels führen können [40].

### **3.4.6. CM5**

Der CM5 Chip von Biacore ist vergleichbar mit den CMD Chips der Firma Reichert. Er besteht aus einer Carboxymethyldextranschicht als Belegungsart mit einer Schichtdicke von 100 nm. Dieser Sensorchip ist universell geeignet und einsetzbar.

Die Biacore Sensorchips sind in einer Chiphalterung aus Kunststoff fest verankert und nur in Biacore-Geräten verwendbar.

### 3.4.7. Goldsensorchips

Eine direkte Belegung eines Goldsensorchips mit Antikörpern oder Analyt-Konjugaten ist nicht möglich. Goldsensorchips bieten aber den Vorteil der Herstellung einer zeitnahen Sensorchipbelegung, am einfachsten als *self-assembled monolayer*, einer einfachen planaren Oberfläche mit Carboxyl- bzw. Hydroxylfunktion. Die aufgedampfte Schichtdicke des Goldfilms beträgt 40 – 60 nm, wobei eine vollkommen ebene Oberfläche in der Regel nicht zu erreichen ist (vergleiche Abbildung 31) [42, 43].

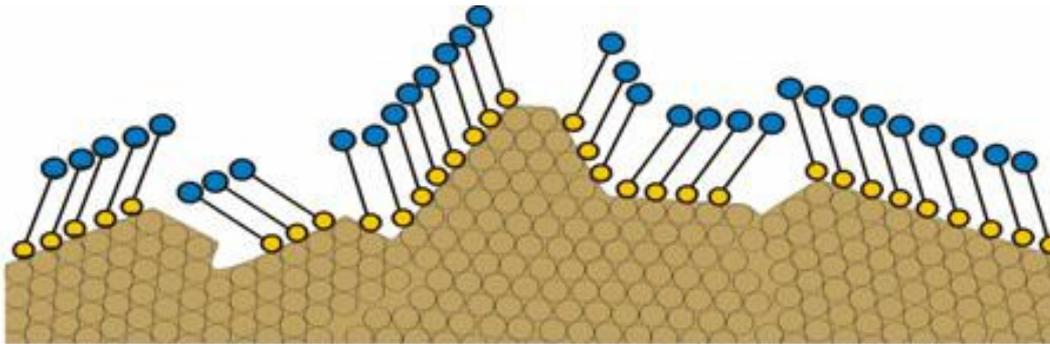


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Oberflächenbeschaffenheit eines SAM, zur Verfügung gestellt durch Gedig [43]

### 3.4.8. Self-assembled Monolayer

*Self-assembled monolayer* (SAM) gehören bezüglich der Oberfläche zu der einfachsten Sensorchipart. Auf der Goldschicht des Sensorchips befindet sich eine planare Carboxyl- bzw. Hydroxyloberfläche. Sensorchips dieser Art sind käuflich zu erwerben, können jedoch auch durch den Anwender selbst auf Goldchips hergestellt werden.

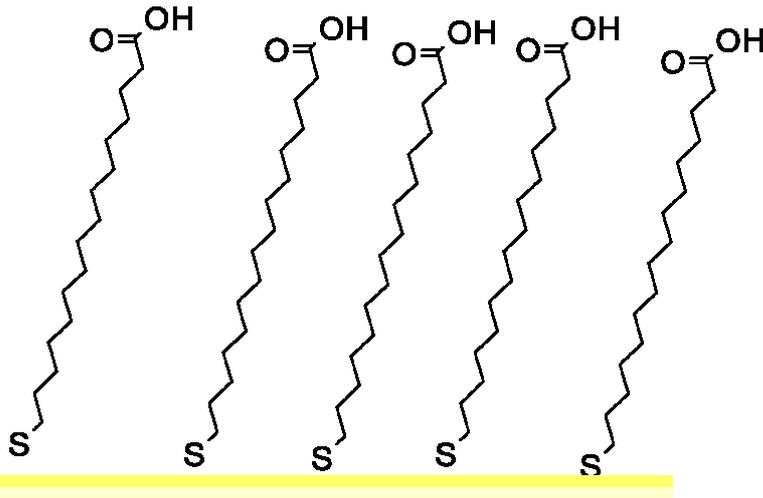


Abbildung 32: Schema eines selbsthergestellten SAM (beige = Glaschip, gelb = Goldschicht), die Bindung der Carboxylketten erfolgt über den Schwefel des Alkanthiols (Haftvermittler als Elektronenpaardonator, Gold Elektronenpaarakzeptor)

### SR7000 self-assembled Monolayer

Der von der Firma Reichert angebotene *self-assembled monolayer* SR7000 unterscheidet sich vom Aufbau her von den selbsthergestellten (Abbildung 32), da es sich um eine Mischung aus 10 % Alkanthiol (PEG)<sub>6</sub>-COOH und 90 % Alkanthiol (PEG)<sub>3</sub>-OH handelt (Abbildung 33).

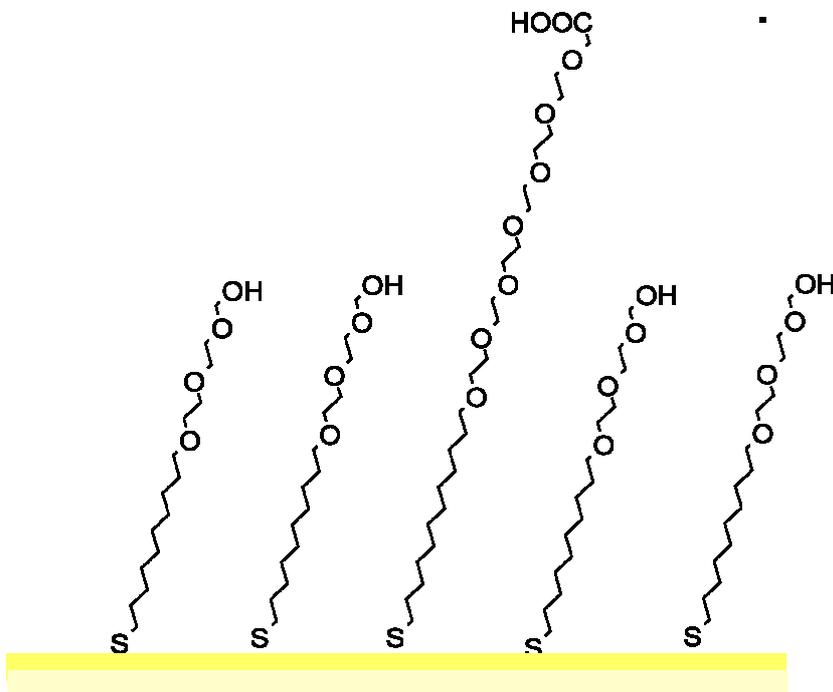


Abbildung 33: Schema self-assembled monolayer standard grade Reichert, (beige = Glaschip, gelb = Goldschicht), die Bindung erfolgt über den Schwefel des Alkanthiols (Haftvermittler als Elektronenpaardonator, Gold Elektronenpaarakzeptor)

### **3.4.9. Goldchip Biacore**

Auch dieser Biacore Sensorchip ist in einer Kunststoffhalterung verankert, entspricht aber dem Goldchip der Firma Reichert.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Immobilisierung

Die Immobilisierung des Liganden, z.B. eines Antikörpers, auf dem Sensorchip bildet einen Hauptansatzpunkt zur Einflussnahme auf die Untersuchungsergebnisse. Grundlegend gilt zu unterscheiden, ob eine maximale Immobilisierung des Liganden oder die Erreichung eines bestimmten Immobilisierungslevels erreicht werden soll. Dabei kann über die Konzentration der injizierten Lösung, über den Fluss oder über die Injektionsdauer auf das Ergebnis Einfluss genommen werden.

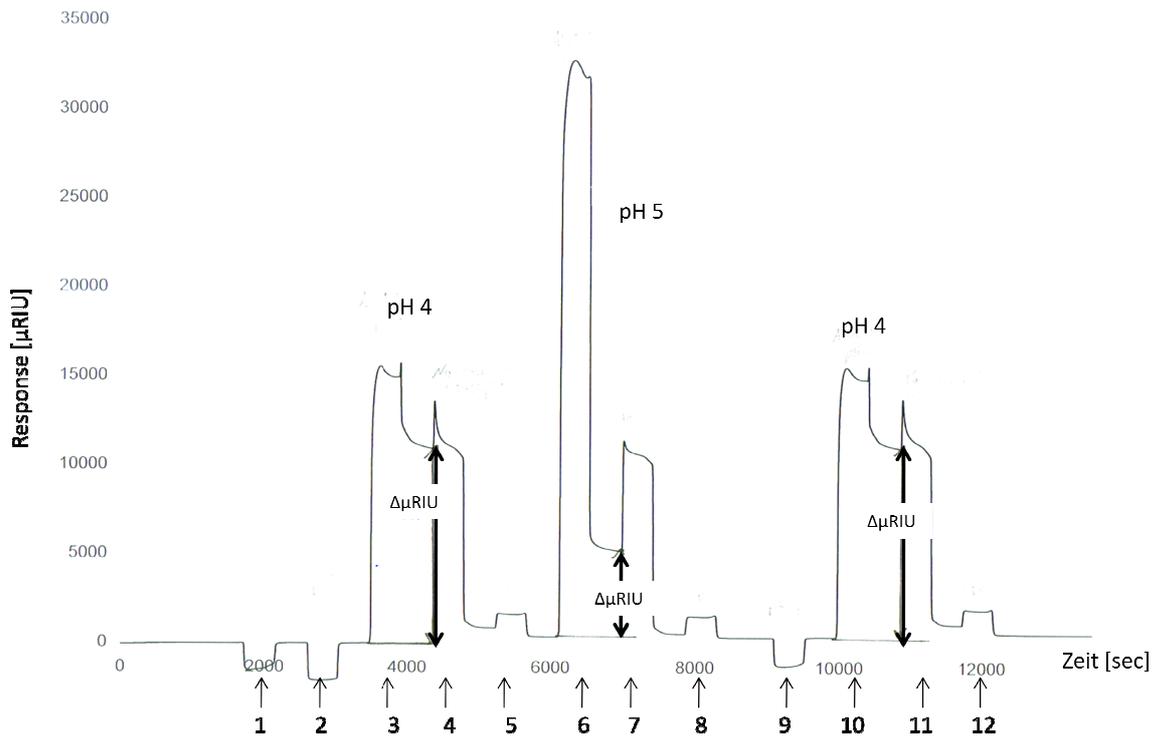
Bei kleinen Analyten und einem direkten Assayformat bildet ein maximaler Immobilisierungslevel eine optimale Grundlage. Hierbei wird so viel wie möglich des Liganden auf der Chipoberfläche gebunden, damit möglichst viele Bindungsstellen für den Analyten zur Verfügung stehen. Dies führt bei der Bindung des Analyten dann zu einem möglichst großen Signal. Bei einem kompetitiven Assayformat ist hingegen ein definierter nicht zu hoher Immobilisierungsgrad (Immobilisierungslevel) anzustreben, entsprechend der in der Probe zu bestimmenden Analytkonzentrationen.

Bei der Immobilisierung eines Liganden sind verschiedene Immobilisierungsarten [4, 43, 44] und Chipoberflächen möglich:

- Amin Kopplung,
- Thiol Kopplung,
- Aldehyd Kopplung,
- Streptavidin-Biotin Kopplung.

### 4.2. Vorkonzentrierungs-Versuche

Eine hohe Anreicherung durch z.B. ionische Wechselwirkungen unterstützt die Immobilisierung, da der Ligand z.B. der Antikörper später sehr nahe an die Chipoberfläche befördert wird (Vergleiche 3.4.). Die Response Units ( $\Delta\mu\text{RIU}$ ) zeigen, dass ein pH-Wert von 4 bei einer Ionenstärke von 20 mM Natriumacetatlösung für den Ceftiofur-Antikörper am förderlichsten ist (Abbildung 34), da dieser zu einem deutlich höheren  $\Delta\mu\text{RIU}$  ( $\updownarrow$ ) durch unspezifische Wechselwirkungen mit der Chipoberfläche führt.



**Abbildung 34: Vorkonzentrierungsversuch mit Cf-AK auf unbelegtem C80m Chip; pH-Werte 4,0 und 5,0; Fluss 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; Regeneration<sup>1</sup>**

#### Injektionsprotokoll:

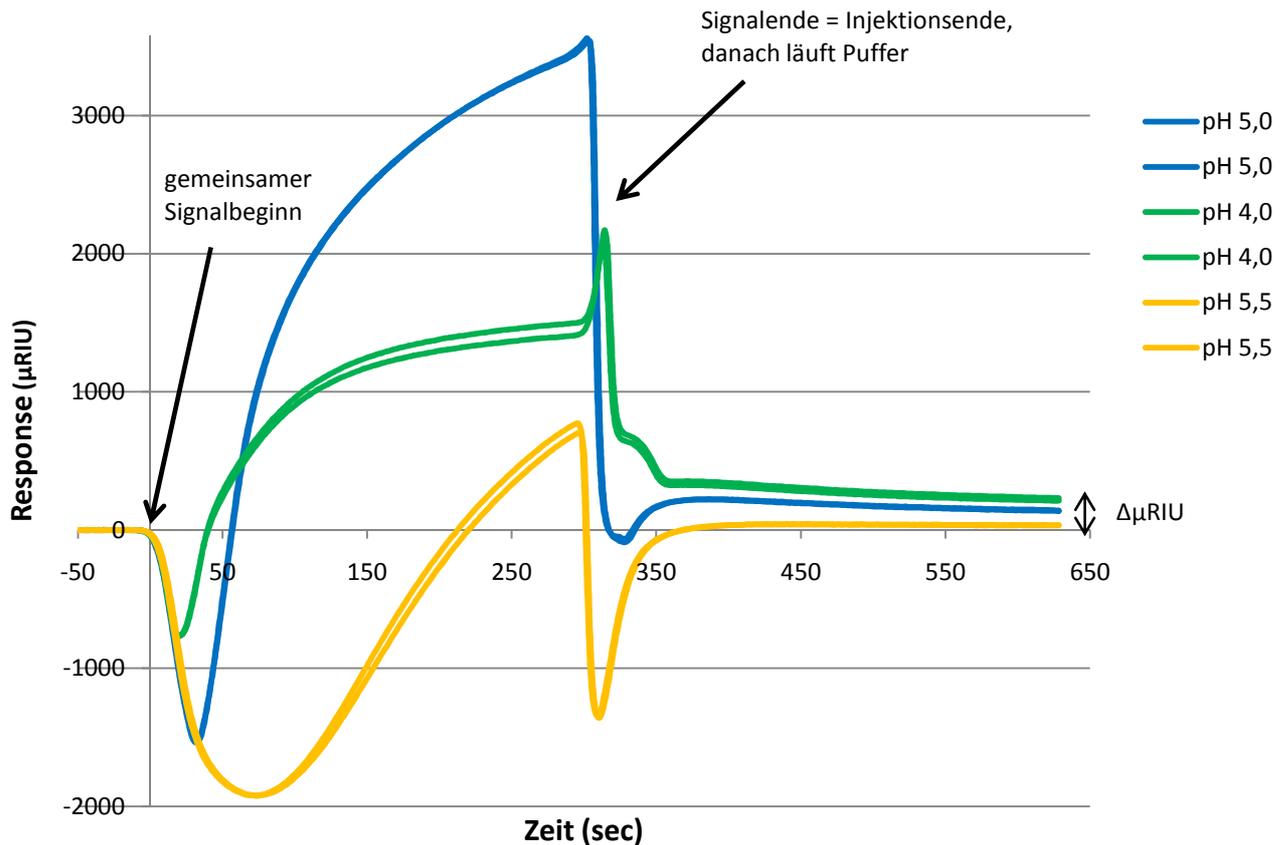
- 1 Pufferinjektion, Na-acetatlösung 10mM pH 4,0
- 2 Pufferinjektion, Na-acetatlösung 10mM pH 5,0
- 3 Cf-AK Injektion, Verdünnung 1/50 in Na-acetatlösung 10mM pH 4,0
- 4 Regeneration 0,1M Na-carbonatlösung mit 1M NaCl pH 10,0
- 5 Regeneration 0,3% SDS in HBSP-Puffer
- 6 Cf-AK Injektion, Verdünnung 1/50 in Na-acetatlösung 10mM pH 5,0
- 7 Regeneration 0,1M Na-carbonatlösung mit 1M NaCl pH 10,0
- 8 Regeneration 0,3% SDS in HBSP-Puffer
- 9 Pufferinjektion, Na-acetatlösung 10mM pH 4,0
- 10 Cf-AK Injektion, Verdünnung 1/50 in Na-acetatlösung 10mM pH 4,0
- 11 Regeneration 0,1M Na-carbonatlösung mit 1M NaCl pH 10,0
- 12 Regeneration 0,3% SDS in HBSP-Puffer

dazwischen ist Laufpuffer durch das System gelaufen

<sup>1</sup>Bis zur Findung einer geeigneten Regenerationslösung [Abschnitt 4.6.] wurde bei den Vorkonzentrationsversuchen nacheinander mit 0,1 M Na-carbonatlösung mit 1 M NaCl pH 10 und 0,3 % SDS regeneriert.

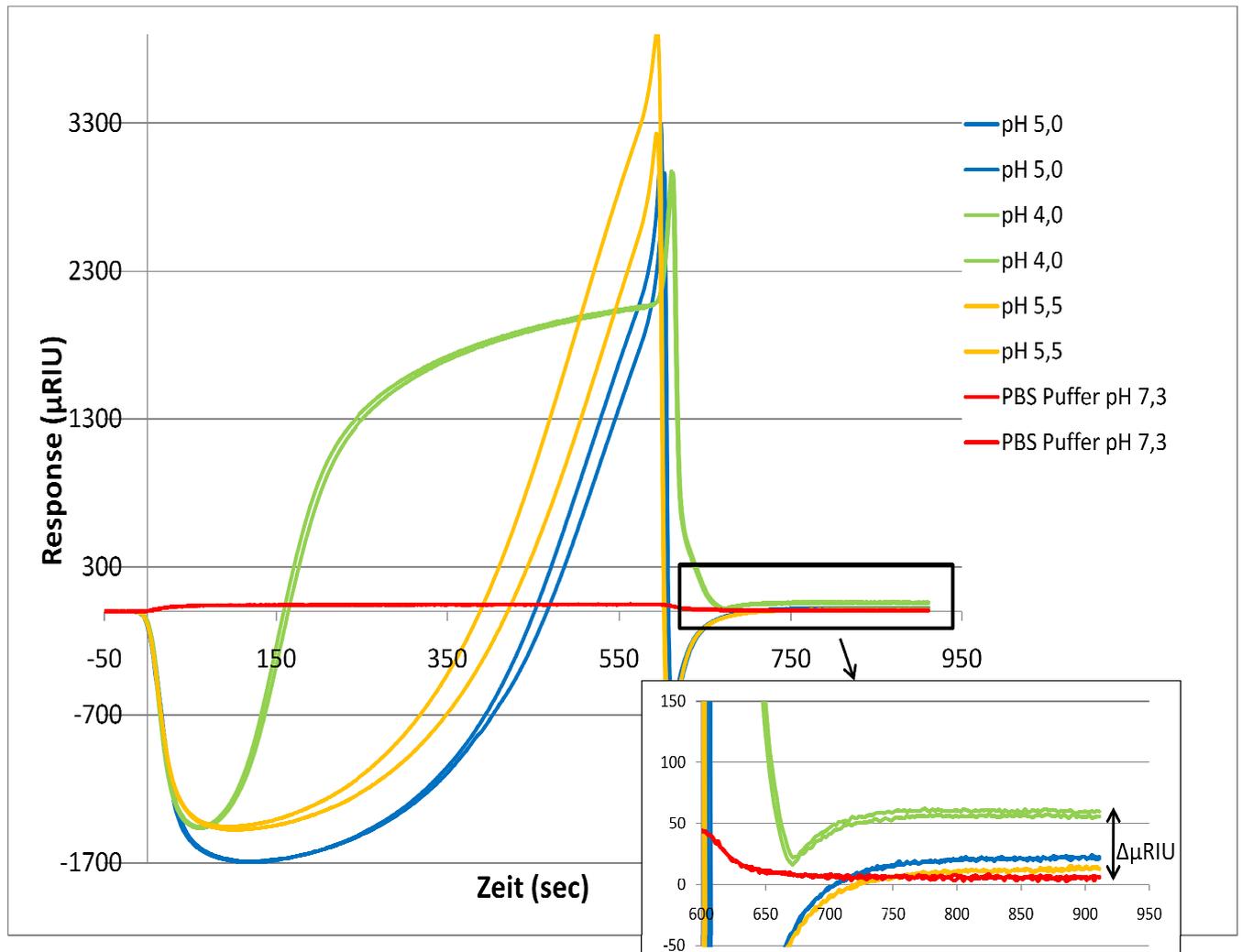
#### 4.2.1. Einfluss von pH-Wert und Ionenstärke bei der Immobilisierung

Der Immobilisierungspuffer beeinflusst die Immobilisierung nicht nur durch die Ionenstärke, sondern auch durch den pH-Wert. Der pH-Wert ist wichtig zur Unterstützung der Annäherung des zu immobilisierenden Moleküls an die Chipoberfläche. Je näher das Molekül an die Chipoberfläche kommt und dort mit dieser in Wechselwirkung treten kann, desto günstiger ist dies für die Immobilisierung. Der optimale pH-Wert liegt dabei knapp (0,5 bis 1) unterhalb des pI-Wertes des Moleküls, sollte jedoch nicht unter pH-Wert 4 liegen, damit bei Verwendung von Carboxylatoberflächen auch die Sensorchipoberfläche geladen vorliegt [45]. Getestet werden kann der pH-Wert-Bereich durch Vorkonzentrationsversuche (Preconcentration) mit dem zu immobilisierenden Molekül auf einem noch nicht belegten Sensorchip. Dabei bindet das Molekül über ionische Wechselwirkungen an die Oberfläche und kann durch anschließende Injektionen einer Regenerationslösung, z.B. Natriumhydroxid, einfach wieder abgelöst werden. Der optimale pH-Wert ist dabei durch eine maximale Bindung, (hoher Response-Wert ↔ hoher  $\mu$ RIU-Wert) erkennbar, da der Signalbeginn einer Injektion jeweils auf einen  $\mu$ RIU-Wert von Null gesetzt wird. In Abbildung 35 sind die Ergebnisse eines Preconcentrationversuches mit einer BSA Lösung, als kostengünstiges, großes und klassisches Mustermolekül, mit einer Konzentration von 99  $\mu$ g/mL in einem 5 mM Natriumacetatpuffer bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Die besten Ergebnisse sind bei einem Puffer-pH-Wert unterhalb des isoelektrischen Punktes des BSA von 4,6 zu erwarten. Die Signale wurden zur besseren Vergleichbarkeit mittels der Scrubber-Software am Signalbeginn (x- und y-Wert gleich Null) übereinandergelegt. Erkennbar ist bei einem pH-Wert von 4,0 eine gute Bindung (hoher  $\mu$ RIU-Wert). Im Gegensatz dazu zeigt das BSA Molekül bei einem pH-Wert von 5,5 annähernd keine Bindung durch Wechselwirkung an der Chipoberfläche. Ein weiterer Versuch mit einem pH-Wert-Bereich von 3,5 bis 5,0 wies ebenfalls den pH-Wert von 4,0 als geeignetsten aus.



**Abbildung 35: Vorkonzentrationsversuch mit BSA 99 µg/mL in 5 mM Na-Acetatpuffer auf HC1000m (Xantec, unbelegt) mit den pH-Werten 4,0; 5,0 und 5,5; Regeneration 20 mM NaOH-Lösung**

Analog wird auch für den monoklonalen Ampicillin-Antikörper (mAmAK) der pH-Wert Einfluss getestet. Da zu dem mAmAK keine Angaben über den isoelektrischen Punkt vorhanden sind, wurde ein pH-Bereich von 4,0 bis 5,5 getestet. Zusätzlich zu den Injektionen im Immobilisierungspuffer erfolgten Injektionen im PBS-Laufpuffer mit einem pH-Wert von 7,3 (Abbildung 36). Dabei kam es zu keiner nennenswerten Vorkonzentrierung.



**Abbildung 36: Preconcentrationstest mAmAK 55 µg/mL verschiedene pH-Werte (5 mM Na-Acetatpuffer) und PBS-Laufpuffer (129,6 mM); Fluss 5 µL/min; HC1000m (Xantec, unbelagt); Regeneration 20 mM NaOH-Lösung**

Bei einem pH-Wert von 4 konnten die besten Bindungen (hoher  $\Delta\mu\text{RIU}$ -Wert zum Nullpunkt) detektiert werden. Die schlechteste Bindung wurde mit dem Laufpuffer erreicht, dies lässt sich sowohl auf den hohen pH-Wert (7,3) als auch auf die hohe Ionenstärke im Puffer (129,6 mM) zurückführen. Die unterschiedlichen Signalverläufe sind auf die unterschiedlichen Brechungsindexänderungen der Lösungen während der Injektion zurückzuführen, diese sind für die Auswertung jedoch nicht relevant.

Zeitgleich wurden verschiedene Ionenkonzentrationen des Immobilisierungspuffers getestet, welche zwischen 5 und 20 mM Na-Acetat liegen sollten [4]. Signifikante Unterschiede zwischen den Na-Acetatkonzentrationen 5 und 10 mM waren nicht zu erkennen. Höhere Konzentrationen erwiesen sich als weniger günstig.

#### 4.2.2. Einfluss der Flussgeschwindigkeit bei der Immobilisierung

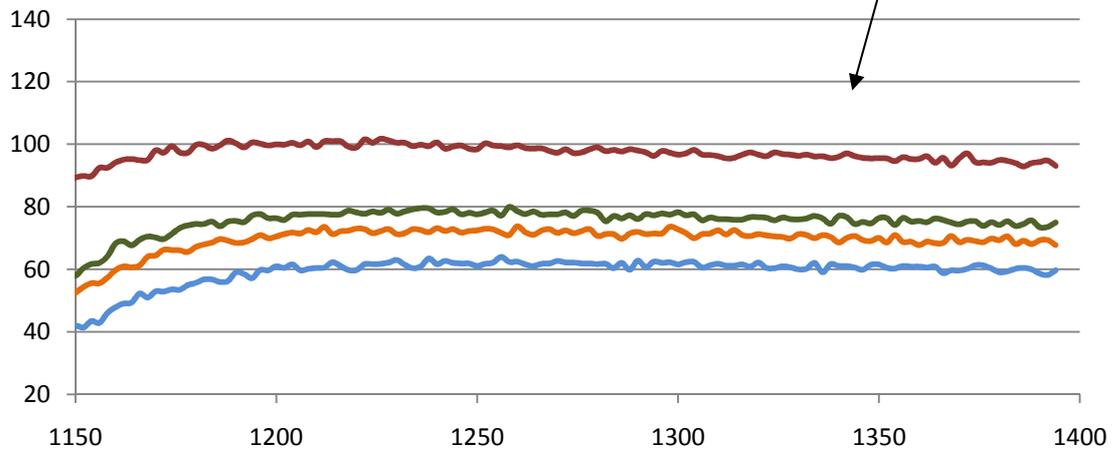
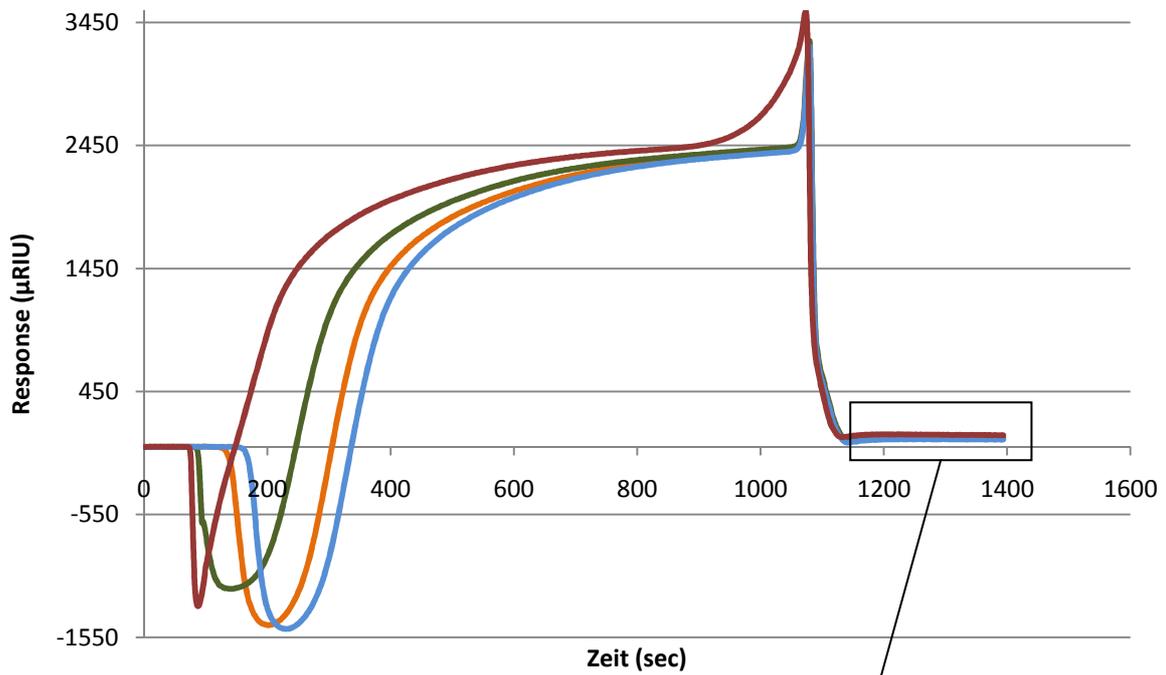
Typische Arbeitsflüsse liegen bei der SPR zwischen 2,5 und 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Nach der Aktivierung der Chipoberfläche mit EDC/NHS, sollte unmittelbar die Immobilisierungslösung injiziert werden, da der Zwischenkomplex von EDC mit NHS an der Oberfläche nicht sehr stabil ist. Bei der Flusswahl sind mehrere Faktoren zu berücksichtigen:

- schneller Kontakt zwischen Immobilisierungslösung und aktivierter Oberfläche,
- ausreichende Kontaktzeit zwischen Immobilisierungslösung und Oberfläche,
- geringer Verbrauch an Immobilisierungslösung (speziell bei kostspieligen Liganden).

Während der erste Punkt für eine hohe Flussrate spricht, stehen die anderen beiden für einen niedrigen Fluss. Um beides vereinbaren zu können, werden unterschiedliche Startflüsse mit einem geringen Endfluss kombiniert [40].

In Abbildung 37 ist ein Preconcentrationversuch mit einem Ampicillin-Antikörper bei verschiedenen Flüssen zu Beginn der Injektion abgebildet. Der Fluss wird jeweils nach 30 Sekunden auf einen einheitlichen Fluss von 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  eingestellt. In der Vergrößerung ist zu erkennen, dass mit zunehmender Geschwindigkeit des Startflusses, was einem schnelleren Erreichen der Immobilisierungslösung auf der aktivierten Oberfläche entspricht, eine höhere Preconcentration erzielt wird.

In der Praxis hat es sich jedoch bei der Arbeit an der Reichert SPR als nicht praktikabel erwiesen, den Fluss während der Injektion umzustellen, da hierfür ein kurzzeitiges Stoppen der Pumpe notwendig ist und somit zwischenzeitlich kein Fluss anliegt. Daher wurde in weiteren Arbeiten mit einer Flussrate von 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  als Kompromiss gearbeitet, um die oben genannten Punkte zu berücksichtigen.



— 40 µL/min für 30 sec, dann 5 µL/min    — 20 µL/min für 30 sec, dann 5 µL/min  
— 10 µL/min 30 sec, dann 5 µL/min    — 5 µL/min

**Abbildung 37: Preconcentrationstest mit Ampicillin Antikörper bei verschiedenen Flüssen (mAmAK 55 µg/mL in Na-Acetatpuffer 5 mM, pH 4) HC1000m (Xantec, unbelegt); Regeneration 20 mM NaOH-Lösung**

### 4.2.3. Einfluss der Zusammensetzung der Immobilisierungslösung

Es wurde eine Immobilisierung über Amin-Kopplung mittels EDC/NHS auf unterschiedlichen Sensorchips untersucht. Diese ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Sowohl die verwendeten Lösungen von EDC und NHS bzw. Sulfo-NHS (Abbildung 38), als auch die molaren Verhältnisse der Reaktionspartner haben Auswirkungen auf den Immobilisierungslevel. Das beispielhafte Sensorgramm für eine Immobilisierung ist im Abschnitt 4.3.5. dargestellt.

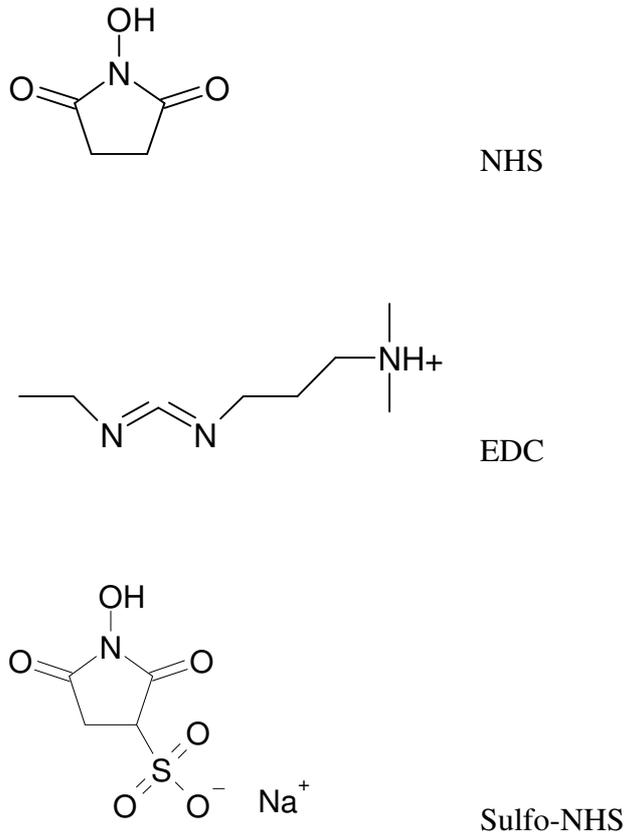


Abbildung 38: Strukturformeln NHS, EDC und Sulfo-NHS

**Tabelle 9: beispielhafter Einfluss der EDC/NHS Lösung auf den Immobilisierungslevel; Cf-AK-Lösung 1:20 Verdünnung; (Sensorchips von Xantec)**

Chipart	EDC (155,24 g/mol)	NHS (115,09 g/mol)	Sulfo-NHS (217,13 g/mol)	Molares Verhältnis	Immobilisierungs- level [ $\mu$ RIU]
C150d	37,5 mg/mL (0,22 M)	5,75 mg/mL (0,05 M)	---	4,4 : 1	15200
					18170
					15585
C150d	40 mg/mL (0,26 M)	10 mg/mL (0,09 M)	---	2,9 : 1	3150
					2880
					3243
CMD150d	40 mg/mL (0,26 M)	10 mg/mL (0,09 M)	---	2,9 : 1	1412
CMD150d	1,5 mg/mL (0,01 M)	---	7,6 mg/mL (0,035 M)	0,3 : 1	1835
					380
					506
CMD200d	37,5 mg/mL (0,22 M)	5,75 mg/mL (0,05 M)	---	4,4 : 1	4566

molares Verhältnis von 2,9:1 entspricht den Empfehlungen von Ryan; molares Verhältnis von 4,4:1 entspricht den Empfehlungen von Biacore, molares Verhältnis von 0,3:1 entspricht einer Test-Empfehlung von Gedig [36, 40, 44]

In Tabelle 9 sind die Immobilisierungslevel, die durch die unterschiedlichen Lösungen erreicht wurden, aufgeführt. Immobilisiert wurde jeweils ein Ceftiofur-Antikörper bis zur Erreichung der maximalen Beladung (maximaler Immobilisierungslevel), diese wurde in Echtzeit verfolgt und jeweils nach circa 30 min erreicht. Verwendet wurden die Sensorchips C150d und CMD150d, welche ähnliche Eigenschaften aufweisen und ein Sensorchip CMD200d, welcher sich nur in der Belegungshöhe der Chipoberfläche vom CMD150d unterscheidet.

Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Beladung, hervorgerufen durch unterschiedliche molare Verhältnisse von EDC zu NHS. Schon kleine Abweichungen im EDC Überschuss wirken sich auf den Immobilisierungslevel aus. In den Untersuchungen zeigten sich im Mittel fast fünffach niedrigere Immobilisierungslevel, wenn der EDC Überschuss von 4,4:1 auf 2,9:1 gesenkt wurde. Eine weitere Verschiebung der Verhältnisse zu Gunsten von NHS (NHS Überschuss) bedeutet eine weitere Absenkung des ursprünglich erreichten Immobilisierungslevels. Dies ließ sich auch durch die Verwendung von Sulfo-NHS anstatt von NHS nicht positiv beeinflussen. Sulfo-NHS bildet mit EDC einen stabileren intermediären Komplex in wässrigen Lösungen und erhöht somit den Kopplungsgrad [45, 46]. Nachteilig sind jedoch hohe Kosten des Sulfo-NHS im Vergleich zu NHS. Eine Immobilisierung mit einem molaren Verhältnis EDC:NHS von 4,4:1 wird von Biacore empfohlen [44]. Weiterführenden Arbeiten durch Herrn Bury im gleichen Arbeitskreis wiesen eine weitere Begünstigung des Immobilisierungslevels durch die Verwendung von Hydrochlorid-EDC statt EDC im molaren Mischungsverhältnis von 4,4:1 auf.

### 4.3. Rückstandsanalytik mittels Reichert-SPR

Für die Analytik von Rückständen mittels Antikörper-Antigen-Reaktion werden vornehmlich das kompetitive Assayformat, seltener der direkte Nachweis und komplexe Formate verwendet [38].

Beim direkten Nachweis wird der Antikörper direkt auf der Chipoberfläche immobilisiert und die aufgearbeitete Probe, die den Rückstand (Analyt) enthält, injiziert. Dies bietet den Vorteil einer recht kostengünstigen Analyse, da bei der Immobilisierung wenig Antikörper verbraucht wird und im weiteren Analysenverlauf kein weiterer Antikörper benötigt wird. Nachteilig ist diese Methode jedoch bei sehr kleinen Analyten, da diese nur in hohen Konzentrationen eine auswertbare Bindung (Messsignal  $\Delta\mu\text{RIU}$ ) hervorrufen und damit die Analytik im Rückstandsbereich oft nicht möglich ist.

Empfindlicher ist hingegen der kompetitive Assay. Hierfür wird Antigen bzw. Antigen-Konjugat auf der Chipoberfläche immobilisiert. Injiziert wird dann eine Lösung, die Antikörper und den Analyten der Probe enthält. Dieser besetzt die Bindungsstellen des Antikörpers und verhindert die Bindung des Antikörpers an die Chipoberfläche, es resultiert ein im Vergleich zur rückstandsfreien Probe niedrigeres Signal.

#### 4.3.1. Charakterisierung der Konjugate

Von den hergestellten Konjugaten wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford zur näheren Charakterisierung und Überprüfung der Ausbeute durchgeführt. Für die Konjugate wurden BSA bzw. GOD als Kopplungsmolekül gewählt, da diese aufgrund ihrer molekularen Größe (66 kDa bzw. 160 kDa) bereits in niedrigen Konzentrationen deutliche Messsignale in der SPR erzeugen.

**Tabelle 10: Konjugat-Konzentration nach Bradford**

Konjugat	Herstellungsdatum	Aufkonzentration	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Konzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Ausbeute [ $\mu\text{g}$ ]
Cf-BSA 1	20.03.2006	nein	---	nicht bestimmt	
Cf-BSA 2	20.07.2006	nein	---	nicht bestimmt	
Am-GOD 1	02.06.2008	ja, Centriprep	1500	5500	8250
Am-GOD 2	29.09.2008	ja, Centriprep	3800	2300	8740
Am-BSA	29.09.2008	ja, Centriprep	1600	24200	38720

Dabei wurden die in Tabelle 10 ermittelten Proteingehalte bestimmt. Bei der Betrachtung der Proteinkonzentrationen der Am-GOD Konjugate 02.06.2008 und 29.09.2008 ist deutlich der Einfluss der Aufkonzentrierung der Lösung unter Erhalt der gleichen Ausbeuten ( $\mu\text{g}$ ) durch die Zentrifugation im Centriprep erkennbar.

#### **4.3.2. Prüfung der Antikörperbindungsfähigkeit mittels ELISA**

Die Antikörperbindungsfähigkeit sollte möglichst unabhängig von der SPR auch mittels ELISA-Test überprüft werden. Dabei sollten sowohl die Ampicillin-GOD-Konjugate als auch das Ampicillin-BSA-Konjugat untersucht werden. Ebenfalls sollte sowohl die Antikörperreaktion gegen Ampicillin als auch gegen das BSA (Immunogen) getestet werden. Die Untersuchungen sollten Hinweise geben ob der proteingebundene Analyt im Vergleich zum freien Analyt noch mit ausreichender Affinität gebunden wird.

Da der polyklonale Ampicillin-Antikörper von Randox unter Verwendung eines Ampicillin-BSA-Konjugates als Immunogen hergestellt wurde und weitere bzw. sekundäre Antikörper nicht zur Verfügung standen, konnte nur ein ELISA mit dem monoklonalen Am-AK und dem aus der Maus gewonnenen anti-ImmuglobulinG-Antikörper (sek. Mouse IgG AK) durchgeführt werden.

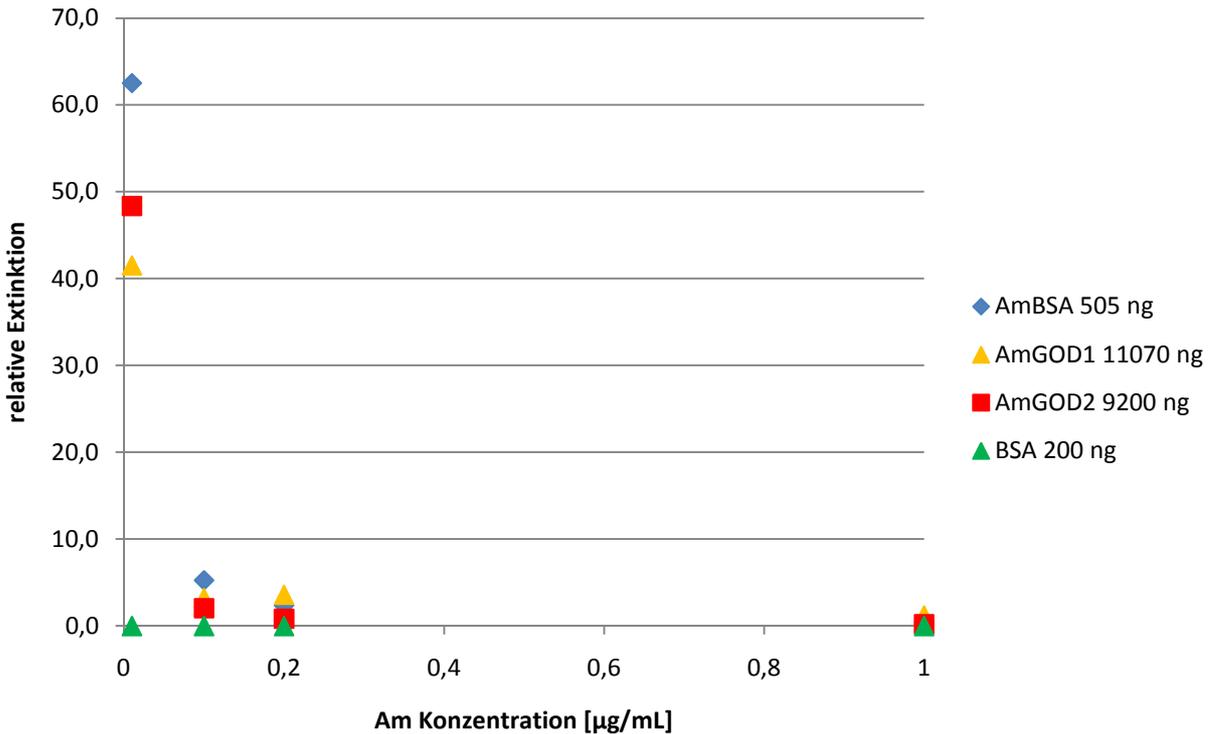
In Vortests wurden die Konzentrationen zur Belegung der Kavitäten für die einzelnen Konjugate und das getestete BSA ermittelt, damit die resultierenden Extinktionen im linearen Bereich liegen. Dabei wurden jedoch keine optimierten Konzentrationsverhältnisse zwischen der Belegung und den Antikörperkonzentrationen ermittelt.

In den Versuchen wurden die Kavitäten mit dem Am-BSA Konjugat (202 und 505 ng/Kav.) und den beiden Am-GOD Konjugaten (Am-GOD1 11070 ng/Kav.; Am-GOD2 9200 ng/Kav.) belegt. Zusätzlich wurde BSA in zwei verschiedenen Konzentrationen (200 und 500 ng/Kav.) als Kontrolle mitgeführt. Der Antikörper wurde mittels eines Am-BSA Immunogens hergestellt, sollte jedoch, da es sich um einen monoklonalen Antikörper handelt, keinerlei Reaktion mit dem BSA eingehen.

Die eingesetzten Ampicillin Konzentrationen lagen zwischen 0,01 und 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Alle drei Konjugate sind in der Lage mit dem monoklonalen Ampicillin Antikörper zu reagieren. Daher scheint das im Konjugat gebundene Ampicillin in seiner wesentlichen chemischen Struktur nicht verändert zu sein.

Bei allen drei Konjugaten konnten Hemmungen in Abhängigkeiten von den Ampicillinzugaben erreicht werden. Wobei trotz einer geringeren Belegungskonzentration eine größere lineare Abhängigkeit bei dem Am-BSA Konjugat ermittelt werden konnte (größerer Messbereich (Extinktionswerte)). Dies lässt den Rückschluss zu, dass mehr Ampicillin im Am-BSA Konjugat gebunden ist als im Am-GOD Konjugat (Abbildung 39).



**Abbildung 39: Auftragung relative Extinktion gegen Ampicillin Konzentration, rel. Extinktion berechnet  $(\text{Ext.-Nullwert} - \text{Ext.-Blindwert})/(\text{Ext.-Ergebniswert} - \text{Ext.-Blindwert}) \cdot 100$**

Wie zu erwarten ist bei den mit BSA belegten Kavitäten keine Reaktion und keine Antikörperbindung zu beobachten. Die dort gemessenen Extinktionen liegen im Bereich der Reagenzienblindwerte.

#### **4.3.3. Charakterisierung des Konjugates aus Ampicillin und BSA**

Nachdem die Bindung mittels SPR und ELISA nachgewiesen wurde, wurde mittels eines MALDI-(TOF)MS-Systems der Kopplungsgrad des Ampicillins an das BSA Molekül ermittelt.

Dazu erfolgte ein Vergleich zwischen reinem BSA mit einer molaren Masse von 66 kDa und dem hergestellten Konjugat. Der Kopplungsgrad des Ampicillins errechnet sich dabei aus der Differenz unter Beachtung der Molaren Masse von 350 Da.

In Abbildung 40 sind die MALDI-(TOF) Massenspektren des BSA (rot) und des Konjugates (blau) im Vergleich dargestellt. Aus den Daten lässt sich ein Kopplungsgrad von sieben Ampicillinmolekülen an ein BSA-Molekül errechnen.

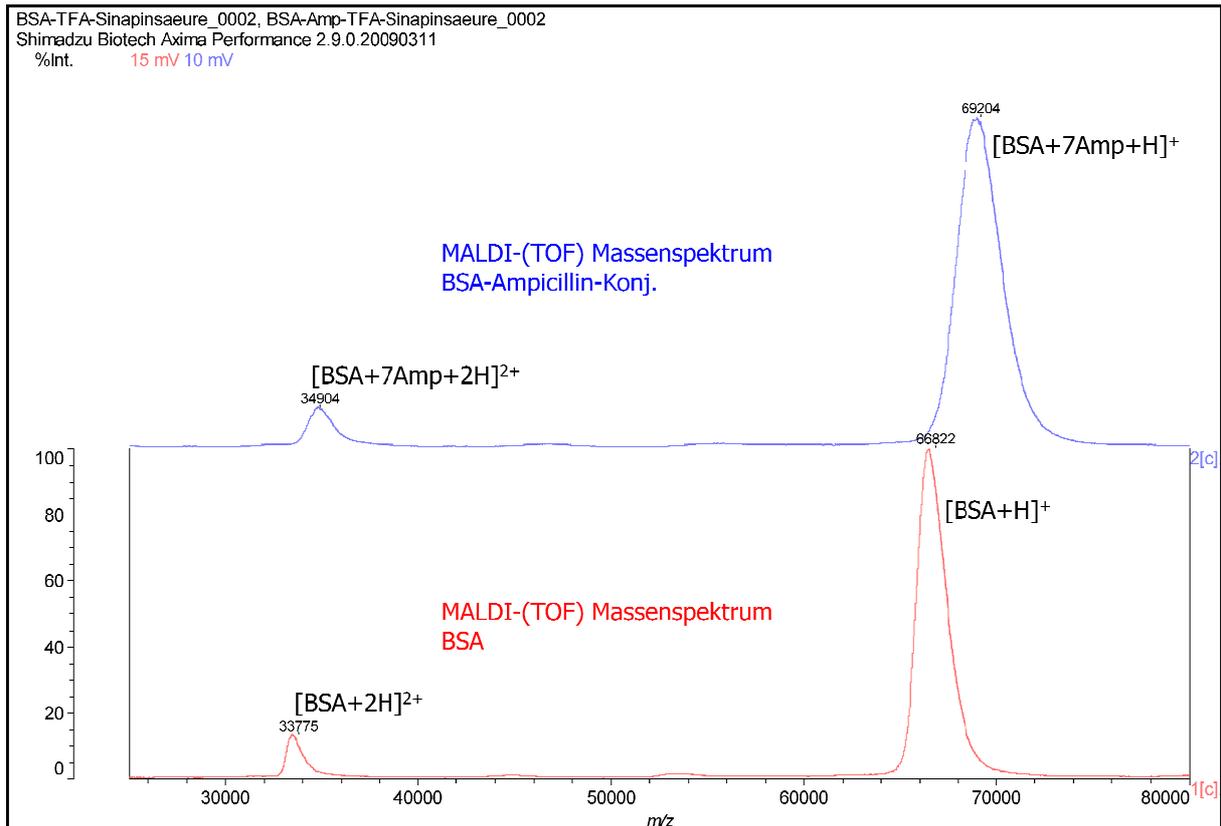


Abbildung 40: MALDI-(TOF) Massenspektrum, Vergleich BSA und BSA-Ampicillin-Konjugat

Ebenfalls wurde versucht, die Belegungsdichte des Ampicillins an die Glucoseoxidase auf diesem Weg zu charakterisieren und den Kopplungsgrad zu ermitteln. Aufgrund der molaren Masse von 160 kDa erwies sich dies jedoch als nicht möglich. Sowohl die GOD, als auch das Konjugat konnten auch in mehreren Versuchen mit geänderten Parametern nicht mittels MALDI-TOF-MS erfasst werden.

#### 4.3.4. Direkter Assay

Die direkten Assays wurden mit den monoklonalen Antikörpern gegen das Ceftiofur und gegen das Ampicillin durchgeführt. Als Regenerationslösung diente jeweils eine 40 mM NaOH-Lösung mit 10% Acetonitril, wie sie von vielen Autoren rückstandsanalytischer SPR-Arbeiten genutzt wird [38].

##### 4.3.4.1. Ceftiofur

Bei den Untersuchungen des Ceftiofurs mittels direktem Assayformat wurden vier unterschiedliche Sensorchips (SR7000, C150d, CMD150d und HC1000m) genutzt.

###### 4.3.4.1.1. SR7000

Zunächst wurde mit dem SR7000 ein möglichst einfacher Sensorchip genutzt. Immobilisiert wurde mittels EDC/NHS Mischung (Empfehlung Ryan [36]; Immobilisierungslevel 2760  $\mu$ RIU). Es konnten sowohl für Cf (6 – 60 mg/kg, Abbildung 41) und für das vorliegende Cf-BSA-Konjugat (Verdünnung 1/20,  $92 \pm 6$   $\mu$ RIU) Bindungen detektiert werden. (Das vorliegende Konjugat wurde von Herrn Usleber (Gießen) ohne Konzentrationsangaben zur Verfügung gestellt. Es wurde jedoch wegen der geringen Menge keine Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Daher sind alle Angaben in Abhängigkeit der Verdünnungsstufen dargelegt.)

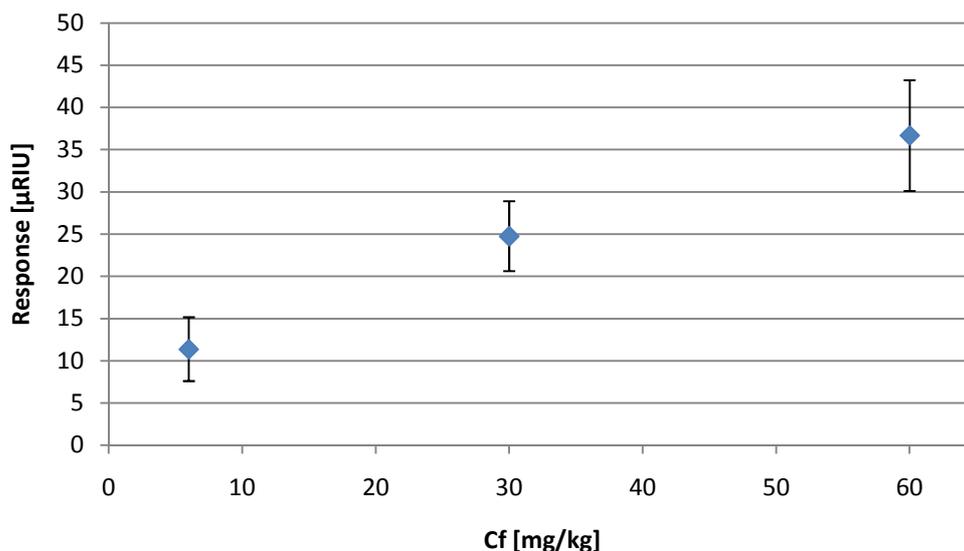


Abbildung 41: Bindung der Cf-Kalibrierung (6-60 mg/kg = umgerechnet aus Konzentration der injizierten Lösung); Cf-AK imm. auf SR 7000 (Reichert); Fluss 20  $\mu$ L/min, Injektionsdauer 3,5 min; n=6

#### 4.3.4.1.2. C150d und CMD150d

Auf diesen beiden Sensorchips wurde der Einfluss der von Gedig [40] vorgeschlagenen EDC/Sulfo-NHS Mischung im Vergleich zur bisherigen EDC/NHS Mischung (Reichert) geprüft. Da die beiden Sensorchips gleiche Belegungsdichten und -längen besitzen und in ihrer Belegungsart ähnlich sind, wurde dies als nahezu optimal angesehen, da bei Verwendung von gleicher Zusammensetzung der Immobilisierungslösungen ähnliche Werte erhalten wurden. Die in diesem Test erzielten Immobilisierungslevel unterscheiden sich deutlich voneinander. So konnte auf dem C150d Sensorchip mit der bisher verwendeten Zusammensetzung der Immobilisierungslösungen (Reichert) ein Immobilisierungslevel von 3243  $\mu$ RIU erreicht werden, hingegen auf dem CMD150d mit der neuen Zusammensetzung nur ein Level von 1835  $\mu$ RIU.

Trotz des geringeren Immobilisierungslevels konnte eine bessere Bindung des Ceftiofurs ermittelt werden. Auf dem C150d konnte für eine Cf-Konzentration von 30 mg/kg eine durchschnittliche Bindung von  $34 \pm 5$   $\mu$ RIU (n=12) und auf dem CMD150d eine durchschnittliche Bindung von  $48 \pm 4$   $\mu$ RIU (n=11) detektiert werden. Damit wird deutlich, dass der CMD150d Sensorchip besser geeignet ist für diesen Versuchsansatz als der C150d Sensorchip, die erreichten Bindungen jedoch nicht zufriedenstellend sind, da mit der sechsfachen MRL-Konzentration für die Niere gearbeitet wurde. Mit der höchsten MRL-Konzentration von 6 mg/kg Cf (für Niere) konnten nur noch Bindungen im Bereich von  $35 \pm 6$   $\mu$ RIU (n=5) auf dem CMD150d ermittelt werden.

#### 4.3.4.1.3. HC1000m

Als letzter Sensorchip wurde der für kleine Analyten entwickelte HC1000m Sensorchip genutzt. Auch bei diesem erfolgte die Immobilisierung mit der von Gedig [40] empfohlenen Zusammensetzung der Immobilisierungslösungen, da diese speziell auf diesem Sensorchip von Xantec geprüft wurden. Der erreichte Immobilisierungslevel von 10001  $\mu$ RIU auf diesem Sensorchip im Vergleich zum CMD150d (1835  $\mu$ RIU) zeigt zusätzlich die vorhandene Kapazität des HC1000m Sensorchips. In den anschließenden Versuchen konnte jedoch nur eine sehr geringe bzw. keine Anbindung des Cf an die Oberfläche beobachtet werden. Dies war unabhängig von der eingesetzten Konzentration. Ebenfalls traten starke Basislinienschwankungen auf, die keine Auswertung ermöglichten. Der Sensorchip wurde ausgebaut, jedoch konnten visuell keine Oberflächenbeeinträchtigungen erkannt werden. Nach mehreren eigenen Versuchen (Anzahl 5) und bei Xantec wurde die EDC/Sulfo-NHS Aktivierung als ungeeignet eingestuft, da sie schnell zur Zerstörung der Oberfläche durch die Kollabierung der Polycarboxylatketten führt, sodass zwar ein hoher Immobilisierungslevel des Reaktionspartners detektiert wird, dieser allerdings während der Analyse nicht für die Bindung des Analyten zur Verfügung steht.

#### 4.3.4.2. Ampicillin

Ein direkter Assay mit einer Immobilisierung des Ampicillinantikörpers (monoklonal) und der Nutzung des Ampicillins bzw. des Ampicillinkonjugates wurde auf zwei unterschiedlichen Sensorchips getestet, auf einem laut Herstellerangaben für kleine Analytmoleküle geeigneten HC1000m und einem CMD200d (Eigenschaften der Sensorchips unter 3.4.).

Auf keinem der getesteten Sensorchips konnten ausreichende und reproduzierbare Bindungslevel der Ampicillinkalibrierung erreicht werden. Für Ampicillin wurde ein Kalibrationsbereich zwischen 50 und 6000 µg/kg gewählt. Der Kalibrationsbereich des Am-Konjugates (Am-GOD 1) umfasste den Bereich von 55,28 bis 552,8 µg/mL. Da eine Charakterisierung des Konjugates wie bei Am-BSA nicht möglich war, sind keine Rückschlüsse auf den Ampicillinanteil möglich.

##### 4.3.4.2.1. HC1000m

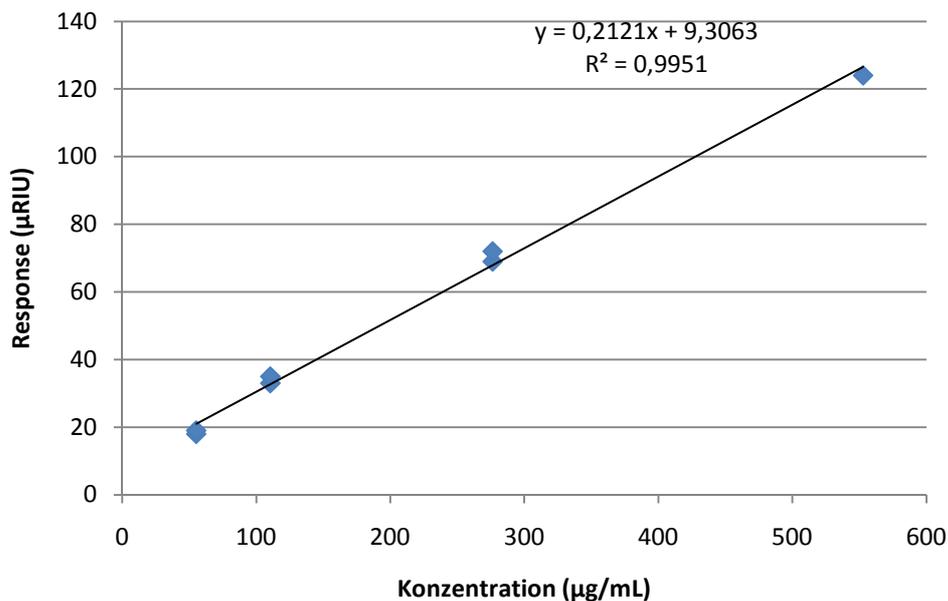
Bei diesen Versuchen wurde der mAmAK mittels EDC/Sulfo-NHS Mischung (Xantec Empfehlung) immobilisiert. Dabei konnte ein Immobilisierungslevel von 1720 µRIU erreicht werden. In den Versuchen des direkten Assay-Formates mit Ampicillin zeigten sich nur geringe Bindungslevel (3000 µg/kg  $22 \pm 15$  µRIU; 6000 µg/kg  $7 \pm 3$  µRIU), welche zudem sehr großen Schwankungen unterworfen waren. Ebenfalls konnten bei Analysen mittels Am-GOD Konjugat nur geringe Bindungen detektiert werden ( $31,1$  µg/mL  $26 \pm 4$  µRIU). Während der gesamten Untersuchungen traten insgesamt starke Basislinienschwankungen und Schwankungen in den detektierten Bindungsleveln auf. Nach Rücksprache mit dem Chiphersteller und dem Ausbau des Sensorchips konnte festgestellt werden, dass der HC1000m Sensorchip zwar gegenüber Matrixinjektionen gute Ergebnisse lieferte (Vergleiche 4.5.), jedoch im Langzeittest für die hier gegebenen Bedingungen ungeeignet war. Es zeigte sich eine Ablösung der Goldschicht von der Glasschicht im Bereich des Übergangs zwischen Flusszelle und Gasketring (Dichtungsring) (Abbildung 42).



Abbildung 42: SC HC1000m (Xantec) nach Nutzung und Ausbau

#### 4.3.4.2.2. CMD200

Immobilisiert wurde der mAmAK mittels EDC/NHS (Biacore Empfehlung; Immobilisierungslevel 4566  $\mu$ RIU). Über den gesamten Kalibrierbereich konnten keine reproduzierbaren Werte erreicht werden, die Bindungslevel lagen zwischen 0 und 10  $\mu$ RIU. Im Gegensatz dazu konnte mit den Am-GOD 1 eine Kalibriergerade erstellt werden (Abbildung 43). Jedoch werden diese Werte über einen längeren Zeitraum (ab d=5) nicht mehr erhalten. Dies spricht für einen Abbau der Bindungsfähigkeit des immobilisierten Antikörpers auf dem CMD200m Sensorchip. Dieser ist nicht für die Nutzung im direkten Assayformat geeignet.

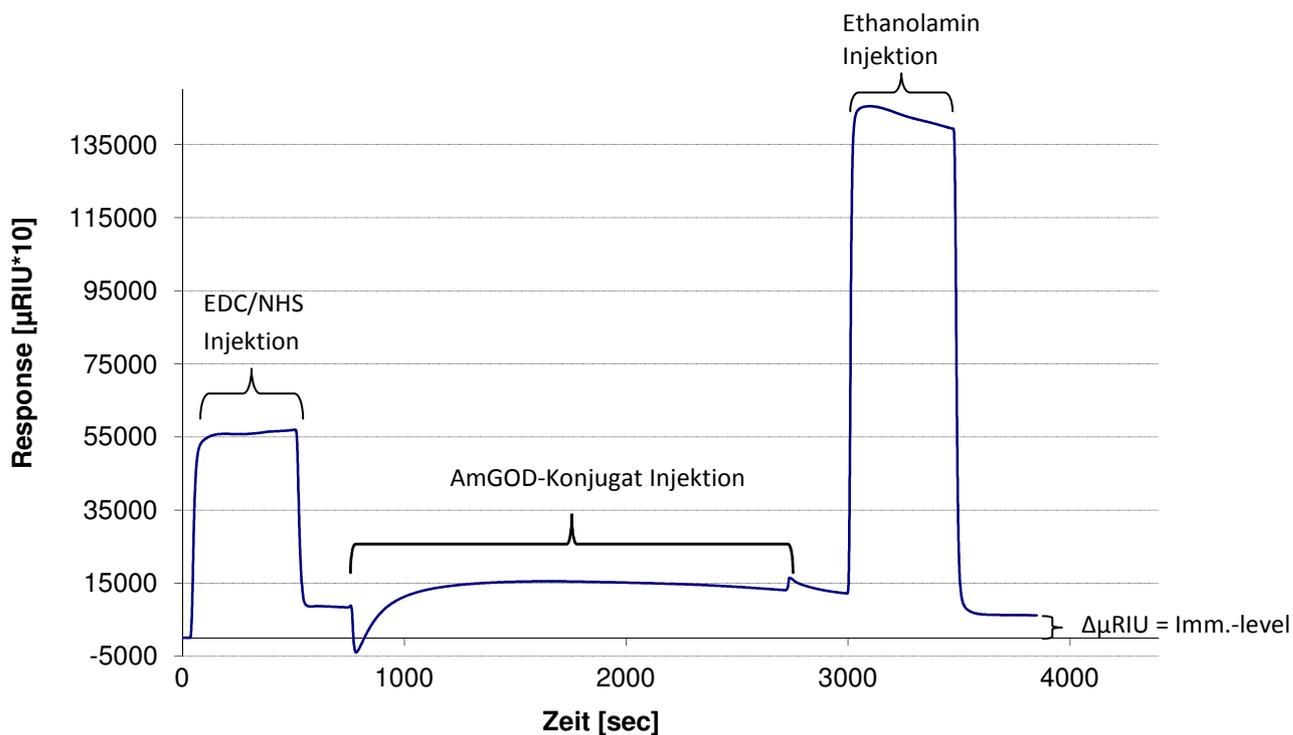


**Abbildung 43: Kalibrierung AmGOD auf einem CMD200m Sensorchip: Imm. Am-AK<sub>m</sub>; Fluss 5  $\mu$ L/min, Injektionsdauer 10 min, Messpunkt 5 min nach Injektionsende**

#### 4.3.5. Kompetitiver Assay mit polyklonalem Antikörper

Zur Durchführung des Formates wurde Ampicillin-GOD-Konjugat auf einem selbsthergestellten self-assembled Monolayer (SAM) immobilisiert (Herstellung Kapitel 6.7.6.). Für den Assay wurden direkt vor der Injektion eine Antikörperlösung (pAmAK) und die Standardlösung gemischt und anschließend ein Aliquot dieses Gemisches injiziert. Die Regeneration erfolgt mit 40 mM NaOH-Lösung.

Das Sensorgramm der durchgeführten Immobilisierung ist in Abbildung 44 aufgezeigt. Die Immobilisierung erfolgte mit dem von Biacore empfohlenen Mischungsverhältnis mittels EDC/NHS. Das Konjugat wurde in einem 5 mM Natriumacetatpuffer pH-Wert 4 gelöst.



**Abbildung 44: Sensorgramm Immobilisierung AmGOD-Konjugat auf SAM, 32,5 min bei Fluss 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , zwischen den Injektionen fließt Laufpuffer durch das System**

Es wurde ein Immobilisierungslevel von 529  $\mu\text{RIU}$  erreicht.

Zur näheren Charakterisierung der Chipoberfläche mit dem immobilisierten Am-GOD Konjugat bezüglich der Erkennung durch den Antikörper pAmAK und anderer Antikörper wie einen gegen Glucoseoxidase gerichteten Antikörper und zur Prüfung der Stabilität der erreichbaren Bindungen wurden wiederholt Injektionen dieser beiden durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Injektionsserie (16 Injektionen) des pAmAK, gefolgt von GOD-AK (8 Injektionen) und anschließend eine nochmalige Serie pAmAK (16 Injektionen).

Die Analysen zeigten sowohl in den beiden Injektionsserien untereinander, als auch im Vergleich der 1. und 2. pAmAK Serie gleiche durchschnittliche Bindungshöhen, sodass von einer ausreichenden Stabilität des Am-GOD Konjugates auf der Chipoberfläche ausgegangen werden kann.

Sowohl Ampicillin als auch die Glucoseoxidase werden vergleichbar gut erkannt. Dies deutet darauf hin, dass weder bei der Konjugatherstellung noch bei der Immobilisierung die jeweiligen Epitope verändert wurden.

#### 4.3.5.1. Abhängigkeit der Antikörperbindung von der eingesetzten Konzentration

Zur Kontrolle, ob eine Abhängigkeit des Bindungssignales von der injizierten Antikörpermenge besteht, erfolgte die mehrfache Injektion von drei unterschiedlich konzentrierten AK-Lösungen. Wie erwartet, konnte eine Zunahme der Bindung mit steigender Konzentration des Antikörpers beobachtet werden (Abbildung 45). Zur Stabilitätskontrolle erfolgten jeweils acht Injektionen der Lösungen direkt nacheinander, an die sich nochmals drei Injektionen der höchsten Antikörperkonzentration anschlossen.

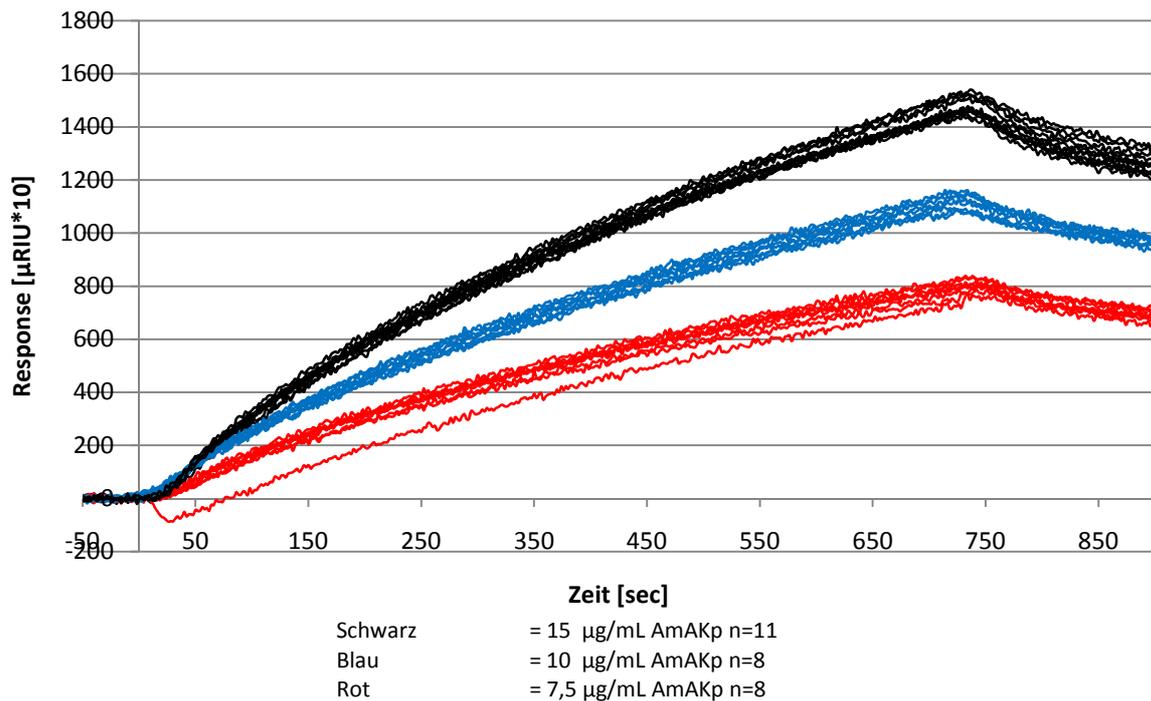


Abbildung 45: Sensorgramm Injektion AmAK polyklonal; Imm. Am-GOD 1 auf SAM; Fluss 10 µL/min, Regeneration 20 mM NaOH;

Für die weiteren Arbeiten wurde mit einer Antikörperkonzentration von 7,5 µg/mL gearbeitet, da:

- ausreichende Bindungshöhe mit durchschnittlich 72 µRIU gegeben war,
- hohe Kosten des Antikörpers (Verringerung des Verbrauchs) beachtet wurden,
- es Einschränkungen der frei verfügbaren Bindungsstellen für den kompetitiven Test ergibt.

#### **4.3.5.2. Überprüfung der Kreuzreaktivität des Antikörpers**

In einem weiteren Schritt wurde zur Analysenvorbereitung die angegebene Kreuzreaktivität des pAmAK getestet. Laut Datenblatt weist der Antikörper (pAmAK) eine 100 % Kreuzreaktivität für Ampicillin und eine 72 % Kreuzreaktivität für Penicillin G auf. Es wird daher eine höhere Bindung bei Zugabe von Penicillin G zur Antikörperlösung erwartet als bei Ampicillin. Dies wurde in den durchgeführten Untersuchungen bestätigt.

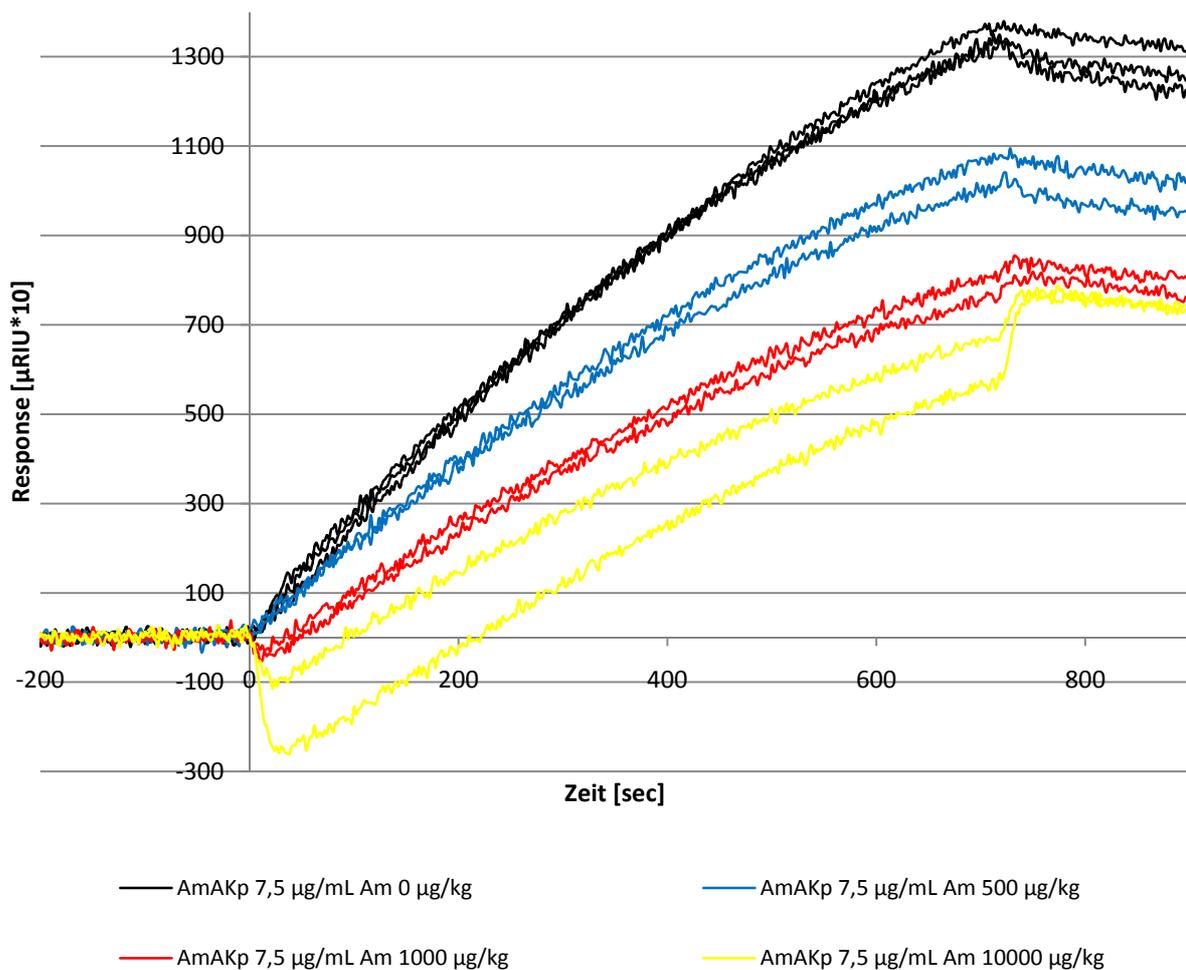
#### **4.3.5.3. Ergebnisse – kompetitiver Assay**

Bei der Durchführung wurden zwei Wege verfolgt. Zum Einen wurde die Antikörperkonzentration schrittweise gesenkt, um damit möglichst wenig Bindungsstellen für die Konkurrenzreaktion zwischen Ampicillin und Ampicillin-Konjugat zur Verfügung zu stellen. Dabei muss auf ein ausreichend intensives Resonanzsignal für den Referenzwert (Antikörperinjektion ohne Ampicillin) geachtet werden. Zum Anderen wurde der Einfluss der Inkubationszeit, in welcher das Ampicillin aus der Probe mit dem Antikörper vor Beginn der Injektion wechselwirken kann, überprüft.

In den durchgeführten Untersuchungen konnte zwar eine Abhängigkeit zwischen der Bindung des Antikörpers und der Konzentration an Ampicillin beobachtet werden (Abbildung 46), jedoch konnte keine komplette Hemmung der Bindung erreicht werden. Untersucht wurden Konzentrationen zwischen 500 bis 100000 µg/kg und eine Verringerung der Antikörperkonzentration in der Lösung von 15 µg/mL bis auf 5 µg/mL, wobei letztere mit einem Referenzwert von 48 µRIU für den kompetitiven Assay zu niedrig war.

Ab einer bestimmten Konzentration erfolgte die Hemmung nur bis zu einem bestimmten Level. Injektionen mit 20000 µg/kg Ampicillin führten zur gleichen Bindung des Antikörpers wie die Injektionen mit 1000 und 10000 µg/kg Ampicillin und wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abbildung 46 nicht mit dargestellt.

Eine Möglichkeit ist das Vorhandensein einer Fraktion von Antikörpern im polyklonalen Serum, die nur für das Konjugat spezifisch sind.

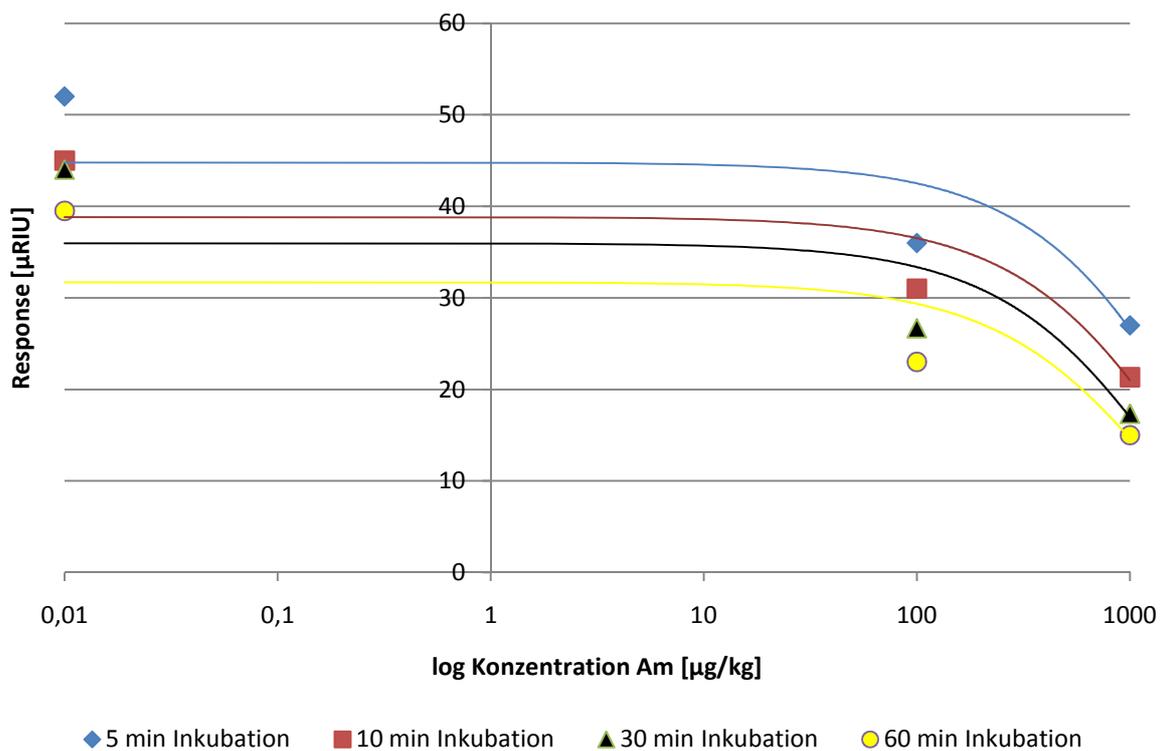


**Abbildung 46: Sensorgramm kompetitiver Test pAmAK mit Am; Imm. Am-GOD 1 auf SAM; Inkubationszeit 30 min, flow 10 µL/min, Regeneration 20 mM NaOH**

Aufgrund der nicht erreichbaren kompletten Hemmung wurde die Inkubationszeit näher betrachtet, um herauszufinden, ob eine längere Inkubationszeit Einfluss auf die Hemmung hat. Dafür wurden Injektionen durchgeführt, die sich nur durch eine Vor-Inkubationszeit unterscheiden. Hierbei wurden zum Einen Injektionen durchgeführt, für die die Lösungen per Hand gemischt wurden, sodass sich eine Inkubationszeit von mehreren Stunden bis zur Injektion ergab. Ebenfalls wurden Serienuntersuchungen durchgeführt, bei der die Lösungen vor der Injektion vom Autosampler gemischt wurden.

Die ermittelten Werte der Response signale wurden gegen die Konzentration des zugegebenen Ampicillins aufgetragen und analog zu Auswertungen aus dem ELISA-Bereich in halblogarithmischer Form dargestellt (Abbildung 47). Neben einer Abhängigkeit von der Inkubationszeit, wobei eine größere Hemmung mit längerer Inkubationszeit zu sehen ist, ist auch eine nachlassende Bindung des Referenzwertes bei sehr langer Inkubationszeit zu detektieren. Als Referenzwert wird hierbei der durchschnittliche µRIU-Wert betrachtet, der bei

den ersten pAmAK Injektionen ohne Ampicillinzugabe erreicht wurde. Hierbei ist der Abfall der Bindung des Referenzwertes des Antikörpers bei einer Inkubationszeit von 60 min besonders deutlich, ohne ein Zugewinn an Hemmung zu erreichen. Hinzu kommt eine deutlich verlängerte Analysenzeit, weswegen wurden weitere Untersuchungen mit einer Inkubationszeit von 30 min durchgeführt wurden.

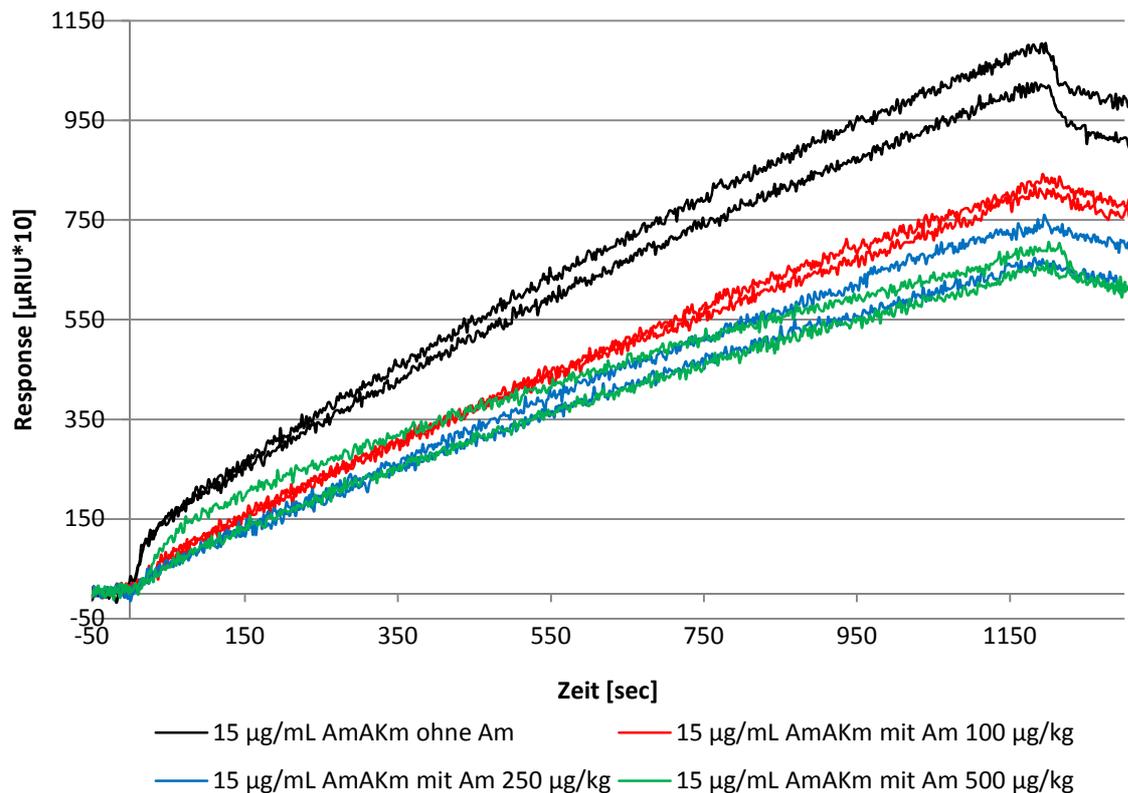


**Abbildung 47: Darstellung Abhängigkeit des Bindungsgrads von der Inkubationszeit, 7,5 µg/mL pAmAK; Imm. Am-GOD 1 Konjugat auf SAM; Regeneration 20 mM NaOH, Fluss 10 µL/min**

#### 4.3.6. Kompetitiver Assay mit monoklonalem Antikörper

Der kompetitive Assay wurde auch mit dem monoklonalen Antikörper (mAmAK) durchgeführt. Dieser sollte spezifischer reagieren und gegebenenfalls größere Signalunterschiede bei Ampicillinzugabe zeigen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 48 dargestellt.



**Abbildung 48: Sensorgramm kompetitiver Test mAmAK mit Am; Imm. Am-GOD 1 Konjugat auf SAM; Fluss 10 µL/min, Regeneration 5 mM NaOH**

Der mAmAK zeigt eine geringere Bindung (Referenzwert) als der pAmAK. Mit dem monoklonalen Antikörper wird eine deutlichere Hemmung der Bindung an das immobilisierte Am-GOD Konjugat in Abhängigkeit von der Ampicillinzugabe erreicht. Bei höherer Ampicillinzugabe (bis 20000 µg/kg) kann jedoch auch bei diesem Versuch keine komplette Hemmung festgestellt werden.

Insgesamt zeigt dieser kompetitive Ansatz eine bessere Empfindlichkeit bei kleineren Ampicillinkonzentrationen, die aber noch deutlich über dem MRL-Werten für Ampicillin liegen.

Trotz der guten ersten Resultate wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt, da, wie in Abbildung 48 zu erkennen ist, die Schwankungen zwischen den Einzelmessungen (Unpräzision) groß sind und damit die Unterschiede der Signalwerte bei kleineren Ampicillinkonzentrationen nicht mehr signifikant wären. Ein weiterer Schwachpunkt ist die geringe Stabilität des verwendeten Antikörpers in den zu injizierenden Pufferlösungen. Dies ließ sich durch eine deutliche Abnahme des Referenzwertes in langen Messreihen z.B. über Nacht erkennen.

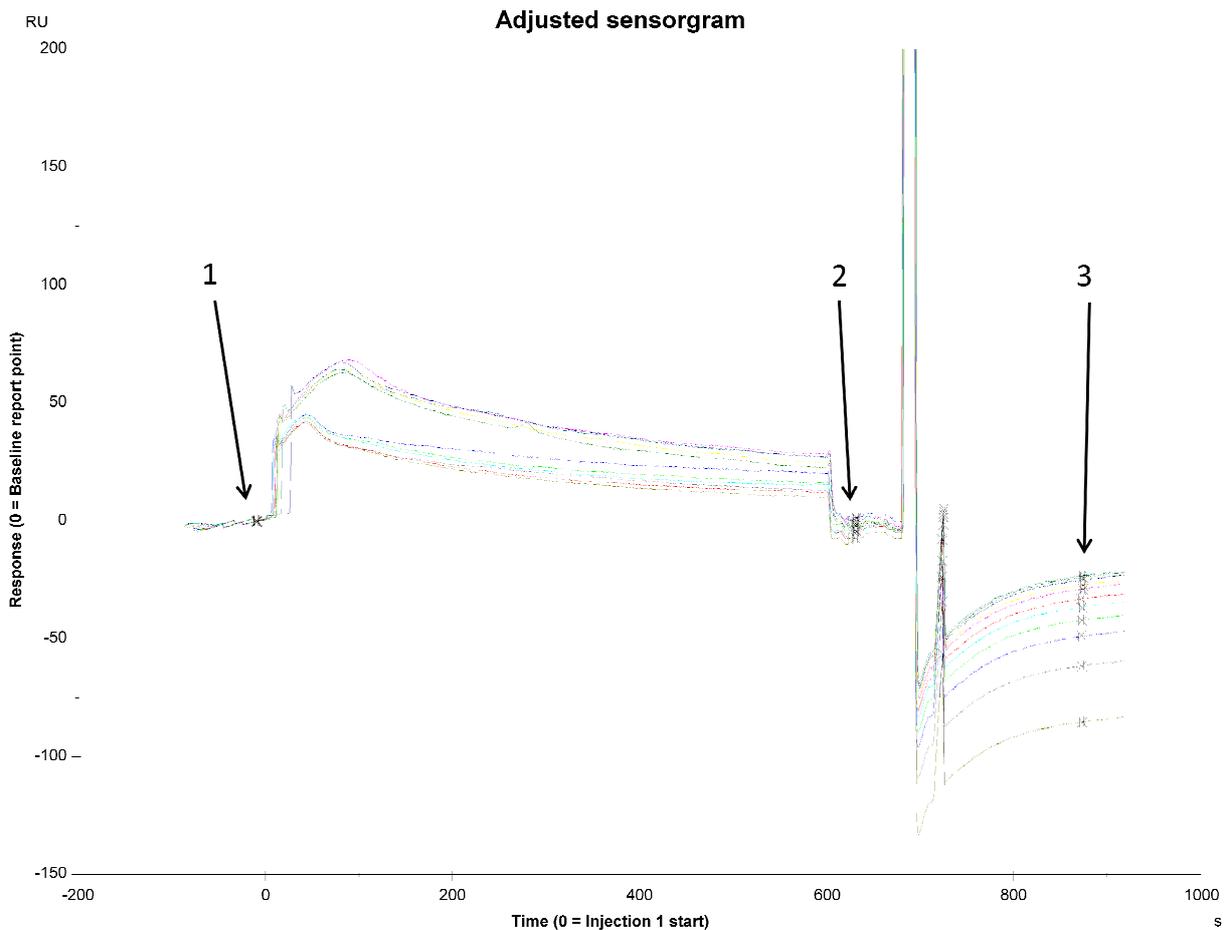
Eine bessere Stabilität zeigte der Antikörper in Gegenwart der Pufferlösungen, wenn der Antikörper auf dem Sensorchip immobilisiert ist. (Vergleiche Direkter Assay)

#### **4.4. Rückstandsanalytik mittels *Biacore-SPR***

Die Rückstandsanalysen des direkten und des kompetitiven Assays wurden vergleichsweise auf dem Biacore Q-Gerät mit vier Flusszellen auf jedem Sensorchip durchgeführt. Für die durchgeführten Untersuchungen auf dem Biacore Q Gerät wurde der standardmäßig empfohlene Sensorchip CM5 verwendet. Versuche mit selbsthergestellten SAMs waren nicht aussagekräftig, möglicherweise wegen der nicht durchführbaren Komplettreinigung der Oberfläche aufgrund der festen Verankerung des Sensorchips mit der umgebenen Kunststoffhalterung. (siehe 6.7.6. Herstellung SAM)

##### **4.4.1. Direkter Assay**

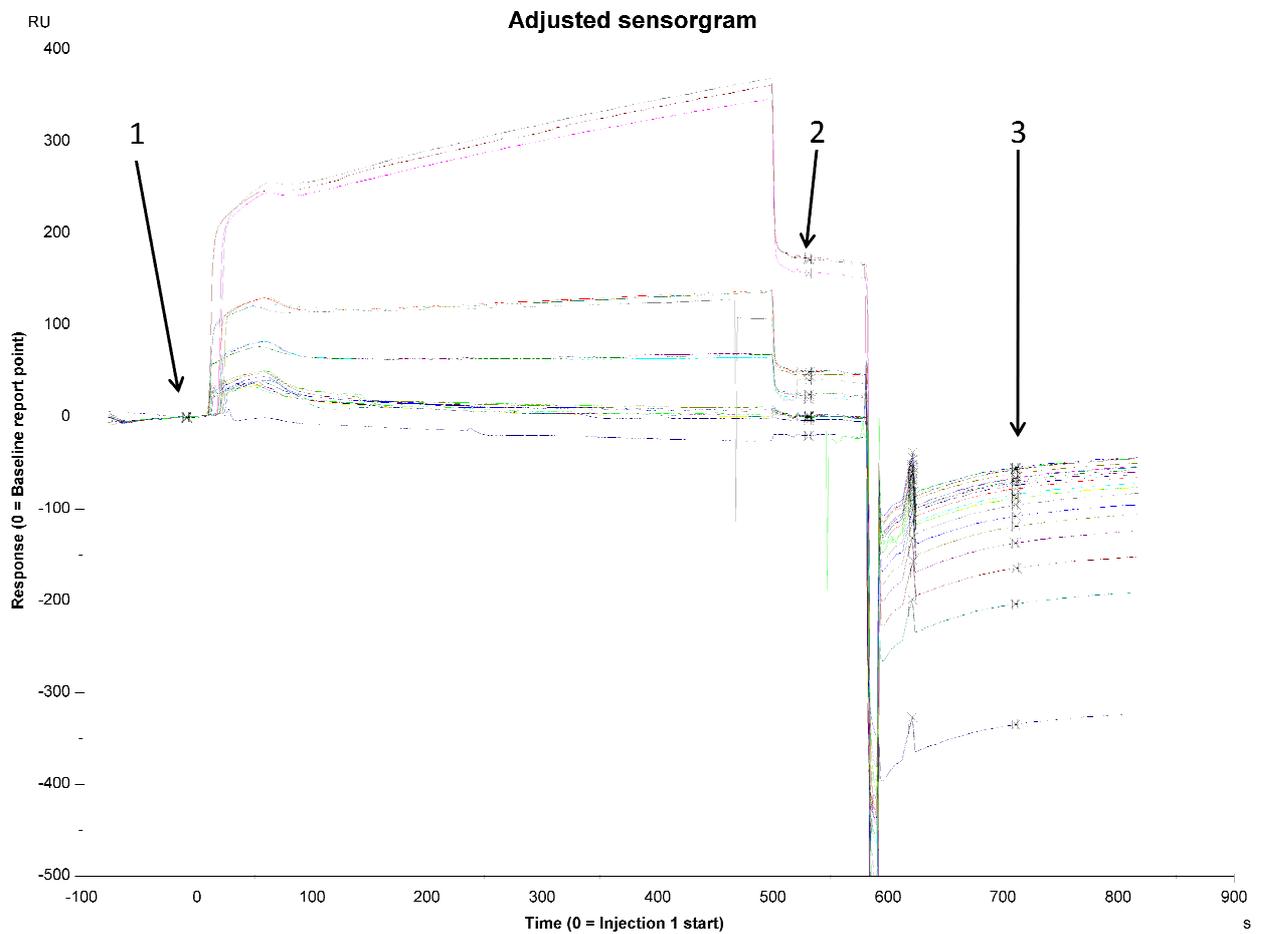
Für den direkten Assay wurde analog zu den Analysen auf dem Reichert-Gerät mAmAK (55 µg/mL) mit der maximal möglichen Kontaktzeit (Gerätevorgabe) immobilisiert. Es wurden auf zwei verschiedenen Flusszellen Immobilisierungslevel von 13712 RU auf fc 1 (18784 µRIU) bzw. 10654 RU auf fc 2 (14595 µRIU) erreicht. Gearbeitet wurde jeweils mit Kalibrierlösungen im Bereich 500 – 6000 µg/kg. Hierbei konnte auf Flusszelle 1 noch ein geringer Unterschied zwischen der 500 µg/kg und den anderen Konzentrationen detektiert werden. Auf Flusszelle 2 konnten hingegen keinerlei Bindungen beobachtet werden (Abbildung 49). Somit konnte analog zu den Analysenergebnissen auf der Reichert-SPR auch auf der Biacore-SPR im direkten Assayformat keine Ergebnisse erzielt werden. Infolgedessen ist für kleine Analytmoleküle wie das Ampicillin ein direkter Assay nicht möglich.



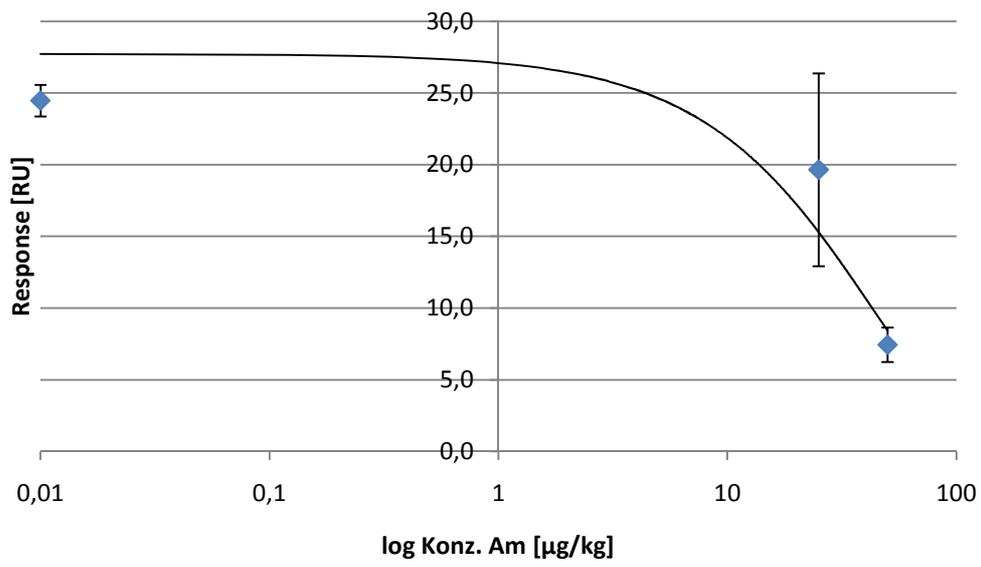
**Abbildung 49: Sensorgramm Biacore, Darstellung aller Zyklen übereinander mit gemeinsamem Messpunkt 1, CM5, Fluss 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , fc 2, Kalibrierung Am 500 - 6000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; Messpunkt 1: Basislinie vor Injektion; Messpunkt 2: Basislinie nach Injektion der Analysenlösung ( $\Delta\text{RU}$  zu Messpunkt 1 = Bindung der Analyten an Oberfläche; Messpunkt 3: Basislinie nach Regeneration)**

#### 4.4.2. Kompetitiver Assay

Die in diesem Test verwendete Flusszelle eines CM5 Sensorchips wurde mit AmGOD 1 Konjugat analog der bisherigen Immobilisierungen belegt (Immobilisierungslevel 10737 RU = 14709,7  $\mu\text{RIU}$ ). Auf der Oberfläche wurde zunächst die Bindefähigkeit des mAmAK nach der Immobilisierung mittels der Erstellung einer Kalibriergerade (Bereich 55 - 220  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Abbildung 50) getestet. Eine kompetitive Hemmung durch Ampicillinzugabe wurde zunächst in einem Kalibrierbereich von 50 – 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  und anschließend im erweiterten Kalibrierbereich von 0 – 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  gemessen (Abbildung 51,  $\Delta\text{RU}$  = Messpunkt 1 – Messpunkt 2). Hierbei konnten bei allen Proben Hemmungen detektiert werden, wobei ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bereits eine komplette Hemmung zu beobachten ist. Damit ist der prinzipielle Versuchsaufbau des kompetitiven Assays möglich. Für quantitative Analysen auf der Biacore-SPR wären jedoch weiterführende Untersuchungen bzw. Optimierungen der Konzentrationsverhältnisse erforderlich. Da das Ziel der Arbeit jedoch die Rückstandsanalytik mittels Reichert-SPR war, wurden diese Optimierungsversuche nicht mehr durchgeführt.



**Abbildung 50: Sensorgramm Biacore, Darstellung aller Zyklen übereinander mit gemeinsamem Messpunkt 1, CM5, Imm. Am-GOD 1 Konjugat, fc 3, Fluss 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , mAmAK 55-220  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Regeneration 40 mM NaOH; Messpunkt 1: Basislinie vor Injektion; Messpunkt 2: Basislinie nach Injektion der Analysenlösung ( $\Delta\text{RU}$  zu Messpunkt 1 = Bindung der Analyten an Oberfläche; Messpunkt 3: Basislinie nach Regeneration)**



**Abbildung 51: Bindungshemmung mAmAK in Abhängigkeit der Am-Konzentration (0 - 50 µg/kg), CM5, Imm. Am-GOD 1 Konjugat, fc 3, Fluss 10 µL/min, Regeneration 40 mM NaOH**

## ***4.5. Wechselwirkung von Matrix mit Chipoberflächen***

Matrixeinflüsse durch unspezifische Bindungen bzw. Wechselwirkungen an der Chipoberfläche gehören zu den größten Störfaktoren bei der SPR. Diese unspezifischen Bindungen können durch elektrostatische, hydrophobe Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen zwischen z.B. Proteinen und der Chipoberfläche oder dem Eindringen von Matrixbestandteilen in die Chipbelegung (z.B. Dextranschicht oder Hydrogel) und dem Verbleib in der Chipbelegung ohne Bindung (sterische Hinderung der Abdissoziation von der Chipoberfläche) hervorgerufen werden.

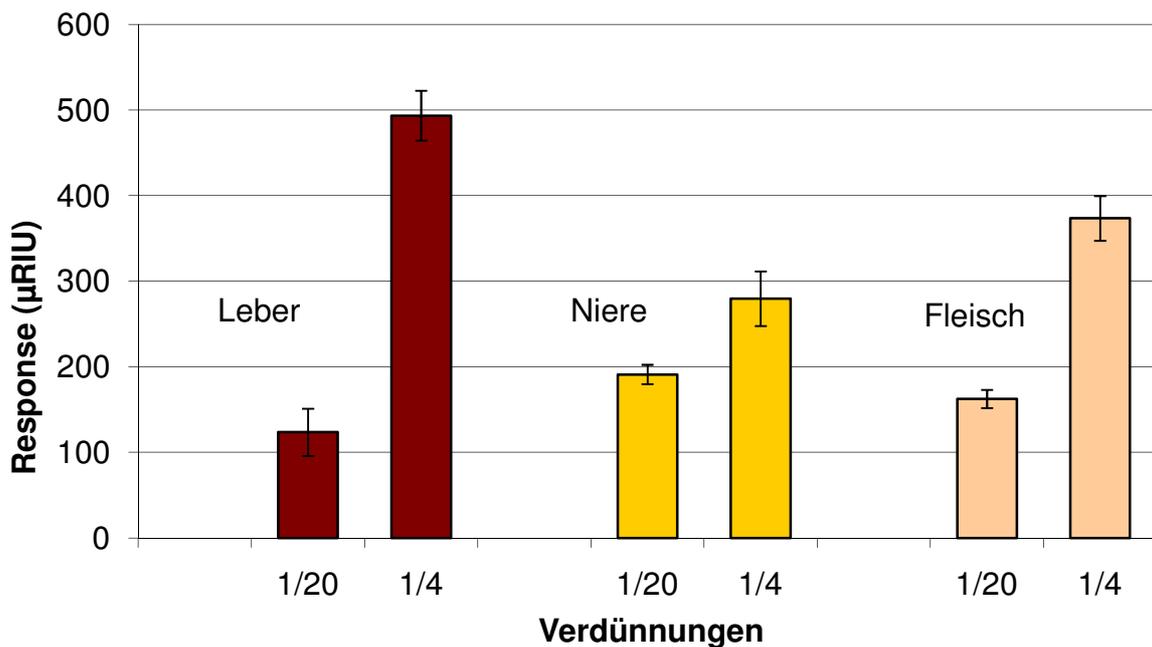
Der *bulk*-Effekt spielt hierbei eine große Rolle. Dabei handelt es sich um die Brechungsindexänderung die von der injizierten Lösung am Signalbeginn hervorgerufen wird. Dieser Brechungsindexänderung liegt jedoch keine Bindung zugrunde, führt jedoch zu einem sprunghaften Signalanstieg. Die Änderung des Signals durch eine Massenänderung (Brechungsindexänderung) an der Chipoberfläche zeigt sich erst nach dem Injektionsende, wenn wieder Laufpuffer über das System fließt. Ein hoher Gehalt an Proteinen oder Zuckern verstärkt den *bulk*-Effekt und führt zu falschen Ergebnissen und hohen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen durch hohe Blindwerte, da durch unspezifische Bindungen der *bulk*-Effekt auch nach dem Injektionsende teilweise bestehen bleibt. Um die hohen Blindwerte zu reduzieren, ist es nötig, durch eine geeignete Aufarbeitung Störsubstanzen zu entfernen oder durch Wahl eines anderen Sensorchips die Wechselwirkungen zwischen Matrix und Chip zu minimieren. Beide Wege wurden für verschiedene Ausgangsmaterialien untersucht.

Wichtige Matrices bei Analysen von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sind neben der Milch auch Muskelfleisch, Leber und Niere vom Schwein, mit einem hohen Proteinanteil, welcher viele unspezifische Wechselwirkungen mit der Chipoberfläche verursacht.

### **4.5.1. Minimierung der Matrixwechselwirkungen durch Variation der Verdünnung**

Durch die Aufarbeitung mit verschiedenen Verdünnungsstufen konnte die Verminderung des Störeinflusses durch unspezifische Wechselwirkungen untersucht werden.

Jede Matrix wurde in den Verdünnungsstufen von 1:4, 1:20 und Leber zusätzlich von 1:50 aufgearbeitet. Das heißt, die Matrix wurde unterschiedlich stark mit Puffer versetzt und aufgearbeitet (siehe 6.6.).



**Abbildung 52: Matrixwechselwirkung auf einem HC1000M (Xantec, unbelegt, Fluss 10 µL/min); Regeneration 40 mM NaOH; n=2**

Die Wechselwirkungen der Filtrate der 1:4 Verdünnung waren stärker als bei 1:20 ausgeprägt. Aufgrund der erwarteten geringen Rückstände in den jeweiligen Matrices (MRL 50 µg/kg [15]) müssten jedoch Verdünnungen von 1:4 mit einem absoluten Gehalt der Probelösung von 50 ng (gerechnet mit dem MRL-Wert) gewählt werden oder bei einer 1:20 Verdünnung Anreicherungsschritte eingeschaltet werden.

#### **4.5.2. Minimierung der Matrixwechselwirkungen durch Variation der Sensorchips**

In Kapitel 3.4. Sensorchips wurden die unterschiedlichen verwendeten Sensorchips mit ihren spezifischen Eigenschaften beschrieben. Geprüft wurden die Matrixeinflüsse der Schweinelebermatrix, da diese in der 1:4 Verdünnung die größten Wechselwirkungen zeigt. Drei Sensorchips, die geeignet erschienen, wurden getestet. Die entsprechenden Vorteile, welche zur Reduktion von Störeinflüssen der Matrix beitragen [40], sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

**Tabelle 11: Zusammenfassung der Vorteile von Sensorchips bezüglich unspezifischer Bindung durch Wechselwirkungen [40]**

Sensorchip	Vorteil
C150d	dicht gepackte Oberfläche
CMD150d	dicht gepackte Oberfläche geringe unspezifische Proteinbindung empfohlen für die Immobilisierung von Proteinen/DNA
HC1000m	sehr geringe unspezifische Proteinbindung empfohlen für kleine Analyten große Belegungshöhe (über evaneszentes Feld hinaus)

**vergleiche auch Abschnitt Sensorchips 3.4.**

Erwartet wird daher eine deutliche Verbesserung bzw. Verminderung der Störeinflüsse auf den beiden letztgenannten Sensorchips. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 53 dargestellt.

Die Vorteile vom HC1000m und vor allem vom CMD150d im Vergleich zum C150d sind deutlich zu erkennen. Die Proteine, welche für die Störeinflüsse verantwortlich gemacht werden, sollten beim HC1000m gar nicht in den Bereich des evaneszenten Feldes eindringen, also nicht erfasst werden, da sich dieser Sensorchip durch eine geringere Ladungsdichte und damit eine geringere Anziehung der Moleküle auszeichnen sollte. Es scheint jedoch, dass die nach der Probenaufarbeitung verbleibenden kleineren Proteine in der Lage sind, tiefer in das Hydrogel des HC1000m Sensorchips einzudringen und von dort schlechter wieder wegdissoziieren können. Ähnliche Effekte wurden von Andree [34] beobachtet. Im Gegensatz dazu steht der CMD150d Sensorchip, welcher zum Einen dichter gepackt ist und zum Anderen eine deutlich kleinere Belegungshöhe aufweist, wodurch die Proteine nicht tief eindringen und nach Beendigung der Injektion ebenfalls rasch abdissoziieren können. Bei SAM-Sensorchips sind hingegen höhere unspezifische Wechselwirkungen zu erwarten, da die Goldoberfläche meist nicht vollkommen eben ist und es so zu „aktiven“ Stellen, an denen z.B. Proteine an die Goldoberfläche adsorbieren können, zwischen den gebundenen Mercaptoalkylketten kommen kann (siehe Abbildung 31) [43].

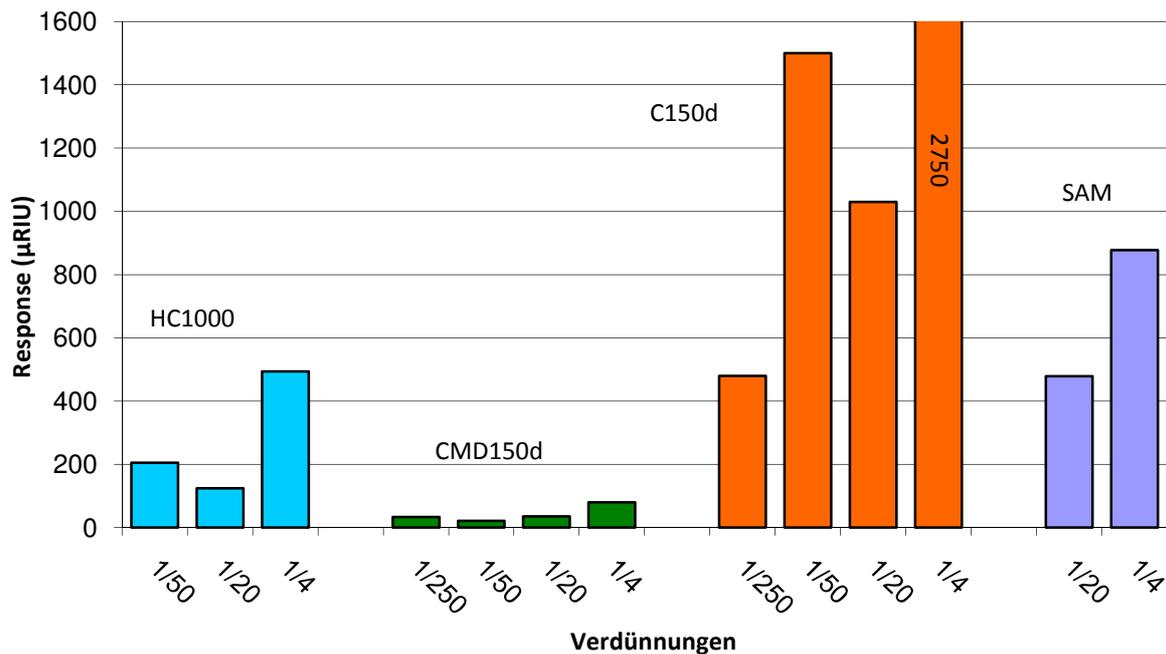


Abbildung 53: Vergleich unspezifischer Bindungen von Bestandteilen der Schweineleber an verschiedenen Chipoberflächen; Fluss 10 µL/min; Regeneration 40 mM NaOH; Injektionsdauer 5 min; n=2

Für diese Annahme spricht auch der auftretende *bulk*-Effekt bei den jeweiligen Injektionen. Auch hierbei sind bereits deutliche Unterschiede erkennbar (Vergleiche Abbildung 54). Diese treten umso stärker auf, je mehr Matrixbestandteile in das evaneszente Feld eindringen.

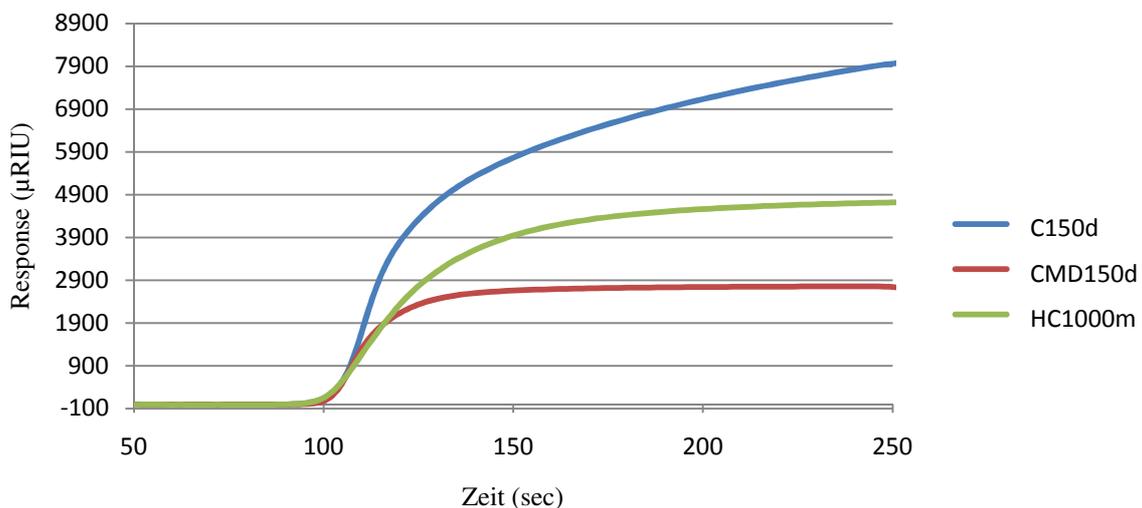


Abbildung 54: *bulk*-Effekt der Schweineleber-Injektion auf verschiedenen Sensorchips (Fluss 10 µL/min); Regeneration 40 mM NaOH; Injektionsdauer 5 min;

## 4.6. Regeneration

Die Regeneration ist der letzte Schritt einer Analyse. Sie sollte den Analyten und unspezifisch gebundene Moleküle möglichst komplett von der Chipoberfläche entfernen, ohne diese negativ zu beeinflussen, durch zum Beispiel:

- Ablösung von Teilen des immobilisierten Liganden oder
- Zerstörung z.B. Denaturierung des Liganden oder
- Veränderung der Struktur des Liganden

Jede dieser Einflussmöglichkeiten führt genauso wie eine unvollständige Ablösung des Analyten zu einer verringerten Bindung des Analyten im nächsten Zyklus.

Bei der Arbeit mit immobilisierten Antikörpern ist bei der Regeneration besondere Vorsicht geboten, um Denaturierungen und Veränderungen und somit der Unbrauchbarmachung des Chips zu vermeiden. Meistens werden in der Rückstandsanalytik schwache Säuren oder Basen als Regenerationslösung verwendet oder eine Glycinlösung (10-100 mM), welche sauer (pH 2) oder basisch (pH 12) eingestellt wird [3, 38, 47-57].

Andersson et al. [58] entwickelten einen systematischen Test zur Ermittlung geeigneter Regenerationslösungen. Hierbei werden die verschiedenen Möglichkeiten der Wechselwirkung berücksichtigt und Lösungen mit unterschiedlichen Eigenschaften kombiniert.

In Anlehnung an dieses Schema wurden folgende Lösungen getestet:

- Ionisch (I),
- Unpolar (U),
- Detergenzien (D),
- Regenerationsreagenz Sauer (A).

Die Lösungen wurden jedoch direkt und nicht in dem von Andersson et al. [58] vorgeschlagenen Mischungen und Verdünnungen eingesetzt.

Im Vorfeld wurde eine Natriumhydroxidlösung [36] getestet, welche jedoch keine vollständige, zufriedenstellende Regeneration brachte.

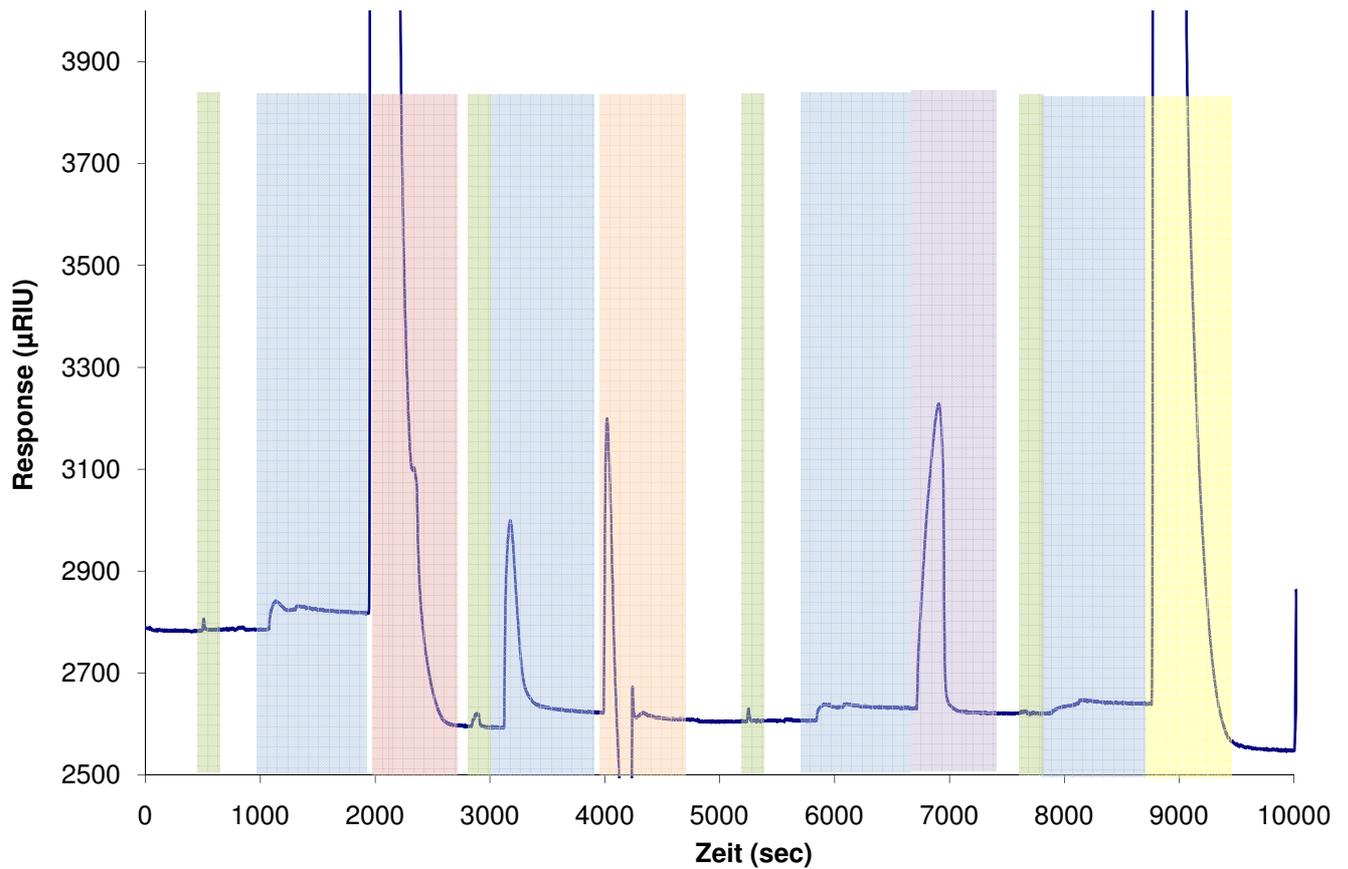


Abbildung 55: Injektion Cf (6000 µg/kg) mit verschiedenen Regenerationslösungen (Anlehnung an [58]); Imm. Cf-AK auf SR7000; Injektionsdauer 3,5 min; Fluss 20 µL/ min; Cf-Bindung 35 - 25 µRIU

Farbe	Injektion	
<span style="color: green;">█</span>	Puffer	
<span style="color: lightblue;">█</span>	Ceftiofur (Konzentration 6 µg/mL)	
<span style="color: red;">█</span>	Regenerationslösung U	Regeneration zu stark = Veränderung/Zerstörung der Oberfläche
<span style="color: orange;">█</span>	Regenerationslösung D	Regeneration unzureichend
<span style="color: purple;">█</span>	Regenerationslösung A	Regeneration unzureichend
<span style="color: yellow;">█</span>	Regenerationslösung I	Regeneration leicht zu stark = Veränderung/Zerstörung der Oberfläche

In Abbildung 55 und Abbildung 56 sind die Sensorgramme der Regenerationstests dargestellt. Nur die ionische Regenerationslösungsmischung lieferte annähernd zufriedenstellende Ergebnisse, erkennbar in Abbildung 55. Da auch dort die Regeneration noch etwas zu stark (Absenkung der Basislinie unter Startniveau, entspricht einer Oberflächenzerstörung) war, wurden im Anschluss die Einzelkomponenten (Teillösungen) der ionischen Lösung getestet.

Guanidinhydrochlorid in einer etwas stärkeren Konzentration erwies sich zunächst als Optimum. Langzeitversuche (circa 6 Wochen) zeigten jedoch auch bei dieser Lösung eine unvollständige Regeneration. Ein Test mit einer schwachen Phosphorsäure führte zur Denaturierung des Antikörpers und Zerstörung der Chipoberfläche. Daher wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Cacciatore [8] zur  $\beta$ -Lactam-Analytik auf eine Natriumhydroxidlösung mit 10 % Acetonitril zurückgegriffen. Weitere Versuche zeigten, dass eine Konzentration von 20 mM NaOH mit 10 % Acetonitril auf allen Oberflächen bei den getesteten Systemen (Antikörper – Antigen bzw. Konjugat) die besten Resultate lieferte.

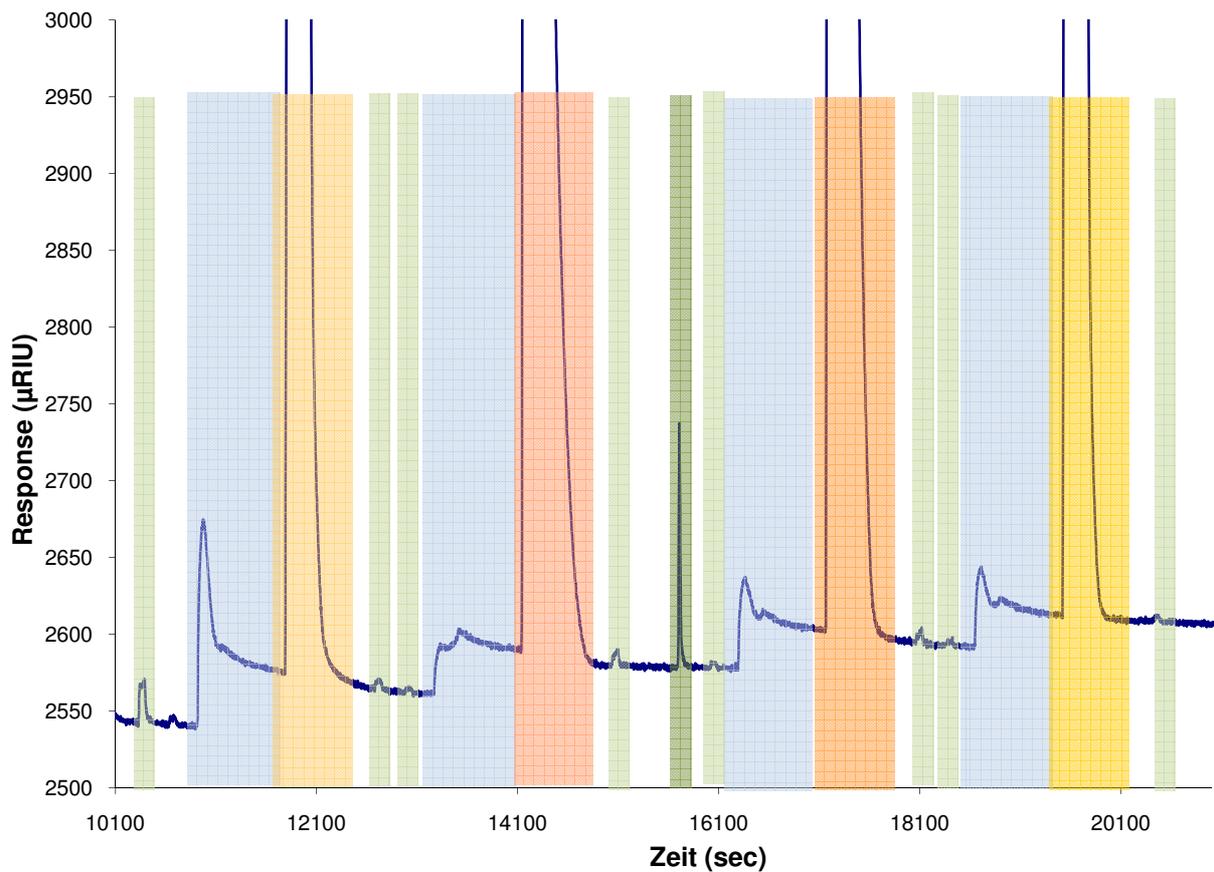


Abbildung 56: Injektion Cf (MRL) mit den Teillösungen aus Regeneration I; Imm. Cf-AK auf SR7000; Injektionsdauer 3,5 min; Fluss 20 µL/ min; Cf-Bindung 35 -25 µRIU

Farbe	Injektion	
	Puffer	
	<i>refill</i>	
	Ceftiofur (Konzentration 6 µg/mL)	
	Regenerationsteillösung KSCN	Regeneration unzureichend
	Regenerationsteillösung MgCl <sub>2</sub>	Regeneration unzureichend
	Regenerationsteillösung Guanidin-HCl	Regeneration unzureichend
	Regenerationsteillösung Harnstoff	Regeneration unzureichend

#### **4.7. Vergleich der Reichert-SPR mit einem Biacore Q-Gerät**

Im Laufe der Arbeit konnten in Zusammenarbeit mit dem Hersteller der Reichert-SPR einige Optimierungen und Anpassungen an die Anforderungen in der Rückstandsanalytik erreicht werden. Die größten Verbesserungen konnten bei der Pumpe und der entsprechenden Software erzielt werden. Sowohl die Reichert-SPR als auch das Biacore Q-Gerät verfügen über Hochleistungs-Spritzenpumpen, welche sehr gut für die Rückstandsanalytik geeignet sind.

Zu den Verbesserungen der Pumpe SR7500 gehört die Steuerung mittels Software ebenso wie das Weiterarbeiten der Pumpe im programmierten Modus, auch wenn es zu Ausfällen der Computersoftware kommen sollte. Ebenfalls konnten die erforderlichen konstanten Pumpraten für den Fluss und die Möglichkeit eines schnellen *refills* ohne Unterbrechung der Analytik erreicht werden. Im Vergleich zum Biacore Q ist es jedoch nicht möglich, während einer Analyse mit verschiedenen Flüssen zu arbeiten. Das heißt, der Fluss muss so gewählt werden, dass er sowohl für die Probeninjektion als auch für die Regeneration genutzt werden kann. Eine Flussanpassung an die einzelnen Schritte der Analyse, wie sie beim Biacore Q durch vorherige Programmierung erfolgt, ist nicht möglich.

Das Reichert-SPR-System mit den drei Komponenten Pumpe, Autosampler und SPR-Messeinheit wird über drei unabhängige Softwareprogramme gesteuert. Diese einzelnen Softwareprogramme sind nicht untereinander verbunden und geben daher keine Informationen aneinander weiter. Eine Steuerung wie bei dem Biacore Q-Gerät über nur eine Software und die damit einhergehende Informationsübertragung ist ein nächster Schritt in der Weiterentwicklung der Reichert-SPR und wird vom Hersteller angestrebt.

Wichtige Informationen, die nicht übertragen werden, sind beispielsweise die Injektionsmarken (Start und Ende der Injektion) bzw. Messpunkte, welche zwar manuell (damit Anwesenheit erforderlich) gesetzt werden können, jedoch in der weiteren Auswertung nicht nutzbar sind, da diese im Verlauf der Datenübertragung (Vergleiche 3.1.1.) verloren gehen. Insgesamt bietet die Biacoresoftware mit:

- der Anzeige des benötigten Reagenzvolumens und des entsprechenden Gefäßes,
- der Definitionsmöglichkeit von Messpunkten (vergleiche Kapitel 4.4) und deren automatischer Markersetzung,
- der Möglichkeit unbegrenzt viele Zyklen an unterschiedlichen Messpunkten übereinanderzulegen und
- der unkomplizierten Auswertung durch Auslesung der gesetzten Messpunkte, Erstellung einer der Analyse angepassten Kalibriergerade und der vollautomatisierten Berechnung der Ergebnisse

eine deutlich bessere Bedienungsfreundlichkeit und Hinweise zur Vermeidung von Fehlern.

Die Reichert Software hingegen bietet den Vorteil, dass mehrere vollständige Messzyklen (Analytinejektion, Regeneration) nacheinander auf dem Bildschirm darstellbar sind. Mit der Darstellung mehrerer Zyklen ist ein schnellerer optischer Vergleich der einzelnen Zyklen

untereinander möglich und Effekte wie eine unvollständige Regeneration lassen sich schneller erkennen. Bei Biacore lassen sich nur definierte Messpunkte, z.B. der Basislinie, graphisch darstellen.

Für die Rückstandsanalytik ist es weiterhin wichtig, dass geringe Reagenzvolumina mit hoher Empfindlichkeit analysiert werden können. Hierbei spielen die Flusszellengröße und die erreichbaren Messsignale eine große Rolle. Die Flusszellen bei Reichert sind entweder 6 oder 9 mm lang und fassen ein Volumen von circa 900 nL (große Flusszelle), die Biacoreflusszellen haben hingegen ein Volumen von 20 nL bei vergleichbaren Messsignalen. Hinzu kommt beim Gerät von Reichert eine deutlich längere Flussstrecke zwischen dem Schaltventil und der Flusszelle und damit ein größeres Totvolumen ( $\approx 6 \mu\text{L}$ ).

Die geringe Flusszellengröße bietet die Möglichkeit auf einem Chip mehrere Flusszellen zu nutzen. In Abschnitt 3.1.2. ist eine Möglichkeit dargestellt, beim Reichert-Gerät durch unterschiedlichen Einbau des Sensorchips zwei Flusszellen pro Sensorchip zu schaffen. Dies ist jedoch mit einem Umbau verbunden.

Beim Einbau des Sensorchips wird das Prisma mit der Glasfläche des Sensorchips durch Dispersionsöl verbunden. Dies darf nur sehr gering dosiert werden, da es sich nicht auf der Chipoberfläche ausbreiten darf. Dies würde sich negativ bis hin zur Unbrauchbarmachung des Sensorchips auswirken. Eine gründliche Reinigung der Unterseite mit Ethanol und Wasser ist daher nach jedem Ausbau erforderlich, auch hierbei ist eine Beeinflussung der Chipoberseite zu vermeiden. Ebenfalls ist eine entsprechend schonende Lagerung vorzunehmen. Beim Biacore Q können vier Flusszellen ohne Umbau im ständigen Wechsel direkt angesteuert werden.

Biacore verwendet zur Überbrückung des Luftraums eine ultradünne Silikonfolie, welche dauerhaft im Gerät verbleibt. Ebenso ist die Lagerung durch die Fixierung des Sensorchips in der Kunststoffhalterung unkompliziert. Diese Halterung wirkt sich nachteilig bei der Herstellung von SAMs aus. Eine Grundreinigung der Chipoberfläche mittels Piranhalösung ist nicht möglich und die Gewährleistung einer dauerhaften Benetzung war aufgrund der benötigten Größe der Glasware weniger praktikabel, da während der SAM Herstellung zur Vermeidung von Verdunstungseffekten eine Sättigung des Dampfraumes mit Ethanol über der Lösung sicherzustellen war (Kapitel 6.7.6.).

In beiden Geräten sind neben den eigenen Sensorchips der Herstellerfirma auch Sensorchips der Firma Xantec einsetzbar. Die Sensorchipvariabilität bezüglich der Oberflächen ist vergleichbar.

Neben der eigentlichen Analyse ist die Wartung und Reinigung des Gerätes ein Hauptkriterium in der Benutzer- und Bedienungsfreundlichkeit. Bei Reichert gibt es kein vorgeschriebenes Reinigungsprogramm bzw. -intervall und keine vorgeschriebenen Reinigungslösungen. Dies führte jedoch in der Anfangszeit zu größeren Problemen, da die Wartungsintervalle zu lang gewählt wurden. Das erarbeitete Wartungsprogramm (siehe Anhang Wartungskalender) umfasst sowohl die Variabilität der Reinigungslösung als auch die Kontrolle der Spritzen, Kapillaren und Transportbänder.

Im Gegensatz dazu ist das Maintenance-Programm bei Biacore, durch die Automatisierung der einzelnen Reinigungsschritte mit den jeweiligen Lösungen und Hinweisen der Software auf den Zeitpunkt sehr streng vorgegeben.

Insgesamt konnten durch die Zusammenarbeit mit der Firma Reichert Fortschritte bei der Nutzung der vorliegenden SPR für den Bereich der Rückstandsanalytik erzielt werden, im Vergleich zum Marktführer Biacore sollten weiterführende Verbesserungen angestrebt und vorgenommen werden.

#### ***4.8. Zusammenstellung der Arbeitsparameter für die Reichert-SPR***

In diesem Abschnitt sind die in dieser Arbeit ermittelten optimierten Punkte für das praktische Arbeiten in der Rückstandsanalytik mit der Reichert-SPR zusammengestellt.

##### Gerätezusammenstellung:

Pumpe SR7500 mit Software SR7500 (länger als 12 Monate stabil)

Endurance Autosampler mit SlscLite Software

SR7000 Einkanalgerät mit SPR4 V.4.0.16c Software

Scrubber2 Software

Einbau einer 700 µL Probenschleife (beige, i.D. 1,02 mm, L 85,7 cm) bei großen Volumina

Einbau einer 90 µL Probenschleife (orange, i.D. 0,50 mm, L 45,8 cm) optional bei kleinen Volumina

Verwendung von Vials für die Immobilisierung, Verwendung Mikrotiterplatte für Analysen

##### Chipeinbau:

Reichert Sensorchips 12x12 mm:

mittigen Einbau, 0,5 – 0,8 µL Dispersionsöl, große Flusszelle

Xantec Sensorchips 9x9 mm:

links- bzw. rechtsseitiger Einbau, 0,3 – 0,5 µL Dispersionsöl, kleine Flusszelle

##### Immobilisierung:

Arbeitsfluss 10 µL/min

optimaler Immobilisierungspuffer Natriumacetatpuffer 5 mM, pH 4

### Analysen:

Arbeitsfluss zwischen 2,5 und 10  $\mu\text{L}/\text{min}$

maximale Injektionsdauer 90  $\mu\text{L}$  Probenschleife: 10  $\mu\text{L}/\text{min}$   $\rightarrow$  85  $\mu\text{L}$  = 8,5 min

2,5  $\mu\text{L}/\text{min}$   $\rightarrow$  90  $\mu\text{L}$  = 36 min

Injektionsvolumen:

unabhängig von Probenschleife: Injektionsvolumen + 40  $\mu\text{L}$  Spülvolumen

Mindestvolumen bei Nutzung MP: Injektionsvolumen + 40  $\mu\text{L}$  Spülvolumen

+ 45  $\mu\text{L}$  Totvolumen des Autosamplers

+ 10  $\mu\text{L}$  Restvolumen in Kavität

Programmierung zur maximalen Nutzung der MP (96 Kavitäten): für 96 Injektionszyklen

- wash-Programmierung aus Laufpuffervorrat
- Regenerationslösung Injektion aus Transportvial 1 bis 4
- Analytlösung in MP

Regeneration angepasst an Versuchsbedingungen mit 5 – 40 mM NaOH (Dauer 0,5 – 1,5 min)

### Chipausbau:

Chipunterseite gründlich mit Ethanol und Wasser reinigen (Wattestäbchen)

Chip unter Stickstoff trocknen

Chiplagerung unter Helium oder Stickstoff, trocken, verschlossen, Kühlschrank

## 5. Zusammenfassung

Es ist in dieser Arbeit erstmalig gelungen, die einzelnen Gerätekomponenten der Reichert-SPR – Pumpe, Autosampler und SPR – für die Arbeiten in der Rückstandsanalytik anzupassen und zu optimieren. Die größten Fortschritte konnten dabei im Bereich des Leistungsvermögens und der Bedienungsfreundlichkeit der Pumpe erreicht werden. Mit der im Einsatz befindlichen SR7500-Pumpe von Reichert, der Hamilton 1001.5TLLX 500  $\mu\text{L}$  Pumpenspritze und der dazugehörigen Software war es möglich, Fließgeschwindigkeiten über einen großen Bereich (2,5 - 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) konstant und reproduzierbar zu fördern. Die SR7500-Pumpe als Hochleistungspumpe war dabei weitestgehend wartungsfrei und konnte ohne Unterbrechungen über einen langen Analysenzeitraum problemfrei genutzt werden.

Ein weiterer großer Fortschritt für die Nutzung der SPR im Bereich der Rückstandsanalytik wurde durch die Weiterentwicklung der SPR-Software in Zusammenarbeit mit der Firma Reichert erzielt. Das letzte Software-Update (SPR4 V.4.0.16c) bot die Möglichkeit, manuell Markierungspunkte für den Signalbeginn und das –ende zu setzen. Dies erleichterte die Übertragung der erhaltenen Daten in Scrubber und Excel und damit deren Auswertung. Weiterhin war die Aufnahme des Temperaturverlaufes in der Flusszelle während der Messung genauso möglich wie die Aufnahme der graphischen Darstellung des SPR-Minimums.

In der verwendeten Zusammenstellung der Gerätekomponenten ist somit eine getrennte und voneinander unabhängige Softwareprogrammierung und Steuerung dieser Komponenten möglich. Nachteilig wirkte sich jedoch die komplett fehlende Kommunikation der Gerätekomponenten inklusive Software während der Analyse aus.

In umfassenden Untersuchungen konnten ferner die bestmöglichen Zubehörmaterialien und deren optimierte Nutzung für die Rückstandsanalytik erarbeitet werden. Hierzu gehörte neben der Verwendung der silica-coated/steel-Injektionsnadel im Autosampler die Ermittlung der maximalen Einstichtiefe und Füllgeschwindigkeit für die Arbeit mit Vials wie auch mit Mikrotiterplatten. Dabei konnte ein sehr geringes Mindestvolumen pro Kavität (Mikrotiterplatte) ermittelt werden, was sich bei teureren Lösungen in der Rückstandsanalytik wie z.B. Antikörperlösungen als Vorteil erwies. Ebenso konnten für die Verbindungen der einzelnen Gerätekomponenten die idealen Kapillarinndurchmesser ermittelt werden. Hierbei wurde ein gutes Zusammenspiel zwischen geringem Totvolumen und wartungsarmen Arbeiten erarbeitet.

Neben der Programmierung einer umfassenden Reinigung des Autosamplers (Autosamplerspritze, Probenschleife und Injektionsnadel) während der Routinearbeit (Programmierung „wash“) konnte ein bedienungsfreundliches und zeitgleich Ressourcen schonendes (Material und Zeit) Wartungsprotokoll zusammengestellt werden.

Für die Analysen konnten Rinderserumalbumin-Konjugate (BSA-Konjugat) sowohl mit Ceftiofur als auch mit Ampicillin hergestellt werden. Zusätzlich wurde ein Ampicillin-

Glucoseoxidase-Konjugat (GOD-Konjugat) als Vergleich hergestellt. Alle Konjugate wiesen nach der Herstellung noch eine Bindungsfähigkeit zu den entsprechenden eingesetzten Antikörpern aus, sodass eine grundlegende Veränderung des für den Antikörper wichtigen chemischen Strukturelements wie z.B. der intakte  $\beta$ -Lactamring auszuschließen war. Dies galt für beide Konjugatbestandteile. Bindungsversuche mittels ELISA zeigten, dass das gewonnene Ampicillin-BSA-Konjugat eine deutlich bessere Bindung an den verwendeten monoklonalen Ampicillin-Antikörper zeigte als das Ampicillin-GOD-Konjugat bei deutlich geringerer Einsatzkonzentration.

Weiterhin gelang es, das Ampicillin-BSA-Konjugat mittels Maldi-TOF-MS näher zu charakterisieren. Hierbei konnte ermittelt werden, dass im Konjugat sieben Ampicillinmoleküle an ein BSA-Molekül gekoppelt wurden. Aufgrund der Molekülgröße des Ampicillin-Glucoseoxidase-Konjugates war eine entsprechende Charakterisierung nicht möglich.

Für die Rückstandsanalytik der Tierarzneimittel Ceftiofur und Ampicillin wurden verschiedene Einflussparameter in dieser Arbeit untersucht. Dazu gehört der Einfluss der Ionenstärke und des pH-Wertes des Immobilisierungspuffers ebenso wie die Fließgeschwindigkeit während der Immobilisierung. Als am geeignetsten konnte dabei für beide Analytmoleküle bzw. deren Konjugate und den genutzten Antikörpern eine Immobilisierung bei einem Fluss von 10  $\mu$ L/min mit einer 5 mM Natriumacetatlösung mit einem pH-Wert von 4 ermittelt werden.

Ebenfalls konnten verschiedene Zusammensetzungen der Aktivierungslösung von EDC/NHS-Lösung auf unterschiedliche Sensorchips getestet werden, wobei eine Zusammensetzung einer EDC/NHS Lösung (0,22 M / 0,05 M), welche der Biacore Empfehlung entspricht, sich als optimal erwiesen hat.

Nach den Untersuchungen verschiedener Regenerationslösungen ergab sich für das vorliegende Testsystem eine erfolgreiche Regeneration mit Natriumhydroxid bzw. Natriumhydroxid mit 10 % Acetonitril, ohne die Chipoberfläche bzw. den immobilisierten Bindungspartner anzugreifen oder zu zerstören. Dabei wurde die Molarität der Natriumhydroxidlösung an die jeweiligen Versuchsbedingungen im Bereich zwischen 5 und 40 mM angepasst.

Da auch die Sensorchipauswahl mit den unterschiedlichen Belegungen eine große Einflussgröße in der Analytik darstellt, wurden in dieser Arbeit ebenfalls verschiedene Sensorchips und das Verhalten der relevanten Matrices (Leber, Niere, Fleisch) auf diesen untersucht. Dabei hatten sich die Sensorchips HC1000 und CMD, welche sich durch geringe unspezifische Proteinbindungen auszeichnen sollen, auch als besonders unanfällig gezeigt. Wie zu erwarten, zeigten die self-assembled monolayer eine größere Anfälligkeit für unspezifische Bindungen der Matrix an der Sensorchipoberfläche. Auf diesen drei

Sensorchips wurden die untersuchten Assayformate (direkter und kompetitiver Assay) untersucht.

Erste Untersuchungsansätze dieser Assays konnten durchgeführt werden, jedoch zeigten sich hierbei die Grenzen der Rückstandsanalytik mittels Reichert-SPR. Dabei ergab sich, dass das Reichert-System in der vorliegenden Zusammenstellung und mit der verfügbaren Software zwar prinzipiell für die Rückstandsanalytik geeignet ist, ohne jedoch die Empfindlichkeit des Biacore Q-Systems zu erreichen, wenn dasselbe kompetitive Assayformat im direkten Vergleich geprüft wurde. Dem Vorteil der Reichert-SPR beim Anschaffungspreis steht weiterhin eine nicht annähernd vergleichbare Bedienerfreundlichkeit, wie sie das Biacore-Gerät aufweist, gegenüber.

## 6. Material und Methoden

### 6.1. Geräte SPR

#### 6.1.1. Pumpen

PHD 22/2000

Harvard Apparatus

84 October Hill Road

US- Holliston, Massachusetts 01746

Internet: [www.harvardapparatus.com](http://www.harvardapparatus.com)

NeMESYS Startermodul

Cetoni GmbH

Am Wiesenring 6

DE- 07554 Korbußen

[www.cetoni.de](http://www.cetoni.de)

SR7500

Reichert, Inc.

3326 Walden Avenue

US- Depew, NY 14043

[www.reichert.com](http://www.reichert.com)

### **6.1.2. Autosampler**

Endurance

Spark Holland BV

Pieter de Keyerstraat 8

NL- 7825 VE Emmen

[www.sparkholland.com](http://www.sparkholland.com)

### **6.1.3. Oberflächenplasmonresonanzgeräte**

SR7000

Reichert, Inc.

3326 Walden Avenue

US- Depew, NY 14043

[www.reichert.com](http://www.reichert.com)

Biacore Q

GE Healthcare

Biacore International AB

Uppsala, Schweden

[www.biocore.com](http://www.biocore.com)

## 6.2. Zubehör

### 6.2.1. Kapillaren

Die Gerätekomponenten Pumpe, Autosampler und Oberflächenplasmonresonanz (Flusszelle) sind jeweils mittels PEEK-Kapillaren unterschiedlicher Innendurchmesser (Tabelle 12) untereinander verbunden. Diese sind in einem Bereich von 0,06 bis 1,02 mm verfügbar. Welche Kapillare eingesetzt wird, hängt dabei ganz von den gegebenen Anforderungen ab.

Tabelle 12: Kapillarfarben und die entsprechenden Innendurchmesser (Reichert SPR)

Kapillarfarbe	Innendurchmesser [mm]	Innendurchmesser [inch]	Verwendung zwischen
beige	1,02	0,04	Pufferreservoir/ Pumpe innerhalb des AS Probenschleife 700 µL
grün	0,75	0,03	Flusszelle/Abfall
orange	0,5	0,02	Probenschleife 90 µL
blau	0,25	0,01	
rot	0,12	0,005	AS/Flusszelle
schwarz	0,08	0,003	
grau	0,06	0,0025	

Diese Anforderungen sollen anhand von zwei Beispielen im Folgenden erläutert werden.

Beispiel 1: Der Zufluss des Puffers aus dem Pufferreservoir in die Pumpenspritze sollte möglichst zügig mit einer hohen Füllrate erfolgen. Bei der verwendeten Füllrate von 25000 µL/min (Pumpe SR 7500) wird daher eine beigefarbige Kapillare verwendet. Im Gegensatz hierzu (Beispiel 2) wird zwischen dem Autosampler und der Flusszelle eine rote Kapillare genutzt. Diese bietet zum Einen den Vorteil eines kleinen Innendurchmessers, welcher einen relativ druckfreien Übergang zur Flusszelle bietet. Das heißt, bei Einlass in die Flusszelle kommt es nicht zu einem Druckaufbau, sondern eher zu einer leichten Entspannung der Injektionslösung. Gleichzeitig ist dieser Innendurchmesser jedoch groß genug, damit sich in der Kapillare nicht zu schnell Pufferkristalle absetzen und diese verstopfen.

## 6.2.2. Pumpenspritzen

BD

BD

Franklin Lakes

NJ 07417

Braun

B Braun Melsungen AG

D-34209 Melsungen

Terumo

Terumo Europa N.V.

3030 Leuven, Belgien

Poulten Graf

Poulten Graf GmbH

Am Bildacker 3-7

D-97877 Wertheim

Vici

VICI Precision Sampling

P.O. Box 15886

Baton Rouge

Louisiana 70895-5886, USA

Hamilton

Hamilton Bonaduz AG

Via Crusch 8

CH- 7402 Bonaduz

Kloehn

Kloehn Inc. USA

10000 Banburry Cross Drive

Las Vegas, NV 89144, USA

### 6.3. Chemikalien SPR

Unter der Angabe H<sub>2</sub>O ist jeweils Reinstwasser; Milli Q Plus, Millipore GmbH zu verstehen.

#### 6.3.1. Immobilisierungsreagenzien

Natriumacetat Puffer 20 mM	54,4 g NaCH <sub>2</sub> COO*3 H <sub>2</sub> O
	pH Wert mit Essigsäure eingestellt
	H <sub>2</sub> O            ad 20 mL

Natriumacetat Puffer 10 mM	27,2 g NaCH <sub>2</sub> COO*3 H <sub>2</sub> O
	pH Wert mit Essigsäure eingestellt
	H <sub>2</sub> O            ad 20 mL

Natriumacetat Puffer 5 mM	34,0 g NaCH <sub>2</sub> COO*3 H <sub>2</sub> O
	pH Wert mit Essigsäure eingestellt
	H <sub>2</sub> O            ad 50 mL

EDC und NHS bzw. Sulfo-NHS werden jeweils im Volumenverhältnis 1:1 gemischt. Je nach Mischungsverhältnis werden unterschiedliche Mengen eingewogen.

N-ethyl-N`-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimid	EDC	40 mg
	H <sub>2</sub> O	0,5 mL
	EDC	1,5 mg
	H <sub>2</sub> O	0,5 mL
	EDC	37,5 mg
	H <sub>2</sub> O	0,5 mL

N-(Hydroxy)-succinimid	NHS	10 mg
	H <sub>2</sub> O	0,5 mL

NHS	5,75 g
H <sub>2</sub> O	0,5 mL

N-(Hydroxy)-sulfosuccinimid	Sulfo-NHS	7,6 mg
	H <sub>2</sub> O	0,5 mL

Ethanolamin pH 8,5	Ethanolamin	3,05 g
	pH-Werteinstellung mit HCl	
	H <sub>2</sub> O	ad 50 mL

### 6.3.2. Arbeitsreagenzien SPR-Analyse

PBS Puffer (Laufpuffer, Verdünnungspuffer)	NaCl	3,40 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,74 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,22 g
	Tween 20	250 µL
	H <sub>2</sub> O	ad 500 mL

Reinigungslösungen:

SDS 0,3 %

SDS 0,15 g

H<sub>2</sub>O 50 mL

SDS 0,5 %

Desorb solution 1, Firma Xantec

Glycin 50 mM pH 8,5

Desorb solution 2, Firma Xantec

Ethanol, reinst

Ethanol 20 %

Ethanol 20 mL

H<sub>2</sub>O 80 mL

Regenerationslösungen:

Andersson-Schema

Sauer (A):

Oxalsäure (0,15 mol/L)

Phosphorsäure (0,15 mol/L)

Ameisensäure (0,15 mol/L)

Malonsäure (0,15 mol/L)

Jeweils in H<sub>2</sub>O herstellen, in gleichen Teilen (v/v) mischen und den pH-Wert mit 4 mol/L NaOH einstellen.

Ionisch (I):

Kaliumthiocyanat (0,46 mol/L)

Magnesiumchlorid (1,83 mol/L)

Harnstoff (0,92 mol/L)

Guanidin-HCl (1,83 mol/L)

Lösung in H<sub>2</sub>O.

Unpolar (U):

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Formamid

Ethanol

Acetonitril

n-Butanol

in gleichen Teilen (v/v) mischen.

Detergenz (D):

3-[3-Chloramidopropyl]dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS) (0,3 %; w/v)

3-Dodecyl-dimethylamino-propyl-1-sulfonat (Zwittergent 3-12) (0,3 %; w/v)

Tween 80 (0,3 %; v/v)

Tween 20 (0,3 %; v/v)

Triton X-100 (0,3 %; v/v)

Lösung in H<sub>2</sub>O.

NaOH 80 mM

NaOH 1,6 g

H<sub>2</sub>O 500 mL

NaOH 20 mM + 10 % Acetonitril

NaOH (80 mM) 5 mL

Acetonitril 2 mL

H<sub>2</sub>O 13 mL

Guanidinhydrochlorid 4 M

Guanidin-HCl 3,82 g

H<sub>2</sub>O ad 10 mL

6 M

Guanidin-HCl 5,73 g

H<sub>2</sub>O ad 10 mL

Magnesiumchlorid 4 M

MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 8,1 g

H<sub>2</sub>O ad 10 mL

## ***6.4. Herstellung der Immunoreagenzien***

### **6.4.1. Verbrauchsmaterialien und Geräte**

Dialyseschläuche und Centripreps:

Medicell Int. LTD

KMF MWCO 12-14 kDa, Size 1-8/32''

Spectra/Por<sup>®</sup>CE

Cellulose Ester, Flout a Lyzer<sup>™</sup>, MWCO 10 kDa, Vol. 10 ml,

Diam. 10 mm, Quanti. 1/pKg

Centiprep YM-10, Micon Bioseparations

MWCO 10 kDa, regenerated Cellulose

digitales pH-Meter 640 (Knick, Berlin)

Anlage zur Reinstwasserherstellung (Milli-Q plus, Millipore GmbH)

Zentrifuge Multifuge 4 KR (Hereaus)

Tischrührer (IKA Labortechnik)

variable Kolbenhubpipette 100-1000 µL (Eppendorf)

Glasvial 10 ml

diverse Glasgeräte und Pipetten

### **6.4.2. Chemikalien**

Ampicillin, Natriumsalz (Fluka)

Glucoseoxidase aus *A. niger* (Fluka)

Natriumperiodat (Sigma)

Natriumborhydrid (Sigma)

Ceftiofur Vetranal (Riedel de Haen)

N((3)-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (EDC) (Fluka)

Rinderserumalbumin, BSA (Sigma)

**Tabelle 13: Puffer und Reagenzlösungen für die Konjugatsynthesen**

<b>Lösung</b>	<b>Menge</b>
PBS-Puffer 0,01 mol/l pH 7,0-7,3	
NaCl	6,79 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,47 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,43 g
Wasser bidest.	ad. 1000 ml
PBS-Puffer 0,01 mol/l pH 6,5	
NaCl	6,79 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,47 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,43 g
Wasser bidest.	ad. 1000 ml
pH-Wert Einstellung mit Phosphorsäure 1 mol/l auf pH 6,5	
Natriumacetatpuffer 0,1 mol/l, pH 4,4	
Natriumacetat·3H <sub>2</sub> O	27,23 g
Wasser bidest.	ad. 2000 ml
pH Wert Einstellung mit 1 mol/l Essigsäure auf pH 4,4	
Natriumperiodat 0,1 M	
NaIO <sub>4</sub>	42,8 mg
lösen in 2 mL Wasser bidest.	

Natriumborhydrid-Lösung NaBH <sub>4</sub> lösen in 1 mL Wasser bidest.	4 mg
Carbodiimid-Lösung EDC lösen in 0,5 mL Wasser bidest.	8,9 mg

### **6.4.3. Arbeitsvorschriften der Konjugatsynthesen**

Die jeweiligen eingesetzten Mengen an Protein, Hapten und sonstigen Reagenzien sind der Tabelle 14 zu entnehmen.

#### **6.4.3.1. Natriumperiodat-Kopplung**

Glucoseoxidase (GOD) wurde in bidestilliertem Wasser gelöst, mit der Natriumperiodatlösung versetzt und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt. Der Reaktionsansatz wurde danach über Nacht gegen 0,1 mol/l Natriumacetatpuffer bei 6 °C dialysiert.

Die dialysierte Enzymlösung wurde mit der wässrigen Lösung des Haptens (Ampicillin) vereinigt, der pH-Wert gemessen und durch vorsichtige Zugabe von 1 M NaOH auf pH 7 eingestellt. Die Lösung wurde unter pH-Wert-Kontrolle (pH 7, pH-Elektrode) vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde zur Reduktion der nicht umgesetzten Aldehydgruppen Natriumborhydridlösung zugegeben und im Dunkeln bei 6 °C für eine Stunde inkubiert. Daraufhin wurde die Lösung einmal gegen PBS-Puffer über Nacht bei 6 °C dialysiert. In einem nächsten Schritt erfolgte eine weitere Dialyse mit gleichzeitiger Aufkonzentrierung in einem Centriprep für 0,7 (29.09.2008) bzw. 1,5 Stunden (02.06.2008) bei 4 °C und 2000 U/min. Zur effektiveren Aufkonzentrierung wurde die Dialyse vom 02.06.2008 nach einer Stunde unterbrochen und die abzentrifugierte Lösung (Außenhülle) verworfen. Die erhaltenen Konjugatlösungen wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

#### **6.4.3.2. Carbodiimid-Kopplung**

Ceftiofur und Rinderserumalbumin (BSA) wurden jeweils gelöst, die Lösungen vermischt und gleich im Anschluss zügig, aber tropfenweise, mit 0,5 mL Carbodiimid-Lösung versetzt. Diese Lösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt und danach 48 Stunden gegen PBS-Puffer dialysiert. Die Konjugatlösungen wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Bei der Herstellung des Ampicillin-BSA Konjugates wurde analog gearbeitet, jedoch wurde nur 24 Stunden gegen PBS-Puffer dialysiert. Im Anschluss erfolgte eine Aufkonzentrierung und Dialyse im Centriprep für 30 Minuten bei 4 °C und 2000 U/min. Die Konjugatlösungen wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 14: Kopplungsübersicht**

Substanz	Menge [mg]	Lösungsmittel	mL	Bezeichnung	Menge [mg]	Lösungsmittel und Zusätze	mL
Ampicillin	2,2	bidest. H <sub>2</sub> O	2	GOD	20	bidest. H <sub>2</sub> O	4
						NaIO <sub>4</sub>	1,2
						1 M NaOH bis pH 7	
						0,1 M NaBH <sub>4</sub>	0,4
Ceftiofur	30,3	18 mM NaOH	5	BSA	39	bidest. H <sub>2</sub> O	1,5
				EDC	8,91	bidest. H <sub>2</sub> O	0,5
Ampicillin	30,1	18 mM NaOH	5	BSA	39,8	bidest. H <sub>2</sub> O	1,5
				EDC	8,9	bidest. H <sub>2</sub> O	0,5

## **6.5. Charakterisierung der Konjugate**

### **6.5.1. Proteinbestimmung nach Bradford**

#### **6.5.1.1. Reagenzien, Materialien, Geräte**

Roti<sup>®</sup>-Nanoquant K880 (Roth K880.1)

Rinderserumalbumin (Sigma)

Anlage zur Reinstwasserherstellung (Milli-Q plus, Millipore GmbH)

Rotilabo<sup>®</sup>-Mikrotest-Platten aus Polystyrol (F-Profil, Roth, 9293.1)

Mikrotiterplatten Reader Model 680 (Bio-Rad Laboratories GmbH)

variable Kolbenhubpipetten 10-100  $\mu$ L; 100-1000  $\mu$ L (Eppendorf)

variable Kolbenhubpipette 1-5 mL (Finnpipette)

#### **6.5.1.2. Arbeitsvorschrift: Proteinbestimmung**

Gearbeitet wurde nach der Gebrauchsanweisung der Roti<sup>®</sup>-Nanoquant Proteinbestimmung.

Arbeitslösung:

4 mL Roti<sup>®</sup>-Nanoquant (5xKonzentrat) wurden mit 16 mL Wasser (bidest.) gemischt.

BSA-Konzentration für die Kalibrierreihe:

Es wurde eine Stammlösung mit 40 mg/ 10 mL hergestellt und anschließend eine Verdünnung von 1:10 vorgenommen. Diese Lösung entspricht somit einem Gehalt von 400  $\mu$ g/mL. Die weiteren Verdünnungsschritte für die Kalibrierreihe erfolgen analog der Roti<sup>®</sup>-Nanoquant Gebrauchsanweisung.

Die Proben bzw. die Kalibrierstandards wurden entsprechend dem Pipettierschema in die Kavitäten pipettiert, mit der Arbeitslösung versetzt und nach einer Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur bei OD<sub>450</sub> und OD<sub>595</sub> vermessen. Aus der Auftragung des Quotienten OD<sub>595</sub>/OD<sub>450</sub> wurde die Kalibrierreihe erstellt und der Proteingehalt der Konjugatlösung bestimmt.

## **6.5.2. Prüfung der Antikörperbindungsfähigkeit**

### **6.5.2.1. Geräte**

Mikrotiterplatten Reader Model 680 (Bio-Rad Laboratories GmbH)

Anlage zur Reinstwasserherstellung (Milli-Q plus, Millipore GmbH)

Flachbettschüttler SM 25 (Edmund Bühler Labortechnik)

Mikrotiterplatte Polysorb (Nunc)

variable Kolbenhubpipetten 10-100  $\mu$ L; 100-1000  $\mu$ L (Eppendorf)

### **6.5.2.2. Reagenzien**

#### **ANTIKÖRPER**

Ampicillin-Antikörper	mouse monoklonal, Abcam (ab9251)
Ampicillin-Antikörper	sheep polyklonal, Randox (PAS9567)
Glucoseoxidase-Antikörper	goat polyklonal, Abcam (ab34547)
sek. AK mouse IgG	rabbit polyklonal, HRP markiert, Abcam (ab6728)

**Tabelle 15: Zusammenfassung Reagenzien ELISA**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
Beschichtungspuffer (Bicarbonatpuffer pH 9,5)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,16 g
	NaHCO <sub>3</sub>	0,29 g
	bidest. H <sub>2</sub> O	ad 100 mL
PBS-Puffer (0,01 mol/L, pH 7,2)	NaCl	3,40 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,68 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,22 g
	bidest. H <sub>2</sub> O	ad 500 mL
Blockpuffer (2 % Casein in PBS)	Casein	2 g
	bidest. H <sub>2</sub> O	100 mL
Verdünnungspuffer (1 % Casein in PBS)	Casein	1 g
	bidest. H <sub>2</sub> O	100 mL
Citratpuffer (0,21 mol/L, pH 3,9-4,0 mit 3,15 mol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Citronensäure-Monohydrat	2,03 g
	KOH 1 mol/L	10 mL
	bidest. H <sub>2</sub> O	40 mL
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %*	16,25 µL*
3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidinlösung	Tetramethylbenzidin	50,4 g
	Aceton	1 mL
	Methanol	9 mL
Substratlösung*	Citratpuffer 0,21 mol/L	20 mL
	Tetramethylbenzidinlösung	1 mL
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	6,5 µL
Stoppreagenz	HCl 1 mol/L	

\* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe erfolgt erst bei Mischung der Substratlösung

### 6.5.2.3. Durchführung

Der ELISA wurde in Anlehnung an Lamar [59] durchgeführt. Zur Kontrolle der Analytik wurden in der Außenreihe jeweils halbseitig der primäre bzw. der sekundäre Antikörper nicht pipettiert und durch Puffer ersetzt. Die gemessenen Extinktionswerte der Außenreihen wurden als Reagenzienblindwert in der Analyse durch Abzug berücksichtigt.

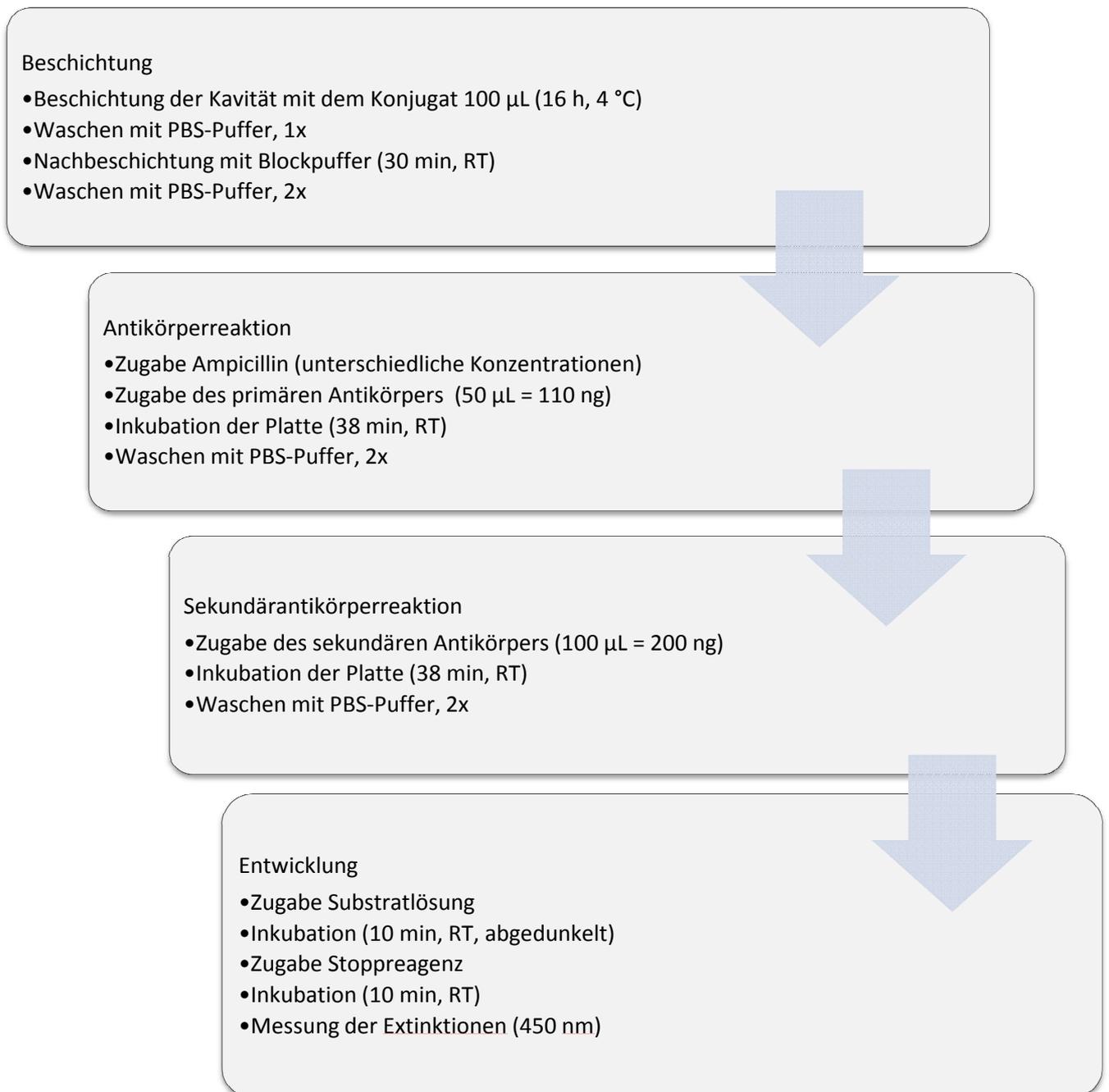


Abbildung 57: Fließschema ELISA Durchführung

### **6.5.3. Charakterisierung des Konjugates aus Ampicillin und BSA**

Für eine Charakterisierung der hergestellten Konjugate bezüglich der Hapten-Dichte am BSA- bzw. GOD-Molekül werden diese Konjugate in Anlehnung an die Literatur [60, 61] mittels MALDI-(TOF) MS untersucht.

#### **6.5.3.1. Reagenzien, Geräte**

Rinderserumalbumin (Sigma)

Trifluoressigsäure (TFA) (Merck)

Acetonitril (CAN) (Roth)

Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydrozimtsäure) (Fluka)

#### **MALDI-(TOF)MS-SYSTEM**

Shimadzu Axima Performance™

Ionenquelle: MALDI, gepulst (Positivmodus)

Laser: 337 nm Stickstofflaser, fixierter Fokus, Pulsbreite 3 ns

Analysator: TOF, Driftstrecke: 1,2 m (linear); 2,0 m (Reflektron)

Probenteller: 2 mm Target, 384 Wells

Analysenbetrachtung: CCD Kamera, monochromatisch (25fache Vergrößerung)

SOFTWARE Shimadzu Biotech Launchpad™ v.2.8.3

#### **6.5.3.2. Probenvorbereitung**

Es wurden Lösungen von Ampicillin-BSA-Konjugat, BSA und GOD mit einer Konzentration von jeweils 10 µmol/L in 0,1 % Trifluoressigsäure hergestellt. Die Einwaagen und Verdünnungen sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

**Tabelle 16: Herstellung der Lösungen für die MALDI-(TOF)MS Messungen**

Lösung	Molare Masse	Einwaage Stammlösg. [pro 10 mL]	Verdünnung	Konzentration [ $\mu\text{mol/L}$ ]
BSA	66 kDa	66 mg	100 $\mu\text{L}$ Stammlg./1000 $\mu\text{L}$	10
GOD	160 kDa	18,6 mg	---	11,63
Am-BSA	gerechnet mit 69,5 kDa*	---	Verd.1: 30 $\mu\text{L}$ Stammlg.**/300 $\mu\text{L}$  Verd.2: 250 $\mu\text{L}$ V1/875 $\mu\text{L}$	10

\* Wert wurde als Näherung genutzt bei Kopplungsverhältnis 1 BSA : 10 Am

\*\* Stammlösung Am-BSA-Konjugat c = 24300 mg/L

Alle weiteren Vorbereitungs- und Messschritte wurden von Herrn Volker Wulf (Arbeitskreis Prof. Gäb, Analytische Chemie Universität Wuppertal) vorgenommen.

Probenvorbereitung/Chemikalien:

Matrix: Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydrozimtsäure)

Lösungsmittel: 0,1 % TFA/ACN (1:1)

Matrixlösung: 15 mg/mL Sinapinsäure in 0,1 % TFA/ACN (1:1)

Probelösung: 10  $\mu\text{mol/L}$  in 0,1 % TFA

46  $\mu\text{L}$  Matrixlösung wurden mit 4  $\mu\text{L}$  Probelösung gemischt und 0,5  $\mu\text{L}$  dieser Mischung wurden auf das Target aufgegeben.

## ***6.6. Aufarbeitung von Lebensmitteln***

### **6.6.1. Chemikalien und Geräte**

#### Geräte

Messer

Knoblauchpresse

Moulinette

Anlage zur Reinstwasserherstellung (Milli-Q plus, Millipore GmbH)

Analysenwaage Modell 1712MP8 (Satorius)

Vakuumpumpe Typ EKF 56CX-4 (Greifenberger Antriebstechnik GmbH)

Wasserbad Julabo SW1, Temperiereinheit Julabo VC (Julabo Labortechnik)

Schüttler Vortex-Genie (Bender & Hobein AG)

Zentrifuge Henle Z 200A mit Rotor 220.96 V01 (Henle Labortechnik GmbH)

Zentrifuge Millifuge<sup>TM</sup> Centrifuge (Millipore GmbH)

Ultraschallbad Bandelin electronic senorex RK 31

Kunststoffspritzen 10 mL (Braun)

Membranfilter PVDF 0,2 µm (Carl Roth)

Greinertube 15 mL (Sarstedt)

### 6.6.2. Aufarbeitung

Die Schweinematrices wurden frisch ohne Einfrieren zerkleinert. Dazu wurde sowohl die Niere als auch das Muskelfleisch in grobe Stücke geschnitten und mittels Moulinette zerkleinert. Die Leber wurde grob mit dem Messer zerkleinert und mittels Knoblauchpresse der Leberpresssaft gewonnen.

Zur Lagerung wurden die Matrixproben eingefroren, vor jeder Aufarbeitung frisch aufgetaut und Tausaft durch gründliches Durchmischen vor der Einwaage eingerührt. Die weitere Aufarbeitung ist in Abbildung 58 dargestellt. Das gewonnene Filtrat wurde direkt zur Messung eingesetzt.



Abbildung 58: Fließschema Matrixaufarbeitung

Es wurden Verdünnungen von

1/4 = 1 g Matrix mit Puffer auf 4 g aufgefüllt

1/20 = 0,4 g Matrix mit Puffer auf 8 g aufgefüllt

1/50 = 0,16 g Matrix mit Puffer auf 8 g aufgefüllt

1/250 = 35 mg Matrix mit Puffer auf 8,75 g aufgefüllt

angesetzt und wie oben beschrieben aufgearbeitet.

## 6.7. Rückstandsanalytik

### 6.7.1. Standardimmobilisierungsprotokolle

Die durchgeführten Waschschritte während der Immobilisierung bzw. in den durchgeführten Analysen erfolgten mit PBS-Puffer.

Reichert:

**Tabelle 17: Standardimmobilisierungsprotokoll Reichert**

Programm-schrittnummer	Programmschritt	Injektions-lösung	Fluss [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	min. benötigtes Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
1	Systemreinigung (wash)			
2	Wartezeit 3 min		10	
3	Systemreinigung (wash)			
4	Wartezeit 3 min		10	
5	Injektion 8 min	EDC/NHS	10	185
6	Wartezeit 1 min		10	
7	Systemreinigung (wash)			
8	Wartezeit 1 min		10	
9	Injektion 32,5 min	AMGOD	10	405
10	Wartezeit 2 min		10	
11	Systemreinigung (wash)			
12	Wartezeit 1 min		10	
13	Injektion 8 min	Ethanolamin	10	185
14	Wartezeit 2 min		10	
15	Systemreinigung (wash)			
16	Wartezeit 2 min		10	

Vor und nach der Immobilisierung erfolgen jeweils zwei Pufferinjektionen. Die Systemreinigung umfasst ausschließlich die Reinigung des Autosampler-Systems (Spritze, Rheodyne, Kapillaren). Bei der Immobilisierung wird aufgrund des höheren benötigten Volumens mit Vials gearbeitet.

Biacore:

**Tabelle 18: Standardimmobilisierungsprotokoll Biacore**

<b>Programm-schritt-nummer</b>	<b>Programmschritt</b>	<b>Injektions-lösung</b>	<b>Fluss [µL/min]</b>	<b>benötigtes Volumen [µL]</b>
1	Systemreinigung (wash)			
2	Mix und Injektion 8 min	EDC/NHS	10	77 / 70
3	Systemreinigung (wash)			
4	Injektion 32,5 min	AMGOD	10	365
5	Systemreinigung (wash)			
6	Injektion 8 min	Ethanolamin	10	120
7	Systemreinigung (wash)			

Vor und nach der Immobilisierung erfolgen jeweils drei Pufferinjektionen. Die Systemreinigung umfasst ausschließlich die Reinigung des Autosampler-Systems (Spritze, Rheodyne, Kapillaren).

### 6.7.2. Verdünnungen Ampicillin-Antikörper

Der monoklonale Antikörper wurde in einer Konzentration von 2,2 mg/mL geliefert. Um die Konstanz zu gewährleisten wurden jeweils dreimal 1 mg (entsprechen 454 µL) erworben.

**Tabelle 19: Verdünnungsübersicht Ampicillin-Antikörper monoklonal**

Lösungsnummer	entnommenes Volumen [µL]	entnommen aus Lösungsnr.	Auffüllvolumen [µL]	Konzentration [µg/mL]	halbe Konz. in Mischung 1:1 [µg/mL]
L1	50	Stammlsg.	500	220	---
L2	25	Stammlsg.	500	110	55
L3	12,5	Stammlsg.	500	55	---

Der polyklonale Antikörper wurde mit einer Konzentration von 8220 µg/mL geliefert (2 mL).

**Tabelle 20: Verdünnungsübersicht Ampicillin-Antikörper polyklonal**

Lösungsnummer	entnommenes Volumen [µL]	entnommen aus Lösungsnr.	Auffüllvolumen [µL]	Konzentration [µg/mL]	halbe Konz. in Mischung 1:1 [µg/mL]
L1	10	Stammlsg.	100	822	---
L2	90	Stammlsg.	6570	15	7,5
L3	1000	Stammlsg.	2000	7,5	---

#### 6.7.4. Verdünnungen Ampicillin

**Tabelle 21: Verdünnungsschema Ampicillin**

Es wurde mit einer Stammlösung von 10 mg in 5 mL PBS-Puffer gearbeitet. Alle Verdünnungen wurden mit PBS-Puffer hergestellt.

Lösungsnummer	entnommenes Volumen [µL]	entnommen aus Lösungsnr.	Auffüllvolumen [µL]	Konzentration [µg/kg]	halbe Konz. in Mischung 1:1 [µg/kg]
L1	100	Stammlsg.	1000	200000	100000
L2	500	L1	1000	100000	50000
L3	500	L2	1000	50000	25000
L4	500	L3	1000	25000	12500
L5	100	L2	1000	10000	5000
L6	100	L3	1000	5000	2500
L7	100	L5	1000	1000	500
L8	100	L6	1000	500	250
L9	200	L7	1000	200	100
L10	100	L7	1000	100	50
L11	100	L8	1000	50	25
L12	100	L9	1000	20	10
L13	100	L10	1000	10	---

## 6.7.6. Herstellung eines Self-assembled Monolayer

### *Chemikalien*

Ethanol, absolut (Fluka)

Schwefelsäure, 98% (Carl Roth)

Wasserstoffperoxid, 30% (Sigma-Aldrich)

16-Mercaptohexadecansäure, 99% (Sigma-Aldrich)

### *Geräte*

Schüttler (Typ SM25, Edmund Bühler GmbH, Hechingen)

Wägegläschen

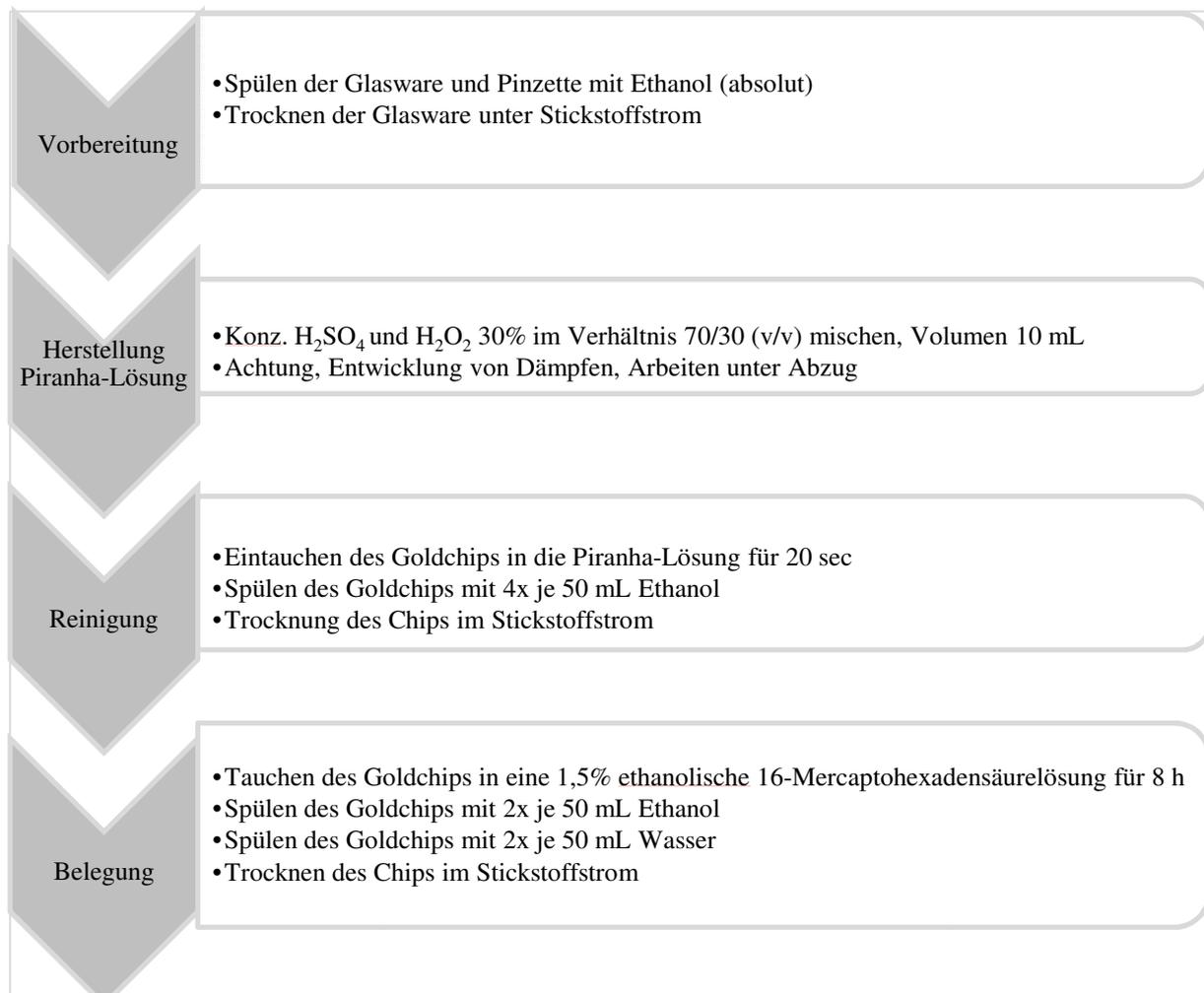
Pinzette

Laborglasware

### *Durchführung*

Die Herstellung eines Self-assembled monolayer umfasst die Reinigung der Goldschicht vor der Behandlung, um jegliche Verschmutzung durch Staub, Fett oder sonstige Chemikalienreste zu entfernen [36, 62]. In einem zweiten Schritt wird die planare Carboxyoberfläche durch Bindung einer Thiol-Carbonsäure über die Thiol-Gruppe an die Goldschicht gebildet und ist im folgenden Fließschema dargestellt [36, 62, 63].

Die Belegung erfolgt dabei im Wägegläschen auf dem Schüttler, damit wird eine gleichmäßige Benetzung der Chipoberfläche und Absättigung des Dampfraums oberhalb der Chipoberfläche mit Ethanol gewährleistet.



**Abbildung 59: Fließschema zur Herstellung eines self-assembled monolayers (SAM)**

Durch die Kettenlänge der Carbonsäure kann dabei die Belegungshöhe des Sensorchips variiert werden (Abbildung 32).

Es hat sich gezeigt, dass eine Unterscheidung der beiden Sensorchipseiten schwierig ist. Durch Messen des elektrischen Widerstands auf beiden Seiten des Goldchips lässt sich die belegte Seite identifizieren.

Hierbei konnte nur auf der Goldseite ein Widerstand gemessen werden (circa  $5 \Omega$ ), welche nach der Belegung anstieg (circa  $60-70 \Omega$ ). Bei Glasschicht (Unterseite) ist die Leitfähigkeit nicht vorhanden und der Widerstand so hoch, dass vom Messgerät ein Fehler angezeigt wird.

Die Herstellung eines self-assembled monolayers auf dem Biacore-Goldchip erfolgte analog Abbildung 59, wobei Schritt 2 und 3 (Herstellen einer Piranha-Lösung und Reinigung des Chips) aufgrund der Chiphalterung nicht durchgeführt wurden.

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: SPR-Gerät SR7000 Firma Reichert (Depew, NY USA), mit Autosampler und Pumpe [2] .....	5
Abbildung 2: Anordnung des Messsystems in der Reichert SPR .....	6
Abbildung 3: Verschiebung des SPR-Winkels vor und nach einer Immobilisierung eines Ampicillin-Glucoseoxidase-Konjugates; Reflexionsgrad wird durch den Photodioden-Array-Detektor (Multiplier) detektiert .....	7
Abbildung 4: SPR-Winkel bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten des Puffers.....	8
Abbildung 5: Struktur des Mureins und schematische Darstellung der quervernetzten Holmen der Zellwand.....	10
Abbildung 6: Wirkmechanismus von $\beta$ -Lactamen bei der Zellwandsynthese (a) und Resistenzmechanismus durch Spaltung der $\beta$ -Lactame (b) (in Anlehnung an [12]).....	11
Abbildung 7: Struktur der 6-Aminopenicillansäure und Struktur des Ampicillin .....	12
Abbildung 8: Struktur 7-Aminocephalosporansäure.....	13
Abbildung 9: Struktur Ceftiofur .....	14
Abbildung 10: Struktur Desfuroylceftiofur .....	14
Abbildung 11: schematische Darstellung des SPR-System-Aufbaus (die Farben der Kapillardarstellungen entsprechen den Kapillargrößen, siehe 6.2.1.).....	19
Abbildung 12: Schema eines Zyklus bestehend aus Analytinjektion (AmGOD Konjugat 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) und Regeneration (5 mM NaOH) mit Laufpufferphasen, Laufpufferphase zwischen Analytinjektion und Regeneration entspricht der Dissoziationsphase mit Messpunkt für $\Delta\mu\text{RIU}$ (Brechungsindexänderung durch Bindung des Analyten).....	21
Abbildung 13: Screenshot der SPR Auswerte- und Scrubber-Software .....	22
Abbildung 14: Screenshot der entstehenden Exceldatei .....	23
Abbildung 15: Messeinheit der SPR, Thermoblock mit Saphirprisma inklusive Flusszellenhalterung.....	24
Abbildung 16: Flusszellenhalterung mit Flusszelle, kleine und große Variante mit den entsprechenden Gasket-Ringen .....	25

Abbildung 17: schematische Darstellung des Prismas und den verschiedenen SPR-Chip Einbauvarianten eines SPR-Chips 9x9 mm (orange); dargestellt: Prismafläche in blau, Flusszelle in beige .....	26
Abbildung 18: Sensorchip-Vergleich bezüglich der Größe und der Dicke .....	26
Abbildung 19: Dichtungsgummis der Flusszellenhalterung zum Saphirprisma bzw. Thermoblock .....	27
Abbildung 20: schematische Darstellung der SPR Anzeige des SPR Winkels ( $32^\circ$ ) zur Überprüfung des richtigen Chi einbaus A = Mismatch-Minimum, B = SPR-Minimum, x-Achse: Resonanz Winkel; y-Achse: Reflexionsgrad; I: richtig eingebauter Chip; II: falsch eingebauter Chip .....	28
Abbildung 21: Injektionen von Ethylenglykol in Puffer; Chip: Xantec, SC C150D; Belegung: Ceftiofur-Antikörper; Probenschleifenvolumen 90 $\mu\text{L}$ (def. 260 $\mu\text{L}$ ); Fluss 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ , Pumpe Harvard Apparatus .....	30
Abbildung 22: a) Mischungseffekt im vorderen Probenschleifenbereich b) Mischungseffekt im hinteren Probenschleifenbereich; grün entspricht der zu injizierenden Lösung, rot dem Laufpuffer.....	31
Abbildung 23: Ethylenglykolinjektionen, Injektionsdauer 2,5 min; Fluss 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ ; Probenschleifenvolumen 90 $\mu\text{L}$ (def. 260 $\mu\text{L}$ ); A: 130 $\mu\text{L}$ partial loop, B: 120 $\mu\text{L}$ partial loop, C: 110 $\mu\text{L}$ partial loop, D: 100 $\mu\text{L}$ partial loop, E: 90 $\mu\text{L}$ partial loop, F: 260 $\mu\text{L}$ full loop (entspricht einem aufgezogenen Volumen von 520 $\mu\text{L}$ ); zwischen den Ethylenglykolinjektionen erfolgten jeweils Pufferinjektionen .....	32
Abbildung 24: Ethylenglykolinjektionen, Fluss 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ , Probenschleifenvolumen 90 $\mu\text{L}$ (def. 260 $\mu\text{L}$ ); Injektionsart: 130 $\mu\text{L}$ partial loop 2,5 min.....	33
Abbildung 25: Pufferinjektion aus Glasvials CS Chromatographie .....	35
Abbildung 26: exemplarische Pumpenspritze mit klar definiertem Kolbenstempel und ausgeprägten Schmetterlingsflügeln .....	38
Abbildung 27: Pumpe Harvard App. PHD 22/2000; Injektionen 1% Ethylenglykol in Puffer; 90 $\mu\text{L}$ Probenschleife (def. 260 $\mu\text{L}$ ); 8 min Injektionsdauer; Anzahl Injektionen 6; Fluss 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ .....	39
Abbildung 28: neMESYS Pumpe; Cetoni, Deutschland.....	40
Abbildung 29: neMESYS Pumpe Firma Cetoni; Injektionen 1% Ethylenglykol in Puffer; 90 $\mu\text{L}$ Probenschleife (def. 260 $\mu\text{L}$ ); 8 min Injektionsdauer; Anzahl Injektionen 10; Fluss 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ .....	41

Abbildung 30: NaCl 140 mM in PBS Puffer, Fluss 10 $\mu$ L/min; 05.05.08 und 20.05.08; 90 $\mu$ l Probenschleife (def. 260 $\mu$ L).....	45
Abbildung 31: Schematische Darstellung der Oberflächenbeschaffenheit eines SAM, zur Verfügung gestellt durch Gedig [43] .....	54
Abbildung 32: Schema eines selbsthergestellten SAM (beige = Glaschip, gelb = Goldschicht), die Bindung der Carboxylketten erfolgt über den Schwefel des Alkanthiols (Haftvermittler als Elektronenpaardonator, Gold Elektronenpaarakzeptor).....	55
Abbildung 33: Schema self-assembled monolayer standard grade Reichert, (beige = Glaschip, gelb = Goldschicht), die Bindung erfolgt über den Schwefel des Alkanthiols (Haftvermittler als Elektronenpaardonator, Gold Elektronenpaarakzeptor).....	55
Abbildung 34: Vorkonzentrierungsversuch mit Cf-AK auf unbelegtem C80m Chip; pH-Werte 4,0 und 5,0; Fluss 10 $\mu$ L/min; Regeneration <sup>1</sup> .....	58
Abbildung 35: Vorkonzentrationsversuch mit BSA 99 $\mu$ g/mL in 5 mM Na-Acetatpuffer auf HC1000m (Xantec, unbelegt) mit den pH-Werten 4,0; 5,0 und 5,5; Regeneration 20 mM NaOH-Lösung .....	60
Abbildung 36: Preconcentrationstest mAmAK 55 $\mu$ g/mL verschiedene pH-Werte (5 mM Na-Acetatpuffer) und PBS-Laufpuffer (129,6 mM); Fluss 5 $\mu$ L/min; HC1000m (Xantec, unbelegt); Regeneration 20 mM NaOH-Lösung .....	61
Abbildung 37: Preconcentrationstest mit Ampicillin Antikörper bei verschiedenen Flüssen (mAmAK 55 $\mu$ g/mL in Na-Acetatpuffer 5 mM, pH 4) HC1000m (Xantec, unbelegt); Regeneration 20 mM NaOH-Lösung .....	63
Abbildung 38: Strukturformeln NHS, EDC und Sulfo-NHS.....	64
Abbildung 39: Auftragung relative Extinktion gegen Ampicillin Konzentration, rel. Extinktion berechnet (Ext.-Nullwert – Ext.-Blindwert)/(Ext.-Ergebniswert – Ext.-Blindwert)*100.....	69
Abbildung 40: MALDI-(TOF) Massenspektrum, Vergleich BSA und BSA-Ampicillin-Konjugat .....	70
Abbildung 41: Bindung der Cf-Kalibrierung (6-60 mg/kg = umgerechnet aus Konzentration der injizierten Lösung); Cf-AK imm. auf SR 7000 (Reichert); Fluss 20 $\mu$ L/min, Injektionsdauer 3,5 min; n=6 .....	71
Abbildung 42: SC HC1000m (Xantec) nach Nutzung und Ausbau.....	73
Abbildung 43: Kalibrierung AmGOD auf einem CMD200m Sensorchip: Imm. Am-AK <sub>m</sub> ; Fluss 5 $\mu$ L/min, Injektionsdauer 10 min, Messpunkt 5 min nach Injektionsende.....	74

Abbildung 44: Sensorgramm Immobilisierung AmGOD-Konjugat auf SAM, 32,5 min bei Fluss 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ , zwischen den Injektionen fließt Laufpuffer durch das System.....	75
Abbildung 45: Sensorgramm Injektion AmAK polyklonal; Imm. Am-GOD 1 auf SAM; Fluss 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ , Regeneration 20 mM NaOH; .....	76
Abbildung 46: Sensorgramm kompetitiver Test pAmAK mit Am; Imm. Am-GOD 1 auf SAM; Inkubationszeit 30 min, flow 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ , Regeneration 20 mM NaOH .....	78
Abbildung 47: Darstellung Abhängigkeit des Bindungsgrads von der Inkubationszeit, 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pAmAK; Imm. Am-GOD 1 Konjugat auf SAM; Regeneration 20 mM NaOH, Fluss 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ .....	79
Abbildung 48: Sensorgramm kompetitiver Test mAmAK mit Am; Imm. Am-GOD 1 Konjugat auf SAM; Fluss 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ , Regeneration 5 mM NaOH .....	80
Abbildung 49: Sensorgramm Biacore, Darstellung aller Zyklen übereinander mit gemeinsamem Messpunkt 1, CM5, Fluss 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ , fc 2, Kalibrierung Am 500 - 6000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; Messpunkt 1: Basislinie vor Injektion; Messpunkt 2: Basislinie nach Injektion der Analysenlösung ( $\Delta\text{RU}$ zu Messpunkt 1 = Bindung der Analyten an Oberfläche; Messpunkt 3: Basislinie nach Regeneration) .....	82
Abbildung 50: Sensorgramm Biacore, Darstellung aller Zyklen übereinander mit gemeinsamem Messpunkt 1, CM5, Imm. Am-GOD 1 Konjugat, fc 3, Fluss 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ , mAmAK 55-220 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Regeneration 40 mM NaOH; Messpunkt 1: Basislinie vor Injektion; Messpunkt 2: Basislinie nach Injektion der Analysenlösung ( $\Delta\text{RU}$ zu Messpunkt 1 = Bindung der Analyten an Oberfläche; Messpunkt 3: Basislinie nach Regeneration) .....	83
Abbildung 51: Bindungshemmung mAmAK in Abhängigkeit der Am-Konzentration (0 - 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), CM5, Imm. Am-GOD 1 Konjugat, fc 3, Fluss 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ , Regeneration 40 mM NaOH .....	84
Abbildung 52: Matrixwechselwirkung auf einem HC1000M (Xantec, unbelegt, Fluss 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ ); Regeneration 40 mM NaOH; n=2.....	86
Abbildung 53: Vergleich unspezifischer Bindungen von Bestandteilen der Schweineleber an verschiedenen Chipoberflächen; Fluss 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ ; Regeneration 40 mM NaOH; Injektionsdauer 5 min; n=2 .....	88
Abbildung 54: <i>bulk</i> -Effekt der Schweineleber-Injektion auf verschiedenen Sensorchips (Fluss 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ ); Regeneration 40 mM NaOH; Injektionsdauer 5 min;.....	88
Abbildung 55: Injektion Cf (6000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) mit verschiedenen Regenerationslösungen (Anlehnung an [58]); Imm. Cf-AK auf SR7000; Injektionsdauer 3,5 min; Fluss 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ ; Cf-Bindung 35 - 25 $\mu\text{RIU}$ .....	90

Abbildung 56: Injektion Cf (MRL) mit den Teillösungen aus Regeneration I; Imm. Cf-AK auf SR7000; Injektionsdauer 3,5 min; Fluss 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ ; Cf-Bindung 35 -25 $\mu\text{RIU}$ .....	92
Abbildung 57: Fließschema ELISA Durchführung .....	119
Abbildung 58: Fließschema Matrixaufarbeitung .....	123
Abbildung 59: Fließschema zur Herstellung eines self-assembled monolayers (SAM).....	130

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: MRL Werte für Ampicillin [15].....	13
Tabelle 2: MRL Werte für Cefotiofur als Summe aller den Betalactamring enthaltenden und als Desfuroylcefotiofur gemessenen Rückstände [15] .....	15
Tabelle 3: Übersicht über in der Arbeit genutzte Antikörper und Konjugate .....	17
Tabelle 4: maximale Injektionsvolumina in Abhängigkeit von der Injektionsart.....	29
Tabelle 5: Flussrichtungstest nach <i>auto refill</i> SR7500 Nr. 1 .....	43
Tabelle 6: Übersicht der getesteten Kunststoffspritzen (Hersteller und Volumina) .....	47
Tabelle 7: Übersicht der getesteten Glasspritzen (Hersteller und Volumina).....	49
Tabelle 8: Übersicht getesteter Sensorchips.....	51
Tabelle 9: beispielhafter Einfluss der EDC/NHS Lösung auf den Immobilisierungslevel; Cf-AK-Lösung 1:20 Verdünnung; (Sensorchips von Xantec) .....	65
Tabelle 10: Konjugat-Konzentration nach Bradford.....	67
Tabelle 11: Zusammenfassung der Vorteile von Sensorchips bezüglich unspezifischer Bindung durch Wechselwirkungen [40] .....	87
Tabelle 12: Kapillarfarben und die entsprechenden Innendurchmesser (Reichert SPR).....	103
Tabelle 13: Puffer und Reagenzlösungen für die Konjugatsynthesen .....	112
Tabelle 14: Kopplungsübersicht.....	115
Tabelle 15: Zusammenfassung Reagenzien ELISA.....	118
Tabelle 16: Herstellung der Lösungen für die MALDI-(TOF)MS Messungen.....	121
Tabelle 17: Standardimmobilisierungsprotokoll Reichert .....	125
Tabelle 18: Standardimmobilisierungsprotokoll Biacore.....	126
Tabelle 19: Verdünnungsübersicht Ampicillin-Antikörper monoklonal .....	127
Tabelle 20: Verdünnungsübersicht Ampicillin-Antikörper polyklonal .....	127
Tabelle 21: Verdünnungsschema Ampicillin.....	128

## 9. Abkürzungsverzeichnis

μRIU	μRefractive-Index-Unit
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AK	Antikörper
Am	Ampicillin
Am-BSA	Ampicillin-Rinderserumalbumin-Konjugat
Am-GOD	Ampicillin-Glucoseoxidase-Konjugat
AS	Autosampler
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
Cf	Ceftiofur
Cf-AK	Ceftiofur-Antikörper
CMD	Carboxymethyldextran
Da	Dalton
EDC	N-ethyl-N`-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
fc	flow cell (Flusszelle)
GC	Gaschromatograph
GOD	Glucoseoxidase
h	Stunde
HBSP	HEPES gepufferte Kochsalzlösung mit Surfactant P 20
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	Horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)

i.D.	innerer Durchmesser
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
L	Länge
LED	Light emitting diode
mAmAK	Ampicillin Antikörper monoklonal
min	Minute
MP	Mikrotiterplatte
MRL	maximum residue limit
MS	Massenspektrometer
MWCO	Molecular Weight Cut Off (Molekulargewicht-Ausschlussgröße)
NHS	N-(Hydroxy)-succinimid
OD <sub>450</sub>	optische Dichte gemessen bei 450 nm
OD <sub>595</sub>	optische Dichte gemessen bei 595 nm
pAmAK	Ampicillin Antikörper polyklonal
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
PC	Personalcomputer
PEEK	Polyetheretherketon
PEG	polyethylene glycol
RIU	Refractive-Index-Unit
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur

RU	Response Units
SAM	self-assembled monolayer
SC	Sensorchip
SDS	Sodium dodecylsulfat
sec	Sekunde
SPR	Surface Plasmon Resonance (Oberflächenplasmonresonanz)
SR	Surface Resonance
Stammlg.	Stammlösung
Stlg.	Standardlösung
Sulfo-NHS	N-(Hydroxy)-sulfosuccinimid
TFA	Trifluoressigsäure
Verd.	Verdünnung

## 10. Literatur

1. Schasfoort, R. and A. Tudos, *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. 2008, Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
2. Reichert, [www.reichertspr.com](http://www.reichertspr.com). August 2008.
3. Fagerstam, L.G., et al., *Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis*. *J Chromatogr*, 1992. **597**(1-2): p. 397-410.
4. Marquart, A., *Surface plasmon resonance and biomolecular interaction analysis theory and practice*. 2008: [www.sprpages.nl](http://www.sprpages.nl).
5. Petz, M. and G. Cacciatore, *Mit Biosensoren Antibiotikarückstände in Lebensmitteln entdecken*. Die aktuelle Wochenschau. Vol. 5. 2009: GDCh.
6. Zachmann, G., *Natur- Wissenschaften und Technik*. Band 1 Die Gesetze der Natur und ihre Anwendung. 1994, Gütersloh: Bertelsmann Lexikothek Verlag GmbH. 321 - 342.
7. Aussenegg, F. and H. Ditlbacher, *Plasmonen als Lichttransporter: Nanooptik*. *Physik in unserer Zeit*, 2006. **37**(5): p. 220-226.
8. Cacciatore, G., Petz, M., Rachid, S., Hakenbeck, R., Bergwerff, A.A, *Development of an optical biosensor assay for detection of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x\**. *Anal Chim Acta*, 2004(520): p. 105-115.
9. Mello, L.D. and L.T. Kubota, *Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries*. *Food Chemistry*, 2002. **77**(2): p. 237-256.
10. Alberts, B., et al., *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. 1999, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH.
11. Eisenbrand, G. and P. Schreier, *Römpp Lexikon Lebensmittelchemie*. Römpp. 1995, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
12. Nelson, D. and M. Cox, *Lehninger Biochemie*. Vol. 3.Auflage. 2001, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
13. Schlegel, H.G., *Allgemeine Mikrobiologie*. Vol. 7. Auflage. 1992, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
14. Auhagen, E., et al., *Ampicillin-Binotal, a broad spectrum penicillin*. *Arzneimittelforschung*, 1962. **12**: p. 791-801.
15. *Verordnung (EU) Nr. 37/2010 der Kommission vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs*. 2010.
16. *CliniPharm Wirkstoffdatenbank*. [www.vetpharm.uzh.ch](http://www.vetpharm.uzh.ch), 2009.

17. Beconi-Barker, M.G., et al., *Determination of Ceftiofur and its desfuoylceftiofur-related metabolites in swine tissues by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, 1995. **673**: p. 231-244.
18. Beconi-Barker, M.G.e.a., *[14C]Ceftiofur Sodium Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion in Sheep following Intramuscular Injections*. J Agric Food Chem, 1995. **43**(6): p. 1589-1597.
19. Beconi-Barker, M.G.e.a., *Metabolism of [14C]Ceftiofur Hydrochloride in Swine after Intramusculrt Injections*. J Agric Food Chem, 1997. **45**(7): p. 2606-2611.
20. Koshy, K.T. and A.R. Cazars, *Controlled Hydrolysis of Ceftiofur Sodium, a Broad-Spectrum Cephalosporin; Isolation and Identification of Hydrolysis Products*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1997. **86**(3): p. 389-395.
21. Ricci, F., et al., *A review on novel developments and applications of immunosensors in food*. Analytica Chimica Acta, 2007. **605**(2): p. 111-129.
22. Brabander, H.F., et al., *Residue analysis: Future trends from a historical perspective*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(46): p. 7964-7976.
23. *L 01.01-5 Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT), Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB*.
24. Becker, M., *LC-MS/MS-Methoden zur Rückstandsanalyse von Penicillinen, Cephalosporinen und Aminoglycosid-Antibiotika*, in *Lebensmittelchemie*. 2005, Bergische Universität Wuppertal: Wuppertal.
25. Ibach, I., *Entwicklung und Anwendung einer HPLC-Schnellmethode zur Bestimmung von Isoxazolylpenicillinrückständen*, in *Lebensmittelchemie*. 1999, Bergische Universität Wuppertal: Wuppertal.
26. Bogialli, S. and A. Di Corcia, *Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **395**: p. 947-966.
27. Mastovska, K. and A.R. Lightfield, *Streamlining methodology for the multiresidue analysis of  $\beta$ -lactam antibiotics in bovine kidney using liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2008. **1202**(2): p. 118-123.
28. Okermann, L., J. Van Hende, and L. De Zutter, *Stability of frozen stock solutions of beta-lactam antibiotics, cephalosporins, tetracyclines and quinolones used in antibiotic residue screening and antibiotic susceptibility testing*. Analytica Chimica Acta, 2006. **586**(1-2): p. 284-288.
29. Benito-Pena, E., et al., *Development of a novel and automated fluorescent Immunoassay for the analysis of  $\beta$ -Lactam antibiotics*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**: p. 6635-6642.
30. Lamar, J. and M. Petz, *Development of a receptor-based microplate assay for the detection of beta-lactam antibiotics in different food matrices*. Analytica Chimica Acta, 2007. **586**(1-2): p. 296.

31. Cacciatore, G., *Entwicklung eines optischen Biosensor-Assays mit Penicillin-bindenden Proteinen*, in *Lebensmittelchemie*. 2005, Bergische Universität Wuppertal: Wuppertal.
32. Möller, N., *Entwicklung eines optischen Biosensor-Assays mit Elementen aus der Resistenzforschung zum Screening auf Tetracyclin-Rückstände in Lebensmitteln*, in *Lebensmittelchemie*. 2007, Bergische Universität Wuppertal: Wuppertal.
33. Möller, N., et al., *A new strategy for the analysis of tetracycline residues in foodstuffs by a surface plasmon resonance biosensor*. *Eur Food Res Technol*, 2007. **224**: p. 285-292.
34. Andree, U., *Beitrag zur Biosensoranalytik von Tetracyclinrückständen in Lebensmitteln mittels Oberflächenplasmonresonanz*, in *Lebensmittelchemie*. 2009, Bergische Universität Wuppertal: Wuppertal.
35. Andree, U., et al., *Tetracycline sensing using novel doxycycline derivatives immobilized on different surface plasmon resonance biosensor surfaces*. *Bioanalysis*, 2010. **2**(2): p. 217-227.
36. Ryan, T., *persönliche Mitteilungen*. Reichert.
37. Cacciatore, G. and M. Petz, *Optical Biosensors: New Perspectives in Residue Analysis*. *Deutsche Lebensmittelrundschau*, 2005. **101**(11): p. 501-508.
38. Petz, M., *Recent applications of surface plasmon resonance biosensors for analyzing residues and contaminations in food*. *Chemical Monthly*, 2009. **140**(8): p. 953-964.
39. Katsamba, P.S., et al., *Kinetic analysis of a high-affinity antibody/antigen interaction performed by multiple Biacore users*. *Anal Biochem*, 2006. **352**(2): p. 208-21.
40. Gedig, E., *persönliche Mitteilungen*. Münster.
41. Gedig, E., *SPR Sensorchips and Sensor surfaces*, [www.xantec.com](http://www.xantec.com). August 2009.
42. Kim, M.G., et al., *Enhanced sensitivity of surface plasmon resonance (SPR) immunoassays using a peroxidase-catalyzed precipitation reaction and its application to a protein microarray*. *Journal of Immunological Methods*, 2005. **297**(1-2): p. 125-132.
43. Gedig, E., *Surface Chemistry in SPR Technology*, in *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, R. Schasfoort and A. Tudos, Editors. 2008, The Royal Society of Chemistry: Cambridge. p. 173pp.
44. Biacore, *Biacore Concentration Analysis Handbook (Version AA)*. 2001.
45. Staros, J.V., R.W. Wright, and D.M. Swingle, *Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions*. *Analytical Biochemistry*, 1986. **156**(1): p. 220-222.
46. Grabarek, Z. and J. Gergely, *Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters*. *Analytical Biochemistry*, 1990. **185**(1): p. 131-135.
47. Bokken, G.C., et al., *Immunochemical detection of Salmonella group B, D and E using an optical surface plasmon resonance biosensor*. *FEMS Microbiol Lett*, 2003. **222**(1): p. 75-82.

48. Chamberlain, P., et al., *Generation and characterization of monoclonal antibodies to human type-5 tartrate-resistant acid phosphatase: development of a specific immunoassay of the isoenzyme in serum*. Clin Chem, 1995. **41**(10): p. 1495-9.
49. Jongerius-Gortemaker, B.G., et al., *Surface plasmon resonance (BIAcore) detection of serum antibodies against Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium*. J Immunol Methods, 2002. **266**(1-2): p. 33-44.
50. Karlsson, R. and A. Falt, *Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors*. J Immunol Methods, 1997. **200**(1-2): p. 121-33.
51. Karlsson, R. and R. Stahlberg, *Surface plasmon resonance detection and multispot sensing for direct monitoring of interactions involving low-molecular-weight analytes and for determination of low affinities*. Anal Biochem, 1995. **228**(2): p. 274-80.
52. Li, Y.J., et al., *Reversible immobilization of proteins with streptavidin affinity tags on a surface plasmon resonance biosensor chip*. Anal Bioanal Chem, 2006. **386**(5): p. 1321-6.
53. Nguyen, A.T., et al., *Binding characteristics of a panel of monoclonal antibodies against the ligand binding domain of the human LDLr*. J Lipid Res, 2006. **47**(7): p. 1399-405.
54. Pei, et al., *Real-time immunoassay of antibody activity in serum by surface plasmon resonance biosensor*. Talanta, 2000. **53**: p. 481-488.
55. Pol, E., et al., *Biosensor-based characterization of serum antibodies during development of an anti-IgE immunotherapeutic against allergy and asthma*. J Mol Recognit, 2007. **20**(1): p. 22-31.
56. Sonksen, C.P., et al., *Combining MALDI mass spectrometry and biomolecular interaction analysis using a biomolecular interaction analysis instrument*. Anal Chem, 1998. **70**(13): p. 2731-6.
57. Wu, G., et al., *The binding of a glycoprotein 120 V3 loop peptide to HIV-1 neutralizing antibodies. Structural implications*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 36645-52.
58. Andersson, K., M. Hamalainen, and M. Malmqvist, *Identification and optimization of regeneration conditions for affinity-based biosensor assays. A multivariate cocktail approach*. Anal Chem, 1999. **71**(13): p. 2475-81.
59. Lamar, J., *Entwicklung, Optimierung und Validierung eines rezeptorproteingestützten Mikrotiterplatten-Tests zur Rückstandsanalytik von beta-Lactam-Antibiotika*, in *Lebensmittelchemie*. 2007, Bergische Universität Wuppertal: Wuppertal.
60. Gascón, J. and e. al., *Development of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for atrazine Performance evaluation by flow injection immunoassay*. Analytica Chimica Acta, 1997. **347**(1-2): p. 149-162.

61. Shankaran, Matsumoto, and Miura, *Development and comparison of two immunoassays for the detection of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) based on surface plasmon resonance*. *Sensors and Actuators B:Chemical*, 2006. **114**(1): p. 71-79.
62. Farré, M., *Part per trillion determination of antrazine in natural water samples by a surface plasmon immunosensor*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007. **388**(1): p. 207-214.
63. Cao, L., H. Lin, and V.M. Mirsky, *Surface plasmon resonance biosensor for enrofloxacin based on deoxyribonucleic acid*. *Anal Chim Acta*, 2007. **589**(1): p. 1-5.

## 11. Anhang

### Ausgearbeiteter Maintenance Kalender (Wartungskalender Reichert SPR)

Aufgabe	Häufigkeit	Durchführung
Gängigkeit Probenhalter	täglich	manuelle Ansteuerung, Position Exchange/Home Position
Spritzendichtigkeit	wöchentlich	Sichtkontrolle
Prüfung auf Verstopfung im AS Bereich	täglich	Durchführung <i>initial wash</i>
Autosamplereinigung	Wöchentlich	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Abspülen des Probenhalters und der Ab- und Überläufe mit Wasser und Reinigung mittels Wattestäbchen</li> <li>• Trocknen aller Teile mittels Tuch</li> </ul>
Spülen des gesamten Systems vor Flusszelle	alle 2 Wochen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kapillare vor Flusszelle ausschrauben</li> <li>• Spülen des Systems über Pumpe mit Fluss von 200 µL/min mit den Spüllösungen 1 und 2 und Wasser (Gesamtvolumen jeweils 5 mL)</li> <li>• Durchführung 3x <i>initial wash</i> mit den jeweiligen Spüllösungen und Wasser</li> <li>• vor weiteren Arbeiten wieder mit Puffer spülen</li> </ul>
Spülen des System inkl. Flusszelle	jeweils bei Chipwechsel	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spülen des Systems über Pumpe mit Fluss von 200 µL/min mit den Spüllösungen 1 und 2 und Wasser (Gesamtvolumen jeweils 5 mL)</li> <li>• Durchführung 3x <i>initial wash</i> mit den jeweiligen Spüllösungen und Wasser</li> <li>• Reinigung der Flusszellenbestandteile mit Ethanol</li> <li>• vor weiteren Arbeiten wieder mit Puffer spülen</li> </ul>
Spritzenreinigung Pumpe	wöchentlich	Ausbau der Spritze und Spülen mit Wasser, nach Einbau spülen mit Puffer
Spritzenreinigung AS	alle 3 Monate	Ausbau der Spritze und Spülen mit Wasser und Ethanol, nach Einbau spülen mit Puffer