

Untersuchungen zur Integration eines enzymatischen Biosensors zur Harnstoffbestimmung in ein neues Blutgasanalysestystem



Institut für Biotechnologie und Bioprozesstechnik
Technische Universität Graz

Betreuer:

Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Bernd Nidetzky ¹

Mag. Dr. Bernhard P. H. Schaffar ²

Vorgelegt von Alessandro König, BSc

Graz / März 2013

Institut für Biotechnologie und Bioprozesstechnik

Institutsleiter: Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Bernd Nidetzky

A - 8010 Graz, Petersgasse 12/I

Telefonnr: (+43 316) 873 – 8401

Telefax: (+43 316) 873 – 8434

<http://www.biote.tugraz.at>

<http://www.tugraz.at>

¹ Institut für Biotechnologie und Bioprozesstechnik - Technische Universität Graz

² Roche Diagnostics Graz GmbH

Deutsche Fassung:

Beschluss der Curricula-Kommission für Bachelor-, Master- und Diplomstudien vom
10.11.2008

Genehmigung des Senates am 1.12.2008

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 2. April 2013



(Unterschrift)

Englische Fassung:

STATUTORY DECLARATION

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared sources / resources, and that I have explicitly marked all material which has been quoted either literally or by content from the used sources.

2nd of April 2013

date



(signature)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei all denjenigen bedanken, die mich in irgendeiner Form bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Mag. Dr. Bernhard P. H. Schaffar der mich im Zuge dieser Arbeit wissenschaftlich betreut hat. Nicht nur die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der nötigen Versuche, auch die Diskussionen, Korrekturen und Denkanstöße zur Arbeit waren wertvolle Hilfestellungen und Triebfedern für die Erstellung der Diplomarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Bernd Nidetzky bedanken, der sich bereit erklärt hat die universitäre Betreuung und die Beurteilung der Arbeit zu übernehmen.

Daneben gilt mein Dank Herrn Dr. Christoph Ritter und Roche Diagnostics Graz GmbH für die Möglichkeit, diese Diplomarbeit an diesem Standort durchführen zu können. Auch meine werten Kollegen bei Roche Diagnostics Graz GmbH haben durch Anmerkungen, Korrekturen und motivierende Worte maßgeblich dazu beigetragen, dass die Diplomarbeit schlussendlich in dieser Form vorliegt.

Ganz besonders gilt mein Dank meiner Lebensgefährtin Anneliese Erhart, meinen Eltern Petra und Peter und meinem Bruder Mario für oft benötigte Aufmunterungen, Motivation und Unterstützung über die letzten Jahre hinweg.

Kurzfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit einem enzymatischen Biosensor auf Basis des Enzyms *Urease* EC 3.5.1.5 aus *Canavalia ensiformis*. Dieser bereits kommerziell erhältliche Sensor dient zur Bestimmung der Harnstoffkonzentration in humanbiologischen Proben und soll in eine neue Messumgebung integriert werden.

Das Ziel dieser Diplomarbeit war die Durchführung von Untersuchungen für eine mögliche Integration dieses Sensors in ein neues Blutgasanalysegerät.

Hierfür wurden die Sensorstabilität und die Messeigenschaften des Sensors bei veränderter Betriebstemperatur (von 30°C auf 37°C geändert) untersucht. Es wurde gezeigt, dass der Sensor bei 37°C ausreichend stabil ist und sich die Sensoreigenschaften nicht signifikant verändern haben.

Im Zuge dieser Arbeit wurden außerdem die Auswirkungen einer Erhöhung der Ammoniumionenkonzentration in der Betriebslösung auf die Sensorstabilität, sowie die Messeigenschaften des Sensors überprüft. Bei dieser Untersuchung konnten ebenfalls keine signifikanten Auswirkungen auf die Sensoreigenschaften beobachtet werden. Die Sensorstabilität konnte durch die Erhöhung der Ammoniumionenkonzentration minimal verbessert werden.

Aufgrund von verminderten Kapazitäten bezüglich verfügbarer Sensorspots und Anzahl der Reagenzlösungen im neuen Blutgasanalysegerät, musste ein neues Kalibrationskonzept inklusive eines neuen Kalibrations- bzw. Messwertrechenmodell entwickelt werden. Hierfür wurden vier verschiedene Lösungen entwickelt, die teilweise keinen Harnstoff in den Kalibrationsreagenzien für die Kalibration des Sensors benötigen. Für die Beurteilung der neu entwickelten Kalibrationskonzepte bzw. Messwertrechenmodelle wurden die Messungen von insgesamt 560 biologischen Proben herangezogen. Mit keinem der neu entwickelten Kalibrationsrechenmodelle konnte eine Verbesserung im Vergleich zum ursprünglichen Rechenmodell erzielt werden. Bei Heranziehen der aktuellen Spezifikationen des Sensors, welche im ursprünglichen Blutgasanalysegerät ermittelt wurden, zeigte sich, dass drei der vier Konzepte diese Anforderungen erfüllen. Somit wurden mögliche Wege aufgezeigt um den Sensor in das neue Blutgasanalysegerät integrieren zu können.

Abstract

This thesis deals with an enzymatic biosensor based on the enzyme *Urease* EC 3.5.1.5 from *Canavalia ensiformis*. An already commercialized sensor, which is used to determine urea concentrations of human samples, should be integrated into a new instrumental system environment.

The goal of the thesis was to undertake investigations to integrate this sensor into a new blood gas analysis device.

First of all sensor stability and sensor characteristics at modified operating temperatures (30°C vs. 37°C) were investigated. As a result it was shown that the sensor is stable enough and that sensor characteristics do not change significant at 37°C.

Furthermore influences of an increased ammonium ion concentration in the maintenance solution on sensor stability and sensor characteristics were tested. Again sensor characteristics have not significantly changed. Only sensor stability was minimally improved because of the increased ammonium ion concentration.

Due to reduced number of sensor spots and reagent solutions available in the target blood gas analysis device a new calibration concept, including mathematical models for calibrations and measurements, had to be developed. Therefore, four different concepts were developed, which partly do not contain urea in the reagent solutions. To evaluate the developed calibration concepts and new mathematical models, measurements of 560 biological samples were performed. None of these mathematical models brought improvements compared to the base model. Three of the four concepts fulfill the performance specifications of the sensors of the initial blood gas analysis device. In conclusion different methods were shown to implement the urea sensor into the target blood gas analysis device.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	11
1.1. Physiologische und medizinische Bedeutung von Harnstoff.....	12
1.2. Aufgabenstellungen.....	13
2. Chemo- und Biosensoren	15
2.1. Definition	15
2.2. Anforderungen an Chemo- und Biosensoren	16
2.3. Prinzipieller Aufbau von Chemo- und Biosensoren	17
2.4. Klassifizierungen von Chemo- und Biosensoren.....	20
2.5. Enzymsensoren.....	23
2.5.1. Enzymkinetik	23
2.5.2. Limitierungen für den Einsatz von Enzymen in Biosensoren.....	26
2.5.3. Immobilisierungsstrategien für den Einsatz von Enzymen in Biosensoren.....	27
2.5.4. Urease aus <i>Canavalia ensiformis</i>	31
2.6. Harnstoffsensoren	33
2.7. AVL/Roche-Harnstoff-Sensor	35
2.7.1. Ionenselektive Potentiometrie	35
2.7.2. Beschreibung des verwendeten Sensors.....	36
2.7.3. Alternative Methoden zur Harnstoffbestimmung	38
3. Methoden und Material	39
3.1. Sensorherstellung.....	39
3.1.1. Siebdruck.....	40
3.1.2. Dispensieren.....	41
3.2. Kalibrationen und Messungen in Messständen	44

3.2.1. Aufbau der Messstände	44
3.2.2. Fluidische Abläufe und Datenerfassung der Messstände	45
3.3. Kalibrationskonzept des Harnstoffsensors.....	47
3.4. Reagenzien	48
3.5. Messreihe	49
3.6. Referenzmessung.....	51
3.7. Datenauswertung	52
4. Durchführung und Ergebnisse	57
4.1. Untersuchung der Enzymstabilität bzw. Sensorstabilität, sowie der Sensoreigenschaften bei veränderter Betriebstemperatur (30°C vs. 37°C):.....	57
4.1.1. <i>Untersuchung der Auswirkungen von verschiedenen Deckmembransystemen auf die Enzymstabilität bzw. Sensorstabilität, sowie auf die Sensoreigenschaften:</i>	<i>63</i>
4.2. Untersuchung der Auswirkungen einer Änderung der Ammoniumionenkonzentration in der Betriebslösung auf die Sensorstabilität und die Sensoreigenschaften (low NH₄⁺ vs. high NH₄⁺):.....	69
4.3. Entwicklung eines neuen Kalibrationskonzepts für die Integration des Harnstoffsensors in das neue Blutgasanalysestystem	73
5. Diskussion	84
6. Zusammenfassung	93
Literaturverzeichnis.....	94
Abbildungsverzeichnis.....	102
Tabellenverzeichnis.....	104
Gleichungsverzeichnis	105
Anhang	106

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
a_i	Aktivität einer Ionenspezies mit dem Index i
a_j	Aktivität einer Ionenspezies mit dem Index j
Ag/AgCl	Silber-Silberchlorid
Asp	Asparaginsäure
BUN	Blood Urea Nitrogen
bzw.	beziehungsweise
Cal_i	Kalibrationslösung mit Index i
CD	Cellulosederivat
cobas [®] C.F.A.S.	cobas [®] Calibrator-For-Automated-Systems für Roche/Hitachi Integra-Analyzers von Roche Diagnostics GmbH
CHEMFET	chemisch sensitive(r) Feldeffekttransistor(en)
Cl ⁻	Chloridion
CO ₂	Kohlendioxid
cobas [®] b221	Blutgasanalysesystem von Roche Diagnostics GmbH
Combitrol Plus B	Kontrolllösung (Level 1-3) für cobas [®] b221 Blutgasanalysesystem von Roche Diagnostics GmbH
DNA	Desoxyribonucleic acid (= Desoxyribonukleinsäure)
E	Enzym (in Reaktionsschema nach Michaelis und Menten) bzw. Elektrodenpotential (in Nernstgleichung und in Nicholsky-Eisenman-Gleichung)
E°	Standardelektrodenpotential
E_A	Aktivierungsenergie
EC	Enzyme Comission Number
ES	Enzymsubstratkomplex
etc.	et cetera
F	Faradaykonstante
GLDH	<i>Glutamat Dehydrogenase</i>
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H ₂ O	Wasser
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
His	Histidin
HPU	hydrophiles Polyurethan
ISE	ionenselektive Elektrode(n)
ISFET	ionensensitive(r) Feldeffekttransistor(en)

IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Jr.	Junior
K^+	Kaliumion
k^i	Geschwindigkeitskonstante mit dem Index i
K_{ij}^{pot}	potentiometrischer Selektivitätskoeffizient
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Lin	Linearität
Lys	Lysin
MK _i	Messkammer mit dem Index i
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol/L	Millimol pro Liter
mV	Millivolt
Mw	Mittelwert
MS-Excel	Microsoft [®] Office Excel von Microsoft Corporation
MSS	Metabolit-Sensitive-Sensoren
MSS _i	Messstand mit dem Index i
n	Probenanzahl
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
(NH ₂) ₂ CO	Harnstoff
NH ₃	Ammoniak
NH ₄ ⁺	Ammoniumion
Ni	Nickel
nl	Nanoliter
nM	Nanometer
nOK	nicht OK
P	Produkt
P _i	Peristaltikpumpe mit dem Index i
PE	Probeneingang
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PVC	Polyvinylchlorid
R	molare Gaskonstante
R ²	Bestimmtheitsmaß

Ref	Referenzelektrode
S	Substrat
SAW-Sensor	Surface-Acoustic-Wave-Sensor
Sensor-Nr.	Sensornummer
SS _i	Sample-Sensor mit dem Index i
Stabw	Standardabweichung
Stby	Standby (= Betriebslösung)
STD	Standard
T	absolute Temperatur
T&D	Turn and Dock
U/min	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolet
μl	Microliter
μM	Micromolar
v	Reaktionsgeschwindigkeit
v _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
VIS	sichtbares Lichtspektrum
WB	Wasserstoffbrücke
z.B.	zum Beispiel
3D	dreidimensional
°C	Grad Celsius
[ES]	Enzymsubstratkomplex
[S]	Substratkonzentration
ΔG [‡]	Aktivierungsenergie
z _i	Ladungszahl einer Ionenspezies mit dem Index i
z _j	Ladungszahl einer Ionenspezies mit dem Index j

1. Einleitung

Diese Diplomarbeit beschäftigt sich mit einem enzymatischen Biosensor zur Bestimmung der Harnstoffkonzentration in humanbiologischen Proben (z.B. Blut oder Serum). Der Biosensor basiert auf dem Enzym *Urease* EC 3.5.1.5 (auch *Urea Amidohydrolase* genannt) aus *Canavalia ensiformis*. Die grundlegende Entwicklung dieses Sensors erfolgte bereits in den 1990er Jahren und der Sensor wurde bis zur Marktreife gebracht [1, 2].

Das Ziel dieser Diplomarbeit ist die Durchführung von Untersuchungen für eine mögliche Integration des enzymatischen Biosensors zur Harnstoffmessung in die Messumgebung eines neuen Blutgasanalysegerätes.

Die Diplomarbeit ist in sechs Kapitel untergliedert. Der erste Teil beinhaltet die Einleitung mit einer kurzen Beschreibung der physiologischen und medizinischen Bedeutung von Harnstoff, sowie das Ziel und die genauen Aufgaben- bzw. Fragestellungen der Diplomarbeit. Das zweite Kapitel beschäftigt sich mit der theoretischen Aufarbeitung des Themas Chemo- und Biosensoren mit speziellem Fokus auf enzymatische Biosensoren zur Harnstoffbestimmung.

Der dritte Teil der Diplomarbeit beschreibt die verwendeten Materialien und Methoden, welche im Zuge der Untersuchungen verwendet wurden. Hier werden unter anderem die Sensorherstellung, die verwendeten Reagenzien, die Methode der Referenzmessung, sowie das den Sensor umgebende Messsystem und die Abläufe in diesem erläutert.

Im vierten Kapitel werden die Durchführungen der Experimente, sowie deren Ergebnisse dargebracht, welche anschließend im fünften Kapitel interpretiert und diskutiert werden.

Im sechsten und letzten Teil der Diplomarbeit wird eine Zusammenfassung dieser gegeben, in dem beschrieben wird, was die Ergebnisse der Diplomarbeit für weitere Entwicklungen bedeuten könnten.

1.1. Physiologische und medizinische Bedeutung von Harnstoff

Harnstoff (oder Kohlendiamid) ist eine organische Verbindung, die von ureothelischen Organismen im Zuge des Harnstoffzyklus (auch *Krebs-Henseleit-Zyklus* genannt) in der Leber gebildet wird. Dieser Zyklus dient der Umwandlung von Ammoniak in das Zyklusendprodukt Harnstoff. Ammoniak entsteht im Zuge des Protein- bzw. Aminosäurestoffwechsels und wirkt bereits in geringen Konzentrationen zytotoxisch [3, 4].

Der gebildete Harnstoff aus der Leber wird, neben der Ausscheidung über den Darm (wo der Harnstoff durch Bakterien wieder zu Ammoniak und Kohlenstoffdioxid abgebaut wird und der gebildete Ammoniak zum Großteil wieder in die Leber gelangt) und minimaler Ausscheidung über den Schweiß, zum Großteil über das Blut zu den Nieren transportiert. Dort wird er über die Nephronen (kleinste funktionelle Einheit der Nieren) und die ableitenden Harnwege im Harn ausgeschieden. Harnstoff gehört somit zu den harnpflichtigen Substanzen [5]. Aufgrund der eben erwähnten Harnpflicht dient die Harnstoffkonzentration im Serum neben der Kreatininkonzentration als wichtiger diagnostischer Parameter zur Bestimmung der Nierenfunktionsfähigkeit (vor allem bei akutem Nierenversagen).

Verminderte Harnstoffkonzentrationen im Serum können bei niedriger Proteinzufuhr (z.B. bei Hungerzuständen oder Anorexie) oder bei einer erhöhten Proteinbiosyntheserate (z.B. im Fall von Schwangerschaften oder Wachstum im Kindesalter) vorkommen. Verminderte Harnstoffkonzentrationen sind jedoch diagnostisch irrelevant. Eine extrem geringe bis nicht messbare Harnstoffkonzentration im Serum kann hingegen Störungen des Harnstoffzyklus oder schwere Lebererkrankungen als Grund haben. Für eine Erhöhung der Konzentration an Harnstoff im Serum (= „Azotämie“) gibt es drei Unterteilungen von Ursachen, die das Messen der Harnstoffkonzentration für die Diagnostik notwendig machen [6, 7]:

a. Prärenale Azotämie:

Hierbei kommt es zu erhöhten Harnstoffkonzentrationen aufgrund einer verminderten Durchblutung der Niere durch Zirkulationsstörungen in Folge von Herzinsuffizienz, Schock, Hypertonie oder Dehydratation. Ein weiterer Grund für eine prärenale Azotämie ist ein erhöhter Proteinkatabolismus der durch Fieber, Verbrennungen, Tumornekrosen oder Traumata mit Gewebsverletzungen auftreten kann.

b. Renale Azotämie:

Bei einer renalen Azotämie kommt es zu erhöhten Harnstoffkonzentrationen im Serum aufgrund einer verminderten glomerulären Filtrationsleistung der Nieren. Dies kann durch akute oder chronische Glomerulonephritis, Phylonephritis, Nephrosklerose und durch den Einfluss von nierentoxischen Medikamenten hervorgerufen werden.

c. Postrenale Azotämie:

Zu dieser Art von Azotämie kommt es durch einen verminderten Abfluss des Harns aus der Niere bzw. der ableitenden Harnwege durch z.B. Steine, Tumore oder Missbildungen. Dies führt zu einem Rückstau des Harns bis in die Nieren was eine verminderte Filtrationsleistung dieser zur Folge hat.

1.2. Aufgabenstellungen

1. Untersuchung der Enzymstabilität bzw. Sensorstabilität bei veränderter Betriebstemperatur:

Da das Ausgangssystem, in dem der Sensor entwickelt wurde bei 30°C betrieben wird, das Zielsystem für den Sensor jedoch bei 37°C, muss die Enzymstabilität bzw. Sensorstabilität des Sensors untersucht werden. Hierfür werden die Signalverläufe des Harnstoffsensors, bei beiden Temperaturen, über die gesamte Einsatzzeit verfolgt und verglichen. Falls sich der Sensor aufgrund der Temperaturänderung als zu instabil herausstellen sollte, müssen mögliche Maßnahmen, wie der Einsatz von Enzymstabilisatoren oder alternative Strategien für die Immobilisierung des Enzyms am Sensor untersucht werden, um die geforderte Stabilität des Biosensors zu gewährleisten.

Des Weiteren müssen Auswirkungen der veränderten Betriebstemperatur auf die Sensoreigenschaften (Messgenauigkeit, Signalwiederfindung, Lebensdauer etc.) getestet und verglichen werden, um eine möglicherweise daraus resultierende notwendige Korrektur des Kalibrations- bzw. Messwertrechenmodells zu entwickeln.

2. Auswirkung der Ammoniumionenkonzentration in der Betriebslösung auf die Stabilität des Sensorpotentials und die Sensoreigenschaften:

Im Zuge der möglichen Integration des Harnstoffsensors in die neue Messumgebung, sollen die Auswirkungen einer Erhöhung der Ammoniumionenkonzentration in der Betriebslösung überprüft werden. Hier soll wiederum die Sensorstabilität des Harnstoffsensors über die gesamte Einsatzzeit verfolgt und mit dem bestehenden System verglichen werden. Des Weiteren müssen ebenfalls Auswirkungen auf die Sensoreigenschaften (Messgenauigkeit, Signalwiederfindung, Lebensdauer etc.) getestet und verglichen werden, um eine möglicherweise daraus resultierende notwendige Korrektur des Kalibrations- bzw. Messwertrechenmodells zu entwickeln.

3. Entwicklung eines neuen Kalibrationskonzepts:

Der für das Ausgangssystem entwickelte Harnstoffsensor besteht insgesamt aus drei Sensorspots (genaue Beschreibung siehe *2.7.2 Beschreibung des verwendeten Sensors*). Da im Zielsystem jedoch nur zwei, anstelle von drei Sensorspots zu Verfügung stehen muss ein neues Kalibrationskonzept inklusive eines neuen Kalibrations- bzw. Messwertrechenmodell entwickelt werden um den Sensor im gewünschten Messbereich kalibrieren und mit diesem messen zu können.

Darüber hinaus stehen für die Kalibration des Harnstoffsensors im Zielmesssystem nur drei anstatt von fünf Kalibrationslösungen (wie im Ausgangssystem) zu Verfügung. Zusätzlich sollten diese Kalibrationslösungen keinen Harnstoff beinhalten, da dies negative Einflüsse auf andere Sensoren des Zielsystems hervorrufen würde.

2. Chemo- und Biosensoren

In vielen Gebieten wie der Medizin, der Lebensmittelanalytik, der Umweltanalytik oder der In-Prozess-Kontrolle von z.B. biotechnologischen Prozessen besteht die Notwendigkeit Konzentrationen von verschiedenen chemischen Verbindungen, Elementen, sowie Ionen zu bestimmen. Hierfür werden oft gängige Verfahren der instrumentellen Analytik, wie z.B. Atomabsorptionsspektrometrie, Massenspektrometrie oder enzymatische Tests verwendet. Herkömmliche Methoden der instrumentellen Analytik sind aber sehr oft mit einem hohen apparativen, sowie zeitlichen und finanziellen Aufwand verbunden. Eine gute Alternative für die Konzentrationsbestimmung verschiedener Analyten stellen Chemo- und Biosensoren dar. Heutzutage werden Chemo- und Biosensoren unter anderem in der Diagnostik [8], der Arbeitsplatzüberwachung [9], der Prozesskontrolle [10], dem Umweltmonitoring [11], der Lebensmittelkontrolle [12], der Sportmedizin [13], dem Brandschutz [14], der Sicherheitsüberwachung [15] und der Terrorabwehr [16] genutzt. Dieses breite Spektrum an Anwendungsbereichen hat dazu beigetragen, dass in den letzten 30 Jahren massive Forschungsbemühungen auf dem Gebiet der Chemo- und Biosensorentwicklung stattgefunden haben.

2.1. Definition

Einen Chemosensor kann man nach den aktuell gültigen Nomenklaturvorschlägen der IUPAC-Kommission wie folgt definieren:

„Unter analytisch einsetzbaren Chemosensoren versteht man nach einem vorläufigen Nomenklaturvorschlag der zuständigen IUPAC-Kommission miniaturisierte Messwertfühler, die chemische Verbindungen oder Ionen selektiv und reversibel erfassen und dabei konzentrationsabhängige elektrische Signale liefern. Streng genommen liegt nur dann ein echter Sensor vor, wenn Konzentrationsänderungen in beiden Richtungen erfasst werden können.“ [17]

Diese Definition für Chemosensoren schließt Einwegteststreifen oder Prüfröhrchen aus, da diese nicht in der Lage sind Konzentrationsverläufe kontinuierlich und reversibel über die Zeit zu messen. Diese Art von Sensoren wird nach einer weiteren Veröffentlichung der IUPAC-Kommission als Dosimeter bezeichnet. Des Weiteren werden durch den Terminus „miniaturisierte Messwertfühler“ auch analytische Großgeräte wie z.B. Massenspektrometer,

aus dieser Definition ausgegrenzt, obwohl es hier in Hinblick auf integrierte Teile dieser Systeme oft zu fließenden Grenzen kommt [17].

Die vom Namensgeber der Biosensoren, Karl Cammann [13], vorher angeführte Definition eines Chemosensors wird folgendermaßen um den Begriff Biosensor von ihm erweitert:

„Laut dieser Nomenklaturvorschläge spricht man weiter von der Untergruppe Biosensoren, wenn bei Chemosensoren biologische Erkennungsmechanismen oder -Prinzipien zur Stofferkennung angewendet werden.“ [17]

Solche biologische Erkennungsmechanismen bzw. Prinzipien zur Stofferkennung können z.B. mit Hilfe von Enzymen oder Antikörpern für die Biosensorik genutzt werden [17].

2.2. Anforderungen an Chemo- und Biosensoren

Die individuellen Anforderungen an Chemo- und Biosensoren hängen stark von dem Verwendungsgebiet dieser ab und können daher nicht immer zufriedenstellend vereinheitlicht werden. Ein Sensor der einen Analyten in definierten Umgebungsbedingungen und in einer definierten Matrix nahezu perfekt misst, kann in einem geänderten Milieu bzw. einer alternativen Matrix Probleme haben den Analyten ausreichend gut zu detektieren. Aufgrund dieser Tatsache gibt es keinen idealen Sensor, da Chemo- und Biosensoren in unterschiedlichsten Gebieten eingesetzt werden.

Man kann jedoch allgemeine Anforderungen an Chemo- und Biosensoren stellen. Diese sollten allgemein die folgenden Eigenschaften besitzen [18, 19, 20, 21]:

- selektiv
- sensitiv
- signalstabil (frei von Driftverhalten)
- robust
- schnell (Ansprechverhalten)
- nachweisstark (gute „signal-to-noise-ratio“)
- einfach kalibrierbar (am besten kalibrationsfrei)
- einfach bedienbar
- preiswert
- klein

Aufgrund dieser Anforderungen an Chemo- und Biosensoren besitzen diese einige Vorteile im Vergleich zu herkömmlicher instrumenteller Analytik. Einer der größten Vorteile ist die Möglichkeit der Echtzeitmessung der gewünschten Analyten aufgrund der schnellen Ansprechzeiten der Sensoren. Darüber hinaus kann man mit Chemo- und Biosensoren kontinuierliche Messsysteme etablieren, da für die meisten Applikationen keine Probenvorbereitung nötig ist. Des Weiteren können sie miniaturisiert und somit unter anderem in portable Systeme wie z.B. Blutzuckermessgeräte integriert werden. Aufgrund von verschiedenen Techniken zur Massenproduktion solcher Sensoren, wie z.B. Dünnschichttechnologie oder Siebdrucktechnologie, können diese außerdem sehr preiswert produziert werden. Die geringe Selektivität, welche oft bei Chemosensoren gegeben ist, können Biosensoren oft aufgrund der hohen Selektivität der verwendeten Rezeptoren (z.B. Enzyme) gut ausgleichen. Tatsächliche Nachteile im Vergleich zu Methoden der instrumentellen Analytik sind unter anderem die geringere Genauigkeit, sowie Probleme bei der Spurenanalytik. Der größte Nachteil ist allerdings ganz einfach der Mangel an Chemo- und Biosensoren für viele analytische Probleme [20, 21, 22, 23, 24].

2.3. Prinzipieller Aufbau von Chemo- und Biosensoren

Der grundlegende Aufbau eines Chemo- bzw. Biosensors besteht im Allgemeinen aus drei Teilen und ist in der folgenden Abbildung (siehe *Abbildung 1*) dargestellt.

Das wichtigste Element eines solchen Sensors ist der Rezeptor (spezifisches Erkennungssystem für einen Analyten). Er dient der Stofferkennung des Analyten, welche aufgrund von stoffspezifischen Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Analyt zu Stande kommt. Da es eine Vielzahl von verschiedenen Rezeptoren respektive eine Vielzahl an analytischen Problemstellungen gibt, werden intensive Forschungsbemühungen unternommen, um neue Rezeptortypen bzw. Rezeptorprinzipien zu etablieren oder Verbesserungen bekannter Systeme zu entwickeln [17, 19, 21].

Das aufgrund der spezifischen Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Analyt generierte Signal wird dann vom zweiten Bauteil des Sensors, dem so genannten Transduktor, in ein elektrisches Signal (sekundäres Signal) umgewandelt. Für die Umsetzung des chemischen in ein messtechnisch zugängliches Signal können verschiedene physikalische Prinzipien genutzt werden [19, 21, 25]. Eine Klassifizierung von Chemo- und Biosensoren aufgrund ihres Transduktorsystems wird im nächsten Punkt der Diplomarbeit beschrieben.

Das letzte Element eines Chemo- bzw. Biosensors ist ein elektronisches System, das der Signalverstärkung, der Signalprozessierung (z.B. Berechnungsmodelle, Computersoftware etc.) und der Datenausgabe (z.B. Monitor) dient [19]. Dieses System übernimmt das Sekundärsignal des Transduktors und verarbeitet es zu Informationen für die Beantwortung der analytischen Problemstellung für die der Sensor eingesetzt wurde weiter. Durch verschiedene Kombinationen und Abstimmungen der einzelnen Sensorbauteile ist es möglich, spezielle Sensoren für ein bestimmtes analytisches Problem zu entwickeln.

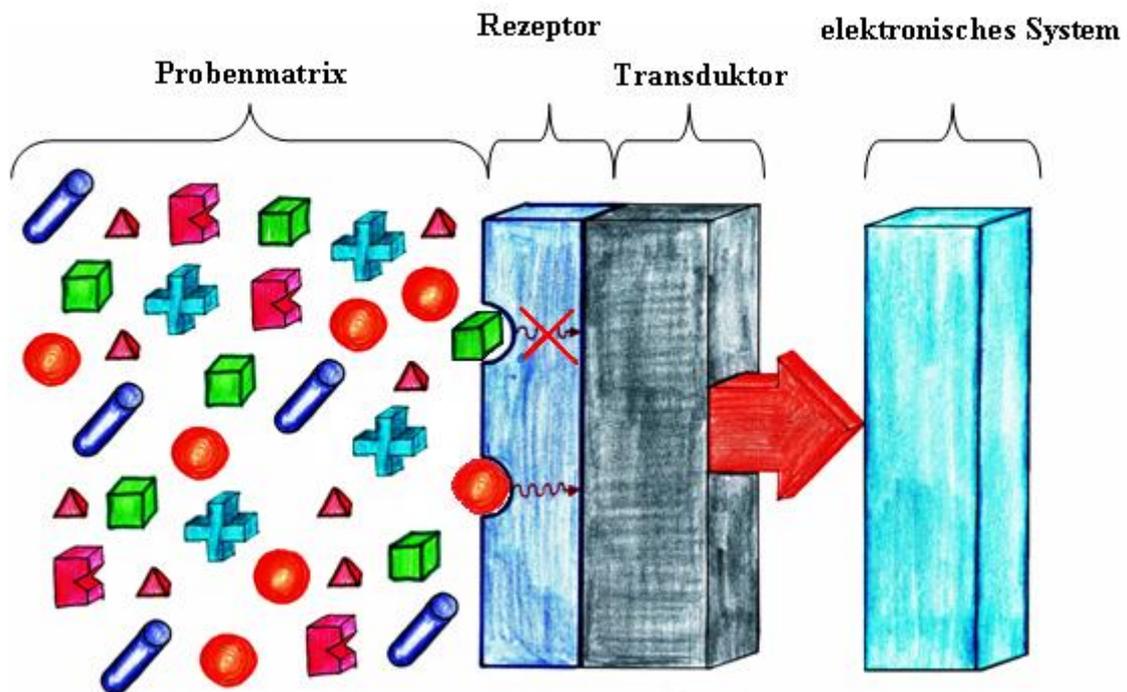


Abbildung 1 - Prinzipieller Aufbau von Chemo- und Biosensoren: Die Abbildung zeigt den prinzipiellen Aufbau eines Biosensors. Der Analyt (rote Kugeln) aus der Probenmatrix bindet an die Rezeptorstruktur. Das chemische Signal (gewellter Pfeil) wird durch den Transduktor in ein messtechnisch verwertbares Signal (roter Pfeil) umgewandelt und auf das elektronische System übertragen. Quelle: Eigene Abbildung.

Zusätzlich zu dem eben beschriebenen prinzipiellen Aufbau der Chemo- und Biosensoren ist bei vielen Sensorensystemen noch ein Filter als vierte Komponente integriert. Solche Filter dienen unter anderem der Verbesserung der Selektivität der Sensoren oder der Limitierung der Diffusion von definierten Stoffen. In den meisten und einfachsten Fällen ist ein solcher Filter zwischen der Probenmatrix und dem Rezeptor installiert (siehe *Abbildung 2*). Es gibt jedoch auch kompliziertere (kombinierte) Sensorsysteme die mehrere Filterschichten beinhalten [24, 26].

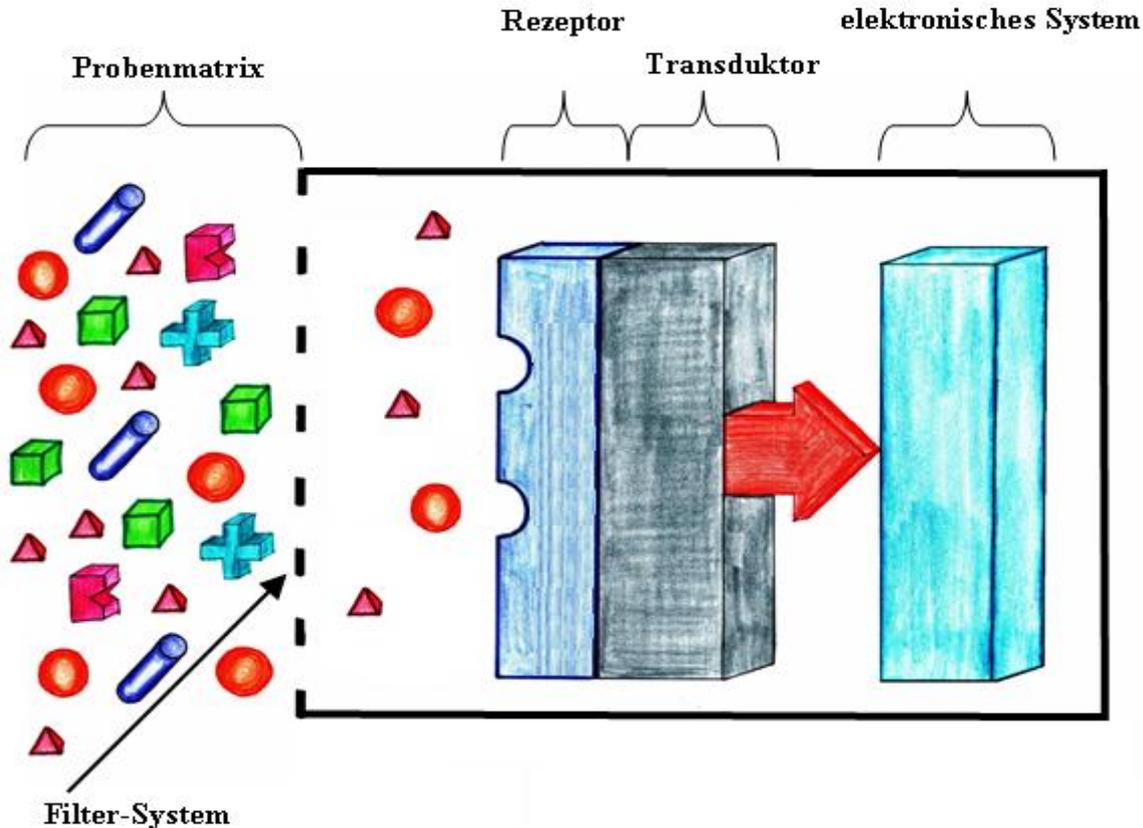


Abbildung 2 – Aufbau eines Chemo- und Biosensors mit Filter: Die Abbildung zeigt den prinzipiellen Aufbau eines Biosensors erweitert um ein Filter-System. Durch dieses Filter-System können nur definierte Bestandteile der Probenmatrix zum Rezeptor des Sensor diffundieren. Somit kann eine Erhöhung der Selektivität des Sensors und eine gewünschte Diffusionslimitierung erreicht werden. Quelle: Eigene Abbildung.

Den für Chemo- und Biosensoren verwendeten Filtern liegen verschiedene Ausschlussprinzipien zu Grunde. Diese Ausschlussprinzipien werden in der Sensorentwicklung ausgenutzt, um gewünschte Effekte wie z.B. eine Steigerung der Selektivität des Sensors zu erzielen. Verwendet man als Filtersystem z.B. eine Dialysemembran auf Basis von Celluloseacetat (Größenausschluss aufgrund der Maschenweite der Polymere membran), so kann man eine Abtrennung von Zellen, Zellbestandteilen oder Proteinen erzielen, die die Wechselwirkungen zwischen Analyt und Rezeptor stören könnten [24, 27]. In folgender Tabelle (siehe *Tabelle 1*) sind verschiedene Ausschlussprinzipien von Filtern zusammengefasst, die für Chemo- und Biosensoren verwendet werden:

Tabelle 1 - Filtersysteme für Chemo- und Biosensoren. Quelle: Tabelle nach [24].

Ausschlussprinzip	Material (Beispiel)	Anwendung
Größenausschluss	Celluloseacetat [20]	zur Abtrennung von z.B. Zellen, Zellteilen und Proteinen
Ausschluss aufgrund der Ladung	Nafion [24]	zur Abtrennung von entgegengesetzt geladenen Ionen
Ausschluss aufgrund der Polarität	Teflon, Silikon oder Hydrogele [24]	zur Abtrennung von hydrophoben bzw. hydrophilen Substanzen
Ausschluss aufgrund von spezifischen Ionenkanälen	Membran mit Ionenkanälen [19]	zur spezifischen Selektion von Ionen
gemischte Ausschlusssysteme	Kationentauscher- + Teflon-Membran [26]	zur Abtrennung aufgrund von verschiedenen Prinzipien

2.4. Klassifizierungen von Chemo- und Biosensoren

Für Chemo- und Biosensoren gibt es mehrere verschiedene Arten der Klassifizierung, wobei diese sich nicht gegenseitig ausgrenzen, sondern additiv erweitern und die Art des Sensors somit noch genauer definieren.

Der einfachsten Klassifizierung der Sensoren liegt die Art des Rezeptors zu Grunde, wie bereits in den Definitionen der Sensoren gezeigt wurde. Hier entscheidet man in erster Linie zwischen Chemo- und Biosensor, je nachdem ob ein Rezeptor ausgehend von einer natürlichen Quelle (z.B. Enzyme, Antikörper, Zellen, Zellfragmente, Gewebeteile oder Nukleotide) verwendet wird, oder ob der verwendete Rezeptor synthetisch (z.B. Ionophore, Calixarene, Cyclodextrine, Kronenether) hergestellt wird [17, 18, 19, 21, 22]. Einen Streitfall könnten unter anderem DNA-Sensoren darstellen, da die als Rezeptoren verwendeten Polynukleotide auch rein synthetisch hergestellt werden könnten. Im Allgemeinen werden diese jedoch zu den Biosensoren gezählt. Weiters kann man diese Klassifizierung basierend auf der Art des verwendeten Rezeptors noch genauer unterteilen, wenn man die Art des Rezeptors eine Ebene tiefer betrachtet (z.B. DNA-Sensoren, Enzym-Sensoren, Aptamer-Sensor usw.).

Eine weitere Klassifizierung von Chemo- und Biosensoren basiert auf dem Mechanismus des verwendeten Rezeptors bei der Wechselwirkung mit dem Analyten. Hier unterscheidet man

zwischen Affinitätssensoren und Metabolismussensoren [22, 28, 29]. Die Unterscheidung erfolgt je nachdem ob der Analyt während der Messung umgesetzt wird (z.B. bei enzymatischen Sensoren) oder ob es zu reversiblen Wechselwirkungen (Rezeptor-Analyt-Bindungen) zwischen Rezeptor und Analyt kommt (z.B. DNA-Sensoren). Im Fall von Metabolismussensoren kommt es aufgrund der Verbrauchsreaktion des Analyten zu einem Fließgleichgewicht, welches von der Diffusion des Analyten zum Sensor abhängig ist. Affinitätssensoren hingegen sind diffusionsunabhängig, da sich hier ein thermodynamisches Gleichgewicht aufgrund der Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Analyt einstellt.

Die vermutlich am weitest verbreitete Klassifizierung für Chemo- und Biosensoren beruht auf der Art des verwendeten Transduktors. Hier unterscheidet man die Sensoren nach dem grundlegenden physikalischen Prinzip des Transduktors und teilt diese in optische, elektrochemische, massensensitive, temperatursensitive und magnetische Transduktoren respektive Sensoren ein [17, 21, 30, 31]. Innerhalb dieser Unterteilung kommt es aufgrund der genauen Messprinzipien bzw. Messgrößen noch zu einer weiteren exakteren Einteilung der Transduktoren bzw. Sensoren. (z.B. Amperometrischer Sensor). *Tabelle 2* fasst die Klassifizierungen der Sensoren aufgrund ihrer Transduktoren zusammen (siehe *Tabelle 2*).

Neben den eben erwähnten Klassifizierungsarten könnte man die Sensoren noch nach der Art ihrer Herstellung bzw. ihrer Herstelltechnik klassifizieren z.B. Dickschichttechnik oder Dünnschichttechnik.

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass es aufgrund der Vielzahl an unterschiedlichen Möglichkeiten für den exakten Aufbau eines Sensors, mehrere solcher Klassifizierungen für Chemo- und Biosensoren gibt. Wie bereits erwähnt, kann man die unterschiedlichen Klassifizierungen auch miteinander kombinieren um genaue Informationen über den Sensoraufbau zu Verfügung zu haben (Beispiel: Der in dieser Arbeit verwendete Harnstoffsensor ist ein potentiometrischer Enzymsensor (Biosensor), gefertigt mittels Dickschichttechnik.)

Tabelle 2 - Transduktoren für Chemo- und Biosensoren. Quelle: Tabelle nach [17], [21] und [24].

Transduktorart	Messprinzip	Gemessene Eigenschaft	Anwendungsbeispiel
Elektrochemisch	Potentiometrie	Elektrodenpotential	ISE [17]
	Voltametrie	Stromstärke	Clark-Elektrode [17]
	Konduktometrie	Leitfähigkeit	Gassensoren [24]
	Feldeffekt	Potential an Feldeffekttransistor	CHEMFET, ISFET [21]
	Kapazitive Sensoren	Impedanz	Enzymsensoren [28]
Optisch	Lumineszenzmessung	Fluoreszenz	pO ₂ -Sensor [24]
		Phosphoreszenz	
		Chemolumineszenz	Immunsensoren [21]
		Biolumineszenz	Enzymsensoren [21]
	Reflektometrie	Veränderung des Absorptionsspektrums	Ionensensoren [24]
	Refraktometrie	Brechungsindex	Affinitätssensoren [24]
Massensensitiv	Resonanzfrequenzmessung	Resonanzfrequenz eines piezoelektrischen Kristalls	Gassensoren [17]
	SAW-Sensoren	Oberflächenschwingung	Immunsensoren [17]
Temperatursensitiv	Thermocouple	Änderung des Widerstands	Gassensoren [20]
	Pyroelektrischer Effekt	Spannungsdifferenz aufgrund von Ladungstrennung	
Magnetisch	Magnetoresistiver Effekt	Änderung des Widerstandes aufgrund eines Magnetfeldes	DNA-Sensoren [19]
	Hall-Effekt	Änderung der Spannung aufgrund eines Magnetfeldes	

2.5. Enzymsensoren

Eine Hauptfunktion von vielen Proteinen im Stoffwechsel biologischer Systeme ist die Katalyse von biochemischen Reaktionen, die unter physiologischen Bedingungen ohne ihr Zutun nicht, bzw. nur sehr sehr langsam ablaufen würden. Diese Proteine werden als Enzyme bezeichnet und besitzen in vielen Fällen prosthetische Gruppen. Enzyme katalysieren biochemische Reaktionen und erzeugen dabei oft Produkte oder verbrauchen Co-Substrate die analytisch leichter zugänglich sind als ihre Substrate. Dies und die hohe Substratspezifität bzw. Reaktionsspezifität macht sie zu interessanten Rezeptoren für Biosensoren. Bei der Verwendung solcher Enzyme als Rezeptor für Biosensoren ist ein umfassendes Verständnis der Enzymkinetik und der grundlegenden Umsetzungsmechanismen der Enzyme erforderlich [3, 21, 30].

2.5.1. Enzymkinetik

Enzyme katalysieren biochemische Reaktionen, indem sie die Einstellung des chemischen Gleichgewichts beschleunigen, ohne dieses dabei zu verändern. Diese Beschleunigung der Reaktion kommt aufgrund der Absenkung der Aktivierungsenergie (ΔG^\ddagger oder E_A) zustande. Während der ersten Phase einer chemischen Reaktion wird das Substrat so verändert (z.B. Änderung von Bindungswinkel, Bindungslängen etc.) dass dieses einen energetisch ungünstigen Übergangszustand einnimmt. Die Aktivierungsenergie ist jener Energiebetrag, der aufgebracht werden muss, um das Substrat in diesen Übergangszustand zu bringen und somit die chemische Reaktion in Gang zu setzen (siehe *Abbildung 3*). Enzyme sind in der Lage durch nicht-kovalente Wechselwirkungen mit dem Substrat diesen Übergangszustand so zu stabilisieren, dass die benötigte Aktivierungsenergie minimiert wird. Das Substrat bzw. die Substrate können somit um ein Vielfaches schneller in das Produkt bzw. die Produkte der Reaktion umgewandelt werden [3, 4, 21].

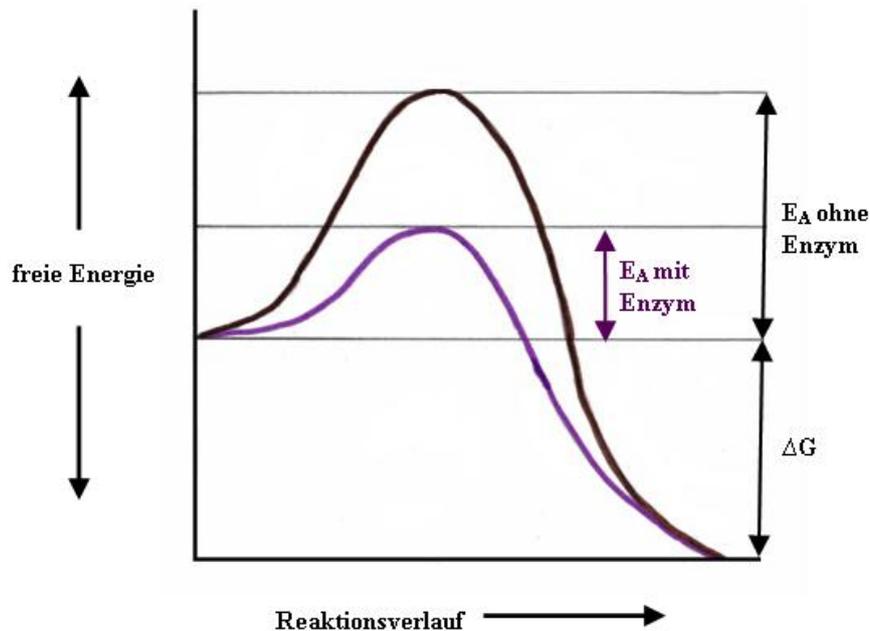


Abbildung 3 – Energieprofil einer chemischen Reaktion - Katalysiert vs. Unkatalysiert: Diese Abbildung zeigt Energieprofile von biochemischen Reaktionen die unkatalysiert (schwarz) bzw. durch ein Enzym katalysiert (lila) sind. Die benötigte Aktivierungsenergie ($= E_A$) der enzymatisch katalysierten Reaktion ist im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion um ein Vielfaches geringer. Quelle: Eigene Abbildung in Anlehnung an [4].

Die von L. Michaelis und M. Menten hergeleitete Michaelis-Menten-Theorie ist ein mathematisches Modell zur Beschreibung der Kinetik einer einfachen enzymatischen Umsetzung eines Substrates in ein Produkt. Zur Herleitung dieser Theorie nahmen die Beiden folgendes vereinfachtes Reaktionsschema an [3, 21, 32] (siehe Gleichung 1):



Gleichung 1 - Reaktionsschema nach Michaelis und Menten

Im ersten Schritt bindet das Substrat (= S) reversibel an das freie Enzym (= E) und bildet den Enzym-Substrat-Komplex (= ES). Im nächsten Schritt zerfällt dieser Enzym-Substrat-

Komplex in das gebildete Reaktionsprodukt (= P) und in das wieder freie Enzym. Dieser zweite Vorgang ist irreversibel, was in der Gleichung durch die Pfeilrichtung des zweiten Schrittes verdeutlicht wird. k^1 und k^{-1} im dargestellten Reaktionsschema sind die Geschwindigkeitskonstanten für den ersten Schritt der Reaktion (Bindung von S an E) respektive für den Zerfall des gebildeten Komplexes in seine Ausgangsstoffe (da diese Reaktion reversibel ist). k^2 entspricht der Geschwindigkeitskonstante für den zweiten Teilschritt der Reaktion vom Enzym-Substrat-Komplex zum Produkt.

Aufgrund dieses angenommenen Reaktionsschemas wurde mit Hilfe der zugehörigen Massenbilanzen und unter der Annahme eines Fließgleichgewichtes (ansonsten wäre das Gleichungssystem analytisch nicht zu lösen) die Michaelis-Menten-Gleichung (siehe Gleichung 2) abgeleitet [3, 21, 32].

$$v = \frac{v_{\max} * [S]}{K_m + [S]}$$

Gleichung 2 - Michaelis-Menten-Gleichung

In dieser Gleichung beschreibt v_{\max} die maximale Reaktionsgeschwindigkeit die nur bei extrem hohen Substratkonzentrationen (= [S]) bzw. sehr großem Substratüberschuss auftritt. In diesem Fall ist das Enzym mit Substrat gesättigt und liegt vollständig als Enzym-Substrat-Komplex vor. Der K_m -Wert ist jene Substratkonzentration die notwendig ist um die Hälfte der für die Reaktion vorhandenen Enzyme (= [E]) mit Substrat zu beladen und bestimmt somit auch die Substratkonzentration bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal ist. Der K_m -Wert ist ebenfalls ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat. Je kleiner der K_m -Wert ist, desto größer ist die Affinität des Enzyms zum jeweiligen Substrat [3, 21, 32]. Graphisch (Reaktionsgeschwindigkeit auf der Y-Achse und die Substratkonzentration auf der X-Achse) beschreibt die Michealis–Menten-Gleichung eine Hyperbel die sich asymptotisch an den Wert v_{\max} (Y-Achse) annähert. Die graphische Darstellung ist in *Abbildung 4* (siehe *Abbildung 4*) abgebildet.

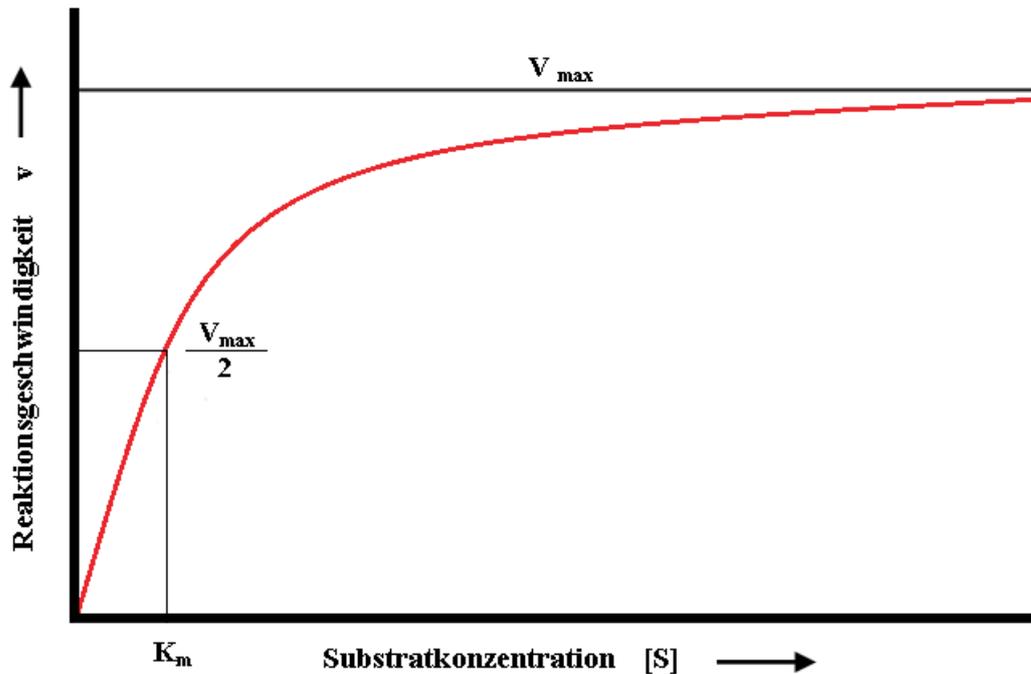


Abbildung 4 – Graphische Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik: Die Abbildung zeigt die graphische Darstellung der von Michaelis und Menten entwickelten Michaelis-Menten-Gleichung. Auf der X-Achse ist die Substratkonzentration ($= [S]$) und auf der Y-Achse die Reaktionsgeschwindigkeit ($= v$) aufgetragen. Die Reaktionsgeschwindigkeit nähert sich mit steigender Substratkonzentration in Form einer Hyperbel asymptotisch an die Maximalgeschwindigkeit ($= v_{max}$) an. K_m beschreibt jene Substratkonzentration bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal ist ($= v_{max}/2$). Quelle: Eigene Abbildung in Anlehnung an [32].

2.5.2. Limitierungen für den Einsatz von Enzymen in Biosensoren

In Bezug auf den Einsatz von Enzymen in Biosensoren ist es notwendig, dass ein Überschuss an Substrat vermieden wird, da ansonsten die Bildung der Produkte bei konstanter Enzymkonzentration nur von der Enzymaktivität abhängig wäre. Somit wären quantitative Analysen der Substratkonzentration nicht möglich da das Enzym bei einem Überschuss an Substrat nur jene Konzentration umsetzen kann, die notwendig ist um das Enzym abzusättigen [24]. In diesem Fall spricht man von einer Enzymlimitierung bzw. einer Aktivitätslimitierung des Sensors. Da es jedoch oft notwendig ist hohe Substratkonzentrationen mit Biosensoren zu messen, die Gesamtzymaktivität am Sensor

jedoch oft nicht unbegrenzt erhöht werden kann, werden oft Diffusionsbarrieren wie z.B. eine Celluloseacetat-Membran zwischen der Probe und der Enzymschicht installiert. Somit kann die Substratkonzentration im Sensor reduziert werden um eine Messung von hohen Substratkonzentrationen in der Probe zu ermöglichen. Für den Einsatz von Enzymen in Biosensoren gilt daher im Allgemeinen die „goldene Regel“, dass diese bei Substratkonzentrationen $< K_m$ betrieben werden sollten. Bei enzymatischen Biosensoren wird die Lebensdauer der Sensoren oft durch die Enzymstabilität (Denaturierung oder Auswaschung der Enzyme führt zu verminderter Enzymaktivität am Sensor) determiniert.

Ein wesentlicher Aspekt des Einsatzes von Enzymen als Rezeptoren für Biosensoren ist auch die Hemmung dieser durch Inhibitoren. Hierbei kann es zu einer kompetitiven, einer unkompetitiven oder einer gemischten Hemmung des Enzyms kommen. Darüber hinaus kann es noch zu irreversiblen Hemmungen der Enzyme kommen. Ein solcher Inhibitor wird dann als Inaktivator bezeichnet [3, 21].

Des Weiteren besitzen Enzyme Temperatur- sowie pH-Wert-Optima, bei denen sie die höchste Aktivität aufweisen bzw. Temperatur- sowie pH-Wert-Bereiche in denen sie für die Anwendung als Rezeptor in Biosensoren überhaupt ausreichend aktiv sind [4].

Einflüsse von Inhibitoren, sowie die Temperatur- und pH-Wert-Optima von Enzymen müssen bei der Entwicklung von enzymatischen Biosensoren in vielen Punkten, wie z.B. Einflüsse der Probenmatrix auf den Biosensor, berücksichtigt werden.

2.5.3. Immobilisierungsstrategien für den Einsatz von Enzymen in Biosensoren

Um eine ausreichende Lebensdauer eines enzymatischen Biosensors gewährleisten zu können, müssen die Enzyme so am Sensor immobilisiert werden, dass diese bei Verwendung des Sensors nicht ausgewaschen werden können (Ansonsten tritt Verlust der Enzymaktivität am Sensor auf (siehe 2.4.2. *Limitierungen für den Einsatz von Enzymen in Biosensoren*)). Weiters sollte die Immobilisierung der Enzyme die spezifischen Eigenschaften dieser wie z.B. Aktivität oder Selektivität nicht zu sehr beeinflussen. Zur Immobilisierung von Enzymen für den Einsatz in Biosensoren werden verschiedene Immobilisierungsstrategien angewendet, die sowohl einzeln, als auch in Kombination verwendet werden. Diese Strategien werden darüber hinaus auch für die Immobilisierung anderer Rezeptoren wie z.B. Antikörper verwendet [21, 24, 27, 30]:

- Die einfachste Möglichkeit zur Immobilisierung von Enzymen ist der Einschluss dieser hinter eine inerte Membran (*Abbildung 5 A*). Bei dieser Art der Immobilisierung behalten die verwendeten Enzyme ihre Aktivität und ihre Selektivität. Die Limitierung dieser Immobilisierungsvariante ist, dass die eingeschlossenen Enzyme größer als die Maschenweite der Membran sein müssen (um einen Einschluss zu erreichen), die Analyten hingegen deutlich kleiner, um durch die Membran diffundieren zu können.

- Eine weitere Möglichkeit Enzyme für den Einsatz in Biosensoren zu immobilisieren ist der Einschluss in polymere 3D-Matrizes (Einschluss durch sterische Behinderung) wie z.B. Polyacrylamid (*Abbildung 5 B*). Hierbei kommt es meist zu einer geringen Beeinflussung von Aktivität und Selektivität der Enzyme. Die Limitierung dieser Immobilisierung ist die Größe des zu detektierenden Analyten, da dieser klein genug sein muss, um durch die Polymermatrix zum Rezeptor diffundieren zu können. Zusätzlich zum Einschluss in die polymere 3D-Matrix kann das Enzym noch kovalent an diese Matrix gebunden werden (*Abbildung 5 C*). Dies kann größeren Einfluss auf die Selektivität sowie die Aktivität des Enzyms zu Folge haben, verhindert jedoch ein mögliches Auswaschen des Enzyms aus der polymeren 3D-Matrix.

- Eine andere Möglichkeit zur Immobilisierung von Enzymen in Biosensoren ist die Quervernetzung (*Abbildung 5 D*) dieser mit bifunktionellen Agenzien wie z.B. Glutardialdehyd. Hierbei kommt es meist zu einer starken Beeinflussung der Aktivität der verwendeten Enzyme, da diese bifunktionellen Agenzien meist unspezifische Quervernetzungen ausbilden und davon auch aktive Zentren der Enzyme betroffen sein können. Durch die Immobilisierung mittels Quervernetzung ist ein hoher Beladungsgrad mit Enzymen möglich, was jedoch auch zu Limitierungen der Diffusion des Analyten führen kann.

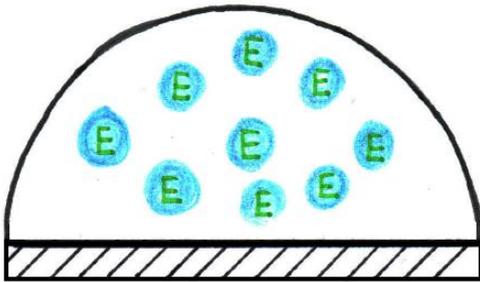
- Weiters kann man Enzyme durch physikalische Adsorption an Biosensoren immobilisieren (*Abbildung 5 E*). Hierbei kommt es zu Wechselwirkungen zwischen Enzym und Trägerfläche aufgrund von Van-der-Waals-Kräften, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbildung.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, Enzyme mit lipophilen Seitengruppen zu modifizieren, um einen Einbau in lipophile Matrizen, aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen zu ermöglichen. Diese Immobilisierungsmethoden sind in der Regel nur für Sensoren mit kurzer Lebensdauer oder für Versuchszwecke im Einsatz, da die Wechselwirkungen sehr schwach und anfällig für Änderungen des pH-Wertes, der Ionenstärke oder der Temperatur sind. Darüber hinaus kann es durch die physikalische Adsorption an den Träger zu starken Einflüssen auf die Aktivität der Enzyme kommen. Trotzdem ist dies eine gängige Strategie zur Immobilisierung, da keine Reagenzien bzw. zusätzliche Syntheseschritte benötigt werden.

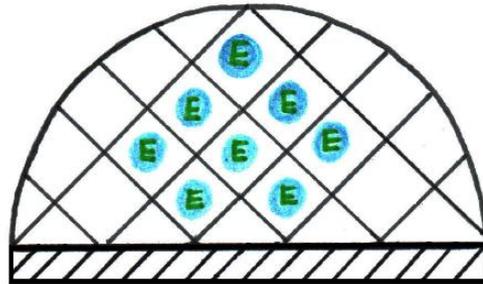
- Die stabilste Immobilisierung für Enzyme an Trägermaterialien für Biosensoren stellt die kovalente Bindung zwischen diesen beiden Komponenten dar (*Abbildung 5 F*). Dies geschieht durch verschiedene Kopplungssynthesen zwischen Enzym und Träger, was oft zu einem deutlichen Verlust an Aktivität führt. Des Weiteren ist die Beladung der Träger mit Enzymen bei dieser Immobilierungsstrategie stark begrenzt. Trotz des großen synthetischen Aufwandes ist diese Art der Immobilisierung sehr gebräuchlich, da die Sensoren eine hohe Langzeitstabilität aufweisen.

Allgemein kann man festhalten, dass es keine universelle Immobilierungsstrategie gibt, da alle Vor- und Nachteile besitzen und stark von der Anwendung des Biosensors, der zu immobilisierenden Komponente, der Trägerkomponente und dem Analyten abhängen. Somit muss die optimale Strategie für die Immobilisierung von Enzymen an einen Biosensor von Fall zu Fall experimentell bestimmt werden.

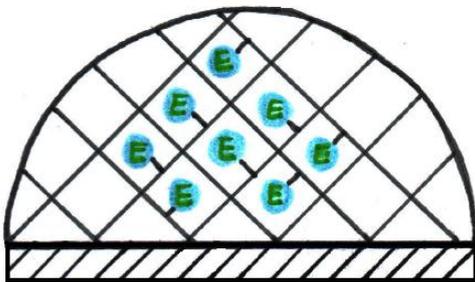
A)



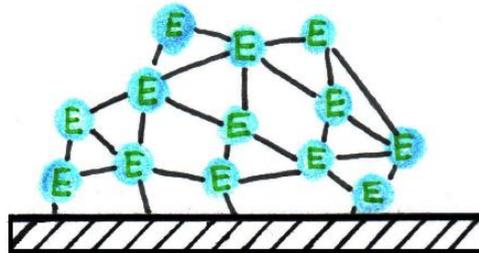
B)



C)



D)



E)



F)

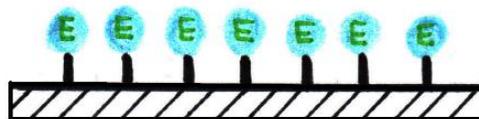


Abbildung 5 – Immobilisierungsstrategien für enzymatische Biosensoren: Diese Abbildung zeigt schematische Darstellungen von unterschiedlichen Strategien zur Immobilisierung von Enzymen an einen Sensorpot. **A)** zeigt den Einschluss der Enzyme hinter eine inerte Membran. **B)** zeigt den Einschluss der Enzyme in eine polymere 3D-Matrix. **C)** zeigt den Einschluss der Enzyme in eine polymere 3D-Matrix mit zusätzlicher kovalenter Bindung der Enzyme an die Matrix. **D)** zeigt die Immobilisierung der Enzyme mittels bifunktionellen Agenzien (z.B. Glutardialdehyd). **E)** zeigt die Immobilisierung der Enzyme durch physikalische Adsorption aufgrund von verschiedenen Wechselwirkungen (z.B. Dipol-Dipol-Wechselwirkungen). **F)** zeigt die Immobilisierung der Enzyme durch kovalente Bindungen an den Sensorpot. Quelle: Eigene Abbildung

2.5.4. Urease aus *Canavalia ensiformis*

Wie bereits erwähnt basiert der verwendete Biosensor zur Harnstoffbestimmung auf dem Enzym *Urease* aus *Canavalia ensiformis*. Im Jahr 1926 war diese *Urease* aus Jackbohnen (= *Canavalia ensiformis*) eines der ersten Enzyme überhaupt das erfolgreich kristallisiert werden konnte [33]. Für diesen Erfolg und weitere Experimente in der Proteinkristallographie wurde James Batcheller Sumner 1946 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

Die *Urease* aus *Canavalia ensiformis* ist ein Homohexamer (siehe *Abbildung 6*) bestehend aus sechs α -Untereinheiten (Hexamer α_6) und besitzt pro Untereinheit (α) zwei Nickel(II)atome im aktiven Zentrum. Die Untereinheit besteht aus 840 Aminosäuren und wiegt exklusive der Nickel(II)atome 90,77 kDa. Insgesamt wiegt die *Urease* (gesamtes Monohexamer) aus Jackbohnen inklusive der zwölf Nickel(II)atome 545,34 kDa [34].

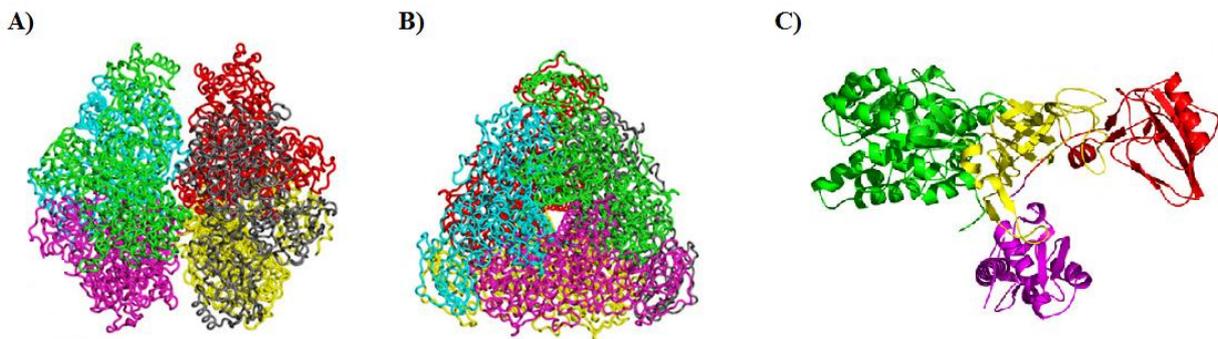


Abbildung 6 – Urease aus Canavalia ensiformis: A) zeigt eine schematische Darstellung des Urease-Homohexamers aus C. ensiformis. Das Homohexamer besteht aus 2 zusammengelagerten Trimeren. B) zeigt eine schematische Darstellung eines Homotrimers des Enzyms um 90° um die vertikale Bildebene gedreht (im Vergleich zu A)). C) zeigt eine im Vergleich zu A) und B) vergrößerte schematische Darstellung eines Monomers der Urease aus C. ensiformis. Quelle A), B) und C): Abbildung modifiziert aus [35].

Der Aufbau des aktiven Zentrums der *Ureasen* wurde anhand von *Ureasen* aus *Klebsiella aerogenes* und *Bacillus pasteurii* aufgeklärt. Das aktive Zentrum beinhaltet zwei Nickel(II)atome im Abstand von 3,5-3,7 Å. Die Nickel(II)atome sind durch eine gemeinsame Lysinseitenkette und zusätzliche Seitenketten komplexiert. Im Fall vom ersten Nickel(II)atom sind die zusätzlichen Seitenketten zwei Histidinseitenketten. Das zweite Nickel(II)atom wird, neben der gemeinsamen Lysinseitenkette, ebenfalls von zwei anderen Histidinseitenketten und einer zusätzlichen Aspartatseitenkette komplexiert (siehe *Abbildung 7*). Darüber hinaus

sind noch 3 Moleküle Wasser in der Tasche des aktiven Zentrums lokalisiert, die bei der Reaktion mit Harnstoff verdrängt werden. Diese Wassermoleküle W1-W3 (W1 ist bei Nickel(II)atom(1), W2 bei Nickel(II)atom(2) und W3 ist an der Öffnung des aktiven Zentrums lokalisiert) sind über Wasserstoffbrücken gebunden. Zusätzlich gibt es noch eine mobile Klappe (bestehend aus mehreren Aminosäureseitenketten) die zwar nicht direkt an der katalytischen Aktivität im aktiven Zentrum beteiligt ist, jedoch für die Bindung des Harnstoffs an das aktive Zentrum eine wichtige Rolle spielt [34].

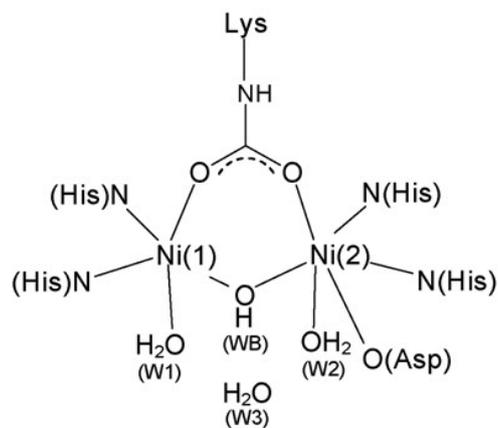
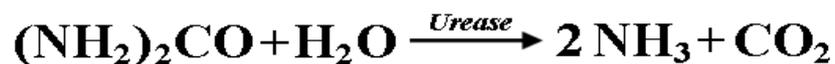


Abbildung 7 – Aufbau des aktiven Zentrums der Urease: Diese Abbildung zeigt das aktive Zentrum der Urease mit den zwei komplexierten Ni-Atomen, sowie den drei Wassermolekülen. Quelle: Abbildung übernommen aus [34].

Die *Urease* gehört zu der Enzymklasse der Hydrolasen und katalysiert folgende Reaktion (siehe Gleichung 3):



Gleichung 3 - Reaktionsgleichung der Harnstoffhydrolyse mit Urease

Im ersten Schritt der Reaktion wird der Harnstoff in Ammoniumcarbamat, dem Salz der Carbaminsäure umgewandelt. Das gebildete Ammoniumcarbamat zerfällt dann spontan durch den Einfluss von Wasser zuerst in Carbaminsäure und Ammoniak und im letzten Schritt weiter in insgesamt zwei Moleküle Ammoniak und ein Molekül Kohlenstoffdioxid. Ammoniak und Kohlenstoffdioxid liegen in wässriger Lösung und bei physiologischen pH-Wert (bei dem der Harnstoffsensor betrieben wird) als Ammonium- bzw. Hydrogencarbonationen vor [36].

Der genaue Reaktionsmechanismus der Harnstoffhydrolyse mit dem Enzym Urease ist noch nicht restlos geklärt. Es gibt mehrere teilweise kontroverse Schemata des Mechanismus. Im Allgemeinen bindet der Harnstoff über den Sauerstoff des Carbonylteiles an das erste Nickel(II)atom im aktiven Zentrum. Dadurch wird der Carbonylteil des Harnstoffmoleküls elektronegativer und zugänglich für einen nukleophilen Angriff. Der Mechanismus des folgenden nukleophilen Angriffs ist jener Punkt, in dem sich die unterschiedlichen Schemata des Reaktionsmechanismus scheiden. Das erste Schema beschreibt eine weitere Bindung eines der beiden Stickstoffatome des Harnstoffes an das zweite Nickel(II)atom. Aufgrund von dieser Bindung soll unter Einfluss von einem Molekül Wasser der nukleophile Angriff auf den Kohlenstoff des Carbonylteils stattfinden und so das Ammoniumcarbamat gebildet werden. Der nukleophile Angriff erfolgt hier durch ein, durch Brückenbindung lokalisiertes Hydroxidion, das als Donator fungiert. Ein anderes Schema schließt die Bindung eines der beiden Stickstoffatome des Harnstoffes an das zweite Nickel(II)atom aus. Hier liefert das zweite Nickel(II)atom das an diesem lokalisierte Wassermolekül (W2) für den nukleophile Angriff. Dies erfolgt mit Hilfe einer Histidinseitenkette aus der mobilen Klappe [34].

2.6. Harnstoffsensoren

In den späten 1960er Jahren waren es George G. Guilbaut und Joseph G. Montalvo Jr. die den ersten enzymatischen Biosensor (auf Basis des Enzyms *Urease*) für die Bestimmung von Harnstoff in Körperflüssigkeiten entwickelten [37]. Sie verwendeten hierfür eine kationenselektive Glaselektrode für die Detektion der durch die Harnstoffhydrolyse gebildeten Ammoniumionen als Transduktor. In den darauf folgenden Jahren wurden von der selben Arbeitsgruppe um George G. Guilbaut einige Weiterentwicklungen dieses ersten Harnstoffsensors mit verschiedenen Transduktoren publiziert [38]. Bis heute gab es unzählige weitere Ansätze für die Entwicklung neuer Biosensoren zur Harnstoffbestimmung für unterschiedliche Probenmatrizes. Hierbei wurden insbesondere verschiedene

elektrochemische [39, 40, 41, 42,43], optische [44, 45, 46], als auch thermosensitive [47, 48, 49] Transduktorsysteme verwendet. Für die Immobilisierung der Enzyme am Sensor wurden ebenfalls unterschiedliche Strategien verfolgt [50]. Heutzutage werden diese neu entwickelten Harnstoffsensoren in den Gebieten der Lebensmittelüberwachung [51, 52, 53], der Diagnostik [2, 54, 55], der Prozesskontrolle [56, 57, 58] und dem Umweltmonitoring [59, 60, 61] eingesetzt.

Aufgrund der Enzymreaktion der *Urease* (siehe *Gleichung 3*) werden im Allgemeinen vier Parameter analytisch zugänglich gemacht. Diese Parameter sind die CO₂-Konzentration, die Ammoniakkonzentration, die Ammoniumionenkonzentration und die Änderung des pH-Wertes aufgrund der Enzymreaktion. Neben anderen Transduktorsystemen werden diese vier Parameter vor allem mit verschiedenen potentiometrischen Elektrodensystemen gemessen. In der Fachliteratur findet man Beispiele für enzymatische Harnstoffsensoren mit einer potentiometrischen CO₂-Gaselektrode, einer potentiometrischen Ammoniak-Gaselektrode, einer potentiometrischen Ammoniumionen-Selektiven-Elektrode, und einer potentiometrischen pH-Elektrode [21, 30, 38, 50].

Die unterschiedlichen Elektrodensysteme haben, je nach Einsatzgebiet (Messbereich, Probenmatrix, Anforderungen an Lebensdauer etc.) verschiedene Vor- und Nachteile. So zeigen zum Beispiel Ammoniumionen-Selektive-Elektroden oft elektrochemische Interferenzen gegenüber anderer Kationen wie z.B. Kaliumionen, was sie nur begrenzt einsetzbar für Probenmatrizes mit hohen Kationenkonzentrationen macht. Die großen Vorteile dieser Elektroden sind kurze Ansprechzeiten und große Messbereiche die sie erfassen können. Potentiometrische pH-Elektroden haben den großen Nachteil der Abhängigkeit vom Puffersystem und dem pH-Wert der Probe. Darüber hinaus haben sie eher geringe Messbereiche, längere Ansprechzeiten und benötigen die Immobilisierung von großen Mengen an Enzym am Sensor. Der Vorteil von potentiometrischen Gaselektroden ist der große Messbereich den sie erfassen können und die hohe Spezifität. Des Weiteren benötigen sie nur geringe Mengen an immobilisiertem Enzym. Der größte Nachteil besteht hierbei in der Abhängigkeit der Gasgleichgewichte zwischen der wässrigen und der Gasphase des Sensors, vom pH-Wert und der Pufferkapazität der Probe. Darüber hinaus sind solche Sensoren häufig anfällig für Interferenzen mit anderen sauren bzw. basischen Gasen [21, 30].

2.7. AVL/Roche-Harnstoff-Sensor

Der im Zuge dieser Diplomarbeit verwendete enzymatische Biosensor (auf Basis des Enzyms *Urease* bzw. *Urea Aminohydrolase* EC 3.5.1.5 aus *Canavalia ensiformis*) zur Bestimmung der Harnstoffkonzentration in humanbiologischen Proben ist ein potentiometrischer Biosensor mit einer Ammoniumionen-Selektiven-Elektrode (mit einer Cl-Referenzelektrode (= Elektrode 2. Art)) als Transduktor. Eine genaue Beschreibung der grundlegenden Mechanismen sowie des Aufbaues des Sensors folgt in den kommenden Unterpunkten.

2.7.1. Ionenselektive Potentiometrie

Wie der Name schon sagt werden in der ionenselektiven Potentiometrie elektrochemische Potentiale gemessen, wobei hier nur ein sehr geringer Strom fließt. Es wird hierbei keine externe Spannung angelegt. Es werden Potentialdifferenzen bestimmt, die sich aufgrund von Ladungstrennungen an den Phasengrenzen zwischen einer ionenselektiven Messelektrode bzw. der Bezugslektrode und der Probelösung (in Abhängigkeit der Aktivität der zu bestimmenden Ionenspezies) ausbilden. Die Potentiale in dieser elektrochemischen Zelle entstehen durch Phasenübergänge von Ladungsträgern (von der Probenlösung in die Elektrode oder umgekehrt / je nach Konzentrationsgradienten) die bei ionenselektiven Elektroden zu einer Aufladung der Phasengrenze führt und messbar sind. Mit Hilfe der Nernst-Gleichung (siehe *Gleichung 4*) kann der Zusammenhang zwischen der Aktivität der zu bestimmenden Ionenspezies in der Probe und dem gemessenen Potential hergestellt werden. Durch die Erweiterung der Nernst-Gleichung von Nikolski und Eisenman (siehe *Gleichung 5*), kann dieser Zusammenhang auch unter dem Einfluss störender Faktoren wie z.B. unter dem Einfluss interferierender Ionenspezies bestimmt werden [21, 31].

$$E = E^\circ + \frac{RT}{z_i F} \ln(a_i)$$

E	Elektrodenpotential
E[°]	Standardelektrodenpotential
R	molare Gaskonstante = 8,31447 J mol ⁻¹ K ⁻¹
T	absolute Temperatur (in Kelvin)
z_i	Anzahl der übertragenen Ladungen
F	Faraday-Konstante = 96485,34 J V ⁻¹ mol ⁻¹
a_i	Aktivität der Ionenspezies

Gleichung 4 - Nernstgleichung

$$E = E^\circ + \frac{RT}{z_i F} \ln(a_i + K_{ij}^{\text{pot}} a_j^{z_i/z_j})$$

E	Elektrodenpotential
E[°]	Standardelektrodenpotential
R	molare Gaskonstante = 8,31447 J mol ⁻¹ K ⁻¹
T	absolute Temperatur (in Kelvin)
z_i	Anzahl der übertragenen Ladungen (Ionenspezies)
z_j	Anzahl der übertragenen Ladungen (interferierende Ionenspezies)
F	Faraday-Konstante = 96485,34 J V ⁻¹ mol ⁻¹
a_i	Aktivität der Ionenspezies
a_j	Aktivität der interferierenden Ionenspezies
K_{ij}^{pot}	potentiometrischer Selektivitätskoeffizient

Gleichung 5 - Nikolski-Eisenman Gleichung

2.7.2. Beschreibung des verwendeten Sensors

Der in dieser Arbeit verwendete Sensor ist ein planares Messsystem das mittels Siebdruck- (Dickschichttechnik) und Dispensierverfahren hergestellt wird. Der Sensor setzt sich zusammen aus einer Ammoniumionen-Selektive-Elektrode auf PVC/Nonactin-Basis und einer weiteren solchen Elektrode auf der zusätzlich das Enzym *Urease* immobilisiert ist. Des Weiteren besteht der Sensor aus einer Kaliumionen-Selektiven-Elektrode auf PVC/Valinomycin-Basis. Zusätzlich zu diesen drei, für die Diplomarbeit verwendeten, Elektroden des Sensors, befinden sich noch weitere Sensorspots zur Glukose, sowie Laktatmessung auf diesem. Als Referenzelektrode für die potentiometrische Messanordnung wird eine konventionelle Cl-Elektrode in einem KCl-Messkanal verwendet (siehe *Abbildung 8*) [1, 2].

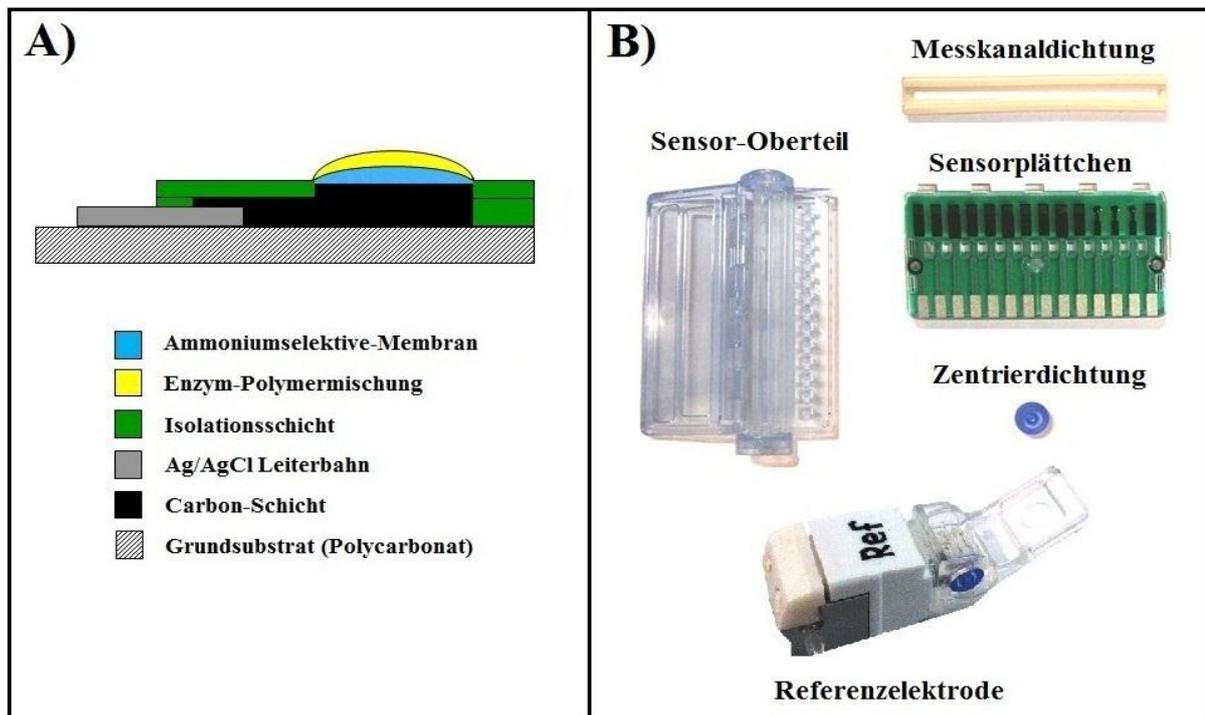


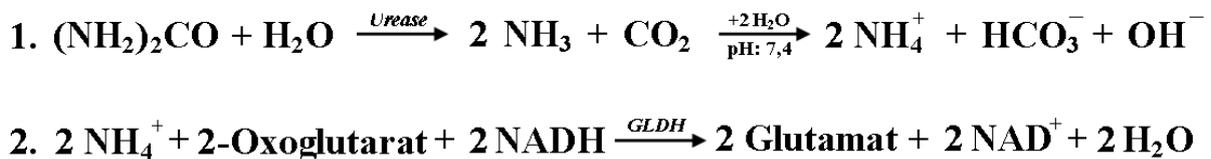
Abbildung 8 – Aufbau des verwendeten Harnstoffsensors: **A)** zeigt den Aufbau des verwendeten Harnstoffsensors im Querschnitt. Hier sind die einzelnen Schichten des Sensors (hergestellt durch Dickschichttechnologie) erkennbar. **B)** zeigt die einzelnen Bestandteile des Sensors (Sensor-Oberteil, Messkanaldichtung, Sensorplättchen und Zentrierdichtung), sowie die verwendete Referenzelektrode. Quelle: Eigene Abbildung.

Da in Vollblut und in Plasma die natürliche Ammoniumionenkonzentration unter „normalen“ physiologischen Umständen sehr gering ist (ca. 10-50 μM) [6], kann man die, durch die Ureasereaktion gebildeten Ammoniumionen mit Hilfe von Ammoniumionen-Selektiven-Elektroden, bestimmen und auf die Harnstoffkonzentration zurückführen (Messung der natürlichen Ammoniumionenkonzentration mit der nativen Ammoniumionen-Selektiven-Elektrode gegen die durch die Harnstoffhydrolyse entstandene Ammoniumionenkonzentration mit jener Ammoniumionen-Selektiven-Elektrode auf der *Urease* immobilisiert ist) Die Kaliumionen-Selektive-Elektrode wird benötigt, da diese Ammoniumionen-Selektiven-Elektroden nur um ca. Faktor 10 selektiver auf Ammoniumionen gegenüber Kaliumionen sind. Diese Kaliuminterferenz der Ammoniumionen-Selektiven-Elektroden kann durch die Bestimmung der Kaliumionenkonzentration der Probe mit Hilfe dieser zusätzlichen Kaliumionen-Selektiven-Elektrode bei der Berechnung der Messergebnisse berücksichtigt werden [1, 2].

2.7.3. Alternative Methoden zur Harnstoffbestimmung

Eine Alternative zur Harnstoffbestimmung mit Biosensoren stellen optisch-enzymatische Tests dar. Hier sind Tests basierend auf dem Urease-GLDH-Test (gekoppelter enzymatischer UV-Test) und basierend auf dem Urease-Berthelot-Test (enzymatischer Farbttest) als wichtigste Vertreter zu erwähnen. Diese zwei verschiedene Testprinzipien wurden vielfach weiterentwickelt, adaptiert und in der Diagnostik eingesetzt [62, 63].

Der Urease-GLDH-Test beruht auf dem NADH abhängigen gekoppelten Enzymtest mit den Enzymen *Urease* und *Glutamat Dehydrogenase* [64]. Hier wird in der ersten Reaktion der Harnstoff mit Hilfe der *Urease* zu Ammoniumionen und Hydrogencarbonationen hydrolysiert und in der Folgereaktion 2-Oxoglutarat (= α -Ketoglutarat) und die gebildeten Ammoniumionen mit dem Enzym *Glutamat Dehydrogenase* (= *GLDH*) und dem Cofaktor NADH zu L-Glutamat, Wasser und NAD^+ umgesetzt (siehe Gleichung 6). Die Abnahme von NADH kann photometrisch bei 340 nm verfolgt werden. Da die Harnstoffkonzentration bei konstanter *Urease*-Aktivität und einem Überschuss an NADH und *Glutamat Dehydrogenase* proportional der Abnahme von NADH ist kann somit die Harnstoffkonzentration bestimmt werden.



Gleichung 6 - Gleichungen gekoppelter enzymatischer Test

Beim Urease-Berthelot-Test wird Harnstoff zuerst durch das Enzym *Urease* zu Ammoniumionen und Hydrogencarbonationen umgesetzt. Die gebildeten Ammoniumionen reagieren dann in alkalischer Lösung mit Hypochlorit zu Chloramin. Dieses wird anschließend mit Phenol zu Indophenol umgesetzt. Indophenol kann photometrisch bei 530 und 570 nm detektiert und somit die Harnstoffkonzentration über den Umsatz von Harnstoff zu Indophenol bestimmt werden [65]. Diese Bestimmungsmethode wurde unter anderem von Fawcett und Scott 1960 [66] und 1962 von Chaney und Marbach weiterentwickelt [67].

Neben den bereits erwähnten Methoden zur Bestimmung der Harnstoffkonzentration in biologischen Flüssigkeiten gibt es noch weitere Verfahren, wie z.B. die Methode nach Gentzkow [68] oder eine Methode die die Harnstoffkonzentration mittels Kernspinresonanz ermittelt [69]. Diese und weitere Methoden sind in der Diagnostik jedoch nicht etabliert.

3. Methoden und Material

3.1. Sensorherstellung

Die Sensorherstellung besteht im Allgemeinen aus den beiden Teilen „Siebdruck“ und „Dispensieren“. Beim Siebdruck werden die einzelnen Sensorschichten mittels Siebdrucktechnik auf den Sensor aufgebracht [70]. Hierfür werden die jeweiligen Komponenten der einzelnen Schichten vermengt und zu einer siebdruckfähigen Paste homogenisiert. Danach werden diese Pasten einzeln auf unterschiedliche Siebe aufgetragen und die Sensorschichten in definierten Arbeitsschritten siebgedruckt. Dies geschieht mit Hilfe eines Rakels, das die Pasten durch die Maschen der Siebe auf ein Kunststoffplättchen (= Basis bzw. Unterteil der Sensoren) bzw. auf die vorherige Sensorschicht drückt (siehe *Abbildung 9*).

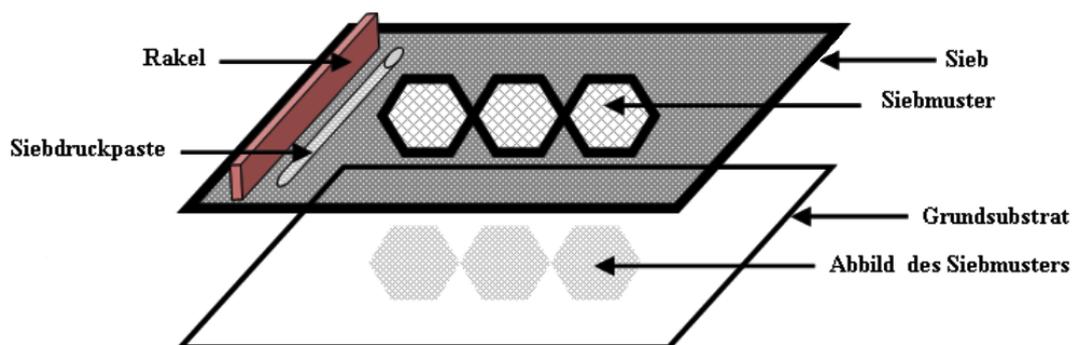


Abbildung 9 – Schema eines Siebdruckschrittes: Diese Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines Siebdruckes. Hierbei wird die Siebdruckpaste mit Hilfe des Rakels über das Sieb gestrichen. Diese wird dadurch durch das Siebmuster auf das Grundsubstrat gedrückt und hinterlässt dort ein Abbild des Siebmusters. Quelle: Eigene Abbildung.

Nach dem Siebdruck werden die ionenselektiven Membranen sowie das Enzym-Polymergemisch und optional Deckmembranen durch ein Dispensierverfahren auf die Elektrodenspots des Sensors aufgebracht. Hierfür werden zuerst sämtliche Komponenten der zu dispensierenden Flüssigkeit gemischt und dann in eine Spritze (ohne Kolben) gefüllt. Diese Spritze besitzt eine Nadel mit definiertem Durchmesser und wird an ein

Druckluftsystem angeschlossen. Für das Aufbringen der Membranen bzw. der Enzymlösung wird nun Druck angelegt und die Lösung somit durch die Nadel gedrückt (siehe *Abbildung 10*). Das aufzubringende Volumen der Dispensierlösungen kann durch Variation der Nadelgeometrie oder durch Variation des angelegten Drucks verändert werden.

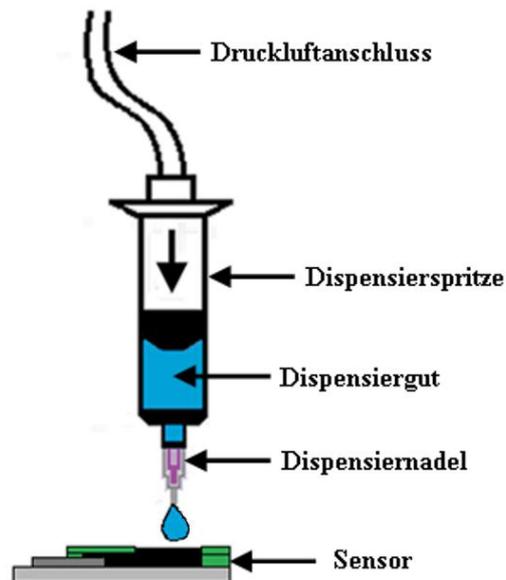


Abbildung 10 – Schema des Dispensierapparates: Diese Abbildung zeigt den schematischen Aufbau des verwendeten Dispensierapparates, bestehend aus der Dispensierspritze an der ein Druckluftsystem, sowie eine Nadel angeschlossen sind. Quelle: Eigene Abbildung.

Im den folgenden Punkten werden die beiden Teile „Siebdruck“ und „Dispensieren“ der Sensorherstellung des Harnstoffsensors genauer erläutert.

3.1.1. Siebdruck

Beim Siebdrucken werden auf das Grundsubstrat (= Polycarbonat-Plättchen) zuerst die Ableitbahnen, unter Verwendung einer Ag/AgCl – Paste, gedruckt. Diese Ag/AgCl – Bahnen dienen zur Ableitung des gebildeten elektrischen Signals zu den Kontakten des Messsystems. Nach jedem Druckschritt müssen die aufgetragenen Schichten bei definierten Temperaturen und für definierte Zeiten getrocknet werden.

Auf die Ag/AgCl – Ableitungen werden im folgenden Schritt Carbonabdeckungen aufgedruckt und wiederum getrocknet. Diese Carbonabdeckungen, bestehend aus einem Carbon-Polymergemisch der Firma Acheson (Electrodag-423SS), dienen als Festkontakt für die Elektroden.

Zuletzt werden hintereinander zwei Isolationsschichten, bestehend aus Isolierlack auf Basis von Epoxidharzen (Trocknung der ersten Schicht vor Druck der zweiten Schicht, anschließend Trocknung der zweiten Schicht) über den Großteil des Sensors gedruckt. Einzig die Bereiche der aktiven Komponenten im Bereich des Probenkanals und im Bereich der Kontakte zum Messsystem werden bei diesen Druckschritten ausgespart. Diese Schichten dienen der elektrischen Isolierung des Sensors um Kurzschlüsse im Messsystem zu vermeiden.

Im Allgemeinen wird das Prinzip des Siebdruckes des verwendeten Harnstoffsensors, sowie dessen Schichten, in folgendem Patent beschrieben [71].

3.1.2. *Dispensieren*

Für das Dispensieren der ionenselektiven Membranen bzw. der Enzymlösung müssen zuerst die zu dispensierenden Flüssigkeiten hergestellt werden. Bei der Herstellung der ammoniumionenselektiven (Rezeptur nach [72]) und der kaliumionenselektiven Membranflüssigkeiten (Rezeptur nach [73]) werden die einzelnen Bestandteile in ein Glasfläschchen eingewogen. Die beiden Ansätze der Membranflüssigkeiten werden danach für mindestens 16 Stunden (maximal 24 Stunden) auf einem Laborschüttler mit 1400 U/min homogenisiert.

Zum Dispensieren der fertigen Membranflüssigkeit wird je 1 ml der Membranansätze in eine 3 ml Kunststoffspritze ohne Kolben gefüllt (blasenfrei). Diese Spritze wird mit einer Nadel (Innendurchmesser = 0,25 mm) versehen und an das Druckluftsystem angeschlossen. Zu Beginn des Dispensierens wird die Dosiervorrichtung auf Dauerbetrieb eingestellt und ca. 0,25 ml Membranflüssigkeit ausgestoßen und verworfen. Danach werden die Parameter des Dosiersystems auf 2,0 bar Druck und 0,02-0,120 Sekunden Dispensierzeit eingestellt und ca. je 100 nl der ammoniumionenselektiven Membranflüssigkeit bzw. der kaliumionenselektiven Membranflüssigkeit auf die jeweiligen Sensorspots dispensiert (siehe *Abbildung 8*).

Das Aufbringen der Membranflüssigkeiten auf die Sensoren geschieht per Hand. Es ist darauf zu achten, dass der Abstand zwischen Nadel und Sensor ca. 0,1 mm beträgt und der an der Nadelspitze gebildete Tropfen mit der Carbonpaste in Berührung kommt. Der aufgebrauchte

Tropfen sollte den gesamten Carbonspot abdecken um einen funktionsfähigen Sensor zu gewährleisten (siehe *Abbildung 11*).



Abbildung 11 – Dispensieren der Kalium- bzw. Ammoniummembran: Diese Abbildung zeigt schematisch die Position einer optimal dispensierten bzw. einer schlecht dispensierten ionenselektiven Membran auf dem Elektrodenspot. Quelle: Eigene Abbildung.

Nach einer Wartezeit (Lagerung bei Raumtemperatur) von mindestens einem Tag nach dem Dispensieren der ammoniumionenselektiven Membranflüssigkeit wird die Enzymlösung für das Dispensieren des Urease-Enzymspots (Rezeptur nach [72]) hergestellt.

Die fertige Enzymlösung ist unmittelbar nach der Herstellung in eine 3 ml Spritze einzufüllen. Diese Spritze wird dann mit einer Nadel (Innendurchmesser = 0,15 mm) versehen und an das Druckluftsystem angeschlossen. Dann wird die Mischung mit 0,2 bar Druck und 0,02 – 0,06 Sekunden Dosierzeit dispensiert.

Das Aufbringen der Enzymlösung auf die Sensoren geschieht wiederum per Hand. Es ist darauf zu Achten, dass der Abstand zwischen Nadel und Sensor ca. 0,1 mm beträgt und der an der Nadelspitze gebildete Tropfen mit der ammoniumionenselektiven Membran in Berührung kommt. Der aufgebraute Tropfen sollte den gesamten Graphitspot, sowie die ammoniumionenselektive Membran abdecken um einen funktionsfähigen Sensor zu gewährleisten (siehe *Abbildung 12*).

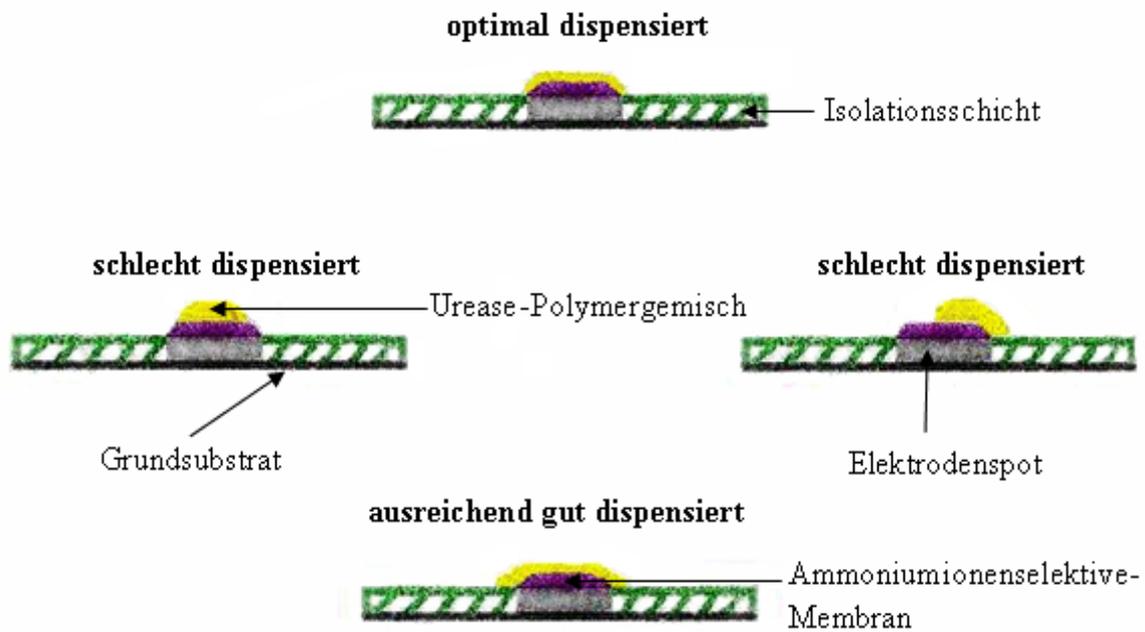


Abbildung 12 – Dispensieren des Urease-Polymergemisches: Diese Abbildung zeigt schematisch die Position von optimal dispensierten, ausreichend gut dispensierten bzw. schlecht dispensierten Urea-Polymergemischtropfen auf der ammoniumionenselektiven Membran des Sensorspots. Quelle: Eigene Abbildung.

Nach Aufbringen der Enzymlösung werden die Sensoren für mindestens zwei Wochen bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend optisch kontrolliert und selektiert. Nach der Trocknungszeit werden diese noch mit einem Oberteil versehen und sind danach für den Einsatz in den Experimenten bereit (siehe *Abbildung 8*).

Um die Zuordnung einzelner Sensoren zu einem Fertigungsprozesszyklus durchführen zu können, wird in der Sensorherstellung die kleinste gemeinsam (in Hinblick auf Fertigungsbedingungen, Fertigungsmaterial und Fertigungszeitpunkt) gefertigte Anzahl an Sensoren als eine Charge bzw. ein Los angesehen. Die jeweilige Losnummer fließt in Folge in die Bezeichnung des Sensors ein. Des Weiteren werden die Sensoren eines Loses fortlaufend nummeriert. So ist z.B. ein Sensor mit der Bezeichnung #100-01 der erste Sensor aus dem Fertigungsprozesszyklus Nummer 100 (= Los 100).

3.2. Kalibrationen und Messungen in Messständen

Die bereits beschriebenen enzymatischen Biosensoren zur Harnstoffbestimmung wurden zur Beurteilung der Sensoreigenschaften (Lebensdauer, Messgenauigkeit, Signalwiederfindung usw.) in so genannte MSS-3-fach-Messstände (MSS = Metabolit-Sensitive-Sensoren) eingebaut, kalibriert und vermessen. Diese Messstände sind für die amperometrische Messung von Glukose- und Laktatsensoren (inklusive Interferenzmessung) und für die potentiometrische Messung von Harnstoff-, Kalium- und Ammonium-Sensoren entwickelt worden. Das Programm für die Bedienung der Messstände und die Datengenerierung wurde in „Delphi“ geschrieben, wobei die Ausgabe der Daten in „MS-Excel“ erfolgt. In die Software dieser Messstände ist ein variables Kalibrationsmodell (Änderungen der Konzentrationen in Kalibrationslösungen kann eingetragen werden) inklusive Messwertberechnung integriert. Darüber hinaus lassen sie sich auf unterschiedliche Betriebstemperaturen einstellen. Die verwendeten Messstände basieren auf den von Michael Tomberger im Zuge seiner Diplomarbeit [74] entwickelten 3-fach-Messständen.

3.2.1. Aufbau der Messstände

Die Messstände bestehen prinzipiell aus einer Einheit zur Probenaufgabe, den drei unabhängigen Messkanälen und einem Abfallbehälter wo sämtliche Flüssigkeiten aufgefangen werden. Die Einheit zur Probenaufgabe umfasst ein „Turn und Dock System“ mit vier Anschlüssen für Kalibrationslösungen („Cal 1-4“) und einem Anschluss für die Betriebslösung (auch „Standby“ = Waschlösung, als auch Bezugspunktlösung für die Potentiometrie). Des Weiteren besteht die Einheit zur Probenaufgabe aus einem Einfüllmund an dem das „Turn-und-Dock-System“ anschließt und auch externe Proben z.B. Humanblut andockt werden können. Nach dem Einfüllmund verteilt ein so genannter Einfüllverteiler die Proben auf drei Messkanäle. Die drei Messkanäle bestehen jeweils aus einem Sample-Sensor (= optischer Probendetektor), einer Messkammer mit integrierter Referenzelektrode, einem Bypass, einer Peristaltikpumpe, einem Behälter mit Referenzlösung (= KCl) und 3 Magnetventilen für die Steuerung der Probenflüsse.

Eine genaue Beschreibung der Messstände findet man in der Diplomarbeit [74]. Insgesamt standen 4 Messstände (Bezeichnet als „MSS 1-4“) für die Beurteilung der Sensoreigenschaften zu Verfügung. Der Aufbau dieser Messstände wird in folgender Abbildung dargestellt (siehe *Abbildung 13*):

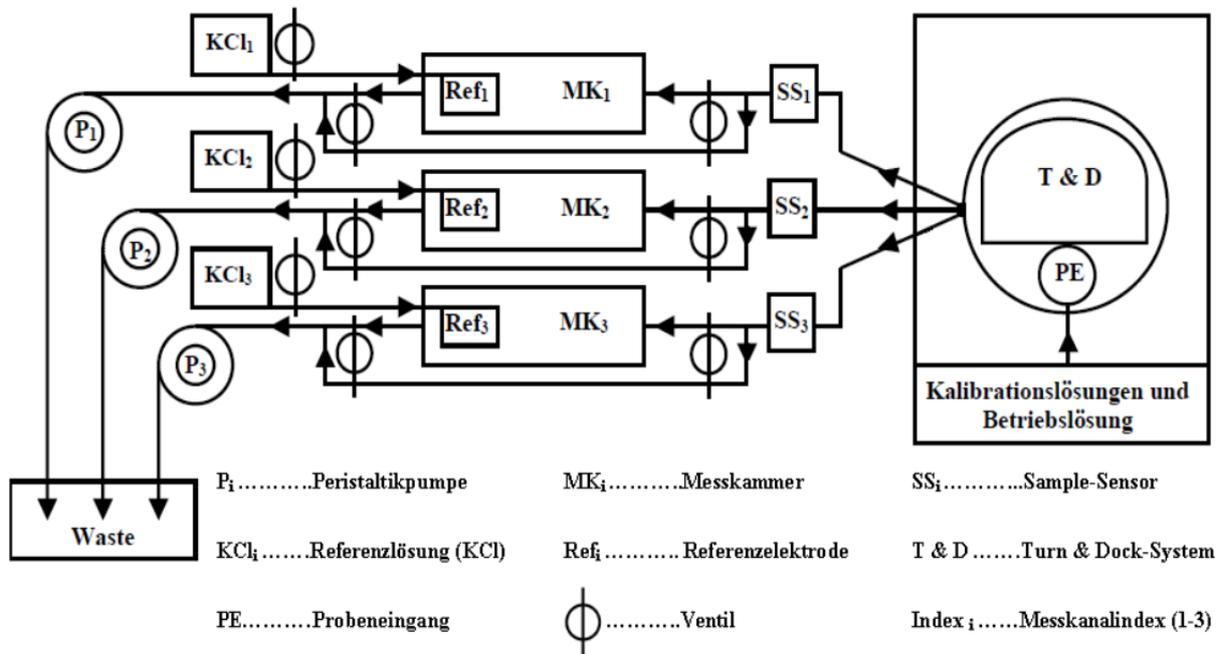


Abbildung 13 – Aufbau der verwendeten Messstände: Diese Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der verwendeten Messstände. Die Proben bzw. die verwendeten Reagenzien (gekoppelt über das Trun-und-Dock-System (= T&D)) kommen über den Probeneingang (= PE) zum Einfüllverteiler. Von dort werden die Flüssigkeiten in die einzelnen Messkanäle aufgeteilt und anschließend im Waste gesammelt. Quelle: Eigene Abbildung in Anlehnung an [74].

3.2.2. Fluidische Abläufe und Datenerfassung der Messstände

Für jede der drei Messkammern gibt es je zwei Datenbanken. Die erste Datenbank dient der Sicherung von Kalibrationsdaten, die zweite dient zum Speichern von Messdaten. Tatsächlich gespeichert werden jedoch nicht alle gemessenen Rohwerte, sondern nur berechnete Mittelwerte (= Absolutwert) zu definierten Zeitpunkten. Die Mittelwerte ergeben sich aus zu definierten Zeitpunkten vier aufeinander folgenden gemessenen Rohwerten. Solche Mittelwerte werden bei Kalibrationen als auch bei Messungen jeweils vor einer Probelösung (wenn Messkammer noch mit der Bezugspunktslösung für die Potentiometrie befüllt ist), während der Messung der eigentlichen Probelösung und nach der Messung der Probelösung ermittelt (wenn Messkammer wieder mit der Bezugspunktslösung befüllt ist) [74]. Die fluidischen Abläufe und die Datenerfassungspunkte einer Kalibration werden in folgender Abbildung dargestellt (siehe *Abbildung 14*):

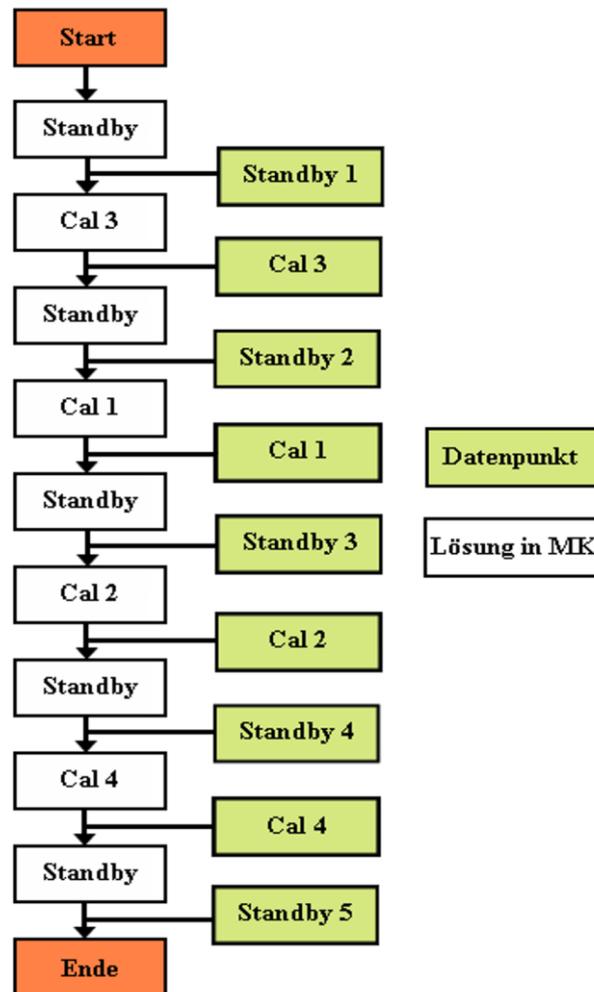


Abbildung 14 – Fluidische Abläufe und Datenerfassung einer Kalibration mit 4 Kalibrationslösungen: Es sind die fluidischen Abläufe und die Datenerfassung einer Kalibration in den Messständen schematisch dargestellt. Die weißen Kästchen stellen das Einsaugen der Reagenzien in die Messkammer dar. Anschließend werden nach einer definierten Messzeit (kontinuierliche Echtzeitmessung des Signals) die Datenpunkte, dargestellt durch die grünen Kästchen, ermittelt und abgespeichert. Quelle: Eigene Abbildung in Anlehnung an [74].

Die Signalhübe der Kalibrationen bzw. der Messungen ergeben sich dann aus der Differenz vom errechneten Mittelwert während der Messung der Probelösung (oder Kalibrationslösung) und dem errechneten Mittelwert der direkt nach der Messung der Probelösung (oder Kalibrationslösung) erhoben wird (= „Standby nach“). In diesem Fall spricht man von einem Nachmesshub. Dieser Nachmesshub wird für sämtliche Berechnungen wie z.B. für das Kalibrationsmodell oder die Messwertberechnung in weiterer Folge herangezogen.

3.3. Kalibrationskonzept des Harnstoffsensors

Das in den Messständen und dem Ausgangs-Blutgasanalyse-System (für das der Harnstoffsensor entwickelt wurde) verwendete Konzept der Kalibration des Harnstoffsensors benötigt fünf Reagenzlösungen (eine Betriebslösung = „Standby“, sowie vier Kalibrationslösungen = „Cal 1-4“ / siehe *Tabelle 3* (Reagenziensatz „Ursprünglich“)).

Im diesem Kalibrationskonzept wird der Kaliumionensensor mit Hilfe der Kalibrationslösung 4, in Bezug auf die Betriebslösung kalibriert. Hierbei beinhaltet die Betriebslösung eine Kaliumionenkonzentration von 5 mmol/L, was einen Kalibrationspunkt im oberen physiologischen Bereich der Kaliumkonzentration in humanem Vollblut darstellt. In Cal 4 liegt eine Kaliumionenkonzentration von 10 mmol/L vor, was einen Kalibrationspunkt im Messbereich darstellt für verdünnte Urinproben darstellt. Mit diesen beiden Punkten kann eine 2-Punktkalibration für den gewünschten Messbereich beider Probenarten durchgeführt werden. Der Kaliumionensensor wird mit Hilfe einer abgewandelten Form der Nernstgleichung (siehe *Gleichung 4*) kalibriert.

Die beiden Ammoniumionensensorspots (nativer und mit Enzym) werden mit den Kalibrationslösungen 3 und 4 in Bezug auf die Betriebslösung kalibriert. Hierbei wird grundsätzlich wieder eine 2-Punktkalibration mit der Betriebslösung (= 0,05 mmol/L Ammoniumionen = niedriger Messbereich) und Cal 3 (= 1 mmol/L Ammoniumionen = hoher Messbereich) durchgeführt. Zusätzlich wird mit Hilfe der Kalibrationslösung 4 in Bezug auf die Betriebslösung der Einfluss von Kaliumionen auf den Ammoniumionensensor ermittelt (siehe 2.7.2. *Beschreibung des verwendeten Sensors*). Dieser Effekt wird über die Veränderung der Ammoniumionensensorsignale (nativer Ammoniumionensensor und Sensor mit Enzym) bei gleicher Ammoniumionenkonzentration aber geänderter Kaliumionenkonzentration (siehe *Tabelle 3* (Reagenziensatz „Ursprünglich“)) mit einberechnet.

Der Harnstoffsensor wird zusätzlich zur Grundkalibration des Ammoniumionensensors mit den Kalibrationslösungen 1 und 2, jeweils in Bezug auf die Betriebslösung (= „Standby“) kalibriert. Hierbei kommt es zu einer 3-Punktkalibration, bei der die Kalibrationslösung 1 (= 7 mmol/L Harnstoff) den physiologischen Kalibrationspunkt beschreibt. Die Kalibrationspunkte der Betriebslösung (= 1 mmol/L Harnstoff), sowie der Kalibrationslösung 2 (= 25 mmol/L Harnstoff) dienen als pathologische Kalibrationspunkte im unteren bzw. oberen Messbereich. Diese 3-Punktkalibration ist notwendig, da der Sensor über den gesamten Messbereich keinen linearen Zusammenhang zwischen der

Konzentrationsänderung des Harnstoffes in der Probe und der damit verbundenen Signaländerung des Sensors aufweist. Der native Ammoniumionensensor, sowie der Harnstoffsensor werden beide mit einer abgewandelten Form der Nikolski-Eisenman Gleichung (siehe *Gleichung 5*) kalibriert.

Bei der Messung einer Probe wird die ermittelte Ammoniumionenkonzentration der Probe in die Berechnung der Harnstoffkonzentration mit einbezogen. Die Ammoniumionenkonzentration der Probe muss in der Berechnung der Harnstoffkonzentration berücksichtigt werden, da diese die Messung der aufgrund der Enzymreaktion entstandenen Ammoniumionen als Maß für die Harnstoffkonzentration beeinflussen.

Für die Untersuchungen der Fragestellungen bezüglich der Auswirkungen der veränderten Temperatur des Messsystems, sowie des veränderten Ammoniumionen-Bezugspunkt in der Betriebslösung auf den Sensor (siehe *1.2 Aufgabenstellung*), wurde dieses ursprüngliche Kalibrationskonzept beibehalten.

Für die dritte Aufgabenstellung der Diplomarbeit (siehe *1.2 Aufgabenstellung*), der Entwicklung eines neuen Kalibrationskonzepts für eine Integration des Harnstoffsensors in das neue Blutgasanalyse-System, wurde dieses Kalibrationssystem als Referenzsystem angesehen. Sämtliche neu entwickelten Kalibrationssysteme beruhen teilweise auf diesem System und werden mit diesem verglichen. Eine genaue Beschreibung der neu entwickelten Systeme erfolgt im nächsten Kapitel (siehe *4. Durchführung und Ergebnisse*).

3.4. Reagenzien

Die fünf Lösungen für das beschriebene Kalibrationskonzept des Sensors, wurden für die Bearbeitung der Fragestellungen der Diplomarbeit (siehe *1.2 Aufgabenstellung*) adaptiert. Im Zuge der Arbeit wurden insgesamt zehn Reagenzlösungen verwendet. Es wurden zwei komplette Sätze an Reagenzlösungen mit einmal einem hohen (= „high NH_4^{+} “) und einmal einem niedrigen (= „low NH_4^{+} “) Ammoniumionen-Bezugspunkt in der Betriebslösung hergestellt (siehe *Tabelle 3*).

Die Änderungen der Ammoniumionenkonzentrationen in den Betriebslösungen wurden für die Fragestellung nach der Auswirkung der Änderung dieser auf die Sensorstabilität, sowie auf die Sensoreigenschaften durchgeführt. Die Ammoniumionenkonzentrationen der verschiedenen Kalibrationslösungen wurden natürlich dementsprechend angepasst um dem ursprünglichen Kalibrationskonzept zu entsprechen.

Die Änderung der Kaliumionenkonzentration in der Kalibrationslösung 4 (von 10 mmol/L auf 2 mmol/L vgl. Reagenziensätze „Ursprünglich“ mit den beiden anderen Reagenziensätzen in *Tabelle 3*) wurde durchgeführt, da die Messung von Urinproben im neuen System nicht vorgesehen ist und daher der hohe Kalibrationspunkt bei 10 mmol/L nicht mehr für den gewünschten Messbereich benötigt wird.

Bezüglich der Harnstoffkonzentration wurde nur die Betriebslösung (= Standby) geändert. Hier wurde der Harnstoff bei den beiden Reagenzeinsätzen „low NH₄⁺“ und „high NH₄⁺“ aus der Betriebslösung entfernt, um möglichen negativen Einflüssen des Harnstoffes auf andere Sensoren des Ziel-Blutgasanalyse-Systems vorzubeugen (siehe *1.2 Aufgabenstellung*).

Die eingewogenen Konzentrationen der für die Kalibration relevanten Substanzen, sowie die pH-Werte der einzelnen Lösungen sind in folgender Tabelle angeführt (siehe *Tabelle 3*):

Tabelle 3 - Rezepturen für die verwendeten Reagenzien. Quelle: Eigene Tabelle.

Reagenziensatz	Lösung	Standby	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4
„Ursprünglich“	Harnstoff [mmol/L]	1	7	25	0	0
	K ⁺ [mmol/L]	5	5	5	5	10
	NH ₄ ⁺ [mmol/L]	0,05	0,05	0,05	1	0,05
	pH-Wert (bei 37°C)	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4
„low NH ₄ ⁺ “	Harnstoff [mmol/L]	0	7	25	0	0
	K ⁺ [mmol/L]	5	5	5	5	2
	NH ₄ ⁺ [mmol/L]	0,1	0,1	0,1	1	0,1
	pH-Wert (bei 37°C)	7,4	7,4	7,4	7,4	6,9
„high NH ₄ ⁺ “	Harnstoff [mmol/L]	0	7	25	0	0
	K ⁺ [mmol/L]	5	5	5	5	2
	NH ₄ ⁺ [mmol/L]	1	1	1	0,1	1
	pH-Wert (bei 37°C)	7,4	7,4	7,4	7,4	6,9

3.5. Messreihe

Die im Zuge der Diplomarbeit durchgeführten Messreihen dienen der Beurteilung der Sensoreigenschaften (Messgenauigkeit, Signalwiederfindung etc.) bzw. der Generierung von Rohdaten für die Entwicklung eines neuen Kalibrationsmodells. Hierfür werden die Messreihen in einem definierten Ablauf durchgeführt.

Vor jeder Messreihe werden die Sensoren kalibriert und erst danach kann die Messreihe gestartet werden. Zuerst wird „Cal 1“ vermessen um erstens die Qualität der Kalibration schnell überprüfen zu können (da die Signalhöhen der einzelnen Sensoren bei dieser Messung

sehr ähnlich sein müssen wie die ermittelten Signalhöhen der Kalibrationslösung 1 bei der vorangegangenen Kalibration) und um den Ausgangspunkt für die Überprüfung der Signalwiederfindung zu generieren. Danach werden die wässrigen Lösungen „Combitrol Plus B Level 1-3“ (Qualitätskontrolllösungen von Roche Diagnostics GmbH), „Cal 9“ und „Cal 10“ (= „Cal 1“ mit verändertem pH-Wert zur Abschätzung der pH-Wert-Empfindlichkeit der Sensoren), sowie zwei Interferenzlösungen mit den Hauptinterferenzen für die Glukosenmessung.

Als nächstes wird wiederum „Cal 1“ zur Überprüfung der Signalwiederfindung gemessen. Danach erfolgen die Messungen mit humanem Vollblut wobei acht Proben von verschiedenen Spendern vermessen werden. Zwei der acht Blutproben („Blut 3“ und „Blut 6“) werden hierfür mit 45 µl bzw. 90 µl einer 1-molaren Harnstofflösung versehen um hochkonzentrierte Proben für die Messreihe zu generieren.

Die Blutproben werden im Anschluss an die Messungen für sechs Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, um Blutplasma zu erhalten. Der Überstand der Blutröhrchen (= Plasma) wird danach abpipettiert und in Eppendorftubes überführt, wobei ca. 300 µl davon für die Referenzmessungen verwendet werden.

Vor Beginn der Plasmamessungen wird wiederum „Cal 1“ zur Überprüfung der Signalwiederfindung gemessen. Anschließend werden die acht Plasmaproben vermessen. Nach Ende der Plasmamessungen wird eine automatische Messreihe gestartet, wobei hier „Cal 1“ in definierten Abständen automatisch vermessen wird. Der Ablauf der Messreihe ist in folgender Aufzählung dargestellt:

Messreihe zur Bestimmung der Sensoreigenschaften:

- 1) „Cal 1“ (Geräteintern)
- 2-4) „Combitrol Plus B Level 1-3“
- 5) „Cal 9“
- 6) „Cal 10“
- 7) „Interferenzlösung I“
- 8) „Interferenzlösung II“
- 9) „Cal 1“ (Geräteintern)
- 10-17) „Blut 1-8“
- 18) „Cal 1“ (Geräteintern)
- 19-26) „Plasma 1-8“
- 27) Start „Cal 1-Reihe“ (Geräteintern)

3.6. Referenzmessung

Zur Ermittlung der Harnstoffkonzentrationen der Blut bzw. Plasmaproben (Soll-Wert-Ermittlung) wurde der „cobas[®] UREA/BUN – Harnstoff/Harnstoff-N kinetischer UV-Test“ [62] der Firma Roche Diagnostics GmbH für das Analysegerät Hitachi 902 als Referenzmethode gewählt.

Das Analysegerät Hitachi 902 ist ein vollautomatisches Multikanal UV-/VIS-Spektrophotometer, das auch ionenselektive Elektroden zur Bestimmung von Natrium, Kalium und Chlorid enthält. Mit diesem Gerät können mehr als 30 photometrische Tests aus einer Probe durchgeführt werden. Hierfür besitzt der Analysator einen Reagenzienteller in dem sich die Reagenzien für die verschiedenen Tests befinden. Des Weiteren besitzt der Hitachi 902 ein Probenteller für 60 Proben, sowie für 50 Behälter für z.B. Kalibrationslösungen, Waschlösungen oder Kontrollsera. Die Proben und die Reagenzien werden von einer automatischen Pipettornadel in eine Küvette pipettiert und dort mit einem kleinen Mixer vermischt. Anschließend können die photometrischen Tests inkubiert und in der Photometereinheit vermessen werden [75].

Bei dem verwendeten „cobas[®] UREA/BUN – Harnstoff/Harnstoff-N kinetischer UV-Test“ handelt es sich um einen gekoppelten enzymatischen Test, der auf dem Urease-GLDH-Test beruht (siehe 2.7.4 *Alternative Methoden zur Harnstoffbestimmung*) [62]. Für die Kalibration des enzymatischen UV-Tests, sowie als Qualitätskontrolle für die Kalibration wurde, wie in der beigelegten Anleitung beschreiben, **cobas[®] C.F.A.S.** (**cobas[®] Calibrator-For-Automated-Systems**) von der Firma Roche Diagnostics GmbH verwendet. **cobas[®] C.F.A.S.** wurde jeweils vor und nach den Plasmaproben der Messreihen vermessen. Die Abweichung vom Mittelwert der beiden Kontrollen zum Zielwert von **cobas[®] C.F.A.S.** wurde dann als Korrekturfaktor zur Berechnung der Harnstoffkonzentrationen der Proben verwendet.

3.7. Datenauswertung

Die Auswertung der Messreihen für die Beurteilung der Sensoreigenschaften wurde in einer extra dafür entwickelten MS-Excel-Vorlage durchgeführt (siehe *Abbildung 15*). Diese Vorlage dient der automatischen Auswertung von unterschiedlichen Parametern welche die Sensoreigenschaften eines Sensors an einem bestimmten Messtag widerspiegeln. Hierfür müssen die in der Messreihe ermittelten Messdaten, die Daten der vorangegangenen Kalibration, allgemeine Daten (z.B. Datum, Sensorname, Messstandsbezeichnung, Bemerkungen), sowie die Daten der Referenzmessungen der humanbiologischen Proben in die Vorlage manuell eingetragen werden. Die Messdaten, sowie die Kalibrationsdaten können direkt aus den ausgegebenen MS-Excel-Datenbanken der Messstände kopiert werden. Die kopierten Daten werden dann in definierte Zellen der MS-Excel-Vorlage eingefügt (nicht in *Abbildung 15* dargestellt). Die Parameter zur Beurteilung der Sensoreigenschaften werden daraufhin automatisch berechnet und mit OK bzw. nOK (= nicht OK) beurteilt. Des Weiteren wird noch die Freigabe des Sensors, aufgrund der Parameter der Sensoreigenschaften mit JA oder NEIN beurteilt. Die Grenzen für diese Beurteilung sind definiert durch die aktuellen Grenzen zur Beurteilung der Harnstoffsensoren im Ausgangssystem. Diese Grenzen entsprechen den Sensorspezifikationen der G/L/U-Sensorkassette von Roche Diagnostics GmbH für das Blutgasanalyzesystem **cobas**[®] b221. Die Sollwerte der vermessenen wässrigen Lösungen sind ebenfalls in dieser Vorlage angegeben. Für die Analyse von Experimenten bzw. Sensorlosen können die jeweiligen Sensorparameter der einzelnen Messreihen gemittelt und miteinander verglichen werden.

Harnstoffsensor Test mit humanbiologischen Proben		Datei: Harnstoff-Auswertesheet_Version1.xls			Erstellt: AKe am 12.03.2012		
Sensorname:		Gerät:		Datum:		Einsatztag:	
Probe	c(Harnstoff) [mmol/L]	Harnstoff SOLL [mmol/L]	Harnstoff MIN [mmol/L]	Harnstoff MAX [mmol/L]	Grenzwerte	Harnstoff MIN	Harnstoff MAX
Cal 1 vor		7,00	6,30	7,70	Cal vor/nach Proben	-10%	10%
Cal 1 nach		7,00	6,30	7,70	Cal 9 und Cal 10	-10%	10%
Cal 9		9,00	8,10	9,90	Combitrol	-15%	15%
Cal 10		9,00	8,10	9,90	Blut/Plasma Steigung	0,85	0,95
Interferenzlösung I		7,00	6,30	7,70	Blut/Plasma Syx	-0,50	0,50
Interferenzlösung II		7,00	6,30	7,70	Plasma Steigung	0,90	1,10
Combitrol Level 1		22,80	18,40	24,40	Plasma Syx	-0,50	0,50
Combitrol Level 2		7,10	5,90	8,30	Blut Steigung	0,85	0,95
Combitrol Level 3		2,20	1,30	2,70	Blut Syx	-0,50	0,50
Humanproben	Blut	Plasma	Referenzdaten c(Harnstoff) [mmol/L]	Sensoreigenschaften	Werte	Freigabe OK/nOK	
Probe 1			Probe 1		Call vor/nach Proben		
Probe 2			Probe 2		Cal 9		
Probe 3			Probe 3		Cal 10		
Probe 4			Probe 4		Combitrolmessungen		
Probe 5			Probe 5		Blut/Plasma-Steigung		
Probe 6			Probe 6		Blut/Plasma-Syx		
Probe 7			Probe 7		Plasma-Steigung		
Probe 8			Probe 8		Plasma-Syx		
Kalibrationsparameter:					Blut-Steigung		
Harnstoff					Blut-Syx		
Standby			Eingabefeld		Plasma-Achsenabschnitt		
Cal 1			Grenzwertfeld		Blut-Achsenabschnitt		
Cal 2					Sensorfreigabe Harnstoff:		JA
Cal 3					Rechenfeld Sensorperformance		
Cal 4					Messergebnis bzw. Beschriftungsfeld		
Linearität							
Combitrolfehler:	0						
Bemerkungen:							

Abbildung 15 – MS-Excel-Vorlage zur Auswertung der Messreihen: Diese Abbildung zeigt einen Teil der MS-Excel-Vorlage zur Auswertung der Messreihen mit humanbiologischen Proben. Es werden die gemessenen Konzentrationen aller Proben, sowie die Kalibrationsdaten der vor der Messreihe vorangegangenen Kalibration abgebildet (weiße leere Kästchen). Des Weiteren sind die Soll-Werte, sowie die Grenz-Werte für die wässrigen Proben und Sensoreigenschaftsparameter eingetragen (blaue Kästchen). Die Soll-Werte der humanbiologischen Proben müssen, neben den allgemeinen Informationen (z.B. Sensorname, Messgerät, Datum) in diese Vorlage manuell übertragen werden (grüne Kästchen). Die Parameter zur Beurteilung der Sensoreigenschaften werden automatisch berechnet und eine Beurteilung (OK vs. nOK) vorgenommen (rote Kästchen). Nicht abgebildet ist jener Teil der MS-Excel-Vorlage, in den die Mess- und Kalibrationsdaten von den Messstandsdatenbanken manuell hineinkopiert werden müssen. Quelle: Eigene Abbildung.

Die Bedeutung der einzelnen Parameter der Sensoreigenschaften werden in der folgenden Aufzählung erklärt:

– „Cal 1 vor/nach Proben“:

Der Parameter „Cal 1 vor/nach Proben“ spiegelt die prozentuelle Änderung des Signals der „Cal 1“ Messung zu Beginn der Messreihe zum Signal der „Cal 1“ Messung nach der letzten Plasmaprobe wider. Dieser Parameter ist ein Maßstab für die Signalwiederfindung bzw. Reversibilität nach Probenbelastung.

- „Cal 9“ und „Cal 10“:

Die Parameter „Cal 9“ und „Cal 10“ beschreiben die prozentuelle Änderung des Signals von „Cal 1“ aufgrund von geänderten pH-Werten. Die Lösung „Cal 9“ ist eine „Cal 1-Lösung“ mit einem pH-Wert von 7,9 anstelle von 7,4 (= pH-Wert von „Cal 1“). Die Lösung „Cal 10“ ist eine „Cal 1-Lösung“ mit einem pH-Wert von 6,8. Dieser Parameter dient der Abschätzung von Einflüssen des pH-Wertes der Proben auf das Sensorsignal.

- „Combitrolmessung“ und „Combitrolfehler“:

Der Parameter „Combitrolmessung“ ist die mittlere prozentuelle Abweichung der drei Messungen der Qualitätskontrolllösungen (= „Combitrol Plus B Level 1-3“). Dies spiegelt die Qualität der Messungen der Kontrollmittel wider und würde bei einer Bewertung mit „nOK“ den Einsatz des Sensors sperren. Der Parameter „Combitrolfehler“ (Werte von 0-3) gibt an, welche Anzahl an Messungen der Qualitätskontrolllösungen außerhalb der vorgegebenen Grenzwerte liegt. Bei einem Wert > 0 wird der Sensor ebenfalls gesperrt und ist nicht messbereit.

- „Blut/Plasma-Steigung“:

Der Parameter „Blut/Plasma-Steigung“ ist ein Maß für die Abhängigkeit der Messung von der jeweiligen Probenmatrix der humanbiologischen Proben. Hierbei werden die Messwerte der Blutproben (Y-Achse) gegen die Messwerte der zugehörigen Plasmaproben (X-Achse) in einem XY-Punktdiagramm aufgetragen und eine Regressionsgerade durch diese Punkte und den Nullpunkt gelegt. Die Steigung dieser Geraden spiegelt dann die Auswirkungen der Probenmatrix auf die Messwerte wider. Die optimale Steigung wäre 1,0 was ein probenmatrixunabhängiges Messsystem (für diese beiden Probenarten) beschreiben würde.

- „Blut-Steigung“ und „Plasma-Steigung“:

Der Parameter „Blut-Steigung“ ist ein Maß für die Empfindlichkeit des Sensors in Blutproben. Dies beschreibt die Abhängigkeit der ausgegebenen Messwerte des Sensors zu Konzentrationsänderungen des Analyten in der Probe. Hierbei werden die Messwerte der Blutproben (Y-Achse) gegen die gemessenen Referenzwerte des Hitachi 902 Analysators (X-Achse) in einem XY-Punktdiagramm aufgetragen und eine Regressionsgerade durch diese Punkte gelegt (nicht durch Koordinatenursprung

gezwungen). Die Steigung dieser Geraden spiegelt dann die Empfindlichkeit wider. Die optimale Steigung wäre 1,0 was bedeuten würde, dass eine Änderung der Analytkonzentration in der Probe um eine bestimmte Größe die selbe Änderung des ausgegebenen Messwertes hervorruft. Der Parameter „Plasma-Steigung“ ist ebenfalls ein Maß der Empfindlichkeit des Sensors. Hier werden jedoch die Plasmamesswerte zur Berechnung der Steigung herangezogen, um die Empfindlichkeit der Sensoren in Plasma zu ermitteln. Diese beiden XY-Punktdiagramme werden in weiterer Folge zur graphischen Darstellung der Ergebnisse verwendet.

– „Blut/Plasma-Syx“, „Blut-Syx“ und „Plasma-Syx“:

Im Allgemeinen ist der „Syx“ eine statistische Kenngröße, der die mittlere Abweichung von Messpunkten zu einer Regressionsgeraden widerspiegelt. Der „Syx“ beschreibt somit den Standardfehler der Y-Werte für alle X-Werte der Regressionsgeraden. Im Fall des Parameters „Blut/Plasma-Syx“ wird somit die Abweichung der Blutmesswerte zur Regressionsgeraden gegen die Plasmamesswerte beschrieben. „Blut-Syx“ bzw. „Plasma-Syx“ beschreiben den jeweiligen Standardfehler der Messpunkte der Blut- bzw. Plasmamesswerte zur Regressionsgerade gegen die Referenzwerte der Proben.

– „Blut-Achsenabschnitt“ und „Plasma-Achsenabschnitt“:

Der „Blut-Achsenabschnitt“ bzw. „Plasma-Achsenabschnitt“ beschreibt die Schnittpunkte der Regressionsgeraden zur Ermittlung der „Blut-Steigung“ bzw. „Plasma-Steigung“ (Y-Achse Messwerte des Sensors gegen X-Achse Referenzmesswerte) mit der Ordinate. Der „Blut-Achsenabschnitt“ bzw. „Plasma-Achsenabschnitt“ ist somit ein Maß für den Absolutfehler der jeweiligen Regressionsgeraden zu einer optimalen Geraden.

– „Blut-Einzelfehler“ und „Plasma-Einzelfehler“

Der Parameter „Blut-Einzelfehler“ bzw. „Plasma-Einzelfehler“ beschreibt die Anzahl von Messwerten bei Blut- bzw. Plasmamessungen, die vom Referenzwert so weit abweichen, dass sie außerhalb der Richtigkeit + 2 Stabw liegen (= Messrichtigkeit + zwei mal die Standardabweichung). Hierbei ist die Richtigkeit + 2 Stabw durch die Sensorspezifikationen mit $\pm 0,8$ mmol/L (für den Messbereich ≤ 4 mmol/L) bzw. $\pm 20\%$ (für den Messbereich ≥ 4 mmol/L) definiert.

Als Maß für die Sensorstabilität über die Einsatzdauer wird neben den Messungen der Kontrollmittel, der Verlauf der Sensorsignale über die Zeit herangezogen. Hierbei werden die Sensorsignale der Kalibrationen über die Zeit in einem Diagramm aufgetragen und deren Verläufe analysiert. Die Abnahme der Harnstoffsignale über die Zeit spiegelt hierbei die Abnahme der gesamt-immobilisierten Enzymaktivität der *Urease* wider, da diese direkt proportional zum Sensorsignal ist, wenn Substrat im Überschuss vorhanden ist (siehe 2.5.2. *Limitierungen für den Einsatz von Enzymen in Biosensoren*). Dieser Schluss ist jedoch nur gültig, wenn die Stabilität des Transduktorsystem (Ammoniumionen-Selektive-Elektrode) gewährleistet ist. Dies kann anhand der Verläufe der Kalibrations-Sensorsignale der nativen Ammoniumionen-Selektiven-Elektrode über die Zeit ermittelt werden.

4. Durchführung und Ergebnisse

4.1. Untersuchung der Enzymstabilität bzw. Sensorstabilität, sowie der Sensoreigenschaften bei veränderter Betriebstemperatur (30°C vs. 37°C):

Um die Auswirkungen der Temperaturänderung des Messsystems (von 30°C auf 37°C) auf den Sensor zu untersuchen, wurden je zwei MSS-3-fach-Messstände auf 30°C (MSS 1 und 2) bzw. 37°C (MSS 3 und 4) Betriebstemperatur eingestellt. In diese Messstände wurden dann jeweils drei Sensoren des gleichen Sensorloses eingebaut und untersucht.

Um eine große Menge an Daten zu generieren und um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurde dieser Versuch insgesamt dreimal durchgeführt. Hierfür wurden drei verschiedene Sensorlose (= Los #1-3) verwendet, um die Streuung der Sensoren aufgrund unterschiedlicher Herstellungszyklen in das Experiment einzubeziehen. Insgesamt wurden somit 18 Sensoren bei 30°C und 18 Sensoren bei 37°C betrieben.

Das für dieses Experiment verwendete Kalibrationskonzept entsprach der in Kapitel 3 beschriebenen Methode zur Kalibration des Harnstoffsensors (siehe 3.3 *Kalibrationskonzept des Harnstoffsensors*). Als Reagenzien wurden für die beiden Lose #1 und #3 der Reagenziensatz „low NH₄⁺“ verwendet, wobei Cal 3 „low NH₄⁺“ zusätzlich 7 mmol/L Harnstoff und Cal 4 „low NH₄⁺“ zusätzlich 25 mmol/L Harnstoff enthielt. Für das Lose #2 wurde der Reagenziensatz „high NH₄⁺“ verwendet, wobei Cal 3 „high NH₄⁺“ zusätzlich 7 mmol/L Harnstoff und Cal 4 „high NH₄⁺“ zusätzlich 25 mmol/L Harnstoff enthielt (siehe *Tabelle 3*). Das Variieren der Reagenziensätze und die zusätzlichen Harnstoffeinwaagen dienten der Vorabschätzung für die Entwicklung von neuen Kalibrationskonzepten, sowie der Abschätzung der Auswirkungen der veränderten Ammoniumionenkonzentration in der Betriebslösung.

Für die Untersuchung der Enzym- bzw. Sensorsignalstabilität bei den unterschiedlichen Betriebstemperaturen, wurden die Sensorsignale der einzelnen Kalibrationslösungen jedes Sensors über die Zeit verfolgt. Der Signaldrift über die Zeit ist ein ausschlaggebendes Maß für die Stabilität des Sensors. Die Kalibrationssignale der Sensoren jeder Sensorgruppe (30°C bzw. 37°C) eines Loses wurden zu „definierten Zeitpunkten“ gemittelt. Diese „definierten Zeitpunkte“ entsprachen hierbei jedem Zeitpunkt an dem alle sechs Sensoren eines Loses einer Sensorgruppe zur gleichen Zeit (± 15 Minuten) erfolgreich kalibriert wurden. Wurde einer oder mehrere der sechs Sensoren einer Sensorgruppe z.B. aufgrund eines Befüllfehlers im Messsystem nicht kalibriert, wurden keine Mittelwerte der Kalibrationssignale ermittelt.

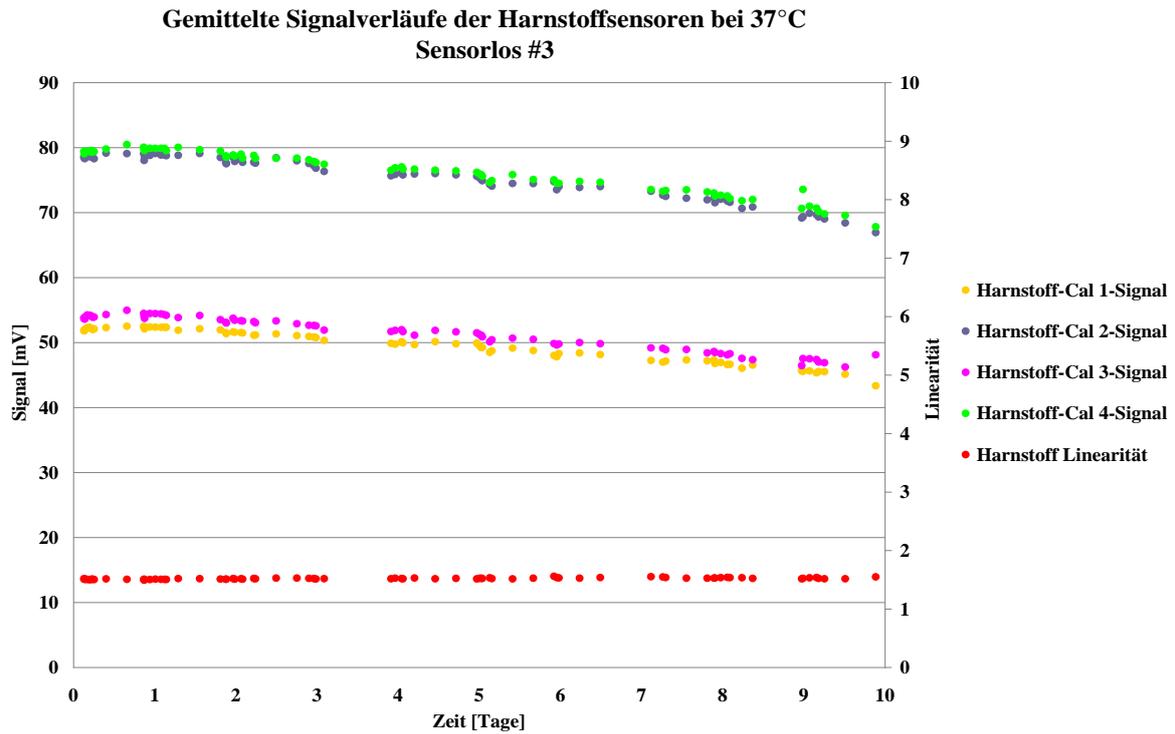
Die Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale jeder Sensorgruppe eines Sensorloses wurden in je einem XY-Punktdiagramm für jeden Sensorspot graphisch dargestellt. Exemplarisch werden auf den folgenden Seiten die einzelnen Kalibrationssignalverläufe des Sensorloses #3 dargestellt (siehe *Abbildung 16 – 18*). Hier kann man, gleich wie bei den Signalverläufen der anderen Sensorlose (Los #1 und Los #2 siehe *Anhang Abbildungen 30 und 33*) erkennen, dass die Signaldrifts des Harnstoffsensors über die Zeit bei 37°C deutlich stärker sind als bei 30°C (siehe *Abbildung 16*). Dies deutet auf eine verminderte Sensorstabilität aufgrund der Temperaturerhöhung des Messsystems hin. Die Kalibrationssignalverläufe der anderen Parameter bei 30°C bzw. 37°C sind hingegen bei allen Sensorlosen (siehe *Abbildungen 17-18 und Anhang Abbildung 31-32 und 34-35*) sehr ähnlich. Eine genauere Beschreibung und Interpretation der Kalibrationssignalverläufe wird in Kapitel 5 der Diplomarbeit durchgeführt.

Zur Abschätzung der Signalstreuung sämtlicher gemittelten Kalibrationssignale wurden die mittleren Standardabweichungen dieser berechnet und in *Tabelle 4* zusammengefasst (siehe *Tabelle 4*). Diese Daten dienen in Kapitel 5 einerseits der Abschätzung der Signalstreuung aufgrund der Herstellung (Vergleich Los zu Los) und dem Vergleich der Signalstreuung aufgrund des Temperatureffekts (Vergleich innerhalb eines Loses 30°C vs. 37°C).

Für die Untersuchung bzw. den Vergleich der Sensoreigenschaften bei unterschiedlichen Betriebstemperaturen (30°C vs. 37°C) wurde, die in Kapitel 3 beschriebene Messreihe (siehe *3.5 Messreihe*) an verschiedenen Tagen nach dem Einsatz der Sensoren durchgeführt. Die Auswertung der Sensoreigenschaften jedes Sensors an den einzelnen Messtagen erfolgte in der dafür entwickelten MS-Excel-Vorlage (siehe *3.7 Datenauswertung*). Abschließend wurden für den Vergleich der Sensoreigenschaften bei unterschiedlichen Betriebstemperaturen alle Messergebnisse des Experiments (Los #1-3) zusammengefasst. Die Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen der einzelnen Sensoreigenschaftsparameter der beiden Sensorgruppen wurden dann in einer Tabelle gegenübergestellt (siehe *Tabelle 5*). Hier konnten keine signifikanten Änderungen aufgrund der Temperaturerhöhung festgestellt werden. Eine genauere Betrachtung der Ergebnisse folgt in Kapitel 5 der Diplomarbeit.

Die Lebensdauer der Sensoren beider Sensorgruppen wurde über die Messungen der Qualitätskontrolllösungen (Combitrol Plus B) ermittelt. Bei der 30°C-Sensorgruppe schaffte ein Sensor am 8. Messtag und am 10. Messtag die Kontrollmessungen nicht. Bei der 37°C-Sensorgruppe schafften hingegen zwei Sensoren am 8. Messtag und insgesamt sechs Sensoren am 10. Messtag die Kontrollmessungen nicht. Dies bedeutet, dass die Lebensdauer der Sensoren wie erwartet zwar durch die Erhöhung der Temperatur abnimmt, aber dennoch laut Spezifikationen ausreichend ist um die Sensoren bei 37°C zu betreiben.

A)



B)

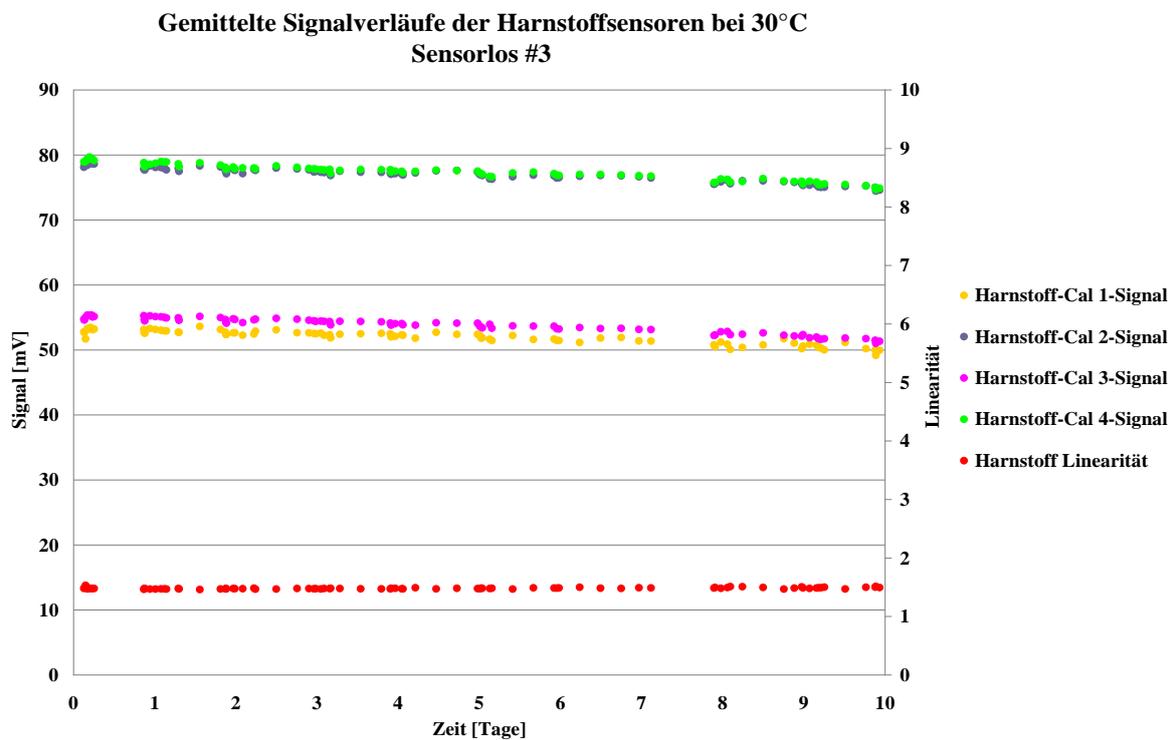
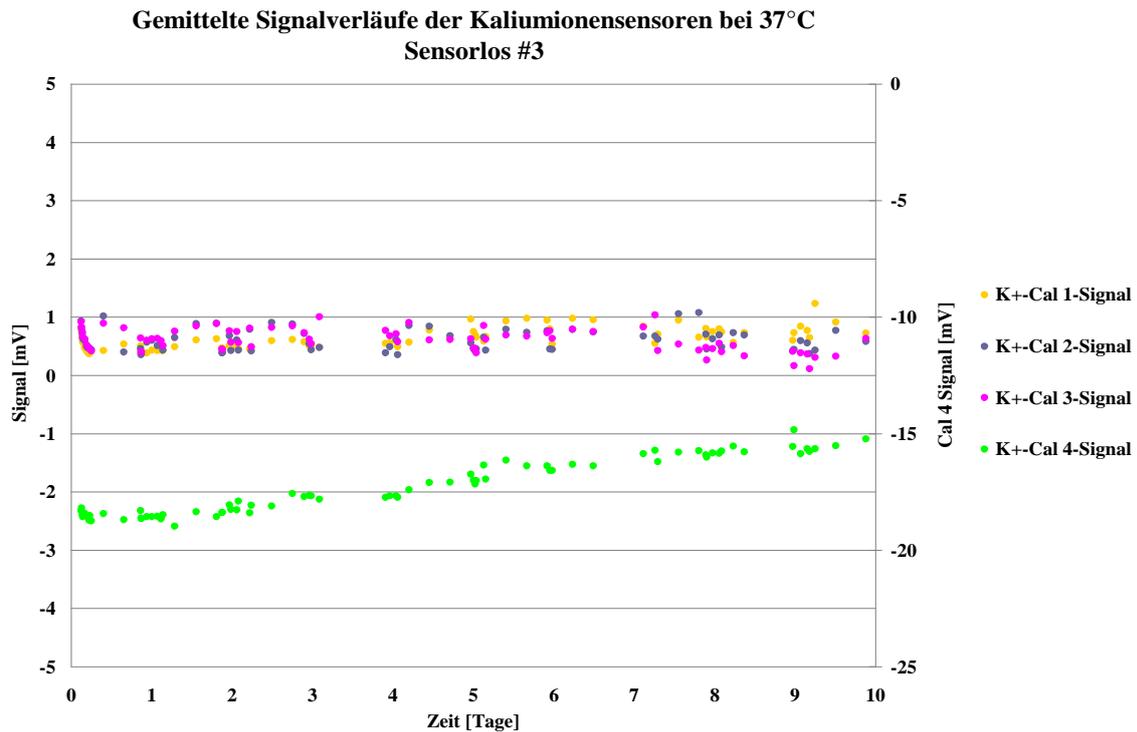


Abbildung 16 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der Harnstoffsensoren 30°C vs. 37°C – Los #3: Abgebildet sind die Diagramme der gemittelten Kalibrationssignale über die Zeit der Harnstoffsensoren bei 37°C (A)) bzw. 30°C (B)) des Los #3. Quelle: Eigene Abbildung.

A)



B)

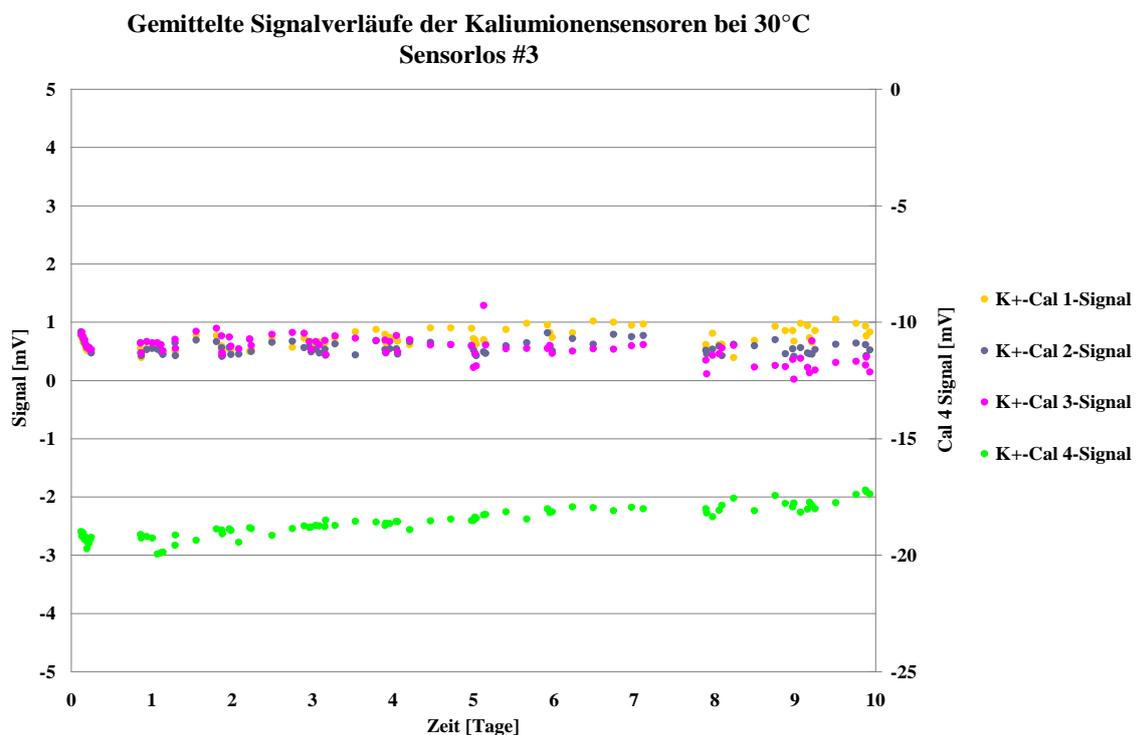
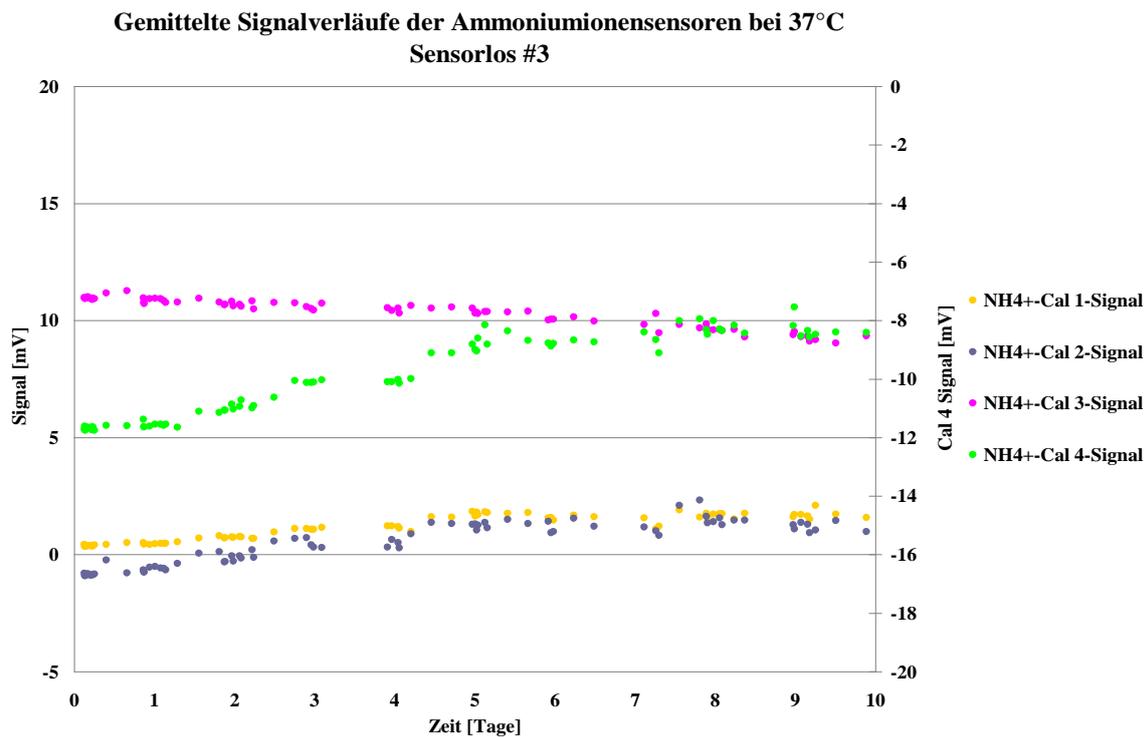


Abbildung 17 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der kaliumionenselektiven Sensoren 30°C vs. 37°C – Los #3: Abgebildet sind die Diagramme der gemittelten Kalibrationssignale über die Zeit der Kaliumionensensoren bei 37°C (A) bzw. 30°C (B) des Los #3. Quelle: Eigene Abbildung.

A)



B)

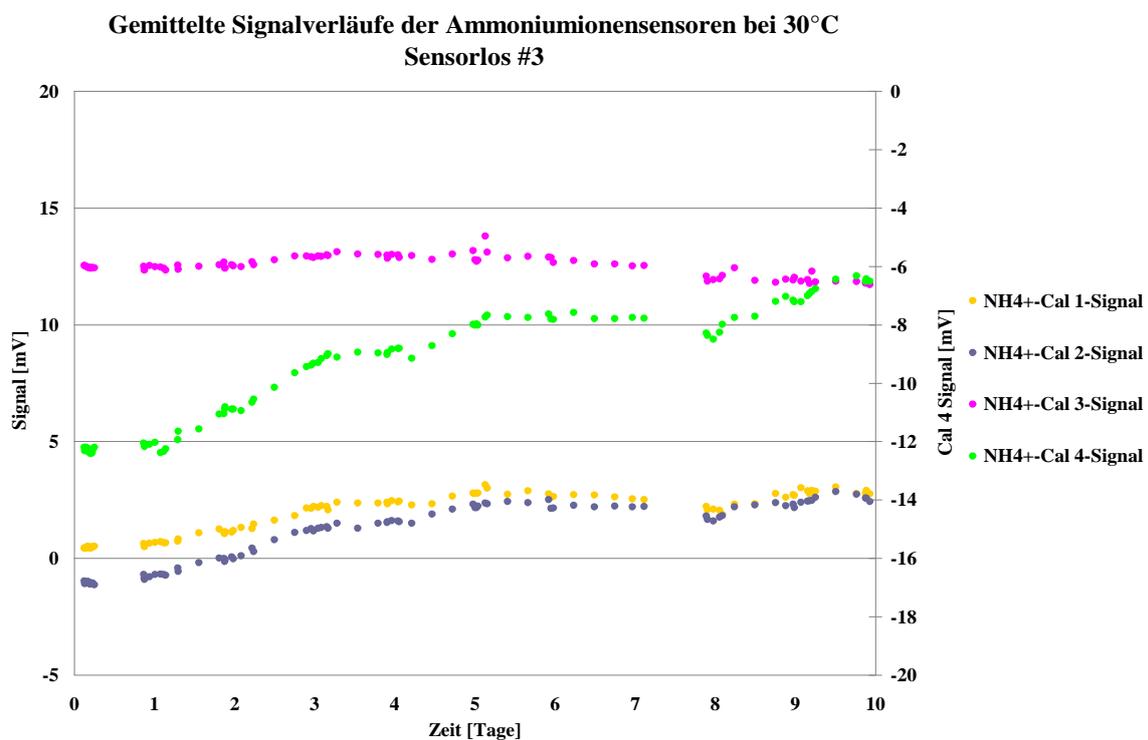


Abbildung 18 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der ammoniumionenselektiven Sensoren 30°C vs. 37°C – Los #3: Abgebildet sind die Diagramme der gemittelten Kalibrationssignale über die Zeit der Ammoniumionensensoren bei 37°C (A) bzw. 30°C (B) des Los #3. Quelle: Eigene Abbildung.

Tabelle 4 - Mittlere Standardabweichungen der gemittelten Kalibrationssignale – Los #1-3.

Quelle: Eigene Tabelle.

mittlere Stabw der Signalverläufe Los #1-3	Los #1		Los #2		Los #3	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
NH ₄ ⁺ - Cal 1 [mV]	0,64	0,78	0,54	0,58	0,97	0,45
NH ₄ ⁺ - Cal 2 [mV]	0,25	0,69	0,38	0,38	1,46	0,53
NH ₄ ⁺ - Cal 3 [mV]	0,27	0,56	0,22	0,14	0,54	0,76
NH ₄ ⁺ - Cal 4 [mV]	1,03	1,35	0,97	1,15	2,52	1,54
K ⁺ - Cal 1 [mV]	0,26	0,12	0,23	0,12	0,16	0,14
K ⁺ - Cal 2 [mV]	0,27	0,15	0,14	0,22	0,18	0,15
K ⁺ - Cal 3 [mV]	0,33	0,28	2,29	0,14	0,36	0,60
K ⁺ - Cal 4 [mV]	1,23	0,98	4,08	2,06	0,79	2,30
Harnstoff - Cal 1 [mV]	2,45	1,99	1,42	2,39	2,97	1,45
Harnstoff - Cal 2 [mV]	4,56	3,99	2,48	2,62	4,64	1,39
Harnstoff - Cal 3 [mV]	2,33	1,52	5,16	2,62	3,12	1,77
Harnstoff - Cal 4 [mV]	4,77	2,99	5,76	2,67	4,55	1,67
Harnstoff – Linearität	0,04	0,06	0,05	0,06	0,02	0,03

Tabelle 5 - Vergleich der Sensoreigenschaften bei unterschiedlichen Betriebstemperaturen (30°C vs. 37°C) – Zusammenfassung Los #1-3. Quelle: Eigene Tabelle.

je 18 Sensoren aus 3 Losen (#1-3)	30°C		37°C	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw
Cal 1 Signal [mV]	48,15	7,40	46,49	7,08
Cal 2 Signal [mV]	72,99	7,99	72,04	7,60
Linearität	1,53	0,09	1,56	0,09
Combitrol Plus B Level 1 [mmol/L]	20,96	0,98	20,77	0,96
Combitrol Plus B Level 2 [mmol/L]	6,94	0,51	6,89	0,44
Combitrol Plus B Level 3 [mmol/L]	1,93	0,38	1,90	0,32
Cal 9 [mmol/L]	8,43	0,70	8,19	0,82
Cal 10 [mmol/L]	9,14	0,62	9,11	0,62
Cal 1vor/nach Proben [%]	0,41	2,37	0,88	3,65
Blut/Plasma-Steigung	0,88	0,03	0,93	0,03
Blut-Steigung	0,91	0,06	0,97	0,08
Plasma-Steigung	1,10	0,06	1,08	0,06
Blut-Achsenabschnitt [mmol/L]	0,07	0,56	0,01	0,46
Plasma-Achsenabschnitt [mmol/L]	-0,44	0,63	-0,33	0,52
Blut-Syx [mmol/L]	0,16	0,17	0,16	0,10
Plasma-Syx [mmol/L]	0,16	0,07	0,17	0,16
Blut/Plasma-Syx [mmol/L]	0,14	0,17	0,12	0,10

4.1.1. Untersuchung der Auswirkungen von verschiedenen Deckmembransystemen auf die Enzymstabilität bzw. Sensorstabilität, sowie auf die Sensoreigenschaften:

Da bei den Untersuchungen der Auswirkung einer veränderten Betriebstemperatur auf die Enzymstabilität bzw. die Sensorstabilität zu sehen war, dass sich eine Erhöhung der Temperatur auf 37°C negativ auf diese auswirken, wurden Maßnahmen zur Stabilisierung untersucht. Es hat sich gezeigt, dass das verwendete Enzym bzw. die verwendete Gesamtzymaktivität bei 37°C prinzipiell ausreichend stabil ist (Lebensdauer > sieben Tage = Spezifikationskonform). Trotz dieser Ergebnisse wurden zur Stabilisierung der Gesamtzymaktivität am Sensor verschiedene Deckmembransysteme untersucht. Diese Deckmembransysteme sollten ein mögliches Auswaschen der Enzyme aus der Polymermatrix verhindern und somit die Gesamtzymaktivität am Sensor über die Einsatzzeit stabilisieren. Diese Deckmembranen wurden mit dem in Kapitel 3 beschriebenen Dispensierverfahren (siehe 3.1 *Sensorherstellung* und *Abbildung 10*) aufgebracht. Hierfür wurden die Polymere der Deckmembranen zuerst in Dioxan für 24 Stunden auf dem Laborschüttler bei 1400 U/min gelöst. Danach wurden die Deckmembranansätze jeweils in eine Dispensierspritze gefüllt und diese mit einer Dispensiernadel versehen (Innendurchmesser = 0,25 mm). Die Membranen wurden danach mit 2,0 bar Druck und 0,02-0,120 Sekunden Dispensierzeit auf den Harnstoffsensortspot aufgebracht.

Insgesamt wurden sechs verschiedene Deckmembransysteme in zwei Sensorlosen (#4-5) untersucht. Hierfür wurden die Sensorlose in vier Varianten geteilt, wobei eine Variante keine Deckmembran (= Standard) und die restlichen Varianten unterschiedliche Deckmembransysteme erhielten. Bei den Deckmembranen handelte es sich um eine 3%-ige HPU-Deckmembran [76] (hydrophiles Polyurethan / Los #4-Variante 2), eine 5%-ige HPU-Deckmembran (Los #4-Variante 3), eine 3%-ige HPU/CD-Deckmembran [77] (hydrophiles Polyurethan mit Cellulosederivat 1:1 gemischt / Los #5-Variante 2), eine 5%-ige HPU/CD-Deckmembran (Los #5-Variante 3) und zwei Deckmembransysteme mit jeweils zwei Deckmembranen (3%-ige HPU-Deckmembran + 3%-ige HPU/CD-Deckmembran (Los #4-Variante 4) und 5%-ige HPU-Deckmembran + 5%-ige HPU/CD-Deckmembran (Los #5-Variante 4)).

Um die Auswirkungen der Deckmembransysteme auf den Sensor zu untersuchen, wurden alle vier MSS-3-fach-Messstände auf 37°C Betriebstemperatur eingestellt. In diese Messstände wurden dann jeweils drei Sensoren des gleichen Sensorloses unterschiedlicher

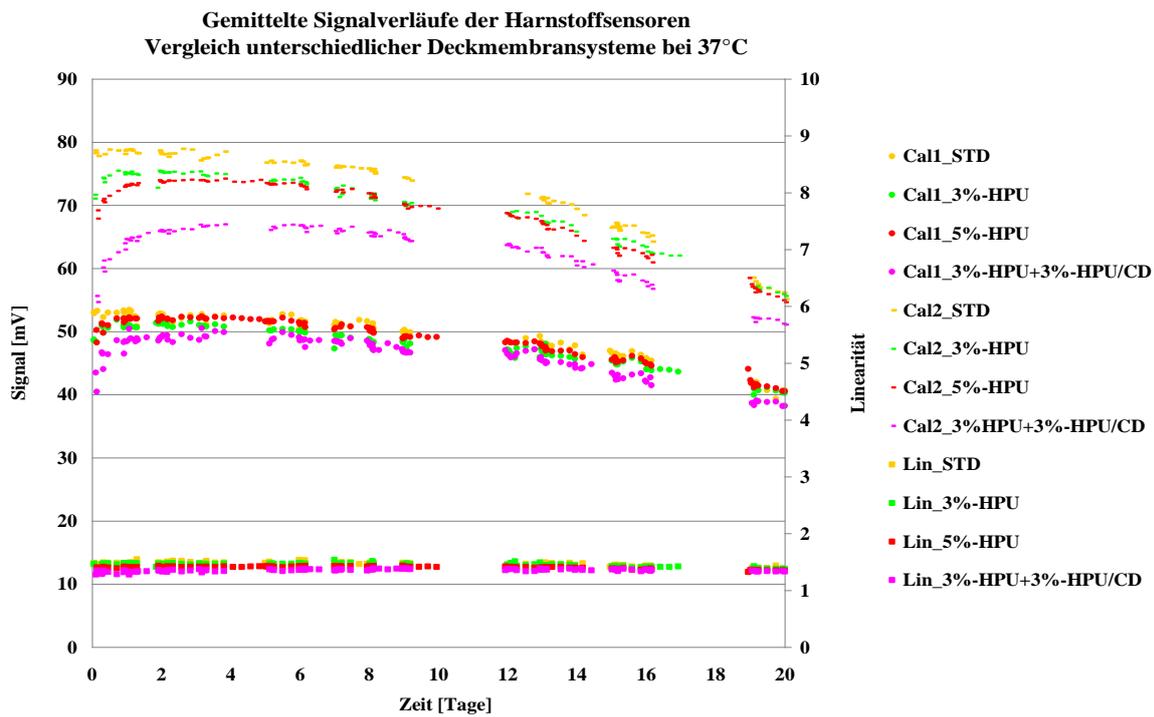
Varianten (insgesamt drei Sensoren pro Variante) eingebaut. Zuerst wurden die Sensoren des Loses #4 und danach die Sensoren des Loses #5 in die Messstände eingebaut und untersucht. Das für dieses Experiment verwendete Kalibrationskonzept entsprach wiederum der in Kapitel 3 beschriebenen Methode zur Kalibration des Harnstoffsensors (siehe 3.3 *Kalibrationskonzept des Harnstoffsensors*). Als Reagenzien wurde für das Sensorlos #4 der Reagenziensatz „low NH₄⁺“ verwendet, wobei Cal 3 „low NH₄⁺“ zusätzlich 7 mmol/L Harnstoff und Cal 4 „low NH₄⁺“ zusätzlich 25 mmol/L Harnstoff enthielt. Für das Sensorlos #5 wurde der Reagenziensatz „high NH₄⁺“ verwendet, wobei Cal 3 „high NH₄⁺“ zusätzlich 7 mmol/L Harnstoff und Cal 4 „high NH₄⁺“ zusätzlich 25 mmol/L Harnstoff enthielt (siehe *Tabelle 3*). Wie beim ersten Experiment dienten die zusätzlichen Harnstoffeinwaagen, sowie die Variation der Reagenziensätze, der Vorabschätzung für weitere Experimente.

Für die Untersuchung der Auswirkungen der Deckmembransysteme auf die Gesamtenzymaktivität bzw. die Sensorsignalstabilität, wurden wiederum die Sensorsignale der einzelnen Kalibrationslösungen jedes Sensors über die Zeit verfolgt. Die Kalibrationssignale der drei Sensoren jeder Sensorgruppe (Variante 1-4) wurden wie beim ersten Experiment zu „definierten Zeitpunkten“ gemittelt.

Aufgrund der Übersichtlichkeit wurden dieses mal nur die Verläufe der gemittelten Harnstoff-Cal 1-Signale, der Harnstoff-Cal 2-Signale und der Harnstoff-Linearität jeder Sensorgruppe der beiden Lose in je einem XY-Punktdiagramm graphisch dargestellt (siehe *Abbildung 19*). Darüber hinaus sind alle anderen Kalibrationssignale für diese Untersuchung nicht relevant, da sie entweder nicht für das Kalibrationsrechenmodell benötigt werden (Harnstoff-Cal 3- und Harnstoff-Cal 4-Signal), oder im Fall der beiden anderen Sensorspots keine Deckmembran besitzen. Anhand dieser Diagramme konnten die Verläufe der Kalibrationssignale der vier Sensorgruppen jedes Loses miteinander verglichen werden. Durch den Vergleich der Signaldrifts der Deckmembranvarianten mit den jeweiligen Standardvarianten können Aussagen über eine mögliche Erhöhung der Enzymstabilität bzw. der Sensorstabilität aufgrund der Deckmembranen getroffen werden. Hier zeigte sich dass durch die Deckmembranen keine Erhöhung der Stabilität des Sensors und somit auch keine Erhöhung der Lebensdauer dieser erreicht werden konnte. Eine genaue Interpretation der Ergebnisse erfolgt in Kapitel 5 der Diplomarbeit.

Zur Abschätzung der Signalstreuung der in *Abbildung 19* dargestellten gemittelten Kalibrationssignale der Lose #4 und #5 wurden wiederum die mittleren Standardabweichungen dieser berechnet und in den folgenden Tabellen zusammengefasst (siehe *Tabelle 6* und *Tabelle 7*).

A)



B)

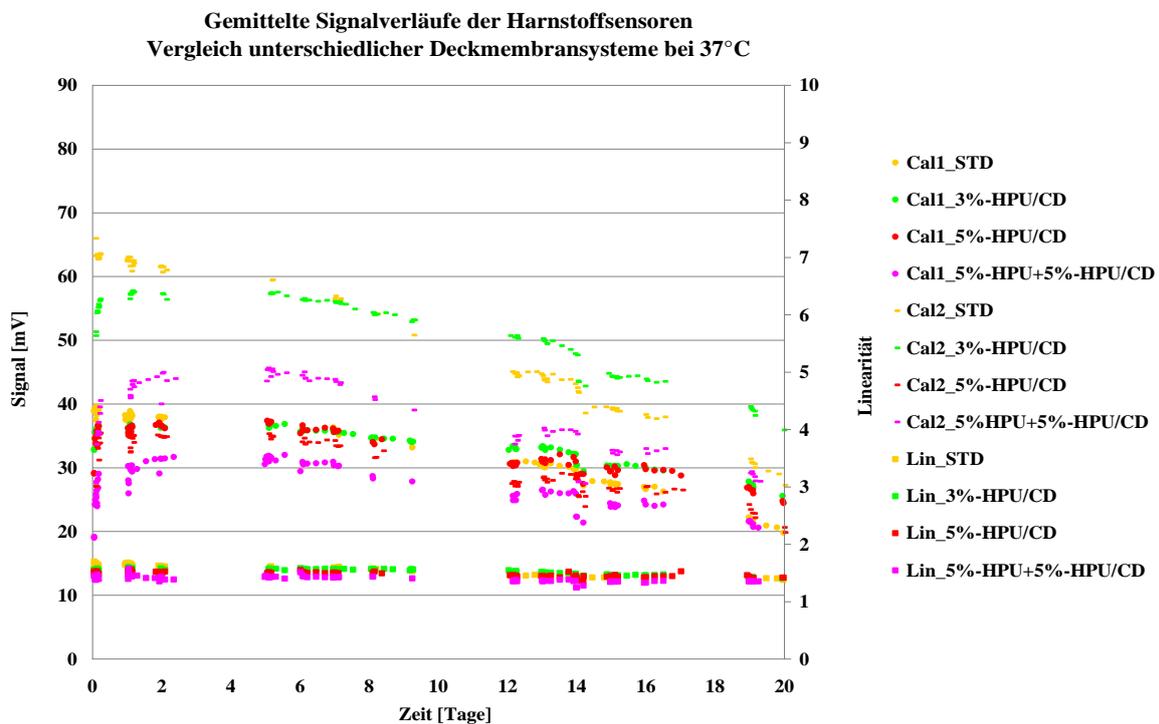


Abbildung 19 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der Harnstoffsensoren - Deckmembransysteme – Los #4 und #5: Abgebildet sind die Diagramme der gemittelten Kalibrationssignale über die Zeit (Cal 1- und Cal 2-Signalverlauf inkl. Linearität) der Harnstoffsensoren des Loses #4 (A)) bzw. des Loses #5 (B)) Quelle: Eigene Abbildung.

Tabelle 6 - Mittlere Standardabweichungen der gemittelten Kalibrationssignale – Los #4.

Quelle: Eigene Tabelle.

mittlere Stabw der Signalverläufe Los #4	ohne Deckmembran	3%-HPU Deckmembran	5%-HPU Deckmembran	3%-HPU+ 3%-HPU/CD Deckmembran
Harnstoff - Cal 1 [mV]	2,58	1,01	1,70	1,63
Harnstoff - Cal 2 [mV]	3,08	1,16	1,92	1,91
Harnstoff – Linearität	0,04	0,04	0,02	0,03

Tabelle 7 - Mittlere Standardabweichungen der gemittelten Kalibrationssignale – Los #5.

Quelle: Eigene Tabelle.

mittlere Stabw der Signalverläufe Los #5	ohne Deckmembran	3%-HPU/CD Deckmembran	5%-HPU/CD Deckmembran	5%-HPU+ 5%-HPU/CD Deckmembran
Harnstoff - Cal 1 [mV]	1,82	1,86	2,64	1,93
Harnstoff - Cal 2 [mV]	2,51	3,30	3,47	3,78
Harnstoff - Linearität	0,04	0,03	0,04	0,05

Für die Untersuchung bzw. den Vergleich der Sensoreigenschaften mit unterschiedlichen Deckmembransystemen wurde, die in Kapitel 3 beschriebene Messreihe (siehe 3.5 *Messreihe*) an verschiedenen Einsatztagen durchgeführt. Die Auswertung der Messeigenschaften der einzelnen Sensoren an den einzelnen Messtagen erfolgte wiederum in der dafür entwickelten MS-Excel-Vorlage (siehe 3.7 *Datenauswertung*). Anschließend wurden die Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen der einzelnen Sensoreigenschaftsparameter jeder Sensorvariante (Los #4 Variante 1-4 und Los #5 Variante 1-4) berechnet und gegenübergestellt (siehe *Tabelle 8* und *Tabelle 9*).

In diesen Tabellen zeigen sich zwar deutliche Unterschiede zwischen einzelnen Sensoreigenschaftsparameter, jedoch war ein Vergleich dieser nicht immer leicht bzw. sinnvoll, da es aufgrund der Deckmembranen zu veränderten Sensorkinetiken gekommen ist. Die durch die Deckmembranen eingebrachten Diffusionslimitierungen werden in dem bestehenden Kalibrationsrechenmodell nicht berücksichtigt was offenbar größere Einflüsse auf die Ergebnisse hat als erwartet. Eine genauere Analyse dieser Ergebnisse findet wiederum in Kapitel 5 der Diplomarbeit statt.

Tabelle 8 - Vergleich der Sensoreigenschaften von unterschiedlichen Deckmembransystemen – Los #4. Quelle: Eigene Tabelle.

je 3 Sensoren von Los #4	ohne Deckmembran		3%ige HPU Deckmembran		5%ige HPU Deckmembran		3%ige HPU + 3%ige HPU/CD Deckmembran	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
Cal 1 Signal [mV]	52,32	2,27	50,36	1,17	51,11	2,33	47,22	2,11
Cal 2 Signal [mV]	77,88	2,01	74,23	1,46	72,52	2,79	63,98	2,91
Linerarität	1,49	0,03	1,47	0,03	1,42	0,02	1,36	0,03
Combitrol Plus B Level 1 [mmol/L]	19,64	0,50	18,57	0,59	17,55	0,96	16,84	2,01
Combitrol Plus B Level 2 [mmol/L]	6,63	0,22	6,20	0,27	5,79	0,35	5,39	0,43
Combitrol Plus B Level 3 [mmol/L]	1,84	0,19	1,59	0,07	1,64	0,26	1,54	0,26
Cal 9 [mmol/L]	7,99	0,35	8,11	0,19	7,92	0,34	8,13	0,42
Cal 10 [mmol/L]	8,76	0,30	8,25	0,28	7,83	0,31	7,44	0,45
Cal 1 vor/nach Proben [%]	-1,60	3,80	2,24	4,75	4,35	5,61	9,55	13,27
Blut/Plasma- Steigung	0,91	0,04	0,92	0,03	0,92	0,02	0,90	0,04
Blut-Steigung	0,88	0,06	0,92	0,07	0,92	0,06	0,99	0,09
Plasma-Steigung	1,00	0,04	0,99	0,05	0,98	0,05	1,06	0,07
Blut- Achsenabschnitt	0,16	0,21	-0,36	0,08	-0,60	0,15	-1,12	0,23
Plasma- Achsenabschnitt	-0,16	0,11	-0,30	0,07	-0,45	0,10	-0,94	0,25
Blut-Syx [mmol/L]	0,18	0,09	0,14	0,04	0,17	0,06	0,28	0,10
Plasma-Syx [mmol/L]	0,14	0,05	0,15	0,04	0,20	0,05	0,38	0,05
Blut/Plasma-Syx [mmol/L]	0,14	0,05	0,09	0,04	0,16	0,05	0,32	0,12

Tabelle 9 - Vergleich der Sensoreigenschaften von unterschiedlichen Deckmembransystemen – Los #5. Quelle: Eigene Tabelle.

je 3 Sensoren von Los #5	ohne Deckmembran		3%ige HPU/CD Deckmembran		5%ige HPU/CD Deckmembran		5%ige HPU + 5%ige HPU/CD Deckmembran	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
Cal 1 Signal [mV]	38,08	1,47	36,49	2,11	36,68	1,48	30,00	2,60
Cal 2 Signal [mV]	61,71	2,22	57,10	4,06	54,84	1,79	42,76	4,92
Linerarität	1,62	0,03	1,56	0,03	1,50	0,03	1,42	0,05
Combitrol Plus B Level 1 [mmol/L]	18,78	0,63	17,20	1,05	16,49	1,42	15,09	1,77
Combitrol Plus B Level 2 [mmol/L]	6,25	0,25	5,66	0,50	5,36	0,36	5,39	0,51
Combitrol Plus B Level 3 [mmol/L]	1,64	0,07	1,52	0,15	1,44	0,11	1,49	0,17
Cal 9 [mmol/L]	7,64	0,28	7,84	0,54	7,84	0,48	7,73	0,87
Cal 10 [mmol/L]	8,19	0,39	7,55	0,51	7,24	0,46	7,08	0,69
Cal 1 vor/nach Proben [%]	-3,30	5,56	0,51	4,82	5,60	6,72	13,22	8,93
Blut/Plasma- Steigung	0,97	0,05	0,94	0,02	0,98	0,04	1,03	0,04
Blut-Steigung	0,95	0,09	0,93	0,11	1,05	0,10	1,19	0,08
Plasma-Steigung	1,00	0,06	0,98	0,09	1,04	0,09	1,12	0,09
Blut- Achsenabschnitt	-0,08	0,19	-0,58	0,16	-1,06	0,31	-1,35	0,36
Plasma- Achsenabschnitt	-0,32	0,20	-0,51	0,16	-0,74	0,29	-0,93	0,41
Blut-Syx [mmol/L]	0,15	0,05	0,12	0,02	0,18	0,06	0,37	0,13
Plasma-Syx [mmol/L]	0,14	0,08	0,15	0,06	0,20	0,07	0,35	0,14
Blut/Plasma-Syx [mmol/L]	0,16	0,04	0,12	0,04	0,21	0,06	0,44	0,15

4.2. Untersuchung der Auswirkungen einer Änderung der Ammoniumionenkonzentration in der Betriebslösung auf die Sensorstabilität und die Sensoreigenschaften (low NH_4^+ vs. high NH_4^+):

Um die Auswirkungen der Änderung der Ammoniumionenkonzentration in der Betriebslösung auf den Sensor zu untersuchen, wurde je zwei MSS-3-fach-Messstand mit dem Reagenziensatz „high NH_4^{+cc} “ bzw. „low NH_4^{+cc} “ betrieben (siehe *Tabelle 3*). In diese Messstände wurden dann jeweils sechs Sensoren des gleichen Sensorloses (= Los #6) eingebaut. Insgesamt wurden somit drei Sensoren mit dem Reagenziensatz „high NH_4^{+cc} “ und drei Sensoren mit dem Reagenziensatz „low NH_4^{+cc} “ betrieben.

Das für dieses Experiment verwendete Kalibrationskonzept entsprach wie in den ersten beiden Experimenten der in Kapitel 3 beschriebenen Methode zur Kalibration des Harnstoffsensors (siehe *3.7 Kalibration des Harnstoffsensors*).

Für die Untersuchung der Auswirkungen der Ammoniumionenkonzentration in der Betriebslösung auf die Sensorsignalstabilität, wurden die Signale der einzelnen Kalibrationslösungen jedes Sensors über die Zeit verfolgt. Die Kalibrationssignale der drei Sensoren jeder Sensorgruppe („high NH_4^{+cc} “ bzw. „low NH_4^{+cc} “) wurden, wie bereits im ersten Experiment beschrieben, zu „definierten Zeitpunkten“ gemittelt.

Die Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale jeder Sensorgruppe wurden dann in je einem Diagramm (Kalibrationssignale (Y-Achse) über Zeit (X-Achse)) für jeden Sensorspot graphisch dargestellt (*siehe Abbildung 20-22*). Somit konnten die Verläufe der Kalibrationssignale der beiden Sensorgruppen („high NH_4^{+cc} “ bzw. „low NH_4^{+cc} “) miteinander verglichen werden.

Hier zeigte sich, dass durch die erhöhte Ammoniumionenkonzentration in der Betriebslösung keine Änderungen der Kalibrationssignalverläufe des Harnstoffsensors erkennbar waren. Das heißt weiters, dass keine Erhöhung der Stabilität des Harnstoffsensors erreicht werden konnte. Auch der Kaliumsensor zeigte keine Unterschiede im Verhalten der Kalibrationssignalverläufe der jeweiligen Kalibrationslösungen. Einzig der native Ammoniumionensensor zeigte eine minimal verbesserte Signalstabilität durch die Änderung der Ammoniumionenkonzentration in der Betriebslösung. Eine genaue Interpretation der Ergebnisse erfolgt in Kapitel 5 der Diplomarbeit.

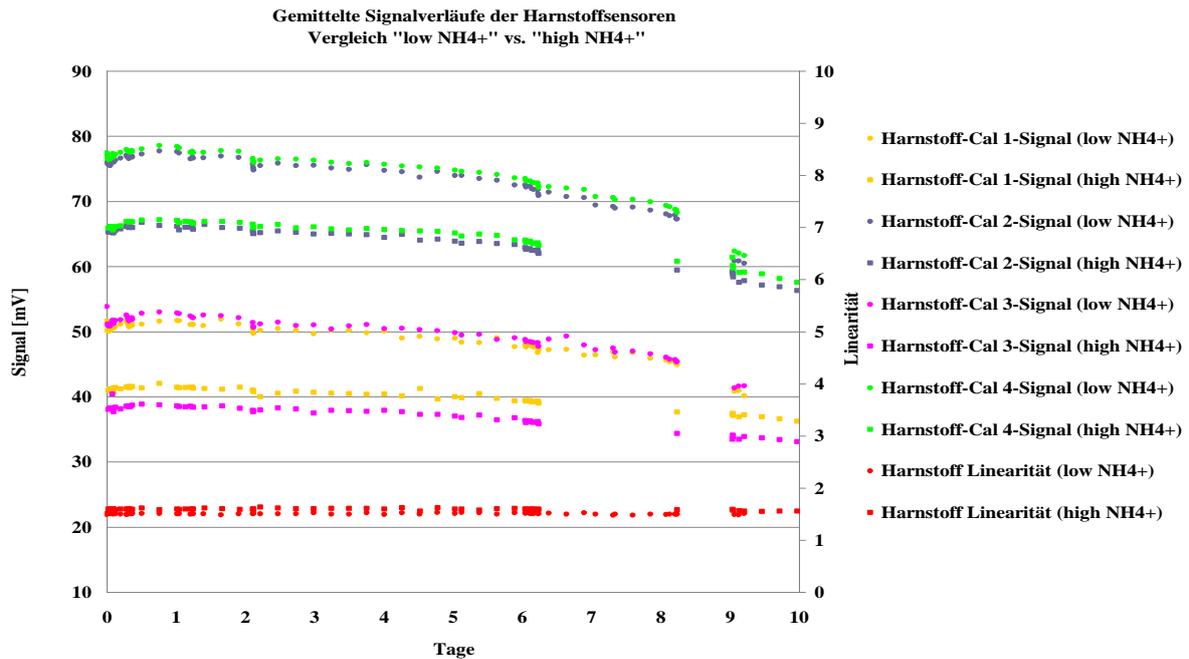


Abbildung 20 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der Harnstoffsensoren „high NH_4^+ “ vs. „low NH_4^+ “ – Los #6: Abgebildet sind gemittelte Kalibrationssignale der Harnstoffsensoren über die Zeit, betrieben mit den Reagenziensätzen „high NH_4^+ “ bzw. „low NH_4^+ “. Quelle: Eigene Abbildung

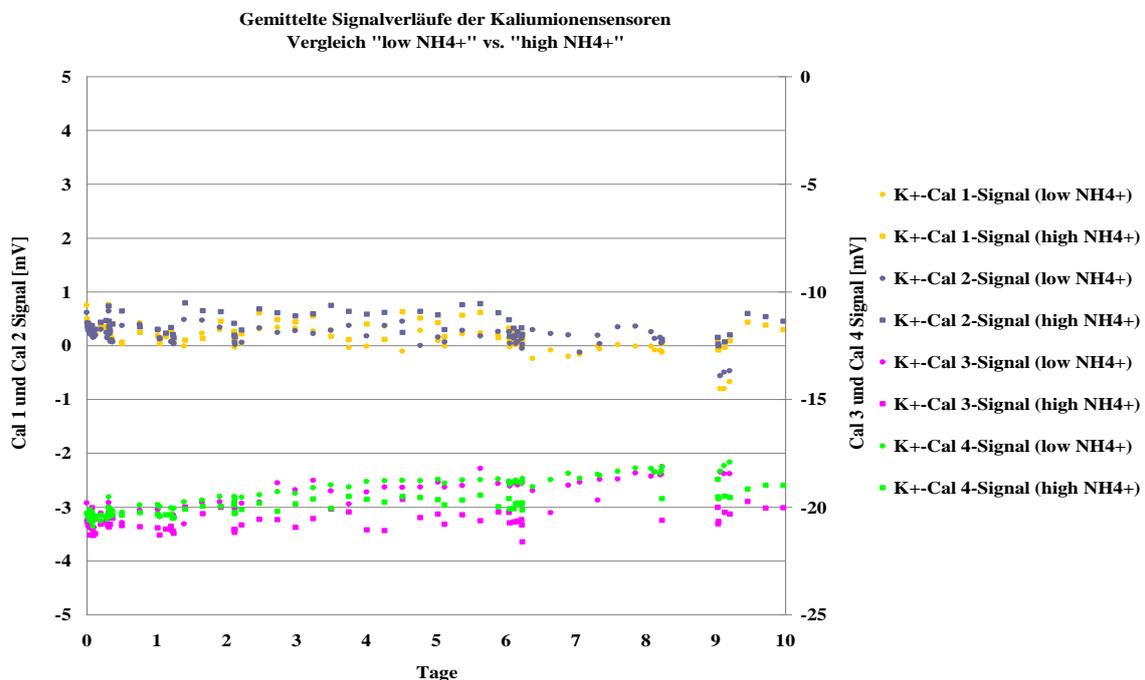


Abbildung 21 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der kaliumionenselektiven Sensoren „high NH_4^+ “ vs. „low NH_4^+ “ – Los #6: Abgebildet sind gemittelte Kalibrationssignale der kaliumionenselektiven Sensoren über die Zeit, betrieben mit den Reagenziensätzen „high NH_4^+ “ bzw. „low NH_4^+ “. Quelle: Eigene Abbildung

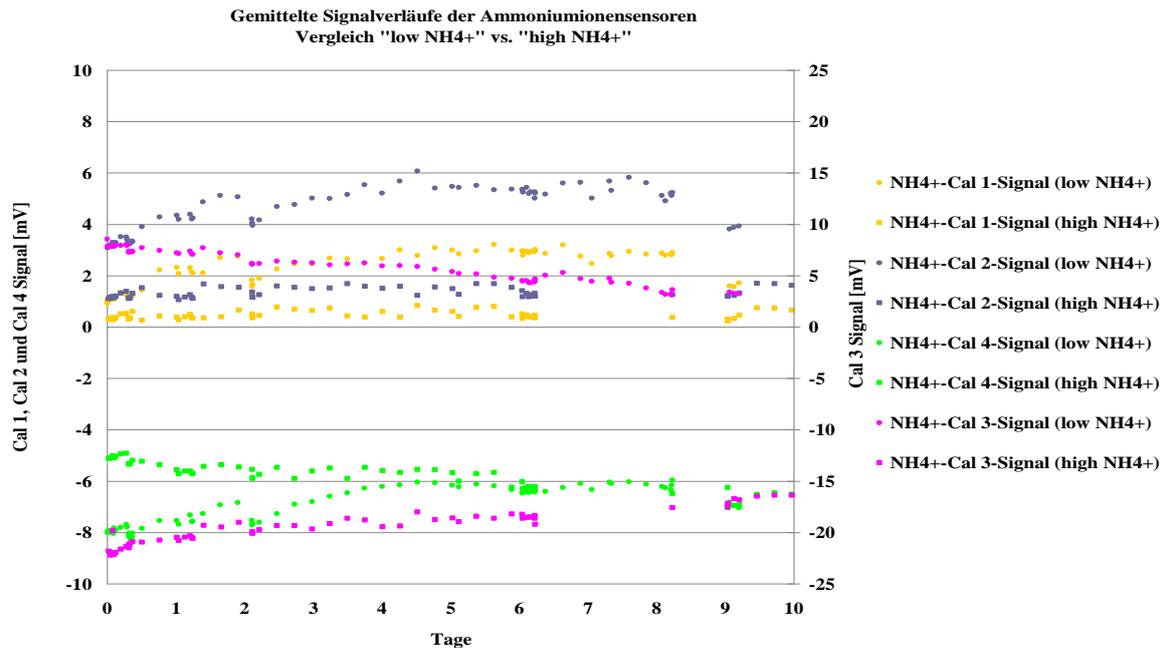


Abbildung 22 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der ammoniumionenselektiven Sensoren „high NH₄⁺“ vs. „low NH₄⁺“ – Los #6: Abgebildet sind gemittelte Kalibrationssignale der ammoniumionenselektiven Sensoren über die Zeit, betrieben mit den Reagenziensätzen „high NH₄⁺“ bzw. „low NH₄⁺“. Quelle: Eigene Abbildung

Zur Abschätzung der Streuung der gemittelten Kalibrationssignale des Loses #6 (siehe Abbildung 20-22) wurden wiederum die mittleren Standardabweichungen dieser berechnet und in der folgenden Tabelle zusammengefasst (siehe Tabelle 10):

Tabelle 10 - Mittlere Standardabweichungen der gemittelten Kalibrationssignale – Los #6. Quelle: Eigene Tabelle.

mittlere Stabw der Signalverläufe Los #6	„high NH ₄ ⁺ “	„low NH ₄ ⁺ “
NH ₄ ⁺ - Cal 1 [mV]	0,06	0,28
NH ₄ ⁺ - Cal 2 [mV]	0,07	0,42
NH ₄ ⁺ - Cal 3 [mV]	0,57	0,35
NH ₄ ⁺ - Cal 4 [mV]	0,19	0,51
K ⁺ - Cal 1 [mV]	0,07	0,11
K ⁺ - Cal 2 [mV]	0,06	0,09
K ⁺ - Cal 3 [mV]	0,60	0,50
K ⁺ - Cal 4 [mV]	0,42	0,42
Harnstoff - Cal 1 [mV]	0,59	0,90
Harnstoff - Cal 2 [mV]	0,77	0,94
Harnstoff - Cal 3 [mV]	0,60	0,83
Harnstoff - Cal 4 [mV]	0,74	0,88
Harnstoff – Linearität	0,01	0,02

Für die Untersuchung bzw. den Vergleich der Sensoreigenschaften bei Verwendung von unterschiedlichen Ammoniumionenkonzentrationen in der Betriebslösung wurde wiederum, die in Kapitel 3 beschriebene Messreihe (siehe 3.5 *Messreihe*) an verschiedenen Einsatztagen durchgeführt. Die Auswertung der Messeigenschaften der einzelnen Sensoren an den einzelnen Messtagen erfolgte in der dafür entwickelten MS-Excel-Vorlage (siehe 3.7 *Datenauswertung*). Anschließend wurden die Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen der einzelnen Sensoreigenschaftsparameter jeder Sensorgruppe („high NH₄⁺“ bzw. „low NH₄⁺“) berechnet und in einer Tabelle gegenübergestellt (siehe *Tabelle 11*)

Bei diesem Vergleich konnten keine signifikanten Unterschiede und somit keine Verbesserung der Sensoreigenschaftsparameter aufgrund der Änderung der Ammoniumionenkonzentration festgestellt werden. Die Unterschiede der Parameter Cal 1 Signal, Cal 2 Signal und Linearität können durch den Einsatz der unterschiedlichen Reagenzsätze erklärt werden. Sämtliche Parameter liegen innerhalb der Sensorspezifikationen.

Tabelle 11 - Vergleich der Sensoreigenschaften bei Verwendung von unterschiedlichen Ammoniumionenkonzentrationen in der Betriebslösung– Los #6. Quelle: Eigene Tabelle.

je 6 Sensoren von Los #6	„low NH ₄ ⁺ “		„high NH ₄ ⁺ “	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw
Cal 1 Signal [mV]	49,75	2,06	40,60	1,26
Cal 2 Signal [mV]	74,77	3,03	64,53	2,00
Linerarität	1,50	0,01	1,59	0,01
Combitrol Plus B Level 1 [mmol/L]	20,12	0,32	20,00	0,22
Combitrol Plus B Level 2 [mmol/L]	6,67	0,15	6,81	0,10
Combitrol Plus B Level 3 [mmol/L]	1,62	0,10	1,80	0,07
Cal 9 [mmol/L]	7,78	0,35	7,92	0,21
Cal 10 [mmol/L]	8,71	0,27	8,92	0,15
Cal 1 vor/nach Proben [%]	-0,76%	2,02%	-0,60%	1,13%
Blut/Plasma-Steigung	0,97	0,05	0,95	0,02
Blut-Steigung	1,00	0,05	0,98	0,02
Plasma-Steigung	1,05	0,02	1,06	0,02
Blut-Achsenabschnitt	-0,24	0,16	0,03	0,11
Plasma-Achsenabschnitt	-0,35	0,05	-0,19	0,09
Blut-Syx [mmol/L]	0,18	0,08	0,15	0,03
Plasma-Syx [mmol/L]	0,18	0,05	0,16	0,02
Blut/Plasma-Syx [mmol/L]	0,12	0,02	0,08	0,02

4.3. Entwicklung eines neuen Kalibrationskonzepts für die Integration des Harnstoffsensors in das neue Blutgasanalyse-System

Zur Entwicklung eines neuen Kalibrationskonzepts wurden fünf Sensoren des Loses #7 (= #7-01 bis #7-05) und vier Sensoren des Loses #8 (= #8-01 bis #8-04) in MSS-3-fach-Messstände eingesetzt. Die drei Messstände wurden mit dem Reagenzsatz „high NH₄⁺“ (siehe *Tabelle 3*) bei 37°C betrieben. Zur Generierung von Messdaten für die Entwicklung bzw. Beurteilung der verschiedenen Kalibrationskonzepte, wurde die in Kapitel 3 beschriebene Messreihe (siehe *3.5 Messreihe*) an den Einsatztagen 1, 2, 3, 4 und 8 durchgeführt.

Die durch diese Messreihen erhaltenen Sensorsignale der biologischen Proben (Blut und Plasma) wurden anschließend mit Hilfe von verschiedenen Kalibrationsrechenmodellen in Harnstoffkonzentrationen umgerechnet. Hierbei wurden nur jene Messreihen berücksichtigt, bei denen die Sensoren die Messungen der Qualitätskontrolllösungen (Combitrol Plus B Level 1-3) mit dem ursprünglichen Kalibrationsrechenmodell (siehe *3.3. Kalibrationskonzept des Harnstoffsensors*) innerhalb der Grenzen (siehe *Abbildung 15*) schafften.

Die berechneten Harnstoffkonzentrationen der jeweiligen Kalibrationsrechenmodelle wurden dann den gemessenen Harnstoff-Referenzwerten (siehe *3.6 Referenzmessung*) in XY-Punktdiagrammen gegenübergestellt (siehe *Abbildung 23-29*). Durch diese Punkte wurde dann eine Regressionsgerade gelegt (blaue Linie) und die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß (R²) dieser berechnet. Insgesamt wurden 560 Messungen (Probenanzahl = n) von biologischen Proben (Blut und Plasma) für den Vergleich herangezogen. Zusätzlich wurde die mittlere Abweichung der Messpunkte zur Trendlinie (= „Syx-Wert“) berechnet. Die oberen und unteren Grenzen der „Richtigkeit“ (grüne Linien), sowie der „Richtigkeit + 2 Stabw“ (rote Linien) sind ebenfalls in diesen Diagrammen abgebildet. Diese Grenzen entsprechen den Sensorspezifikationen der G/L/U-Sensorkassette von Roche Diagnostics GmbH für das Blutgasanalyse-System **cobas**[®] b221. Laut den Spezifikationen muss die Regressionsgerade durch die, mit dem jeweiligen Kalibrationsrechenmodell, berechneten Harnstoffkonzentrationen und den Harnstoff-Referenzwerten innerhalb der Grenzen der „Richtigkeit“ liegen. Des Weiteren müssen 95% aller berechneten Harnstoffwerte innerhalb der Grenzen der „Richtigkeit + 2 Stabw“ liegen.

Am Ende des Versuches konnten die einzelnen Kalibrationsmodelle miteinander verglichen werden. Als Referenz wurde das ursprüngliche Kalibrationsrechenmodell der Messstände (siehe *3.3. Kalibrationskonzept des Harnstoffsensors*) herangezogen (siehe *Abbildung 23*).

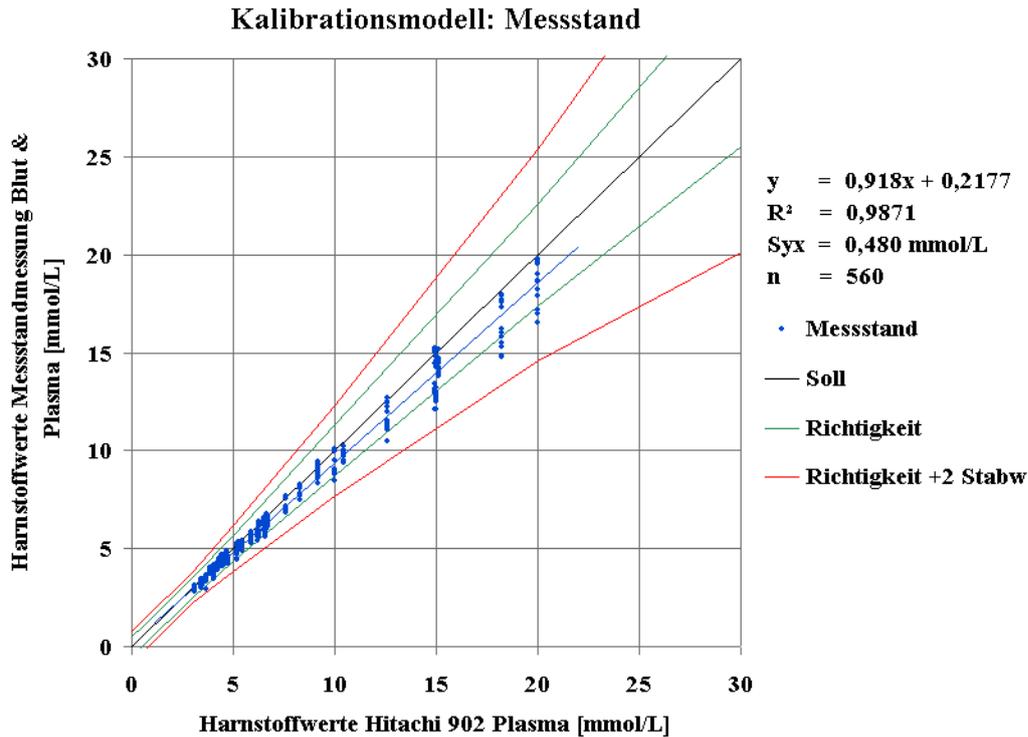


Abbildung 23 – Vergleich der mit dem Kalibrationsmodell „Messstand“ berechneten Harnstoffwerte zu den mit Hitachi 902 gemessenen Referenzwerten: In diesem Diagramm ist die Regressionsgerade (blaue Linie) durch die Datenpunkte, die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß (R^2) dargestellt. Zusätzlich abgebildet sind der S_{yx} -Wert, die Probenanzahl (n), die Lage einer optimalen Trendlinie (= Soll / schwarze Linie) und die im Text beschriebenen Grenzen der „Richtigkeit“ (grüne Linien), sowie der „Richtigkeit + 2 Stabw“ (rote Linien).

Um den Anforderungen (siehe 1.2 Aufgabenstellung) der beschränkten Anzahl von Kalibrationslösungen (maximal 3) und der beschränkten Anzahl von Sensorspots (maximal 2) an das neue Kalibrationskonzept gerecht zu werden wurden insgesamt vier verschiedene Lösungsansätze entwickelt.

Bei allen Lösungsansätzen wurde auf die Betrachtung des nativen ammoniumionenselektiven Sensorspots und somit auf die Korrektur der Harnstoffwerte um die Ammoniumionenkonzentration der Probe verzichtet. Da der Einfluss der Ammoniumionenkonzentration in Blut- bzw. Plasmaproben auf die Messung der Harnstoffkonzentration im physiologischen Normalbereich sehr gering ist (siehe 2.7.2. Beschreibung des verwendeten Sensors), kann auf diese Korrektur verzichtet werden. Somit

würde man mit zwei Sensorspots für den gesamten Sensor (Kaliumionensensor und Harnstoffsensor) auskommen. Des Weiteren wurde bei allen Lösungsansätzen auf Harnstoff in den Kalibrationslösungen verzichtet. Sämtliche neu entwickelten Kalibrationskonzepte verwenden ausschließlich die Kalibrationslösungen Standby, Cal 3 und Cal 4 des Reagenziensatzes „high NH₄⁺“ (siehe *Tabelle 3*). Die einzelnen Lösungsansätze zur Entwicklung eines neuen Kalibrationskonzepts werden in der folgenden Aufzählung beschrieben und die Ergebnisse dieser in den bereits beschriebenen Diagrammen dargestellt:

– *Kalibrationskonzept 1: „Chargenparameter“*

Für das Kalibrationskonzept „Chargenparameter“ wurde zuerst die durchschnittliche prozentuelle Abnahme von Harnstoff-Cal 1- und Harnstoff-Cal 2-Signalen von insgesamt 39 Sensoren aus zehn unterschiedlichen Losen (ohne Los #7 und #8 / betrieben über zehn Tage bei 37°C) tagfein berechnet (siehe *Tabelle 12*). Anschließend wurden die mittleren Harnstoff-Cal 1- und Harnstoff-Cal 2-Signale der ersten 24 Stunden der beiden Sensorlose #7 und #8 berechnet. Dies war möglich, da die Messstände für diese Untersuchung, wie bereits erwähnt, mit allen Kalibrationslösungen betrieben wurden. Neben den Kalibrationslösungen Cal 3 und Cal 4 (für die Grundkalibration der ammoniumionenselektive Membran des Harnstoffsensors) wurden die mittleren Harnstoff-Cal 1- und Harnstoff-Cal 2-Signale des ersten Tages des jeweiligen Loses (#7 bzw. #8), zur Kalibration der Harnstoffsensoren am gesamten ersten Tag herangezogen. Für die weiteren Einsatztage wurden die Harnstoffsensoren auf die gleiche Art, ausgehend von den mittleren Harnstoff-Cal 1- und Harnstoff-Cal 2-Signalen des ersten Tages und der mittleren prozentuellen Abnahme der Kalibrationssignale über die Zeit kalibriert. Der Kaliumionensensor wird in diesem Kalibrationskonzept wie im ursprünglichen Kalibrationskonzept kalibriert.

Für die Integration der Harnstoffsensoren in das Zielsystem (wo die Kalibrationslösungen Cal 1 und Cal 2 nicht verwendet werden können) müssten zuerst einige Sensoren eines Loses (je nach Losgröße) mit den Kalibrationslösungen Cal 1 und Cal 2 anstelle von Cal 3 und Cal 4 für 24 Stunden betrieben werden, um ausschließlich die mittleren Harnstoff-Cal 1- und Harnstoff-Cal 2-Signale des ersten Tages zu ermitteln. Anschließend könnte man diese ermittelten Werte für die Kalibration aller anderen Sensoren des Loses als fixe Chargenparameter anwenden und die Sensoren im Gerät nur mit den Kalibrationslösungen Cal 3 und Cal 4 betreiben.

Tabelle 12 – Prozentuelle Abnahme der Kalibrationssignale Harnstoff-Cal 1-Signal und Harnstoff-Cal 2-Signal über die Zeit. Quelle: Eigene Tabelle.

Ø 39 Sensoren aus 10 Losen	Mw		Stabw	
	Harnstoff-Cal 1	Harnstoff-Cal 2	Harnstoff-Cal 1	Harnstoff-Cal 2
1	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
2	-0,40%	-0,50%	0,79%	0,88%
3	-1,54%	-2,49%	1,10%	2,24%
4	-2,50%	-2,85%	1,10%	1,61%
5	-3,59%	-4,11%	0,80%	1,29%
6	-5,14%	-5,50%	1,29%	1,51%
7	-6,97%	-7,65%	1,84%	2,36%
8	-8,09%	-9,56%	2,24%	2,87%
9	-10,38%	-12,11%	2,92%	3,67%
10	-12,12%	-14,55%	4,04%	4,47%

Die durch das eben beschriebene Kalibrationsrechenmodell berechneten Harnstoffkonzentrationen wurden den gemessenen Harnstoff-Referenzwerten in folgendem XY-Punktogramm gegenübergestellt (siehe *Abbildung 24*):

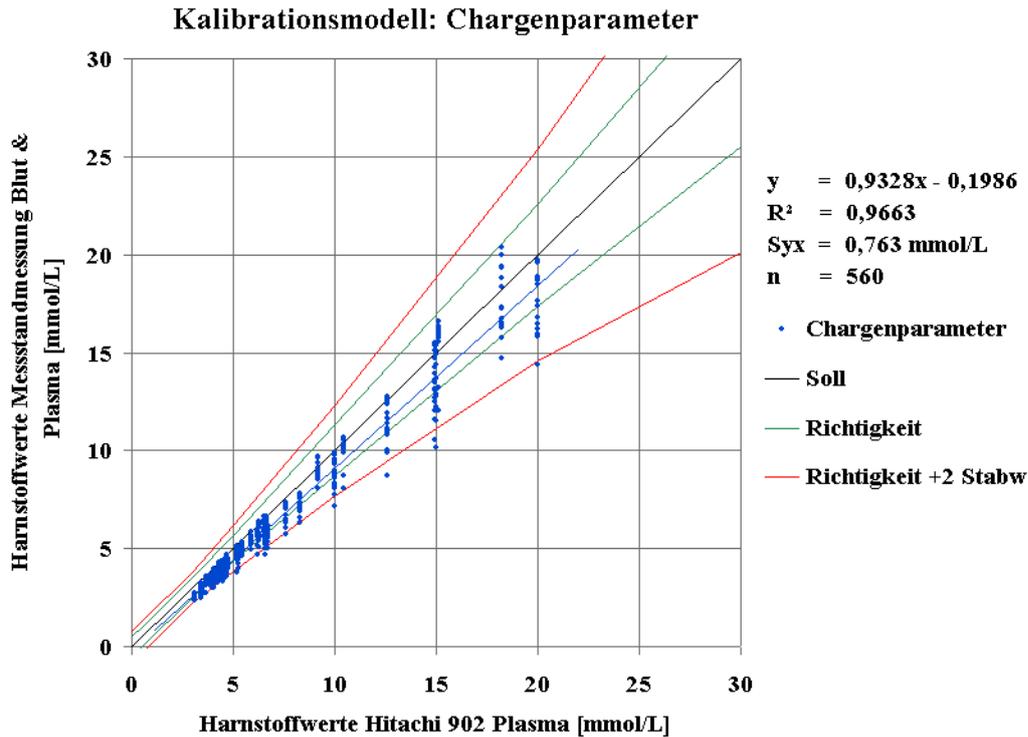


Abbildung 24 – Vergleich der mit dem Kalibrationsmodell „Chargenparameter“ berechneten Harnstoffwerte zu den mit Hitachi 902 gemessenen Referenzwerten: In diesem Diagramm ist die Regressionsgerade (blaue Linie) durch die Datenpunkte, die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß (R^2) dargestellt. Zusätzlich abgebildet sind der Syx -Wert, die Probenanzahl (n), die Lage einer optimalen Trendlinie (= Soll / schwarze Linie) und die im Text beschriebenen Grenzen der „Richtigkeit“ (grüne Linien), sowie der „Richtigkeit + 2 Stabw“ (rote Linien).

– Kalibrationskonzept 2: „Kontrollmittelkalibration“

Für das Kalibrationsmodell „Kontrollmittelkalibration“ werden die externen Messungen der Qualitätskontrolllösungen (Combitrol Plus B Level 1 und Level 2) für die Kalibration des Harnstoffsensors herangezogen. Da diese jeden Tag vermessen werden müssen, kann man sie für die Kalibration des Harnstoffsensors für 24 Stunden heranziehen. Es wurden zwei unterschiedliche Rechenmodelle für „Kontrollmittelkalibrationen“ entworfen. Einmal wurde eine 2-Punktkalibration mit den Kontrollmitteln Combitrol Plus B Level 1 und Combitrol Plus B Level 2 entwickelt. Das zweite Modell beruht auf einer 1-Punktkalibration mit dem Kontrollmittel Combitrol Plus B Level 2. Je nach Art der „Kontrollmittelkalibration“ dürften die zur Kalibration verwendeten Kontrollmittel nicht mehr als solche angesehen werden. Der

Kaliumionensensor wird in diesem Kalibrationskonzepten wiederum wie im ursprünglichen Kalibrationskonzept kalibriert.

Ein sehr ähnliches Kalibrationskonzept welches Qualitätskontrolllösungen für die Kalibration von Sensoren in Blutgasanalysegeräten benutzt, wurde bereits von der Firma Radiometer Medical ApS patentiert [78]. Somit kann dieses Konzept nicht ohne Weiters in einem Blutgasanalyse-System eingesetzt werden, das kommerziell erhältlich ist.

Die durch die eben beschriebenen Varianten des Kalibrationsrechenmodell „Kontrollmittelkalibration“ berechneten Harnstoffkonzentrationen wurden den gemessenen Harnstoff-Referenzwerten in folgenden XY-Punktdiagrammen gegenübergestellt (siehe *Abbildung 25-26*):

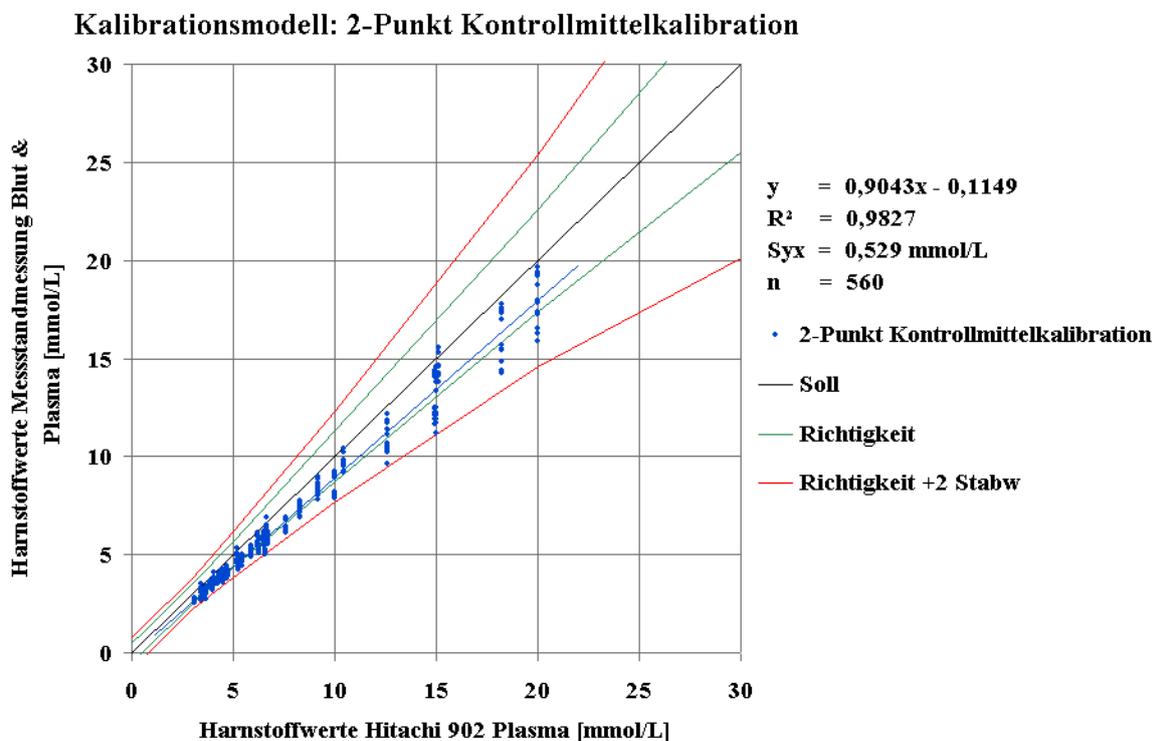


Abbildung 25 – Vergleich der mit dem Kalibrationsmodell „2-Punkt Kontrollmittelkalibration“ berechneten Harnstoffwerte zu den mit Hitachi 902 gemessenen Referenzwerten: In diesem Diagramm ist die Regressionsgerade (blaue Linie) durch die Datenpunkte, die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß (R^2) dargestellt. Zusätzlich abgebildet sind der S_{yx} -Wert, die Probenanzahl (n), die Lage einer optimalen Trendlinie (= Soll / schwarze Linie) und die im Text beschriebenen Grenzen der „Richtigkeit“ (grüne Linien), sowie der „Richtigkeit + 2 Stabw“ (rote Linien).

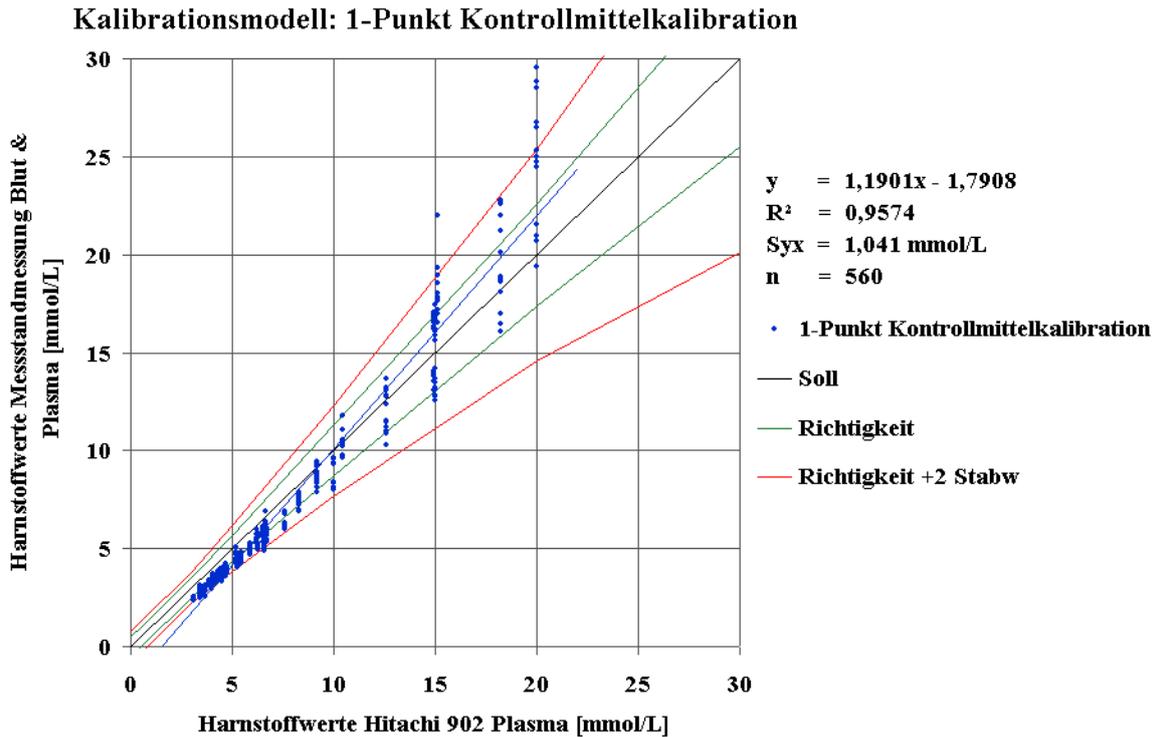


Abbildung 26 – Vergleich der mit dem Kalibrationsmodell „1-Punkt Kontrollmittelkalibration“ berechneten Harnstoffwerte zu den mit Hitachi 902 gemessenen Referenzwerten: In diesem Diagramm ist die Regressionsgerade (blaue Linie) durch die Datenpunkte, die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß (R^2) dargestellt. Zusätzlich abgebildet sind der Syx-Wert, die Probenanzahl (n), die Lage einer optimalen Trendlinie (= Soll / schwarze Linie) und die im Text beschriebenen Grenzen der „Richtigkeit“ (grüne Linien), sowie der „Richtigkeit + 2 Stabw“ (rote Linien).

– Kalibrationskonzept 3: „Kombinationskalibration“

Das Kalibrationskonzept „Kombinationskalibration“ ist, wie der Name schon sagt eine kombinierte Variante aus den beiden Kalibrationskonzepten „Chargenparameter“ und „Kontrollmittelkalibration“. Hierfür werden wiederum die externen Messungen der Qualitätskontrolllösungen (Combitrol Plus B Level 1 und Level 2) für die Kalibration des Harnstoffsensors herangezogen. Diese werden jedoch anders als beim Kalibrationskonzept „Kontrollmittelkalibration“ nur einmal am ersten Tag (ca. eine Stunde nach dem Einsatz der Sensoren) vermessen und für die Kalibration des Harnstoffsensors für den ersten Einsatztag herangezogen. Für die weiteren Einsatztage werden die Kalibrationsdaten ausgehend von diesen Messungen und unter Berücksichtigung der Signalabnahme über die Zeit für jeden

Tag neu berechnet (siehe *Tabelle 12*). Im Zuge der Diplomarbeit wurden wiederum zwei unterschiedliche Rechenmodelle für die „Kombinationskalibration“ entworfen. Einmal wurde eine 2-Punktkalibration mit den Kontrollmitteln Combitrol Plus B Level 1 und Level 2 entwickelt. Das zweite Modell beruht auf einer 1-Punktkalibration mit dem Kontrollmittel Combitrol Plus B Level 2. Bei dieser Kalibration dürften die verwendeten Kontrollmittel (Combitrol Plus B Level 1 und Level 3) weiterhin als Kontrollmittel verwendet werden. Der Kaliumionensensor wird in diesen Kalibrationskonzepten wiederum wie im ursprünglichen Kalibrationskonzept kalibriert. Die durch die eben beschriebenen Varianten des Kalibrationsrechenmodell „Kombinationskalibration“ berechneten Harnstoffkonzentrationen wurden den gemessenen Harnstoff-Referenzwerten in folgenden XY-Punktdiagrammen gegenübergestellt (siehe *Abbildung 27-28*):

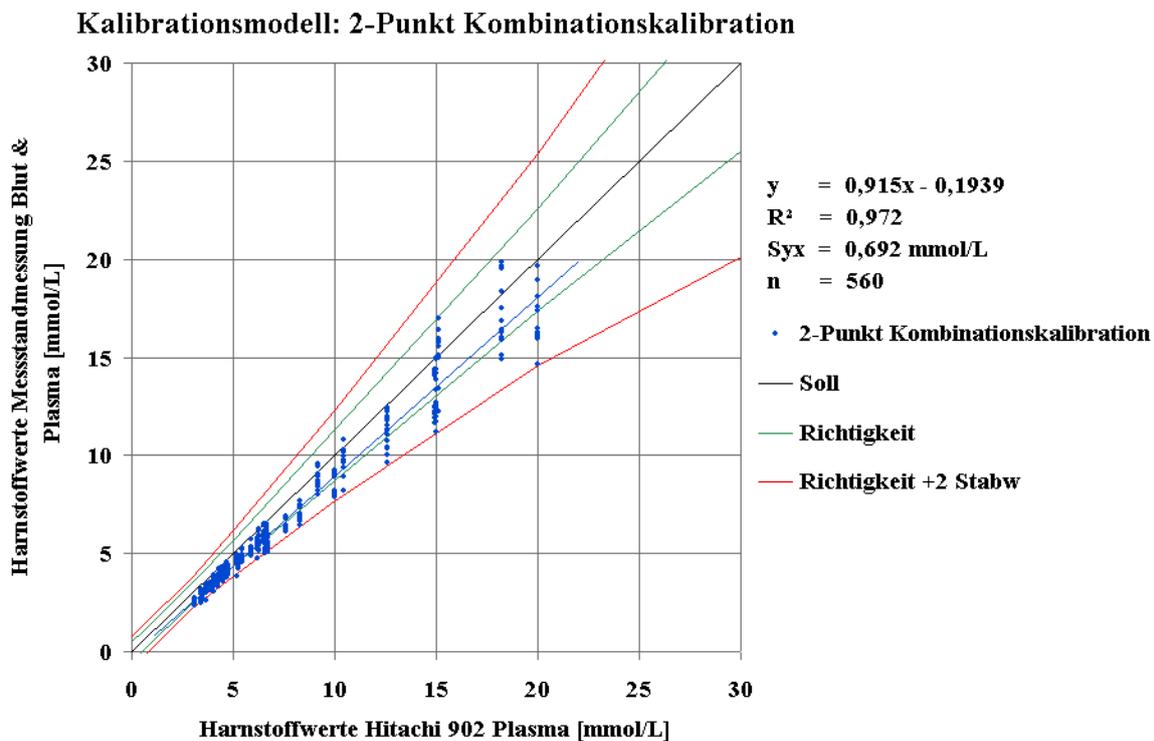


Abbildung 27 – Vergleich der mit dem Kalibrationsmodell „2-Punkt Kombinationskalibration“ berechneten Harnstoffwerte zu den mit Hitachi 902 gemessenen Referenzwerten: In diesem Diagramm ist die Regressionsgerade (blaue Linie) durch die Datenpunkte, die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß (R^2) dargestellt. Zusätzlich abgebildet sind der Syx-Wert, die Probenanzahl (n), die Lage einer optimalen Trendlinie (= Soll / schwarze Linie) und die im Text beschriebenen Grenzen der „Richtigkeit“ (grüne Linien), sowie der „Richtigkeit + 2 Stabw“ (rote Linien).

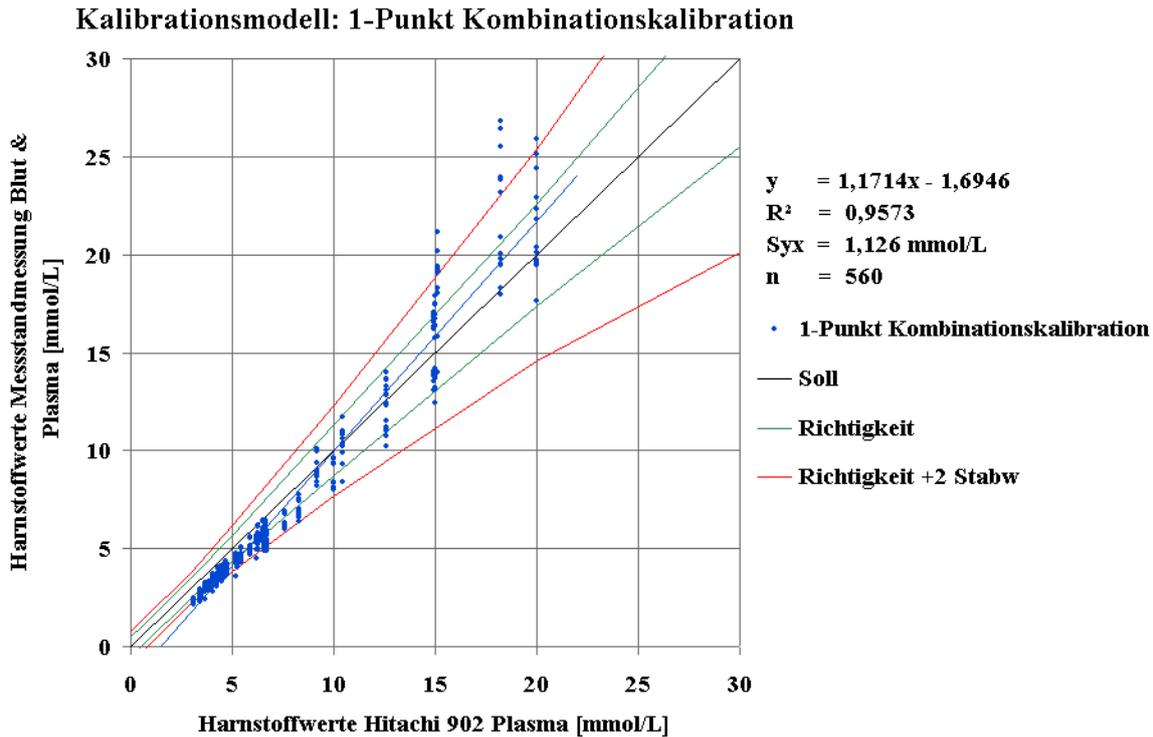


Abbildung 28 – Vergleich der mit dem Kalibrationsmodell „1-Punkt Kombinationskalibration“ berechneten Harnstoffwerte zu den mit Hitachi 902 gemessenen Referenzwerten: In diesem Diagramm ist die Regressionsgerade (blaue Linie) durch die Datenpunkte, die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß (R^2) dargestellt. Zusätzlich abgebildet sind der S_{yx} -Wert, die Probenanzahl (n), die Lage einer optimalen Trendlinie (= Soll / schwarze Linie) und die im Text beschriebenen Grenzen der „Richtigkeit“ (grüne Linien), sowie der „Richtigkeit + 2 Stabw“ (rote Linien).

– Kalibrationskonzept 4: „Kalibration als reiner NH_4^+ -Sensor“

Für das Kalibrationsmodell „Kalibration als reiner NH_4^+ -Sensor“ wird der Harnstoffsensor mit den Kalibrationslösungen Cal 3 und Cal 4 so kalibriert, als ob es sich um einen nativen Ammoniumionensensor handelt. Hierfür wurde die abgewandelte Form der Nikolski-Eisenman Gleichung (siehe 3.3 Kalibrationskonzept des Harnstoffsensors) aus dem ursprünglichen Kalibrationskonzept herangezogen und ein Umrechnungsfaktor von 0,5 eingefügt, da laut Reaktionsgleichung der Urease ein Molekül Harnstoff in zwei Moleküle NH_4^+ gespalten wird (siehe Gleichung 3). Dieser Faktor dient zur Umrechnung der gemessenen Ammoniumionenkonzentration in die Harnstoffkonzentration der Probe. Der

Kaliumionensensor wird in diesen Kalibrationskonzepten wiederum wie im ursprünglichen Kalibrationskonzept kalibriert.

Die durch das Kalibrationsrechenmodell „Kalibration als reiner NH_4^+ -Sensor“ berechneten Harnstoffkonzentrationen wurden den gemessenen Harnstoff-Referenzwerten in folgenden XY-Punktdiagrammen gegenübergestellt (siehe *Abbildung 29*):

Eine Auflistung der ermittelten Steigungen, der Bestimmtheitsmaße, der mittleren Standardfehler und des jeweiligen Achsenabschnittes, der unterschiedlichen XY-Punktdiagramme der Kalibrationsmodelle in *Tabelle 13* wiedergegeben (siehe *Tabelle 13*).

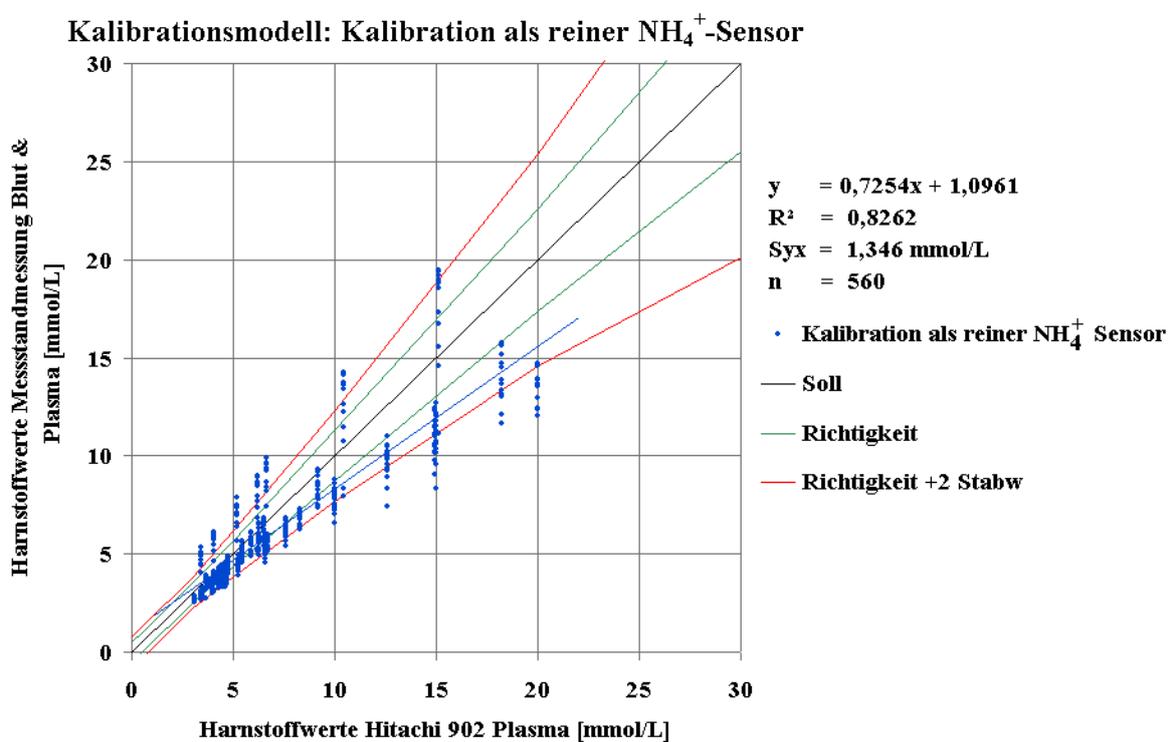


Abbildung 29 – Vergleich der mit dem Kalibrationsmodell „Kalibration als reiner NH_4^+ -Sensor“ berechneten Harnstoffwerte zu den mit Hitachi 902 gemessenen Referenzwerten: In diesem Diagramm ist die Regressionsgerade (blaue Linie) durch die Datenpunkte, die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß (R^2) dargestellt. Zusätzlich abgebildet sind der S_{yx} -Wert, die Probenanzahl (n), die Lage einer optimalen Trendlinie (= Soll / schwarze Linie) und die im Text beschriebenen Grenzen der „Richtigkeit“ (grüne Linien), sowie der „Richtigkeit + 2 Stabw“ (rote Linien).

Tabelle 13 – Zusammenfassung der Parameter der linearen Regressionen der unterschiedlichen Kalibrationsmodelle. Quelle: Eigene Tabelle.

Kalibrationsmodell	R²	Steigung	Achsenabschnitt [mmol/L]	Syx [mmol/L]
Messstand	0,987	0,918	0,218	0,480
Chargenparameter	0,966	0,933	-0,199	0,763
2-Punkt Kontrollmittelkalibration	0,983	0,904	-0,115	0,529
1-Punkt Kontrollmittelkalibration	0,957	1,190	-1,791	1,041
2-Punkt Kombinationskalibration	0,972	0,915	-0,194	0,692
1-Punkt Kombinationskalibration	0,957	1,171	-1,695	1,126
Kalibration als reiner NH₄⁺-Sensor	0,826	0,725	1,096	1,346

5. Diskussion

Um die Auswirkungen der Temperaturänderung des Messsystems von 30°C auf 37°C auf das Sensorsystem zu untersuchen, wurde ein Experiment insgesamt drei Mal durchgeführt (siehe *4.1. Untersuchung der Enzymstabilität bzw. Sensorstabilität, sowie der Sensoreigenschaften bei veränderter Betriebstemperatur (30°C vs. 37°C)*). Dies war so geplant um eine große Menge an Daten zu generieren und um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen. Darüber hinaus wäre es jedoch ohnehin notwendig gewesen, da es bei der ersten bzw. der zweiten Durchführung des Experiments zu Problemen mit den Messständen kam. Aufgrund von Befüllproblemen in den Messständen konnten nur wenige Kalibrationsdaten für die Berechnung der mittleren Kalibrationssignale der Sensoren einer Sensorgruppe (30°C bzw. 37°C) über die Zeit herangezogen werden. Für diese Berechnung der mittleren Kalibrationssignale wurden die Kalibrationssignale aller Sensoren einer Sensorgruppe zu „definierten Zeitpunkten“ gemittelt (siehe *4.1. Untersuchung der Enzymstabilität bzw. Sensorstabilität, sowie der Sensoreigenschaften bei veränderter Betriebstemperatur (30°C vs. 37°C)*). Wurde einer oder mehrere der Sensoren einer Sensorgruppe nicht erfolgreich kalibriert, wurden keine Mittelwerte der Kalibrationssignale berechnet.

Diese häufigen Befüllprobleme konnten auf zwei Ursachen zurückgeführt werden. Erstens waren die verwendeten Messstände schon alt und deren Elektronik und PC-Umgebung anfällig für interne Fehler. So konnte man z.B. manchmal beobachten dass die Magnetventile während einer Kalibration nicht richtig geschaltet haben, dass sich die Peristaltikpumpen nicht gedreht haben oder dass die Software nicht mehr reagierte. Dies waren jedoch nur gelegentliche Fehler die sich nicht verhindern bzw. ausbessern ließen. Die Hauptursache für die Befüllfehler war jedoch Mikroorganismenbewuchs bzw. Ablagerungen im Messsystem („Fouling“). Dies führte zu verschmutzten Schläuchen und verschmutzten Sample-Sensoren. Aufgrund dessen wurde die Fluidik der Messstände beeinflusst. Der Bewuchs der Sample-Sensoren hatte zur Folge, dass die Position der Proben bzw. Kalibrationsflüssigkeiten im Messstand nicht mehr richtig erkannt wurden. Dies führt dazu, dass die Flüssigkeiten über den Bypass ausgespült wurden ohne vermessen zu werden. Diese Probleme konnten in weiterer Folge durch eine eingeführte Dekontaminations- und Reinigungsroutine (am Ende jedes Experiments) und durch gelegentliche Wechsel der Schlauchsysteme im Messstand unterbunden werden.

Ein Befüllfehler äußert sich in den Kalibrationsdaten z.B. durch das Fehlen von einzelnen Kalibrationssignalen (z.B. Harnstoff Cal 1 Signal ≈ 0 mV alle anderen Signale OK). Ist ein

Befüllfehler so gravierend, dass es zu keinem vollständigen Kalibrationszyklus im Messsystem kommt, wird dies in der Benutzeroberfläche der Software mit „Flüssigkeitfehler“ angezeigt. So ein „Flüssigkeitsfehler“ hat zur Folge, dass die automatischen Kalibrationen des Messsystems (alle acht Stunden) nicht aufgerufen werden. Somit kommt es zu keiner Kalibration bis zur nächsten manuell aufgerufenen Kalibration. In den Diagrammen der gemittelten Kalibrationsverläufe über die Zeit äußern sich solche Flüssigkeitsfehler als „Datenlücken“ da hier keine automatischen Kalibrationen durchgeführt wurden (vor allem bei „Flüssigkeitsfehlern“ an Wochenenden oder Feiertagen → exemplarisch siehe *Anhang Abbildung 33 A*)).

Unter anderem aufgrund solcher „Datenlücken“ wurde, wie bereits erwähnt, die Untersuchung der Auswirkungen der Temperaturänderung des Messsystems von 30°C auf 37°C auf das Sensorsystem insgesamt drei Mal durchgeführt. Bei allen drei Versuchen konnte man bei der 37°C Sensorgruppe eine Abnahme der Signalhöhen der Harnstoffkalibrationssignale über die Zeit beobachten. Im Vergleich dazu kam es bei der 30°C Sensorgruppe zu keiner bzw. einer minimalen Abnahme der Harnstoffkalibrationssignale über die Zeit (siehe *Abbildung 16* und *Anhang Abbildung 30* und *33*). Diese Abnahme der Signalhöhen über die Zeit bei einer erhöhten Betriebstemperatur könnte zwei Gründe haben.

Der erste Grund für dieses Phänomen könnte eine aufgrund der Temperaturerhöhung erhöhte Inaktivierung des Ammoniumionophors sein. Diese Theorie kann mit Hilfe der Betrachtung der nativen Ammoniumionensensoren und deren Kalibrationssignale über die Zeit überprüft werden (siehe *Abbildung 18* und *Anhang Abbildung 32* und *35*). Bei dieser Betrachtung fällt auf, dass sich die zeitlichen Verläufe der Kalibrationssignale der beiden Sensorgruppen (30°C bzw. 37°C) zum Großteil nicht über die Messunsicherheit hinausgehend voneinander unterscheiden. Einzig beim Ammoniumionenkalibrationssignal Cal 3 von Sensorlos #1 sieht man eine stärkere Abnahme des Signals bei der 37°C Sensorgruppe. Aufgrund von bereits beschriebenen Problemen bei diesem ersten Versuch (Los #1) und der daraus resultierenden Datenlage kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es hier im Zuge des Experiments zu einem anderen Phänomen (nicht temperaturbedingt) gekommen ist, das die Signalhöhe beeinflusst hat. Auffällig sind die Signal-Drift von Los #1 bis Los #3 (für 30°C und 37°C gleich) der Kalibrationslösungen 1, 2 und 4. Diese sind auf die native Harnstoffhydrolyse in wässrigem Milieu zurückzuführen. Aufgrund des natürlichen Zerfalls von Harnstoff in den Reagenzlösungen, verändert sich in diesen die Ammoniumionenkonzentration über die Zeit. Des Weiteren kann es sein, dass die Harnstoffhydrolyse durch Bakterienbefall der

Reagenzien beschleunigt wurde. Da die Reagenzien eher schwache Konservierungsmittel enthalten, um den Sensor nicht zu stören bzw. zerstören, könnten die Reagenzien der Ausgangspunkt für die bereits beschriebene Kontamination der Messstände sein. Die Harnstoffhydrolyse in den Reagenzien kann somit der Grund für das Driftverhalten der Ammoniumionenkalibrationssignale in den besagten Diagrammen sein. Dieses Driftverhalten ist vor allem bei Los #3 ausgeprägt. Insgesamt kann gesagt werden, dass der Einfluss der Temperatur auf die Signalstabilität der Ammoniumionensensoren keinen Einfluss hat.

Der zweite, und aufgrund der prognostizierten Stabilität des Ammoniumionensensors (bei 37°C), plausiblere Grund für die Abnahme der Kalibrationssignale des Harnstoffsensors über die Zeit ist der Verlust an Enzymaktivität am Harnstoffsensor. Dieser Schluss ist zulässig, da die Gesamtzymaktivität proportional zum Sensorsignal ist, wenn die Enzymaktivität limitierend wird (siehe 3.7. *Datenauswertung*). Dieser Verlust an Enzymaktivität am Sensor kann wiederum zwei Gründe haben. Der erste Grund wäre die Auswirkung der Temperaturänderung auf die Stabilität des Enzyms *Urease*. Die Erhöhung der Temperatur um 7°C könnte eine verminderte Stabilität des Enzyms über die Einsatzzeit zur Folge haben. Ein zweiter Grund für den Verlust an Enzymaktivität am Sensor wäre eine veränderte Auswaschrates des Enzyms aus dem Enzym-Polymergemisch (siehe 3.1 *Sensorherstellung*), aufgrund der erhöhten Temperatur (veränderte Wechselwirkungen zwischen Enzym und Matrix). Natürlich ist auch eine Kombination aus beiden Gründen für den Verlust der Enzymaktivität am Sensor denkbar. Um diese Theorien zu überprüfen und die Stabilität zu erhöhen wurde ein eigenes Experiment durchgeführt (siehe 4.1.1. *Untersuchung der Auswirkungen von verschiedenen Deckmembransystemen auf die Enzymstabilität bzw. Sensorstabilität, sowie auf die Sensoreigenschaften*).

Bei diesem Experiment wurden zur Stabilisierung der Gesamtzymaktivität am Sensor verschiedene Deckmembransysteme (insgesamt sechs Deckmembransysteme in zwei Sensorlosen) untersucht. Diese Deckmembransysteme sollten ein mögliches Auswaschen der Enzyme aus der Polymermatrix verhindern und somit die Gesamtzymaktivität am Sensor über die Einsatzzeit stabilisieren. Bei der Betrachtung der Harnstoffkalibrationssignale über die Zeit konnte jedoch beobachtet werden, dass die Abnahme der Signalthöhen bei 37°C, mit und ohne Deckmembransystem, sehr ähnlich verläuft und keine Verbesserung der Harnstoffsensorstabilität mit sich zieht (siehe *Abbildung 19*). Somit kann die Theorie des Auswaschens von Enzym aus dem Enzym-Polymergemisch vernachlässigt werden. Darüber hinaus kann man aus den Diagrammen ableiten, dass durch den Einsatz von Deckmembranen eine Diffusionsbarriere für Harnstoff eingefügt werden kann. Dies ist ersichtlich an den

Absoluthöhen der Kalibrationssignale die mit Deckmembran niedriger sind als ohne Deckmembran. Zusätzlich sinkt diese Absolutsignalhöhe mit zunehmender Deckmembrandicke (3%ige zu 5%ige Deckmembran) und durch den Einsatz von mehreren Deckmembranschichten. Solche Deckmembransysteme könnte man somit einsetzen um den Messbereich der zu messenden Harnstoffkonzentration für diese Sensoren nach oben zu korrigieren. Ein Nachteil einer solchen Deckmembran wäre eine längere Zeit vom Einsatz des Sensors bis zur Messbereitschaft, da die Membranen erst quellen müssen (siehe *Abbildung 19* → Signalverlauf am ersten Tag). Erst nach der Quellung der Deckmembran erreichen die Sensoren eine stabile Phase des Signalverlaufes über die Zeit in dem Messungen mit dem Sensor möglich sind.

Trotz der Abnahme der Harnstoffkalibrationssignale über die Zeit bei 37°C, wurden keine weiteren Bemühungen unternommen um die Gesamtzymaktivität am Sensor zu stabilisieren. Es wäre möglich diese durch Enzyme-Engineering, Einsatz von Enzymstabilisatoren wie z.B. Glycerin oder durch alternative Immobilisierungsstrategien zu verbessern. Des Weiteren könnte man ein Screening für alternative *Ureasen* durchführen um ein thermostabileres Enzym zu finden.

Bei der Betrachtung der gemittelten Kaliumkalibrationssignale der Lose #1-3 über die Zeit fällt auf, dass sich die Verläufe der Signale der beiden Sensorgruppen (30°C bzw. 37°C) zum Großteil nicht über die Messunsicherheit hinausgehend voneinander unterscheiden. Einzig beim Kaliumionenkalibrationssignal Cal 4 von Sensorlos #1 sieht man einen stärkeren Drift des mittleren Signals bei der 37°C Sensorgruppe. Aufgrund von bereits beschriebenen Problemen bei diesem ersten Versuch (Los #1) kann hier wiederum nicht ausgeschlossen werden, dass im Zuge des Experiments andere Phänomene (nicht temperaturbedingt) aufgetreten sind, welche die Signalhöhe beeinflusst haben. Bei einem Vergleich sämtlicher Kalibrationssignale von Sensorlos zu Sensorlos muss berücksichtigt werden, dass die Experimente (Los #1-3) nicht mit den selben Kalibrationslösungen durchgeführt wurden.

Die mittleren Standardabweichungen sämtlicher gemittelten Kalibrationssignale dieser Untersuchung zeigen, dass die Streuung der jeweiligen Sensorsignale gering (<10%) ist und innerhalb der gewöhnlichen Fertigungsstreuung für diese Art Sensoren liegt (siehe *Tabelle 4, 6 und 7*). Die mittleren Standardabweichungen der gemittelten Kalibrationssignale der einzelnen Sensorgruppen (30°C bzw. 37°C und ohne Deckmembran bzw. mit Deckmembran) zeigen im Vergleich zueinander keine reproduzierbaren Unterschiede. Aufgrund dessen kann keine Interpretation für das Verhalten der Signalstreuung der Sensoren bezüglich der Temperaturerhöhung durchgeführt werden.

Bei der Untersuchung bzw. dem Vergleich der Sensoreigenschaften bei unterschiedlichen Betriebstemperaturen (30°C vs. 37°C) wurden die Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen der einzelnen Sensoreigenschaftsparameter der beiden Sensorgruppen (30°C bzw. 37°C) für jedes Los extra (Los #1-3), sowie über alle Lose gemeinsam berechnet und gegenübergestellt (siehe *Tabelle 5* und *Anhang Tabelle 14, 15* und *16*) Bei diesen Gegenüberstellungen konnten keine nennenswerte Unterschiede der Sensoreigenschaftsparameter beider Sensorgruppen festgestellt werden. Auffällig sind leicht erhöhte Werte bei dem Parameter „Blut-Steigung“ (37°C), wobei es hier keinen statistisch signifikanten Unterschied gibt. Somit wird keiner der Sensoreigenschaftsparameter durch die Temperaturänderung um 7°C über die gewöhnliche Messunsicherheit hinausgehend beeinflusst. Bei der Zusammenfassung der drei Lose fällt die große Standardabweichung bei den Cal 1 und Cal 2 Harnstoffsignalen auf. Diese ist jedoch durch die unterschiedlichen Reagenziensätze zu erklären, die in den Experimenten verwendet wurden. Ebenfalls auffällig sind die im Mittel niedrigeren Werte der Harnstoffsensoren bei 37°C. Diese sind zwar nicht signifikant tiefer, jedoch wurde eher eine Erhöhung dieser aufgrund der erhöhten Enzymaktivität der *Urease* bei 37°C erwartet [79]. Diese erniedrigten Harnstoffsignale bei 37°C könnten sich aufgrund der Temperaturabhängigkeit von Puffersystemen erklären lassen. Beim Vergleich der Sensoreigenschaften der Sensoren mit Deckmembransystem zu den Standardsensoren wurden wiederum die Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen der einzelnen Sensoreigenschaftsparameter der unterschiedlichen Sensorgruppen berechnet und gegenübergestellt (siehe *Tabelle 8* und *Tabelle 9*). Die Deckmembransysteme mit einer Deckmembran zeigen keine großen Unterschiede zum Standardsensordesign. Die Sensoren mit zwei Deckmembranen zeigen hingegen veränderte Sensoreigenschaften. Aufgrund der Deckmembranen kam es zu veränderten Sensorkinetiken. Durch die Diffusionslimitierung der Deckmembranen kam es zu einem verlangsamten Ansprechverhalten, sowie zu einer schlechteren Auswaschrates der Sensoren nach dem Messbetrieb. Somit war es möglich, dass die Sensorsignale nach dem Auswaschen der Proben (vor allem bei hochkonzentrierten Proben) nicht die ursprünglichen Niveaus der Signale der Betriebslösung (= Waschlösung) erreichten (Hysterese). Dadurch kam es zu „Fehlmessungen“ der Sensoren die durch die Deckmembranen bedingt waren. Durch eine Erhöhung der Messzeit bzw. der Auswaschzeit im Messsystem, könnten solche „Fehlmessungen“ umgangen werden. Ein Einsatz von Deckmembransystemen für diese Art von Biosensoren ist somit prinzipiell nicht ausgeschlossen, bedarf aber einer Adaptierung am Kalibrationsmodell bzw. dem Kalibrationskonzept. Dies wäre notwendig, da das aktuelle Konzept die durch die

Deckmembranen eingebrachten Diffusionslimitierungen nicht ausreichend berücksichtigen. Da die Deckmembransysteme keine Verbesserung hinsichtlich der Sensorstabilität bewirkt haben, wurden keine weiteren Bemühungen in Richtung dieser Sensorsysteme unternommen.

Um die Auswirkungen der Änderung der Ammoniumionenkonzentration in der Betriebslösung auf die Sensorsignalstabilität zu untersuchen (siehe 4.2. *Untersuchung der Auswirkungen einer Änderung der Ammoniumionenkonzentration in der Betriebslösung auf die Sensorstabilität und die Sensoreigenschaften (low NH₄⁺ vs. high NH₄⁺)*), wurden wiederum die mittleren Kalibrationssignale beider Sensorgruppen („high NH₄⁺“ bzw. „low NH₄⁺“) über die Einsatzzeit verfolgt.

Im Fall der Verläufe der gemittelten Harnstoffkalibrationssignale konnte bis zum neunten Tag kein Unterschied festgestellt werden (siehe *Abbildung 20*). Der Unterschied der Absoluthöhe der Signale ist auf die unterschiedlichen Reagenzsätze zurückzuführen, die für dieses Experiment verwendet wurden. Am neunten Tag der Kalibrationssignalverläufe der Harnstoffsensoren konnte bei der Sensorgruppe „low NH₄⁺“ plötzlich ein stärkerer Abfall der Sensorsignale (im Vergleich zur Gruppe „high NH₄⁺“) beobachtet werden. Dieses Phänomen kann vermutlich mit einem Fehler im Messsystem korreliert werden. Da es am Tag davor zu einem Ausfall des Messsystems aufgrund von PC-Problemen kam, wurden die Sensoren in den Messständen nicht gespült. Das hat zur Folge, dass es aufgrund von Flüssigkeitsbrücken zwischen Harnstoffsensoren und anderen Sensoren bzw. der Referenzelektrode zu einer Inaktivierung der *Urease* durch Ag-Ionen kommt. Somit sinkt die Gesamtzymaktivität am Sensor, was die Abnahme der Kalibrationssignale zur Folge hat. Es kann festgehalten werden, dass die Änderung der Ammoniumionenkonzentration in der Betriebslösung des Messsystems keinen Einfluss auf die Signalstabilität der Harnstoffsensoren hat.

Bei der Betrachtung der gemittelten Kaliumkalibrationssignale des Lose #6 über die Zeit sieht man, dass sich die Verläufe der Signale der beiden Sensorgruppen („high NH₄⁺“ bzw. „low NH₄⁺“) nicht über die Messunsicherheit hinausgehend voneinander unterscheiden (siehe *Abbildung 21*). Somit kann auch für den Kaliumionensensor festgehalten werden, dass die Änderung der Ammoniumionenkonzentration in der Betriebslösung keinen Einfluss auf die Signalstabilität der Kaliumionensensoren hat.

Im Fall der Kalibrationssignalverläufe der Ammoniumionensensoren konnten keine großen Unterschiede festgestellt werden (siehe *Abbildung 22*). Jedoch hat es den Anschein, dass die Kalibrationssignalverläufe der Sensorgruppe „high NH₄⁺“ etwas stabiler sind als die

Kalibrationssignalverläufe der Sensorgruppe „low NH_4^{+} “. Vor allem bei den Signalverläufen von Cal 1, Cal 2 und Cal 4 driftet das Signal bei der Sensorgruppe „low NH_4^{+} “ stärker. Bei Cal 3 verhält sich der Kalibrationssignaldrift jedoch gleich (Drift \rightarrow Endsignal \approx 35% vom Startsignal). Aufgrund der Datenlage kann eine leicht verbesserte Signalstabilität bei dem Einsatz des Reagenziensatzes „high NH_4^{+} “ nur vermutet werden. Um eine klare und signifikante Aussage in dieser Hinsicht zu erhalten, müsste man einen größeren Versuch durchführen, der den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde.

Die mittleren Standardabweichungen sämtlicher gemittelten Kalibrationssignale dieses Experiments zeigen, dass die Streuung der jeweiligen Sensorsignale sehr gering ist (noch geringer als bei den ersten fünf Sensorlosen) und innerhalb der gewöhnlichen Fertigungsstreuung für diese Art Sensoren liegt (siehe *Tabelle 10*). Die mittleren Standardabweichungen der gemittelten Kalibrationssignale der einzelnen Sensorgruppen („high NH_4^{+} “ bzw. „low NH_4^{+} “) zeigen im Vergleich zueinander keine reproduzierbaren Unterschiede. Tendenziell streuen die Sensorsignale der Sensorgruppe „high NH_4^{+} “ etwas weniger. Aufgrund der allgemein geringen Signalstreuung im Vergleich zu anderen Sensorlosen und von teilweise kontroversen Ergebnissen dieses Vergleichs (z.B. Sensorsignal NH_4^{+} -Cal 3) kann hier kein wirklicher Vorteil attestiert werden.

Bei der Untersuchung bzw. dem Vergleich der Sensoreigenschaften bei Verwendung von unterschiedlichen Ammoniumionenkonzentrationen in der Betriebslösung („high NH_4^{+} “ vs. „low NH_4^{+} “), wurden die Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen der einzelnen Sensoreigenschaftsparameter der beiden Sensorgruppen („high NH_4^{+} “ bzw. „low NH_4^{+} “) berechnet und gegenübergestellt (siehe *Tabelle 11*) Bei dieser Gegenüberstellung konnten keine großen Unterschiede zwischen den beiden Sensorgruppen festgestellt werden. Die ersten drei Parameter Cal 1 Signal, Cal 2 Signal und Linearität sind zwar unterschiedlich, dies wird aber durch den Einsatz der unterschiedlichen Reagenzsätze erklärt. Auffällig ist, dass die wässrigen Proben bei der Sensorgruppe „high NH_4^{+} “ im Mittel leicht höhere Werte liefern. Einen signifikanten Unterschied gibt es allerdings nur bei dem Parameter „Combitrol Plus B Level 3“. Da hier, wie auch bei allen anderen Parametern, beide Sensorgruppen innerhalb der Sensorspezifikationen sind, kommt es zu keiner wirklichen Beeinflussung bzw. Verbesserung der Sensoreigenschaften durch die Änderung der Ammoniumionenkonzentration in der Betriebslösung von 0,1 mmol/L auf 1 mmol/L.

Das letzte Experiment der Diplomarbeit beschäftigte sich mit der Entwicklung eines neuen Kalibrationskonzepts inklusive eines neuen Kalibrationsrechenmodells für die mögliche Integration des Harnstoffsensors in das neue Messsystem (siehe 4.3. *Entwicklung eines neuen Kalibrationskonzepts für die Integration des Harnstoffsensors in das neue Blutgasanalyzesystem*). Um den Anforderungen an das neue Kalibrationskonzept gerecht zu werden (siehe 1.2 *Aufgabenstellung*), wurden insgesamt vier verschiedene Lösungsansätze entwickelt, wobei es hier bei zwei Lösungsansätzen noch zusätzlich je zwei Varianten gibt. Zur Beurteilung der unterschiedlichen Kalibrationsmodelle wurden die berechneten Harnstoffkonzentrationen (der biologischen Proben berechnet mit den jeweiligen Kalibrationsrechenmodellen) den gemessenen Harnstoff-Referenzwerten in XY-Punktdiagrammen gegenübergestellt und untereinander verglichen. (siehe *Abbildung 23-29*) Zwar konnte keines der Rechenmodelle sämtliche Parameter wie z.B. Steigung der Regressionsgeraden des Referenzmodells („Messstand“) erreichen bzw. übertreffen (siehe *Tabelle 13*), trotzdem konnten die Modelle „Chargenparameter“, „2-Punkt Kontrollmittelkalibration“ und „2-Punkt Kombinationskalibration“ die Spezifikationen für den Einsatz im Messsystem erfüllen.

Das Kalibrationsmodell „Chargenparameter“ zeigt im Vergleich zum Kalibrationsmodell „Messstand“ ein niedrigeres Bestimmtheitsmaß (R^2). Dies bedeutet, dass die berechneten Harnstoffwerte des Kalibrationsmodell „Chargenparameter“ über den gesamten Messbereich stärker um die Regressionsgerade streuen. Die mittlere Abweichung dieser Werte zur Regressionsgeraden (Syx-Wert) ist ebenfalls größer. Der Standardfehler für die Regressionsgerade dieses Kalibrationsmodell zeigt zwar ein anderes Vorzeichen als das Referenzmodell, ist aber insgesamt geringer. Die Regressionsgerade des Kalibrationsmodell „Chargenparameter“ zeigt nur minimale Abweichung zum Modell des Messstandes.

Für das Kalibrationsmodell „2-Punkt Kontrollmittelkalibration“ gilt im Wesentlichen das Selbe wie für das Kalibrationsmodell „Chargenparameter“. Das Modell zeigt ein minimal niedrigeres Bestimmtheitsmaß (R^2) und einen leicht erhöhten Syx-Wert im Vergleich zum Referenzmodell. Der Achsenabschnitt ist im Vergleich wiederum mit einem anderen Vorzeichen versehen und ebenfalls absolut geringer. Dieses Kalibrationsmodell besitzt die besten Parameter für eine mögliche Integration in das neue Messmodell. Das Kalibrationsmodell „1-Punkt Kontrollmittelkalibration“ erfüllt nicht die Spezifikationen für den Einsatz in dem neuem Messsystem. Der Achsenabschnitt von -1,17 mmol/L und der Syx-Wert von 1,04 mmol/L zeigen, dass dieses Modell einen zu großen Absolutfehler hat und zusätzlich stark um die Regressionsgerade streut.

Auch das Kalibrationsmodell „1-Punkt Kombinationskalibration“ kommt für den Einsatz im neuen Messsystem nicht in Frage, da es ebenfalls einen zu großen Achsenabschnitt-Wert (-1,69 mmol/L) und Syx-Wert (1,13 mmol/L) aufweist. An diesen beiden Kalibrationsmodellen lässt sich erkennen, dass eine 1-Punkt Kalibration des Harnstoffsensors nicht ausreichend ist. Das Kalibrationsmodell „2-Punkt Kombinationskalibration“ zeigt sehr ähnliche Werte wie das Kalibrationsmodell „Chargenparameter“. Somit kann dieses Modell für den Einsatz des Harnstoffsensors in das neue Messsystem herangezogen werden.

Das letzte Kalibrationsmodell „Kalibration als reiner NH_4^+ -Sensor“ zeigten die schlechtesten Parameter im Vergleich zum Referenzsystem. Bestimmtheitsmaß und Steigung sind viel zu gering. Der Achsenabschnitt dieses Modells ist mit 1,10 mmol/L zwar besser als bei den beiden „1-Punkt Kalibrationsmodelle“, jedoch noch immer zu groß für die Spezifikationen. Zusätzlich zeigt ein Syx-Wert von 1,35 mmol/L eine zu große Streuung der berechneten Werte um die Regressionsgerade. Eine höherer Ammoniumionen-Kalibrationspunkt (z.B. 10 mmol/L anstelle von 0,1 mmol/L in Cal 3) für die Kalibration als reiner NH_4^+ -Sensor wäre eventuell von Vorteil, da die Kalibration mit den vorhandenen Reagenzien nur einen sehr geringen Messbereich abdeckt.

Insgesamt konnten somit drei Modelle entwickelt werden, die für die Integration des Harnstoffsensors in das neue Messsystem einsatzfähig wären.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es prinzipiell möglich ist den verwendeten enzymatischen Biosensors zur Harnstoffmessung in die Messumgebung des neuen Blutgasanalysegerätes zu integrieren. Es wurde gezeigt, dass der Sensor bei der veränderten Betriebstemperatur von 37°C ausreichend stabil ist. Darüber hinaus ist die Sensorcharakteristik durch die Temperaturänderung nicht signifikant beeinflusst. Somit müsste, bei alleiniger Änderung dieses Umgebungsparameters des Systems, keine Korrektur am Kalibrationsrechenmodell vorgenommen werden. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass eine Änderung der Ammoniumionenkonzentration in der Betriebslösung nur einen minimalen positiven Einfluss auf die Signalstabilität des Sensors hat. Diese Änderung der Ammoniumionenkonzentration beeinflusst die Sensoreigenschaften jedoch nicht. Insgesamt wurden in dieser Arbeit drei Kalibrationskonzepte inklusive Kalibrationsrechenmodelle entwickelt, welche die Sensoren im gewünschten Messbereich kalibrieren können und die Spezifikationen für den Einsatz dieser Sensoren in Kombination mit den jeweiligen Modellen erfüllen.

Für eine Integration des Harnstoffsensors in das neue Blutgasanalysegerät müssten aber noch einige Punkte wie z.B. Verträglichkeit anderer Sensoren mit den Reagenzien überprüft werden. Außerdem wäre eine intensivere Behandlung des Themas Enzymstabilität bzw. Sensorstabilität von Vorteil, um die Lebensdauer solcher Sensoren zu verlängern. Des Weiteren ist es noch notwendig die entwickelten Kalibrationsrechenmodelle ausgiebiger zu testen und eventuell zu verbessern. Für eine tatsächliche Integration des Harnstoffsensors in das neue Blutgasanalyzesystem sind somit noch einige Dinge zu berücksichtigen und weitere Arbeitspakete notwendig.

Literaturverzeichnis

- [1] Schaffar B., Ritter Ch. (1995) „Harnstoffsensor für klinische Anwendungen“ *Biomedizinische Technik* **40**(2):102-103.
- [2] Ritter C., Frebel H., Kroneis H., Krysl F. J., Lang S., Neuhold C., Offenbacher H., Pestitschek G., Schaffar B., Schinnerl M., Schmidt W., Steiner G. (2001) „Multiparameter miniaturised sensor array for multiple use“ *Sensors and Actuators B: Chemical* **76**(1-3):200-220.
- [3] Voet D., Voet J.G., Pratt C.W. (2002) „Lehrbuch der Biochemie“ (2. überarbeitete Auflage / deutsche Fassung) *WILEY-VCH* S.652-656.
- [4] Campbell N.A., Reece J.B. (2006) „Biologie“ (6. überarbeitete Auflage / deutsche Fassung) *Pearson Studium* S.1125-1140.
- [5] Faller A., Schünke M. (2008) „Der Körper des Menschen – Einführung in Bau und Funktion“ (15. überarbeitete Auflage) *Georg Thieme Verlag* S.500-529.
- [6] Hallbach J. (2006) „Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg“ (2. überarbeitete Auflage) *Georg Thieme Verlag* S.207-210.
- [7] Dörner K. (2006) „Klinische Chemie und Hämatologie“ (6. überarbeitete Auflage) *Georg Thieme Verlag* S.432-434.
- [8] Cunningham D. D., Stenken J. A. (2010) „In Vivo Glucose Sensing“ (aus der Serie: „Chemical Analysis“ / Vol. 174) *John Wiley & Sons*.
- [9] Mauder A. (1996) „Nachweisgrenze piezoelektrischer Sensoren“ (1.Auflage) *Herbert Utz Verlag*.
- [10] Müller J. P. (2000) „Entwicklung eines modularen Durchflusssystems auf der Basis von amperometrisch-enzymatischen Biosensoren unter Verwendung von TTF-TCNQ als Mediator“ *Dissertation Eidgenössische Technische Hochschule Zürich*.

- [11] Almeida S. A., Truta L. A., Queirós R. B., Montenegro M. C., Cunha A. L., Sales M. G. (2012) „Optimizing potentiometric ionophore and electrode design for environmental on-site control of antibiotic drugs: application to sulfamethoxazole” *Biosensors and Bioelectronics* **35**(1):319-326.
- [12] Schaffar B. P. H., Dremel B. A. A., Schmid R. D. (1989) „Ascorbic acid determination in fruit juices based on a fibre optic ascorbic acid biosensor and flow injection analysis” (Artikel in Schmid R. D., Scheller F. (1989) “Biosensors: Applications in Medicine, Environmental Protection and Process Control” GBF Monographs Volume 13) *VCH* S.229-232.
- [13] Renneberg R. (2009) „Bioanalytik für Einsteiger” *Spektrum Akademischer Verlag* S.182-225.
- [14] Hammonda M. H., Rose-Pehrsson S. L., Gottuk D. T., Lynch J. A., Tillett D., Strecker H. (2008) „Cermet microsensors for fire detection” *Sensors and Actuators B: Chemical* **130**(1):240-248.
- [15] Baker B. R., Lai R. Y., Wood M. C. S., Doctor E. H., Heeger A. J., Plaxco K. W. (2006) „An Electronic, Aptamer-Based Small-Molecule Sensor for the Rapid, Label-Free Detection of Cocaine in Adulterated Samples and Biological Fluids” *Journal of the American Chemical Society* **128**(10):3138-3139.
- [16] Findeisen A. M. (2009) „Chemosensoren für Phosphorsäureester gegen Bedrohungspotentiale durch chemische Kampfstoffe“ *Dissertation Universität Wien*.
- [17] Cammann K., Lemke U., Rohen A., Sander J., Wilken H., Winter B. (1991) „Chemo- und Biosensoren – Grundlagen und Anwendungen“ *Angewandte Chemie* **103**(5):519-541.
- [18] Diamond D. (1998) „Principles of Chemical and Biological Sensors“ (aus der Serie: „Chemical Analysis” / Vol. 150) *John Wiley & Sons* S.1-17.
- [19] Grieshaber D., MacKenzie R., Vörös J., Reimhult E. (2008) „Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures” *Sensors* **8**(3):1400-1458.

- [20] Gründler P (2004) „Chemische Sensoren, eine Einführung für Naturwissenschaftler und Ingenieure“ *Springer-Verlag* S.1-14.
- [21] Hall E. A. H. (1995) „Biosensoren“ *Springer-Verlag* S.3-29.
- [22] Hajnsek M. (2010) „Sensor for Monitoring Glucose in Interstitial Fluid” *Dissertation Technische Universität Graz*.
- [23] Dremel B. (1992) „Entwicklung faseroptischer Chemo- und Biosensoren für die Bioprozesskontrolle und Nahrungsmittelanalytik“ *Dissertation Technische Universität Carolo-Wilhemina zu Braunschweig*.
- [24] Maier R. (2012) „Optimierung enzymhaltiger Braunsteinpasten“ *Diplomarbeit Technische Universität Graz*.
- [25] Simonis A. (2006) „Untersuchungen zur Entwicklung einer feldeffektbasierten Biosensoranordnung mit integriertem Referenzsystem“ *Dissertation Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen*.
- [26] Okada T., Karube I., Suzuki S. (1982) „Hybrid urea sensor using nitrifying bacteria” *Applied Microbiology and Biotechnology* **14**(3):149-154.
- [27] Edelman P. G., Wang J. (1992) „Biosensors & Chemical Sensors – Optimizing Performance Through Polymeric Materials“ *American Chemical Society Symposium Series* **487**.
- [28] Gläsel U. (2004) „Konduktometrische Enzymaktivitätsdetektoren mit adsorbiertem Substrat“ *Dissertation Westfälischen Wilhelms-Universität Münster*.
- [29] Kessler R. W. (2006) „Prozessanalytik: Strategien und Fallbeispiele aus der industriellen Praxis“ (1. gebundene Ausgabe) *WILEY-VCH*.
- [30] Eggins B. (1996) „Biosensors – An Introduction“ *WILEY-TEUBNER*.
- [31] Fouletier J., Fabry P. (2010) „Chemical and Biological Microsensors – Applications in Liquid Media” (1. Auflage) *ISTE Ltd and John Wiley & Sons*.
- [32] Chmiel H. (2006) „Bioprozesstechnik” (2. Auflage) *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg* S.67-97.

- [33] Sumner J. B. (1926) „The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease. Preliminary Paper” *The Journal of Biological Chemistry* **69**:435–441.
- [34] Krajewska B. (2009) „Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **59**(1-3):9–21.
- [35] Balasubramanian A., Ponnuraj K. (2010) „Crystal Structure of the First Plant Urease from Jack Bean: 83 Years of Journey from Its First Crystal to Molecular Structure” *Journal of Molecular Biology* **400**(3):274-283.
- [36] Panpae K., Krintrakul S. Chaiyasit A. (2006) „Development of a Urea Potentiometric Biosensor Based on Gelatin-Immobilized Urease” *Kasetsart Journal - Natural Science* **40**(5):74–81.
- [37] Guilbaut G. G., Montalvo J. G. Jr. (1969) „A urea-specific enzyme electrode“ *Journal of the American Chemical Society* **91**(8):2164-2165.
- [38] Dhawan G., Sumana G., Malhotra B.D. (2009) „Recent developments in urea biosensors” *Biochemical Engineering Journal* **44**(1):42–52.
- [39] Pandey P. C., Upadhyay S., Singh G., Prakash R., Srivastava R. C., Seth P. K. (2000) „A new solid-state pH sensor and its application in the construction of solid-state urea biosensor” *Electroanalysis* **12**(7) :517–521.
- [40] Chen J. C., Chou J. C., Sun T. P., Hsiung S. K. (2003) „Portable urea biosensor based on extended-gate field effect transistor“ *Sensors and Actuators B: Chemical* **91**(1-3):180–186.
- [41] Bertocchi P., Compagnone D. (1996) „Amperometric ammonium ion and urea determination with enzyme-based probes“ *Biosensors and Bioelectronics* **11**(1-2):1-10.
- [42] Castillo-Ortega M. M. , Rodriguez D. E., Ensinas J. C., Plascencia M., Velarde F. A. M., Olayo R. (2002) „Conductometric uric acid and urea biosensor prepared from electroconductive polyaniline-poly(n-butyl methacrylate) composites“ *Sensors and Actuators B: Chemical* **85**(1-2):19–25.
- [43] Starodub N. F., Rebriev A. V. (2007) „Liquid photopolymerizable compositions as immobilized matrix of biosensors” *Bioelectrochemistry* **71**(1):29–32.

- [44] Tsai H., Doong R. (2005) „Simultaneous determination of pH, urea, acetylcholine and heavy metals using array-based enzymatic optical biosensor” *Biosensors and Bioelectronics* **20**(9):1796–1804.
- [45] Kovács B., Nagy G., Dombi R., Tóth K. (2003) „Optical Biosensor for urea with improved response time” *Biosensors and Bioelectronics* **18**(2-3):111–118.
- [46] Chen H., Wang E. (2000) „Optical urea biosensor based on ammonium ion selective membrane“ *Analytical Letters* **33**(6):997-1011.
- [47] Xie B., Danielsson B. (1996) „An integrated thermal biosensor array for multianalyte determination demonstrated with glucose, urea and penicillin“ *Analytical Letters* **29**(11):1921–1932.
- [48] Xie B., Mecklenburg M., Danielsson B., Ohman O., Nolin P., Winquist F. (1995) „Development of an integrated thermal biosensor for the simultaneous determination of multiple analytes“ *Analyst* **120**(1):155–160.
- [49] Fulton S. P., Cooney C. L., Waeber J. C. (1980) „Thermal enzyme probe with differential temperature measurements in a laminar flow-through cell“ *Analytical Chemistry* **52**(3):505–508.
- [50] Singh M., Verma N., Garg A. K., Redhu N. (2008) „Urea Biosensors“ *Sensors and Actuators B: Chemical* **134**(1):345-351.
- [51] Trivedi U. B., Lakshminarayana D., Kothari I. L. , Patel N. G., Kapse H.N., Makhija K. K., Patel P. B., Panchal C. J. (2009) „Potentiometric biosensor for urea determination in milk” *Sensors and Actuators B: Chemical* **140**(1):260-266.
- [52] Venugopal V. (2002) „Biosensors in fish production and quality control” *Biosensors and Bioelectronics* **17**(3):147–157.
- [53] Lima J. L. F. C., Delerue-Matos C., Vaz M. C. V. F. (1998) „Flow Injection System with Potentiometric Detection for the Determination of Urea Content in Milks” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**(4):1386–1389.

- [54] Petersson B. A. (1988) „Enzymatic determination of urea in undiluted whole blood by flow analysis using an ammonium ion-selective electrode“ *Analytica Chimica Acta* **209**:239-248.
- [55] Chen X., Yang Z., Si S. (2009) „Potentiometric urea biosensor based on immobilization of urease onto molecularly imprinted TiO₂ film” *Journal of Electroanalytical Chemistry* **635**(1):1–6.
- [56] Schindler J. G., Schindler M. M., Herna K., Reisinger E., Burk B., Kuhlmann U., Knaack J., Schmidt B., Lange H. (1994) „Harnstoff-Durchflußsensor zur ammoniumselektiv-enzymatischen Prozesskontrolle der künstlichen Niere“ *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* **32**(3):145-152.
- [57] Brand U., Reinhardt B., Rüther F., Scheper T., Schügerl K. (1991) „Bio-field-effect Transistors for Process Control in Biotechnology“ *Sensors and Actuators B: Chemical* **4**(3-4):315-318.
- [58] Busch M., Gutberlet F., Höbel W., Polster J., Schmidt H.-L., Schwenk M. (1993) „The application of optodes in FIA-based fermentation processcontrol using the software package FIACRE” *Sensors and Actuators B: Chemical* **11**(1-3):407-412.
- [59] Krawczyński vel Krawczyk T., Moszczyńska M., Trojanowicz M. (2000) „Inhibitive determination of mercury and other metal ions by potentiometric ureabiosensor” *Biosensors and Bioelectronics* **15**(11–12):681–691.
- [60] Yang Y., Wang Z., Yang M., Guo M., Wu Z., Shen G., Yu R. (2006) „Inhibitive determination of mercury ion using a renewable urea biosensor based on self-assembled gold nanoparticles” *Sensors and Actuators B: Chemical* **114**(1):1-8.
- [61] Zhylyak G. A., Dzyadevich S. V., Korpan Y. I., Soldatkin A. P., El'skaya A. V. (1995) „Application of urease conductometric biosensor for heavy-metal ion determination” *Sensors and Actuators B: Chemical* **24**(1-3):145-148.
- [62] Roche Diagnostics (2011) „cobas[®] UREA/BUN – Harnstoff/Harnstoff-N kinetischer UV-Test“ (Bedienungsanleitung Version 15 - 11982486001V15) *Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim.*

- [63] ATLAS Medical (2005) „Urea Berthelot - Enzymatic–colorimetric test ”Berthelot”” (Revision B (02.07.2005) - PPI030A01) *ATLAS Medical, William James House, Cowley Road, CB4 0WX Cambridg.*
- [64] Talke H., Schubert G. E. (1965) „Enzymatische Harnstoffbestimmung in Blut und Serum im optischen Test nach Warburg“ *Journal of Molecular Medicine* **43**(3):174-175.
- [65] Kaplan A. (1982) „The Determination of Urea, Ammonia and Urease” (in „Methodes of Biochemical Aanalysis” Volume 17) *John Wiley & Sons.*
- [66] Fawcett J. K., Scott J. E. (1960) „A rapid and precise method for the determination of urea“ *Journal of Clinical Pathology* **13**(2):156–159.
- [67] Chaney A. L., Marbach E. P (1962) „ Modified Reagents for Determination of Urea and Ammonia” *Clinical Chemistry* **8**(2):130-132.
- [68] Gentzkow C. J. (1942) „An accurate method for determination of blood urea nitrogen by direct Nesslerization“ *Journal of Biological Chemistry* **143**:531-544.
- [69] Liu L., Mo H., Wie S., Raftery D (2012) „Quantitative analysis of urea in human urine and serum by ¹H nuclear magnetic resonance” *Analyst* **137**(3):595-600.
- [70] Ernst H. (1971) „Der Siebdruck: ein Lehr- und Handbuch“ *Ellwanger Verlag.*
- [71] Pace S. J. (1984) „Ion-selective layered sensor and methodes of making and using the same“ *United States Patent US4454007.*
- [72] Offenbacher H., Schaffar B., Ghahramani M. (1994) „Preparation of a hydrophobic polymer matrix containing immobilized enzymes“ *United States Patent US5928918.*
- [73] Kim H. J., Hummel J. W., Birrell S. J. (2006) „ Evaluation of nitrate and potassium ion-selective membranes for soil macronutrient sensing” *American Society of Agricultural and Biological Engineers* **49**(3): 597–606.
- [74] Tomberger M. (2002) „Entwicklung eines Präzisionsmessstandes zur Ermittlung von Kennlinien elektrochemischer Sensoren“ *Diplomarbeit Technische Universität Graz.*

- [75] Buchinger M. (2008) „Messungen von Creatinin in Vollblut mit elektrochemischen Sensoren“ *Diplomarbeit Fachhochschule Oberösterreich – Campus Linz – Studiengang Medizintechnik*.
- [76] Cha G. S., Nam H., Shin J. H. (2003) „Methode for fabricating Biosensors using hydrophilic polyurethane“ *United States Patent US6509148 B2*.
- [77] Pasic A., Koehler H., Klimant I., Schaupp L., (2007) „Minituarized fiber-optic sensor for continuous glucose monitoring in subcutaneous tissue“ *Sensors and Actuators B 122(1):60-68*.
- [78] Frischauf P. A., Larsen E. (2002) „Methode of performing calibration and quality control of a sensor and apparatus for performing said method“ *European Patent Office EP1558921 B1*
- [79] Huang T.-C., Chen D.-H. (1991) „Kinetic Urease-catalysed Urea Hydrolysis“ *Journal of Chemical Technology and Biotechnology 52(4):433-444*

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Prinzipieller Aufbau von Chemo- und Biosensoren:	18
Abbildung 2 – Aufbau eines Chemo- und Biosensors mit Filter:	19
Abbildung 3 – Energieprofil einer chemischen Reaktion - Katalysiert vs. Unkatalysiert:	24
Abbildung 4 – Graphische Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik:	26
Abbildung 5 – Immobilisierungsstrategien für enzymatische Biosensoren:	30
Abbildung 6 – Urease aus <i>Canavalia ensiformis</i> :	31
Abbildung 7 – Aufbau des aktiven Zentrums der Urease:	32
Abbildung 8 – Aufbau des verwendeten Harnstoffsensors:	37
Abbildung 9 – Schema eines Siebdruckschrittes:	39
Abbildung 10 – Schema des Dispensierapparates:	40
Abbildung 11 – Dispensieren der Kalium- bzw. Ammoniummembran:	42
Abbildung 12 – Dispensieren des Urease-Polymergemisches:	43
Abbildung 13 – Aufbau der verwendeten Messstände:	45
Abbildung 14 – Fluidische Abläufe und Datenerfassung einer Kalibration mit 4 Kalibrationslösungen:	46
Abbildung 15 – MS-Excel-Vorlage zur Auswertung der Messreihen:	53
Abbildung 16 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der Harnstoffsensoren 30°C vs. 37°C – Los #3:	59
Abbildung 17 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der kaliumionenselektiven Sensoren 30°C vs. 37°C – Los #3:	60
Abbildung 18 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der ammoniumionenselektiven Sensoren 30°C vs. 37°C – Los #3:	61
Abbildung 19 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der Harnstoffsensoren - Deckmembransysteme – Los #4 und #5:	65
Abbildung 20 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der Harnstoffsensoren „high NH ₄ ⁺ “ vs. „low NH ₄ ⁺ “ – Los #6:	70
Abbildung 21 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der kaliumionenselektiven Sensoren „high NH ₄ ⁺ “ vs. „low NH ₄ ⁺ “ – Los #6:	70

Abbildung 22 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der ammoniumionenselektiven Sensoren „high NH ₄ ⁺ “ vs. „low NH ₄ ⁺ “ – Los #6:.....	71
Abbildung 23 – Vergleich der mit dem Kalibrationsmodell „Messstand“ berechneten Harnstoffwerte zu den mit Hitachi 902 gemessenen Referenzwerten:	74
Abbildung 24 – Vergleich der mit dem Kalibrationsmodell „Chargenparameter“ berechneten Harnstoffwerte zu den mit Hitachi 902 gemessenen Referenzwerten:	77
Abbildung 25 – Vergleich der mit dem Kalibrationsmodell „2-Punkt Kontrollmittelkalibration“ berechneten Harnstoffwerte zu den mit Hitachi 902 gemessenen Referenzwerten:	78
Abbildung 26 – Vergleich der mit dem Kalibrationsmodell „1-Punkt Kontrollmittelkalibration“ berechneten Harnstoffwerte zu den mit Hitachi 902 gemessenen Referenzwerten:	79
Abbildung 27 – Vergleich der mit dem Kalibrationsmodell „2-Punkt Kombinationskalibration“ berechneten Harnstoffwerte zu den mit Hitachi 902 gemessenen Referenzwerten:	80
Abbildung 28 – Vergleich der mit dem Kalibrationsmodell „1-Punkt Kombinationskalibration“ berechneten Harnstoffwerte zu den mit Hitachi 902 gemessenen Referenzwerten:	81
Abbildung 29 – Vergleich der mit dem Kalibrationsmodell „Kalibration als reiner NH ₄ ⁺ -Sensor“ berechneten Harnstoffwerte zu den mit Hitachi 902 gemessenen Referenzwerten:	82
Abbildung 30 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der Harnstoffsensoren 30°C vs. 37°C – Los #1:.....	106
Abbildung 31 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der kaliumionenselektiven Sensoren 30°C vs. 37°C – Los #1:	107
Abbildung 32 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der ammoniumionenselektiven Sensoren 30°C vs. 37°C – Los #1:.....	108
Abbildung 33 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der Harnstoffsensoren 30°C vs. 37°C – Los #2:.....	110
Abbildung 34 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der kaliumionenselektiven Sensoren 30°C vs. 37°C – Los #2:	111
Abbildung 35 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der ammoniumionenselektiven Sensoren 30°C vs. 37°C – Los #2:.....	112

Tabellenverzeichnis

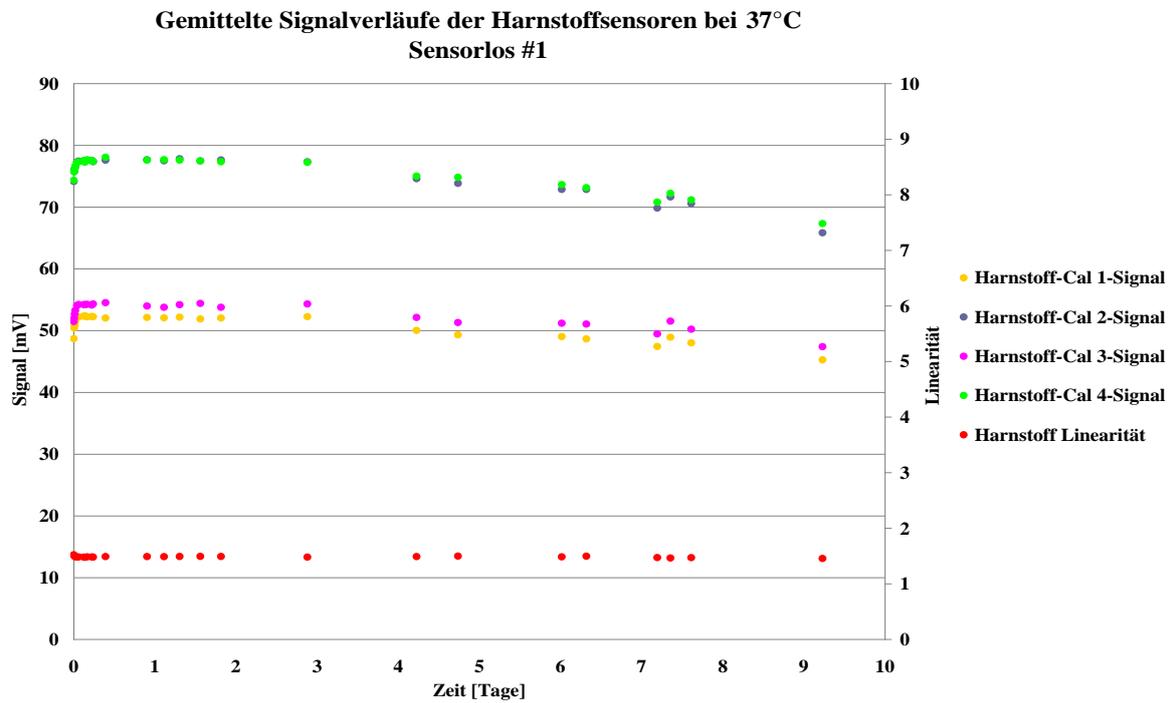
<i>Tabelle 1 - Filtersysteme für Chemo- und Biosensoren.....</i>	<i>20</i>
<i>Tabelle 2 - Transduktoren für Chemo- und Biosensoren.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 3 - Rezepturen für die verwendeten Reagenzien.</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 4 - Mittlere Standardabweichungen der gemittelten Kalibrationssignale – Los #1-3.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 5 - Vergleich der Sensoreigenschaften bei unterschiedlichen Betriebstemperaturen (30°C vs. 37°C) – Zusammenfassung Los #1-3.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 6 - Mittlere Standardabweichungen der gemittelten Kalibrationssignale – Los #4...66</i>	
<i>Tabelle 7 - Mittlere Standardabweichungen der gemittelten Kalibrationssignale – Los #5...66</i>	
<i>Tabelle 8 - Vergleich der Sensoreigenschaften von unterschiedlichen Deckmembransystemen – Los #4.....</i>	<i>67</i>
<i>Tabelle 9 - Vergleich der Sensoreigenschaften von unterschiedlichen Deckmembransystemen – Los #5.....</i>	<i>68</i>
<i>Tabelle 10 - Mittlere Standardabweichungen der gemittelten Kalibrationssignale – Los #6.</i>	<i>71</i>
<i>Tabelle 11 - Vergleich der Sensoreigenschaften bei Verwendung von unterschiedlichen Ammoniumionenkonzentrationen in der Betriebslösung– Los #6.</i>	<i>72</i>
<i>Tabelle 12 – Prozentuelle Abnahme der Kalibrationssignale Harnstoff-Cal 1-Signal und Harnstoff-Cal 2-Signal über die Zeit.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabelle 13 – Zusammenfassung der Parameter der linearen Regressionen der unterschiedlichen Kalibrationsmodelle.</i>	<i>83</i>
<i>Tabelle 14 - Vergleich der Sensoreigenschaften bei unterschiedlichen Betriebstemperaturen (30°C vs. 37°C) - Los #1.</i>	<i>109</i>
<i>Tabelle 15 - Vergleich der Sensoreigenschaften bei unterschiedlichen Betriebstemperaturen (30°C vs. 37°C) - Los #2.</i>	<i>113</i>
<i>Tabelle 16 - Vergleich der Sensoreigenschaften bei unterschiedlichen Betriebstemperaturen (30°C vs. 37°C) - Los #3.</i>	<i>113</i>

Gleichungsverzeichnis

<i>Gleichung 1 - Reaktionsschema nach Michaelis und Menten</i>	<i>24</i>
<i>Gleichung 2 - Michaelis-Menten-Gleichung</i>	<i>25</i>
<i>Gleichung 3 - Reaktionsgleichung der Harnstoffhydrolyse mit Urease</i>	<i>32</i>
<i>Gleichung 4 - Nernstgleichung</i>	<i>36</i>
<i>Gleichung 5 - Nikolski-Eisenman Gleichung.....</i>	<i>36</i>
<i>Gleichung 6 - Gleichungen gekoppelter enzymatischer Test.....</i>	<i>38</i>

Anhang

A)



B)

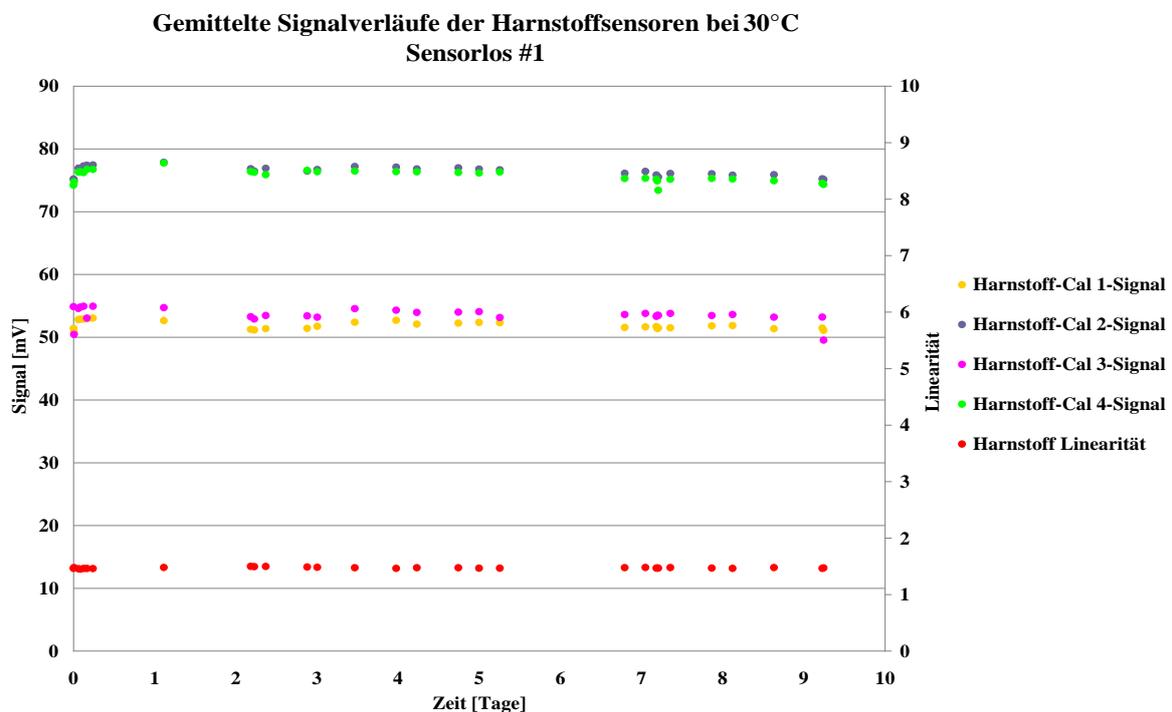
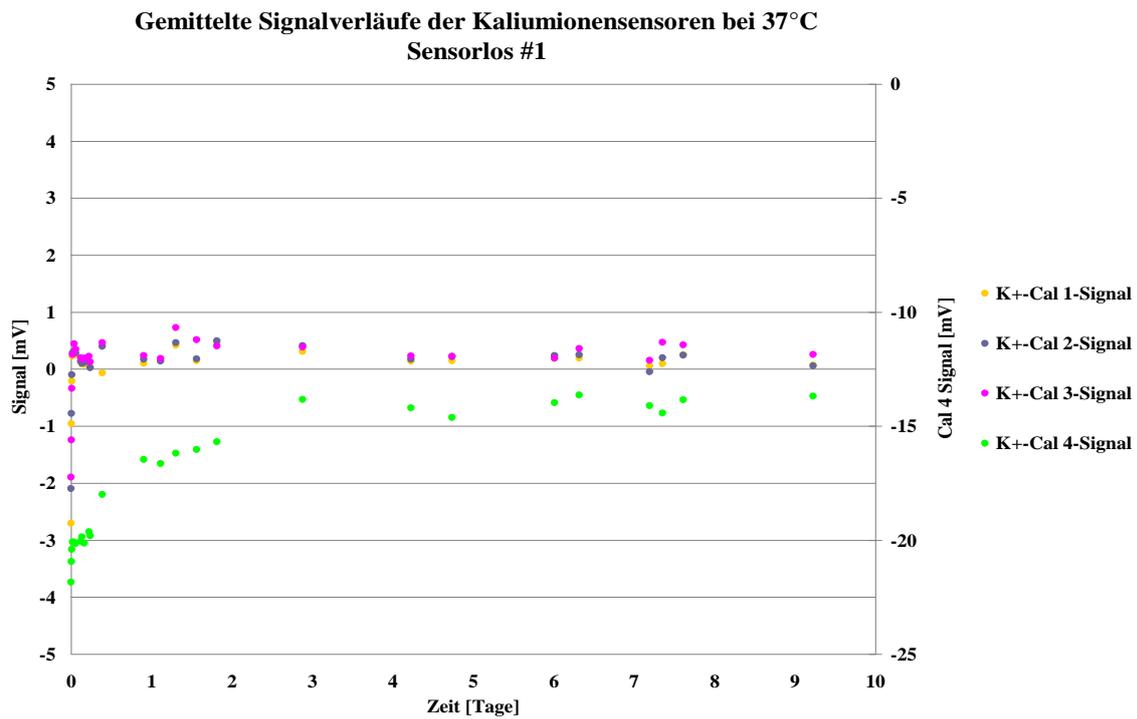


Abbildung 30 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der Harnstoffsensoren 30°C vs. 37°C – Los #1: Abgebildet sind die Diagramme der gemittelten Kalibrationssignale über die Zeit der Harnstoffsensoren bei 37°C (A)) bzw. 30°C (B)) des Los #1. Quelle: Eigene Abbildung.

A)



B)

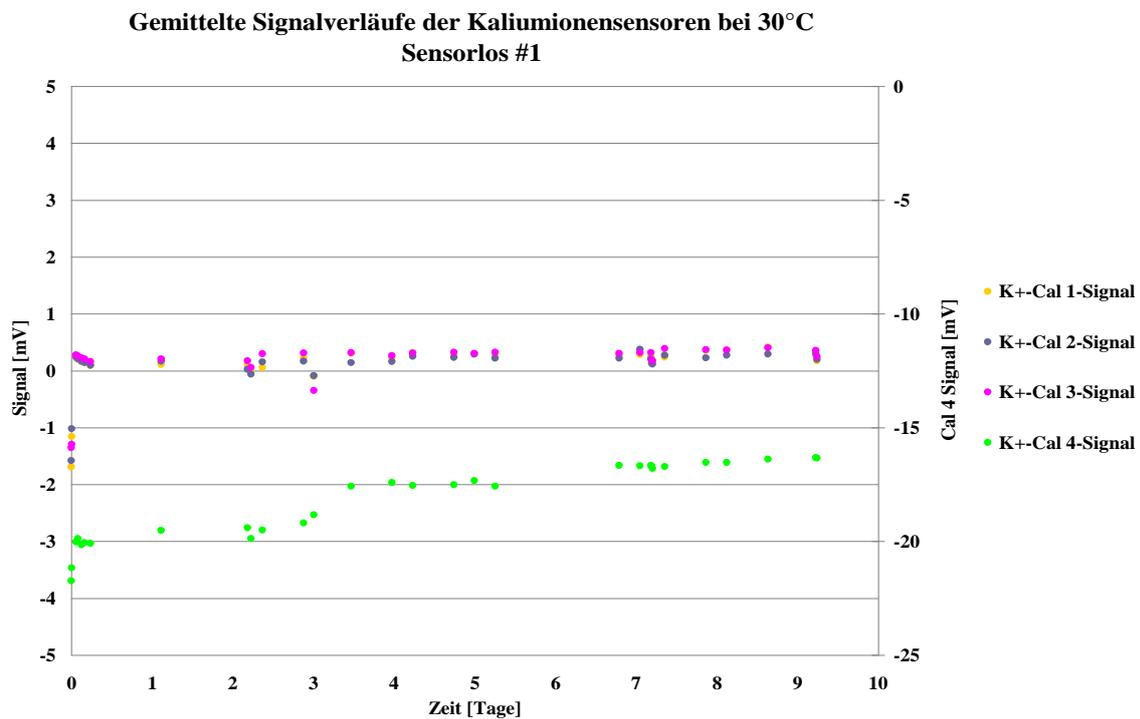
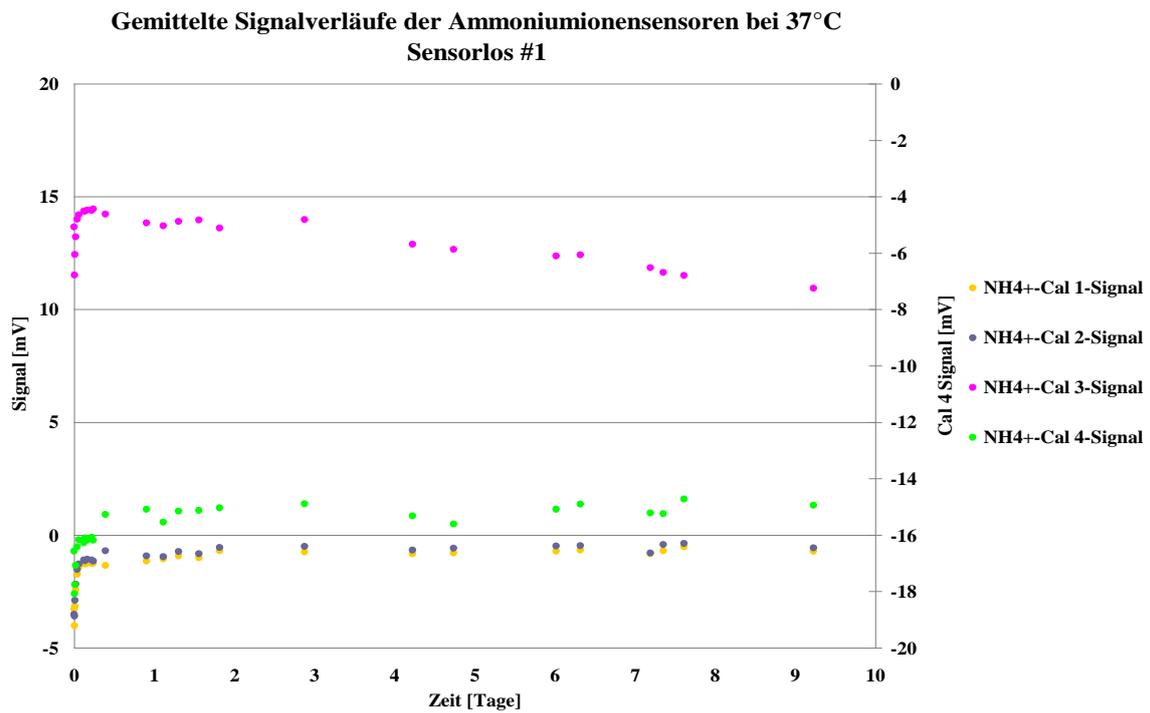


Abbildung 31 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der kaliumionenselektiven Sensoren 30°C vs. 37°C – Los #1: Abgebildet sind die Diagramme der gemittelten Kalibrationssignale über die Zeit der Kaliumionensensoren bei 37°C (A)) bzw. 30°C (B)) des Los #1. Quelle: Eigene Abbildung.

A)



B)

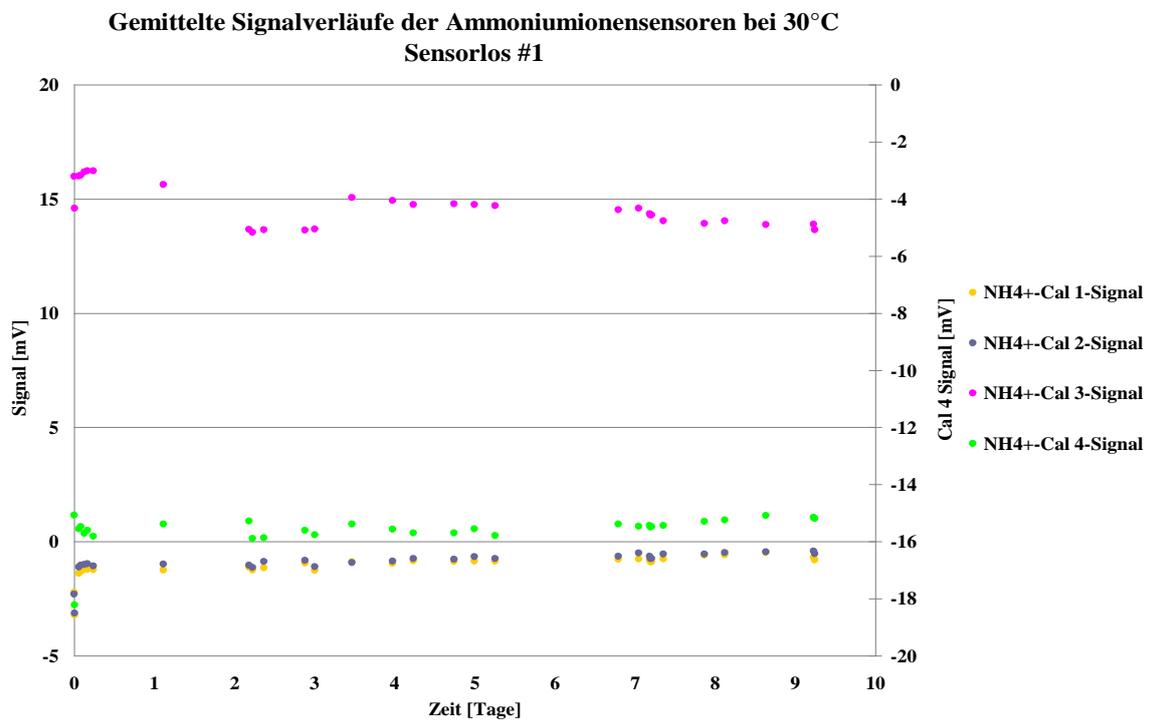
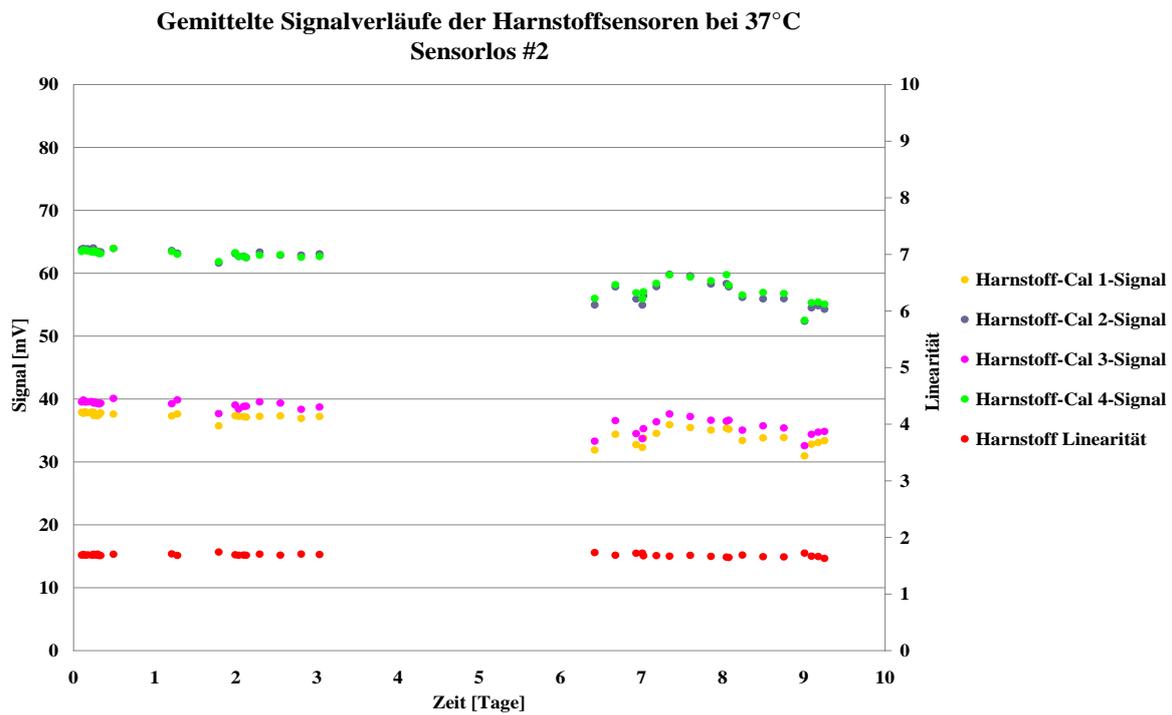


Abbildung 32 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der ammoniumionenselektiven Sensoren 30°C vs. 37°C – Los #1: Abgebildet sind die Diagramme der gemittelten Kalibrationssignale über die Zeit der Ammoniumionensensoren bei 37°C (A) bzw. 30°C (B) des Los #1. Quelle: Eigene Abbildung.

Tabelle 14 - Vergleich der Sensoreigenschaften bei unterschiedlichen Betriebstemperaturen (30°C vs. 37°C) - Los #1. Quelle: Eigene Tabelle.

je 6 Sensoren von Los #1	30°C		37°C	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw
Cal 1 Signal [mV]	52,10	1,39	51,93	1,58
Cal 2 Signal [mV]	76,96	1,53	76,92	2,22
Linerarität	1,48	0,02	1,48	0,01
Combitrol Plus B Level 1 [mmol/L]	19,78	0,46	20,03	0,47
Combitrol Plus B Level 2 [mmol/L]	6,83	0,11	6,76	0,11
Combitrol Plus B Level 3 [mmol/L]	2,32	0,05	2,28	0,09
Cal 9 [mmol/L]	8,18	0,15	7,54	1,08
Cal 10 [mmol/L]	8,95	0,21	8,69	0,25
Cal 1 vor/nach Proben [%]	-0,10	1,86	1,80	3,63
Blut/Plasma-Steigung	0,90	0,01	0,92	0,02
Blut-Steigung	0,85	0,03	0,91	0,05
Plasma-Steigung	1,01	0,02	1,02	0,05
Blut-Achsenabschnitt [mmol/L]	0,35	0,12	0,26	0,12
Plasma-Achsenabschnitt [mmol/L]	0,06	0,09	0,07	0,15
Blut-Syx [mmol/L]	0,10	0,04	0,11	0,06
Plasma-Syx [mmol/L]	0,10	0,02	0,12	0,04
Blut/Plasma-Syx [mmol/L]	0,08	0,03	0,08	0,07

A)



B)

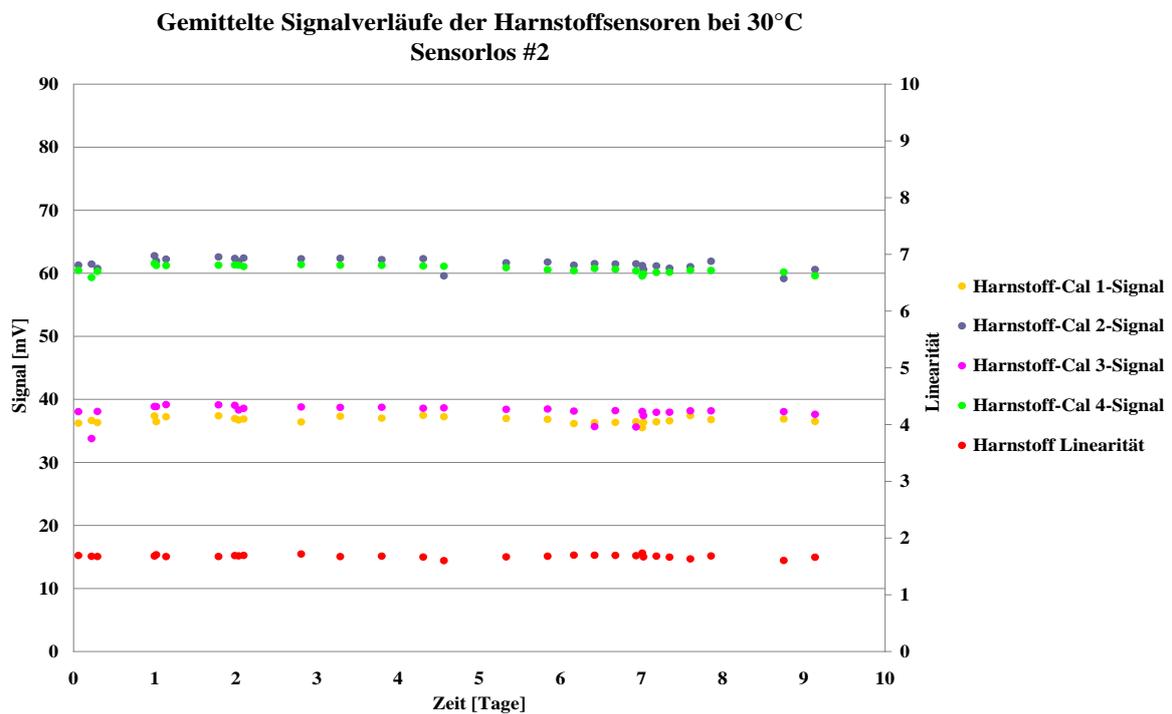
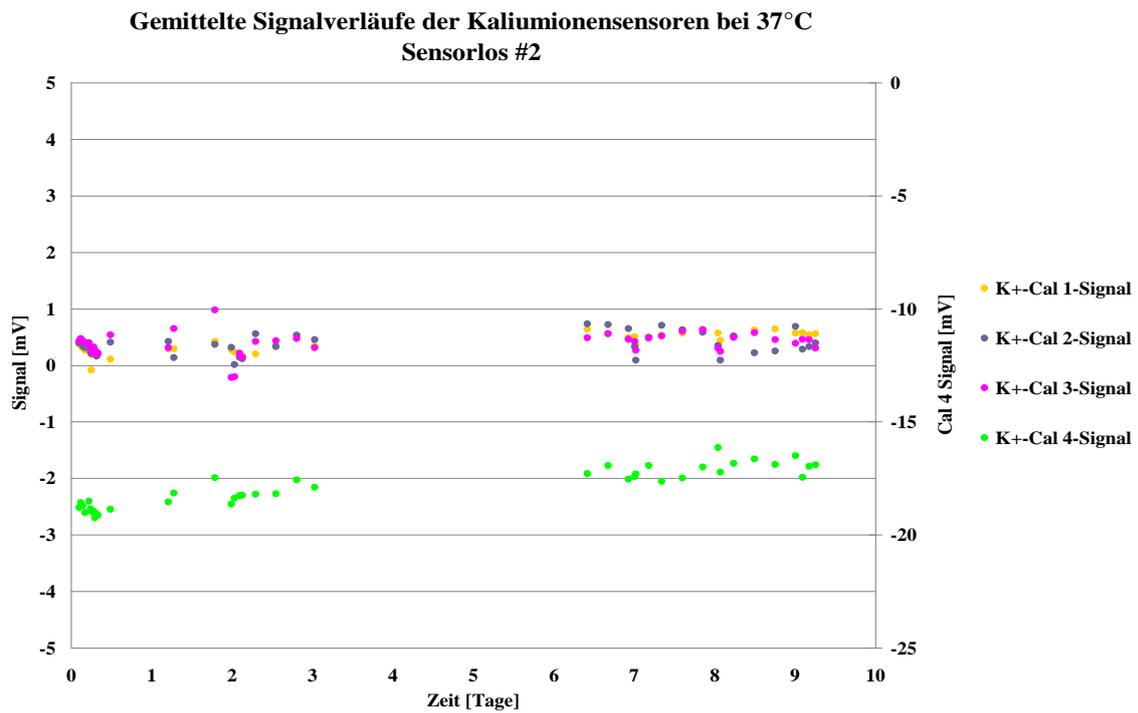


Abbildung 33 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der Harnstoffsensoren 30°C vs. 37°C – Los #2: Abgebildet sind die Diagramme der gemittelten Kalibrationssignale über die Zeit der Harnstoffsensoren bei 37°C (A) bzw. 30°C (B) des Los #2. Quelle: Eigene Abbildung.

A)



B)

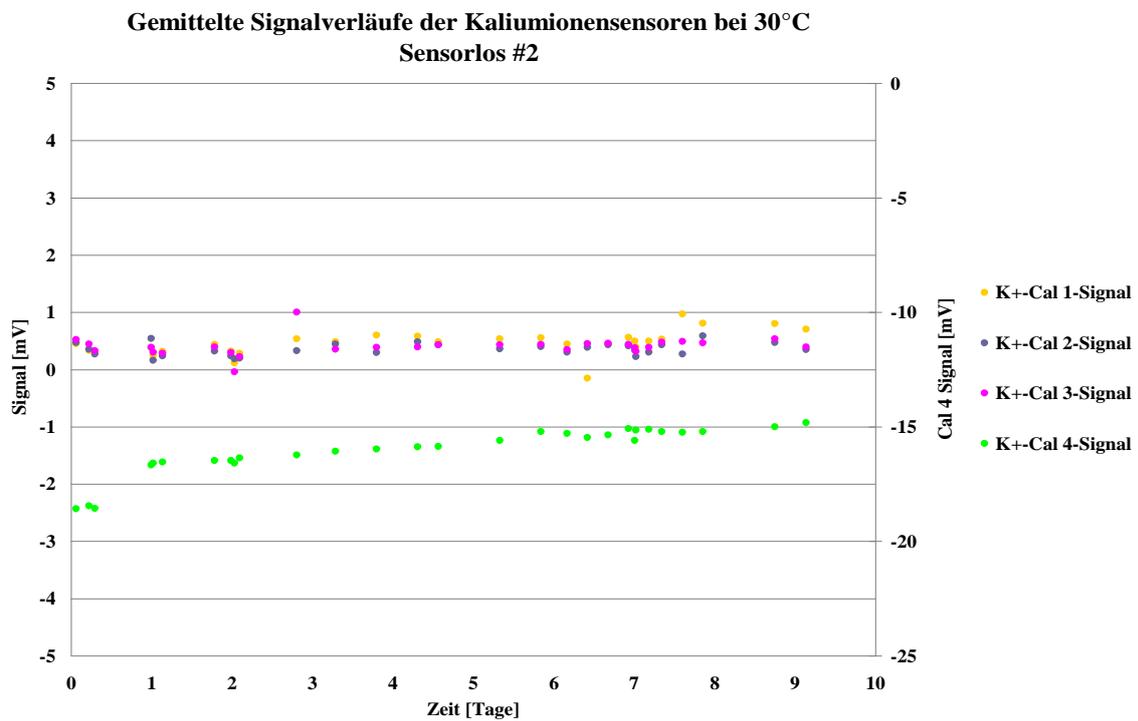
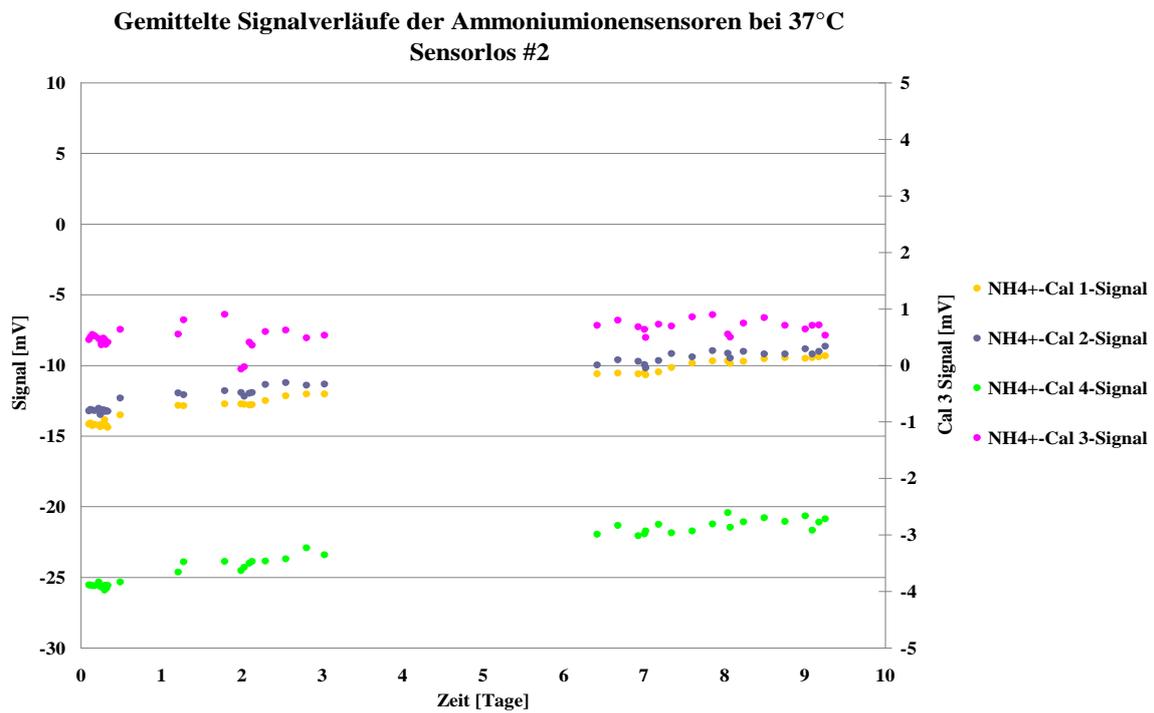


Abbildung 34 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der kaliumionenselektiven Sensoren 30°C vs. 37°C – Los #2: Abgebildet sind die Diagramme der gemittelten Kalibrationssignale über die Zeit der Kaliumionensensoren bei 37°C (A)) bzw. 30°C (B)) des Los #2. Quelle: Eigene Abbildung.

A)



B)

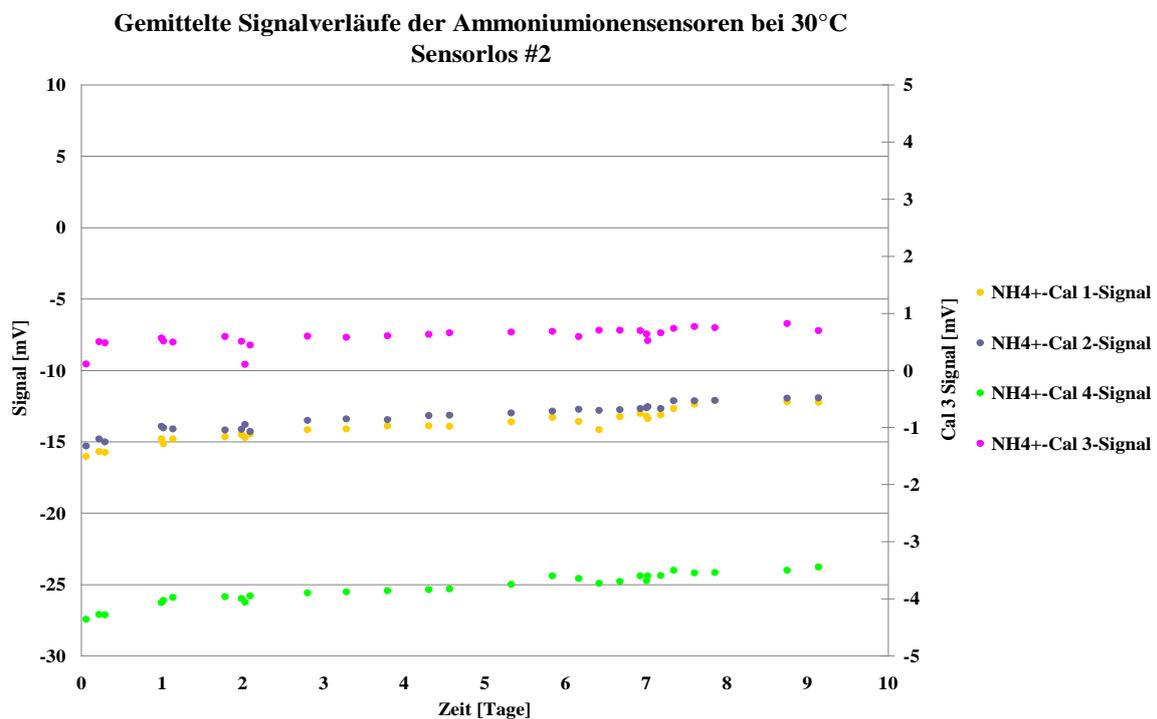


Abbildung 35 - Verläufe der gemittelten Kalibrationssignale der ammoniumionenselektiven Sensoren 30°C vs. 37°C – Los #2: Abgebildet sind die Diagramme der gemittelten Kalibrationssignale über die Zeit der Ammoniumionensensoren bei 37°C (A) bzw. 30°C (B) des Los #2. Quelle: Eigene Abbildung.

Tabelle 15 - Vergleich der Sensoreigenschaften bei unterschiedlichen Betriebstemperaturen (30°C vs. 37°C) - Los #2. Quelle: Eigene Tabelle.

je 6 Sensoren von Los #2	30°C		37°C	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw
Cal 1 Signal [mV]	36,47	1,40	36,37	2,00
Cal 2 Signal [mV]	61,09	2,11	61,29	2,95
Linerarität	1,68	0,03	1,69	0,04
Combitrol Plus B Level 1 [mmol/L]	21,35	0,73	20,89	0,93
Combitrol Plus B Level 2 [mmol/L]	7,66	0,30	7,43	0,31
Combitrol Plus B Level 3 [mmol/L]	2,31	0,12	2,13	0,16
Cal 9 [mmol/L]	9,48	0,25	9,02	0,48
Cal 10 [mmol/L]	9,97	0,31	9,90	0,29
Cal 1vor/nach Proben [%]	1,29	2,48	3,28	3,20
Blut/Plasma-Steigung	0,88	0,02	0,93	0,04
Blut-Steigung	0,90	0,03	1,01	0,11
Plasma-Steigung	1,09	0,03	1,10	0,07
Blut-Achsenabschnitt [mmol/L]	0,75	0,32	0,32	0,63
Plasma-Achsenabschnitt [mmol/L]	0,28	0,29	0,08	0,54
Blut-Syx [mmol/L]	0,24	0,31	0,20	0,14
Plasma-Syx [mmol/L]	0,15	0,06	0,21	0,14
Blut/Plasma-Syx [mmol/L]	0,21	0,32	0,11	0,04

Tabelle 16 - Vergleich der Sensoreigenschaften bei unterschiedlichen Betriebstemperaturen (30°C vs. 37°C) - Los #3. Quelle: Eigene Tabelle.

je 6 Sensoren von Los #3	30°C		37°C	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw
Cal 1 Signal [mV]	52,40	2,89	50,53	2,24
Cal 2 Signal [mV]	77,36	4,54	76,70	2,31
Linerarität	1,48	0,02	1,52	0,03
Combitrol Plus B Level 1 [mmol/L]	21,24	0,89	21,00	1,00
Combitrol Plus B Level 2 [mmol/L]	6,62	0,27	6,60	0,25
Combitrol Plus B Level 3 [mmol/L]	1,58	0,10	1,60	0,09
Cal 9 [mmol/L]	8,01	0,35	7,94	0,31
Cal 10 [mmol/L]	8,81	0,43	8,80	0,38
Cal 1vor/nach Proben [%]	0,17	2,44	-1,00	2,91
Blut/Plasma-Steigung	0,88	0,03	0,93	0,03
Blut-Steigung	0,95	0,05	0,97	0,04
Plasma-Steigung	1,14	0,04	1,09	0,04
Blut-Achsenabschnitt [mmol/L]	-0,39	0,26	-0,28	0,14
Plasma-Achsenabschnitt [mmol/L]	-0,99	0,18	-0,74	0,17
Blut-Syx [mmol/L]	0,15	0,07	0,15	0,06
Plasma-Syx [mmol/L]	0,18	0,07	0,16	0,19
Blut/Plasma-Syx [mmol/L]	0,14	0,05	0,15	0,13