

Daniel Rudolf HARRICH, BSc

Entwicklung eines Sensors zur frühzeitigen Detektion von Wundinfektionen

Masterarbeit



HEALTH - Institut für Biomedizin und Gesundheitswissenschaften

Biomedizinische Technik und Monitoring

JOANNEUM RESEARCH Forschungsgesellschaft mbH

Elisabethstraße 5, A-8010 Graz

Leitung: Univ.-Prof. Dr. Thomas Rudolf Pieber



Institut für Medizintechnik

Technische Universität Graz

Kronesgasse 5, A-8010 Graz

Vorstand: Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Rudolf Stollberger

Betreuer (JR): Dipl.-Ing. Dr.techn. Martin Hajnsek

Begutachter (TUG): Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Rudolf Stollberger

Graz, Jänner 2013

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 benutzen Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 22.01.2013

.....

(Unterschrift)

Danksagung

Diese Masterarbeit entstand in Zusammenarbeit mit dem HEALTH-Institut der Joanneum Research Forschungsgesellschaft mbH und dem Institut für Umweltbiotechnologie der TU-Graz. An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mir während der Durchführung dieser Arbeit hilfreich zur Seite gestanden sind.

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Betreuer Dipl.-Ing. Dr.techn. Martin Hajsek für die Betreuung der Masterarbeit bedanken. Danke Martin, Deine vielen guten Ratschläge haben mich immer wieder unterstützt und motiviert. Mit Deiner Kompetenz und Hilfsbereitschaft hattest Du einen entscheidenden Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Mein aufrichtiger Dank gilt weiters meinen Eltern. Danke, dass Ihr mir während des gesamten Studiums das Vertrauen geschenkt und immer an mich geglaubt habt. Ohne Eure Unterstützung wäre dieses Studium nicht möglich gewesen.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des HEALTH-Instituts der Joanneum Research Forschungsgesellschaft mbH, im Speziellen bei der BTM-Gruppe, und bei den Mitarbeitern des Institutes für Umweltbiotechnologie der TU-Graz für die Zusammenarbeit bedanken.

Kurzfassung - Entwicklung eines Sensors zur frühzeitigen Detektion von Wundinfektionen

Wundinfektionen sind die Hauptursache für verzögerte oder nicht stattfindende Wundheilung und stellen daher ein großes Problem für das Gesundheitswesen dar. Sie können im schlimmsten Fall zum Tod führen und verursachen enorme Kosten für das Gesundheitssystem. Die aktuelle Wundinfektionsdiagnostik ermöglicht die Erkennung einer Wundinfektion erst nach Auftreten äußerlich sichtbarer Entzündungszeichen, bei denen die Infektion bereits in einem fortgeschrittenen Stadium ist. Das Ziel dieser Masterarbeit ist die Entwicklung eines Sensors zur frühzeitigen Erkennung von Wundinfektionen, um rechtzeitig eingreifen zu können und somit die Last für die Patienten, den Einsatz von Antibiotika und auch die Kosten für das Gesundheitswesen zu senken.

Um dies zu ermöglichen, wird die Aktivität des Enzyms Myeloperoxidase im Wundsekret bestimmt. Dieses Enzym wird bei beginnender Infektion vermehrt ins Wundsekret ausgeschüttet und stellt somit einen Marker für den Beginn einer Infektion dar. Eines der Substrate dieses Enzyms ist Wasserstoffperoxid, welches mit amperometrischen Sensoren gemessen werden kann. Vermischt man Wundsekret mit einem Puffer, in dem sich dieses Substrat befindet, kommt es zum Substratumsatz und somit zu einem Signalabfall, der proportional zur Enzymaktivität im Wundsekret ist. Aus der Stärke dieses Signalabfalls kann die Enzymaktivität berechnet werden, die ein quantitatives Maß für die Erkennung des Beginns einer Wundinfektion darstellt.

Insgesamt wurden zwölf reale Wundproben mit dem System getestet, von denen vom behandelnden Arzt sechs als „gut heilend“ und sechs als „kritisch“ bezüglich einer Infektion eingestuft wurden. Es konnte ein eindeutiger Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen festgestellt werden, wobei die Enzymaktivität in den „kritischen“ gegenüber den „gut heilenden“ Wunden um mehr als das Vierfache erhöht war.

Die erzielten Ergebnisse demonstrieren die Eignung dieses Systems, den Wundinfektionsstatus quantitativ zu bewerten und könnten somit die Grundlage für die Entwicklung eines Gerätes zur frühzeitigen Detektion von Wundinfektionen darstellen.

Schlüsselwörter: Wundinfektion, Myeloperoxidase, Wasserstoffperoxid, Chronoamperometrie, Sensor

Abstract - Development of a sensor for early detection of wound infection

Wound infections are the main cause for delayed or not occurred wound healing and therefore poses a big issue for the health care system. In the worst case they can even lead to death and furthermore cause tremendous costs. At the moment a wound infection is diagnosed by typical signs of inflammation, but not until the infection already exists. The aim of this master thesis is the development of a sensor for the early detection of wound infections. This would allow interventions in time, with a reduction of the patient's load, the applications of antibiotic agents and the financial burden of the health care system as a result.

To meet these requirements, the activity of the enzyme myeloperoxidase can be determined directly in wound fluid. This enzyme is released into the wound fluid in high quantities at the onset of an infection and therefore could be used as a marker of infection. Hydrogen peroxide represents a substrate of this enzyme and can be measured by amperometric sensors. Compounding a buffer solution (including this substrate) with wound fluid (including the enzyme) leads to a loss of hydrogen peroxide and therefore to a signal loss, that is proportional to the enzyme activity in the wound fluid. The enzyme activity can be determined by the measured signal loss, enabling the detection of a wound infection.

Twelve real samples of wound fluid were available for testing the system. Out of these samples, six were classified by the attending physicians as "good healing" and the other six as "critical", regarding wound infection. The results showed a clear difference between these 2 groups, whereas the "critical" wound samples indicated a more than fourfold higher enzyme activity compared with the samples of the "good healing" wounds.

The obtained results demonstrate the applicability of this system to quantitatively assess the status of a wound infection and therefore could represent the basis for the development of a device for the early detection of wound infection.

Keywords: wound infection, myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chronoamperometry, sensor

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Wundinfektionen als großes Problem für das Gesundheitswesen.....	1
1.2.	Phasen der Wundheilung	3
1.3.	Aktuelle Methoden der Wundinfektionsdiagnostik.....	4
1.4.	Projektidee und Aufgabenstellung.....	5
1.5.	Das Enzym Myeloperoxidase als Marker für den Beginn einer Infektion.....	5
2.	Methoden.....	10
2.1.	Amperometrische Messung von Wasserstoffperoxid.....	10
2.1.1.	Dreielektrodensystem	10
2.1.2.	Potentiostat.....	11
2.1.3.	Chronoamperometrie	13
2.1.4.	Die elektrochemische Doppelschicht.....	14
2.1.5.	Die Nernst'sche Diffusionsschicht in bewegter und unbewegter Lösung	17
2.2.	Bestimmung der Polarisationsspannung durch zyklische Voltammetrie	18
2.3.	Herstellung der Sensoren durch Dickschichttechnologie	20
2.4.	Messsysteme und Messlösungen.....	24
2.4.1.	Messsystem für die Durchführung der zyklischen Voltammetrie.....	24
2.4.2.	Flusszelle für amperometrische Messungen	24
2.4.3.	Herstellung der Messlösung mit Phosphat-Puffer	25
2.4.4.	Amperometrische Messungen ohne MPO.....	26
2.4.4.1.	Ausbildung der Diffusionsschicht in ruhenden Lösungen	27
2.4.4.2.	Bestimmung von Sensoreigenschaften.....	27
2.4.5.	MPO-Lösungen: Wundproben und käuflich erworbenes Enzypulver	29
2.4.6.	Amperometrische Messungen mit MPO.....	31
2.4.6.1.	Wiederholpräzision des relativen Signalverlustes.....	32

2.4.6.2.	Vergleichspräzision des relativen Signalverlustes	32
2.4.6.3.	Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und relativem Signalverlust	33
2.4.7.	Datenauswertung	33
2.4.8.	Modellentwicklung zur Auswertung der Signalverluste	34
2.4.9.	Berechnung der Enzymaktivität in Wundproben	36
2.4.10.	Software zur Signalauswertung	37
3.	Ergebnisse	39
3.1.	Berechnung des pH-Wertes des Phosphat-Puffers	39
3.2.	Berechnung bestimmter H ₂ O ₂ -Konzentrationen	39
3.3.	Bestimmung der Polarisationsspannung durch zyklische Voltammetrie	41
3.4.	Herstellung der Sensoren durch Dickschichttechnologie	43
3.5.	Amperometrische Messungen von Wasserstoffperoxid ohne MPO	43
3.5.1.	Ausbildung der Diffusionsschicht in ruhenden Lösungen	43
3.5.2.	Messung einer Konzentrationsreihe und Aufnahme einer Sensorkennlinie	44
3.5.3.	Ermittlung der Ansprechzeiten und des Detektionslimits	46
3.5.4.	Wiederholpräzision des Sensorsignales (Repeatability)	47
3.5.5.	Vergleichspräzision des Sensorsignales (Reproducibility)	47
3.5.6.	Drift des Sensorsignales	48
3.6.	Amperometrische Messung von Wasserstoffperoxid mit MPO	49
3.6.1.	Wiederholpräzision des relativen Signalverlustes	49
3.6.2.	Vergleichspräzision des relativen Signalverlustes	50
3.6.3.	Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und relativem Signalverlust	50
3.6.4.	Messungen mit realen Wundproben	52
3.6.5.	Berechnung der Enzymaktivität an Hand eines Beispiels	54
4.	Diskussion	56
4.1.	Verwendung des Phosphatpuffers zur Herstellung der Messlösung	56

4.2. Bestimmung der Polarisationsspannung durch zyklische Voltammetrie	57
4.3. Herstellung der Sensoren durch Dickschichttechnologie	59
4.4. Amperometrische Messungen von Wasserstoffperoxid	60
4.4.1. Allgemein.....	60
4.4.2. Amperometrische Messungen ohne MPO.....	61
4.4.3. Amperometrische Messungen mit MPO.....	67
5. Literatur.....	73
6. Anhang.....	79
6.1. Störungen im Messsignal ohne die Verwendung eines Faraday'schen Käfigs	79
6.2. Einfluss des unkonstanten Flusses der Pumpe auf das Messsignal	80
6.3. Berechnung des Analytverbrauchs während der Messung	80
6.4. Überprüfung der Vergleichspräzision des Sensorsignals - Rohdaten	81

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phagozytose in einem neutrophilen Granulozyten	6
Abbildung 2: Das antimikrobielle System der MPO	8
Abbildung 3: Dreielektrodensystem.....	10
Abbildung 4: Schaltung eines Potentiostaten	12
Abbildung 5: Ausbildung der elektrochemischen Doppelschicht	14
Abbildung 6: Auswahl der Spannung bei der Chronoamperometrie.....	15
Abbildung 7: Die Nernst'sche Diffusionsschicht in ruhender und bewegter Lösung	17
Abbildung 8: Spannungsverlauf bei der zyklischen Voltammetrie	18
Abbildung 9: Zyklovoltammogramme für reversible und irreversible Elektrodenreaktionen	19
Abbildung 10: Siebdruckverfahren zur Herstellung der Sensoren.....	20
Abbildung 11: Schritt 1 bei der Sensorherstellung	21
Abbildung 12: Schritt 2 bei der Sensorherstellung	22
Abbildung 13: Schritt 3 bei der Sensorherstellung	22
Abbildung 14: Schritt 4 bei der Sensorherstellung	22
Abbildung 15: Herstellung eines Platinsensors.....	23
Abbildung 16: Messsystem für die zyklische Voltammetrie	24
Abbildung 17: Flusszelle für amperometrische Messungen	25
Abbildung 18: Messsystem für Messungen ohne MPO.....	26
Abbildung 19: Messsystem für Messungen mit MPO.....	31
Abbildung 20: Sigmoidmodell zur Auswertung der Messungen mit MPO	34
Abbildung 21: Sigmoidmodell für die Auswertung von Wiederhol- und Vergleichspräzision des Sensorsignals	35
Abbildung 22: Flussdiagramm der Software zur Signalauswertung	37
Abbildung 23: Zyklisches Voltammogramm eines Braunsteinsensors in Phosphatpuffer	41
Abbildung 24: Zyklisches Voltammogramm eines Braunsteinsensors in 1 mM H ₂ O ₂	41
Abbildung 25: Zyklisches Voltammogramm eines Platinsensors in Phosphatpuffer.....	42
Abbildung 26: Zyklisches Voltammogramm eines Platinsensors in 1 mM H ₂ O ₂	42
Abbildung 27: Hergestellte Sensoren in einem Arbeitsschritt.....	43
Abbildung 28: Ausbreitung der Diffusionsschicht in ruhender Lösung	44
Abbildung 29: Messung einer Konzentrationsreihe von 1 µM bis 125 µM	44

Abbildung 30: Sensorkennlinie (Kalibrationsgerade).....	45
Abbildung 31: Ermittlung der Ansprechzeiten.....	46
Abbildung 32: Ermittlung des Detektionslimits	46
Abbildung 33: Wiederholpräzision des Sensorsignals	47
Abbildung 34: Vergleichspräzision des Sensorsignals.....	47
Abbildung 35: Langzeitmessung zur Überprüfung der Drift des Sensorsignals.....	48
Abbildung 36: Wiederholpräzision des relativen Signalverlustes.....	49
Abbildung 37: Vergleichspräzision des relativen Signalverlustes	50
Abbildung 38: Messungen des relativen Signalverlustes für verschiedene Enzymaktivitäten	50
Abbildung 39: Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und relativem Signalverlust.....	51
Abbildung 40: Ergebnisse der gut heilenden Wundproben.....	52
Abbildung 41: Ergebnisse der kritischen Wundproben	52
Abbildung 42: Ergebnisse der uncharakterisierten Wundproben	53
Abbildung 43: Software zur Datenauswertung.....	53
Abbildung 44: statistische Auswertung der berechneten Enzymaktivität in gut heilenden und kritischen Wunden	55
Abbildung 45: Schwankungen im Messsignal durch externe Störsignale.....	79
Abbildung 46: Einfluss des Pumpenrauschens auf das Signal.....	80
Abbildung 47: Rohdaten zur Messung der Vergleichspräzision des Sensorsignals	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wundproben.....	30
Tabelle 2: gemessene Ströme der Konzentrationsreihe.....	45
Tabelle 3: gemessene Signalverluste für verschiedene Enzymaktivitäten	51
Tabelle 4: berechnete Enzymaktivitäten und Vergleich der Charakterisierungen	55

Abkürzungsverzeichnis

AE ... Arbeitselektrode
CV... Variationskoeffizient (Coefficient of Variation)
FR ... Flussrate
GE ... Gegenelektrode
MPO ... Myeloperoxidase
NADPH ... Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
OV ... Operationsverstärker
PAVK ... periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR ... Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
RE ... Referenzelektrode
SV ... Signalverlust
VF ... Verdünnungsfaktor

Begriffsdefinitionen

Abstrich: „Entnahme von Untersuchungsmaterial von Wunden zur mikrobiologischen oder zytologischen Diagnostik“ [1]

Antisepsis: „Maßnahmen zur Abtötung, irreversiblen Inaktivierung und Wachstumshemmung von an lebenden Geweben haftenden Mikroorganismen unter Verwendung chemischer Substanzen“ [1]

Antiseptika: „mikrobizide Wirkstoffe zur prophylaktischen Antisepsis sowie zur Therapie lokaler Infektionen (Desinfektionsmittel)“ [1]

Calciphylaxie: Verkalkung kleiner oder mittlerer arterieller Gefäße mit tief gehender lokaler Schädigung der Haut [2]

Degranulation: Verschmelzung von verschiedenen Vesikeln mit einer Zellmembran unter gleichzeitiger Absonderung von Sekreten in diese Zelle

Debridement: Entfernen von Fremdkörpern und abgestorbenem Gewebe aus der Wunde [3]

Dekubitus: Druckgeschwür; Schädigung der Haut und des Unterhautgewebes durch Druckeinwirkung [3]

Grundstrom: Geringer Strom, der auch ohne das Vorhandensein des zu messenden Analyten gemessen wird [4]

Manschettenulcus: Umlaufender Ulcus, der z.B. um den ganzen Unterschenkel auftritt

mikrobizid: bezeichnet die Fähigkeit, Mikroorganismen abzutöten [1]

Mortalität: Kennzahl, die sich auf die Anzahl der Todesfälle in einer bestimmten Population, die an einer bestimmten Krankheit innerhalb eines bestimmten Zeitraums leiden, bezieht [5]

Osteomyelitis: Knochenmarksentzündung [1]

PAVK: periphere arterielle Verschlusskrankheit; Durchblutungsstörung der Becken- und Beinarterien, die häufig zu Schmerz und Nekrosenbildung führt [6]

Prävalenz: Kennzahl, die sich auf die Anzahl der Erkrankungen an einer bestimmten Erkrankung zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer bestimmten Population bezieht [1]

Ulcus: Geschwür, tiefliegender Substanzdefekt in der Haut [1]

Ulcus Cruris: Unterschenkelgeschwür; „offenes Bein“; Substanzdefekt der Haut, der meist über dem Innenknöchel auftritt [1]

Ulcus Cruris Venosum: Ulcus Cruris, dessen Ursache eine chronisch venöse Insuffizienz (Störung des venösen Rücktransports) ist [1]

x:y-Mischung: Mischung von x Teilen der Substanz A mit y Teilen der Substanz B

x:y-Verdünnung: x Teile der Substanz A werden auf y Gesamtteile aufgefüllt. Eine 1:2-Verdünnung entspricht somit einer 1:1-Mischung.

zytotoxisch: bezeichnet die Fähigkeit, Zellen zu schädigen bzw. abzutöten [1]

1. Einleitung

1.1. Wundinfektionen als großes Problem für das Gesundheitswesen

„Unter einer Wundinfektion versteht man das Eindringen und Vermehren eines Infektionserregers in bzw. auf einer Wunde und die immunologische Reaktion des Wirtsorganismus auf den Erreger“ [7].

Wundinfektionen sind eine der Hauptursachen für verzögerte oder nicht stattfindende Wundheilung [8] und stellen daher ein großes Problem für das Gesundheitswesen dar (Prävalenz 10-15 %, Mortalität 2,5 % [9] (Daten für Europa)). Neben der Last für den Patienten ist auch der wirtschaftliche Aspekt relevant. Die Behandlung von Wundinfektionen verursacht allein in Europa pro Jahr zusätzliche Kosten von über 20 Milliarden Euro (vor allem durch verlängerte Krankenhausaufenthalte und die Notwendigkeit zusätzlicher Medikamente) [10]. Durch eine Wundinfektion wird ein Krankenhausaufenthalt um mindestens 10 Tage verlängert [8]. Vor allem Kinder und Personen im höheren Alter besitzen ein schwächeres Immunsystem und sind daher stärker gefährdet, eine Infektion zu erleiden. Die demographische Entwicklung zeigt eine deutlich zunehmende Lebenserwartung, einhergehend mit einem starken Wachstum an chronisch kranken und pflegebedürftigen Menschen.

Ist der Heilprozess einer Wunde nicht innerhalb der physiologischen Abheilzeit von 8 Wochen abgeschlossen, wird sie definitionsgemäß als „chronisch“ bezeichnet [11], [12]. Diese Art der Wunde besitzt auf Grund des chronischen Verlaufes eine hohe Anfälligkeit für Infektionen, geht mit großen Schmerzen einher und kann zu akuten gesundheitlichen Problemen führen. Bei langjährigem Bestehen kann es zu einer verminderten Lebensqualität (gesellschaftliche Isolation, häufige Verbandswechsel, Einschränkung der Bewegungsfähigkeit, üble Gerüche) kommen [3]. Typische Beispiele für chronische Wunden sind Dekubitus Wunden (Schädigung der Haut durch anhaltende Druckeinwirkung), Ulcus Cruris („offenes Bein“) und das diabetische Fußsyndrom [11]. Sowohl bei chronischen, als auch bei postoperativen Wunden ist das Risiko einer Wundinfektion gegeben (etwa 5 % der postoperativen Wunden sind davon betroffen [13] [7], bei den chronischen Wunden sind es ca. 25 % [7].)

Erreger von Wundinfektionen können Bakterien, Viren oder Pilze sein [11]. In überwiegenden Fällen sind jedoch Bakterien die Verursacher einer Infektion (vor allem Staphylokokkus Aureus, Escherichia Coli und Staphylokokkus Epidermidis) [10].

Alle Wunden sind mit Mikroorganismen der umliegenden Haut oder der lokalen Umgebung kontaminiert. Die Entwicklung einer Wundinfektion ist jedoch nicht nur von der Anzahl der vorhandenen Mikroorganismen abhängig. Zusätzlich spielen die Pathogenität und die Invasivität der Mikroorganismen, der Zustand der Wunde (z.B. Vorhandensein von Fremdkörpern, Durchblutungsverhältnisse) und die individuelle Abwehrfähigkeit des Patienten eine entscheidende Rolle [8], [14]. Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion wird jedoch erhöht, je mehr pathogene Keime vorhanden sind (eine quantitative Last von mehr als 100 000 Keimen pro Kubikmillimeter Wundsekret ist prädiktiv für eine Wundinfektion [3])

Bei der Besiedelung von Wunden mit Mikroorganismen muss zwischen folgenden Stufen unterschieden werden [3], [8], [14]:

- Kontamination: In der Wunde sind nicht-replizierende Mikroorganismen vorhanden, es erfolgt jedoch keine Wirtsreaktion. Die Mikroorganismen werden durch die Abwehrmechanismen des Gewebes rasch beseitigt.
- Kolonisation: Wie bei der Kontamination erfolgt keine Wirtsreaktion, aber eine Vermehrung der Bakterien.
- Kritische Kolonisation: Eine erhöhte bakterielle Last verursacht Verzögerungen in der Wundheilung (durch bakterielle Toxine) ohne feste Zeichen einer Entzündung.
- Lokale Infektion: Vorhandensein von replizierenden Mikroorganismen mit Wirtsreaktion. Die erhöhte Proliferation der Mikroorganismen übersteigt die Abwehrfähigkeit des Wirtes und führt zu klassischen Entzündungszeichen.
- Systemische Infektion: Weitere Erhöhung der Keimzahl; ohne sofortige Behandlung kommt es zur systemischen Aussaat und Sepsis, was zu Multiorganversagen und zum Tod führen kann.

Wird eine systemische Wundinfektion durch den behandelnden Arzt erkannt, droht eine weitere Ausbreitung der Bakterien und es muss sofort eine Antibiotika-Therapie erfolgen, noch bevor die mikrobiologische Diagnostik vorliegt (diese ist u.U. erst nach einigen Tagen verfügbar). Die Auswahl des Antibiotikums obliegt der Erfahrung des Arztes und hängt von

der Art und Lokalisation der Wunde, von früheren mikrobiologischen Untersuchungsergebnissen sowie einer möglichen Medikamentenallergie des Patienten ab. Würde der Beginn einer Infektion früher erkannt werden, könnte eine Antibiotika-Therapie verhindert werden, da bei lokal infizierten Wunden oft eine Behandlung mit Antiseptika (z.B. Silber- oder Iodverbindungen) ausreichend ist [3]. Eine prophylaktische Behandlung der Wunde mit Antiseptika (zur Vorbeugung) wird grundsätzlich nicht durchgeführt, da jeder Eingriff die Wundheilung stört. Die Entscheidung, ob und wie Wunden behandelt werden, stellt also eine große Herausforderung dar.

1.2. Phasen der Wundheilung

„Als Wundheilung bezeichnet man Vorgänge zur Regeneration zerstörten Gewebes, die insbesondere durch Neubildung von Bindegewebe und Kapillaren den Verschluss einer Wunde bewirken“ [1].

Akute Wunden (Unfallwunden) heilen in einem geordneten Verlauf, welcher nach ca. 3 Monaten abgeschlossen ist und in 3 Phasen gegliedert werden kann. Die erste Phase (inflammatorische Phase) beginnt mit dem Reinigen der Wunde von abgetötetem Gewebe und Fremdmaterial und bereitet die Wunde auf den Heilungsprozess vor. In der darauffolgenden proliferativen Phase wird vermehrt Kollagen gebildet und es kommt zu einer Kontraktion der Wunde. Der Prozess der Wundheilung wird durch die letzte Phase (repetative Phase) beendet, in der es zur Ausbildung einer Narbe und zur Wiederherstellung der mechanischen Stabilität des Gewebes kommt [15].

Die Phasen der Wundheilung sind sehr sensitiv gegenüber Störungen, da sie in einem komplexen biologischen Prozess ablaufen. Wird dieser Prozess durch Ursachen wie Infektionen, Alter, Diabetes und venöse oder arterielle Krankheiten unterbrochen, kann dies zu chronischen, nicht heilenden Wunden führen. Bakterielle Infektionen sind die Hauptursache für die Ausbildung von chronischen Wunden. Sie können den normalen Wundheilungsprozess durch verschiedene Mechanismen (z.B. durch Konkurrieren um essentielle Nährstoffe und Sauerstoff mit Phagozyten und Fibroblasten) stark verzögern oder sogar anhalten [8].

1.3. Aktuelle Methoden der Wundinfektionsdiagnostik

Die gängigste Art der Wundinfektionsdiagnostik ist die Erkennung der Infektion durch den behandelnden Arzt an Hand typischer Entzündungszeichen wie Rötung (Rubor), Erwärmung (Calor), Schwellung (Tumor), Schmerz (Dolor) und Funktionsbeeinträchtigungen (Functio laesa) [16]. Diese sogenannten „Kardinalsymptome“ sind die Folge einer Entzündungsreaktion, einem Schutzmechanismus, welcher die Zerstörung und Neutralisierung von toxischen Substanzen am Infektionsort (die z.B. durch Bakterien ausgeschüttet werden) zum Ziel hat. Weitere Anzeichen einer Infektion sind üble Gerüche, verstärkte Sekretion und pathologisches Granulationsgewebe [3]. Hierbei kann eine Infektion erst nach Manifestation (Auftreten äußerlich sichtbarer Zeichen) erkannt werden (in diesem Stadium ist die Infektion bereits fortgeschritten, was eine schwierige Behandlung zur Folge hat). Die Möglichkeit, eine Wundinfektion während ihres Entstehungsprozesses zu erkennen, ist bis dato noch nicht gegeben.

Diese sehr subjektive Beurteilung erfordert ein großes Maß an Erfahrung in diesem Bereich und es ist schwer zu beurteilen, in welchen Wunden sich eine Infektion entwickelt. Nur selten sind bei einem Krankheitsfall alle klassischen Entzündungszeichen vorliegend, meistens liegen unterschiedliche Kombinationen der Symptome vor [14]. Die Diagnose wird zusätzlich dadurch erschwert, dass beim normalen postoperativen Verlauf (primäre, normale Wundheilung) klinische Zeichen in gleicher Weise vorkommen können, wie sie bei dem Vorliegen einer Infektion in Erscheinung treten [17]. Zusätzlich können diese Symptome (z.B. bei Patienten mit Immunsuppression) sogar fehlen [3]. Demzufolge ist die Notwendigkeit prophylaktischer Maßnahmen im Rahmen der Wundversorgung schwer abschätzbar.

Als weitere Methoden werden Abstriche und die PCR-Analytik zur Identifikation der vorhandenen Wundkeime durchgeführt. Nach einem Abstrich liegt das Ergebnis allerdings erst nach einigen Tagen vor, da eine Anzucht der Bakterien notwendig ist. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist eine hohe diagnostische Fehlerquote [8]. Eine Alternative dazu ist der Nachweis vom C-reaktiven Protein im Blut, dessen Konzentration während einer Entzündung zunimmt [16–18]. Dazu werden Blutabnahmen durch entsprechendes Fachpersonal und spezielle Geräte benötigt. Zusätzlich können bildgebende Verfahren (Röntgen, Magnetresonanztomographie oder Ultraschall) eingesetzt werden, um z.B. eine

Ansammlung von Eiter sichtbar zu machen [17] oder eine durch Wundinfektion verursachte Osteomyelitis zu erkennen [3].

1.4. Projektidee und Aufgabenstellung

Eine frühzeitige Erkennung einer Wundinfektion ist für den weiteren Krankheitsverlauf eines Patienten von entscheidender Bedeutung. Nicht diagnostizierte und unbehandelte Wundinfektionen verzögern den Heilungsprozess (eine erhöhte bakterielle Last hemmt die Wundheilung [7]) und können abgesehen von der Last des Patienten weitere schwere Folgen nach sich ziehen. Im schlimmsten Fall kann eine Wundinfektion durch Sepsis („Blutvergiftung“, Keime gelangen in die Blutbahn) bis zum Tod führen [8]. Durch eine frühzeitige Erkennung einer Wundinfektion könnte rechtzeitig eingegriffen werden (Antiseptika bzw. chirurgisches Debridement [7], [19]), wodurch es zu enormen Einsparungen im Gesundheitswesen, einer erhöhten Lebensqualität des Patienten und zu einem verminderten Einsatz von Antibiotika (Reduzierung von Antibiotikaresistenzen) kommen könnte.

Alle unter 1.3. angeführten Methoden sind entweder teuer, zeitintensiv oder ungenau. Bisher gibt es kein System auf dem Markt, mit welchem die Diagnose einer Wundinfektion schnell, günstig und genau durchgeführt werden kann. Aus diesem Grund besteht seitens der behandelnden Ärzte ein großes Interesse daran, Infektionen so früh wie möglich zu erkennen und deren Ausbreitung zu verhindern. Eine schnelle Wundinfektionsdiagnostik wäre vor allem in der Hauspflege (z.B. bei chronischen Ulcus – Patienten) oder zur Kontrolle des Wundinfektionsstatus im Zuge eines Verbandwechsels sinnvoll. Je früher Therapiemaßnahmen gesetzt werden können, desto geringer sind die Kosten und vor allem das Leid der Patienten. Das Ziel dieser Masterarbeit ist es, ein System zu entwickeln, welches diese Vorteile vereinigt und somit eine schnelle, günstige und sichere Wundinfektionsdiagnostik ermöglicht.

1.5. Das Enzym Myeloperoxidase als Marker für den Beginn einer Infektion

Um dies zu erreichen, wird die Aktivität eines Enzyms (der Myeloperoxidase, MPO) direkt in Wundflüssigkeit bestimmt. Dieses Enzym wird von neutrophilen Granulozyten des

menschlichen Immunsystems **bei beginnender Infektion** vermehrt produziert und in das Wundsekret ausgeschüttet.

Neutrophile Granulozyten („Neutrophile“) sind mit 50 – 60 % Anteil an der Gesamtleukozytenzahl die häufigsten weißen Blutzellen im menschlichen Körper [8]. Sie haben einen Durchmesser von 6 – 12 μm und sind stabkernig (unreifer neutrophiler Granulozyt) oder segmentkernig (reifer, polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt) [20].

Der größte Teil der neutrophilen Granulozyten befindet sich als Reserve im Knochenmark. Diese Reserve wird aktiviert, wenn es zu einer Infektion kommt [21]. Dabei penetrieren Neutrophile die Gefäßwand (Diapedese) und kommen innerhalb weniger Stunden als eine der ersten Zellen am Ort der Wunde (am Infektionsort) an. Sie werden durch chemische Signale, die von eingedrungenen Keimen, aber auch von bereits am Infektionsort befindlichen Neutrophilen selbst, freigesetzt werden, zum Ort der Wunde geleitet (Chemotaxis) [16], [21]. Je mehr Keime eine Wunde befallen, desto mehr Neutrophile werden dabei aktiviert. Durch eine schwere Infektion kann ein größerer Granulozytenverbrauch hervorgerufen werden [21]. Im Falle einer Infektion steht also eine erhöhte Menge an neutrophilen Granulozyten zur Bekämpfung von eingedrungenen Keimen durch Phagozytose in der Wunde zur Verfügung.

Neutrophile sind Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr und zur Phagozytose von eingedrungenen Keimen befähigt (Abb. 1).

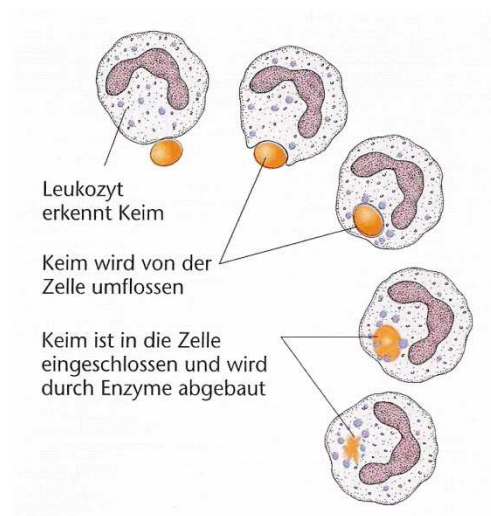


Abbildung 1: Phagozytose in einem neutrophilen Granulozyten [22]

Neutrophile Granulozyten besitzen verschiedene Rezeptoren, die Antigene auf Fremdkörpern, z.B. auf Bakterien erkennen können [21]. Bei dieser Erkennung spielen Antikörper, das Komplementsystem und Zytokine eine entscheidende Rolle [23]. Dadurch können Pathogene an die Zellmembran eines Phagozyten gebunden werden. Nach dieser Bindung wird das Pathogen von der Zellmembran des neutrophilen Granulozyten umschlossen und als Phagosom internalisiert (Phagozytose). Das Pathogen wird dabei so dicht von der Zellmembran des Neutrophilen umschlossen, dass möglichst wenig extrazelluläre Flüssigkeit in das Phagosom gelangt. Für den Inhalt dieses Phagosoms sind hauptsächlich intrazelluläre Granula (in Abb.1 als blaue „Körnchen“ dargestellt) verantwortlich, welche die mikrobiziden Substanzen beinhalten [24]. Durch Verschmelzen mit diesen Granula (z.B. azurophile Granula, welche das Enzym MPO beinhalten [23]) kommt es zur Degranulation, wobei diese Substanzen in das Phagosom ausgeschüttet werden (es entsteht das sogenannte Phagolysosom). Dies gewährleistet eine neue chemische Umgebung, welche eine entscheidende Rolle in der Bekämpfung der Pathogene spielt [24], [25]. Das Bakterium wird in Bruchstücke zerlegt (bakterielle Proteine werden chloriert [26]), woraufhin sich die Membran des Phagolysosoms löst. Der neutrophile Granulozyt selbst wird in seinem Inneren mit den vorher das Bakterium zerstörenden Substanzen überflutet und ebenfalls zerstört. Dabei bricht die Zellmembran auf und dessen Inhalt (unter anderem das Enzym MPO) wird in das Wundsekret ausgeschüttet. Die durch diese Abwehrreaktion absterbenden Granulozyten sind die Hauptursache für den Eiter, der wegen der freigesetzten MPO eine leichte Grünfärbung aufweisen kann. Je mehr Keime in einer Wunde vorhanden sind, desto mehr Neutrophile nehmen an der Abwehrreaktion teil und sind an der Ausschüttung der MPO beteiligt.

MPO (EC 1.11.1.7 [27]) ist ein Häm-enthaltendes Enzym, welches in den azurophilen Granula der Neutrophilen in hohen Konzentrationen gespeichert wird (ca. 5 % der Trockenmasse der Neutrophilen ist auf dieses Enzym zurückzuführen [28]). Es katalysiert die Bildung von Hypochloriger Säure aus Wasserstoffperoxid und Chlorid-Ionen, welche ein wirksames antibakterielles, antivirales und antifungales Mittel darstellt. Die MPO besteht aus 2 Monomeren, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind und ein Dimer bilden [29]. Jedes Monomer besteht aus einer schweren (59 kDa, 466 Aminosäuren) und einer leichten Untereinheit (14 kDa, 108 Aminosäuren) und ist kovalent an eine Hämgruppe gebunden, welche für die katalytische Aktivität des Enzyms verantwortlich ist [28]. Durch die

kovalente Bindung der Häm-Gruppe wird die Konfiguration und in weiterer Folge das optische Spektrum des Häms derart verändert, dass es nicht wie in den meisten Häm-Proteinen (z.B. Hämoglobin) rot, sondern grün erscheint. Dies ist auch der Grund für die grünliche Farbe des Eiters [30], [31].

Die physiologische Funktion der MPO ist die Produktion von Hypochloriger Säure (HOCl) aus Wasserstoffperoxid und Chlorid-Ionen [32], [33]. Das pH-Optimum für diese Reaktion liegt im neutralen Bereich [34].

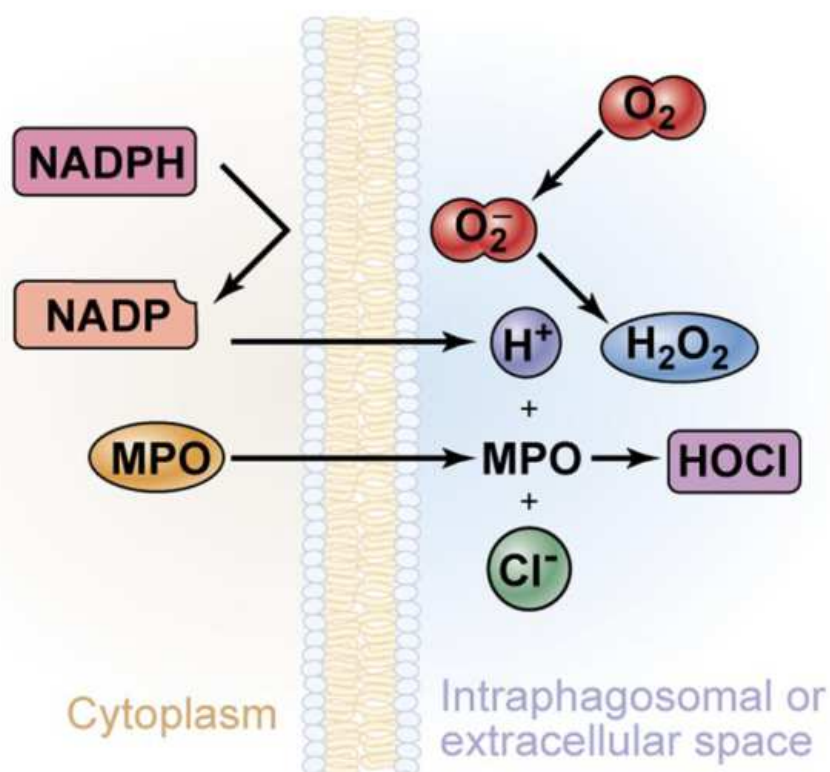
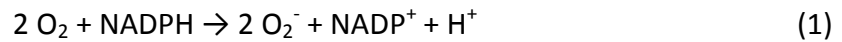


Abbildung 2: Das antimikrobielle System der MPO [35]: Das Enzym bildet aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Protonen (H^+) und Chloridionen (Cl^-) Hypochlorige Säure (HOCl), welche mikrobizid wirkt

Die Enzyme NADPH-Oxidase und MPO spielen eine entscheidende Rolle beim Abtöten der phagozytierten Mikroorganismen. Die NADPH-Oxidase ist ein Enzym des sogenannten respiratorischen Bursts (Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies), bei dem toxische Produkte entstehen, die zum Abtöten der phagozytierten Mikroorganismen erforderlich sind. Dieses Enzym befindet sich in der phagosomalen Membran und besteht aus mehreren Untereinheiten, mit deren Hilfe vom NADPH (im Zytoplasma des Neutrophilen) allmählich ein Elektron auf den molekularen Sauerstoff (im Phagosom) übertragen wird, wodurch das Superoxidanion-Radikal (Superoxid, O_2^-) entsteht [36], [37]:



Dieses Superoxid ist sehr instabil, sodass daraus in weiterer Folge Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gebildet wird (entweder spontane Disproportionierung oder bei geringeren Konzentrationen katalytisch durch das Enzym Superoxid-Dismutase [25]), welches jedoch (wie auch das Superoxid selbst) nur in sehr hohen Konzentrationen antibakteriell wirkt [24].



Diese Reaktion wird als Disproportionierung bezeichnet (Superoxid reagiert mit sich selbst unter Bildung eines oxidierten (O_2) und eines reduzierten Produktes (H_2O_2)) [31].

Die MPO verstärkt die antibakterielle Wirkung, indem es aus dem produzierten Wasserstoffperoxid, Protonen und Chlorid-Ionen, die aus der Extrazellulärflüssigkeit aufgenommen werden, Hypochlorige Säure (HOCl) bildet [25], [26], [38]:



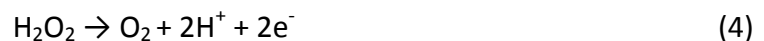
Hypochlorige Säure ist das stärkste Zytotoxin, das von Phagozyten gebildet wird, und spielt somit eine entscheidende Rolle im Immunsystem [39], [40]. Es reagiert mit ungesättigten Fettsäuren und bildet Substanzen (Chlorohydrine), die in weiterer Folge Zellmembranen destabilisieren können [34]. Im Vergleich zu Wasserstoffperoxid ist die antimikrobielle Wirksamkeit der Hypochlorigen Säure ca. um das 1000-fache erhöht [36].

Im Vergleich zu nicht infizierten Wunden ist in infizierten Wunden die Aktivität des Enzyms MPO stark erhöht [41]. Diese erhöhte Aktivität kann auf die verstärkte Infiltration von Neutrophilen zur infizierten Wunde zurückgeführt werden. Das Enzym ist also nach der Freisetzung extrazellulär (im Wundsekret) vorhanden, wird bei Infektionen in erhöhten Mengen ausgeschüttet und ist deshalb als Markerenzym für die Diagnose von Wundinfektionen geeignet [39], [42], [43].

2. Methoden

2.1. Amperometrische Messung von Wasserstoffperoxid

Wie einführend bereits erklärt, sind Wasserstoffperoxid und Chlorid Substrate für das Enzym MPO. Diese Substrate werden durch eine Mischung mit dem Enzym (z.B. Wundsekret) verbraucht, wobei dieser Verbrauch von der Aktivität des Enzymes abhängig ist. Die Enzymaktivität ist definiert als Substratumsatz pro Zeiteinheit (Einheit U; 1 U entspricht dem Umsatz von 1 μmol Substrat pro Minute) und wird in flüssigen Medien in U/ml angegeben. Die Messung der MPO-Aktivität zur Erkennung einer Wundinfektion kann über den Verbrauch von Wasserstoffperoxid erfolgen, welches amperometrisch gemessen werden kann. Dabei wird Wasserstoffperoxid nach Anlegen einer konstanten Spannung, der sogenannten Polarisationsspannung, an der Arbeitselektrode eines Dreielektrodensystems nach folgender Reaktion oxidiert [44], [45]:



Bei dieser Reaktion werden pro H_2O_2 -Molekül zwei Elektronen an die Arbeitselektrode abgegeben, woraus ein Strom resultiert, der proportional zur Wasserstoffperoxid – Konzentration ist und mit einem Potentiostaten gemessen werden kann. Sind im Falle einer Infektion erhöhte Mengen der MPO im Wundsekret vorhanden, kommt es nach der Mischung zu einem erhöhten Verbrauch von Wasserstoffperoxid, wodurch ein Signalabfall im messbaren Signal entsteht.

2.1.1. Dreielektrodensystem

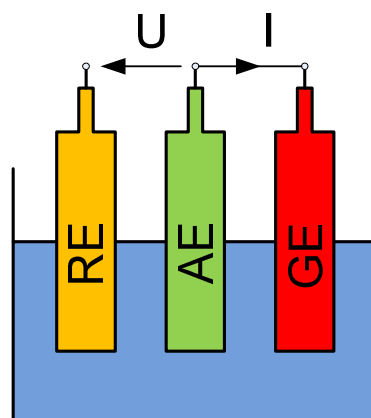


Abbildung 3: Dreielektrodensystem: nach Anlegen einer Spannung U zwischen Arbeitselektrode (AE) und Referenzelektrode (RE) fließt ein Strom über die Gegenelektrode (GE), der proportional zur Analytkonzentration ist

Für die Messungen wird ein Dreielektrodensystem bestehend aus einer Arbeitselektrode (Messelektrode, Braunstein oder Platin), einer Referenzelektrode (Bezugselektrode, Silber/Silberchlorid) und einer Gegenelektrode (Hilfselektrode, Karbon) verwendet. An der polarisierbaren Arbeitselektrode erfolgt bei Anlegen der entsprechenden Polarisationsspannung die spezifische Umsetzung des Analyten (Wasserstoffperoxid), wodurch das Messsignal entsteht. Die Referenzelektrode dient zur Einstellung und Aufrechterhaltung des Arbeitspotentials. Sie ist eine hochohmige, nicht polarisierbare Elektrode zweiter Art und muss stromlos betrieben werden, damit ihr Potential konstant gehalten werden kann. Um dies zu gewährleisten, wird eine dritte Elektrode (Gegenelektrode) verwendet, die den Stromfluss durch den Elektrolyten ermöglicht und mit dem Analyten nicht in Wechselwirkung tritt. Dieser Elektrolyt verhält sich wie ein ohm'scher Widerstand, der bei Stromfluss einen Spannungsabfall verursacht. Ein Stromfluss über die Referenzelektrode würde zu einem Spannungsabfall zwischen Arbeits- und Referenzelektrode führen und somit das Arbeitspotential verändern. Das Konstanthalten des Arbeitspotentials ist jedoch wichtig, da es die Elektrodenreaktion bestimmt. Aus diesem Grund sollte die Referenzelektrode nicht zwischen Arbeits- und Gegenelektrode platziert werden [46], [47].

2.1.2. Potentiostat

Für amperometrische Messungen am Dreielektrodensystem wird ein Messgerät benötigt, das die Spannung zwischen Arbeits- und Referenzelektrode konstant hält und den Strom zwischen Arbeits- und Gegenelektrode misst (Potentiostat Gamry PCI4, Warminster, USA). Um dies zu ermöglichen, vergleicht dieses Messgerät die zwischen der Arbeitselektrode und Referenzelektrode herrschende Potentialdifferenz (Istspannung) mit einer vorgegebenen Sollspannung. Die Sollspannung kann dabei ein zeitlich konstanter Wert (Chronoamperometrie) oder variabel (z.B. Dreieckspannung bei zyklischer Voltammetrie) sein. Besteht ein Unterschied zwischen Ist- und Sollspannung (z.B. wenn Elektronen durch die Elektrodenreaktion an die Arbeitselektrode abgegeben werden und damit ihr Potential verändern), so gleicht die Regelschaltung des Potentiostaten die Istspannung der vorgegebenen Sollspannung an, indem ein passender Strom über die Gegenelektrode geleitet wird. Der Potentiostat erzeugt also zwischen Arbeits- und Gegenelektrode einen Stromfluss, der so lange geregelt wird, bis sich das gewünschte Potential an der Arbeitselektrode einstellt [48]. Je mehr Elektronen an die Arbeitselektrode abgegeben

werden, desto höher muss dieser Strom sein, um der Potentialänderung durch die abgegebenen Elektronen entgegenzuwirken.

Schaltung:

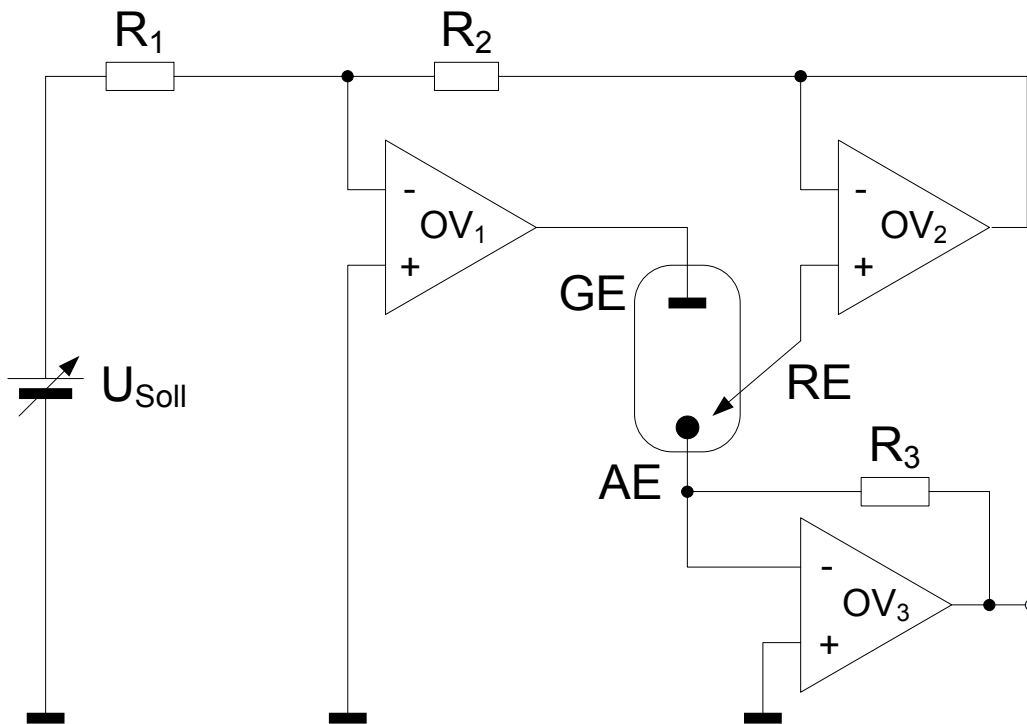


Abbildung 4: Schaltung eines Potentiostaten [47]: Der Regelverstärker OV_1 vergleicht ständig die Differenz zwischen Ist- und Sollspannung. Im Falle einer Abweichung fließt ein Strom über die Gegenelektrode zur Arbeitselektrode, der dieser Abweichung entgegenwirkt und die Differenz zwischen Ist- und Sollspannung wieder verringert.

Am invertierenden Eingang des Regelverstärkers OV_1 wird die Sollspannung U_{Soll} vorgegeben, die manuell einstellbar ist. Die Arbeitselektrode wird von OV_3 auf Massepotential gehalten (auch der nichtinvertierende Eingang von OV_1 liegt auf Masse). Der Potentiostat verstärkt nun jede kleine Abweichung der Sollspannung von der Istspannung (Differenz an den Eingängen von OV_1). Das verstärkte und invertierte Signal wird als Strom über die Gegenelektrode auf die Arbeitselektrode geleitet und ändert somit ihr Potential, d.h., die Istspannung wird so verändert, dass die Differenz zwischen Soll- und Istspannung verringert wird. Findet keine Elektrodenreaktion statt, bleibt das Potential der Arbeitselektrode konstant und die Istspannung entspricht der Sollspannung, sodass kein Strom über die Gegenelektrode fließt. Fließt ein Strom durch eine Elektrode, dann wird ihr Potential verschoben. Um ein konstantes Potential der Referenzelektrode zu gewährleisten, darf durch diese kein Strom fließen. Dies wird (annähernd) durch den OV_2 ermöglicht, der einen

sehr hohen Eingangswiderstand besitzt ($G\Omega$ -Bereich). Durch die Schaltung des OV_3 als Stromfolger wird die Arbeitselektrode auf Massepotential gehalten und die Messung des Stromes ermöglicht (der Strom kann indirekt über den Spannungsabfall am bekannten Widerstand R_3 gemessen werden). [47]

Dadurch, dass die Spannung zwischen Arbeitselektrode und Referenzelektrode (annähernd) konstant gehalten wird, herrscht zwischen diesen beiden Elektroden ein (annähernd) konstantes elektrisches Feld. Das elektrische Feld zwischen Arbeitselektrode und Gegenelektrode ist abhängig vom Ausmaß der elektrochemischen Umsetzung des Analyten. Je größer dieser Umsatz ist, desto höher ist auch die Ausgangsspannung des OV_1 (und der Regelstrom zwischen Arbeitselektrode und Referenzelektrode) und somit das elektrische Feld zwischen diesen beiden Elektroden.

2.1.3. Chronoamperometrie

Bei der Chronoamperometrie wird eine konstante Spannung zwischen Arbeits- und Referenzelektrode angelegt und der dabei fließende Strom gemessen [49]. Diese Spannung ist spezifisch für das Elektrodenmaterial und den zu messenden Analyten und liefert die notwendige Aktivierungsenergie für die elektrochemische Umsetzung. Durch diese Aktivierungsenergie werden chemische Reaktionen erzwungen, die normalerweise nicht ablaufen. Als Arbeitselektrodenmaterial für die Wasserstoffperoxid – Sensorik sind dabei die Materialien Braunstein (Mangandioxid, MnO_2) [50–53] und Platin (Pt) [54–56] weit verbreitet.

Der Prozess der amperometrischen Messung eines Analyten kann prinzipiell durch 4 Schritte beschrieben werden [4]:

1. Der Analyt diffundiert zur Arbeitselektrode
2. An der Oberfläche der Arbeitselektrode wird der Analyt adsorbiert
3. Die elektrochemische Reaktion findet statt
4. Die Reaktionsprodukte verlassen die Elektrode durch Diffusion in die Lösung

Durch das angelegte Potential an der Arbeitselektrode wird diese polarisiert, was zunächst zu einem kapazitiven Stromfluss führt. Dabei kommt es zu einer Ladungstrennung an der Phasengrenzfläche (Elektrodenoberfläche, Elektrolyt) und dadurch zur Ausbildung der elektrochemischen Doppelschicht. Ist diese Schicht vollständig aufgebaut, fließt im Idealfall

kein kapazitiver Strom mehr. Erst bei Vorhandensein einer elektroaktiven Spezies kommt es zur Depolarisation und damit zu einem Stromfluss. Diese Ströme werden durch die Umsetzung des Analyten (Oxidation an der Anode oder Reduktion an der Kathode) an der Elektrodenoberfläche hervorgerufen und als „Faraday'sche Ströme“ bezeichnet [57].

2.1.4. Die elektrochemische Doppelschicht

Wird an eine in einem Elektrolyten befindlichen Elektrode (in Bezug auf eine zweite Elektrode, der Referenzelektrode) eine Gleichspannung angelegt, wird zunächst ein Strom gemessen, der rasch wieder auf null absinkt. Durch das Anlegen dieser Spannung besitzt die Elektrode einen Überschuss an Ladungen bestimmten Vorzeichens, was zur Folge hat, dass sich auf der Elektrolytseite entgegengesetzt geladene Ionen sammeln. Diese Ladungstrennung ist vergleichbar mit einem Kondensator und wird als „elektrochemische Doppelschicht“ bezeichnet. Der Aufladungsvorgang dieser Schicht verursacht einen kapazitiven Strom, der so lange fließt, bis die Doppelschicht vollständig aufgebaut ist.

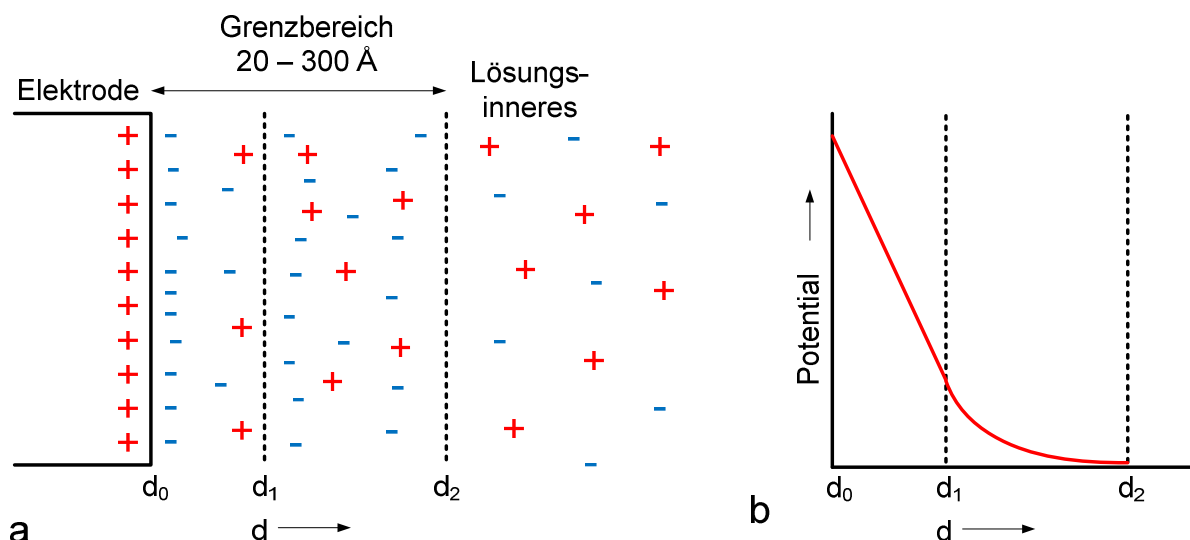


Abbildung 5: Ausbildung der elektrochemischen Doppelschicht: a.) Ladungszonen vor der Elektrode, b.) Potentialverlauf vor der Elektrode; d stellt den Abstand zur Elektrodenoberfläche dar

Die Zone vor der Elektrodenoberfläche (im Elektrolyten) besteht aus 2 Bereichen (Abb. 5) [58]:

- Einer kompakten inneren Schicht (d_0 - d_1 , das Potential nimmt linear mit der Entfernung von der Elektrodenoberfläche ab)
- Einer diffusen äußeren Schicht (d_1 - d_2 , exponentielle Abnahme des Potentials)

Die kompakte innere Schicht („Stern-Schicht“) wird durch die Radien der beteiligten Ionen verursacht. Bedingt durch die thermische Bewegung der Ionen entsteht mit zunehmender Entfernung eine diffuse Schicht. Durch die Berücksichtigung der Radien und der thermischen Bewegung der Ionen wurde dieses Modell von Stern entwickelt, welches die beiden Modelle von Helmholtz (nur kompakte Schicht, Vernachlässigung der thermischen Bewegung) und Gouy-Chapman (nur diffuse Schicht, Vernachlässigung der Ionenradien, Annahme von Punktladungen) vereinigt [59].

Der Vorteil eines konstanten Arbeitspotentials ist die ausschließliche Registrierung des Faraday'schen Stromes. Die kapazitiven Ströme zum Aufladen der Doppelschichtkapazität tragen bei konstanten Potentialen nicht zum gemessenen Strom bei (keine Umladung der elektrochemischen Doppelschicht), sodass sehr geringe Nachweisgrenzen erzielt werden können [46]. Bei jeder Änderung des Arbeitspotentials kommt es zu Ladungsverschiebungen an der elektrochemischen Doppelschicht, was einen kapazitiven Strom zur Folge hat. Dieser Strom überlagert den durch den Analyten erzeugten Faraday'schen Strom und ist daher als Störsignal anzusehen.

Die Einstellung der konstanten Spannung zwischen Arbeitselektrode und Referenzelektrode erfolgt dabei so, dass sie im Bereich des Diffusionsgrenzstromes des elektroaktiven Analyten liegt [46]:

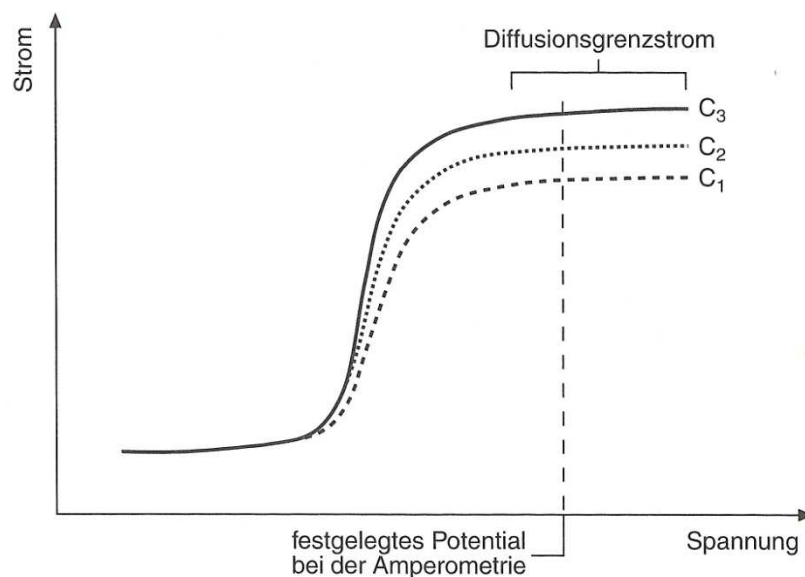


Abbildung 6: Auswahl der Spannung bei der Chronoamperometrie [46]: Im Bereich des Diffusionsgrenzstromes ist der messbare Strom linear proportional zur Analytkonzentration (C_1 beschreibt die geringste Analytkonzentration, C_3 die größte)

Im stromlosen Zustand liegt in der gesamten Lösung, also auch direkt vor der Arbeitselektrode, die gleiche Analytkonzentration vor. Wird die Spannung zwischen Arbeitselektrode und Referenzelektrode langsam erhöht, beginnt ein Strom zu fließen, der auf die elektrochemische Umsetzung des Analyten an der Arbeitselektrode zurückzuführen ist. In diesem Bereich wird der Strom durch die Kinetik der elektrochemischen Reaktion an der Arbeitselektrode bestimmt. Durch weitere Erhöhung der Spannung wird auch der Strom höher, da immer mehr Analytmoleküle elektrochemisch umgesetzt werden.

Bedingt durch den Verbrauch des Analyten verringert sich dessen Konzentration direkt vor der Arbeitselektrode, es entsteht ein Konzentrationsgradient. Vor der Elektrode bildet sich dabei eine Diffusionsschicht aus (Nernst'sche Diffusionsschicht). Durch diesen Konzentrationsgradienten gelangen in weiterer Folge Analytmoleküle durch Diffusion gemäß dem ersten Fick'schen Gesetz zur Arbeitselektrode [46], [60]:

$$J_x = -DA \frac{\partial c}{\partial x} \quad (5)$$

J_x ... Diffusionsfluss in x-Richtung (mol/s)

D ... Diffusionskoeffizient (cm^2/s)

A ... Querschnittsfläche senkrecht zur x-Richtung (cm^2)

$\frac{\partial c}{\partial x}$... Konzentrationsgradient (mol/cm^4)

Im sogenannten Grenzstrombereich (Diffusionsgrenzstrom, Abb. 6) wird der gesamte Analyt an der Arbeitselektrode sofort elektrochemisch umgesetzt (d.h., die Analytkonzentration direkt an der Elektrodenoberfläche ist null, der Konzentrationsgradient und der ihm proportionale Strom sind maximal). Der Faraday'sche Strom wird hier nicht mehr durch die Kinetik der Elektrodenreaktion, sondern nur durch die Diffusion des Analyten zur Elektrodenoberfläche kontrolliert [4]. Das bedeutet, dass die Elektrodenreaktion schneller abläuft als die Anlieferung des Analyten durch Diffusion (diffusionslimitierender Bereich). Durch eine weitere Erhöhung der Spannung erfolgt keine Stromzunahme mehr, da die Spannung nur die Geschwindigkeit der Elektrodenreaktion, nicht aber die Diffusion beeinflusst. Da die Diffusion durch einen Konzentrationsunterschied bestimmt wird und die Analytkonzentration an der Elektrodenoberfläche im Grenzstrombereich immer Null ist, wird der Konzentrationsgradient nur noch von der Analytkonzentration in der Lösung und der Dicke der Nernst'schen Diffusionsschicht bestimmt [46].

2.1.5. Die Nernst'sche Diffusionsschicht in bewegter und unbewegter Lösung

Wird die Lösung (mit konstanter Geschwindigkeit) gerührt, dann hat die Nernst'sche Diffusionsschicht eine konstante Dicke δ (Abb. 7b), da durch die Konvektion stets genügend Analyt an die Grenzfläche dieser Schicht geliefert wird [46].

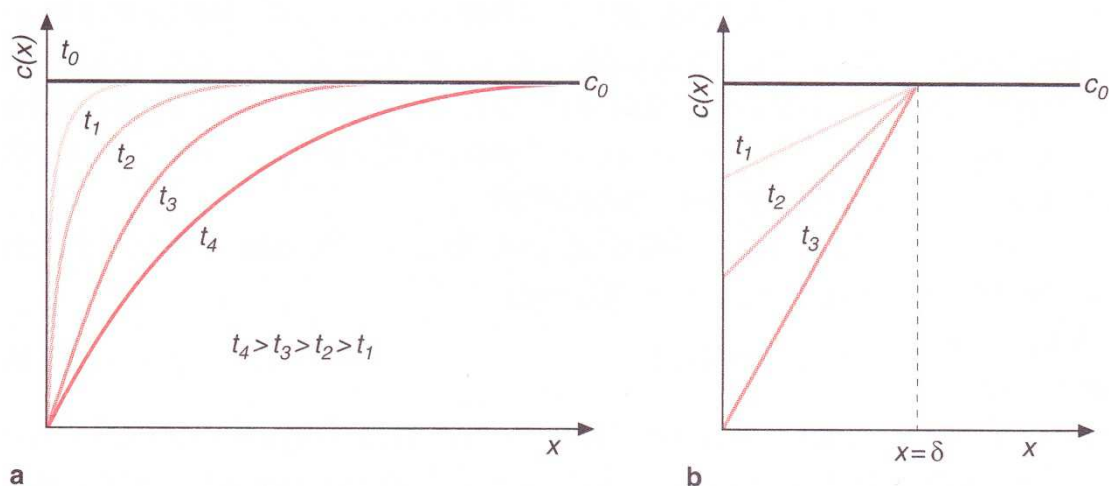


Abbildung 7: Die Nernst'sche Diffusionsschicht in ruhender und bewegter Lösung [46]: a.) in ruhenden Lösungen wächst sie mit der Zeit t in die Lösung hinein; b.) in (konstant) bewegten Lösungen bleibt die Dicke der Diffusionsschicht konstant; c_0 = Analytkonzentration, die roten Kurven beschreiben den Konzentrationsverlauf mit der Entfernung x von der Elektrode

Die Dicke der Nernst'schen Diffusionsschicht ist inversproportional zur Rühr- bzw. Fließgeschwindigkeit [4], [61]. Je höher diese Geschwindigkeit ist, desto dünner wird die Diffusionsschicht und desto größer wird der Konzentrationsgradient. Der Diffusionsgrenzstrom, der proportional zum Konzentrationsgradienten ist, hängt bei konstanter Rührgeschwindigkeit nur noch von der Analytkonzentration in der Messlösung ab und folgt allen Konzentrationsänderungen [46].

$$I_d = zFAD * \frac{C_0}{\delta} \quad (6)$$

I_d ... Diffusionsgrenzstrom (A)

z ... Anzahl der an der Elektrodenreaktion beteiligten Elektronen

F ... Faraday-Konstante (As/mol)

A ... elektrochemisch aktive Fläche der Arbeitselektrode (cm^2)

D ... Diffusionskoeffizient des Analyten im verwendeten Medium (cm^2/s)

C_0 ... Konzentration des Analyten in der Messlösung (mol/cm^3)

δ ... Dicke der Nernst'schen Diffusionsschicht (cm)

In einer ruhenden Lösung ist die Nernst'sche Diffusionsschicht nicht mehr konstant, sondern wächst mit \sqrt{t} in die Lösung hinein (Abb. 7a). Dadurch wird auch der Konzentrationsgradient kleiner, was zur Folge hat, dass der Strom mit $1/\sqrt{t}$ sinkt. Dieses zeitabhängige Verhalten des Stromes wird durch die Cottrell-Gleichung beschrieben [46], [61]:

$$I(t) = \frac{zFA\sqrt{D}}{\sqrt{\pi t}} * C_0 \quad (7)$$

Um ein konstantes, zur Analytkonzentration proportionales Stromsignal zu erhalten, ist es also wichtig, dass die Messlösung relativ zur Arbeitselektrode bewegt wird (z.B. durch Rühren oder durch Pumpen der Messlösung über den Sensor).

2.2. Bestimmung der Polarisationsspannung durch zyklische Voltammetrie

Um die optimale Polarisationsspannung (im Bereich des Diffusionsgrenzstromes, siehe Abb. 6, Seite 15) für die Oxidation von Wasserstoffperoxid an der Arbeitselektrode für das vorliegende Dreielektrodensystem mit Braunstein und Platin als Arbeitselektrodenmaterial zu ermitteln, wurde eine zyklische Voltammetrie durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, das Potential einer Elektrode, welche in eine ruhende Lösung eingetaucht ist, zyklisch zu verändern und den dabei fließenden Strom zu messen [62].

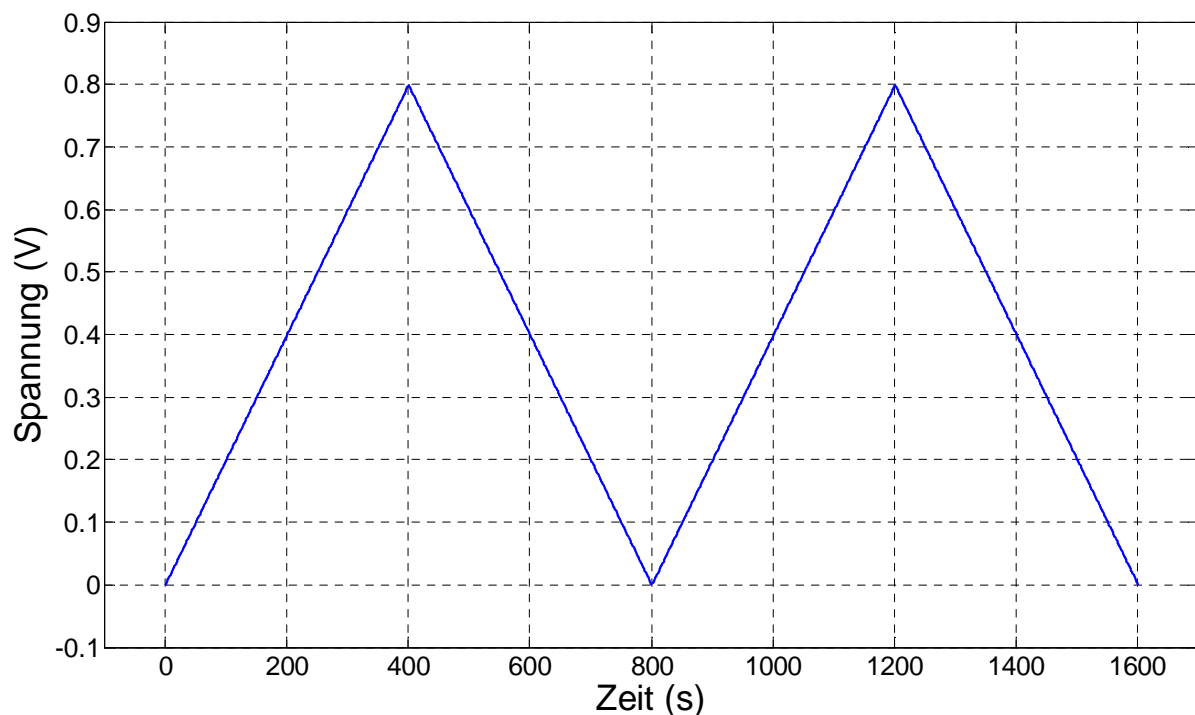


Abbildung 8: Spannungsverlauf bei der zyklischen Voltammetrie

Die Änderung der Spannung zwischen Arbeits- und Referenzelektrode erfolgt dabei linear mit einer bestimmten Scanrate (mV/s) bis zu einer vorgegebenen Maximalspannung. Ist diese sogenannte Umkehrspannung erreicht, erfolgt die Spannungsänderung mit negativem Vorzeichen (oder auch umgekehrt), sodass der Verlauf eine Dreiecksspannung ergibt. Die Umkehrspannungen werden dabei so gewählt, dass zwischen ihnen eine diffusionskontrollierte Oxidation oder Reduktion des bzw. der Analyten stattfinden kann [58]. Die Spannung zwischen Arbeits- und Referenzelektrode wurde dabei zweimal (2 Zyklen oder „Scans“, siehe Abb. 8) mit einer Scanrate von 2 mV/s linear zwischen 0 und 800 mV geändert.

Trägt man den gemessenen Strom über die Spannung auf, erhält man ein für die elektroaktive Substanz und das verwendete Arbeitselektrodenmaterial charakteristisches Zyklovoltammogramm [46]. Aus diesen Zyklovoltammogrammen kann die optimale Polarisationsspannung für das vorliegende System ermittelt werden.

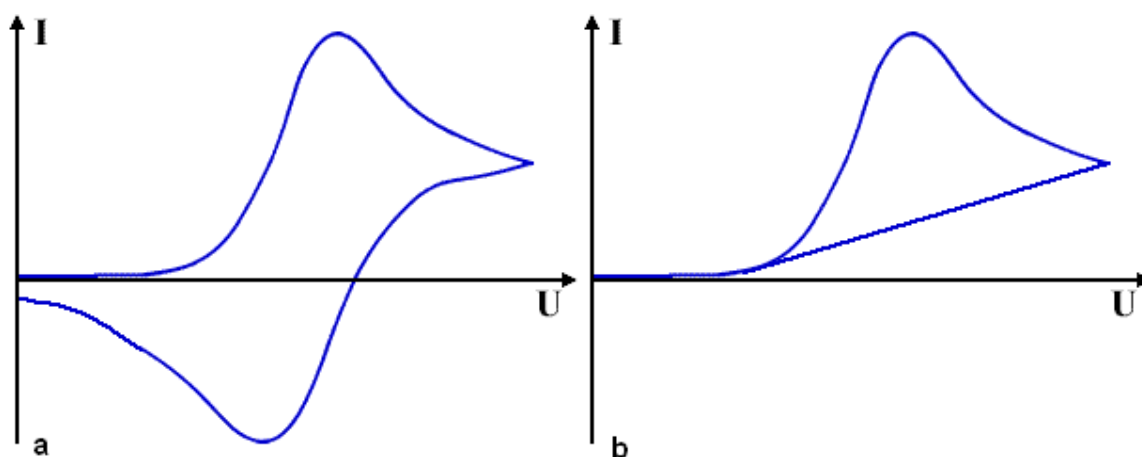


Abbildung 9: Zyklovoltammogramme für reversible und irreversible Elektrodenreaktionen [63]: a: reversible Elektrodenreaktion mit negativem Peak; b: irreversible Elektrodenreaktion ohne negativem Peak

Wie bereits erwähnt, steigt der Strom bis zum Erreichen des Plateaus (Grenzstrombereich) an, da mit Erhöhung der Spannung immer mehr Analyt elektrochemisch umgesetzt wird und somit zum Strom beiträgt. Die zyklische Voltammetrie wird in ruhenden Lösungen durchgeführt [46], [58], was dazu führt, dass der Strom nach Erreichen dieses Plateaus bedingt durch die Ausbreitung der Diffusionsschicht und der damit verbundenen Verringerung des Konzentrationsgradienten wieder sinkt.

Bei der elektrochemischen Reaktion entstehen Produkte, die sich danach in der Nähe der Elektrodenoberfläche befinden. Wird z.B. ein Analyt an der Elektrodenoberfläche oxidiert, kann diese oxidierte Form beim Rückwärtsscan wieder reduziert werden. In diesem Fall ist die Elektrodenreaktion reversibel, was im Voltammogram zu einem negativen Peak mit ca. gleich großem Peakstrom führt (siehe Abb. 9a). Bei irreversiblen Reaktionen ist dieser Peak nicht erkennbar, weil im Rückwärtsscan keine Rückreaktionen stattfinden (siehe Abb. 9b).

Aus den gemessenen Voltammogrammen kann die optimale Spannung für die Oxidation von Wasserstoffperoxid an Braunstein- und Platinelektroden ermittelt werden. Diese ist durch den Beginn der Plateauphase gekennzeichnet, sodass nach dem Anlegen dieser Spannung ein konzentrationsproportionales Stromsignal gemessen werden kann. Um den Einfluss des Analyten auf das Sensorsignal zu überprüfen, wurden Messungen in reinem Phosphatpuffer (ohne Analyt H_2O_2 , „Deckschichtdiagramm“) und in einer 1 mM H_2O_2 -Lösung durchgeführt.

2.3. Herstellung der Sensoren durch Dickschichttechnologie

Für die Herstellung der Sensoren wurde die Dickschichttechnologie verwendet, bei der Schichten mittels Siebdruck auf einen Träger (nichtleitende Substratfolie) aufgedruckt werden. Diese Technologie ist für die Massenproduktion von leicht austauschbaren Einwegsensoren weit verbreitet [52], [64].

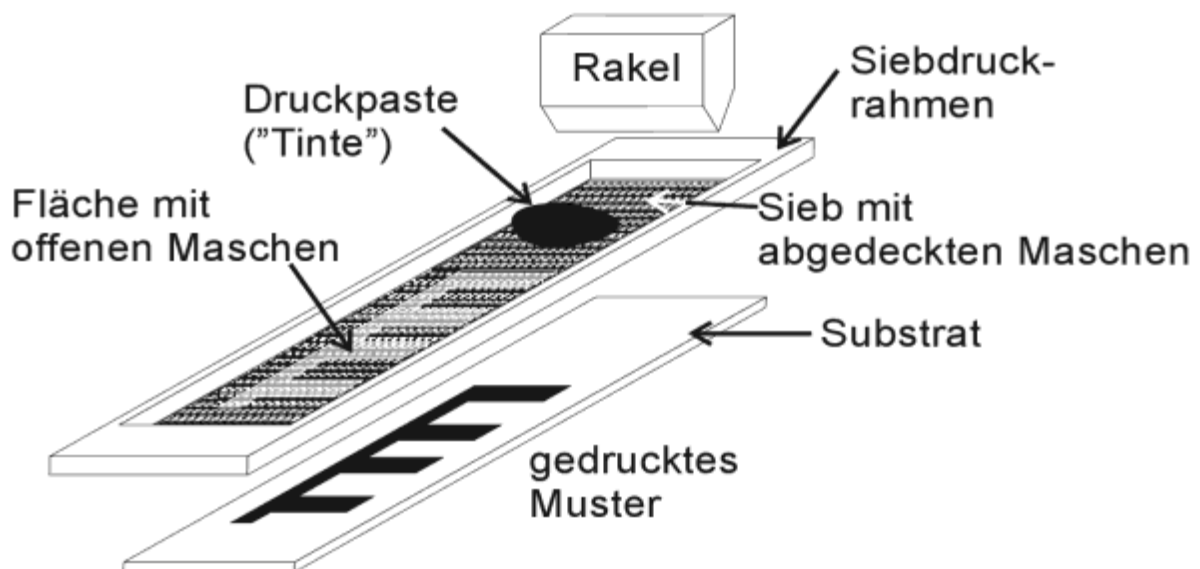


Abbildung 10: Siebdruckverfahren zur Herstellung der Sensoren [47]

Ein in einen Metallrahmen eingespanntes Sieb liegt dicht über der zu bedruckenden Substratfolie. Auf diesem Sieb sind einzelne Regionen abgedeckt (für die Siebdruckpaste nicht durchlässig), sodass die freiliegenden Regionen die gewünschte Struktur bilden. Für die Erzeugung des gewünschten Musters auf dem Sieb (die Struktur der Sensoren) werden photolithographische Techniken angewandt. Die Siebdruckpaste wird auf das Sieb gegeben und mit einer Flutrakel aus Aluminium als dünne Schicht über das Sieb verteilt. Danach wird eine Gummirakel in entgegengesetzter Richtung unter Kontakt über das Sieb geführt, wobei die Paste durch das Sieb gestrichen wird. So entsteht eine strukturierte Schicht auf dem Substrat [47], [65], [66].

Die Siebdruckpasten beinhalten neben Bindemitteln verschiedene organische Lösungsmittel, die für die notwendige Viskosität beim Siebdrucken sorgen. Die Bindemittel ermöglichen das Anhaften der aufgedruckten Schicht auf dem Substrat nach dem Trocknen [67].

Die Herstellung der Sensoren wurde mit dem Siebdrucker DEK 248 (DEK Printing Machines GmbH, Bad Vilbel, Deutschland) in 4 Druckschritten (4 verschiedene Siebe) durchgeführt:

1. **Referenzelektrode:** 3 Leiterbahnen werden als Silber-/Silberchlorid – Paste auf das Substrat gedruckt, wobei eine davon (die lange, unterste Leiterbahn) als Referenzelektrode verwendet wird (Abb. 11)

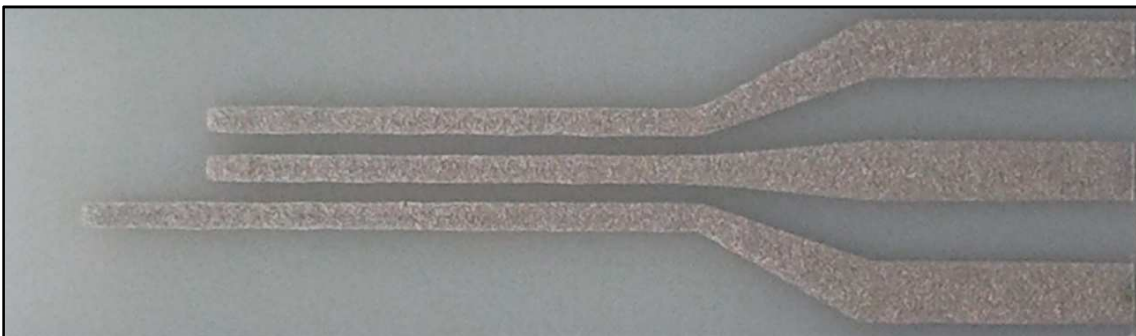


Abbildung 11: Schritt 1 bei der Sensorherstellung: 3 Elektroden aus Silber/Silberchlorid werden auf das Substrat gedruckt

2. **Gegenelektrode:** Die beiden anderen (kürzeren) Leiterbahnen werden mit Kohlenstoffpaste verlängert, die mittlere Elektrode in Abb. 12 stellt (nach weiterer Bearbeitung in Abb. 13) die Arbeitselektrode dar, die obere wird als Gegenelektrode verwendet

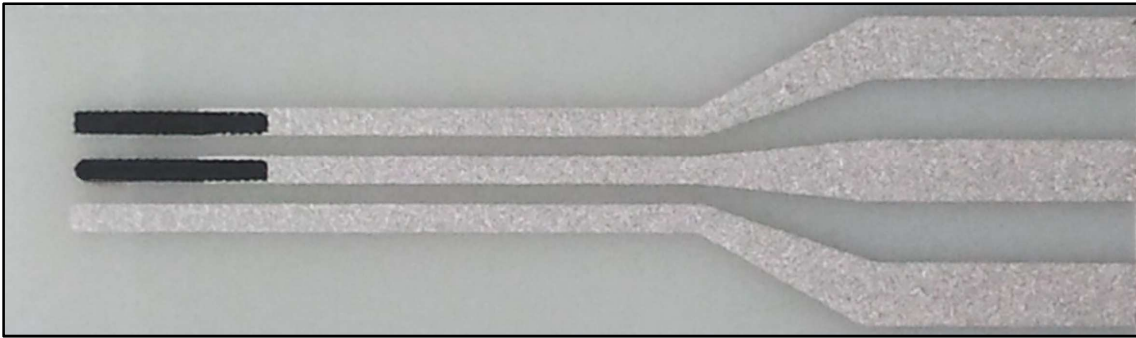


Abbildung 12: Schritt 2 bei der Sensorherstellung: Verlängerung der Arbeits- und Gegenelektrode mit Karbon

- 3. Arbeitselektrode:** Für die Arbeitselektrode wird die mittlere Elektrode an der Spitze mit einem Braunstein-Spot bedruckt (Mischung aus 25 % Braunsteinpulver und 75 % Karbonpaste, rot markiert in Abb. 13)



Abbildung 13: Schritt 3 bei der Sensorherstellung: Braunstein wird auf die Arbeitselektrode gedruckt (rot markiert)

- 4. Isolierung:** Zum Schluss werden die Sensoren mit einer Isolierung beschichtet (Abb. 14), wobei der hintere Teil der Elektroden (rechts in Abb. 14) für den Kontakt zum Potentiostaten freigelassen wird. Im vorderen Bereich (Elektroden spitzen) kommt der Sensor in Kontakt mit der Messlösung.

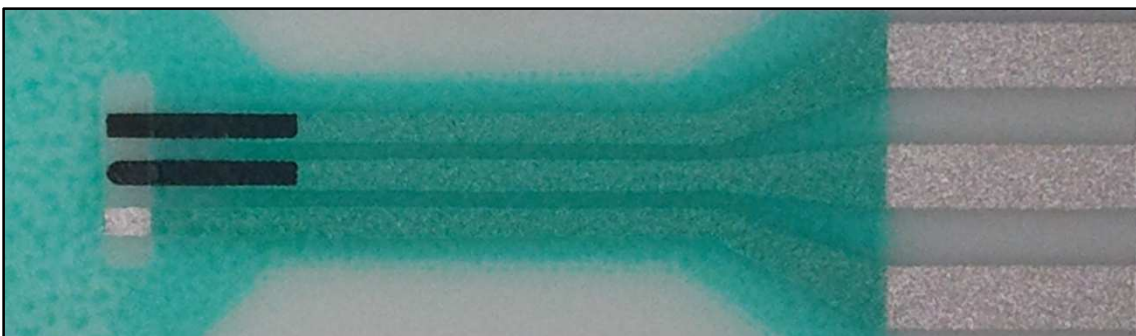


Abbildung 14: Schritt 4 bei der Sensorherstellung: Beschichtung des Sensors mit einer Isolationsschicht

Für die Herstellung der Platinsensoren wurde statt dem Siebdrucker das Dispensiergerät EFD Performus III (Nordson EFD, Westlake, Ohio) verwendet, mit dem die Mischung (25 % Platinpulver und 80 % Karbonpaste) auf die Arbeitselektrode dispensiert wurde (Abb. 15).



Abbildung 15: Herstellung eines Platinsensors: Statt Braunstein wird Platin auf die Arbeitselektrode dispensiert

Nach den Schritten 1-3 muss das bedruckte Substrat jeweils für 1 Stunde in einem mit 80 °C vorgeheizten Ofen trocknen, um die Lösungsmittel zu entfernen und die Paste auszuhärten. Dadurch erhalten die bedruckten Muster eine stabile Struktur und sind weniger anfällig gegen Verschmutzungen [65]. Die durch Schritt 4 aufgebrachte Isolationsschicht wurde mit dem UV-Punktstrahler DYMAX Blue Wave 50 (DYMAX Europe GmbH, Wiesbaden, Deutschland) ausgehärtet.

Folgende Materialien wurden für die Sensorherstellung verwendet:

- Siebdruckpaste Ag/AgCl: Electrodag 6037 SS (Henkel Nederland B.V., Nieuwegein, Niederlande)
- Siebdruckpaste Karbon: Electrodag PE-401 ROCHE (Henkel Nederland B.V., Nieuwegein, Niederlande)
- Siebdruckpaste für die Isolation: Electrodag 452 SS 1 KG (Henkel Nederland B.V., Nieuwegein, Niederlande)
- Braunsteinpulver (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

2.4. Messsysteme und Messlösungen

Für verschiedene Messungen wurde die Temperatur mit dem Temperaturmessgerät Testo 175H1 (Testo GesmbH., Wien, Österreich) gemessen.

2.4.1. Messsystem für die Durchführung der zyklischen Voltammetrie

Da die zyklische Voltammetrie in ruhenden Lösungen durchgeführt wird, wurde der Sensor über einen Verbindungsstecker mit dem Potentiostat verbunden und in eine ruhende Lösung getaucht, die sich in einem Becher befindet.

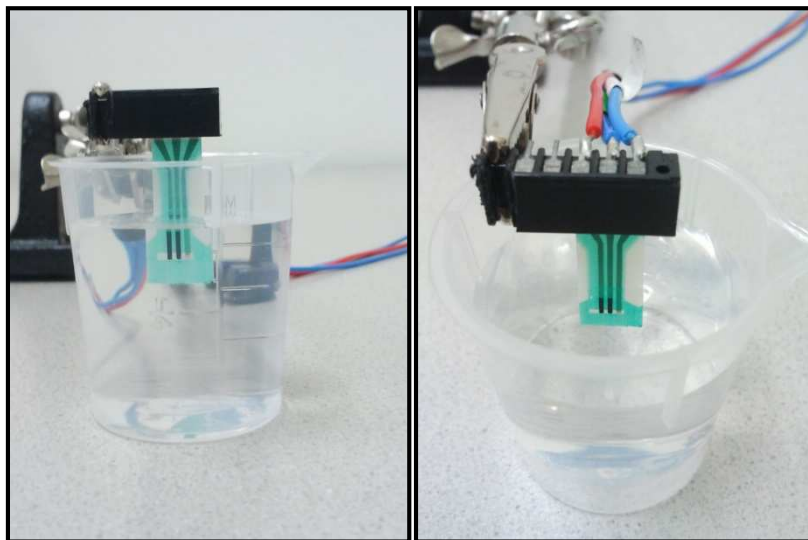


Abbildung 16: Messsystem für die zyklische Voltammetrie: Der Sensor wird mit einem Verbindungsstecker mit dem Potentiostaten verbunden und in eine ruhende Lösung getaucht

2.4.2. Flusszelle für amperometrische Messungen

Wird das Enzym MPO (z.B. die Wundprobe) mit ihren Substraten (Cl^- und H_2O_2) in Verbindung gebracht, kommt es unter Anderem zum Verbrauch von Wasserstoffperoxid und während dessen amperometrischer Messung zu einem Abfall des messbaren Stromes. Damit dieser Abfall rein durch die katalytische Aktivität des Enzymes MPO detektiert werden kann (und nicht etwa durch die Ausbildung der Diffusionsschicht), muss die amperometrische Messung in bewegter Lösung erfolgen.

Um dies zu gewährleisten, wurde eine Flusszelle (FC2 Flusszelle, BVT Technologies, Brünn, Tschechien) verwendet, die durch eine Pumpe mit der Messlösung versorgt wird.

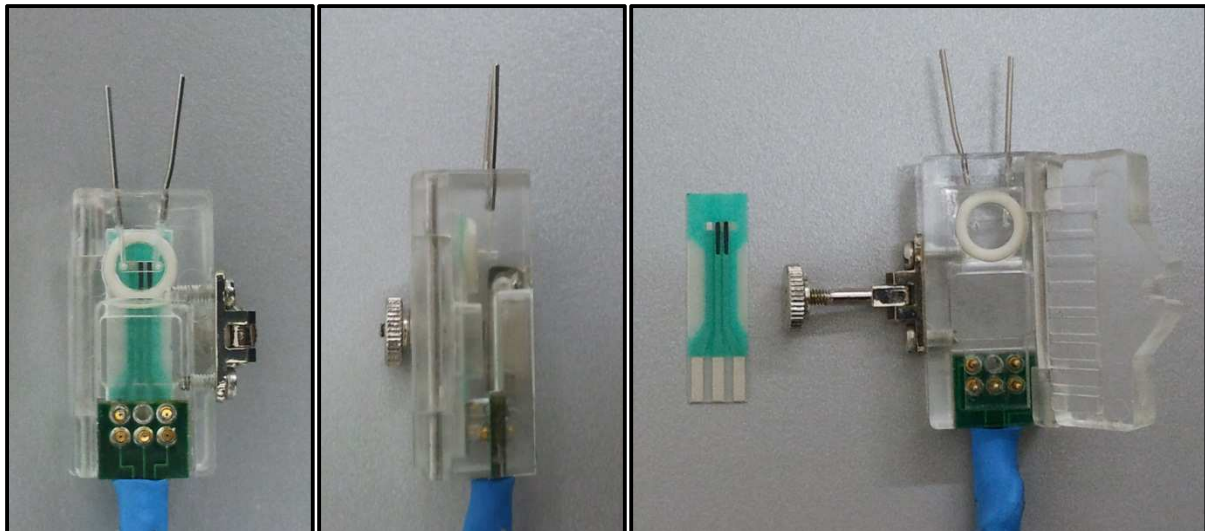


Abbildung 17: Flusszelle für amperometrische Messungen: links: Hinteransicht (geschlossen); Mitte: Seitenansicht (geschlossen); rechts: Vorderansicht (geöffnet mit entferntem Sensor)

In der Messkammer (innerhalb des weißen Dichtungsringes) befindet sich ein leicht vertiefter Kanal, der die Messlösung über die drei Elektroden des Sensors führt. Für die Verbindung zum Potentiostat werden die drei Bereiche der Elektroden, die nicht mit der Isolation beschichtet sind, nach Schließen der Flusszelle auf die vorgesehenen Kontakte gedrückt.

2.4.3. Herstellung der Messlösung mit Phosphat-Puffer

Um reproduzierbare Messergebnisse zu erhalten, sollte der pH-Wert der Messlösung während der Messungen möglichst konstant bleiben. Da sich der pH-Wert durch verschiedene Einflüsse verändern kann (z.B. durch Protonen, die bei der Elektrodenreaktion (Gl. 4, Seite 10) entstehen oder unterschiedliche pH-Werte des Wundsekretes), ist die Verwendung eines Puffers notwendig. Eine starke Änderung des pH-Wertes könnte die Elektrodenreaktion oder die Stabilität der MPO und damit das Messergebnis beeinflussen. Als Puffersystem wird ein 0,1 M Phosphatpuffer verwendet, der das pH-Optimum und einen gute Pufferkapazität im Bereich von 7,2 besitzt. Der Phosphatpuffer wurde wie folgt hergestellt:

- 4,5 g Potassium Phosphate Monobasic (KH_2PO_4 , Sigma Aldrich, USA)
- 9,5 g Sodium Phosphate Dibasic (Na_2HPO_4 , Sigma Aldrich, USA)
- 9,0 g Sodium Chloride (NaCl , Sigma Aldrich, USA)
- 1000 mL Wasser (H_2O , Carl Roth, Deutschland)

Das Einwiegen der einzelnen Substanzen erfolgte dabei mit einer Präzisionswaage (KERN PLS 720-3A, Ziegelei, Deutschland).

Der pH-Wert des Puffers kann mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung berechnet werden [68]:

$$pH = pK_S + \lg \frac{[\text{konjugierte Base}]}{[\text{Säure}]} \quad (8)$$

Die beiden Salze lösen sich im Wasser und es liegt H_2PO_4^- als Säure (Protonendonator) und HPO_4^{2-} als konjugierte Base (Protonenakzeptor) vor. Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter (Hanna HI 98127, Kehl, Deutschland) überprüft.

Ausgehend von einer 30%igen – H_2O_2 – Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) können die für die jeweiligen Messungen gewünschten Konzentrationen durch Verdünnung mit dem Phosphatpuffer hergestellt werden.

2.4.4. Amperometrische Messungen ohne MPO

Um den Einfluss des Signalabfalles durch eine ruhende Lösung und bestimmte Eigenschaften der Sensoren (Linearität des Sensorsignals, Ansprechzeiten, Detektionslimit, Wiederholpräzision, Vergleichspräzision, Drift) zu überprüfen, wurde folgendes System verwendet:

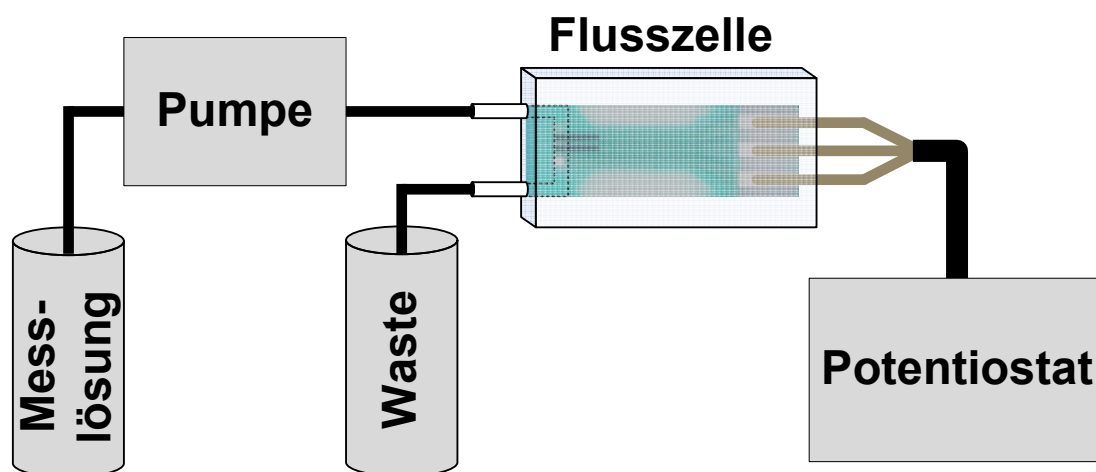


Abbildung 18: Messsystem für Messungen ohne MPO: Die Messlösung wird durch eine Pumpe in die Flusszelle und über die Elektroden des Sensors gepumpt, der Potentiostat ist direkt mit dem Sensor in der Flusszelle verbunden

Die Messlösung (enthält für die jeweilige Anwendung eine entsprechende H_2O_2 -Konzentration) wird während der Messung mit einer Flussgeschwindigkeit von $20 \mu\text{l}/\text{min}$ über den in der Flusszelle befindlichen Sensor geführt, wodurch die Diffusionsschicht und damit das Stromsignal konstant bleibt. Als Pumpsystem dient eine Peristaltikpumpe (Watson Marlow 505 Du, Falmouth, Großbritannien) mit TYGON-Schlauch (Innendurchmesser $0,25 \text{ mm}$).

2.4.4.1. Ausbildung der Diffusionsschicht in ruhenden Lösungen

Um die Auswirkung einer ruhenden Lösung (Abfall des Signales durch Ausbreitung der Diffusionsschicht) auf das Sensorsignal zu überprüfen, wurde die Pumpe während der Messung einer $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 – Lösung nach Erhalt eines konstanten Sensorsignales abgeschaltet und der entsprechende Signalabfall gemessen. Wäre dieser Signalabfall vernachlässigbar, könnten die Messungen mit dem Enzym auch in ruhenden Lösungen erfolgen. Dabei könnte der Abbau der Substrate nach Mischung mit dem Enzym und damit die Enzymkinetik direkt (und über einen längeren Zeitraum) beobachtet werden. Das Ergebnis dieses Versuches soll als Entscheidungskriterium für die Messung in bewegter oder unbewegter Messlösung dienen und gegebenenfalls die Notwendigkeit einer bewegten Messlösung demonstrieren. Zusätzlich zum Messergebnis wurde der Signalabfall mit der Cottrell-Gleichung (Gl. 7, Seite 18) simuliert.

2.4.4.2. Bestimmung von Sensoreigenschaften

Untersuchung der Proportionalität zwischen H_2O_2 -Konzentration und gemessenem Strom

Für die amperometrischen Messungen von Wasserstoffperoxid ist es wichtig, dass der gemessene Strom proportional zur Wasserstoffperoxid - Konzentration ist. Dadurch kann nach Durchführung einer Kalibration mit bekannten Konzentrationen aus einer Stromänderung leicht auf eine Konzentrationsänderung rückgeschlossen werden. Um diese Proportionalität zu überprüfen, wurde eine H_2O_2 -Konzentrationsreihe (1:1-Mischungen ausgehend von $125 \mu\text{M}$ bis $1 \mu\text{M}$) hergestellt und der zur jeweiligen Konzentration proportionale Strom gemessen. Dabei wurden die unterschiedlich konzentrierten Lösungen in Serie für jeweils 100 s in die Flusszelle gepumpt. Zwischen den einzelnen Lösungen wurde für 100 s reiner Phosphatpuffer (ohne H_2O_2) gemessen, um bei jeder Messung der jeweiligen H_2O_2 – Konzentration vom Grundstrom zu starten. Aus diesen gemessenen Strömen zu den entsprechenden H_2O_2 - Konzentrationen kann eine Kalibrationsgerade erstellt und die

Proportionalität zwischen H_2O_2 – Konzentration und gemessenem Strom überprüft werden (Sensorkennlinie). Für den gemessenen Strom wurde ein Mittelwert über 30 Werte des entsprechenden Plateaus zur jeweiligen Konzentration berechnet. Die Grundströme wurden ebenfalls als Mittelwerte über 30 Messwerte (Zwischenmessungen im Phosphatpuffer) berechnet, wobei diese Grundströme für die Auswertung der Sensorkennlinie von den jeweiligen Plateauströmen abgezogen wurden. Für die Erstellung eines Auswertemodells wurde die „polyfit“-Funktion von Matlab (Mathworks Inc., Natick, USA) verwendet (Least-Squares-Verfahren), wobei durch den linearen Zusammenhang ein Polynom ersten Grades als Modellfunktion gewählt wurde (lineare Regression).

Ermittlung der Ansprechzeiten und des Detektionslimits

Aus den durchgeführten Messungen zur Proportionalität zwischen H_2O_2 – Konzentration und gemessenem Strom wurden die Ansprechzeiten des Sensors auf Konzentrations sprünge und sein Detektionslimit ermittelt. Die Ansprechzeit wurde dabei als jene Zeit definiert, die der Sensor benötigt, um einen Signalanstieg von 10 % auf 90 % des maximalen Signales zu registrieren. Das Detektionslimit entspricht jener Konzentration, aus der ein Strom resultiert, der dreimal höher als die Standardabweichung des Grundstromes ist. Wie für die gemessenen Stromwerte wurden auch für den Grundstrom der Mittelwert und die Standardabweichung über 30 Werte berechnet.

Überprüfung der Wiederholpräzision des Sensorsignales (Repeatability)

*„Unter Wiederholpräzision oder Repeatability versteht man ein Maß der Übereinstimmung von Ergebnissen von aufeinanderfolgenden Messungen des gleichen Parameters, die unter **den gleichen** Messbedingungen durchgeführt wurden.“ [46]*

Diese Kenngröße wurde überprüft, indem mit dem gleichen Sensor 10 Messungen in Serie durchgeführt wurden. Die Messung wurde dabei so durchgeführt, dass der Sensoreinlauf (Ausbildung der Doppelschicht, bis ein konstantes Signal gemessen wird) in reinem Phosphatpuffer durchgeführt wurde, worauf nach ca. 350 s die Messung einer $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 – Lösung erfolgte. Die erhaltenen Ergebnisse wurden statistisch mit Mittelwert und Standardabweichung ausgewertet.

Überprüfung der Vergleichspräzision des Sensorsignales (Reproducibility)

„Unter Vergleichspräzision oder Reproducibility versteht man ein Maß der Übereinstimmung von Ergebnissen von aufeinanderfolgenden Messungen des gleichen Parameters, die unter **veränderten** Messbedingungen durchgeführt wurden.“ [46]

Zur Überprüfung dieser Kenngröße wurde eine 100 µM H₂O₂ – Lösung mit 10 verschiedenen Sensoren vermessen. Die Durchführung dieser Messung erfolgte nach dem gleichen Schema wie für die Wiederholpräzision.

Überprüfung der Drift des Sensorsignales

Eine Drift des gemessenen Signales mit der Zeit kann verschiedene Ursachen haben und muss vor allem bei längeren Messungen berücksichtigt werden. Um die Drift des Signales über die Zeit zu untersuchen, wurde eine Langzeitmessung über 13 Stunden mit einer 100 µM H₂O₂ – Lösung durchgeführt. Die Temperatur wurde dabei mit einem Temperaturlogger (VOLTcraft DL-101T) mitgeloggt.

2.4.5. MPO-Lösungen: Wundproben und käuflich erworbenes Enzypulver

Die Wundproben, die auf eine Infektion untersucht werden sollten, wurden von der Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie des LKH Graz zur Verfügung gestellt. Dabei wurden pro Wunde 100 µl Sekret mit einem Abstrichtupfer entnommen, die in weiterer Folge 1:10 in einer isotonischen Kochsalzlösung (9 g/l NaCl $\hat{=}$ 154 mM) verdünnt wurden. Insgesamt waren 18 Wundproben verfügbar, wobei diese Wunden von den behandelnden Ärzten (optisch) wie folgt charakterisiert wurden:

Tabelle 1: Wundproben

Wundprobe	Charakterisierung	Art der Wunde
Wundprobe 1	„gut heilend“	Ulcus Cruris Venosum
Wundprobe 2	„gut heilend“	Manschettenulcus
Wundprobe 3	„gut heilend“	Ulcus Cruris Venosum
Wundprobe 4	„gut heilend“	Ulcus Cruris Venosum
Wundprobe 5	„gut heilend“	Decubitus Ferse
Wundprobe 6	„gut heilend“	Ulcus Cruris Venosum
Wundprobe 7	„kritisch“	Calciphylaxie
Wundprobe 8	„kritisch“	Calciphylaxie
Wundprobe 9	„kritisch“	Ulcus Cruris Venosum
Wundprobe 10	„kritisch“	PAVK
Wundprobe 11	„kritisch“	Ulcus Cruris Venosum
Wundprobe 12	„kritisch“	Posttraumatische Wunde
Wundprobe 13	keine Beurteilung	Brandblase
Wundprobe 14	keine Beurteilung	Brandblase
Wundprobe 15	keine Beurteilung	keine Angabe
Wundprobe 16	keine Beurteilung	Keine Angabe
Wundprobe 17	keine Beurteilung	keine Angabe
Wundprobe 18	keine Beurteilung	keine Angabe

Die Wundproben 1-6 stammen von gut heilenden Wunden, welche theoretisch relativ geringe MPO-Aktivitäten aufweisen sollten. 6 Wundproben (7-12) wurden als „kritisch“ bezüglich einer Infektion eingestuft (es waren leichte Anzeichen einer Infektion vorhanden) und sollten daher höhere Aktivitäten der MPO aufweisen. Leider liegen für die Wundproben 13-18 keine Charakterisierungen vor, trotzdem wurden diese Wundproben auf die Aktivität der MPO untersucht. Die Wundproben 13 und 14 stammen von Brandblasen, die laut [39] eine geringe MPO-Aktivität aufweisen sollten.

Da von den Wundproben nur eine begrenzte und geringe Menge verfügbar war, wurde das Enzym (für diverse Untersuchungen zur Enzymaktivität) als Pulver käuflich erworben (Planta Natural Products, Wien, Österreich). Laut Angaben des Lieferanten hat das Enzym eine Aktivität von 30 U pro mg Pulver. Löst man 100 µg des Pulvers in 1 ml destilliertem Wasser, erhält man eine Aktivität von 3 U/ml. Mit diesen Enzymlösungen konnten reproduzierbare Untersuchungen des Systems durchgeführt werden, da die Aktivitäten (im Gegensatz zu den Wundproben) bekannt sind und dadurch keine Wundproben verbraucht werden.

2.4.6. Amperometrische Messungen mit MPO

Für die Messungen mit dem Enzym MPO wurde ein System verwendet, das die Messlösung (welche die Substrate Cl^- (154 mM) und H_2O_2 (200 μM) beinhaltet) mit der Enzymlösung (Wundsekret oder aus käuflich erworbenem Enzympulver hergestellte Lösung) in einem Y-Verbindungsstück mischt und damit den Umsatz der Substrate durch das Enzym ermöglicht.

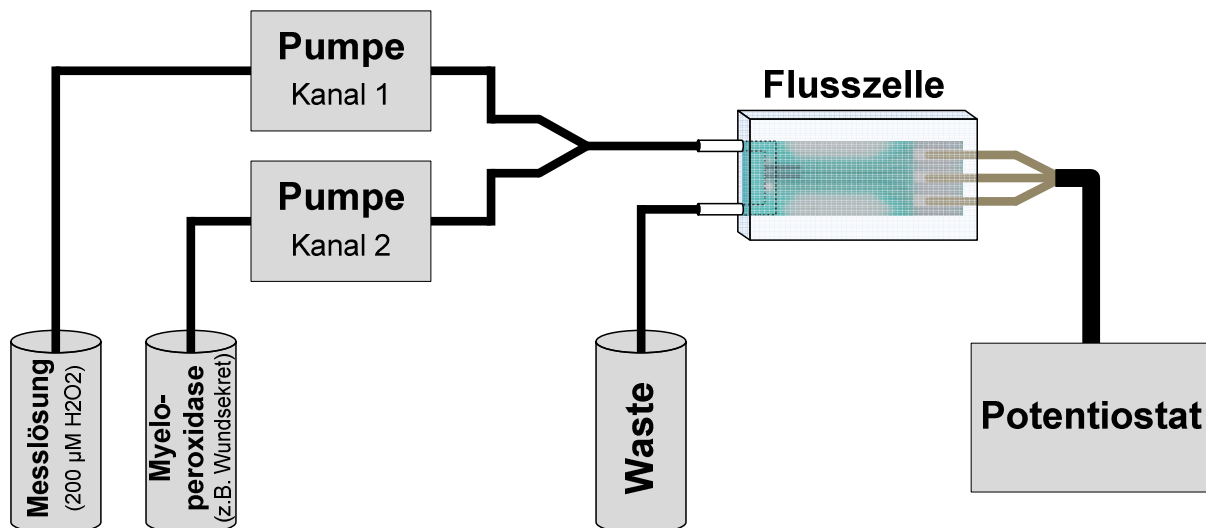


Abbildung 19: Messsystem für Messungen mit MPO: In einem Y-Stück kommt es zur Mischung zwischen dem Enzym und dessen Substraten und somit zum Substratumsatz. Je größer die Aktivität des Enzyms, desto geringer ist, bedingt durch den größeren Substratumsatz, die Substratmenge (Analytmenge), die über den Sensor fließt

Durch die Verwendung von 2 Kanälen der gleichen Peristaltikpumpe kommt es im Y-Stück zu einer 1:1 - Mischung der beiden Lösungen (und damit zu einer Halbierung der H_2O_2 - Konzentration, was einer 100 μM H_2O_2 - Lösung entspricht). Die Pumpgeschwindigkeit wurde mit 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ eingestellt, sodass das Gemisch nach dem Y-Stück wieder (wie bei den Messungen ohne MPO) mit 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ über den Sensor fließt. Durch diese Geschwindigkeit und die Wahl des Schlauches (Länge, Durchmesser) zwischen Y-Stück und Sensor wird die Reaktionszeit t_R (jene Zeit, in der das Enzym die Substrate umsetzen kann) eingestellt. Durch die gewählte Pumpgeschwindigkeit und der Auswahl des Schlauches wurde eine Reaktionszeit von 30 Sekunden eingestellt.

Damit ein durch die Aktivität der MPO bedingter Signalabfall registriert werden kann, erfolgte die Messung zunächst mit der Messlösung (Pumpenkanal 1) und einer isotonischen NaCl - Lösung (9 g/l NaCl , Pumpenkanal 2), um die Ausbildung der Doppelschicht zu

ermöglichen und ein stabiles Signal zu erhalten, von dem aus ein Signalabfall erfolgen kann. Nach einer gewissen Zeit (400 s) wird die isotonische NaCl – Lösung durch die Wundprobe bzw. die Enzymlösung ersetzt. Die isotonische NaCl – Lösung ist für konstante Messbedingungen notwendig, da auch die Wundproben in einer isotonischen NaCl-Lösung vorliegen. Durch die Mischung des Enzyms mit dessen Substraten kommt es während der Reaktionszeit zum Abbau von H_2O_2 und somit zu einem Signalabfall.

Vor dem Wechsel der isotonischen NaCl – Lösung zur Enzymlösung wird (nach vollständig ausgebildeter Doppelschicht) ein konstantes Signal gemessen, da die 1:1-Mischung konstant bleibt und somit immer die gleiche H_2O_2 Konzentration ($100 \mu\text{M}$) über den Sensor fließt. Diese Mischung bleibt auch nach dem Wechsel der isotonischen NaCl – Lösung zur Enzymlösung konstant. Zusätzlich ist durch die konstante Pumpgeschwindigkeit auch die Reaktionszeit des Enzyms mit den Substraten konstant (nach der Mischung im Y-Stück erfolgt die Reaktion immer in einer konstanten Zeit, bis die Lösung beim Sensor ist). Das bedeutet, dass das System einen Konzentrationssprung von einer Konzentration C_1 ($100 \mu\text{M}$ H_2O_2) auf eine Konzentration C_2 , die durch die Enzymaktivität und die Reaktionszeit bestimmt wird, erfährt. Theoretisch entspricht dies einer Sigmoid – Funktion (siehe Abb. 20, Seite 34), die, ausgehend von einem Plateau (zu C_1 proportional gemessener Strom), auf ein niedrigeres Plateau (zu C_2 proportional gemessener Strom) abfällt.

Für die Berechnung der Enzymaktivität zur Beurteilung einer Wundinfektion wurde der relative Signalverlust, der durch diesen Konzentrationssprung entsteht, gewählt (Begründung siehe Diskussion).

2.4.6.1. Wiederholpräzision des relativen Signalverlustes

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um zu untersuchen, wie konstant der relative Signalverlust für 6 Messungen **mit dem gleichen Sensor** und der gleichen Enzymaktivität ($0,75 \text{ U/ml}$) ist. Die Ergebnisse wurden statistisch durch Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient ausgewertet.

2.4.6.2. Vergleichspräzision des relativen Signalverlustes

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um zu untersuchen, wie konstant der relative Signalverlust für 6 Messungen **mit verschiedenen Sensoren** und der gleichen Enzymaktivität

(0,3 U/ml) ist. Die Ergebnisse wurden statistisch durch Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient ausgewertet.

2.4.6.3. Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und relativem Signalverlust

Ausgehend von einer Aktivität von 3 U/ml der gekauften Enzymlösung wurde für diesen Versuch eine Aktivitätsreihe durch 1:1 – Mischungen (3 U/ml; 1,5 U/ml; ...; 0,025 U/ml) hergestellt. Für jede dieser Enzymaktivitäten wurde der relative Signalverlust gemessen. Für die Auswertung des Zusammenhangs zwischen Enzymaktivität und relativem Signalverlust wurde, anlehnend an die Michaelis – Menten – Kinetik, folgende Funktion als Modellfunktion für einen nichtlinearen Fit gewählt:

$$SV(a) = \frac{SV_{max} * a}{K_a + a} \quad (9)$$

Für die Ausgleichsrechnung („Fitting“) wurde die Matlab – Funktion „nlinfit“ verwendet, welche ein Least-Squares-Verfahren mit der Modellfunktion und den gemessenen Daten durchführt. Dabei bedeuten SV den relativen Signalverlust (in %), SV_{max} den maximalen relativen Signalverlust (in %) und a die Aktivität des Enzyms (in U/ml). K_a ist eine Aktivitätskonstante (in U/ml), die jene Enzymaktivität angibt, bei der die Hälfte des maximalen Signalverlustes erreicht wird. Die Parameter SV_{max} und K_a werden von der „nlinfit“-Funktion von Matlab ermittelt, wobei als Startwerte für den Fit 100 % und 1 U/ml für SV_{max} und K_a gewählt wurden.

2.4.7. Datenauswertung

Die Messdaten des Potentiostaten werden als *.DTA-File abgespeichert. Für die Auswertung dieser Daten (Darstellung der Messdaten, statistische Auswertung, Modellentwicklung und Parameterschätzung) wurde Matlab verwendet. Durch den unkonstanten Fluss der Peristaltikpumpe und der daraus resultierenden Schwankungen im Messsignal (Anhang, Abb. 45) wurden alle gemessenen Signale mit einem gleitenden Mittelwertfilter (n = 20) geglättet. Für statistische Auswertungen wurden die Matlab-Funktionen „mean“ (Mittelwert) und „std“ (Standardabweichung) verwendet. Der Variationskoeffizient CV ergibt sich aus dem Quotient zwischen Standardabweichung und Mittelwert.

2.4.8. Modellentwicklung zur Auswertung der Signalverluste

Um eine reproduzierbare Auswertung der Signalverluste zu ermöglichen, wurde basierend auf den theoretischen Überlegungen in 2.4.6. ein Modell entwickelt, dem eine negative Sigmoidfunktion als Modellfunktion zugrunde liegt.

$$I(t) = I_0 - \Delta I \frac{1}{1 + e^{-\frac{t-t_0}{\tau}}} \quad (10)$$

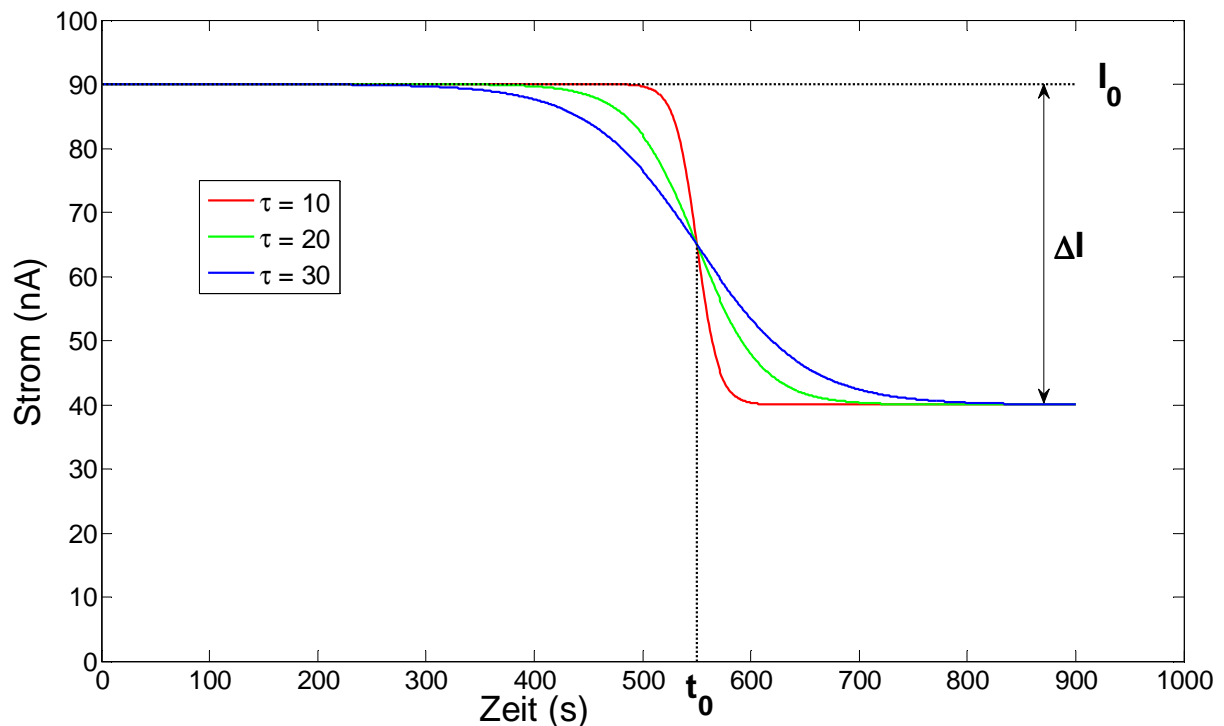


Abbildung 20: Sigmoidmodell zur Auswertung der Messungen mit MPO

Für die Parameteridentifizierung (4 Parameter: I_0 , ΔI , t_0 , τ) wurde auch hier die „nlinfit“-Funktion von Matlab verwendet. Die Funktion liefert durch ein Least-Squares-Verfahren die berechneten Werte für die 4 Parameter zurück, die folgende Bedeutung haben:

- I_0 : beschreibt die Höhe des ersten Plateaus (den Strom, der durch die Mischung der Messlösung mit der isotonischen NaCl – Lösung gemessen wird)
- ΔI : beschreibt die absolute Differenz zwischen erstem und zweitem Plateau (absoluter Stromverlust, der durch den H_2O_2 – Abbau der MPO verursacht wird)
- t_0 : beschreibt die Lage des Wendepunktes (abhängig vom Zeitpunkt des Wechsels der isotonischen NaCl – Lösung zur Enzymlösung)
- τ : beschreibt den Zeitraum, in dem der Signalabfall stattfindet und damit die Steilheit der Kurve

Für die Auswahl der Startparameter wurden dabei 2 Extremfälle (sehr hoher Abfall und sehr geringer Abfall) betrachtet. Ausgehend von den Parametern dieser Extremfälle wurden dazwischenliegende Startparameter gewählt ($I_0 = 100 \text{ nA}$; $\Delta I = 20 \text{ nA}$; $t_0 = 500 \text{ s}$; $\tau = 20 \text{ s}$). Nach der Festlegung der Startparameter erfolgten Tests mit verschiedenen Messdaten, die alle positiv abgeschlossen werden konnten.

Aus diesem Modell kann der relative Signalverlust SV wie folgt berechnet werden:

$$SV(\%) = \frac{\Delta I}{I_0} * 100 \% \quad (11)$$

Die Ergebnisse für die Wiederhol- und die Vergleichspräzision zeigen einen umgekehrten Verlauf (Anstieg statt Abfall), sodass eine positive Sigmoidfunktion als Modellfunktion verwendet wurde:

$$I(t) = I_0 + \Delta I \frac{1}{1 + e^{-\frac{t-t_0}{\tau}}} \quad (12)$$

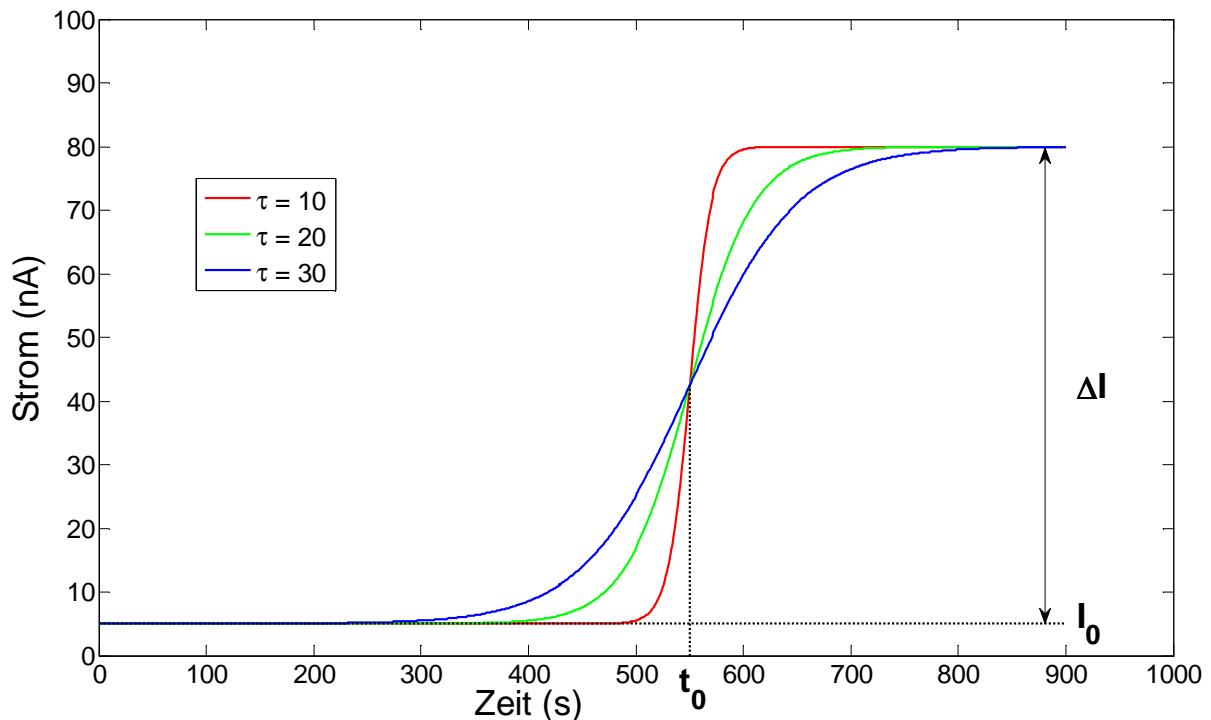


Abbildung 21: Sigmoidmodell für die Auswertung von Wiederhol- und Vergleichspräzision des Sensorsignals

In diesem Fall beschreibt I_0 den Wert des unteren Plateaus (Grundstrom), die Differenz zwischen den beiden Plateaus wird weiterhin durch ΔI beschrieben. Die Startparameter wurden mit $I_0 = 1 \text{ nA}$, $\Delta I = 50 \text{ nA}$, $t_0 = 350 \text{ s}$ und $\tau = 20 \text{ s}$ festgelegt. ΔI kann als Parameter für

den zur entsprechenden Konzentration gemessenen Strom verwendet werden, sodass der Einfluss des (möglicherweise geringfügig unterschiedlichen) Grundstromes für eine genaue Auswertung nicht berücksichtigt wird.

2.4.9. Berechnung der Enzymaktivität in Wundproben

Die Enzymaktivität in den jeweiligen Wundproben wurde aus dem gemessenen Signalverlust berechnet. Folgende Zusammenhänge und Parameter sind dabei bekannt:

- gemessener Strom ist linear proportional zur H_2O_2 – Konzentration (Abb. 30, Seite 45)
- C_1 (H_2O_2 - Konzentration vor der Umsetzung durch das Enzym \triangleq dem Signal des oberen Plateaus der Sigmoidfunktion)
- Reaktionszeit t_R (jene Zeit, in der die Umsetzung durch das Enzym stattfindet)
- Flussrate FR
- Verdünnungsfaktor VF der Proben
- relativer Signalverlust SV (aus Messung bekannt)
- 1:1 – Mischung im Y-Stück (Verwendung zweier Kanäle der gleichen Pumpe)

Aus dem relativen Signalverlust SV kann durch die lineare Proportionalität zwischen gemessenem Signal und H_2O_2 – Konzentration die Konzentration ΔC berechnet werden, die durch das Enzym umgesetzt wird:

$$\Delta C[\mu M] = C_1[\mu M] * \frac{SV[\%]}{100 \%} \quad (13)$$

Das Reaktionsvolumen V_R kann durch die Flussrate FR und die Reaktionszeit bestimmt werden:

$$V_R[l] = FR[\mu l/min] * t_R[min] * 10^{-6} \quad (14)$$

Die Enzymaktivität a (Substratumsatz pro Zeiteinheit) der MPO im Wundsekret kann wie folgt bestimmt werden:

$$a[U] = \frac{n[\mu mol]}{t_R[min]} * VF = \frac{\Delta C[\mu M] * V_R[l]}{t_R[min]} * VF \quad (15)$$

Dabei entspricht n der Stoffmenge H_2O_2 im Reaktionsvolumen, die während der Reaktionszeit t_R umgesetzt wird. Damit die Enzymaktivität in U/ml angegeben werden kann, wird das Volumen benötigt, in dem das Enzym vorliegt. Das Volumen der Wundprobe V_{Probe} entspricht der Hälfte des Reaktionsvolumens V_R (1:1 – Mischung).

$$a[U/ml] = \frac{a[U]}{V_{Probe}[ml]} = 2 * \frac{a[U]}{V_R[ml]} \quad (16)$$

2.4.10. Software zur Signalauswertung

Die Auswertung und Visualisierung der Ergebnisse der vermessenen Wundproben (Tab. 1, Seite 30) erfolgte in Matlab nach folgendem Schema:

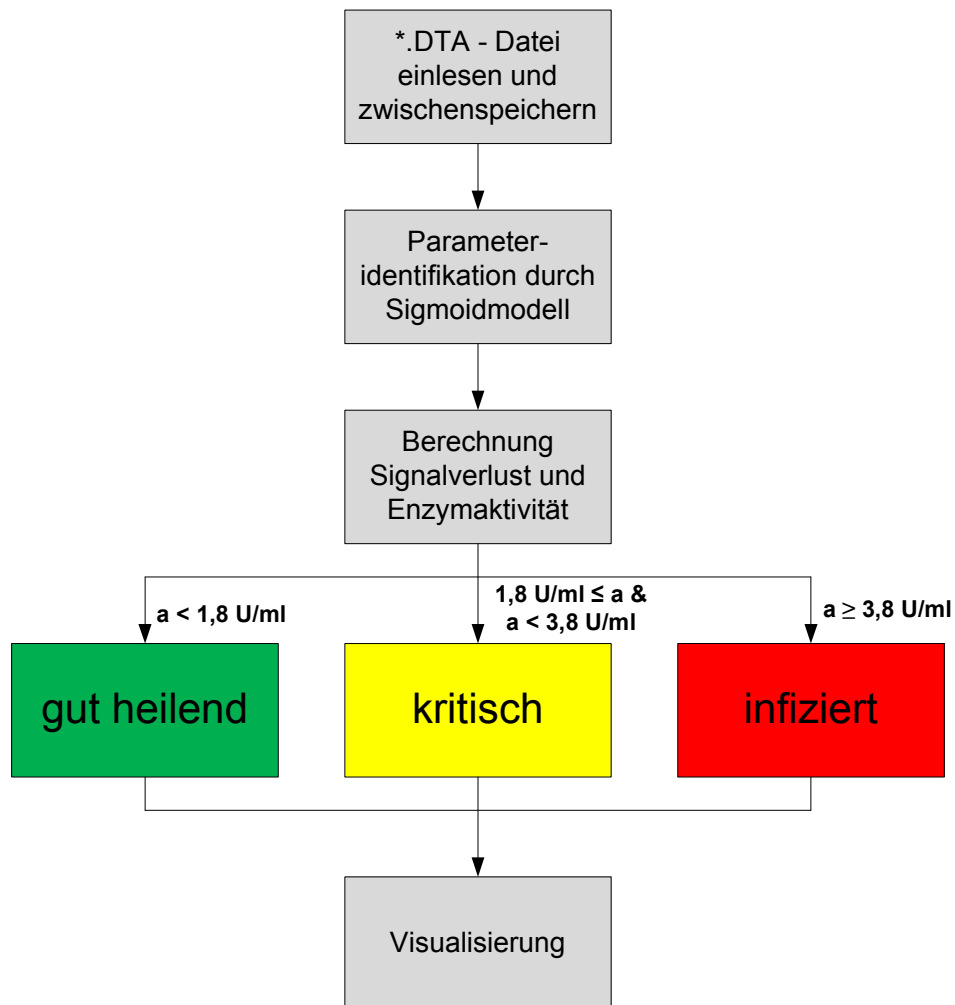


Abbildung 22: Flussdiagramm der Software zur Signalauswertung

Die vom Potentiostaten im *.DTA-Format abgespeicherten Daten werden durch die Matlab - Funktion „fgetl“ zeilenweise eingelesen und im Vektorformat als Variable zwischengespeichert. Auf diese Daten kann in weiterer Folge das Sigmoidmodell zur Parameteridentifikation durch die Matlab – Funktion „nlinfit“ angewendet werden. Nachdem der relative Signalverlust und die Enzymaktivität wie beschrieben berechnet wurden, erfolgt die Beurteilung der Wunde an Hand der berechneten Enzymaktivität. Für die Beurteilung wurden dabei die Charakterisierungen „gut heilend“, „kritisch“ und „infiziert“

gewählt. Je nach Einstufung erscheint die Beurteilung in der entsprechenden Farbe, die anderen beiden Anzeigen bleiben grau hinterlegt. Dabei wurden alle Wunden als „kritisch“ eingestuft, die eine Aktivität zwischen 1,8 U/ml und (exklusive) 3,8 U/ml aufwiesen. Alle Wunden mit geringerer Aktivität wurden als „gut heilend“, alle mit höherer Aktivität als „infiziert“ eingestuft. Die Software soll als Beispiel für die eventuelle Entwicklung eines Gerätes dienen, sodass die behandelnden Ärzte als Unterstützung zur optischen Bewertung nach der Messung einer Wundprobe eine dieser Charakterisierungen präsentiert bekommen. Zusätzlich wird von allen verfügbaren Wundproben (gut heilende und kritische) eine statistische Auswertung vorgenommen, indem die Enzymaktivitäten als Balkendiagramm (Mittelwert \pm Standardabweichung) dargestellt werden.

3. Ergebnisse

3.1. Berechnung des pH-Wertes des Phosphat-Puffers

Der pK_S -Wert des verwendeten Säure-Basen-Paares $H_2PO_4^-$ und HPO_4^{2-} liegt bei Raumtemperatur bei 7,2 [68].

- $m_{KH_2PO_4} = 4,5 \text{ g}$
- $m_{Na_2HPO_4} = 9,5 \text{ g}$
- Volumen $V = 1000 \text{ ml (H}_2\text{O)}$
- Molare Massen:
 - $M_{KH_2PO_4} = 136,09 \text{ g/mol}$
 - $M_{Na_2HPO_4} = 141,96 \text{ g/mol}$
- Säurekonzentration: $C_S = \frac{m_{KH_2PO_4}}{M_{KH_2PO_4} * V} = \frac{4,5 \text{ g}}{136,09 \frac{\text{g}}{\text{mol}} * 1 \text{ l}} = 33,07 \text{ mM}$
- Basenkonzentration: $C_B = \frac{m_{Na_2HPO_4}}{M_{Na_2HPO_4} * V} = \frac{9,5 \text{ g}}{141,96 \frac{\text{g}}{\text{mol}} * 1 \text{ l}} = 66,92 \text{ mM}$
- Pufferkonzentration: $C_P = C_S + C_B = 0,03307 \text{ M} + 0,06692 \text{ M} \approx 0,1 \text{ M}$

$$pH = pK_S + \lg \frac{[\text{konjugierte Base}]}{[\text{Säure}]} = 7,2 + \lg \frac{66,92 \text{ mM}}{33,07 \text{ mM}} = 7,5$$

Die Messung des pH-Wertes mit dem pH-Meter ergab 7,3.

3.2. Berechnung bestimmter H_2O_2 -Konzentrationen

Die Verdünnung der 30%igen H_2O_2 -Lösung mit Phosphatpuffer wird als Beispiel für eine Konzentration von 100 mM in 10 ml Endvolumen berechnet:

- gewünschtes Endvolumen: $V = 10 \text{ ml}$
- gewünschte Konzentration: $C = 100 \text{ mM}$
- Molare Masse von H_2O_2 $M_{H_2O_2} = 34,02 \text{ g/mol}$
- Dichte von H_2O_2 : $d_{H_2O_2(30\%)} = 1,11 \text{ g/l}$

Die benötigte Stoffmenge n im gewünschten Endvolumen errechnet sich wie folgt:

$$n = C * V = 100 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} * 10^{-2} \text{ l} = 1 \text{ mmol}$$

In 10 ml Endvolumen wird also eine Stoffmenge von 1 mmol H₂O₂ für eine Konzentration von 100 mM benötigt. Zur Umrechnung in die benötigte Masse wird die molare Masse von Wasserstoffperoxid benötigt:

$$m_{H_2O_2} = M_{H_2O_2} * n = 34,02 \frac{g}{mol} * 10^{-3} mol = 34,02 * 10^{-3} g$$

Die dafür nötige Menge der 30%igen Lösung (3 g reines H₂O₂ in 10 g Lösung) wird wie folgt berechnet:

$$m_{30\%Lsg} = \frac{10}{3} * m_{H_2O_2} = \frac{10}{3} * 34,02 * 10^{-3} g = 0,1134 g$$

$$V_{30\%Lsg} = \frac{m_{30\%Lsg}}{d_{H_2O_2(30\%)}} = \frac{0,1134 g}{1,11 \frac{g}{l}} \approx 102 \mu l$$

Es werden also 102 µl der 30%igen H₂O₂-Lösung mit 9898 µl Phosphatpuffer verdünnt, um 10 ml einer 100 mM H₂O₂-Lösung zu erhalten. Durch weitere Verdünnungen können die gewünschten Konzentrationen hergestellt werden (z.B. 1:100-Verdünnung (100 µl 100 mM-Lösung + 9900 µl Phosphatpuffer) für 10 ml einer 1 mM H₂O₂-Lösung).

3.3. Bestimmung der Polarisationsspannung durch zyklische Voltammetrie

Braunsteinsensor in Phosphatpuffer (Deckschichtdiagramm)

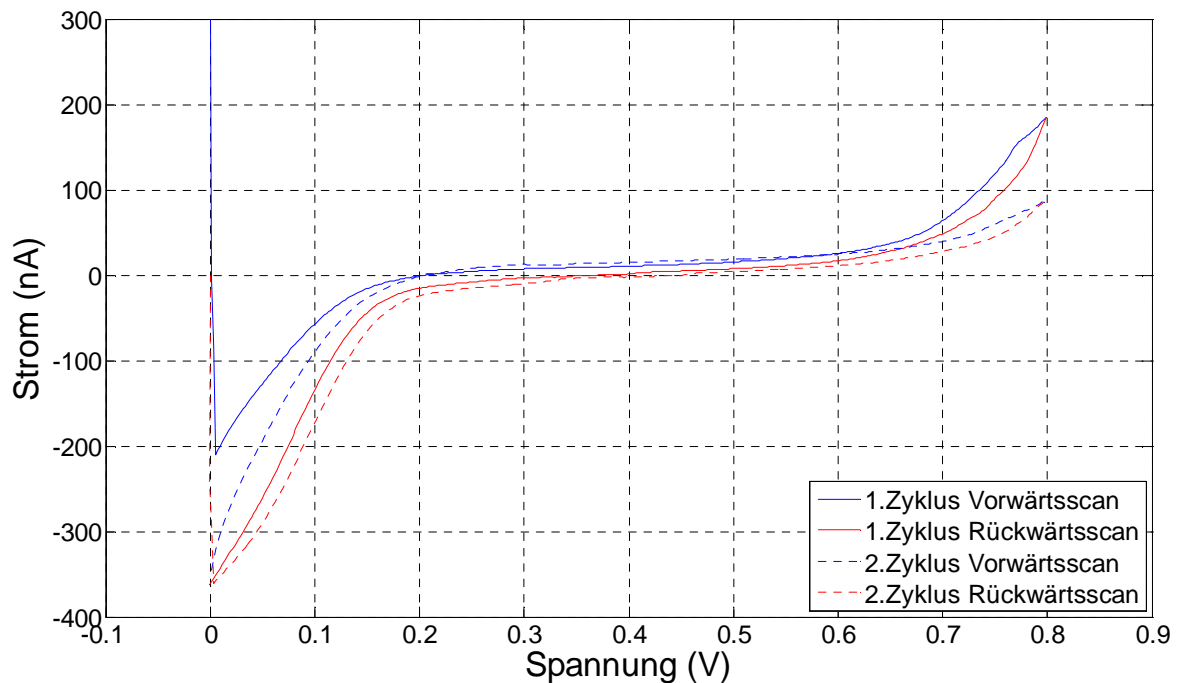


Abbildung 23: Zyklisches Voltammogramm eines Braunsteinsensors in Phosphatpuffer

Braunsteinsensor in einer 1mM H₂O₂-Lösung

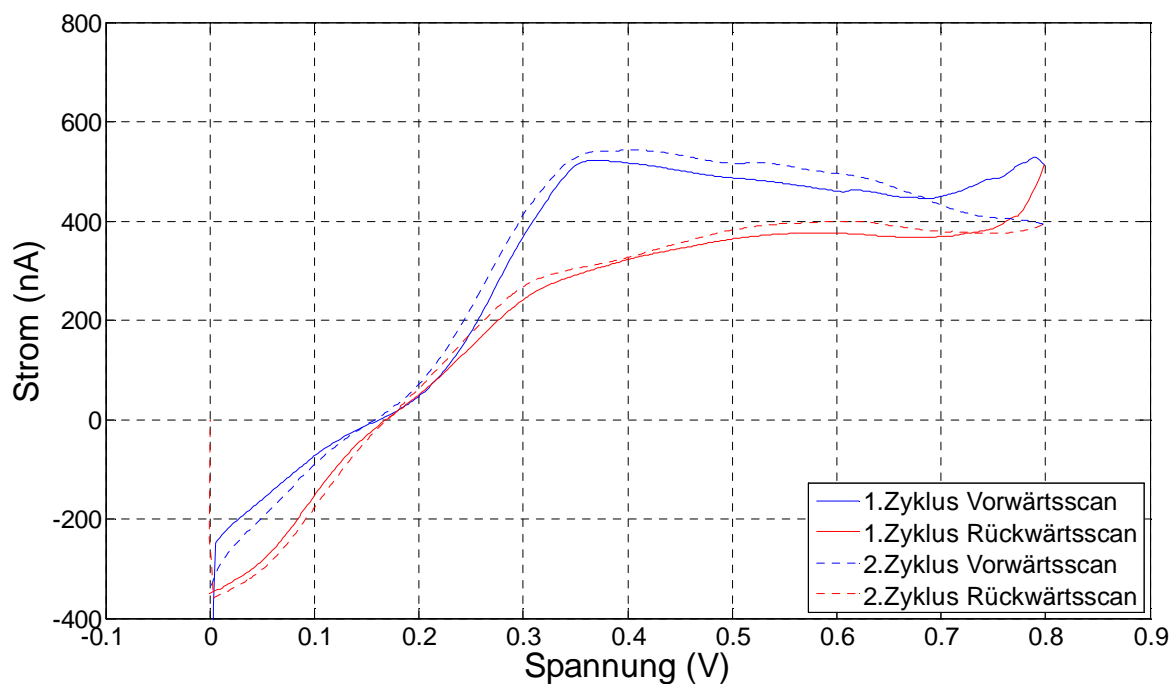


Abbildung 24: Zyklisches Voltammogramm eines Braunsteinsensors in 1 mM H₂O₂

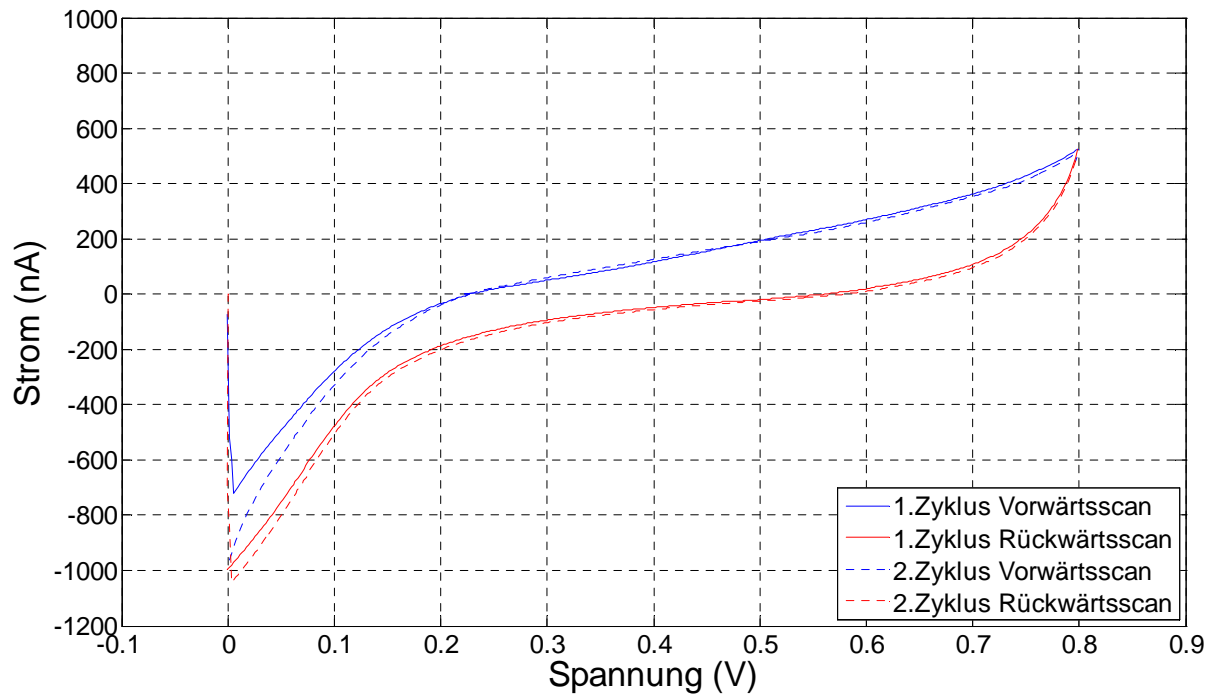
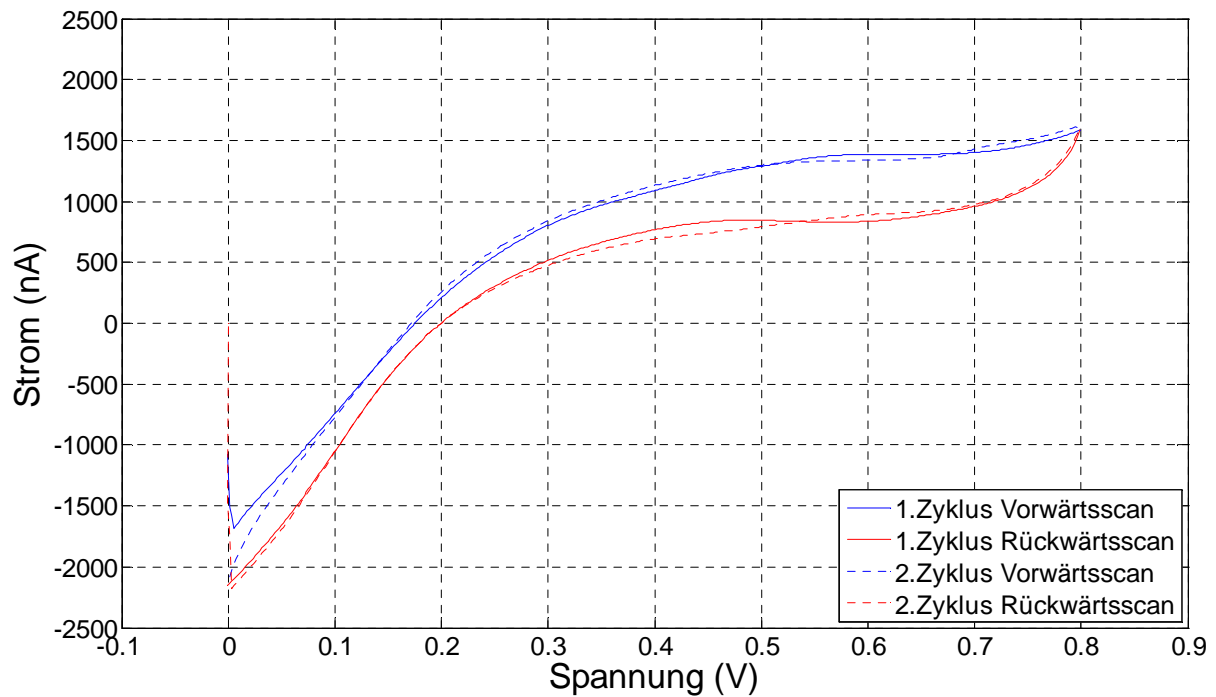
Platinsensor in Phosphatpuffer (Deckschichtdiagramm)

Abbildung 25: Zyklisches Voltammogramm eines Platinsensors in Phosphatpuffer

Platinsensor in einer 1mM H₂O₂-LösungAbbildung 26: Zyklisches Voltammogramm eines Platinsensors in 1 mM H₂O₂

3.4. Herstellung der Sensoren durch Dickschichttechnologie

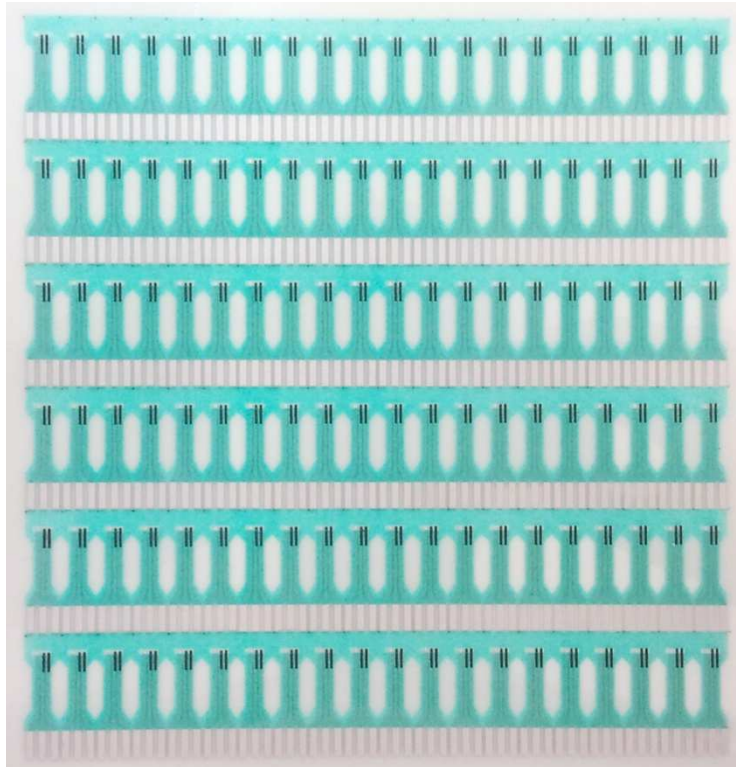


Abbildung 27: Hergestellte Sensoren in einem Arbeitsschritt

3.5. Amperometrische Messungen von Wasserstoffperoxid ohne MPO

3.5.1. Ausbildung der Diffusionsschicht in ruhenden Lösungen

Die Abnahme des Stromes in ruhenden Lösungen wird mittels Cottrell-Gleichung (Gl. 7, Seite 18) beschrieben.

Für die Simulation wurden folgende Werte verwendet:

- $z = 2$ (siehe Elektrodenreaktion, Gl. 4, Seite 10)
- $F = 96485,33 \text{ As/mol}$
- $A = 0,001 \text{ cm}^2$ (Gesamtfläche $0,004 \text{ cm}^2$, Braunsteinanteil 25 %)
- $D = 1,43 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ (bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$) [69]
- $C_0 = 100 \text{ } \mu\text{M}$

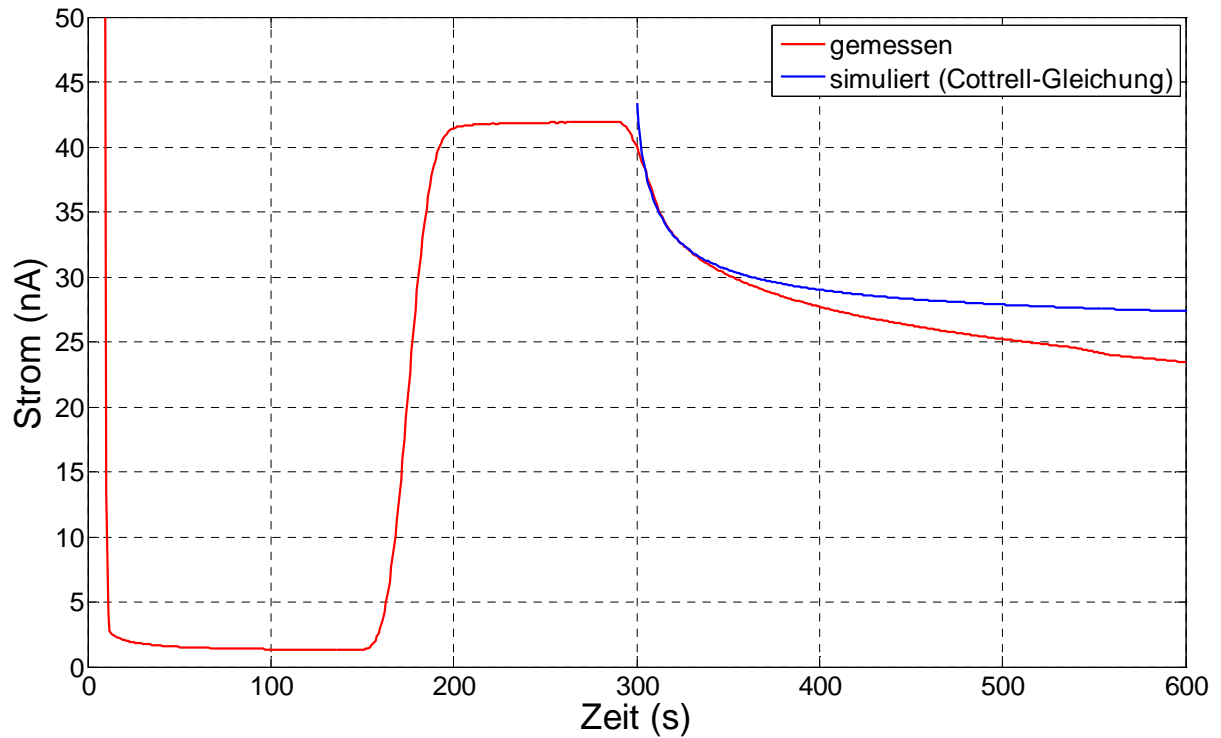


Abbildung 28: Ausbreitung der Diffusionsschicht in ruhender Lösung

3.5.2. Messung einer Konzentrationsreihe und Aufnahme einer Sensorkennlinie

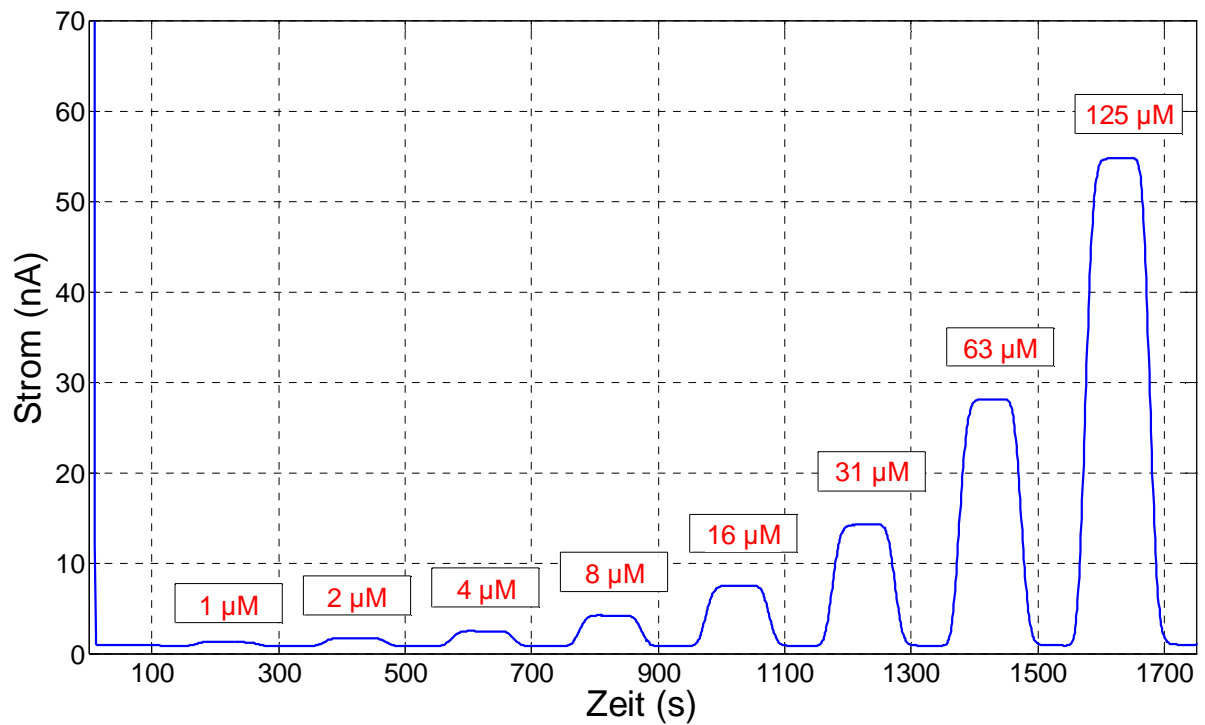


Abbildung 29: Messung einer Konzentrationsreihe von 1 µM bis 125 µM

Tabelle 2: gemessene Ströme der Konzentrationsreihe

H ₂ O ₂ -Konzentration	gemessener Strom (exkl. Grundstrom)
1 µM	0,41 nA
2 µM	0,83 nA
4 µM	1,65 nA
8 µM	3,37 nA
16 µM	6,71 nA
31 µM	13,41 nA
63 µM	27,26 nA
125 µM	53,95 nA

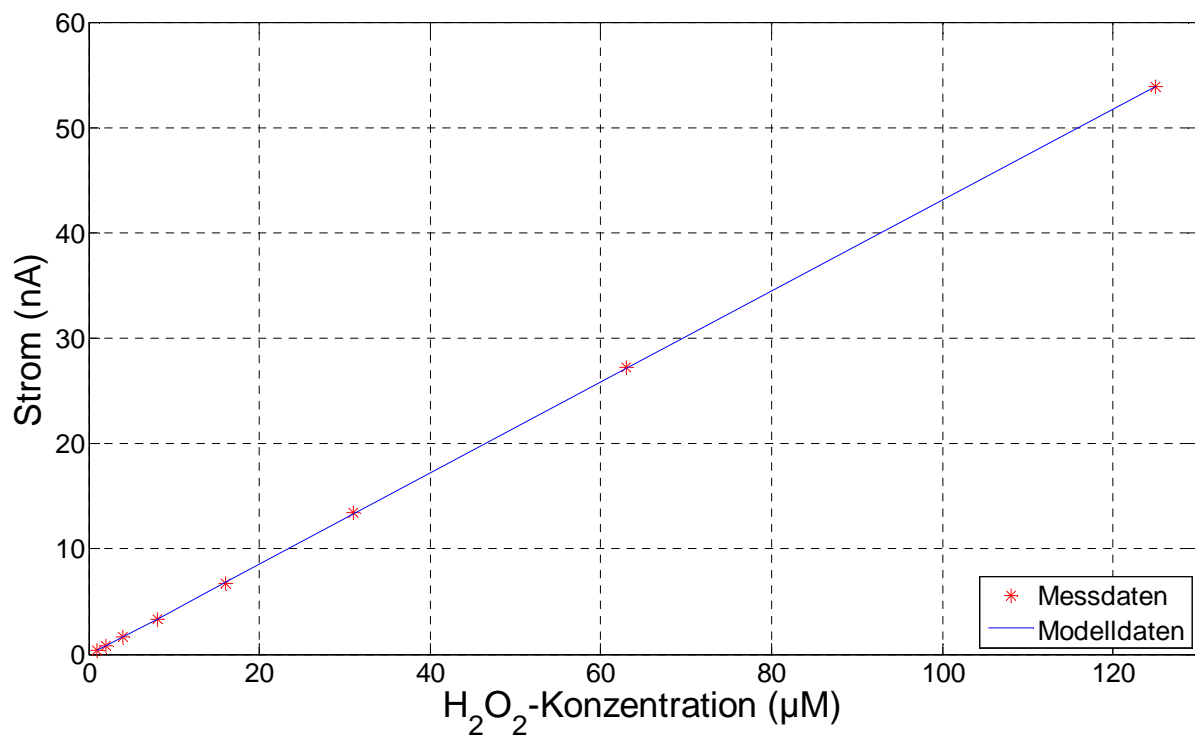


Abbildung 30: Sensorkennlinie (Kalibrationsgerade)

3.5.3. Ermittlung der Ansprechzeiten und des Detektionslimits

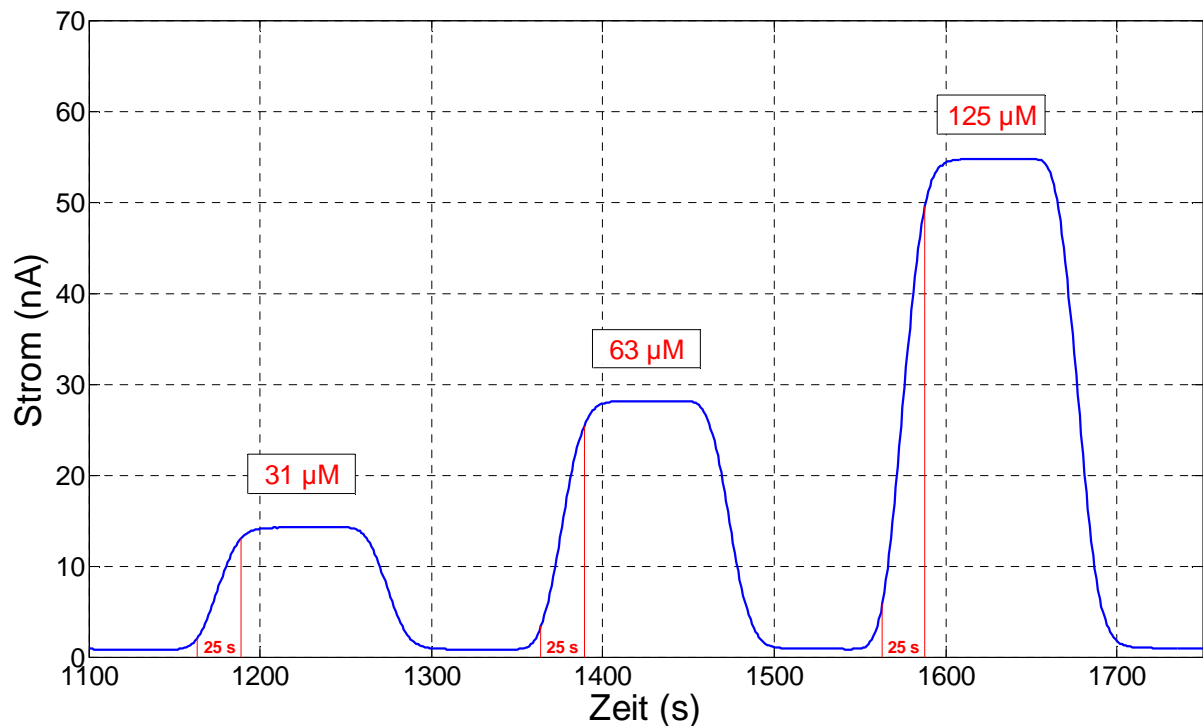


Abbildung 31: Ermittlung der Ansprechzeiten

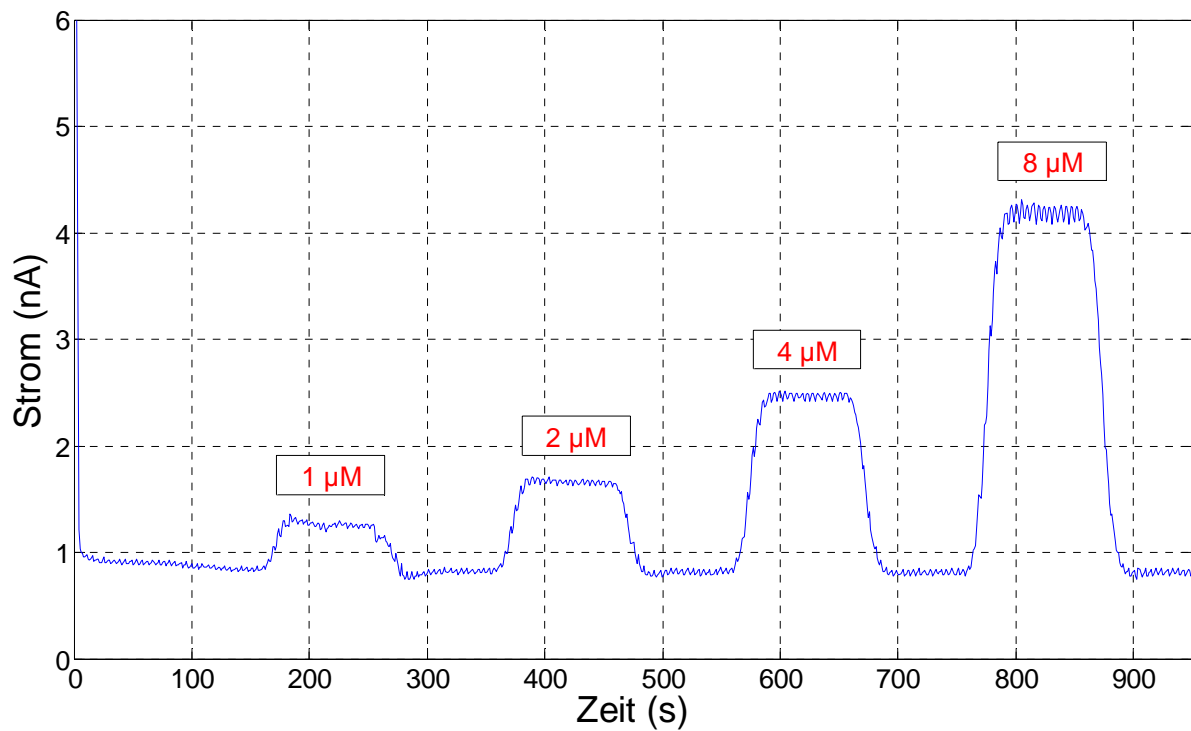


Abbildung 32: Ermittlung des Detektionslimits (Daten ohne Mittelwertfilter)

Grundstrom (berechnet zwischen 120 und 150 s): $(0,84 \pm 0,02)$ nA

3.5.4. Wiederholpräzision des Sensorsignales (Repeatability)

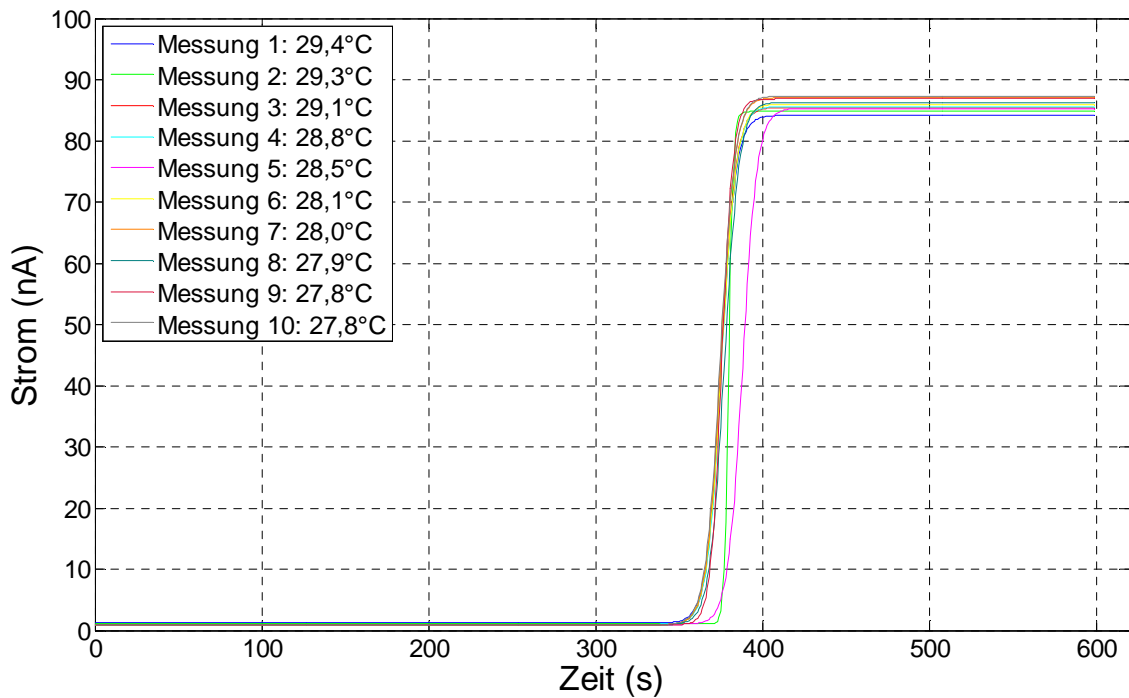


Abbildung 33: Wiederholpräzision des Sensorsignals: 10 Messungen mit dem gleichen Sensor

Ergebnis: (86 ± 1) nA, CV = 1,2 %

3.5.5. Vergleichspräzision des Sensorsignales (Reproducibility)

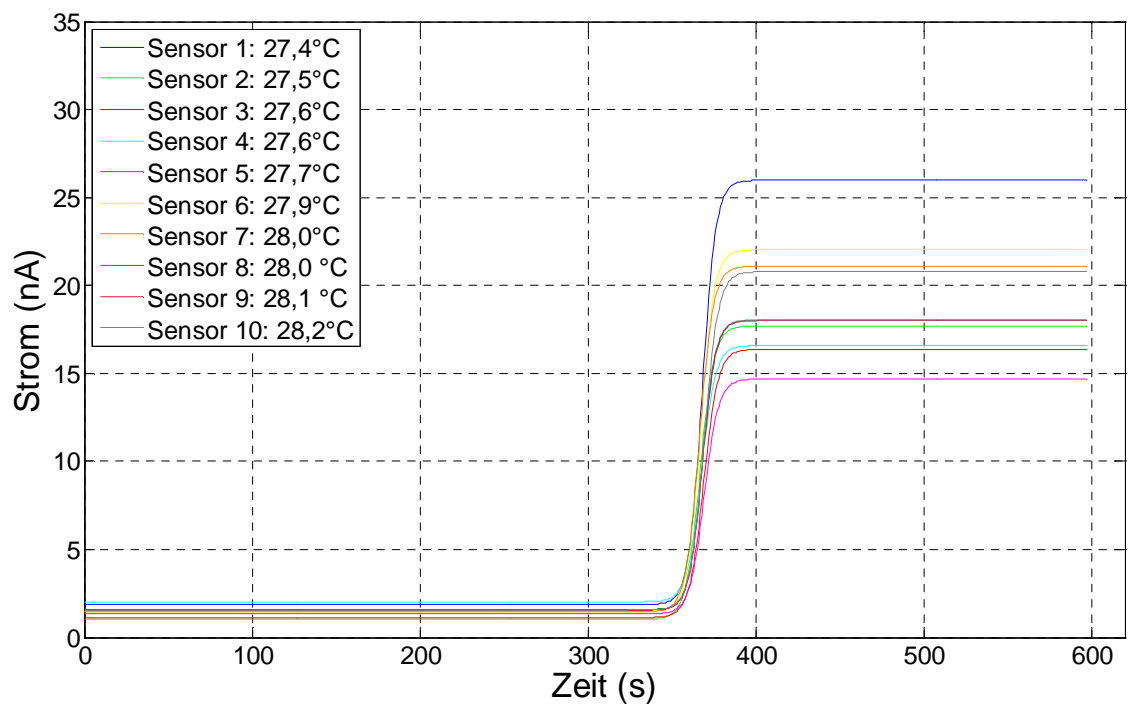


Abbildung 34: Vergleichspräzision des Sensorsignals: 10 Messungen mit verschiedenen Sensoren

Ergebnis: $(19,13 \pm 3,33)$ nA, CV = 17,4 %

3.5.6. Drift des Sensorsignales

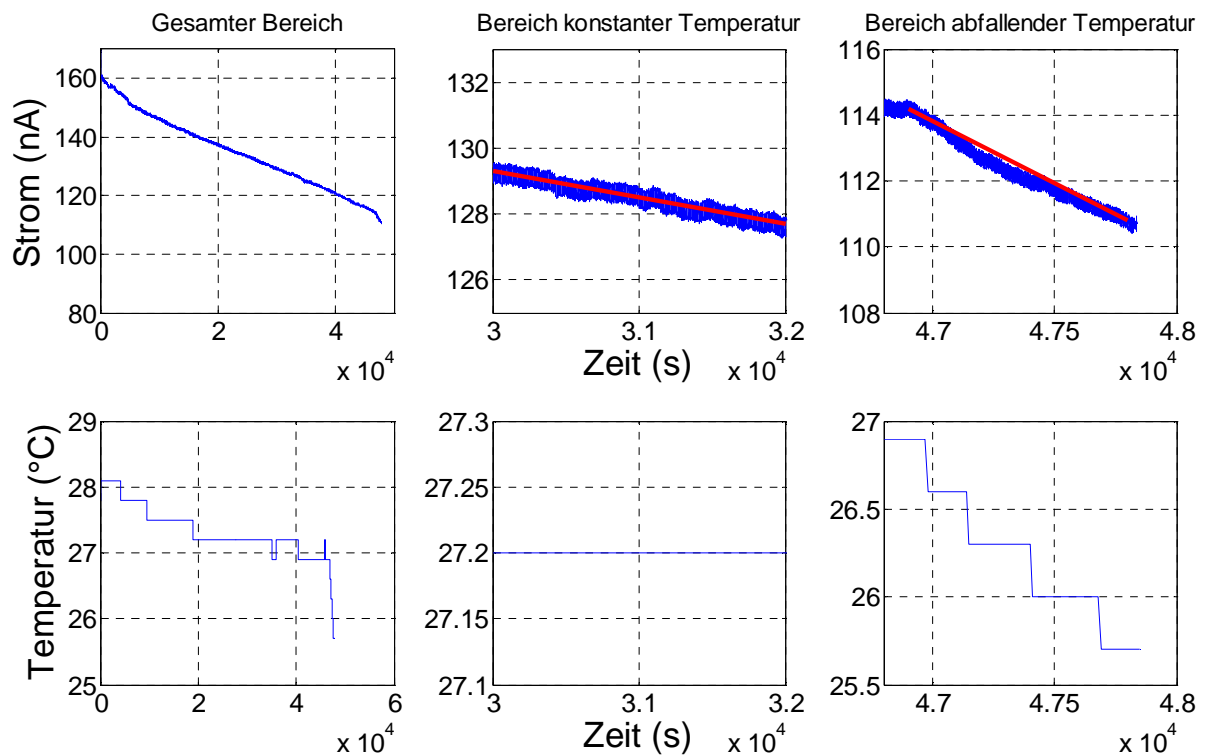


Abbildung 35: Langzeitmessung zur Überprüfung der Drift des Sensorsignales: linke Spalte: gesamter Bereich, mittlere Spalte: Bereich konstanter Temperatur, rechte Spalte: Bereich abfallender Temperatur

Berechnung der Drift D pro Zeiteinheit:

- Bereich konstanter Temperatur:

$$D_1 = \frac{\Delta I}{\Delta t} = \frac{129,3 \text{ nA} - 127,7 \text{ nA}}{2000 \text{ s}} = \frac{1,6 \text{ nA}}{33,3 \text{ min}} = 0,048 \text{ nA/min}$$

- Bereich abfallender Temperatur:

$$D_2 = \frac{\Delta I}{\Delta t} = \frac{114,2 \text{ nA} - 110,8 \text{ nA}}{900 \text{ s}} = \frac{3,4 \text{ nA}}{15 \text{ min}} = 0,226 \text{ nA/min}$$

Um die Drift D_T zu berechnen, die rein von einer Temperaturänderung hervorgerufen wird, wird die Differenz der beiden Driften berechnet und durch die Temperaturänderung dividiert:

$$D_T = \frac{D_2 - D_1}{\Delta T} = \frac{0,226 \text{ nA/min} - 0,048 \text{ nA/min}}{1,2 \text{ °C}} = 0,148 \text{ nA/(min * °C)}$$

Die Messung einer Wundprobe wird über eine Zeit t von 900 s (15 min) durchgeführt. Ändert sich während dieser Zeit die Temperatur um 1°C (ΔT), ergibt sich ein Stromabfall ΔI_T von:

$$\Delta I_T = D_T * t * \Delta T = 0,148 \frac{\text{nA}}{\text{min} * ^\circ\text{C}} * 15 \text{ min} * 1^\circ\text{C} = 2,22 \text{ nA}$$

Der Stromabfall, der nicht durch die Temperatur hervorgerufen wird, errechnet sich wie folgt:

$$\Delta I = D_1 * t = 0,048 \frac{\text{nA}}{\text{min}} * 15 \text{ min} = 0,72 \text{ nA}$$

Ändert sich die Temperatur während einer Messung von 15 min um 1°C , ergibt sich insgesamt eine Drift des Stromes um weniger als 3 nA.

3.6. Amperometrische Messung von Wasserstoffperoxid mit MPO

3.6.1. Wiederholpräzision des relativen Signalverlustes

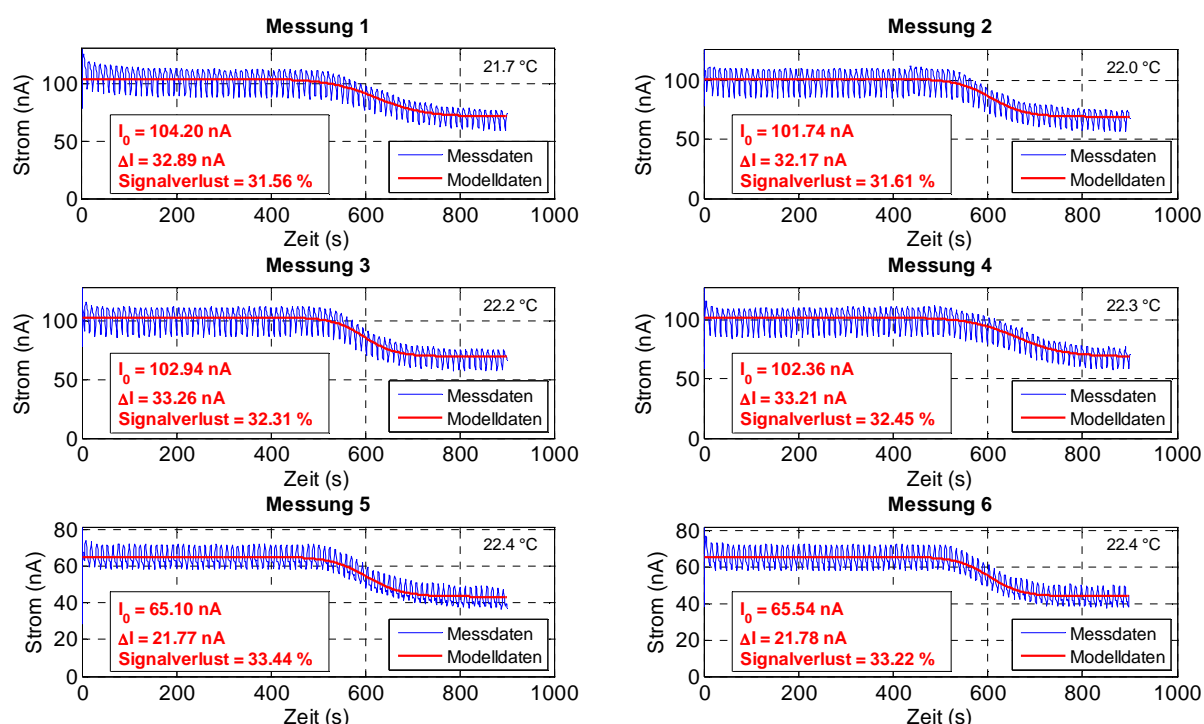


Abbildung 36: Wiederholpräzision des relativen Signalverlustes: 6 Messungen mit dem gleichen Sensor und der gleichen Enzymaktivität (0,75 U/ml)

Ergebnis: $(32,4 \pm 0,8) \%$, CV = 2,4 %

3.6.2. Vergleichspräzision des relativen Signalverlustes

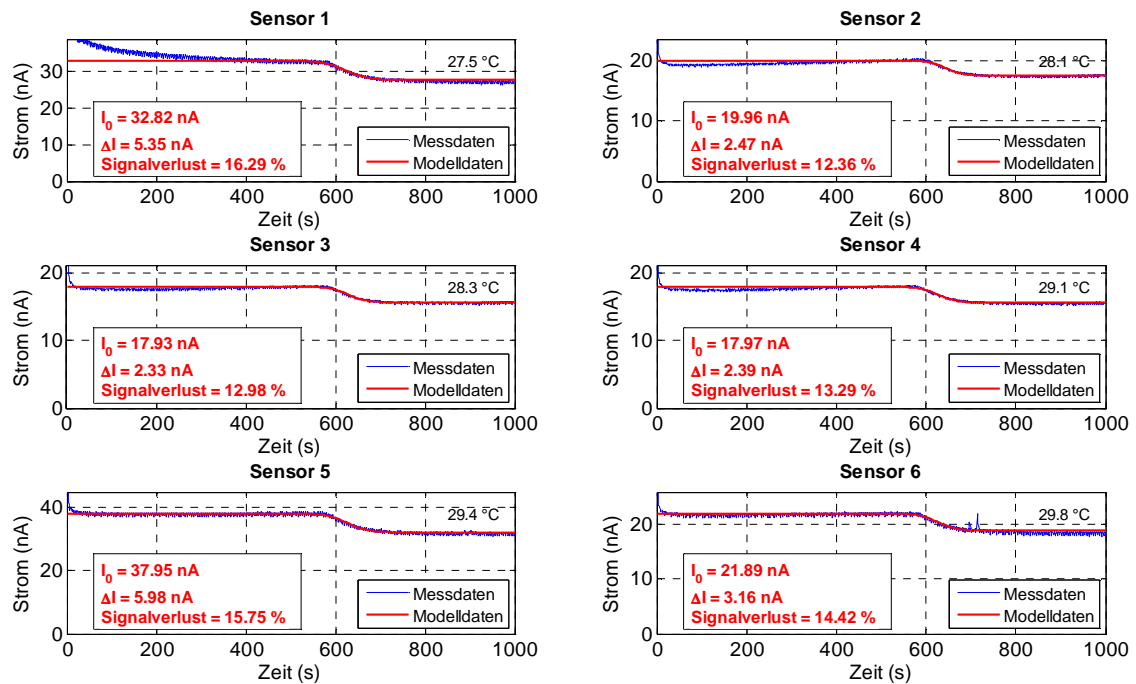


Abbildung 37: Vergleichspräzision des relativen Signalverlustes: 6 Messungen mit verschiedenen Sensoren und der gleichen Enzymaktivität (0,3 U/ml)

Ergebnis: $(14,2 \pm 1,6) \%$, CV = 11,3 %

3.6.3. Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und relativem Signalverlust

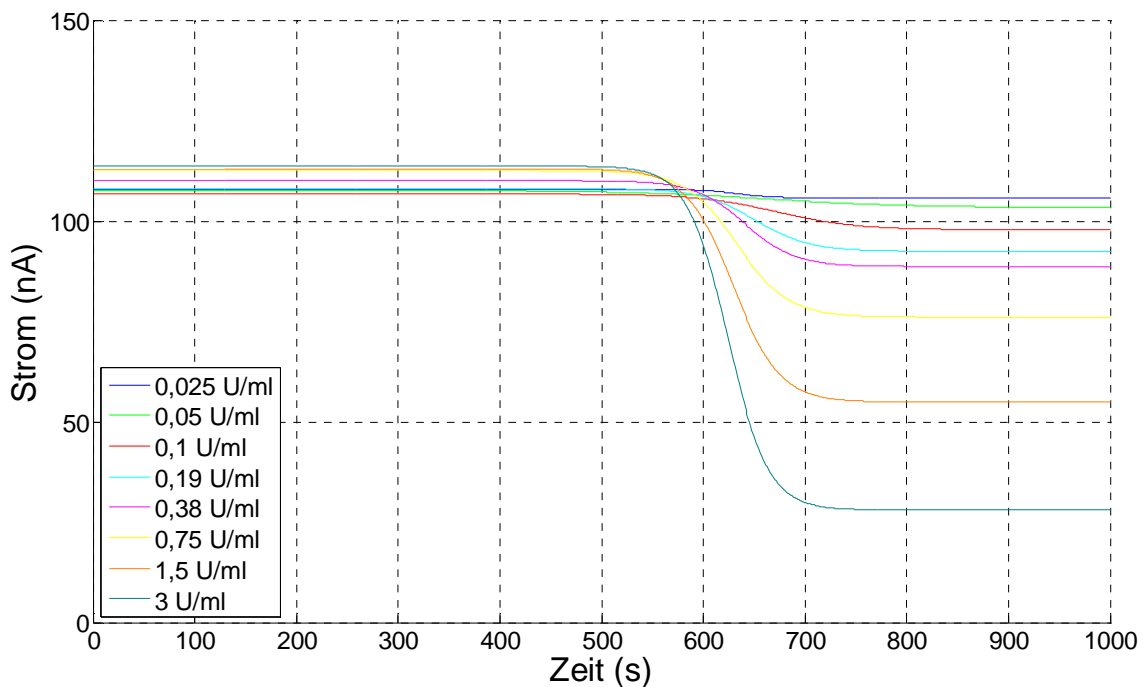


Abbildung 38: Messungen des relativen Signalverlustes für verschiedene Enzymaktivitäten: je höher die Enzymaktivität, desto größer der relative Signalverlust

Tabelle 3: gemessene Signalverluste für verschiedene Enzymaktivitäten

Enzymaktivität	relativer Signalverlust
3 U/ml	1,95 %
1,5 U/ml	3,89 %
0,75 U/ml	8,36 %
0,38 U/ml	14,44 %
0,19 U/ml	19,41 %
0,1 U/ml	32,39 %
0,05 U/ml	51,42 %
0,025 U/ml	75,33 %

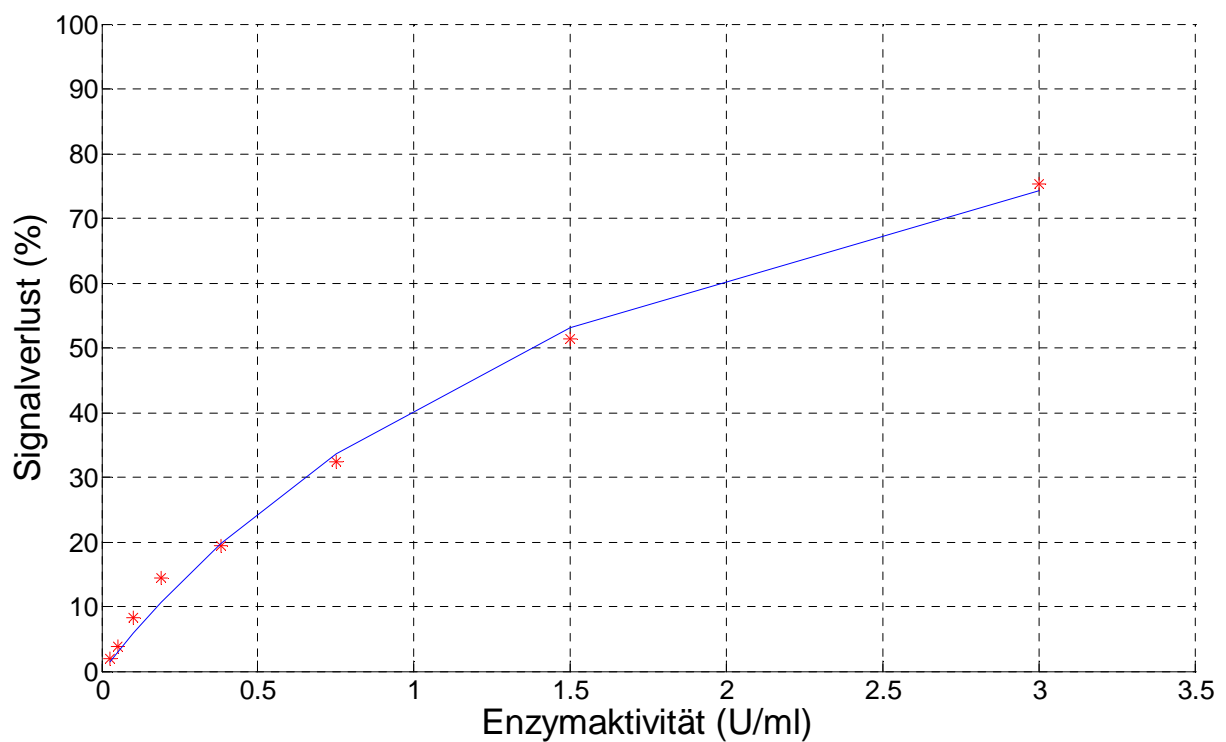


Abbildung 39: Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und relativem Signalverlust: die Kurve zeigt ein Sättigungsverhalten und wurde mit der Michaelis-Menten-Gleichung modelliert (blau), rot: berechnete Signalverluste zu den jeweiligen Enzymaktivitäten

Das Modell lieferte als Ergebnis die Parameter $SV_{\max} = 124,57 \%$ und $K_a = 2,03 \text{ U/ml}$.

3.6.4. Messungen mit realen Wundproben

Gut heilende Wundproben:

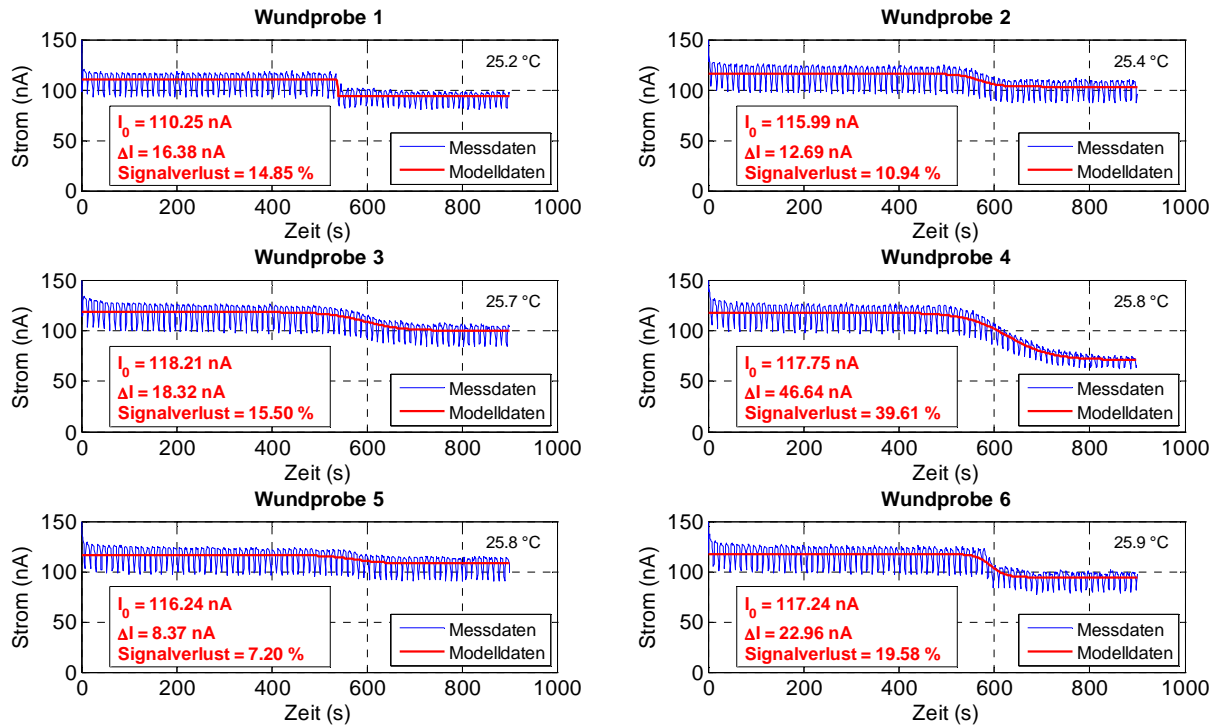


Abbildung 40: Ergebnisse der gut heilenden Wundproben: Wundproben 1 bis 6

Kritische Wundproben:

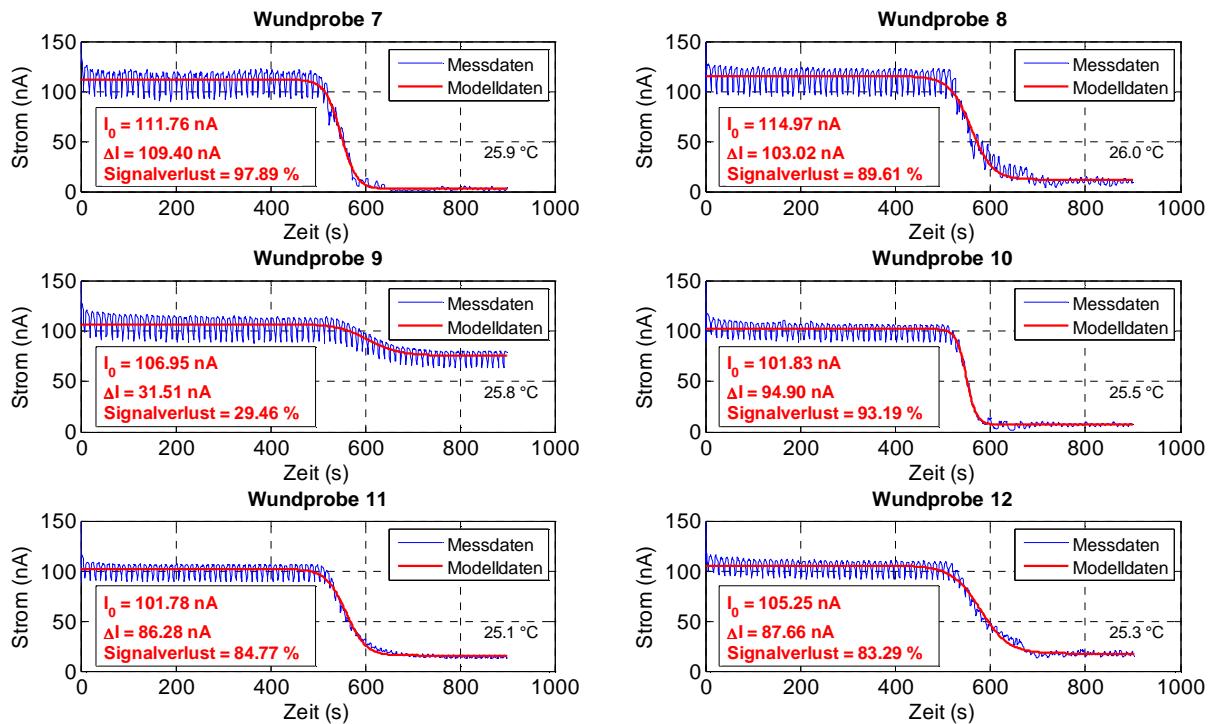


Abbildung 41: Ergebnisse der kritischen Wundproben: Wundproben 7 bis 12

Uncharakterisierte Wundproben:

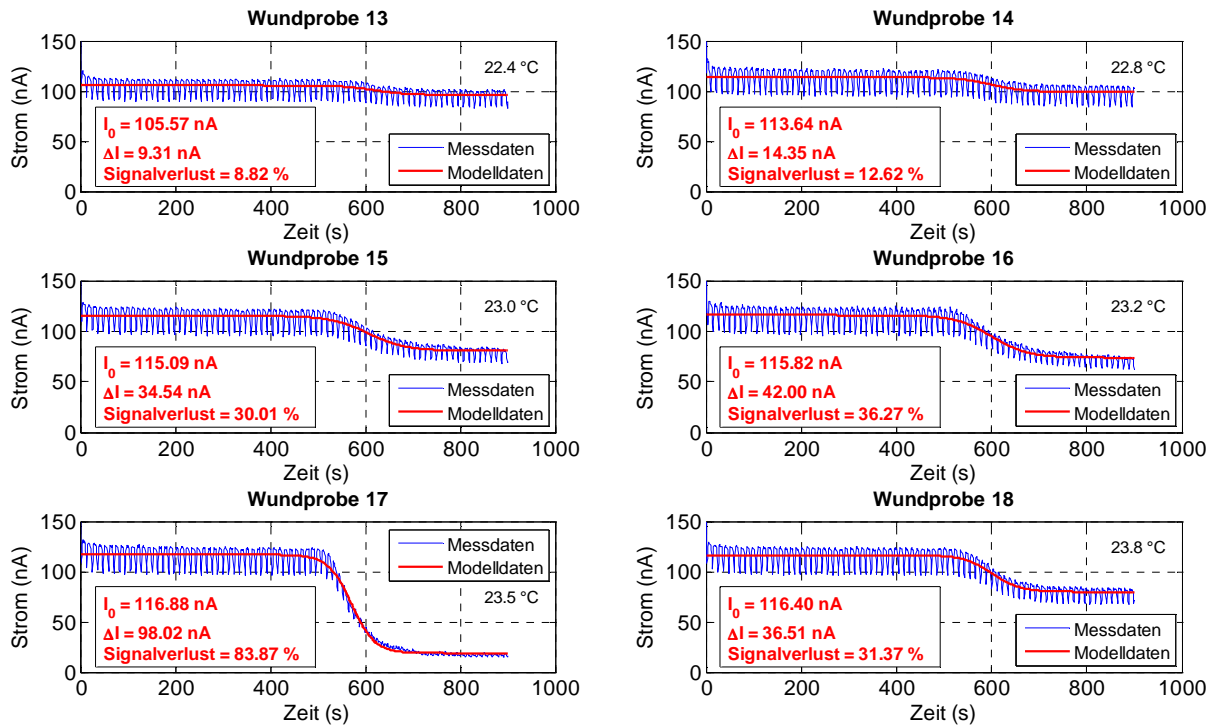


Abbildung 42: Ergebnisse der uncharakterisierten Wundproben: Wundproben 13 bis 18

Signalauswertung:

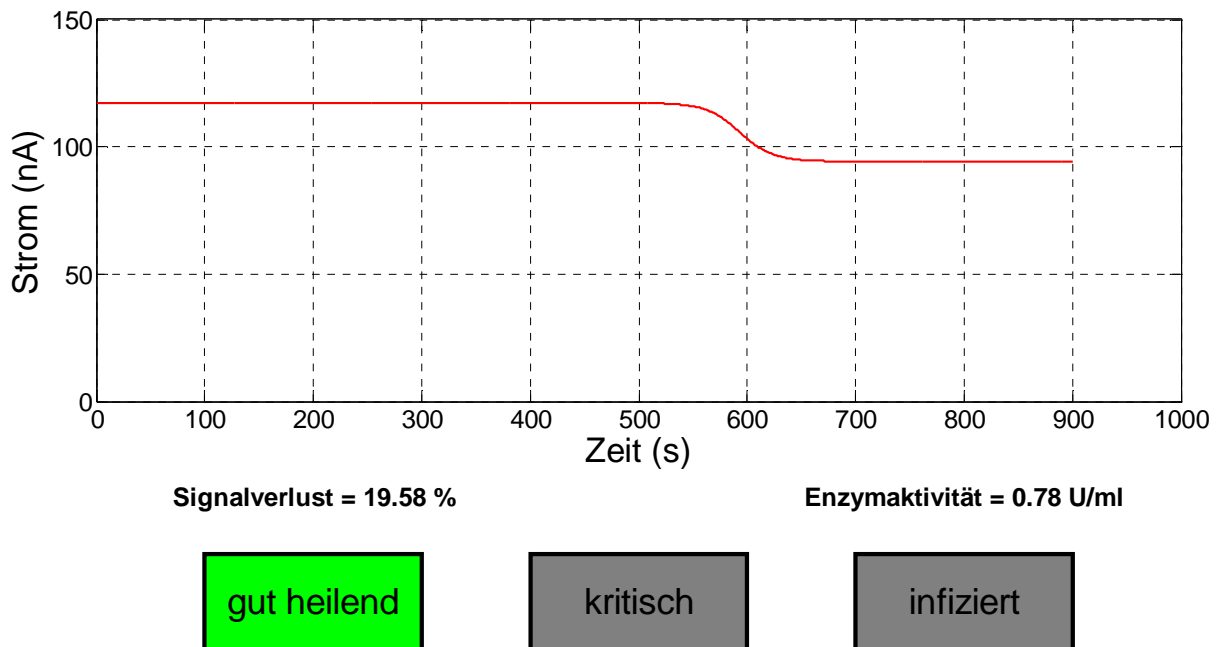


Abbildung 43: Software zur Datenauswertung: Beispiel an Hand der Wundprobe 6 (gut heilend)

3.6.5. Berechnung der Enzymaktivität an Hand eines Beispiels

Die Enzymaktivität wurde für Wundprobe 6 (Abb. 43, Seite 53) berechnet, wobei folgende Zusammenhänge und Parameter bekannt sind:

- gemessener Strom ist linear proportional zur H_2O_2 – Konzentration (siehe Abb. 30, Seite 45)
- $C_1 = 100 \mu\text{M}$ (\triangleq dem Signal des oberen Plateaus der Sigmoidfunktion)
- Reaktionszeit $t_R = 0,5 \text{ min}$
- Flussrate $FR = 20 \mu\text{l}/\text{min}$
- Verdünnungsfaktor VF der Wundproben = 10
- Signalverlust $SV = 19,58 \%$ (siehe Abb. 43, Seite 53)
- 1:1 – Mischung im Y-Stück

$$\Delta C[\mu\text{M}] = C_1[\mu\text{M}] * \frac{SV[\%]}{100} = 100 \mu\text{M} * \frac{19,58 \%}{100 \%} = 19,58 \mu\text{M}$$

$$V_R[l] = FR[\mu\text{l}/\text{min}] * t_R[\text{min}] * 10^{-6} = 20 \mu\text{l}/\text{min} * 0,5 \text{ min} * 10^{-6} = 10^{-5} l$$

$$a[U] = \frac{\Delta C[\mu\text{M}] * V_R[l]}{t_R[\text{min}]} * VF = \frac{19,58 \mu\text{M} * 10^{-5} l}{0,5 \text{ min}} * 10 = 3,916 * 10^{-3} U$$

$$a[U/ml] = 2 * \frac{a[U]}{V_R[ml]} = 2 * \frac{3,916 * 10^{-3} U}{10^{-2} ml} = 0,78 U/ml$$

Tabelle 4: berechnete Enzymaktivitäten und Vergleich der Charakterisierungen

Wundprobe	berechnete Enzymaktivität (U/ml)	Charakterisierung des Messsystems	Charakterisierung der/des Ärztin/Arztes
Wundprobe 1	0,59	„gut heilend“	„gut heilend“
Wundprobe 2	0,44	„gut heilend“	„gut heilend“
Wundprobe 3	0,62	„gut heilend“	„gut heilend“
Wundprobe 4	1,58	„gut heilend“	„gut heilend“
Wundprobe 5	0,29	„gut heilend“	„gut heilend“
Wundprobe 6	0,78	„gut heilend“	„gut heilend“
Wundprobe 7	3,92	„infiziert“	„kritisch“
Wundprobe 8	3,58	„kritisch“	„kritisch“
Wundprobe 9	1,18	„gut heilend“	„kritisch“
Wundprobe 10	3,73	„kritisch“	„kritisch“
Wundprobe 11	3,39	„kritisch“	„kritisch“
Wundprobe 12	3,33	„kritisch“	„kritisch“
Wundprobe 13	0,35	„gut heilend“	keine Beurteilung
Wundprobe 14	0,50	„gut heilend“	keine Beurteilung
Wundprobe 15	1,20	„gut heilend“	keine Beurteilung
Wundprobe 16	1,45	„gut heilend“	keine Beurteilung
Wundprobe 17	3,35	„kritisch“	keine Beurteilung
Wundprobe 18	1,25	„gut heilend“	keine Beurteilung

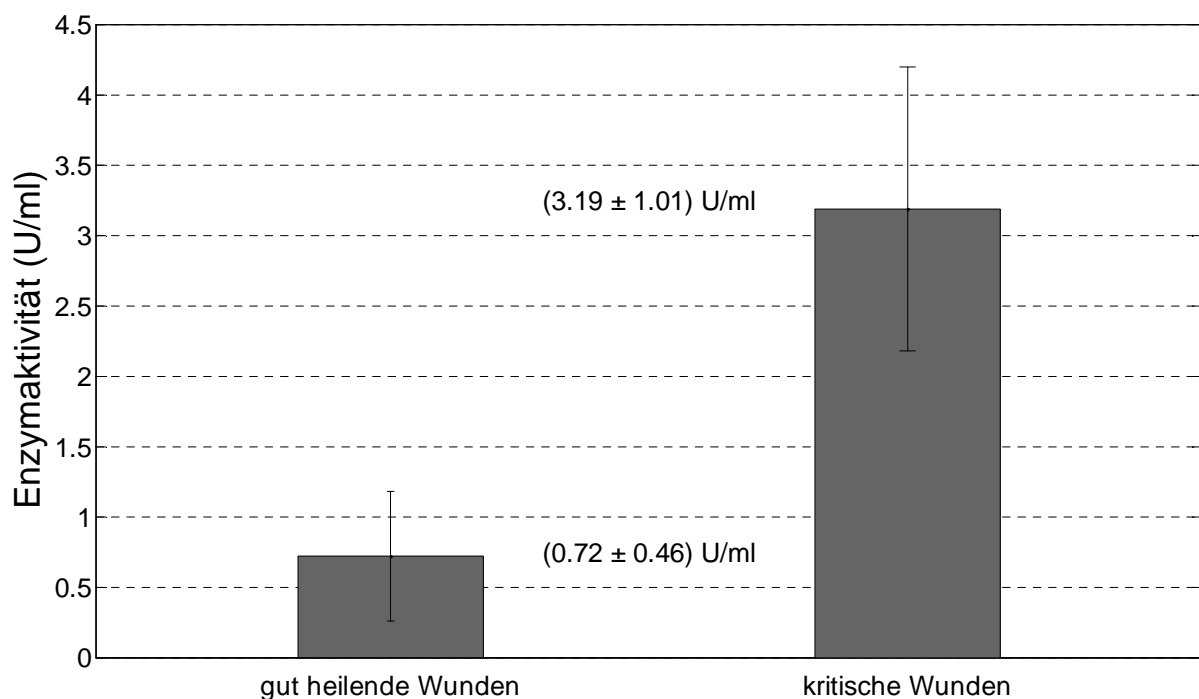


Abbildung 44: statistische Auswertung der berechneten Enzymaktivität in gut heilenden und kritischen Wunden: dargestellt werden Mittelwert ± Standardabweichung als Balkendiagramm

4. Diskussion

4.1. Verwendung des Phosphatpuffers zur Herstellung der Messlösung

Der pH-Wert der Messlösung hat einen entscheidenden Einfluss auf die Messergebnisse und muss daher auf einen bestimmten Wert eingestellt und möglichst konstant gehalten werden. Als Puffersystem diente dabei ein Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,5. Da dieser pH-Wert im Bereich des physiologischen pH-Wertes (ca. 7,4 [6]) liegt, ist dieser Puffer für alle Zellflüssigkeiten von Bedeutung [68] (es wurde mit biologischen Proben gearbeitet). Vergleicht man den berechneten (7,5) mit dem gemessenen pH-Wert (7,3), kann eine Abweichung von 0,2 festgestellt werden, welche hauptsächlich auf das in der Luft vorkommende Kohlendioxid zurückgeführt werden kann. Dieses löst sich gut in Wasser (im Phosphatpuffer) und bildet dabei Kohlensäure, wodurch der pH-Wert in den sauren (niedrigeren) Bereich verschoben wird. Weitere Gründe für diese Abweichung könnten Ungenauigkeiten der Messgeräte (pH-Meter und Analysewaage) und individuelle Fehler beim Einwiegen der Substanzen sein.

Die Wahl des pH-Wertes ist weiters dadurch zu begründen, dass sich Braunstein bei kleineren pH-Werten (unter 7, saures Milieu) auflöst [52], [70], was mit der Zeit zu immer kleineren Signalen führen würde. Im neutralen und basischen Bereich ist Braunstein in der Lage, H_2O_2 zu O_2 zu oxidieren [51], [52] und dadurch die Elektrodenreaktion zu ermöglichen (siehe Gleichung 4, Seite 10). Allerdings ist Wasserstoffperoxid in basischer Umgebung instabil [71], sodass ein pH-Wert im physiologischen Bereich für das vorliegende System am besten geeignet ist. Das dem Puffer hinzugefügte Natriumchlorid hat keinen Einfluss auf den pH-Wert, Chlorid wird von der Silber/Silberchlorid-Elektrode zur Aufrechterhaltung des Arbeitspotentials benötigt [72]. Weiters liegt das pH-Optimum für die Chlorierungsaktivität des Enzyms und den gewählten Substratkonzentrationen im neutralen Bereich [73].

Mit diesem Phosphatpuffer wurden jeden Tag, an dem Messungen durchgeführt wurden, die benötigten Messlösungen mit den entsprechenden H_2O_2 -Konzentrationen frisch hergestellt, da sich H_2O_2 spontan zersetzt. Um diese spontane Zersetzung zu unterdrücken, enthält die Stammlösung (die 30%ige H_2O_2 -Lösung aus der die Verdünnungen hergestellt wurden) verschiedene Stabilisatoren [74].

4.2. Bestimmung der Polarisationsspannung durch zyklische Voltammetrie

Die optimale Oxidationsspannung für Wasserstoffperoxid liegt bei Braunstein im Bereich von 300 – 500 mV [53], [70] und bei Platin im Bereich von 600 mV [75]. Um diese Bereiche abzudecken, wurde die Spannung für die Versuche der zyklischen Voltammetrie linear zwischen 0 und 800 mV verändert. Die Wahl der Umkehrspannungen (0 mV, 800 mV) ist begrenzt durch die Zersetzung des verwendeten Lösungsmittels (H₂O im Phosphatpuffer) [58]. Dies soll an Hand des Versuches in Abb. 23 (Seite 41) erklärt werden, bei dem ein Deckschichtdiagramm eines Braunsteinsensors in Phosphatpuffer ohne H₂O₂ aufgenommen wurde. Bei niedrigen Spannungen kommt es zur Wasserstoffentwicklung an der Arbeitselektrode, wobei Elektronen von der Elektrode auf das Wasser übertragen werden:



Die entstehenden Wasserstoffmoleküle bilden dabei an der Arbeitselektrode eine Wasserstoff-Adsorptionsschicht. Durch die Reduktion des Wassers wird die Arbeitselektrode definitionsgemäß zur Kathode (kathodischer Bereich des Zykelvoltammogramms). Ein kathodischer Strom wird als negativ definiert, sodass sich in diesem Bereich ein negativer Stromfluss ergibt. Wird die Spannung langsam durch die eingestellte Scanrate von 2 mV/s erhöht, wird dieser kathodische Strom immer kleiner bis eine Plateauphase beginnt, in der kaum ein Strom fließt. In diesem Bereich ist die Polarisierbarkeit der Arbeitselektrode ersichtlich, sodass trotz angelegter Spannung nur ein sehr geringer Strom fließt. Bedingt durch die Änderung der Spannung durch die eingestellte Scanrate fließt stets ein geringer kapazitiver Strom, der durch die Umladung der elektrochemischen Doppelschicht verursacht wird. Durch die relativ kleine Scanrate von 2 mV/s wurde dieser Einfluss jedoch bewusst gering gehalten. Im oberen Spannungsbereich wird der Strom immer höher, was ebenfalls auf die Zersetzung des Lösungsmittels zurückzuführen ist. In diesem Fall kommt es zu einer Sauerstoffentwicklung durch die Oxidation von H₂O an der Arbeitselektrode:



Dabei bildet sich eine Sauerstoff – Adsorptionsschicht an der Arbeitselektrode aus. Durch die Oxidation wird die Arbeitselektrode definitionsgemäß zur Anode (anodischer Bereich des Zykelvoltammogramms). Durch gegenläufige Stromrichtung von Oxidation und Reduktion ergibt sich in diesem Bereich im Gegensatz zum kathodischen Bereich ein positiver Strom.

Beim Rückwärtsscan laufen die Vorgänge in umgekehrter Reihenfolge ab, bis wieder ein etwas höherer negativer Strom im kathodischen Bereich zu messen ist. Es erfolgt ein abwechselnder Auf- und Abbau von Wasserstoff- und Sauerstoff – Adsorptionsschichten. Im Vorwärtsscan war der messbare Strom in diesem Bereich etwas geringer, da die Ausbildung der elektrochemischen Doppelschicht bei einer beginnenden Messung das Signal als kapazitiver Strom überlagert. Der Verlauf des zweiten Zyklus ist dem ersten sehr ähnlich. Verunreinigungen in der Braunsteinschicht der Arbeitselektrode werden im anodischen Bereich des ersten Zyklus oxidiert (tragen zum Strom bei), sodass im zweiten Zyklus weniger davon vorhanden sind und in diesem Bereich ein geringerer Strom messbar ist. Im Allgemeinen kann man durch mehrere Zyklen die Elektrode vor Verunreinigungen reinigen, sodass vor chronoamperometrischen Messungen oft (vor allem bei höheren Polarisationsspannungen) eine zyklische Voltammetrie durchgeführt wird.

In Abb. 24 (Seite 41) ist ein Zyklovoltammogramm eines Braunsteinsensors in einer 1 mM H_2O_2 -Lösung zu sehen. Vergleicht man dieses Diagramm mit dem vorigen Deckschichtdiagramm ohne Analyt, ist ein eindeutiger Unterschied zu erkennen. Der Strom steigt stark mit der größer werdenden Spannung an, da nun vermehrt H_2O_2 -Moleküle an der Arbeitselektrode oxidiert werden (ab ca. 200 mV ist dieser Anstieg hauptsächlich auf die Oxidation von H_2O_2 zurückzuführen). Der Beginn des diffusionslimitierenden Bereiches (Beginn der Plateauphase) liegt bei ca. 350 mV. Ab dieser Spannung werden alle H_2O_2 -Moleküle an der Oberfläche der Arbeitselektrode sofort oxidiert und der gemessene Strom ist linear proportional zur Analytkonzentration in der Messlösung. Daher wurde für chronoamperometrische Messungen mit dem vorliegenden System eine Polarisationsspannung von 350 mV gewählt. Wird die Spannung nicht im Grenzstrombereich gewählt, resultiert eine nichtlineare Sensorantwort und der Sensor ist empfindlicher gegen Alterung [4]. Da die Zyklovoltammetrie in ruhender Lösung durchgeführt wird, ist hier auch die Ausbildung der Diffusionsschicht zu erkennen, indem der Strom trotz weiterer Erhöhung der Spannung wieder sinkt. Am Ende des anodischen Astes (weitere Erhöhung der Polarisationsspannung) ist wieder ein Anstieg des Stromes zu erkennen, der auf die Oxidation von Verunreinigungen zurückzuführen ist. Dieser Anstieg ist im zweiten Zyklus nicht mehr zu erkennen, da durch die Umsetzung im ersten Zyklus keine Verunreinigungen mehr vorhanden sind. Die Zersetzung des Wassers ist im anodischen Ast nicht zu erkennen,

da die Ausbildung der Diffusionsschicht überwiegt, sehr wohl aber im kathodischen Ast (hier wird kein H_2O_2 oxidiert).

In Abb. 24 (Seite 41) kann weiters die Irreversibilität der Elektrodenreaktion [55] erkannt werden, da der negative Peak (wie in Abb. 9, Seite 19 gezeigt) im Rückwärtsscan fehlt.

Die gleichen Versuche wurden mit einem Platinsensor durchgeführt (Abb. 25 und 26, Seite 42). In Abb. 25 ist keine eindeutige Plateauphase zu erkennen, was bei Spannungen ab 300 mV zu deutlich höheren Grundströmen in reinem Phosphatpuffer ohne H_2O_2 führt. Bei der Messung in einer 1 mM H_2O_2 -Lösung ist der diffusionslimitierende Bereich erst ab ca. 600 mV erreicht (Plateauphase). Somit ist für die Messung eines linear zur Konzentration proportionalen Stromes durch chronoamperometrische Messungen eine Polarisationsspannung von 600 mV notwendig, welche deutlich über der von Braunsteinsensoren (350 mV) liegt. Im Vergleich zum Braunsteinsensor sind für die gleiche H_2O_2 – Konzentration höhere Ströme messbar, was auf eine größere aktive Fläche der Arbeitselektrode (größerer Platin-Spot durch das Dispensiergerät) bei Platinsensoren zurückzuführen ist (vgl. Abb. 14 und 15, Seite 22 und 23). Abweichungen der Signale der beiden Zyklen bedingt durch Verunreinigungen sind bei den Platinsensoren jedoch weder in Abb. 25, noch in Abb. 26 zu erkennen. Da Verunreinigungen auch in der Messlösung vorkommen können und diese bei höheren Polarisationsspannungen leichter oxidiert werden [4], [52], [70] (und somit eher als Störsignal zum gemessenen Strom beitragen), ist die Polarisationsspannung im Allgemeinen so gering wie möglich zu halten. Mit einer Polarisationsspannung von 350 mV für die Oxidation von H_2O_2 besitzen Braunsteinsensoren einen deutlichen Vorteil gegenüber Platinsensoren. Weiters ist Braunstein deutlich billiger als Platin und somit besser für die H_2O_2 -Sensorik geeignet. Aus diesen Gründen wurden für alle weiteren Messungen Braunsteinsensoren verwendet.

4.3. Herstellung der Sensoren durch Dickschichttechnologie

Wie in Abb. 27 (Seite 43) zu sehen ist, können durch die verwendeten Siebe bis zu 120 Sensoren in einem Arbeitsschritt hergestellt werden. Diese hohe Anzahl in Verbindung mit geringen Materialkosten (Siebdruckpasten, Substratfolie) ermöglicht eine billige Herstellung der Sensoren. Weiters entfällt die Notwendigkeit von Membranen (erhöhen Ansprech- und Einlaufzeiten, Verlust an Stabilität) und Enzymen (teure Enzyme, komplizierte Immobilisierungen) als Biokomponente, wie sie bei vielen anderen Sensoren verwendet

werden. Dadurch gewinnen die Sensoren an Stabilität und können sehr lange für Messungen verwendet werden (Braunstein besitzt eine hohe chemische Stabilität in Luft [71]). Diese Sensoren besitzen weiters den Vorteil, dass sie mit einer Fläche von weniger als 2 cm² relativ klein und damit flexibel einsetzbar sind.

Um eine definierte aktive Elektrodenoberfläche zu erhalten, wird eine Isolationsschicht über die Sensoren gelegt (Abb. 14, Seite 22). Bedingt durch Variationen im Herstellungsprozess (keine ideal homogene Verteilung des Braunsteinpulvers in der Karbonpaste, nicht exakte Positionierung der Braunsteinspots, sodass diese zu einem geringen Teil unter der Isolationsschicht liegen) liefern unterschiedliche Sensoren (geringfügig) unterschiedliche Ströme zur gleichen H₂O₂-Konzentration. Dieser Effekt spielt jedoch eine untergeordnete Rolle für die Erkennung einer Wundinfektion (es wird der **relative** Signalverlust betrachtet), worauf später noch genauer eingegangen wird.

Ein großer Vorteil dieser pastenartigen Elektrodenmaterialien ist die leichte Modifizierbarkeit (Karbonpaste vermischt mit Braunstein oder Platinpulver), um eine höhere Selektivität, eine Verringerung der Polarisationspannung und eine niedrigere Detektionsgrenze für H₂O₂ zu erhalten. Die Verwendung eines Dispensiergerätes für die Herstellung der Platinsensoren erschwert den Herstellungsprozess und erhöht die Variation zwischen den Sensoren (unterschiedlich große Arbeitselektroden auf Grund der manuellen Herstellung). Dadurch wird jedoch der etwas höhere Materialverlust (Platin ist sehr teuer) beim Siebdrucken im Vergleich zum Dispensiergerät vermieden.

4.4. Amperometrische Messungen von Wasserstoffperoxid

4.4.1. Allgemein

Da bei amperometrischen Messungen von H₂O₂ sehr geringe Ströme (nA-Bereich) gemessen werden, können Störsignale durch externe Quellen (z.B. Leitungen in Wänden, die hohe Ströme führen) eine entscheidende Rolle spielen. Diese Störsignale werden durch die Leitungen des Messsystems aufgenommen und überlagern das Nutzsignal (siehe Anhang, Abb. 45). Um dies zu verhindern, wurden alle Messungen in einem Faraday'schen Käfig durchgeführt.

Die verwendete Peristaltikpumpe erzeugt einen relativ unkonstanten Fluss. Diese Schwankungen in der Flussgeschwindigkeit bewirken, dass die Diffusionsschicht keine

konstante Dicke besitzt. Mit höherer Geschwindigkeit wird die Diffusionsschicht dünner, sodass der Konzentrationsgradient und damit der Strom höher werden. Umgekehrt wird die Diffusionsschicht dicker, wenn die Geschwindigkeit sinkt (in diesem Fall führt ein geringerer Konzentrationsgradient zu einem geringeren Strom). Dieser ständige Auf- und Abbau der Diffusionsschicht durch den unkonstanten Fluss der Pumpe wird in Abb. 46 (Anhang, Seite 80) gezeigt. Bei höheren Strömen ist der absolute Einfluss dieser Schwankungen auf den Konzentrationsgradienten größer, sodass auch das Rauschen im Messsignal größer ist. Durch dieses Pumpenrauschen wird die Notwendigkeit eines Auswertemodells zusätzlich unterstrichen. Für die eventuelle zukünftige Entwicklung eines Gerätes könnten Mikropumpen verwendet werden. Durch ihre geringe Größe (Abmessungen im cm – Bereich) wären diese gut für die Verwendung innerhalb eines Gerätes geeignet. Weiters besitzen Mikropumpen im Vergleich zu der verwendeten Peristaltikpumpe den Vorteil einer deutlich konstanteren Pumpgeschwindigkeit.

4.4.2. Amperometrische Messungen ohne MPO

Ausbildung der Diffusionsschicht in ruhenden Lösungen

Abb. 28 (Seite 44) zeigt die Auswirkung der Ausbildung der Diffusionsschicht auf den Strom in ruhenden Lösungen. Zur Ausbildung der elektrochemischen Doppelschicht erfolgte die Messung (rote Kennlinie) zuerst in reinem Phosphatpuffer (ohne H_2O_2 , Grundstrom), worauf nach ca. 150 s eine $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 -Lösung vermessen wurde. Diese Konzentration verursachte in diesem Versuch einen Strom von ca. 42 nA, der jedoch für verschiedene Versuche variieren kann. Der messbare Strom ist im Allgemeinen abhängig vom Einlaufzustand der Sensoren, der Analytkonzentration, der Temperatur, Variationen zwischen den Sensoren, der Flussrate und dem Vorhandensein verschiedener Verunreinigungen (die einzelnen Faktoren werden im Laufe der Diskussion noch genauer behandelt).

Nach 300 s wurde die Pumpe abgeschaltet, wodurch ein eindeutiger Signalabfall zu sehen ist. Bedingt durch die Ausbreitung der Diffusionsschicht in die Messlösung hinein (in konstant bewegter Lösung bleibt die Diffusionsschicht konstant, sodass ein konstanter Strom gemessen werden kann) werden der Konzentrationsgradient über diese Schicht und damit auch der Strom immer kleiner. Dieser Signalabfall wurde auch durch die Cottrell – Gleichung simuliert (blaue Kennlinie), die diesen Stromabfall beschreibt. Es ist eine sehr gute Übereinstimmung der beiden Kennlinien im Anfangsbereich zu erkennen. Mit zunehmender

Zeit wird der Unterschied zwischen den beiden Kurven größer. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass der für die Simulation verwendete Diffusionskoeffizient von H_2O_2 für eine Temperatur von 25 °C gegeben ist, die Messung jedoch bei einer Temperatur von $22,3\text{ °C}$ durchgeführt wurde. Durch die geringere Temperatur bei der Messung werden der Diffusionskoeffizient und dadurch auch der Strom geringer. Weiters spielen geringe Ungenauigkeiten in der Fläche A der aktiven Elektrodenoberfläche durch Variationen im Herstellungsprozess (für die Simulation wurde für die aktive Elektrodenoberfläche 25% (Braunsteinanteil) der Gesamtoberfläche verwendet) und geringe Pipettierfehler (Konzentration C_0) eine Rolle.

Aus der Elektrodenreaktion (Gl. 4, Seite 10) kann entnommen werden, dass pro H_2O_2 -Molekül 2 Elektronen an die Arbeitselektrode abgegeben werden, was zu einem Verbrauch des Analyten während der Messung führt. In einem fließenden System wie der verwendeten Flusszelle kann der Einfluss des Analytverbrauchs auf den Signalabfall vernachlässigt werden, da ständig eine frische Lösung zum Sensor gepumpt wird. Verwendet man hingegen ein ruhendes System, kann dieser Analytverbrauch auch eine Rolle für den beobachteten Signalabfall spielen. Auch dies könnte der Grund für einen höheren Abfall in der Messung im Vergleich zur Simulation sein. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, kann zur Berechnung des Analytverbrauchs das Faraday'sche Gesetz (Gl. 20, Seite 80) herangezogen werden (Berechnung siehe Anhang). Die Ergebnisse zeigen, dass nur ca. 4% des Analyten innerhalb von 200 s verbraucht werden. Diese Berechnung unterliegt einem linearen Modell. Für eine genauere Berechnung müsste ein nichtlineares Modell herangezogen werden, da mit der Zeit durch die Umsetzung des Analyten auch der Strom geringer wird und somit auch der Strom einen zeitabhängigen Parameter darstellt. Durch diese Berücksichtigung würde der Analytverbrauch allerdings noch geringer werden. Durch das nicht abgeschlossene System der Flusszelle müsste weiters die Diffusion des Analyten berücksichtigt werden, die durch die Zu- und Abflussrohre der Messzelle erfolgt.

Durch die Messung in ruhenden Lösungen wäre nach Mischung der MPO mit ihren Substraten die Enzymkinetik direkt messbar. Der Abfall durch die Ausbildung der Diffusionsschicht ist jedoch sehr dominant, sodass eine Beurteilung des Abfalls, der durch den Substratumsatz des Enzyms entsteht, schwierig wäre. Dieser Versuch demonstriert die Notwendigkeit einer fließenden Lösung für die Messung der Enzymaktivität.

Zusammenhang zwischen H_2O_2 -Konzentration und gemessenem Strom (Sensorkennlinie)

In Abb. 29 (Seite 44) ist das Ergebnis einer Konzentrationsreihe von 1 μM bis 125 mM zu sehen. Schön zu erkennen ist, dass mit höher werdenden Konzentrationen auch das Messsignal immer höher wird. Um die Proportionalität zwischen H_2O_2 -Konzentration und gemessenem Strom zu überprüfen, wurde in Abb. 30 (Seite 45) eine Sensorkennlinie erstellt. Für die Auswertung wurden die jeweiligen Grundströme (Ströme bei der Messung des Phosphatpuffers zwischen den einzelnen Peaks, werden in der Literatur auch als „Nullströme“ bezeichnet) vernachlässigt, sodass nur der Strom, der durch das H_2O_2 verursacht wird, berücksichtigt wird. Geringe Grundströme sind immer messbar und vor allem bei höheren Polarisationsspannungen von Bedeutung. Sie werden durch Verunreinigungen und andere Seitenreaktionen hervorgerufen [4]. Diese Grundströme liegen gewöhnlich im nA-Bereich und sind bei höheren Strömen vernachlässigbar, haben aber bei niedrigeren Strömen einen größeren relativen Einfluss und wurden daher für diese Auswertung nicht berücksichtigt (da in diesem Versuch bis zu einer relativ geringen Konzentration von 1 μM gemessen wurde).

Es ist ein linear proportionaler Zusammenhang zu sehen, sodass aus einer Stromänderung (für die Berechnung der Enzymaktivität) leicht eine Konzentrationsänderung berechnet werden kann. Aus dieser Konzentrationsänderung kann die Enzymaktivität bestimmt werden. Die (sehr geringen) Abweichungen der Messdaten (rot dargestellt) von einer idealen Geraden (blau dargestellt) sind auf Ungenauigkeiten beim Pipettieren und auf Rundungsfehler bei der Herstellung der Konzentrationsreihe zurückzuführen (jeweils Konzentrationshalbierung ausgehend von 125 μM , siehe Tabelle 2, Seite 45).

Ansprechzeiten und Detektionslimit der Sensoren

Aus Abb. 31 (Seite 46, Ausschnitt aus Abb. 29) ist zu entnehmen, dass die Ansprechzeiten des Sensors mit 25 s in einem akzeptablen Bereich liegen. Auffallend ist, dass die Ansprechzeiten für verschiedene Konzentrationen gleich sind (dies gilt auch für geringere Konzentrationen, sodass die Ansprechzeiten im gemessenen Konzentrationsbereich weitgehend unabhängig vom Konzentrationssprung sind). In Wirklichkeit ist die Ansprechzeit noch geringer, weil diese 25 s nicht nur die Ansprechzeit des Sensors, sondern auch die benötigte Zeit für den Lösungsaustausch innerhalb der Messzelle beinhaltet.

Abb. 32 (Seite 46) zeigt ein ungeglättetes Signal (Ausschnitt aus Abb. 29) zur Bestimmung des Detektionslimits. Hier ist der Einfluss des Pumpenrauschens deutlich sichtbar. Der gemessene Strom bei $1 \mu\text{M}$ ($0,41 \text{ nA}$, Tabelle 2, Seite 45) liegt deutlich über der 3-fachen Standardabweichung des Grundstromes ($0,06 \text{ nA}$). Das Detektionslimit für diesen Sensor liegt somit unterhalb der (schon sehr geringen) Konzentration von $1 \mu\text{M}$. Leider wurden keine geringeren Konzentrationen gemessen (andere Sensoren konnten $1 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ gerade nicht mehr detektieren), womit das Detektionslimit für diesen Sensor nicht eindeutig festgelegt ist. Zusammenfassend kann jedoch gesagt werden, dass das Detektionslimit dieser Sensoren bei ca. $1 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ liegt.

Wiederholpräzision und Vergleichspräzision des Sensorsignales

Zur Überprüfung der Wiederholpräzision (Abb. 33, Seite 47) wurden mit einem lang eingelaufenen Sensor 10 Messungen in Serie mit einer $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ -Lösung durchgeführt. Die Datenauswertung erfolgte, wie in 2.5.7 beschrieben, mit dem Sigmoidmodell. Zunächst erfolgte die Ausbildung der elektrochemischen Doppelschicht wieder in Phosphatpuffer, der nach einer bestimmten Zeit durch die Messlösung ersetzt wurde. Die einzelnen Messungen zeigen sehr ähnliche Verläufe, die geringen Unterschiede sind auf mehrere Faktoren zurückzuführen (Einlaufstatus des Sensors, Temperatur, Zersetzung von H_2O_2). Auffallend ist, dass die Messung bei höchster Temperatur (blaue Kennlinie) das kleinste Signal liefert, während eine ähnlich hohe Temperatur (rote Kennlinie) ein relativ hohes Signal liefert. Geringere Temperaturen liefern ähnliche Signale, ein Trend mit der Temperatur ist nicht zu erkennen (die Abhängigkeit des Signales von der Temperatur wird im folgenden Abschnitt untersucht). Da mit fortlaufenden Messungen das Signal eher einen Trend nach oben zeigt, hat der Einlaufstatus des Sensors den größten Einfluss auf die geringen Signalunterschiede, die spontane Zersetzung des H_2O_2 kann demnach auch vernachlässigt werden. Die Messungen ergaben einen Mittelwert von 86 nA und eine sehr geringe Standardabweichung von 1 nA , woraus geschlossen werden kann, dass die Sensoren für mehrere Messungen sehr ähnliche Ergebnisse liefern (relativ geringer Variationskoeffizient von $1,2 \%$).

Die Auswertung der Vergleichspräzision (Abb. 34, Seite 47) ergab einen Mittelwert und eine Standardabweichung von $(19,13 \pm 3,33) \text{ nA}$. Der Mittelwert liegt deutlich unter dem der Wiederholpräzisionsmessung, was darauf zurückzuführen ist, dass alle Sensoren für die Messungen frisch eingesetzt wurden (da dieser Versuch auf die Messung mit verschiedenen

Sensoren beruht) und somit ein Einlauf der Sensoren fehlte. Ein längeres Einlaufen war hier jedoch nicht möglich, da mit zunehmender Zeit die Reproduzierbarkeit der Messlösung durch die spontane Zersetzung des H_2O_2 nicht mehr gegeben ist. Der höhere Variationskoeffizient von 17,4 % ergibt sich aus der Variation im Herstellungsprozess und dem fehlenden Einlauf, sodass jeder Sensor unterschiedliche Ströme liefert. Die relative starken Driften nach oben innerhalb von 200 s (Messbereich 400 – 600 s) weisen auch auf eine fehlende Einlaufphase hin (auf Grund der Modellauswertung nicht ersichtlich, siehe Abb. 47 im Anhang). Ein längeres Einlaufen würde den Mittelwert erhöhen und die Standardabweichung und den Variationskoeffizienten verringern.

Drift des Sensorsignales

In Abb. 35 (Seite 48) ist ein Signal-Profil zu sehen, dass durch die Messung einer $100 \mu\text{M}$ – H_2O_2 – Lösung über 13 Stunden entstand. Dafür wurde ein Sensor verwendet, mit dem zuvor sehr viele Messungen durchgeführt wurden („lang eingelaufener Sensor“), um das Aktivwerden von Braunsteinschichten und damit einen Signalanstieg auszuschließen. Dieser hätte einen entscheidenden Einfluss auf die Drift des Sensorsignales. Zu sehen ist ein Signalabfall über die Zeit, der durch verschiedene Effekte verursacht wird. Unter Anderem fällt der Strom durch einen Abfall der Temperatur, da der Strom diffusionskontrolliert und jeder Diffusionskoeffizient temperaturabhängig ist. Mit fallender Temperatur sinkt die Brownsche Bewegung der Analytmoleküle, wodurch auch deren Diffusion zur Arbeitselektrode verringert wird. Dabei muss erwähnt werden, dass durch die Temperaturmessung nur die Raumtemperatur, nicht jedoch die tatsächliche Temperatur in der Messzelle bekannt ist. Ein weiterer Grund für den Signalabfall ist die Instabilität von H_2O_2 , die durch die spontane Zersetzung von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser verursacht wird [76]:



Diese Zersetzung gewinnt vor allem durch die lange Messzeit von über 13 Stunden an Bedeutung und muss daher berücksichtigt werden. Dieser Effekt wurde bei längerer Verwendung (ca. 1 Tag) einer H_2O_2 – Lösung durch Gasblasen (Sauerstoff) an den Rändern des Reaktionsgefäßes sichtbar. Zusätzlich können Instabilitäten des Potentials der Referenzelektrode, die durch Änderungen der Ionenkonzentration oder durch Verunreinigungen, die mit der Zeit an der Elektrodenoberfläche entstehen, Gründe für ein

Driftverhalten sein [4]. Durch das ständige Quetschen des Pumpschlauches der Peristaltikpumpe verliert dieser an Elastizität, sodass auch die Flussgeschwindigkeit und damit die Dicke der Diffusionsschicht vor allem über die lange Messzeit geringfügig variieren können. Bereits geringe Variationen in der Flussgeschwindigkeit können einen Einfluss auf das Signal haben. Da die Dicke der Diffusionsschicht einen entscheidenden Einfluss auf den Strom (Konzentrationsgradient) hat, könnte auch das ein möglicher Grund für eine Drift sein. Bei der Verwendung von Peristaltikpumpen sollte daher der Schlauch regelmäßig gewechselt werden. Durch die relativ lange Messung wird durch die Elektrodenreaktion (Gl. 4, Seite 10) ständig O_2 gebildet, das sich in Form einer Gasblase auf der Arbeitselektrode sammelt. Somit wird die aktive Oberfläche verringert (Strom wird kleiner), sodass auch dieser Effekt einen Einfluss auf eine Drift nach unten hat.

Das Signal fällt zu Beginn etwas stärker ab, da hier auch der Temperaturabfall etwas höher ist. Es folgt ein Bereich einer geringeren Temperaturänderung, sodass auch der Signalabfall etwas schwächer wird. In diesem Bereich (um 30000 s) bleibt die Temperatur in etwa konstant. In der mittleren Spalte der Abbildung 35 ist ein Teil dieses Bereiches dargestellt, in dem der Signalabfall wegen der konstanten Temperatur hauptsächlich durch die zuvor genannten Gründe verursacht wird. Natürlich muss dabei die Auflösung des Temperaturloggers von $0,3\text{ °C}$ berücksichtigt werden. Da sich die Temperatur jedoch in einem relativ großen Bereich von über 15000 s nur um maximal $\pm 0,15\text{ °C}$ ändert, kann sie innerhalb einer kleineren Zeitspanne von 2000 s annähernd als konstant betrachtet werden. Ohne Einfluss der Temperatur ergibt sich über eine Messzeit von 15 min ein Abfall des Stromes um $0,72\text{ nA}$, während ein Temperaturabfall um 1 °C innerhalb dieser Zeit einen Stromabfall von $2,22\text{ nA}$ verursacht. Bei der Berechnung dieser Werte wurde ein linearer Signalabfall (rot markiert in Abb. 35) verwendet, wobei die Originaldaten einen leicht nichtlinearen Abfall zeigen (vor allem in der rechten Spalte von Abb. 35, wo die Temperatur berücksichtigt wird). Allerdings zeigt auch die Temperatur einen ähnlichen nichtlinearen Abfall, sodass dieses Modell als Annäherung für eine grobe Abschätzung des Temperatureinflusses auf die Drift des Stromsignales verwendet werden kann. Der Temperaturabfall am Ende der Messung wurde durch das Öffnen eines Fensters bewusst hervorgerufen, wobei ein eindeutiger Unterschied im Signalabfall zu sehen ist. Berücksichtigt man beide Effekte, wird bei einem Temperaturabfall innerhalb von 15 min (Messzeit einer

Wundprobe) ein Signalabfall von ca. 3 nA verursacht. Steigt die Temperatur, so sind die beiden Effekte gegenläufig und die Drift wird noch geringer.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei einem gemessenen Strom von über 100 nA über 15 min ein Signalabfall um 3 nA vernachlässigt werden kann. Der Signalabfall von 3 nA erstreckt sich über die gesamte Messzeit von 15 min, wodurch durch die Modellbildung zur Signalauswertung der Einfluss noch geringer wird, da kein abrupter Sprung um 3 nA vorliegt. Die Messzeit könnte eventuell verringert werden, da die Plateaus bereits nach kurzer Zeit stabile Werte aufweisen (Abbildungen 40-42, Seite 52). Durch die verkürzte Messzeit würde der Einfluss der Drift noch geringer werden, es sollte aber trotzdem darauf geachtet werden, dass das Messsystem während der Messzeit keinen unnötig hohen Temperatursprüngen ausgesetzt wird. Es kann davon ausgegangen werden, dass während der Messung einer Wundprobe (15 min, siehe Abbildungen 40 - 42) keine signifikanten Temperaturänderungen auftreten (bei der Entwicklung eines Messgerätes könnte dies durch eine thermostatisierte Messkammer gewährleistet werden). Temperaturunterschiede zwischen einzelnen Messungen haben einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Signalauswertung, da der relative Signalverlust unabhängig von der Höhe des Stromes ist (siehe nächster Abschnitt).

Zusätzlich zum Temperatureinfluss auf das Sensorsignal muss natürlich auch der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der MPO berücksichtigt werden. Im Gegensatz zu vielen anderen Enzymen, die eine starke Temperaturabhängigkeit aufweisen, haben Temperaturänderungen (vor allem im Bereich der Raumtemperatur) keinen Einfluss auf die Aktivität der MPO, die eine hohe Temperaturstabilität aufweist [29].

4.4.3. Amperometrische Messungen mit MPO

Wiederholpräzision und Vergleichspräzision des relativen Signalverlustes

Abb. 36 (Seite 49) zeigt die Wiederholpräzision des relativen Signalverlustes, der für die gleiche Enzymaktivität mit einem Mittelwert und einer Standardabweichung von $(32,4 \pm 0,8)$ % sehr konstant ist. Es ist ein geringer Anstieg des relativen Signalverlustes mit den Messungen zu erkennen. Ein möglicher Grund dafür wäre die Tatsache, dass die MPO dazu neigt, an den Wänden des Pumpsystems hängen zu bleiben [34] und dadurch einen Einfluss auf die folgende Messung auszuüben. Aus diesem Grund wurde nach jeder Messung das System mit einer erhöhten Geschwindigkeit und einer NaCl-Lösung gespült (Cl^- ist ein Ligand

der MPO). Obwohl die oberen Plateauströme der Messungen 5 und 6 deutlich geringer sind (auf Grund eines Problems mit dem Potentiostaten musste die Messung für längere Zeit unterbrochen werden, sodass der lange Einlaufstatus nicht mehr gegeben war), ist der relative Signalverlust (im Gegensatz zum absoluten Signalverlust) mit einem Variationskoeffizienten von 2,4 % relativ konstant. Dies demonstriert die Eignung des relativen Signalverlustes als Parameter zur Bestimmung der Enzymaktivität und in weiterer Folge zur Charakterisierung von Wundinfektionen.

Die Vergleichspräzision des relativen Signalverlustes zeigt mit $(14,2 \pm 1,6) \%$ und einem Variationskoeffizienten von 11,3 % etwas höhere Abweichungen für 6 verschiedene Sensoren (Abbildung 37, Seite 50) im Vergleich zur Wiederholpräzision für einen einzigen Sensor. Der geringere Mittelwert des relativen Signalverlustes ist auf die Messung einer geringeren Enzymaktivität zurückzuführen. Auffallend ist auch das geringere Pumpenrauschen, das, wie bereits erklärt, im niedrigeren Strombereich absolut betrachtet eine geringere Auswirkung hat. Die geringen Ströme sind auch hier wieder auf das Einsetzen frischer Sensoren zurückzuführen. Dabei ist auch erkennbar, dass verschiedene Sensoren bei der ersten Messung unterschiedlich lange brauchen, um ein konstantes Signal zu erhalten (Sensor 1 zeigt einen deutlich längeren Abfall als die anderen 5 Sensoren nach Start der Messung). Der Grund dafür liegt auch hier wieder in den Variationen des Herstellungsprozesses. Dieser längere Signalabfall hat Auswirkungen auf das Auswertemodell, da dadurch höhere Werte zu Beginn für die Modellbildung berücksichtigt werden, woraus sich ein etwas höherer Signalabfall ergibt. Bei den Sensoren 2-4 wirken sich die geringen Driften nach oben umgekehrt auf die Modellbildung aus, sodass sich etwas geringere Signalabfälle ergeben. Diese Einflüsse auf die Modellauswertung verursachen einen etwas höheren Variationskoeffizienten von 11,3 %, der jedoch hauptsächlich auf die zu kurze Einlaufphase der Sensoren zurückzuführen ist (unterschiedlich starke Drifts zu Beginn der Messungen für die 6 verschiedenen Sensoren). Wird eine Messung gestartet, ohne dass zuvor längere Messungen („Sensoreinlauf“) mit dem gleichen Sensor durchgeführt wurden, sollte daher ein Sensoreinlauf durch eine Messung mit der vorgesehenen H_2O_2 -Konzentration über mehrere Stunden durchgeführt werden. Dies führt zu höheren, stabileren Signalen und würde auch in diesem Fall den Variationskoeffizienten senken. Insgesamt kann gesagt werden, dass auch nach einem möglichen Wechsel des Sensors ähnliche Ergebnisse erzielt werden und somit keine Kalibration notwendig wäre.

Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und relativem Signalverlust

Bei der Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Enzymaktivität und relativem Signalverlust kann man feststellen, dass der relative Signalverlust mit steigender Enzymaktivität zwar größer wird (Abb. 38, Seite 50), der Zusammenhang aber nichtlinear ist (Abb. 39, Seite 51). Diese Nichtlinearität ist darauf zurückzuführen, dass innerhalb der Reaktionszeit von 30 Sekunden höhere Enzymaktivitäten in den ersten Sekunden durch die höhere Umsatzrate mehr vom Substrat umsetzten. Dadurch ist für die restliche Reaktionszeit weniger Substrat vorhanden, was zu einer geringeren Umsatzrate führt (weniger Enzym-Substrat-Komplexe, mehr freies Enzym). Ein weiteres Indiz für diese Überlegungen ist der annähernd lineare Zusammenhang für kleinere Aktivitäten (ersten 4 Punkte in Abb. 39), sodass bedingt durch die geringen Aktivitäten so wenig Substrat umgesetzt wird, dass während der gesamten Reaktionszeit von 30 s annähernd alle Enzyme als Enzym-Substrat-Komplex vorliegen. Diese Zusammenhänge werden durch die Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben, sodass diese Gleichung (Gl. 9, Seite 33) als Modellfunktion für die Auswertung verwendet wurde. Statt der Reaktionsgeschwindigkeit in der Michaelis-Menten-Gleichung wird hier der zur Reaktionsgeschwindigkeit proportionale relative Signalverlust, und statt der Substratkonzentration die Enzymaktivität verwendet (die Substratkonzentration bleibt konstant). Es ist ein ähnliches Sättigungsverhalten erkennbar, wobei für eine vollständige Beschreibung des Sättigungsverhaltens zu wenige Datenpunkte (oberhalb von 3 U/ml) aufgenommen wurden. Dies wird auch durch die vom Modell berechneten Parameter SV_{\max} und K_a demonstriert. Da zu wenige Datenpunkte aufgenommen wurden, übersteigt SV_{\max} mit 124,57 % den theoretisch maximalen Wert von 100 %. K_a liegt bei 2,03 U/ml und beschreibt damit mit ca. 60 % Signalverlust die Hälfte von SV_{\max} .

Würde man eine höhere H_2O_2 -Konzentration verwenden, würde sich dieses Verhalten für die gleichen Enzymaktivitäten einer linearen Proportionalität nähern, da relativ gesehen weniger Substrat während der Reaktionszeit umgesetzt wird und die Enzym-Substrat-Komplexe somit über eine längere Zeit in einer höheren Anzahl vorhanden sind. Höhere H_2O_2 -Konzentrationen als 100 μ M waren jedoch nicht angebracht, da diese die MPO irreversibel inaktivieren [77]. Ein lineares Verhalten könnte auch durch eine Verkürzung der Reaktionszeit erreicht werden, allerdings würde dadurch auch ein Aktivitätsunterschied (vor allem im wichtigen unteren Aktivitätsbereich) mit geringerer Sensitivität erkannt werden.

Die Nichtlinearität bzw. Abflachung der Kurve im oberen Bereich führt dazu, dass unterschiedlich stark infizierte Wunden (fortgeschrittener Infektionsstatus, hohe Enzymaktivität) nur durch einen geringen Unterschied im relativen Signalverlust erkennbar sind. Dies spielt jedoch eine untergeordnete Rolle, da ab einer gewissen Aktivität die Wunde ohnehin als infiziert einzustufen ist (siehe Schlussfolgerungen). Wichtig ist eine hohe Sensitivität im unteren Aktivitätsbereich, sodass der Beginn einer Infektion sensibel und zuverlässig erkannt werden kann.

Messung mit realen Wundproben und Schlussfolgerungen

Vergleicht man die beiden Abbildungen 40 und 41 (Seite 52), erkennt man einen deutlichen Unterschied zwischen gut heilenden und kritischen Wundproben. Die gut heilenden Wunden zeigen einen relativ geringen Signalverlust, während kritische Wunden auf Grund der höheren Enzymaktivität einen höheren Signalverlust verursachen. Dabei ist zu erwähnen, dass keine Wunde absolut keimfrei ist und somit auch in gut heilenden Wunden eine gewisse Menge an MPO vorhanden ist, was zu diesen geringen Signalverlusten führt. Auffallend ist der, im Vergleich zu allen anderen Wundproben, relativ schnelle Signalabfall bei Wundprobe 1 (Abb. 40, Seite 52). Eventuell wurde beim Verdünnen der Wundprobe keine isotonische NaCl – Lösung verwendet (sondern z.B. Wasser), sodass das System beim Wechsel zur Wundprobe einem Cl^- - Konzentrationssprung ausgesetzt ist, der einen kurzen kapazitiven Stromfluss zur Folge hat.

In beiden Abbildungen gibt es einen „Ausreißer“: Wundprobe 4 zeigt als „gut heilend“ eingestufte Wunde einen etwas höheren Abfall als Wundprobe 9, die als „kritisch“ eingestuft wurde. Wie einleitend bereits erwähnt, stellt die optische Beurteilung einer Wunde bezüglich einer Infektion eine große Herausforderung dar, da nicht immer alle Anzeichen einer Infektion in gleicher Weise vorliegen. Diese könnte der Grund für eine falsche bzw. ungenaue Beurteilung einer dieser Wunden bzw. beider Wunden sein. Natürlich muss auch berücksichtigt werden, dass das Immunsystem von verschiedenen Patienten unterschiedlich stark ausgeprägt ist und somit eine etwas erhöhte bakterielle Last in einer Wunde keine Infektion zur Folge hat, während in einer anderen Wunde die gleiche (oder sogar eine etwas geringere) bakterielle Last zu einer Infektion führt. Auch dies könnte der Grund für diese Abweichung sein. Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion ist jedoch erhöht, wenn eine erhöhte bakterielle Last in der Wunde vorliegt. In der Literatur wird sogar ein quantitatives

Maß für Keime festgelegt, sodass ab einer Menge von 100000 Keimen pro Gramm Gewebe von einer Infektion gesprochen wird [3]. Von den uncharakterisierten Wundproben (Abb. 42, Seite 53) wurden vom entwickelten System fünf als „gut heilend“ und eine als „kritisch“ eingestuft. Die beiden Brandblasen (Wundprobe 13 und 14) weisen sehr geringe MPO-Aktivitäten auf, was in guter Übereinstimmung mit den Beschreibungen in [39] ist.

Im Allgemeinen ist es vorteilhaft, eine erhöhte bakterielle Last auch ohne klinische Anzeichen einer Infektion frühzeitig zu erkennen und somit einen frühzeitigen Eingriff zu ermöglichen, um die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Wundinfektion zu senken. Da eine erhöhte bakterielle Last optisch nicht immer sichtbar ist (bzw. erst dann, wenn eine Infektion ausgebrochen ist), und anderen Methoden der Wundinfektionsdiagnostik teurer sind bzw. erst nach langer Zeit Ergebnisse liefern, die dann noch eine hohe diagnostische Fehlerquote aufweisen, wird die Bedeutung und die Notwendigkeit dieses Systems unterstrichen. Die Ergebnisse liegen dabei innerhalb von 15 min vor, wobei diese Zeit durch weitere Verbesserungen (Verkürzung der Plateauphasen vor und nach dem Signalabfall in den Abbildungen 40 – 42) noch verkürzt werden könnte. Mit der eingestellten Pumprate von 10 µl/min und einer Messzeit von 15 min werden 150 µl Probe für eine Messung benötigt. Durch die anschließende 1:10 – Verdünnung in einer isotonischen NaCl – Lösung werden nur 15 µl reine Wundflüssigkeit benötigt, was aus jeder Wunde leicht gewonnen werden kann.

Für die Berechnung der Enzymaktivität kann der lineare Zusammenhang zwischen H_2O_2 -Konzentration und gemessenem Strom (Abb. 30, Seite 45) ausgenutzt werden. Da der Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und relativem Signalverlust auf Grund des Sättigungsverhaltens nichtlinear ist (Abb. 39, Seite 51), werden die höheren Enzymaktivitäten bei der Berechnung etwas unterschätzt. In Wirklichkeit sind diese Aktivitäten etwas erhöht, es konnten jedoch, wie bereits erwähnt, weder die Reaktionszeit verkürzt (Verlust an Sensitivität), noch die H_2O_2 -Konzentration erhöht (Irreversible Inaktivierung der MPO [34]) werden, um sich einem linearen Verhalten anzunähern. Trotzdem ist dieses System ausreichend, um eine Bewertung bezüglich einer Wundinfektion vorzunehmen, da erhöhte Aktivitäten ohnehin als infiziert eingestuft werden (oberhalb 3,8 U/ml). Hier muss ein hoher Aktivitätsunterschied nicht mehr sensibel erkannt werden, wohingegen ein Aktivitätsunterschied im unteren Aktivitätsbereich von entscheidender Bedeutung für die Erkennung des Beginns einer Wundinfektion ist.

Die Signalauswertung wird in Abb. 43 (Seite 51) an Hand der Wundprobe 6 (gut heilend) visualisiert. Leider waren keine Wundproben verfügbar, die explizit als „infiziert“ durch den behandelnden Arzt / die behandelnde Ärztin eingestuft wurden. Es wurde jedoch bereits gezeigt, dass die Menge an MPO in infizierten Wunden gegenüber akuten, gut heilenden Wunden deutlich erhöht ist [39], [43]. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Enzymaktivitäten in stark infizierten Wunden noch höher sind und noch höhere Signalverluste hervorrufen. Auf Grund dieser Überlegungen und der Ergebnisse in Tabelle 4 (Seite 54) wurden die Grenzen für die Einstufung der Wundproben festgelegt. Von den 12 Wundproben, die eine ärztliche Beurteilung besitzen, wurden 10 Wundproben durch das System gleich bewertet (83,3 % Übereinstimmung, siehe Tabelle 4, Seite 55). Die restlichen 2 Wundproben könnten durch Gründe, die bereits erwähnt wurden, falsch eingestuft worden sein. Natürlich ist das Ergebnis durch die geringe Anzahl an Wundproben (12) mit ärztlicher Beurteilung nicht sehr aussagekräftig, dies könnte durch eine zukünftige klinische Studie mit einer größeren Anzahl an Wundproben verbessert werden. Trotzdem ist ein eindeutiger Aktivitätsunterschied zwischen gut heilenden ($0,72 \pm 0,46$ U/ml) und kritischen ($3,19 \pm 1,01$ U/ml) Wunden in Abb. 44 (Seite 55) erkennbar. Demnach ist die MPO-Aktivität in kritischen Wunden gegenüber gut heilenden Wunden im Mittel um mehr als das 4-fache erhöht.

Abschließend kann gesagt werden, dass das Ziel der Masterarbeit mit diesen Ergebnissen erreicht wurde. Die Ergebnisse demonstrieren, dass dieses System durchaus für die frühzeitige Erkennung von Wundinfektionen geeignet wäre und stellen die Grundlage für eine weitere klinische Studie und gegebenenfalls die Entwicklung eines Gerätes zur frühzeitigen Detektion von Wundinfektionen dar.

5. Literatur

- [1] T. Dörner, J. Feldkamp, J. Kunze, and R. Pfitzmann: *Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch*. Berlin - New York, Walter de Gruyter Verlag, 2004.
- [2] W. Hörl and C. Wanner: *Dialyseverfahren in Klinik und Praxis*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2003.
- [3] J. E. Grey and K. Harding: *Ärztliche Wundversorgung Das ABC der Wundheilung*. München - Jena, Urban & Fischer Verlag, 2008.
- [4] I. Helm, L. Jalukse, and I. Leito: Measurement Uncertainty Estimation in Amperometric Sensors: A tutorial Review. *Sensors* 10(5): 4430–55, Jan. 2010.
- [5] R. Klischies, U. Panther, and V. Singbeil-Grischkat: *Hygiene und medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart - New York, Schattauer Verlag, 2004.
- [6] U. Gerlach, H. Wagner, and W. Wirth: *Innere Medizin für Pflegeberufe*. Stuttgart - New York, Georg Thieme Verlag, 2006.
- [7] H. Lippert: *Wundatlas, Kompendium der komplexen Wundbehandlung*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2006.
- [8] A. Hasmann: *Diagnostic system for detection of wound infection based on novel immobilized enzyme substrates*, Institut für Umweltbiotechnologie - Technische Universität Graz, Dissertation, 2010.
- [9] T. Wild and T. Eberlein: *Neues von der Silbertherapie*, Medizinische Privatuniversität Paracelsus, Salzburg, 2009.
- [10] D. J. Leaper, H. van Goor, J. Reilly, N. Petrosillo, H. K. Geiss, A. J. Torres, and A. Berger: Surgical site infection - a European perspective of incidence and economic burden. *International Wound Journal* 1(4): 247–73, Dec. 2004.
- [11] S. Danzer: *Chronische Wunden - Beurteilung und Behandlung*. Stuttgart, Kohlhammer Verlag, 2009.
- [12] K.-H. Busch and P. M. Vogt: Chronische infizierte Wunde - Grenzen der konservativen Behandlung. *Trauma und Berufskrankheit* 12(1): 19–24, Jan. 2010.
- [13] R. Girard, M. Perraud, A. Prüss, A. Savey, E. Tikhomirov, M. Thuriaux, and P. Vanhems: *Prevention of hospital-acquired infections: a practical guide*. World Health Organisation, 2002.
- [14] A. R. Siddiqui and J. M. Bernstein: Chronic wound infection: facts and controversies. *Clinics in Dermatology* 28(5): 519–26, 2010.
- [15] H.-P. Bruch and O. Trentz: *Chirurgie*. München, Urban & Fischer Verlag, 2008.

- [16] A. Hasmann, E. Wehrsuetz-Sigl, G. Kanzler, U. Gewessler, E. Hulla, K. P. Schneider, B. Binder, M. Schintler, and G. M. Guebitz: Novel peptidoglycan-based diagnostic devices for detection of wound infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 71(1): 12–23, Sep. 2011.
- [17] M. Bühler, E. Engelhardt, and H. Schmidt: *Septische postoperative Komplikationen - Atlas für Unfallchirurgen und Orthopäden*. Wien - New York, Springer Verlag, 2003.
- [18] F. Niehoff: *Diagnostische Wertigkeit der Wundsekretanalyse bei orthopädischen Wundinfektionen*, Klinik und Poliklinik für Allgemeine Orthopädie - Universitätsklinikum Münster, Dissertation, 2007.
- [19] I. Blank: *Wundversorgung und Verbandwechsel*. Stuttgart, Kohlhammer Verlag, 2007.
- [20] W. Linß and J. Fanghänel: *Histologie*. Berlin - New York, Walter de Gruyter Verlag, 1998.
- [21] M. Gerecitano-Schmidek: *Transport der Myeloperoxidase in die azurophilen Granula von HL-60 Zellen*, Institut für physiologische Chemie - Phillips-Universität Marburg, Dissertation, 2008.
- [22] C. Zalpour: *Anatomie Physiologie*. München - Jena, Urban & Fischer Verlag, 2002.
- [23] V. Witko-Sarsat, P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli: Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Laboratory Investigation* 80(5): 617–53, 2000.
- [24] M. B. Hampton, a J. Kettle, and C. C. Winterbourn: Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92(9): 3007–17, Nov. 1998.
- [25] J. Smith: Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *Journal of Leukocyte Biology* 56(6): 672–86, 1994.
- [26] H. Rosen: Human Neutrophils Use the Myeloperoxidase-Hydrogen Peroxide-Chloride System to Chlorinate but Not Nitrate Bacterial Proteins during Phagocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 277(34): 30463–30468, Jun. 2002.
- [27] M. Blair-Johnson, T. Fiedler, and R. Fenna: Human Myeloperoxidase: Structure of a Cyanide Complex and Its Interaction with Bromide and Thiocyanate Substrates at 1,9Å Solution. *Biochemistry* 40(46): 13990–13997, 2001.
- [28] P. E. Petrides and W. M. Nauseef: *The Peroxidase Multigene Family of Enzymes*. Berlin - Heidelberg - New York, Springer Verlag, 2000.
- [29] S. Banerjee, J. Stampller, P. G. Furtmüller, and C. Obinger: Conformational and thermal stability of mature dimeric human myeloperoxidase and a recombinant monomeric form from CHO cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1814(2): 375–87, Feb. 2011.

- [30] W. Siems, A. Bremer, and J. Przyklenk: *Allgemeine Krankheitslehre für Physiotherapeuten*. Heidelberg, Springer Verlag, 2009.
- [31] B. M. Babior: Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine* 109(1): 33–44, Jul. 2000.
- [32] S. J. Klebanoff: Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology* 77(5): 598–625, 2005.
- [33] A. Kettle and C. C. Winterbourn: A kinetic analysis of the catalase activity of myeloperoxidase. *Biochemistry* 40(34): 10204–10212, 2001.
- [34] A. Kettle and C. C. Winterbourn: Assays for the Chlorination Activity of Myeloperoxidase. *Methods In Enzymology* 233(53): 502–12, 1994.
- [35] D. C. Dale, L. Boxer, and W. C. Liles: The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112(4): 935–45, Aug. 2008.
- [36] M. Ferencík, J. Rovensky, V. Mat’ha, and M. Herold: *Kompendium der Immunologie - Grundlagen und Klinik*. Wien - New York, Springer Verlag, 2006.
- [37] Y. W. Yap, M. Whiteman, and N. S. Cheung: Chlorinative stress: An under appreciated mediator of neurodegeneration? *Cellular Signalling* 19(2): 219–28, Feb. 2007.
- [38] P. G. Furtmüller, C. Obinger, Y. Hsuanyu, and H. B. Dunford: Mechanism of reaction of myeloperoxidase with hydrogen peroxide and chloride ion. *European Journal of Biochemistry* 267(19): 5858–64, Oct. 2000.
- [39] A. Hasmann, A. Marold, H. Wiesbauer, R. Schoeftner, U. Gewessler, A. Kandelbauer, D. Schiffer, K. P. Schneider, B. Binder, M. Schintler, and G. M. Guebitz: Analysis of myeloperoxidase activity in wound fluids as a marker of infection. *Annals of Clinical Biochemistry* 00(1): 1–10, 2011.
- [40] L. Wang, M. Bassiri, R. Najafi, K. Najafi, J. Yang, B. Khosrovi, W. Hwong, E. Barati, B. Belisle, C. Celeri, and M. C. Robson: Hypochlorous Acid as a Potential Wound Care Agent - Part I: Stabilized Hypochlorous Acid: A Component of the Inorganic Armamentarium of Innate Immunity. *Journal of Burns and Wounds* 6(e5): 65–79, Jan. 2007.
- [41] G. Gübitz, E. Wehrschütz-Sigl, A. Hasman, B. Binder, M. Burnett, and M. Schintler: Methode for detecting a wound infection, U.S. Patent WO 2010/133589 A12010.
- [42] J. Gaut, G. Yeh, and H. Tran: Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. *PNAS* 98(21): 11961–11966, 2001.
- [43] T. a Dechert, A. E. Ducale, S. I. Ward, and D. R. Yager: Hyaluronan in human acute and chronic dermal wounds. *Wound Repair and Regeneration* 14(3): 252–8, 2006.

- [44] S. Alegret, A. Moralesa, F. Ckspedes, J. Mufiozb, and E. Martinez-f: Hydrogen peroxide amperometric biosensor based on a peroxidase-graphite-epoxy biocomposite. *Analytica Chimica Acta* 332(2): 131–138, 1996.
- [45] S. B. Hall, E. A. Khudaish, and A. L. Hart: Electrochemical oxidation of hydrogen peroxide at platinum electrodes. Part 1. An adsorption-controlled mechanism. *Electrochimica Acta* 43(5): 579–88, Nov. 1997.
- [46] K. Cammann: *Instrumentelle Analytische Chemie*. Berlin - Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2001.
- [47] P. Gründler: *Chemische Sensoren - Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Ingenieure*. Berlin - Heidelberg - New York - Hongkong - London - Mailand - Paris - Tokio, Springer Verlag, 2004.
- [48] C. H. Hamann and V. Wolf: *Elektrochemie*. Weinheim, Wiley VCH Verlag GmbH, 2005.
- [49] M. Otto: *Analytische Chemie*. Weinheim, Wiley VCH Verlag GmbH, 2006.
- [50] E. Turkus, K. Kalcher, K. Schachl, and A. Komersova: Amperometric determination of glucose with an MnO₂ and glucose oxidase bulk-modified screen-printed carbon ink biosensor. *Analytical Letters* 34(15): 2633–2647, 2001.
- [51] K. Schachl, H. Alemu, K. Kalcher, J. Ježkova, I. Svancara, and K. Vytras: Amperometric Determination of Hydrogen Peroxide With a ManganeseDioxide-modified Carbon Paste Electrode Using Flow Injection Analysis. *Analyst* 122(9): 985–89, 1997.
- [52] K. Schachl, H. Alemu, K. Kalcher, H. Moderegger, I. Svancara, and K. Vytras: Amperometric determination of hydrogen peroxide with a manganese dioxide film-modified screen printed carbon electrode. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 362(2): 194–200, 1998.
- [53] Y. Lin, X. Cui, and L. Li: Low-potential amperometric determination of hydrogen peroxide with a carbon paste electrode modified with nanostructured cryptomelane-type manganese oxides. *Electrochemistry Communications* 7(2): 166–72, Feb. 2005.
- [54] Y. Zhang and G. S. Wilson: Electrochemical oxidation of H₂O₂ on Pt and Pt + Ir electrodes in physiological buffer and its applicability to H₂O₂-based biosensors. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 345(1): 253–71, 1993.
- [55] S. a G. Evans, J. M. Elliott, L. M. Andrews, P. N. Bartlett, P. J. Doyle, and G. Denuault: Detection of hydrogen peroxide at mesoporous platinum microelectrodes. *Analytical Chemistry* 74(6): 1322–1326, Mar. 2002.
- [56] T. You, O. Niwa, and M. Tomita: Characterization of platinum nanoparticle-embedded carbon film electrode and its detection of hydrogen peroxide. *Analytical chemistry* 75(9): 2080–2085, 2003.

- [57] E. Hering and G. Schönfelder: *Sensoren in Wissenschaft und Technik*. Wiesbaden, Vieweg & Teubner Verlag, 2012.
- [58] D. A. Skoog and J. J. Leary: *Instrumentelle Analytik - Grundlagen, Geräte, Anwendungen*. Berlin - Heidelberg - New York - Barcelona - Budapest - Hongkong - London - Mailand - Paris - Santa Clara - Singapur - Tokio, Springer, 1996.
- [59] H. Mollet and A. Grubenmann: *Formulierungstechnik - Emulsionen, Suspensionen, Feste Formen*. Weinheim, Wiley VCH Verlag GmbH, 2000.
- [60] G. Adam, P. Läger, and G. Stark: *Physikalische Chemie und Biophysik*. Berlin - Heidelberg - New York - Hongkong - London - Mailand - Paris - Tokio, Springer Verlag, 2003.
- [61] J. Janata: *Principles of Chemical Sensors*. Heidelberg - London - New York, Springer Verlag, 2009.
- [62] P. T. Kissinger and W. R. Heineman: Cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education* 60(9): 702–706, Sep. 1983.
- [63] Zyklische Voltammetrie. [Online]. Available: <http://www.nano-world.org/Lab/demo/electrochem/Seitenstrang2/Voltammetrie?language=de>. [Accessed: 23-May-2012].
- [64] J. Wang, B. Tian, B. Nascimento, and L. Angnes: Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks. *Electrochimica Acta* 43(23): 3459–3465, 1998.
- [65] N. M. White and J. D. Turner: Thick-film sensors: past, present and future. *Measurement Science and Technology* 8(1): 1–20, Jan. 1997.
- [66] John Turner: *Automotive Sensors*. New York, Momentum Press, 2009.
- [67] H. Meixner, J. Robert, W. Göpel, J. Hesse, and Z. J.N.: *Sensors, A Comprehensive Survey*. Weinheim, Wiley VCH Verlag GmbH, 2008.
- [68] A. Zeeck, S. Grond, S. Papastavrou, and S. C. Zeeck: *Chemie für Mediziner*. München - Jena, Urban & Fischer Verlag, 2005.
- [69] S. a. M. van Stroe-Biezen, F. M. Everaerts, L. J. J. Janssen, and R. a. Tacken: Diffusion coefficients of oxygen, hydrogen peroxide and glucose in a hydrogel. *Analytica Chimica Acta* 273(1): 553–560, Feb. 1993.
- [70] E. a. Dontsova, I. a. Budashov, a. V. Eremenko, and I. N. Kurochkin: Hydrogen peroxide-sensitive amperometric sensor based on manganese dioxide nanoparticles. *Nanotechnologies in Russia* 3(7): 510–20, Aug. 2008.
- [71] B. Xu, M.-L. Ye, Y.-X. Yu, and W.-D. Zhang: A highly sensitive hydrogen peroxide amperometric sensor based on MnO₂-modified vertically aligned multiwalled carbon nanotubes. *Analytica Chimica Acta* 674(1): 20–26, Jul. 2010.

- [72] S. Hall and E. Khudaish: Electrochemical oxidation of hydrogen peroxide at platinum electrodes. Part V: inhibition by chloride. *Electrochimica Acta* 45(21): 3573–3579, 2000.
- [73] J. Kettle and C. C. Winterbourn: Influence of superoxide on myeloperoxidase kinetics measured with a hydrogen peroxide electrode. *Biochemical Journal* 263(3): 823–8, Nov. 1989.
- [74] R. Steudel: *Chemie der Nichtmetalle - Von Struktur und Bindung zur Anwendung*. Berlin, Walter de Gruyter Verlag, 2008.
- [75] S. B. Hall, E. A. Khudaish, and A. L. Hart: Electrochemical oxidation of hydrogen peroxide at platinum electrodes. Part II: effect of potential. *Electrochimica Acta* 43(14): 2015–2024, May 1998.
- [76] J. Koolmann and K.-H. Röhm: *Taschenatlas der Biochemie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2003.
- [77] A. J. Kettle, C. A. Gedye, and C. C. Winterbourn: Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide. *Biochemical Journal* 321(2): 503–508, Jan. 1997.

6. Anhang

6.1. Störungen im Messsignal ohne die Verwendung eines Faraday'schen Käfigs

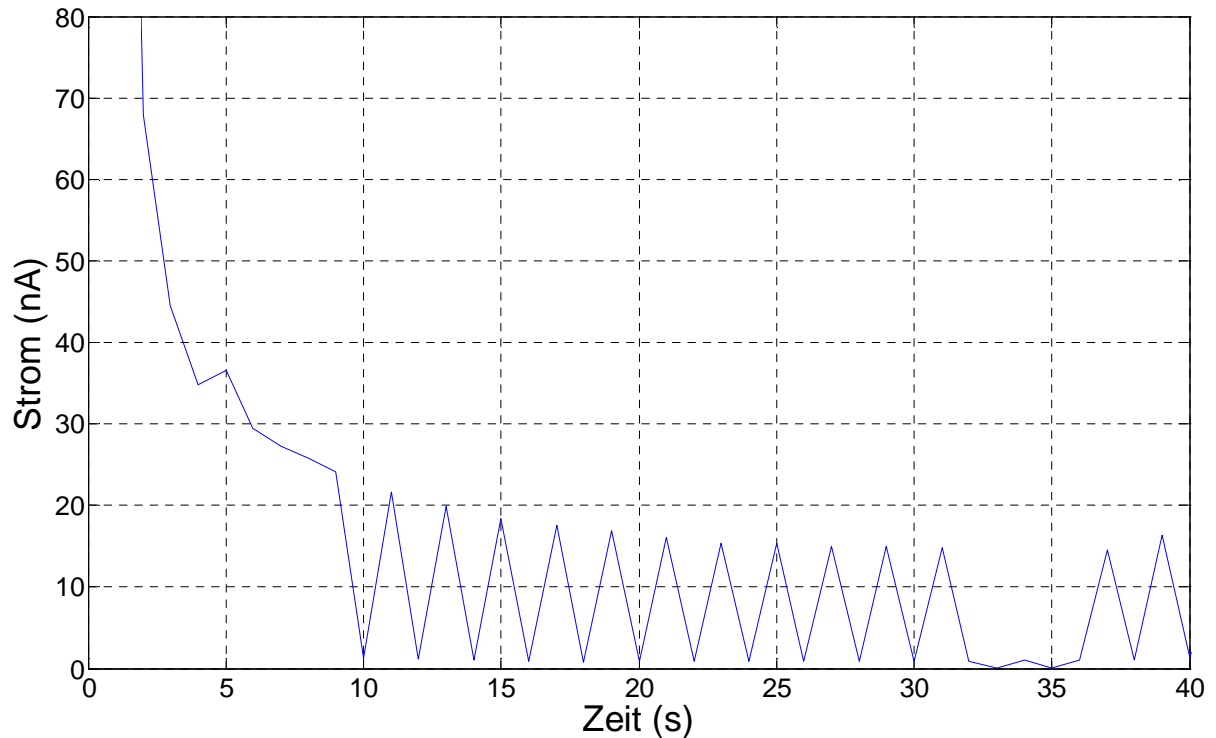


Abbildung 45: Schwankungen im Messsignal durch externe Störsignale: Ausbildung der elektrochemischen Doppelschicht bei einer Messung in Phosphatpuffer

Zu sehen ist ein Signalabfall (kapazitiver Strom) bedingt durch die Ausbildung der elektrochemischen Doppelschicht, der bei jedem Start von chronoamperometrischen Messungen durch die Ladungstrennung an der Phasengrenzfläche Elektrode/Elektrolyt entsteht. Die relativ großen Schwankungen im Signal stellen Störungen von externen Signalquellen dar, die ohne der Verwendung eines Faraday'schen Käfigs durch das Messsystem aufgenommen werden.

6.2. Einfluss des unkonstanten Flusses der Pumpe auf das Messsignal

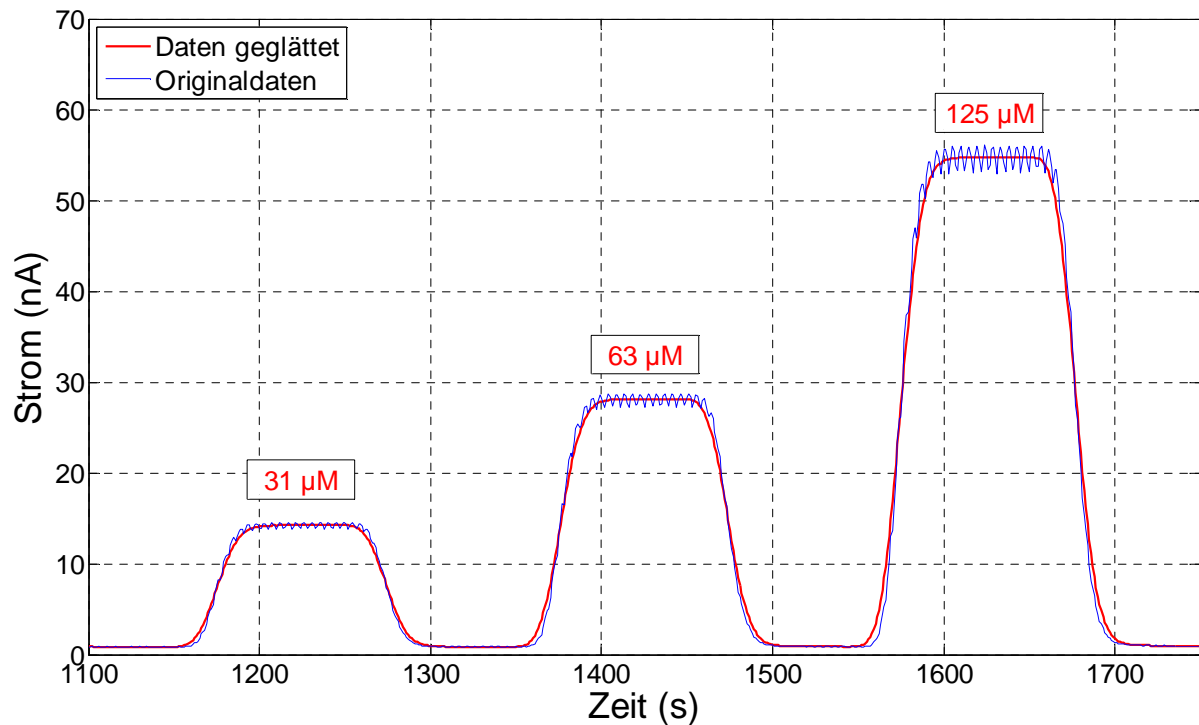


Abbildung 46: Einfluss des Pumpenrauschens auf das Signal: blau: gemessene Rohdaten, rot: durch Mittelwertfilter geglättetes Signal

6.3. Berechnung des Analytverbrauchs während der Messung

Findet zwischen 2 Elektroden, die in eine Elektrolytlösung eingetaucht sind, eine elektrochemische Umsetzung des Analyten statt, wodurch ein Stromfluss entsteht, dann ist die umgesetzte Stoffmenge proportional zur Zeitdauer und Stärke des Stromflusses (Faraday'sches Gesetz) [46].

$$n = \frac{i * t}{z * F} \quad (20)$$

n ... Stoffmenge des Analyten (mol)

i ... Stromstärke (A)

t ... Messzeit (s)

z ... Anzahl der pro Teilchen umgesetzten Elektronen

F ... Faraday-Konstante (96485,33 As/mol)

Für eine genaue Berechnung muss der Grundstrom, der ohne die Anwesenheit von H₂O₂ in reinem Phosphatpuffer gemessen wird und somit auch zum Gesamtstrom bei der Messung

inklusive H_2O_2 beiträgt, von diesem abgezogen werden, damit die Berechnung mit dem Strom erfolgt, der rein durch die Oxidation von H_2O_2 verursacht wird.

Wie in Abb. 28 (Seite 44) zu sehen ist, ergibt eine Messung einer $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 -Lösung einen Strom von 42 nA (i_{gesamt}), wobei der Grundstrom (i_{Grund}) ca. 2 nA beträgt. Mit dem Volumen der Messzelle ($V = 10 \mu\text{l}$) kann aus der Konzentration C die darin enthaltene Stoffmenge n an H_2O_2 berechnet werden.

$$n = C * V = 100 \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}} * 10^{-5} \text{ l} = 10^{-3} \mu\text{mol} = 1 \text{ nmol}$$

Als Beispiel soll der Verbrauch an H_2O_2 durch die Elektrodenreaktion über eine Messzeit von 200 s berechnet werden:

$$n = \frac{(i_{\text{gesamt}} - i_{\text{Grund}}) * t}{z * F} = \frac{(42 - 2) * 10^{-9} \text{ A} * 200 \text{ s}}{2 * 96485,33 \frac{\text{As}}{\text{mol}}} = 4,15 * 10^{-11} \text{ mol}$$

$$= 4,15 * 10^{-2} \text{ nmol}$$

6.4. Überprüfung der Vergleichspräzision des Sensorsignals - Rohdaten

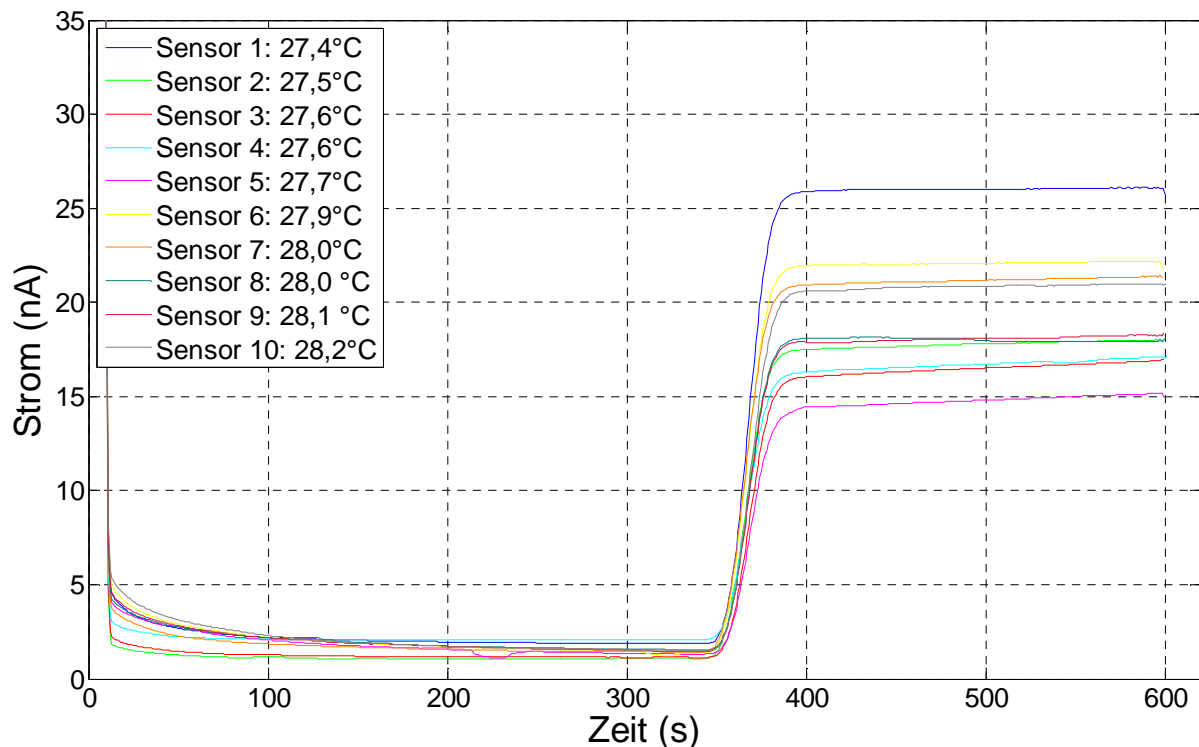


Abbildung 47: Rohdaten zur Messung der Vergleichspräzision des Sensorsignals: Messung mit 10 verschiedenen Sensoren