

**Originalarbeiten • Full Papers****Einfluß von Schwermetallionen in Trinkwasser auf die Aktivität des AChE-Biosensors****Kathrin Stein und Stefan Schmechel**

Clausthal, Technische Universität, Institut für Anorganische und Analytische Chemie

Eingegangen am 04. Mai bzw. 12. September 1995

**Influence of Heavy Metal Ions in Drinking Water on the Activity of the AChE-Biosensor**

**Abstract.** Because of the specific inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) by organophosphoric ester, -thioester and N-methylcarbamates an acetylcholinesterase biosensor can be used to screen drinking water for the presence of compounds used as insecticides. The presence of heavy metal ions may also lead to a decrease in catalytic activity of the enzyme, and in this way a misinterpretation of the results of the screening is possible. In this paper the effect of lead, iron, copper and zinc ions on the activity was examined, with the view to the concentration limit given by the decree for drinking water in the Federal Republic of Germany. Zinc and copper ions in drinking water produce a detectable inhibition (3 mg/L copper produced an inhibition of 10 to 20%, 5 mg/L zinc an inhibition of 10%), therefore the

presence of copper, lead and other heavy metal ions not tested in drinking water may produce wrong results in pesticide screening. The coimmobilization of albumin and enzyme was successful in eliminating the inhibition caused by heavy metal ions. Using this membrane for a 3 mg/L copper solution an inhibition of only 0.3% higher was measured and for a 5 mg/L zinc solution an inhibition of 2.3% lower than the inhibition of TRIS-buffer itself. This results were in the range of the standard deviation, which means that no inhibition could be measured with this metal ion solution using albumin containing AChE-membranes. The use of this modified membrane in real drinking water samples shows clearly lower inhibition values than that of membranes without albumin.

Die derzeit gültigen Grenzwerte für Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffe im Trinkwasser sind in der Trinkwasserverordnung vom Juli 1986 auf 0,1 µg/L je Einzelsubstanz beziehungsweise auf 0,5 µg/L der Summe an Pestizid-Wirkstoffen festgelegt. Die Grenzwerte nach Anlage 2 Nr. 13 für chemische Stoffe zur Pflanzenbehandlung und Schädlingsbekämpfung einschließlich toxischer Hauptabbauprodukte wurden zunächst für drei Jahre ausgesetzt, da zum Zeitpunkt der Veröffentlichung keine ausreichend empfindlichen Analysensysteme zur Verfügung standen. Sie sind am 1. Oktober 1989 in Kraft getreten [1, 2]. Um die Einhaltung der vorgeschriebenen Grenzwerte zu erreichen, ist eine rasche, empfindliche und möglichst kontinuierliche Überwachung des Trinkwassers erforderlich. Dies ist mit den konventionellen Nachweisverfahren wie GC und HPLC nicht in vollem Umfang möglich und führt in zunehmendem Maße zur Prüfung von biochemischen Tests wie Immunoassays und Enzymtests auf ihre Eignung zum

Schadstoffnachweis [3]. Als Vorteile dieser Untersuchungsmethoden gelten ihre leichte Durchführbarkeit am Ort der Probenahme und ihre einfache apparative Ausstattung [4].

Die Entwicklung eines Acetylcholinesterase-Biosensors hat die on-line-Überwachung von Trinkwasser auf die Anwesenheit von Pflanzenschutzmitteln der Stoffklassen der Organophosphate, -thiophosphate und N-Methylcarbamate zum Ziel. Das in dem Biosensor verwendete Enzym Acetylcholinesterase (AChE) ist im Organismus vieler Lebewesen an der Weiterleitung des Nervenimpulses über den synaptischen Spalt beteiligt. Kommt dieses Enzym mit den oben bereits erwähnten Stoffen in Kontakt, wird durch eine Reaktion zwischen dem aktiven Zentrum des Enzyms und dem Hemmstoff (Pestizid) die katalytische Aktivität des Enzyms herabgesetzt [5].

Durch Optimierung der Testparameter konnte mit einem Biosensor, der aus einer acetylcholinesterasehaltigen Membran besteht, die mit einer pH-Flachmembranelektrode in

Kontakt gebracht wurde, die Anwesenheit von 0,1 µg/L verschiedener insektizider Wirkstoffe detektiert werden [6]. Unter den für diese niedrigen Inhibitorkonzentrationen nötigen Hemmbedingungen reagiert der Biosensor jedoch auch empfindlich auf unspezifische Hemmstoffe wie z. B. Metallionen. Bereits geringe Konzentrationen vieler Metallionen können beim Kontakt mit dem Enzym AChE zu einer Veränderung der katalytischen Aktivität führen. Die Aktivierung und Inhibierung von nativer und immobilisierter AChE durch verschiedene Metallionen wurde bereits mehrfach untersucht [7–9]. Die Vorgänge auf molekularer Ebene, die zur Inhibierung bzw. Aktivierung führen, sind noch nicht endgültig geklärt. Für Schwermetalle wird eine Reaktion mit den Sulfhydrylgruppen von Proteinen angenommen, durch die es zu einer Variation der dreidimensionalen Struktur kommen kann. Diese Veränderung kann bei Enzymen eine inhibierende aber auch aktivierende Wirkung zur Folge haben.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung und Beseitigung störender Einflüsse auf den AChE-Biosensor durch Schwermetallionen im Trinkwasser. Hierbei sollten die apparativen Bestandteile des bereits entwickelten und für das Pestizid-Screening optimierten Biosensors nicht verändert, sowie der zusätzliche zeitliche Aufwand zur Aufhebung der Störungen möglichst gering gehalten werden. Die Konzentrationen der Schwermetalllösungen wurden entsprechend den Grenz- bzw. Richtwerten der Trinkwasserverordnung gewählt.

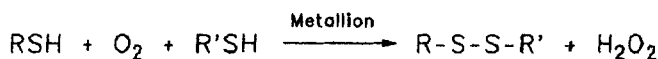
### Biochemische Grundlagen der Inhibierung durch Schwermetallionen

Der Mechanismus der Reaktion zwischen der Acetylcholinesterase und Metallionen, die zur Beeinflussung der Enzymaktivität führen, ist noch nicht aufgeklärt. Zur Zeit werden zwei verschiedene Mechanismen diskutiert, die beide von BUDNIKOV beschrieben wurden und hier kurz vorgestellt werden.

Nach der von MICHAELIS und MENTEN aufgestellten Theorie bilden Enzym und Substrat einen Komplex, der nach seiner Entstehung sofort wieder in die Endprodukte und das Enzym zerfällt [10]. Die katalytische Wirkung der AChE beruht auf der räumlichen Nähe eines anionischen Zentrums (Bindung des Acetylcholins durch den positiv geladenen Stickstoff) zu einem esteratischen Zentrum (Spaltung der Esterbindung).

- Nach der ersten Theorie bewirken Metallionen in der Hemmlösung, daß sich eine koordinative Bindung in der Nähe des anionischen Zentrums ausbildet, was mit einer Änderung der Stabilität des MICHAELIS-MENTEN Komplexes verbunden ist, das heißt, es kommt zu einer Erhöhung beziehungsweise Verringerung der Katalysatoraktivität. Dieser Effekt ist in erster Linie von der Größe und Ladung der Metallionen und erst in zweiter Linie von der benötigten Konzentration zur Blockierung des anionischen AChE-Zentrums abhängig [9].
- Inhibitionsmessungen mit unterschiedlichen Schwermetall-

ionen bei verschiedenen Konzentrationen führten zu einer zweiten Theorie: Metallionen können die Oxidation von im Enzym enthaltenen Cysteinresten katalysieren. Das führt zur Ausbildung von Disulfidbrücken und damit zur Änderung der räumlichen Struktur der AChE [8]. Ein derartiger Mechanismus wird auch für die Inhibierung der Urease durch Metallionen diskutiert [11–13].



### Ergebnisse und Diskussion

Bei der Beurteilung der Meßergebnisse ist zu beachten, daß es sich bei Biosensoren um Systeme handelt, die mit Biokomponenten arbeiten. Diese Biokomponenten sind aus ihrer natürlichen Umgebung isoliert worden, in der sie unter optimalen Bedingungen aktiv sind. Bei der Präparation des Biosensors kann man unter Laborbedingungen die natürlichen Bedingungen nicht vollständig kopieren. Daher ist bei derartigen Meßmethoden nicht die Reproduzierbarkeit zu erreichen, wie sie aus der instrumentellen Analytik bekannt ist.

#### *Hemmung durch Schwermetalle*

Das pH-Optimum für die enzymatische Substrathydrolyse der Acetylcholinesterase wird in der Literatur zwischen 6 und 8 angegeben [14]. Hier ist der Phosphatpuffer der am häufigsten verwendete Puffer und wurde auch für den AChE-Biosensor eingesetzt [6]. Wegen der niedrigen Löslichkeitsprodukte (z.B.  $K_L(\text{Pb}_3(\text{PO}_4)_2) = 1 \times 10^{-54}$ ) sind einige Schwermetalle nur in sehr geringen Konzentrationen in Phosphatpuffer löslich, und es mußte ein anderes Puffersystem verwendet werden. Die von dem Puffer hervorgerufene Hemmung muß jedoch möglichst gering sein, und die zu untersuchenden Schwermetallionen müssen während der Hemmung in diesem Puffer in frei hydratisierter Form vorliegen (keine komplexierende Wirkung, keine Fällungsreaktion). Untersuchungen der Hemmung des Enzyms Urease durch Kupferionen haben gezeigt, daß nur das frei hydratisierte Kupferion eine Hemmung hervorruft [15, 16].

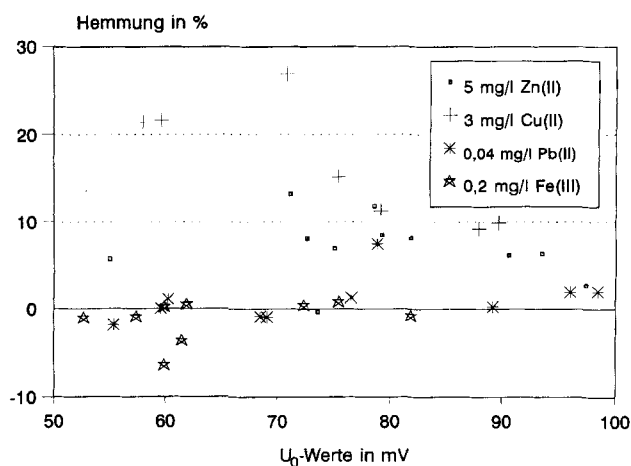
Als Puffersystem in diesem pH-Bereich eignet sich neben dem Phosphatpuffer ein TRIS-Puffer. Vergleicht man die Grundhemmung, die durch Eintauchen der Enzymelektrode in die Puffer unter den Hemmbedingungen (60 Minuten bei 34 °C) hervorgerufen wird, zeigt sich, daß der TRIS-Puffer bei einem pH-Wert von 7,4 keine höhere Hemmung hervorruft als der Phosphatpuffer bei pH 7,4 (Tabelle 1). Die Anwendung des F- und t-Testes zeigt, daß beide Meßreihen mit hoher Wahrscheinlichkeit vergleichbar sind. Werden beiden Pufferlösungen Kupfer(II)-Ionen bis zu einer Endkonzentration von 3 mg/L zugesetzt, so wird im Phosphatpuffer

**Tab. 1** Hemmwirkung verschiedener Puffer mit und ohne Kupferionen

$U_0$ : Aktivität vor der Hemmung % H: Hemmung (Aktivitätsabnahme) durch die Hemmung bezogen auf die Ausgangsaktivität  $U_0$

Puffer	Zusätze Cu(II)	Mittelwert der Hemmung	Einzelmeßwerte
Phosphatpuffer pH 7,4	+ 0 mg/L	5,7%±2,7	$U_0$ [mV] 75,1 80,2 81,3 86,2 88,7 93,1 94,4
			%H 4,0 2,9 9,8 6,8 6,0 2,0 8,7
	+ 3 mg/L	14,7%±4,0	$U_0$ [mV] 70,6 81,6 83,1 88,5 90,1
			%H 11,5 20,1 10,5 12,5 18,8
TRIS-Puffer pH 7,4	+ 0 mg/L	6,8%±0,8	$U_0$ [mV] 85,1 85,2 86,3 91,6 96,6
			%H 6,4 5,8 7,8 6,1 7,7
	+ 3mg/L	6,515±1,1	$U_0$ [mV] 82,7 83,0 86,4 97,6 100
			%H 7,7 7,8 4,9 5,5 5,4

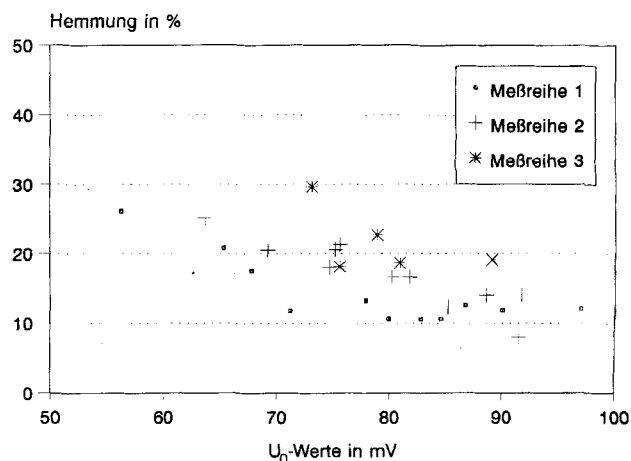
eine um durchschnittlich 9% (Vergleich der Mittelwerte, Tabelle 1) gegenüber dem reinen Phosphatpuffer erhöhte Hemmung gemessen. Im TRIS-Puffer wird dagegen keine gegenüber dem reinen Puffer erhöhte Hemmung festgestellt (Tabelle 1). Nach Einstellung des pH-Wertes des TRIS-Puffers auf 6 werden auch für Lösungen mit einem Kupferionengehalt von 3 mg/L deutlich erhöhte Hemmungen gegenüber dem reinen TRIS-Puffer pH 6 gemessen (Abb. 1).



**Abb. 1** Hemmung durch Schwermetalllösungen verringert um die Hemmung des TRIS-Puffers pH 6,0 (Hemmung durch den TRIS-Puffer entspricht der Null-Linie)

Die Hemmung durch den Puffer ist jetzt jedoch mit 10–20% (je nach Ausgangsaktivität) geringfügig höher als die Hemmung durch TRIS-Puffer pH 7,4 mit durchschnittlich 7% (vgl. Tabelle 1 und Abb. 2 Meßreihe 1). Bei  $U_0$ -Werten oberhalb von 80 mV ergeben sich für TRIS-Puffer pH 6 konstante Grundhemmwerte etwas über 10%, während bei geringeren  $U_0$ -Werten die Hem-

mung um so größer wird, je geringer der  $U_0$ -Wert ist. Diese Beobachtung läßt sich durch die Enzymmenge in der Membran erklären, denn je geringer die  $U_0$ -Werte und damit die immobilisierte Enzymmenge ist, desto empfindlicher reagiert das System auf Hemmstoffe. Bei geringer Enzymmenge ist auch die Anzahl der aktiven Zentren geringer, die pro Zeiteinheit das Substrat umsetzen. Nur ein blockiertes aktives Zentrum macht sich prozentual stärker bemerkbar als bei einer größeren Anzahl aktiver Zentren. Aufgrund dieser Abhängigkeit der Hemmung von den  $U_0$ -Werten ist es in diesem speziellen Falle nicht sinnvoll, Mittelwertberechnungen durchzuführen.



**Abb. 2** Einfluß des Zusatzes von Citronensäure auf albumin-freie Membranen (Einzelmeßwerte) im Vergleich zum reinen TRIS-Puffer pH 6,0

Meßreihe 1: TRIS-Puffer pH 6,0 ohne Zusatz  
 Meßreihe 2: TRIS-Puffer pH 6,0 + 2 mmol/L Citronensäure  
 Meßreihe 3: TRIS-Puffer pH 6,0 + 2 mmol/L Citronensäure + 3 mg/L  $Cu^{2+}$

Die Untersuchungen wurden mit Zink-, Kupfer-, Eisen(III)- und Blei(II)-Ionen durchgeführt, die nach der Trinkwasserverordnung höchstens mit Konzentrationen bzw. empfohlenen Richtwerten von 5 mg/L  $Zn^{2+}$ , 3 mg/L  $Cu^{2+}$ , 0,2 mg/L  $Fe^{3+}$  und 0,04 mg/L  $Pb^{2+}$  vorkommen dürfen. Für diese Grenzkonzentrationen wurde für Kupferionen eine deutlich erhöhte Hemmung gegenüber dem reinen Puffer und für Zinkionen eine etwas geringere Erhöhung der Hemmung festgestellt (Abb. 1). Wurden diese Konzentrationen um den Faktor 10 auf 0,5 mg/L  $Zn^{2+}$  und 0,3 mg/L  $Cu^{2+}$  gesenkt, ergaben sich gegenüber dem reinen Puffer keine erhöhten Hemmwirkungen mehr (Tab. 2). Bei der Messung mit Eisen- und Bleiionen führt sogar eine zehnfach höhere Konzentration als nach der Trinkwasserverordnung zulässig nur zu einer um durchschnittlich 3 bzw. 4% erhöhten Hemmung (Tab. 2). Diese Ergebnisse zeigen, daß die Anwesenheit von Zink- und Kupferionen im Trinkwasser bei den Bedingungen des Pestizid-Screenings erhöhte Hemmungen bewirken und damit eine Belastung anzeigen, die nicht auf insektizide Wirkstoffe zurückzuführen ist.

**Tab. 2** Hemmung durch verschiedene Schwermetallionen gelöst in TRIS-Puffer pH 6 (Der Einfluß des TRIS-Puffers wurde rechnerisch eliminiert)

Metall	Konzentration [mg/L]	Hemmung [%]
$Zn^{2+}$	5 <sup>a)</sup>	7,5
	0,5	0
$Cu^{2+}$	3 <sup>a)</sup>	16,5
	0,3	0
$Fe^{3+}$	0,2 <sup>a)</sup>	-1,4
	2	3
$Pb^{2+}$	0,04 <sup>a)</sup>	1,4
	0,4	4

<sup>a)</sup> Richt- und Grenzwert nach der Trinkwasserverordnung

#### *Eliminierung der Hemmwirkung von Schwermetallionen auf die Acetylcholinesterase*

Untersuchungen mit dem Enzym Urease haben gezeigt, daß nur frei hydratisiert vorliegende Kupferionen eine Enzym-Hemmung hervorrufen, nicht aber Schwermetallionen, die in stabilen Komplexen gebunden sind [15]. So kann z. B. die durch Kupfer inhibierte Urease durch den Komplexbildner EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) reaktiviert werden [16]. Nach dem ersten Schritt, der Bestimmung des Einflusses von Metallionen auf die Aktivität des Enzyms, wurde in einem zweiten Schritt nach geeigneten Zusätzen bzw. Maskierungsmitteln gesucht. Diese Zusätze sollen das Enzym vor dem inhibierenden Effekt der Metallionen schützen, aber selber

möglichst keinen inhibierenden Effekt ausüben. Untersucht wurde die Zugabe von L-Cystein und dem Eiweiß Rinderserumalbumin zur Hemmlösung, die in ähnlicher Weise wie das Enzym mit dem Schwermetallkation reagieren sollten. Sofern Cystein bzw. Albumin im Überschuß gegenüber dem Enzym Acetylcholinesterase vorhanden ist, können die Schwermetalle mit den Sulfhydrylgruppen der Aminosäure L-Cystein bzw. dem Eiweiß Albumin reagieren, bevor sie mit dem Enzym in Kontakt kommen. Durch Zugabe von Komplexbildungsreagenzien zur Hemmlösung wie EDTA, CDTA (1,2-Cyclohexandiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure) und Citronensäure können die Metallionen dagegen stabile Komplexe bilden und liegen damit nicht mehr in freier, für das Enzym verfügbarer Form vor.

In früheren Arbeiten hat sich gezeigt, daß der Sensor empfindlich auf Zusätze zur Hemmlösung reagiert. Von den untersuchten Zusätzen (L-Cystein, Albumin, Komplexbildner) übt die Citronensäure die geringste zusätzliche Hemmwirkung aus (Tab. 3). Die Hemmwirkung der Citratlösung ist jedoch trotzdem höher als die des TRIS-Puffers (Abb. 2 Meßreihe 2 im Vergleich zu Meßreihe 3). Weiterhin ist die Citronensäure ein schwacher Komplexbildner, der die Hemmung der Kupferionen nur verringern, nicht aber aufheben kann (Abb. 2). Ein Komplexbildner wie EDTA, dessen Metallkomplexe stabiler sind, bewirkt dagegen eine erhebliche Eigenhemmung (Tab. 3).

**Tab. 3** Zusätzliche Hemmung durch Zusätze im TRIS-Puffer pH 6 (die Hemmung des TRIS-Puffer wurde rechnerisch eliminiert)

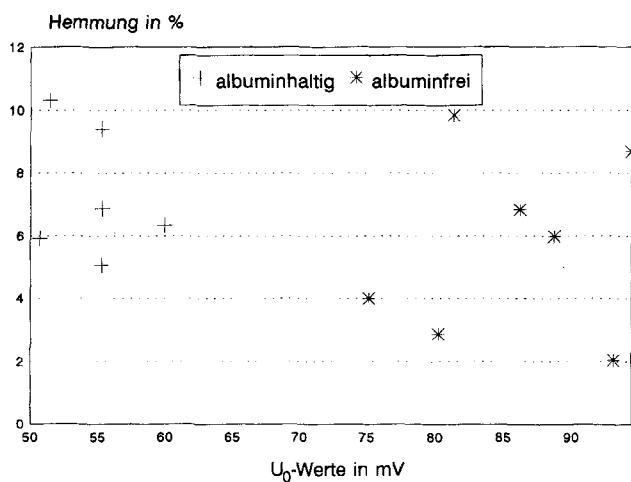
Zusatz	Hemmung (– Anteil durch den TRIS-Puffer)
2 mmol/L L-Cystein	15 %
0,04 g/L Albumin	10 %
0,02 mmol/L EDTA	10 %
2 mmol/L CDTA	10 %
2 mol/L Citronensäure	5 %

#### *Verhalten albuminhaltiger Membranen*

Die erhöhte Aktivitätsverminderung der Enzymmembranen bei Zugabe von Albumin zu der Hemmlösung (Tab. 3), ist nicht durch aktivitätsmindernde Effekte des Albumins auf das Enzym zu erklären. Bei anderen beschriebenen Immobilisierungstechniken wird das Enzym in Gegenwart von Albumin immobilisiert [17, 18]. Eine mögliche Erklärung für die Inaktivierung der Membranen durch albuminhaltige Lösungen ist ein Verstopfen der Poren durch das Makromolekül Albumin, so daß nach der Inkubation in der Hemmlösung das Sub-

strat nicht mehr in die Membran zu den aktiven Zentren des Enzyms diffundieren kann.

Durch Coimmobilisierung von Albumin und Enzym in der Membran besteht die Möglichkeit, das Enzym vor aktivitätsmindernden Reaktionen mit den Metallkationen zu schützen, wenn das Eiweiß im Überschuß in der Membran vorliegt. Das Verhalten derart modifizierter Membranen wurde zunächst durch die Hemmung in Phosphatpuffer überprüft. Verglichen mit albuminfreien Membranen zeigt sich, daß der Mittelwert der Hemmung hervorgerufen durch Phosphatpuffer zwar etwas höher ist, die Standardabweichung dagegen etwas geringer als mit Verwendung albuminfreier Membranen. F- und t-Test zeigen, daß zwischen dem Verhalten beider Membrantypen gegen den Phosphatpuffer kein Unterschied besteht (Abb. 3).

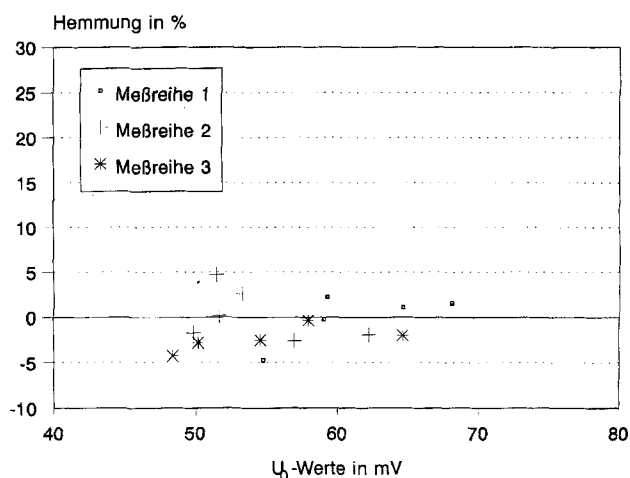


**Abb. 3** Darstellung der gemessenen Hemmwerte albuminhaltiger (berechneter Mittelwert % H =  $7,3 \pm 1,9$ ) und albuminfreier Membranen (berechneter Mittelwert % H =  $5,8 \pm 2,7$ ) in Phosphatpuffer pH 7,4 ohne Zusatz

Bei der Inhibierung albuminhaltiger Membranen durch 0,1 mol/L TRIS-Puffer pH 6 ergibt sich dagegen eine geringere Hemmwirkung (für Membranen mit  $U_0$ -Werten zwischen 55 und 70 mV wurden Hemmungen zwischen 8 und 15% gemessen, Abb. 4) als bei der Verwendung albuminfreier Membranen (für Membranen mit  $U_0$ -Werten zwischen 55 und 70 mV wurden Hemmungen zwischen 12 und 28% gemessen, Abb. 2). Die für die albuminfreien Membranen gemessene Hemmung durch die Kupfer- und Zinkionenlösung konnte bei den albuminhaltigen Membranen nicht festgestellt werden, wie ein Vergleich der Mittelwerte zeigt (Abb. 4). Diese Beobachtung läßt darauf schließen, daß durch die Coimmobilisierung von Albumin das Enzym vor unspezifischen Hemmstoffen geschützt werden kann. Im Einzelfall muß dieses jedoch für den jeweils interessierenden Stoff untersucht werden.

### Verhalten gegenüber Trinkwasserproben

Als Trinkwasserproben wurden zwei Proben mit unterschiedlichen Schwermetallgehalten verwendet. Die erste wurde aus einer Wasserleitung in Clausthal-Zellerfeld entnommen, in der das Wasser längere Zeit gestanden hat, so daß sich das Wasser mit Metallkationen anreichern konnte (Probe 1). Der pH-Wert des Trinkwassers wurde auf pH 6 eingestellt. Die zweite Probe wurde nach dreißigminütigem Spülen aus der Trinkwasserleitung entnommen (Probe 2). In diesen Proben wurden die in Tab. 4 aufgeführten Schwermetallkonzentrationen mit der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) nach Membranfiltration ermittelt. Die Zinkkonzentration wurde mit der Flammentechnik in einer Luft/Acetylen-Flamme und die Kupfer- und Bleiionenkonzentration mit der Graphitrohrföfen-Technik bestimmt. Die wirksamen insektiziden Wirkstoffe konnten nach einer flüssigkeitschromatographischen Untersuchung nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 4** Hemmwirkung von TRIS-Puffer pH 6,0 ohne Zusatz (berechnete mittlere prozentuale Hemmung  $12,9\% \pm 2,5$ , dargestellt durch die Nulllinie), Kupfer- (berechnete mittlere prozentuale Hemmung  $13,2\% \pm 2,7$ ) und Zinklösungen (berechnete mittlere prozentuale Hemmung  $10,6\% \pm 1,3$ ) auf albuminhaltige Membranen

Meßreihe 1: TRIS-Puffer pH 6,0 ohne Zusatz minus dem Mittelwert der Hemmung durch TRIS-Puffer

Meßreihe 2: TRIS-Puffer pH 6,0 + 3 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$  minus dem Mittelwert der Hemmung durch TRIS-Puffer

Meßreihe 3: TRIS-Puffer pH 6,0 + 5 mg/L  $\text{Zn}^{2+}$  minus dem Mittelwert der Hemmung durch TRIS-Puffer

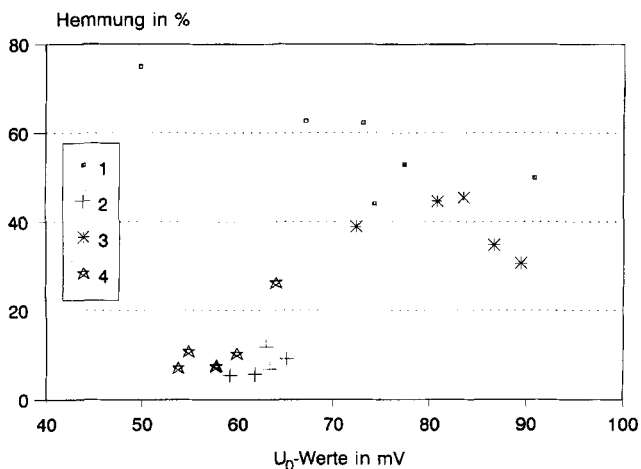
Die durch beide Proben hervorgerufene hohe Hemmung der albuminfreien Membran kann nicht allein auf die in Tabelle 4 angegebenen Schwermetallgehalte in den Proben zurückgeführt werden (Abb. 5). Die Zinkkonzentration ist zwar in der Probe 1 so hoch, daß ein

Teil der Hemmung des Biosensors darauf zurückzuführen ist, jedoch nicht in der gemessenen Höhe. Diese Hemmung ist nur durch Anwesenheit anderer störender Stoffe, die bisher nicht untersucht bzw. identifiziert wurden oder auf synergetische Effekte störender Stoffe zurückzuführen.

**Tab. 4** Schwermetallgehalte der Wasserproben

Metall	Probe 1 [ $\mu\text{g/L}$ ]	Probe 2 [ $\mu\text{g/L}$ ]
Kupfer	0,7	1,4
Blei	0,7	0,5
Zink	1400	0,4

Beim Einsatz der albuminhaltigen Membran wurden dagegen Hemmwerte gemessen, die im Bereich der Puffer-Hemmung liegen. Der Zusatz von Albumin beeinträchtigt nicht die Hemmwirkung der Organophosphorsäureester, -thioester und N-Methylcarbamate, wie sich in anderen Arbeiten gezeigt hat. In diesen Arbeiten wird das Enzym in Gegenwart von Albumin immobilisiert und zur Detektion der Hemmwirkung dieser insektiziden Wirkstoffe eingesetzt [4, 17, 18]



**Abb. 5** Hemmwirkung zweier Trinkwasserproben jeweils gemessen mit einer albuminfreien und albuminhaltigen Membran

- 1: Probe I albuminfreie Membran (berechnete mittlere prozentuale Hemmung  $57,85\% \pm 10,1$ )
- 2: Probe I albuminhaltige Membran (berechnete mittlere prozentuale Hemmung  $7,7\% \pm 2,4$ )
- 3: Probe II albuminfreie Membran (berechnete mittlere prozentuale Hemmung  $38,9\% \pm 5,7$ )
- 4: Probe II albuminhaltige Membran (berechnete mittlere prozentuale Hemmung  $8,5\% \pm 1,6$ )

## Beschreibung der Versuche

**Geräte:** Pocket-Photometer LASA plus, Biosensor-Test-Gesamtausstattung bestehend aus Trockenthermostat, Flachmembranelektrode, Rührvorsatz und Reaktionsgefäßen (jeweils Dr. Bruno Lange GmbH). Zusätzlich zwei Glasplatten und Klammern.

**Chemikalien:** Substratlösung: Substratkappen mit 25 mg lyophilisiertem Acetylcholinchlorid in 25 ml Phosphatpuffer-Lösung (2,84 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,36 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1,6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 0,2 g  $\text{NaN}_3$  in 2 l dest. Wasser gelöst, pH mit HCl entsprechend eingestellt, es ergibt sich ein 11,3 mmol/L Phosphatpuffer) lösen (beides Dr. Bruno Lange GmbH). Diese Lösung muß täglich frisch hergestellt werden.

**TRIS-Puffer (100 mmol/L):** aus 12,11 g TRIS-(hydroxymethyl)-methylamin (Aldrich-Chemie, Nr. 15,456-3) in 100 ml destilliertem Wasser lösen und den pH mit HCl auf 7,4 bzw. 6 einstellen.

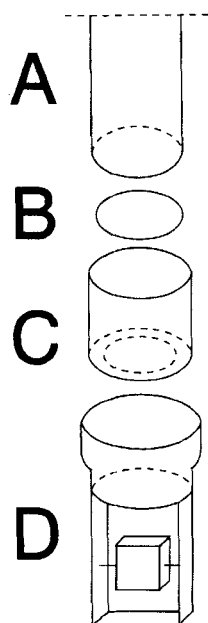
Zink-, Kupfer-, Eisen- und Blei-Stammlösungen mit  $c(\text{Metallion}) = 1 \text{ g/L}$  jeweils die Nitrate in 0,5 mol/L  $\text{HNO}_3$ , L-Cystein (jeweils Merck), Rinder-Serum Albumin Fraktion V (Sigma Nr. A-3350), EDTA (Titriplex III, Merck Nr. 8418), CDTA (Titriplex IV, Merck Nr. 8424), Citronensäure (Merck Nr. 818707), Enzymmembranen (Dr. Bruno Lange GmbH) und AChE vom Zitteraal, Typ III mit 909,09 Units/mL (Sigma), Acrylamidmonomer, N,N'-Methylenbisacrylamid (BIS), N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) (jeweils Merck), 20%ige Lösung von Ammoniumperoxodisulfat (Riedel-de Haën) in Wasser (entspricht 0,88 mmol/L). Als Trägermembranen wurden Celluloseacetat-Membranen mit 1,2  $\mu\text{m}$  Porendurchmesser (Sartorius SM 12303-50-N) verwendet.

### Bestimmung der Aktivität der Enzymmembran:

Entsprechend der Anleitung des Biosensor-Tests wird die Enzymmembran B mit Hilfe einer Gummikappe C auf der ionensensitiven Oberfläche der pH-Elektrode A befestigt. Auf diese Gummikappe wird der Rührzusatz D aufgesetzt (Abb. 6). Es ist darauf zu achten, daß der Flüssigkeitsfilm zwischen Elektrode und Membran möglichst dünn bleibt (mit einem Wattestäbchen fest andrücken) und daß sich keine Luftblasen bilden. Taucht die Enzymelektrode in die gleichmäßig gerührte Pufferlösung, stellt sich nach einiger Zeit ein konstantes Grundpotential  $U_G$  ein, das dem pH-Wert der Lösung entspricht. Anschließend wird die Elektrode in die gleichmäßig gerührte Substratlösung (800 mg/L) getaucht. Durch die enzymatische Hydrolyse des Acetylcholins wird Essigsäure in der Membran freigesetzt, wodurch der pH-Wert sinkt. Es stellt sich das Potential  $U_S$  ein („steady state“-Messung nach 15 Minuten). Die Differenz zwischen  $U_G$  und  $U_S$  ergibt die durch die enzymatische Reaktion hervorgerufene Potentialänderung  $U_0$ , die ein Maß für die Aktivität des Enzyms in der Membran ist.

**Hemmung:** Der Einfluß folgender Lösungen auf die Aktivität des Biosensors wurde untersucht:

Phosphatpuffer pH 7,4 und TRIS-Puffer pH 6 bzw. 7,4; 0,3 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$  in Phosphatpuffer und TRIS-Puffer pH 7,4 gelöst, 0,3 mg/L und 3 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$ ; 5 und 0,5 mg/L  $\text{Zn}^{2+}$ ; 0,2 und 2 mg/L  $\text{Fe}^{3+}$ ; 0,04 und 0,4 mg/L  $\text{Pb}^{2+}$ ; 2 und 20 mmol/L



**Abb. 6** Aufbau des Sensors

A: pH-Elektrode                      C: Gummikappe  
D: Rührzusatz                        B: Enzymmembran

EDTA; 2 mmol/L CDTA; 2 und 20 mmol/L Citronensäure; 3 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$  + 2 mmol/L Citronensäure in TRIS-Puffer pH 6 gelöst.

Zur Durchführung der Hemmung wird der Biosensor für 60 Minuten in eine auf 34 °C temperierte Hemmlösung getaucht, wobei gleichmäßig gerührt wird. Nach der Inhibierung wird die Elektrode mit destilliertem Wasser gespült und anschließend die verbleibende Restaktivität ( $U_H$ ) der Enzymmembran analog zur Bestimmung der Ausgangsaktivität ( $U_0$ ) ermittelt. Da die Membranen aufgrund der Herstellung und Lagerung unterschiedliche Aktivitäten aufweisen, muß vor jeder Messung die Ausgangsaktivität ( $U_0$ ) ermittelt werden

Die Hemmung wird nach folgender Formel berechnet:

Nach erfolgter Messung wird die Membran verworfen.

#### Herstellung albuminhaltiger Enzymmembranen:

3,8 g (entsprechen 53 mmol) Acrylamidmonomer und 0,2 g (entsprechen 1,3 mmol) BIS werden in 2 mL Phosphatpufferlösung gelöst und anschließend 125 Units AChE und 240 mg Albumin in dieser Polymerlösung aufgelöst. Vier Celluloseacetat-Membranen werden auf eine Glasscheibe gelegt. Zu der Enzym-Polymerlösung werden als Radikalstarter 8  $\mu\text{L}$   $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ -Lösung (entspricht einer absoluten Menge von  $7 \times 10^{-9}$  mol  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) und 2  $\mu\text{L}$  TEMED (entsprechend

0,0177 mmol) gegeben. Auf jede Membran werden 400  $\mu\text{L}$  der fertigen Lösung pipettiert und gleichmäßig ohne Blasenbildung verteilt. Eine zweite Glasplatte wird auf die erste gelegt und beide Platten mit Klammern fest gegeneinander gepreßt. Nach ca. einer Stunde ist die Polymerisation abgeschlossen. Danach können die Glasplatten entfernt und die Membranen in Phosphatpuffer bei 4 °C aufbewahrt werden.

Wir danken der Firma Dr. Bruno Lange GmbH für die Bereitstellung der Biosensor-Test Gesamtausstattung zur Durchführung dieser Arbeit.

#### Literatur

- [1] K. Haberer, S. Normann, M. Schmitz, Wasser + Boden Nr. 4 (1988) 177
- [2] P. Dilly, M. Welsch, Trinkwasserverordnung, 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1992
- [3] C. Wittmann, R.-D. Schmidt, U. Bilitewski, Nachr. Chem. Tech. Lab. 40 (1992) 1250
- [4] P. Herzsprung, L. Weil, R. Niessner, Vom Wasser 76 (1991) 51
- [5] A. Günther, U. Billitewski, Anal. Chim. Acta 300 (1995) 117
- [6] K. Stein, G. Schwedt, Vom Wasser 79 (1992) 211
- [7] L. Webb, Enzyme and Metabolic Inhibitors, Academic Press, New York, 1963
- [8] G. J. Moody, G. S. Sanghera, J. D. R. Thomas, Analyst 111 (1986) 1235
- [9] G. K. Budnikov, E. P. Medyantseva, S. S. Babkina, S. N. Volkov, J. Anal. Chem. USSR 44 (1989) 2253
- [10] G. Henninger, CLB 40 (1989) 9
- [11] W. H. R. Shaw, J. Am. Chem. Soc. 76 (1954) 2160
- [12] W. H. R. Shaw, D. N. Raval, J. Am. Chem. Soc. 83 (1961) 31847
- [13] B. Hughes, S. A. Katz, S. E. Stubbins, Enzymologia 36 (1965) 332
- [14] P. D. Boyer, The Enzymes, III and V, Academic Press, New York and London 1971
- [15] G. Schwedt, D.-O. Waldheim, K.-D. Neumann, K. Stein, Fresenius J. Anal. Chem. 346 (1993) 659
- [16] K.-D. Neumann, Dissertation TU Clausthal 1992
- [17] G. Schwedt, M. Hauck, Fresenius Z. Anal. Chem. 331 (1988) 316
- [18] Y. Hanazato, M. Nakako, S. Shiono, IEEE Trans. Elec. Dev. ED 33 (1986) 47

Korrespondenzanschrift:

Dr. Kathrin Stein  
Institut für Anorganische und Analytische Chemie  
der TU Clausthal  
Paul-Ernst Str. 4  
D-38678 Clausthal-Zellerfeld, Germany