

Entwicklung eines Smartphonephotometers zur Anwendung in der Umweltanalytik und dem Weinbau

Vom Fachbereich Maschinenbau und Verfahrenstechnik der Universität
Kaiserslautern zur Verleihung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

genehmigte

Dissertation

Vorgelegt von
M.Sc. Matthias Schäfer
aus Wadern

Dekan: Prof. Dr.-Ing. Tilmann Beck
Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Eberhard Kerscher
Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Roland Ulber
Prof. Dr. phil. habil. Jochen Kuhn

Datum der mündlichen Prüfung: 23.10.2019

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungen und Symbole.....	IX
Abstract	XI
Kurzzusammenfassung	XII
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen und Stand der Technik.....	5
2.1 Extinktionsmodelle	5
2.2 Trübungsmodelle	7
2.2.1 Transmissionsmessung.....	7
2.2.2 Streuungsmessung.....	8
2.3 Photometrische Bioassay.....	10
2.3.1 Kompetitive Inhibierung	11
2.3.2 Nicht kompetitive Inhibierung.....	11
2.3.3 Unkompetitive Inhibierung	12
2.3.4 Inaktivierung	12
2.3.5 Einzelstoffinhibierung	13
2.3.6 Mehrkomponenteninhibierung	16
2.3.7 Matrixeffekte	16
2.4 Photometrische Analytik am Smartphone	17
2.5 Photometrische Bioassays zum Nachweis von Schwermetallionen.....	19
2.5.1 Glucoseoxidase-Peroxidaseassay.....	19
2.5.2 Ureaseassay.....	21
2.6 Bestimmung des Oxidationsverhaltens von Weinen	23
2.6.1 Photometrischer Eisen(II)nachweis	25
2.6.2 Photometrischer Eisen(III)- und Totaleisennachweis.....	25

2.7	Bestimmung der Trübung von Weinen.....	26
2.7.1	Formazinstandardmethode und Trübungsskala	26
2.8	Additive Fertigungsverfahren	27
3	Entwicklung photometrischer Konzepte zur Verwendung an Smartphones ..	30
3.1	Allgemeine technische Anforderungen an die Lichtquelle.....	30
3.2	Betriebsprogramm zur Erfassung und Auswertung der Sensordaten und Gerätesteuerung	33
3.3	Küvettenbasierte Photometer zur Transmissionsmessung	34
3.3.1	Konzeptserie 1.....	35
3.3.2	Konzeptserie 2.....	38
3.3.3	Konzeptserie 3.....	41
3.4	Kapillarbasierte Systeme zur nephelometrischen Trübungsmessung	44
3.4.1	Konzeptserie 1.....	45
3.4.2	Konzeptserie 2.....	47
3.5	Kapillarbasierte Systeme zur Transmissionsmessung und Nephelometrie	49
3.5.1	Konzeptserie 1.....	50
3.5.2	Konzeptserie 2 Kombinationssystem Nephelometrie und Transmissionsmessung.....	52
4	Anwendungsfeld: Enzymatische Assays zum Schwermetallnachweis.....	55
4.1	Ureaseassay	55
4.1.1	Anforderungen an das verwendete Messlicht zur Transmissionsphotometrie.....	56
4.1.2	Bestimmung der minimal nachweisbaren Substratumsetzung	57
4.1.3	Charakterisierung der Einzelstoffinhibierung durch Schwermetallionen	58
4.1.4	Mehrkomponenteninhibierung	65
4.1.5	Matrixeffekte	70
4.2	Glucoseoxidase-Peroxidaseassay	71

4.2.1	Anforderungen an das verwendete Messlicht zur Transmissionsphotometrie.....	71
4.2.2	Charakterisierung der Einzelstoffinhibierung durch Schwermetallionen	74
5	Anwendungsfeld: Weinanalytik	76
5.1	Eisen(II)-, Eisen(III)- und Totaleisennachweis.....	76
5.1.1	Anforderungen an das verwendete Messlicht zur Transmissionsphotometrie.....	77
5.1.2	Eisen(II)- und Eisen(III)nachweis	78
5.1.3	Oxidation und Reduktion von Eisenspezies im Assay	81
5.1.4	Totaleisennachweis	82
5.2	Kapillarbasierte Modellmethode zur Trübungsmessung	86
6	Zusammenfassung und Ausblick	88
7	Literatur.....	91
	Anhang A Chemikalien	1
	Anhang B Geräte	1
	B.I Verwendete Geräte.....	1
	B.II Küvettenbasiertes Photometer zur Transmissionsmessung	2
	B.III Kapillarbasiertes Photo-/Nephelometer zur Transmissions- und Trübungsmessung	8
	Anhang C Methoden.....	1
	C.I Glucoseoxidase-Peroxidaseassay	1
	C.II Ureaseassay.....	3
	C.III Eisen(II)nachweis	4
	C.IV Eisen(III)nachweis	4
	C.V Totaleisennachweisnachweis mittels Ferrozin.....	5
	C.VI Totaleisennachweisnachweis mittels Ammoniumthiocyanat	5
	C.IIX Herstellung Formazinstandard	6

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reaktionsschema der ureasekatalysierten Hydrolyse von Urea [53].	21
Abbildung 2: Holoenzym Urease (EC 3.5.1.5) aus <i>Canavalia ensiformis</i> (Schwertbohne) [55].	22
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Komplexbildung von Ferrozin und Fe^{2+} [79].	25
Abbildung 4: Reaktionsschema der Komplexbildung von Ammoniumthiocyanat und Eisen(III)ionen in wässriger Lösung, X: 1-6; Y: 0-5; Z: -3-2 [86].	26
Abbildung 5: Reaktionsschema der Polymerisation von Formazin aus 1,3,5,7-Tetraazaadamantan und Hydrazoniumsulfat in wässriger Lösung. Als Zwischenprodukte entstehen Formaldehyd und Hydrazin.	27
Abbildung 6: Emissionsspektren der Blitzlicht-LED der untersuchten Smartphones, aufgenommen mit einem Fluoreszenzspektrometer (LS 55, PerkinElmer Inc.,USA) A: HTC one; B: Iphone 4; C: LG G3; D: Sony Xperia Z3.	31
Abbildung 7: A: Filterfolie, rot; B: Filterfolie, grün C: Filterfolie, blau; I: Emissionsspektren der Blitzlicht-LED (LG G3) überlagert durch Absorptionsspektren der verwendeten Filterfolien; II: Transmissionsspektren nach durchtreten der jeweiligen Filterfolie aufgenommen mit einem Fluoreszenzspektrometer (LS 55, PerkinElmer Inc.,USA).	32
Abbildung 8: Konzeptserie 1 des küvettenbasierten Smartphonephotometers mit Smartphone A: Frontansicht; B: Rückansicht; C: Explosionsdarstellung.	37
Abbildung 9: Konzeptserie 2 des küvettenbasierten Smartphonephotometers mit Smartphone A: Frontansicht; B: Rückansicht; C: Explosionsdarstellung.	40
Abbildung 10: Konzeptserie 3 des küvettenbasierten Smartphonephotometers mit Smartphone A: Frontansicht; B: Rückansicht; C: Explosionsdarstellung.	43
Abbildung 11: Konzeptserie 1 des kapillarbasierten Smartphone nephelometers zur Trübungsmessung; A: Frontansicht; B: Rückansicht.	46
Abbildung 12: Konzeptserie 2 des kapillarbasierten Smartphone nephelometers zur Trübungsmessung; A: Frontansicht; B: Rückansicht.	48
Abbildung 13: Konzeptserie 1 des kapillarbasierten Smartphonephotometers zur Transmissionsmessung; A: Gesamtansicht; B: halbtransparente Ansicht, Maßstab 1 cm.	51

Abbildung 14: Konzeptserie 2 des kapillarbasierten Smartphonephotometers/-nephelometers zur Transmissions- und Trübungsmessung, Maßstab 1 cm.....	53
Abbildung 15: Transmissionsspektren der Blitzlicht-LED der untersuchten Smartphones nach durchtreten der Filterfolie, grün, aufgenommen mit einem Fluoreszenzspektrometer (LS 55, PerkinElmer Inc.,USA) A: HTC one; B: Iphone 4; C: LG G3; D: Sony Xperia Z3; überlagert mit dem Absorptionsspektrum von Phenolphthalein gemessen am Laborspektrometer (Varian Cary 50 UV-vis, Agilent Technologies, USA).....	56
Abbildung 16: Ureabedarf zur Selbstjustierung des pH-Wertes bis zum Umschlagpunkt von Phenolphthalein des ureasebasierten Bioassay ($0,417 \mu\text{kat}\cdot\text{mL}^{-1}$ Urease) gemessen am Smartphonephotometer mit einem LG G3 (LG Corporation, Süd Korea) und grünem Filter, und einem UV-vis Spektrometer (Varian Cary 50 UV-vis, Agilent Technologies, USA) (n = 7).	58
Abbildung 21: Lineweaver-Burk Darstellung des Inhibierungsverhaltens verschiedener Schwermetallionen auf das ureasebasierten Bioassay ($0,417 \mu\text{kat}\cdot\text{mL}^{-1}$ Urease) bei variiertem Substratkonzentration (1, 2,5, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 100 mM) gemessen am Smartphonephotometer mit einem LG G3 (LG Corporation, Süd Korea) und grünem Filter, (n=7). A: CoCl_2 ; B: NiCl_2 ; C: AgNO_3 ; D: CuCl_2	60
Abbildung 22: Visualisierung der Nachweisgrenze (LOD) und Inhibierungsparameter des ureasebasierten Bioassay ($0,417 \mu\text{kat}\cdot\text{mL}^{-1}$ Urease) gemessen am Smartphonephotometer mit einem LG G3 (LG Corporation, Süd Korea) und grünem Filter,; p= 0,05 (n = 7).	61
Abbildung 23: Kumulative inhibitorische Effekte, gemessen am Smartphonephotometer, LG G3 (LG Corporation, Süd Korea) (n = 5); A: 10,0 nM CuCl_2 , 20 nM MnCl_2 , 20 nM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 20 nM NiCl_2 , 30 nM CoCl_2 ; B: 5,0 nM CuCl_2 , 5 nM MnCl_2 , 5 nM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 5 nM NiCl_2 , 5 nM CoCl_2 ; C: 6 μM NiCl_2 ; D: Trinkwasser; E: Meerwasser (Nordsee, November 2016); F: Flusswasser; CuCl_2 wird im Bereich von 0–3,0 μM zugegeben.	68
Abbildung 24: Reaktion des Ureaseassay auf erhöhte Salzkonzentrationen; A: CaCl_2 ; B: KCL; C: NaCl.	70
Abbildung 19: Transmissionsspektren der Blitzlicht-LED der untersuchten Smartphones nach durchtreten der Filterfolie, rot, aufgenommen mit einem Fluoreszenzspektrometer (LS 55, PerkinElmer Inc.,USA) A: HTC one; B: Iphone 4; C: LG G3; D: Sony Xperia Z3; überlagert mit dem Absorptionsspektrum von TMB-dimer,	

oxidiert gemessen am Laborspektrometer (Varian Cary 50 UV-vis, Agilent Technologies, USA).....	72
Abbildung 20: Transmissionsspektren der Blitzlicht-LED der untersuchten Smartphones nach durchtreten der Filterfolie, blau, aufgenommen mit einem Fluoreszenzspektrometer (LS 55, PerkinElmer Inc.,USA) A: HTC one; B: Iphone 4; C: LG G3; D: Sony Xperia Z3; überlagert mit dem Absorptionsspektrum von TMB-monomer, oxidiert, gemessen am Laborspektrometer (Varian Cary 50 UV-vis, Agilent Technologies, USA).....	73
Abbildung 17: Visualisierung des inhibitorischen Verhaltens von Kuper(II)ionen auf den Glucoseoxidas-Peroxidaseassay ($2 \mu\text{kat}\cdot\text{mL}^{-1}$ GOD; $6 \text{ nkat}\cdot\text{mL}^{-1}$ POD, 10 mM Glucose; $0,015 \mu\text{M}$ TMB, 0,1 M Acetatpuffer, pH 5,5) gemessen am Smartphonephotometer mit einem LG G3 (LG Corporation, Süd Korea); Konfidenzintervall $p= 0,05$ ($n = 7$).....	74
Abbildung 18: Visualisierung des inhibitorischen Verhaltens von Kuper(II)ionen auf den Peroxidaseassay ($4 \text{ nkat}\cdot\text{mL}^{-1}$ POD, 10 mM H_2O_2 ; $0,015 \mu\text{M}$ TMB, 0,1 M Acetatpuffer, pH 5,5) gemessen am Smartphonephotometer mit einem LG G3 (LG Corporation, Süd Korea); Konfidenzintervall $p= 0,05$ ($n = 7$).	75
Abbildung 25: Transmissionsspektren der Blitzlicht-LED der untersuchten Smartphones nach durchtreten der Filterfolie, grün, Abbildung 7, aufgenommen mit einem Fluoreszenzspektrometer (LS 55, PerkinElmer Inc.,USA) A: HTC one; B: Iphone 4; C: LG G3; D: Sony Xperia Z3; überlagert mit dem Absorptionsspektrum von Ferrozin gemessen am Laborspektrometer (Varian Cary 50 UV-vis, Agilent Technologies, USA).....	77
Abbildung 26: Eisen(II)nachweis mittels Ferrozin mit vorbeschichteten Kapillaren variierter Assaykompositionen (vgl. Tabelle 3) am kapillarbasierten Smartphonephotometer in Kombination mit einem Samsung A5, 6; unter Verwendung der grünen Filterfolie verwendet wurden Borosilikatglaskapillaren, v: $30 \mu\text{L}$, l: 30 mm; ($n=10$); Testlösung mit FeCl_2	80
Abbildung 27: Eisen(II)nachweis mittels Ammoniumthiocyanat mit vorbeschichteten Kapillaren variierter Assaykompositionen (vgl. Tabelle 4) am kapillarbasierten Smartphonephotometer in Kombination mit einem Samsung A5, 6; unter Verwendung der grünen Filterfolie; verwendet wurden Borosilikatglaskapillaren, v: $30 \mu\text{L}$, l: 30 mm; ($n=10$); Testlösung mit FeCl_2	81

Abbildung 28: A: Kinetik der Eisen(II)oxidation mittels Natriumpercarbonat unter Assaybedingungen; 0,2 M Ammoniumthiocyanat, 0,1 M Natriumpercarbonat, 0,35 mM FeCl ₂ ;	
B: Kinetik der Eisen(III)reduktion mittels Ascorbinsäure unter Assaybedingungen; 2 mM Ferrozin, 0,6 mM Neocuproin, 0,1 M Ascorbinsäure, 0,35 mM FeCl ₂ ; gemessen am Laborspektrometer (Varian Cary 50 UV-vis, Agilent Technologies, USA) (n=10).	82
Abbildung 29: Totaleisennachweis mittels Ferrozin mit vorbeschichteten Kapillaren variiert Assaykompositionen (vgl. Tabelle 5) am kapillarbasierten Smartphonephotometer in Kombination mit einem Samsung A5, 6; unter Verwendung der grünen Filterfolie; verwendet wurden Borosilikatglaskapillaren, v: 30 µL, l: 30 mm; (n=10); Testlösung mit FeCl ₃ .	84
Abbildung 30: Totaleisennachweis mittels Ammoniumthiocyanat mit vorbeschichteten Kapillaren variiert Assaykompositionen (vgl. Tabelle 6) am kapillarbasierten Smartphonephotometer in Kombination mit einem Samsung A5, 6; unter Verwendung der grünen Filterfolie; verwendet wurden Borosilikatglaskapillaren, v: 30 µL, l: 30 mm; (n=10); Testlösung mit FeCl ₂ .	85
Abbildung 31: Wellenlängenabhängige Messung der relativen Streulichtintensität von Formazinstandards nach ISO 7027 am Spektrometer (Varian Cary 50 UV-vis, Agilent Technologies, USA) unter Annahme fehlender Absorption durch Partikel.	86
Abbildung 32: Trübungsmessung von Formazinstandards nach ISO 7027 am Smartphone nephelometer (R ² : 0,9938), Smartphonephotometer in Kombination mit einem Samsung A5, 6 ohne Filter (R ² : 0,9718) und einem konventionellen Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm (R ² : 0,9979) (Varian Cary 50 UV-vis, Agilent Technologies, USA), (n = 5)	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Exemplarischer Überblick typischer spektrometrischer Anwendungen am Smartphone mit verwendeten Bauteilklassen, Stromversorgung und Auswertungsverfahren.....	18
Tabelle 2: Nachweisgrenze (LOD) und Inhibierungsparameter (IC_{50} , p) des ureasebasierten Bioassay ($0,417 \mu\text{kat}\cdot\text{mL}^{-1}$ Urease) im Vergleich zu F-AAS als Referenzverfahren; gemessen am Smartphonephotometer mit einem LG G3 (LG Corporation, Süd Korea); p-Wert 0,05 (n=7).....	63
Tabelle 3: Verwendete Assaykompositionen zur Kapillarbeschichtung zum Eisen(II)nachweis; verwendet wurden Borosilikatglaskapillaren, v: 30 μL , l: 30 mm; Befüllung der Kapillaren durch Kapillareffekt mit anschließender Trocknung bei 55°C, 24 h; (n=100).	78
Tabelle 4: Verwendete Assaykompositionen zur Kapillarbeschichtung zum Eisen(III)nachweis; verwendet wurden Borosilikatglaskapillaren, v: 30 μL , l: 30 mm; Befüllung der Kapillaren durch Kapillareffekt mit anschließender Trocknung bei 55°C, 24 h; (n=100).	81
Tabelle 5: Verwendete Assaykompositionen zur Kapillarbeschichtung zum Totaleisennachweis mittels Ferrozin; verwendet wurden Borosilikatglaskapillaren, v: 30 μL , l: 30 mm; Befüllung der Kapillaren durch Kapillareffekt mit anschließender Trocknung bei 55°C, 24 h; (n=100).....	83
Tabelle 6: Verwendete Assaykompositionen zur Kapillarbeschichtung zum Totaleisennachweis mittels Ammoniumthiocyanat; verwendet wurden Borosilikatglaskapillaren, v: 30 μL , l: 30 mm; Befüllung der Kapillaren durch Kapillareffekt mit anschließender Trocknung bei 55°C, 24 h; (n=100).....	84

Abkürzungen und Symbole

%	Prozent
[S] ₀	Substartkonzentration zum startzeitpunkt
3D	dreidimensional
Abs	Absorption
C	Stoffmengenkonzentration
c _i	Stoffmengenkonzentration des Inhibitors
CMOS	<i>Complementary metal-oxide-semiconductor</i>
D	Durchmesser
E	Extinktion
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
f _i	Inhibierungsfunktion
GOD	Glucoseoxidase
I	Lichtintensität
I	Inhibierungsfaktor
I ₀	Blindwert der Lichtintensität
IC ₅₀	Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft
I _s	Lichtintensität des Streulichts
kDa	Kilodalton
K _m	Michaeliskonstant
L	Liter
LED	<i>light emitting diode</i>
LFIA	<i>lateral flow immunoassay</i>
m	Meter
mg	Milligramm
Mm	Millimeter
M	Molar [mol·L ⁻¹]
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium
N	Newton
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid

NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Nm	Nanoometer
p	Steigungsparameter
POD	Peroxidase
r	Radius
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
v	Volumen
v	Reaktionsrate
v_{\max}	maximale Reaktionsrate
v_{\min}	minimale Reaktionsrate
E	molarer Extinktionskoeffizient
ϵ^*	scheinbarer molarer Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge

Abstract

The development of the first 3D-printable smartphone photometer for the acquisition of kinetic and static measurement data of enzymatic and chemical reactions on the smartphone without the use of additional electronic components or complex optical components will be presented. The development takes place both in the field of environmental analysis for the detection of heavy metal contamination in water samples within the scope of citizen sciences applications and as a point of need analysis system for industrial use in wineries with adapted objectives and example systems. For the different application areas different systems with different objectives are developed. A cell-based system will be developed with regard to the requirements of the citizen sciences area. A capillary based smartphone photometer and -nephelometer will be developed to optimally meet the requirements of wineries.

In the field of environmental analysis, enzymatic assays are used which are carried out in conventional cuvettes. The assays are based on the detection of inhibitory effects on the activity of enzymes and enzyme cascade cadences caused by heavy metal contamination in water samples. In the field of wine analysis, chemical/biological parameters are determined using a smartphone photometer. The photometric analysis is performed in assay capillaries that can be pre-assembled. This enables the realization of minimum requirements for the persons carrying out the test with maximum reproducibility of the test results.

The smartphone photometer is able to quantify changes in absorbance in the wavelength ranges of about 410-545 nm, 425-650 and 555-675 nm using the smartphone's own flashlight LED as a light source. The restriction of the specific wavelength is caused by the inhomogeneous emission spectra of the flashlight LED of the smartphone. Nephelometric turbidity measurements can be performed quantitatively up to a turbidity of 250 FNU.

Kurzzusammenfassung

Die Entwicklung des ersten 3D-druckbaren Smartphonephotometers zur Erfassung kinetischer und statischer Messdaten enzymatischer und chemischer Reaktionen am Smartphone ohne den Einsatz zusätzlicher elektronischer Komponenten oder aufwändiger optischer Komponenten wird vorgestellt. Die Entwicklung erfolgt sowohl im Bereich der Umweltanalytik zum Nachweis von Schwermetallbelastungen in Gewässerproben im Rahmen von *Citizen Sciences* Anwendungen als auch als *point of need* Analysesystem zum industriellen Einsatz in Winzereibetrieben unter jeweils angepassten Zielsetzungen und Beispielsystemen. Für die verschiedenen Anwendungsbereiche werden unterschiedliche Systeme mit angepassten Zielsetzungen entwickelt. Ein küvettenbasiertes System wird in Hinblick auf die Anforderungen des *Citizen Sciences* Bereichs entwickelt. Ein kapillarbasiertes Smartphonephotometer und –nephelometer wird entwickelt um den Anforderungen in Winzereibetrieben optimal zu entsprechen.

Verwendung finden im Bereich der Umweltanalytik enzymatische Assay, die in herkömmlichen Küvetten durchgeführt werden. Die Assays beruhen auf der Erfassung inhibitorischer Effekte auf die Aktivität von Enzymen und Enzymkaskaden durch Schwermetallbelastungen in Gewässerproben. Im Anwendungsfeld der Weinanalytik werden chemisch Parameter am Smartphonephotometer bestimmt. Die photometrische Analyse wird in vorkonfektionierbaren Assaykapillaren durchgeführt. Dies ermöglicht die Realisierung minimaler Anforderungen an die durchführenden Personen bei maximaler Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse.

Die Smartphonephotometer sind unter Verwendung der smartphoneeigenen Blitzlicht-LED als Lichtquelle in der Lage Änderungen der Extinktion in den Wellenlängenbereichen von 410-545 nm, 425-650 und 555-675 nm zu quantifizieren. Die Einschränkung der spezifischen Wellenlänge wird durch die inhomogenen Emissionsspektren der LED der Blitzlicht-LED des Smartphones verursacht. Nephelometrische Trübungsmessungen können bis zu einer Trübung von 250 FNU quantitativ durchgeführt werden.

1 Einleitung

Smartphones sind ein bedeutender Bestandteil des alltäglichen Lebens geworden. Sie haben die Kommunikation, den Daten- und Informationsaustausch sowie die Interaktion mit der Umwelt revolutioniert. Die Funktionalitäten von modernen Smartphones decken dabei weitestgehend die Funktionen herkömmlicher Computer ab und übersteigen diese in vielen Bereichen. Besondere Beachtung findet in diesem Zusammenhang die umfangreiche Sensorik, die in die Geräte integriert wird. Diese Sensorik dient primär der erleichterten Bedienbarkeit der Geräte und der automatischen Anpassung der Schnittstelleneinstellungen wie beispielsweise der Anpassung von Bildschirmhelligkeit und -farbton. Diese Sensoren eröffnen allerdings auch weitreichende Möglichkeiten im Bereich der *point of care* und *point of need* Analytik [1]. Die sensorischen Möglichkeiten der ersten Smartphones wurden seit ihrem kommerziellen Durchbruch untersucht. Vor allem der Einsatz für medizinische *point-of-care* Analysen bildete den Grundstein der Entwicklung von leistungsfähigen und kostengünstigen Zusatzgeräten mit unterschiedlicher Integration der smartphoneeigenen Sensoren, die den Endnutzern zu jedem Zeitpunkt, mobil und ohne zeitlichen Verzug gesundheitsrelevante Daten zur Verfügung stellen konnten. Bereits im Jahr 2009 wurden erste Studien veröffentlicht, die einen entsprechenden Einsatz von Smartphones in Kombination mit *Lab on a Chip* Applikationen im medizinischen Bereich untersuchten [2]. Durch die Weiterentwicklung der Prozessoren und der Sensorelemente, die in Smartphones eingesetzt werden sowie der daraus resultierenden Leistungssteigerung, konnten die analytischen Anwendungen an Smartphones stetig weiterentwickelt werden [3]. Neben medizinischen Untersuchungen, die bis dato zumeist auf der automatischen Auswertung von Farbreaktionen auf Teststreifen basierten [4], sind mit aktuellen Geräten anspruchsvollere Analysemethoden möglich [5–7]. Ein Beispiel für anspruchsvolle Analysemethoden am Smartphone ist die Entwicklung eines Chloridsensors zur Verwendung am Smartphone durch Zhang et al., 2017 [8]. Chloridmessungen im Schweiß von Patienten dienen in diesem Zusammenhang einer schnellen Diagnose eines erhöhten Mukoviszidoserisikos. Gerade in wirtschaftlich wenig entwickelten Regionen erschwert die mangelnde Verfügbarkeit und die hohen Kosten herkömmlicher Chloridsensoren die flächendeckende Durchführung entsprechender

Untersuchungen in Verdachtsfällen [9]. Zhang et al. ist es gelungen ein citratbasiertes System für Smartphones zu entwickeln, mit dem Chloridmessungen im Schweiß von Patienten kostengünstig und schnell an jedem Ort durchgeführt werden können. Grundprinzip ist dabei die Quantifizierung der Fluoreszenzauslöschung durch Chloridionen [10]. Das System bedient sich dabei der Blitzlicht-LED des Smartphones als Lichtquelle zur Anregung des Fluorophors und der geräteeigenen Kamera zur Quantifizierung der Fluoreszenzintensität. Durch den hohen Integrationsgrad des Smartphones in das Gesamtsystem werden die Komponentenkosten reduziert bei gleichzeitig hoher Mobilität.

Der Anwendungsbereich von analytischen Systemen am Smartphone liegt trotz der vielfältigen photometrischen Verfahren noch immer meist bei medizinischen Untersuchungsmethoden. Diese Fokussierung beruht auf dem hohen Bedarf leicht zu handhabender, mobiler und kostengünstiger Diagnosesysteme, wie dem beschriebenen Chloridsensor, in ländlichen Regionen verschiedener Entwicklungs- und Schwellenländern [11–13].

Das Potential von Smartphones in anderen Anwendungsbereichen, wie zum Beispiel der Erfassung umweltrelevanter Parameter, wurde bisher deutlich weniger beachtet. Verschiedene anthropogene Umweltkrisen wie die Wasserkrise in Flint, Michigan, bezüglich der Bleiverschmutzung der Trinkwasserversorgung als ein Beispiel für die Auswirkungen, die Schwermetallemissionen auf den menschlichen Körper, die Umwelt und die gesamte Gesellschaft haben können, haben den Bedarf an umweltanalytischen Anwendungen jedoch gesteigert.

Verunreinigungen in Boden und Wasser können das ökologische Gleichgewicht empfindlich stören und sich negativ auf die Biodiversität und wesentliche Stoffkreisläufe auswirken. Private Haushalte sind neben landwirtschaftlichen Nutzflächen und industriellen Produktionsstätten die größten Emissionsquellen von Schwermetallionen und -verbindungen. Das Verständnis der Auswirkungen von Schwermetallionen und die Sensibilisierung der Öffentlichkeit sowie die frühzeitige Erkennung potentieller Gefährdungen sind Voraussetzungen, um den Beitrag der Haushalte zu den Gesamtemissionen aktiv zu verringern. Um einen persönlichen Bezug der Bevölkerung zu schaffen und flächendeckende, messwertbasierte Risikobewertung zu ermöglichen ist eine einfache und effiziente Methode zum

Nachweis von Schwermetallen und zur Quantifizierung der gemischten Toxizität in Wasserproben von entscheidender Bedeutung. Der Bereich der *Citizen Sciences* befasst sich speziell mit der Erfassung und Bereitstellung von Messdaten durch die Bevölkerung und hat die Sensibilisierung für umweltrelevante Zusammenhänge als Zielsetzung. Die Messwerterhebung durch die Bevölkerung ermöglicht eine flächendeckende Erhebung von Messwerten für eine effektive Risikobewertung. Zumeist handelt es sich bei den bisher erhobenen Daten um Parameter im Bereich der Gewässerkontrolle sowie um Klimadaten. Gerade im Bereich der Umweltanalytik durch nicht wissenschaftlich ausgebildete Personen im Bereich der *Citizen Sciences* ist die hohe Mobilität, Verfügbarkeit und einfache Bedienbarkeit smartphonebasierter Analysesysteme ein besonderer Vorteil gegenüber herkömmlichen Analysegeräten. Vor allem photometrische und spektrometrische Anwendungen sind, bedingt durch ihre vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten und der großen Überschneidung der notwendigen Komponenten mit den smartphoneeigenen Funktionalitäten, von besonderem Interesse und haben das Potential in diesem Bereich einen maßgeblichen Beitrag zur Weiterentwicklung und Verbreitung moderner Methoden zu leisten.

Neben dem Einsatz im Bereich der *Citizen Sciences* können leistungsstarke Analysemethoden am Smartphone einen Betrag leisten kleine und mittelständige Unternehmen in die Lage zu versetzen eigenständige Prozess- und Produktkontrollen in Echtzeit durchzuführen und ihre Produktqualität deutlich zu steigern. Von besonderer Bedeutung ist dies für Betriebe in der Lebens- und Genussmittelindustrie. Durch den großen Anteil kleiner Betriebe stellt die Weinproduktion in diesem Zusammenhang einen besonders relevanten Betriebszweig dar. In kleinen Weibaubetrieben ist eine angemessene Analytik zumeist nur durch Auftragslabore zu leisten, wodurch es zu deutlichen Verzögerungen in der Einleitung etwaiger Gegenmaßnahmen bei Fehlentwicklungen in der Gärung oder Lagerung kommt. Hier können kostengünstige photometrische Anwendung am Smartphone einen Beitrag leisten die Situation der Winzerinnen und Winzer durch einfache *point of need* Analytik zu verbessern und zentrale chemische Parameter analytisch zugänglich zu machen.

Ziel dieser Arbeit ist es photometrische Systeme am Smartphone zu entwickeln, die den Anforderungen der Umweltanalytik als potentielle Systeme für *Citizen Sciences* Anwendungen sowie den Anforderungen in Winzereibetrieben gerecht werden. Zur Anwendung in der Umweltanalytik wird ein transmissionsphotometrisches System zur

Erfassung von Enzymkinetiken vorgestellt. Die Erfassung kinetischer Parameter von Enzymreaktionen dient als Basis der biosensorischen Schwermetallmessung in Gewässerproben. Der Einsatz von Smartphones in Winzereibetrieben wird durch die Entwicklung eines nephelometrischen Messaufbaus sowie kapillarbasierter transmissionsphotometrischer Systemen ermöglicht. Es wird die Entwicklung von entsprechenden Systemen unter variierten Anforderungen und Zielsetzungen dargestellt. Die Einsatzfähigkeit der entwickelten Systeme wird anhand von, den jeweiligen Anwendungsbereich angepassten, Messverfahren untersucht.

2 Theoretische Grundlagen und Stand der Technik

In den nachfolgenden Kapiteln werden die Grundlagen, auf denen photometrische und nephelometrische Anwendungen am Smartphone basieren sowie die verwendeten Verfahren zum Nachweis der praktischen Anwendbarkeit der entwickelten Systeme beschrieben.

2.1 Extinktionsmodelle

Die Messung der Extinktion ist ein weit verbreitetes Verfahren in der Analytik, speziell der Photometrie und Spektrometrie. Zur Differenzierung der Verfahren wird im weiteren die Bestimmung der Extinktion bei einer einzelnen Wellenlänge des einstrahlenden Lichts beziehungsweise in einem Wellenlängenbereich ohne Differenzierung von Teilbereichen als Photometrie bezeichnet. Spektrometrie bezeichnet die differenzierte Bestimmung der Extinktion bei unterschiedlichen einstrahlenden Wellenlängen des Messlichts. Die Extinktion beschreibt die Abschwächung eines Lichtstrahls beim Durchdringen von Materie. Sie ist dabei als Summe der Absorption, Streuung, Reflektion, Brechung und Beugung zu verstehen. Vereinfacht wird bei der Analyse gelöster Stoffe in der Regel der Einfluss des Analyten auf die Reflektion, Brechung und Beugung in der Probe vernachlässigt. Diese Effekte werden meist lediglich als Messaufbaukonstanten in Form einer Nullwertmessung berücksichtigt. Aus dieser vereinfachten Betrachtung ergibt sich das Lambert-Beer'sche Gesetz (Gl. 1) [14].

$$E_{\lambda} = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl. 1})$$

I	Transmittierte Lichtintensität [-]
I ₀	Einstrahlende Lichtintensität [-]
E	Extinktion [-]
ε	Extinktionskoeffizient [L·m ⁻¹ ·mmol ⁻¹]
c	Konzentration [mol·L ⁻¹]
d	Schichtdicke [m]
Index λ	Wellenlänge des Lichts [nm]

Wird die Extinktion in einem, nicht zu vernachlässigenden, Wellenlängenbereich und nicht bei einer einzelnen Wellenlänge bestimmt entspricht die Intensität des Messlichts dem Integral über den betrachteten Wellenlängenbereich (Gl. 2).

$$I_{0,12} = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} I_{\lambda} d\lambda \quad (\text{Gl. 2})$$

$I_{0,12}$	Lichtintensität Im Wellenlängenbereich 1-2 [-]
I_{λ}	Lichtintensität bei Wellenlänge λ [-]

Für die Intensität des transmittierten Lichts in einem Wellenlängenbereich gilt äquivalent in Abhängigkeit des Extinktionsspektrums (Gl. 3):

$$I_{12} = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \frac{I_{0,\lambda}}{10^{E_{\lambda}}} d\lambda \quad (\text{Gl. 3})$$

I_{12}	transmittierte Lichtintensität im Wellenlängenbereich [-]
$I_{0,\lambda}$	Lichtintensität bei Wellenlänge λ [-]

Die weitere Bestimmung der Extinktion im Wellenlängenbereich erfolgt durch einsetzen von $I_{0,12}$ und $I_{1,2}$ in (Gl. 1). Entscheidend für die gemessene Extinktion in einem Wellenlängenbereich ist damit die Intensität des Messlichts (I_0) im Extinktionsbereich des Analyten. Die Lichtintensität außerhalb des Extinktionsbereichs reduziert die gemessene Extinktion bei konstanter Konzentration des Analyten, entsprechend (Gl. 1).

Die vereinfachte Betrachtung der Extinktion als reine Absorption liefert bei der Untersuchung gelöster Stoffe, bedingt durch den geringen Einfluss der Stoffkonzentration auf Streuung, Reflektion, Brechung und Beugung, hinreichend exakte Werte. Bei der Untersuchung kolloidaler beziehungsweise partikulärer Systeme basiert die Extinktion hingegen maßgeblich auf Streuungseffekten, nicht auf Absorption. Entsprechend lässt sich das Lambert-Beer'sche Gesetz in diesen Fällen nur näherungsweise anwenden.

2.2 Trübungsmodelle

Die Trübung von Flüssigkeiten und Gasen durch partikuläre Einflüsse lässt sich, abhängig von der Größe und Konzentration der betrachteten Partikel, auf unterschiedliche Weise betrachten. Transmissionsphotometrische Messgeräte zeichnen sich durch ein weites Anwendungsspektrum im Bereich der Konzentrationsbestimmung gelöster Komponenten aus. Das weite Anwendungsspektrum führt zu einer flächendeckenden Verbreitung und guten Verfügbarkeit dieser Systeme im Laborbereich. Gemessen wird in diesem Fall die Intensität des transmittierten Lichts im Vergleich zu einer transparenten Probe gemäß des Lambert-Beer'schen Gesetzes. Dabei tragen Absorptions- und Streueffekte positiv zur gemessenen Trübung bei. In einigen Industrie- und Forschungszweigen hat sich hingegen die direkte Streuungsmessung mittels Nephelometrie durchgesetzt. Dies gilt vor allem im Bereich der Getränke- und Lebensmittelindustrie, wo mittels Nephelometrie unter anderem die Trübung von Getränken bestimmt wird. Die Nephelometrie ist eine direkte Messung der Streulichtintensität durch partikuläre Trübung. Absorptionseffekte tragen nicht positiv zur gemessenen Trübung bei.

2.2.1 Transmissionsmessung

Die Transmissionsmessung zur Beschreibung und Quantifizierung von Trübungsphänomenen bedient sich der gleichen Annahmen und Modelle wie die Extinktionsmessung gelöster Stoffe. Es wird eine abgewandelte Form des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Gl. 4) verwendet [15].

$$E_{\lambda} = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon_{\lambda}^* \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl. 4})$$

I	Transmittierte Lichtintensität [-]
I_0	Einstrahlende Lichtintensität [-]
E	Extinktion [-]
ε^*	scheinbarer Extinktionskoeffizient [$\text{L} \cdot \text{m}^{-1}$]
c	Konzentration [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]
d	Schichtdicke [m]
Index λ	Wellenlänge des Lichts [nm]

Im Fall der Trübungsmessung kann nicht von einem einfachen molaren Extinktionskoeffizienten ausgegangen werden. An seine Stelle tritt ein scheinbarer Extinktionskoeffizient (ϵ^*), der neben der Partikelkonzentration maßgeblich von der Partikelgröße und -form abhängig ist. Die Abhängigkeit von der Wellenlänge wird in erster Linie durch die Partikelgröße bestimmt. Die Abhängigkeit des scheinbaren Extinktionskoeffizienten steigt mit Verringerung des Partikeldurchmessers. Abhängig von der Größe der Partikel wird zwischen Rayleigh-, Mie- und geometrischer Streuung unterschieden.

Rayleigh-Streuung tritt an kleinen Partikeln auf, deren Durchmesser deutlich unterhalb der Wellenlänge des gestreuten Lichts liegt. Der Streuwinkel ist dabei stark Wellenlängenabhängig und teilt sich symmetrisch in eine Vorwärts- und Rückwärtsstreuung auf. Zusätzlich zu der Wellenlängenabhängigkeit der Streuung tritt eine Winkelabhängige Polarisation des Lichts auf.

Mie-Streuung tritt an Partikeln auf, deren Durchmesser im Bereich der Wellenlänge des gestreuten Lichts liegt. Der Streuwinkel ist leicht Wellenlängenabhängig und zeigt ein komplexes Verhältnis aus Vorwärts- und Rückwärtsstreuung. Eine teilweise Polarisation des Streulichts tritt in Abhängigkeit des Streuwinkels auf.

Geometrische Streuung tritt an Partikeln verschiedener Größen auf. Die Wellenlängenabhängigkeit der Streuung ist schwach ausgeprägt und nimmt mit zunehmender Partikelgröße ab. Eine Polarisation des Streulichts ist im Übergangsbereich zur Mie-Streuung zu beobachten.

Eine exakte Abgrenzung zwischen Mie-Streuung und geometrischer Streuung an Partikeln im μm -Bereich ist nicht möglich. Es existieren ausgeprägte Übergangsbereiche.

2.2.2 Streuungsmessung

Die Nephelometrie ist ein Verfahren zur direkten Quantifizierung der Lichtintensität durch Streuung an Partikeln in einer Flüssigkeit oder einem Gas. Die Streulichtdetektion erfolgt meist in einem Streuwinkel von 90° . Sie findet hauptsächlich in der Umweltüberwachung zur Beurteilung der Partikelbelastung der Luft, in der medizinischen Untersuchung von Plasmaproteinen und in der Lebensmitteltechnik zur

Qualitätskontrolle von klaren Getränken Anwendung [16,17]. Die Nephelometrie ist ein Standardverfahren in der Weinproduktion. Richt- und Grenzwerte für die Trübung von Weinen sowie für Ergebnisse von Untersuchungen, bei denen Trübungen entstehen, werden in nephelometric turbidity units (NTU) angegeben und verglichen [18]. Eine direkte Übertragung der Messwerte der unterschiedlichen Verfahren ist, bedingt durch die unterschiedlichen physikalischen Grundprinzipien nicht möglich. Als Basis der Nephelometrie wird meist die anisotrope Lichtstreuung an kleinen Partikeln nach der Rayleigh Formel (Gl. 5) verwendet [19].

$$I_S \sim \frac{n \cdot V^2}{r^2 \cdot \lambda^4} \cdot I_0 \quad (\text{Gl. 5})$$

I_S	Streulichtintensität in einem festen Winkel [-]
I_0	Einstrahlende Lichtintensität [-]
n	Teilchenanzahl [-]
V	Volumen des einzelnen Teilchens [m ³]
r	Entfernung vom beleuchteten Volumenelement [m]
λ	Wellenlänge einstrahlendes Licht [m]

Die Rayleigh-Formel stellt dabei einen linearen Zusammenhang zwischen der Partikelanzahl und der Intensität des gestreuten Lichts im betrachteten Volumenelement dar und ist stark von der Partikelgröße in Relation zur Wellenlänge des verwendeten Messlichts abhängig. Diese Annahme ist in den meisten Anwendungsfällen der Lebensmitteltechnologie eine deutliche Vereinfachung. Der Rayleigh-Effekt bezieht sich auf Partikel, deren Durchmesser deutlich kleiner als die Wellenlänge des gestreuten Lichts ist. Dies ist beispielsweise bei der Streuung durch Hefezellen oder Trübstoffen aus der Prozessierung von Früchten in der Regel nicht der Fall. Unter der Annahme, dass das beobachtete Volumen sowie das verwendete Messlicht in einem nephelometrischen Aufbau konstant gehalten werden ergibt sich, dass die Intensität des Streulichts von der Anzahl und dem Durchmesser der Partikel im beobachteten Volumenelement abhängig ist. Handelt es sich bei der Probe beispielsweise um eine Gärprobe, bei der die Trübung maßgeblich durch Hefen mit relativ uniformen morphologischen Eigenschaften hervorgerufen wird ergibt sich eine direkte Proportionalität zwischen der Anzahl der Hefen im beobachteten Volumenelement und der Intensität des Streulichts.

2.3 Photometrische Bioassay

Bioassays sind analytische Methoden, bei denen die Sensitivität und Selektivität gegenüber einem Analyten durch Interaktion mit einem biologischen System erzielt wird. Von besonderer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang neben Immunoassays, bei denen die hoch spezifische Interaktion von Antikörpern mit dem entsprechenden Antigen genutzt wird vor allem Enzymassays. Sie finden weite Anwendung im Bereich der klinischen Analytik aber auch im umweltchemischen und Lebensmittelbereich. Enzymassays können auf Basis verschiedener Enzymeigenschaften durchgeführt werden.

Eine Möglichkeit ist der Einsatz von Enzymen zum Nachweis des natürlichen oder eines modifizierten Substrates beziehungsweise Cosubstrates. Die Produkte dieser Reaktion werden durch Indikatoren in ein auswertbares Signal überführt. In diesem Fall ist der Nachweis sowohl durch die spezifische Interaktion des Enzyms mit dem verwendeten Substrat als auch durch die Indikation der jeweiligen Produkte auf Analyten begrenzt. Durch diese Begrenzung ist es möglich präzise Konzentrationsbestimmungen in komplexen Gemischen durchzuführen. Die Konzentrationsbestimmung kann sowohl auf Basis der Reaktionskinetik als auch anhand von Endpunktbestimmung nach vollständiger Umsetzung des Substrates erfolgen. Ein Beispiel für diesen Typ der Enzymassays ist die Blutzuckermessung mittels Glucoseoxidase.

Eine weitere Möglichkeit Enzyme zum Nachweis bestimmter Verbindungen zu nutzen ist die Untersuchung der Reaktionskinetik einer, durch das Enzym katalysierten Reaktion unter konstanten Bedingungen bei variiertem Konzentration des Analyten. Verringert sich die Reaktionsrate mit steigender Konzentration des Analyten und wird durch dessen Entfernung wieder vollständig hergestellt handelt es sich um einen reversiblen Inhibitor. Möglichkeiten der Beschreibung unterschiedlicher Effekttypen von Inhibitoren werden in den nachfolgenden Kapiteln behandelt. Die Interaktion möglicher Inhibitoren mit dem Enzym ist nicht auf das aktive Zentrum des Enzyms beschränkt und weniger spezifisch als die Interaktion eines Enzyms mit einem Substrat. Dadurch ist es möglich auf diese Weise Stoffe nachzuweisen, die kein Substrat für bekannte Enzyme sind und nicht auf direktem Weg mittels Enzymassays nachweisbar wären. Durch die geringere Spezifität im Vergleich zur Enzym-Substrat

Interaktion erhöht sich in komplexen Gemischen die mögliche Anzahl von Komponenten, die die Messung beeinflussen.

2.3.1 Kompetitive Inhibierung

Bei kompetitiven Inhibierungen handelt es sich bei dem Inhibitor in der Regel um eine Substanz, die dem natürlichen Substrat des Enzyms in ihren chemischen Eigenschaften ähnelt. Es liegt eine Konkurrenzreaktion um das aktive Zentrum des jeweiligen Enzyms vor. Entsprechend wird die Michaelis-Menten Konstante (K_m) in Abhängigkeit der Affinität des Inhibitors und dessen Konzentration in Bezug auf das natürliche Substrat erhöht (Gl. 6).

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]_0}{[S]_0 + K_m \cdot i} \quad (\text{Gl. 6})$$

v	Reaktionsrate [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]
v_{max}	maximale Reaktionsrate [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]
i	Restaktivitätsfaktor der Reaktionsrate, $i \in 0,1$ [-]
K_m	Michaelis-Menten Konstante [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$]
$[S]_0$	Substratkonzentration zum Zeitpunkt $t=0$ [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$]

Die Effektstärke steht im direkten Zusammenhang zum Verhältnis der Inhibitorkonzentration zur Substratkonzentration. Durch die Verwendung hoher Substratkonzentrationen kann der Effekt des Inhibitors vollständig aufgehoben werden. Die katalytische Aktivität des aktiven Zentrums bleibt durch den Inhibitor unbeeinflusst.

2.3.2 Nicht kompetitive Inhibierung

Nicht kompetitive Inhibitoren beeinflussen direkt die katalytische Aktivität des Enzyms ohne dessen Affinität zum Substrat zu reduzieren. Der Interaktionsort ist nicht klar lokalisiert und kann sowohl innerhalb als auch außerhalb des aktiven Zentrums oder in einem allosterischen Zentrum liegen. Eine nicht kompetitive Inhibierung ist unabhängig von der Substratkonzentration. Bei der Verwendung von Enzymassays ist eine Regeneration inhibierter Enzyme durch Entfernung des Inhibitors meist nicht

möglich. Wird in diesem Fall die Reaktionskinetik eines Enzyms in Anwesenheit eines Inhibitors bestimmt ist die Differenzierung zwischen einer reversiblen Inhibierung und einer irreversiblen Inaktivierung auf alleiniger Basis der kinetischen Parameter nicht möglich. Beide Vorgänge lassen sich in diesem speziellen Fall durch einen angepassten Michaelis-Menten Ansatz beschreiben (Gl. 7).

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]_0}{i \cdot ([S]_0 + K_m)} \quad (\text{Gl. 7})$$

v	Reaktionsrate [mmol·L ⁻¹ ·s ⁻¹]
v _{max}	maximale Reaktionsrate [mmol·L ⁻¹ ·s ⁻¹]
i	Restaktivitätsfaktor der Reaktionsrate, i ∈ 0,1 [-]
K _m	Michaelis-Menten Konstante [mmol·L ⁻¹]
[S] ₀	Substratkonzentration zum Zeitpunkt t=0 [mmol·L ⁻¹]

2.3.3 Unkompetitive Inhibierung

Eine unkompetitive Inhibierung beeinflusst sowohl die katalytische Aktivität des aktiven Zentrums als auch dessen Affinität zum Substrat. Kompetitive Inhibierungen treten auf wenn der Inhibitor nicht am freien Enzym, sondern am Enzym-Substrat Komplex bindet (Gl. 8).

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]_0}{([S]_0 + \frac{K_m}{i}) \cdot i} \quad (\text{Gl. 8})$$

v	Reaktionsrate [mmol·L ⁻¹ ·s ⁻¹]
v _{max}	maximale Reaktionsrate [mmol·L ⁻¹ ·s ⁻¹]
i	Restaktivitätsfaktor der Reaktionsrate, i ∈ 0,1 [-]
K _m	Michaelis-Menten Konstante [mmol·L ⁻¹]
[S] ₀	Substratkonzentration zum Zeitpunkt t=0 [mmol·L ⁻¹]

2.3.4 Inaktivierung

Bei einer Inaktivierung der enzymatischen Aktivität handelt es sich um einen irreversiblen Prozess. Die, zur Inaktivierung des Enzyms führende Reaktion, kann

dabei, vergleichbar der nicht kompetitiven Inhibierung, im aktiven Zentrum des Enzyms oder getrennt davon lokalisiert sein. Im Fall von Inaktivierungsprozessen durch Schwermetalle treten, gerade bei pflanzlichen Systemen, komplexe Mechanismen in Kraft, die zu einer erhöhten Schwermetalltoleranz führen, auf. Neben der Synthese von Komplexbildnern durch die Pflanze, die gezielt zur Chelatisierung von Schwermetallionen führen, weisen verschiedene pflanzliche Enzyme Bereiche hoher Schwermetallaffinität auf, die die enzymatische Aktivität auch bei Bindung von Schwermetallen nicht beeinflussen [20]. Durch die Bindung der Schwermetallionen außerhalb des aktiven Zentrums wird die enzymatische Aktivität bei niedrigen Schwermetallkonzentrationen nicht beeinflusst. Übersteigt die Schwermetallexposition die Kapazität der Bindungsstellen erfolgt eine Inaktivierung des Enzyms entsprechend der Schwermetallkonzentration. Da eine Regenerierung des Enzyms in Enzymassays nicht möglich ist, kann die Inaktivierung der Enzymaktivität äquivalent einer nicht kompetitiven Inhibierung beschreiben werden. Diese Annahme gilt für den Fall, dass die katalytische Aktivität des Enzyms, nicht jedoch die Affinität des aktiven Zentrums zum Substrat beeinflusst wird oder das aktive Zentrum durch Anlagerung des Inaktivators seine katalytischen Eigenschaften vollständig verliert.

2.3.5 Einzelstoffinhibierung

Im Fall von Enzymreaktionen kann die Reaktionsrate (v) unter konstanten Reaktionsbedingungen und konstanter Substratkonzentration explizit als Funktion der InhibitorKonzentration (c_i) ausgedrückt werden. Als Übertragungsfunktion dient eine Dose Response Funktion (Gl. 9) [21]. Die Funktion ist definiert durch die minimale und die maximale Reaktionsrate (v_{\min} , v_{\max}), die InhibitorKonzentration, die zu einer Reduzierung der Reaktionsrate um 50% führt (IC_{50}), die wirksame InhibitorKonzentration (c_i) und den Steigungsparameter (p). Der Zusammenhang gilt unabhängig vom Inhibierungsmechanismus und dessen Stärke.

$$v = v_{min} + \frac{(v_{max} - v_{min})}{1 + 10^{(IC_{50} - c_i) \cdot p}} \quad (\text{Gl. 9})$$

v	Reaktionsrate [mmol·L ⁻¹ ·s ⁻¹]
v _{min,max}	minimale; maximale Reaktionsrate [mmol·L ⁻¹ ·s ⁻¹]
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, bei der 50% der maximalen Reaktionsrate erreicht wird [μmol·L ⁻¹]
c _i	Inhibitorkonzentration [μmol·L ⁻¹]
p	Steigungsparameter [μmol ⁻¹ ·L]

Bei vollständiger Inhibierung der Enzymaktivität durch hohe Inhibitorkonzentrationen und unter der Annahme, dass die betrachtete Reaktion ohne enzymatische Aktivität nicht oder mit vernachlässigbarer Reaktionsrate abläuft kann der Zusammenhang vereinfacht dargestellt werden (Gl. 10). Bedingt durch die vollständige Inhibierung der Enzymreaktion kann die minimale Reaktionsrate (v_{min}) vereinfacht als null angenommen werden.

$$v = \frac{(v_{max})}{1 + 10^{(IC_{50} - c_i) \cdot p}} \quad (\text{Gl. 10})$$

v	Reaktionsrate [mmol·L ⁻¹ ·s ⁻¹]
v _{max}	maximale Reaktionsrate [mmol·L ⁻¹ ·s ⁻¹]
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, bei der 50% der maximalen Reaktionsrate erreicht wird [μmol·L ⁻¹]
c _i	Inhibitorkonzentration [μmol·L ⁻¹]
p	Steigungsparameter [μmol ⁻¹ ·L]

Zur Untersuchung und zum Vergleich unterschiedlicher Inhibitoren wird die Dose Response Funktion im Weiteren in, auf die Reaktionsrate in Abwesenheit eines Inhibitors, normierter Form verwendet (Gl. 11). Die anteilige Restaktivität wird beschrieben durch f_i.

$$f_i = \frac{v_{min} + \frac{(v_{max} - v_{min})}{1 + 10^{(IC_{50} - c_i) \cdot p}}}{v_{max}} \quad (\text{Gl. 11})$$

v	Reaktionsrate [mmol·L ⁻¹ ·s ⁻¹]
v _{min,max}	minimale; maximale Reaktionsrate [mmol·L ⁻¹ ·s ⁻¹]
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, v=v _{max} 0,5 [μmol·L ⁻¹]
c _i	Inhibitorkonzentration [μmol·L ⁻¹]
p	Steigungsparameter [μmol ⁻¹ ·L]

Der Steigungsparameter (p) kann als spezifisch für verschiedene Inhibitoren angesehen werden, sofern der inhibitorischen Wirkung unterschiedliche, unabhängige Mechanismen zugrunde liegen. In Umkehrschluss können bei signifikanten Differenzen im Steigungsparameter unterschiedlicher Inhibitoren unabhängige Effekte postuliert werden.

In Fall einer nicht kompetitiven Inhibierung oder irreversiblen Inaktivierung der Enzymaktivität, kann die anteilige Restaktivität zurück in einen Michaelis-Menten-Ansatz überführt und in Abhängigkeit zur Ausgangssubstratkonzentration ([S]₀) und den inhibitorischen Effekt (i) gesetzt und experimentell bestimmt werden (Gl. 12).

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]_0}{i \cdot ([S]_0 + K_m)} \quad \text{mit } i = f_i^{-1} \quad (\text{Gl. 12})$$

v	Reaktionsrate [mmol·L ⁻¹ ·s ⁻¹]
v _{max}	maximale Reaktionsrate [mmol·L ⁻¹ ·s ⁻¹]
i	Restaktivitätsfaktor der Reaktionsrate, i ∈ 0,1 [-]
K _m	Michaelis-Menten Konstante
[S] ₀	Substratkonzentration zum Zeitpunkt t=0 [mmol·L ⁻¹]

Zur Bestimmung der Mess- (LOQ) und Nachweisgrenze (LOD) dient im Weiteren die normierte Dose Response Funktion mit zugehörigem Konfidenzband mit einem Konfidenzniveau von 97,5% der jeweiligen Inhibitoren bei variiertem Konzentration. Die Nachweisgrenze wird definiert als die Inhibitorkonzentration, die, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p=0,05, maximal zu einer Reaktionsrate führt, die der minimal erwarteten Reaktionsrate in Abwesenheit des Inhibitors entspricht.

2.3.6 Mehrkomponenteninhibierung

Die Beschreibung von enzymatischen Reaktionssystemen mit mehreren Inhibitoren kann auf Basis verschiedener Annahmen erfolgen, die sich der inhibitorischen Parameter der Einzelinhibitoren (Gl. 9)-(Gl. 11) bedienen. Ein möglicher Grenzpunkt der Beobachtung ist die Annahme, dass sich verschiedene Inhibitoren in ihrer Wirkung nicht beeinflussen und die Enzymaktivität vollständig unabhängig beeinflussen. Diese Annahme lässt sich durch die Bliss-Unabhängigkeit beschreiben (Gl. 13) [22,23]. Die Annahme der Bliss-Unabhängigkeit setzt unterschiedliche Lokalisationen der Inhibierung oder vollständig unabhängige Wirkmechanismen voraus, die sich gegenseitig nicht beeinflussen.

$$f_{ij,n} = \prod_j^n f_i \quad (\text{Gl. 13})$$

Eine mögliche Gegenthese zur Bliss-Unabhängigkeit ist die Loewe-Additivitätstheorie (Gl. 14). Unter Anwendung dieser Theorie wird die Annahme getroffen, dass verschiedene Inhibitoren einen gemeinsamen Effekt zeigen, der durch die gewichtete Summe der individuellen Inhibitorkonzentrationen ausgedrückt werden kann [23,24]. Im Allgemeinen kann unter Annahme der Loewe-Additivität von einem gemeinsamen Wirkort sowie einem gemeinsamen Mechanismus der Inhibierung ausgegangen werden.

$$1 = \sum_j^n \frac{c_i}{f_i^{-1} \cdot f_{ij,n}} \quad (\text{Gl. 14})$$

Die Gewichtung erfolgt anhand der Stärke des jeweiligen Effektes des Einzelinhibitors. Dies entspricht der Gewichtung anhand des Steigungsparameters (p) der Einzelstoffinhibierung (Gl. 10).

2.3.7 Matrixeffekte

Als Matrixeffekt wird der Einfluss von Komponenten in Proben, die keine Analyten sind, bezeichnet. In komplexen Proben, wie Gewässerproben, handelt es sich potentiell um hoch komplexe Interaktionen mit dem Analyten oder dem Messsystem. Auf Grund der potentiell hohen Komplexität von Matrixeffekten können bei deren Untersuchung von

Analysesystemen meist nur die als zentral betrachteten Einflussfaktoren untersucht werden. Im Fall von Gewässerproben stellen der Salzgehalt, die Pufferkapazität und pH-Wert, Trübung und im Fall von Bioassays, die biologische Hintergrundaktivität zentrale Matriceigenschaften dar.

2.4 Photometrische Analytik am Smartphone

Die sensorische Ausstattung moderner Smartphones mit Umgebungslicht- und Näherungssensoren sowie CMOS-Chips (*Complementary metal-oxide-semiconductor*), als Komponente hochauflösender Kameras, und verschiedenen Lichtquellen bietet eine optimale Grundlage, die Geräte für photometrische und spektrometrische Anwendungen zu nutzen. Durch die Vielzahl möglicher Anwendungen ist eine Einteilung der Analysetechniken notwendig. Analytische Anwendungen am Smartphone lassen sich grundlegend nach der Integration der Smartphones in die Messkette in zwei Gruppen einteilen: Ansätze, bei denen das Smartphone lediglich als Benutzerschnittstelle dient oder zur Datenauswertung und Speicherung verwendet wird und Ansätze bei dem das Smartphone selbst beziehungsweise smartphoneeigene Komponenten als Sensor genutzt werden. Im Weiteren werden ausschließlich Systeme betrachtet, bei denen das Smartphone selbst zur Erfassung der Messgrößen dient. Beispiel für Anwendungsfelder, bei denen die smartphoneeigenen Sensoren zur Messwerterfassung dienen können sind neben Transmissionsmessungen [25,26] verschiedene mikroskopische Anwendungen [27,28], antikörperbasierte Systeme wie *lateral flow immunoassay* (LFIA) [29], *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) [29–31], antikörperbasierte Mie-Streuung [32–34] und Fluoreszenzmessungen [34–36]. Die meisten aktuellen Konzepte von photometrischen und spektrometrischen Anwendungen auf Basis von Smartphones erfordern externe elektronische oder optische Komponenten. In der Regel handelt es sich dabei um eine separate Lichtquelle, Linse, Gitter oder eine zusätzliche Stromversorgung [25,36–38].

Im Bereich der Smartphonephotometrie wurden Anwendungen zur Fluoreszenz- und Absorptionsmessung sowie zur Spektroskopie mit unterschiedlich hohem Integrationsgrad der smartphoneeigenen Komponenten entwickelt. Eine

exemplarische Übersicht verschiedener Systeme und den jeweils verwendeten Zusatzkomponenten ist in Tabelle 1 gegeben.

Tabelle 1: Exemplarischer Überblick typischer spektrometrischer Anwendungen am Smartphone mit verwendeten Bauteilklassen, Stromversorgung und Auswertungsverfahren.

Anwendung	Linsen	Spiegel	Licht- quelle	Blende/ Diffusor	Energie	Filter/ Gitter	Methode*	Referenz
Fluoreszenz	Ja	Ja	extern	-	extern	X	BA	[35]
Fluoreszenz	Ja	-	extern	-	extern	X	BA	[36]
Absorption, Fluoreszenz	Ja	-	extern	X	intern	X	BA	[39]
Absorption	Ja	-	extern	X	extern	X	BA	[25]
Spektrometrie	-	-	extern	X	extern	X	BA	[31]
Absorption	Ja	-	extern	X	extern	-	BA	[40]
Absorption	Ja	-	extern	X	intern	-	US	[41]

* BA: Bildauswertung; US: Direktauswertung des Umgebungslichtsensors

Alle beschriebenen Konzepte bedienen sich der additiven Fertigungsverfahren zur Herstellung verschiedener Gerätekomponenten. Dieser Produktionsansatz unterstützt die einfache Verbreitung und ermöglicht eine schnelle Prototypentwicklung. Dem gegenüber steht im Allgemeinen eine Fokussierung der Gerätekompatibilität auf einzelne Smartphones ohne die Möglichkeit einer Anpassung an andere Geräte. Eine Anpassung bedarf in der Regel konstruktiver Änderungen am Analysesystem und kann von Endverbrauchern nicht vorgenommen werden. Weiterhin ist es bisher nicht gelungen vielseitig einsetzbare und leistungsstarke Geräte zu entwickeln, die keine optischen Komponenten wie Linsen, Spiegel, Blenden oder Filter benötigen. In den meisten Fällen werden mehrere dieser Funktionalitäten benötigt. Die Verwendung dieser Komponenten hat einen signifikanten Einfluss auf die Komplexität und die Produktionskosten. Erhöhte Produktionskosten, hohe Komplexität und die Spezialisierung auf einzelne Smartphonebaureihen stehen den Zielen der Analytik an Smartphones diametral entgegen. Das Einsatzpotential in Schwellen- und Entwicklungsländern sowie in Bereichen, die über geringe Finanzmittel verfügen, wie dem allgemeinbildenden schulischen Bereich, hängt unmittelbar von den Gerätekosten und -Flexibilität ab. Die betrachteten Konzepte bedienen sich zusätzlich ausschließlich externer Lichtquellen zur Analyse von Proben sowie meist externer Energiequellen. Diese externen Komponenten stellen eine unvollständige Integration

der smartphoneeigenen Funktionalitäten dar und führen zu zusätzlich gesteigerten Gerätekosten. Zur optimalen Verbreitung ist es daher unerlässlich Systeme zu entwickeln, die möglichst ohne externe Bauteile und externe Energiequellen ein breites Anwendungsspektrum mit hinreichender Präzision bieten und den Einsatz an diversen Smartphones bei vollständiger Einbeziehung der smartphoneeigenen Komponenten ermöglichen.

2.5 Photometrische Bioassays zum Nachweis von Schwermetallionen

Bei der Anwendung von Enzymassays zum Nachweis von Schwermetallen ist eine Interaktion des Analyten als Substrat der Enzymreaktion nicht möglich. Bei den Assay, die im Weiteren beschrieben werden handelt es sich entsprechend um Assay, bei denen die katalytische Aktivität des Enzyms gegenüber einem Substrat untersucht wird, welches nicht den Analyten darstellt. Bestimmt wird die Stärke des inhibitorischen Effektes, den etwaige Schwermetallionen auf die Enzymreaktion ausüben sowie die Einordnung der Inhibierung in kompetitive, nicht kompetitive und unkompetitive Inhibierungseffekte sowie Inaktivierung durch einzelne Inhibitoren und Gemische verschiedener Inhibitoren im Zusammenspiel.

2.5.1 Glucoseoxidase-Peroxidaseassay

Mikrobielle Glucoseoxidase (GOD) erfährt derzeit aufgrund ihrer breiten Anwendung in der Chemie, Pharmazie, Lebensmittel, Getränke, klinischen Chemie, Biotechnologie und anderen Industrien große Aufmerksamkeit. GOD aus *Aspergillus niger* wird kommerziell für verschiedene Anwendungen eingesetzt [42,43]. Industriell wurde sie zur Herstellung von Gluconsäure und zur Lebensmittelkonservierung eingesetzt. Die wichtigste Anwendung ist die als Biosensor zur quantitativen Bestimmung von Glucose in Körperflüssigkeiten, Lebensmitteln, Getränken und Gärungsflüssigkeiten [42,44]. In verschiedenere Publikationen wurde der Einfluss von Schwermetallionen auf die katalytische Aktivität der GOD postuliert, jedoch nicht für sensorische Zwecke eingesetzt. In diesem Zusammenhang wurden Ag^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+}

und Zn^{2+} als starke Inhibitoren identifiziert [43,45–47]. Eine vollständige Inhibierung durch Ag^+ , Cu^{2+} , und Fe^{2+} wurde bei einer Konzentration von je 2 mM erreicht [45]. Hg^{2+} verursachte in der Konzentration von 2 mM eine Aktivitätsreduzierung von 93% [45]. GOD ist aufgrund ihrer niedrigen Kosten, guten Stabilität und hohen spezifischen Aktivität ein ideales Enzym zum Einsatz in Bioassays und Biosensoren. Trotz der optimalen Ausgangsbedingungen ist diese Verwendung außerhalb medizinischer Anwendungen in indirekten Bioassay, die auf Grundlage inhibitorische Eigenschaften arbeiten, wenig verbreitet [48]. GOD (EC 1.1.3.4.) katalysiert die Oxidation von β -D-Glucose durch molekularen Sauerstoff zu β -D-Gluconolacton, das anschließend spontan zu Gluconsäure hydrolysiert. GOD ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 150 bis 180 kDa, das zwei fest gebundene FAD-Moleküle enthält. Das Enzym ist sehr spezifisch für β -D-Glucose. Andere Monosaccharide können ebenfalls oxidiert werden, die Reaktionsraten liegen allerdings deutlich niedriger [48]. GOD wird bei der Anwendung in Bioassays oft in Kombination mit einer Peroxidase (POD) verwendet. Die POD dient dabei der katalytischen Umsetzung des, durch die GOD gebildeten, Wasserstoffperoxids. Die Umsetzung des Wasserstoffperoxids erfolgt in der Regel gemeinsam mit der Oxidation eines Indikators. Ein möglicher Indikator ist 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), welches durch photometrische Methoden leicht quantifiziert werden kann. In dieser Reaktion fungiert TMB als Wasserstoffdonator für die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser. Das entstehende Diimin zeigt eine intensive Färbung und bildet Dimere aus der oxidierten und der reduzierten Form [49]. Bei fortschreitender Oxidation liegt die oxidierte Form im Überschuss vor. Unter diesem Überschuss der oxidierten Form liegt TMB in monomerer Form vor, was zu einer Verschiebung des Absorptionsspektrums von 652 zu 450 nm führt. Um die enzymatische Aktivität der GOD in diesem Assaysystem zu bestimmen, muss POD im Überschuss vorliegen. Unter diesen Bedingungen kann näherungsweise davon ausgegangen werden, dass das gebildete Wasserstoffperoxid unverzüglich durch POD umgesetzt wird. Die gemessene Reaktionsrate hängt unter dieser Bedingung ausschließlich von der enzymatischen Aktivität der GOD als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ab.

2.5.2 Ureaseassay

Urease war das erste Enzym, das kristallisiert wurde [50]. Es handelt sich um eines der am weitesten verbreiteten Enzyme in der Natur. Die Struktur und Masse des Enzyms wird maßgeblich durch dessen Ursprung bestimmt, so unterscheiden sich pflanzliche und mikrobielle Urease signifikant. Nichts desto trotz existieren hoch konservierte Struktur motive im Bereich des aktiven Zentrums, die sich durch die Anwesenheit von Schwermetallionen beeinflussen lassen [51].

Urease (EC 3.5.1.5) ist ein nickelabhängiges Metalloenzym, das die Hydrolyse von Harnstoff zu Carbamidsäure und Ammoniak katalysieren. Durch spontane Hydrolyse der Carbamidsäure in wässrigen Milieu wird weiterer Ammoniak und Kohlendioxid freigesetzt [52]. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 1 dargestellt.

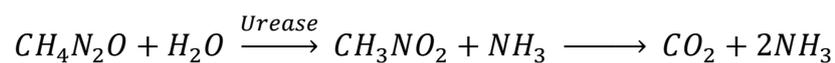


Abbildung 1: Reaktionsschema der ureasekatalysierten Hydrolyse von Urea [53].

Urease aus *Canavalia ensiformis* (Schwertbohne) bildet als Holoenzym ein Homohexamer, mit zwölf gebundenen Nickelatomen in den aktiven Zentren. Die Molekularmasse liegt zwischen 54,5 und 59,0 kDa [54]. Das Hexamer wird aus zwei locker verbundenen kompakten Trimeren gebildet. Der strukturelle Aufbau des Holoenzym ist in Abbildung 2 visualisiert.

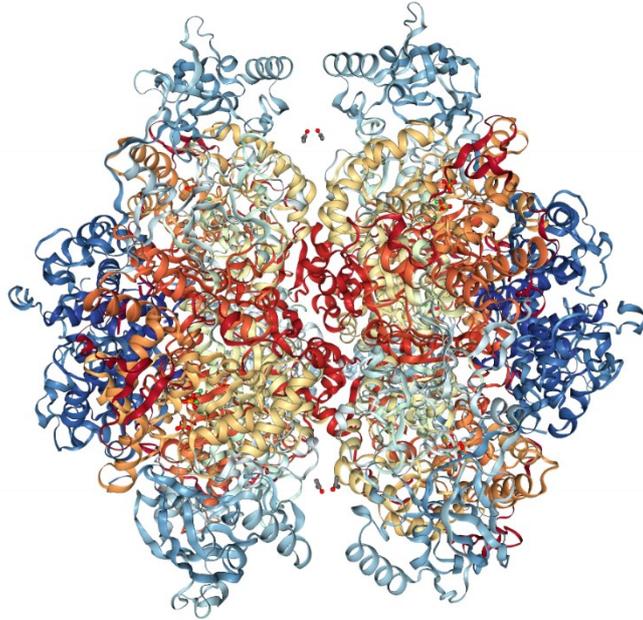


Abbildung 2: Holoenzym Urease (EC 3.5.1.5) aus *Canavalia ensiformis* (Schwertbohne) [55].

Das aktive Zentrum der Urease enthält zwei Nickelatome, die durch ein carboxyliertes Lysin verbunden sind. Ein Nickelatom wird durch zwei Histidingruppen, einen Asparaginsäurerest und ein Wassermolekül koordiniert. Das zweite Nickelatom wird lediglich durch zwei Histidingruppen und Wassermolekül koordiniert [56]. Weiterhin wird das aktive Zentrum durch zwei zusätzliche, freie Histidingruppen beeinflusst.

Einer der postulierten Mechanismen für die Harnstoffhydrolyse basiert auf der Theorie, dass die überbrückende Hydroxylgruppe den Harnstoff, der an der Carbonylgruppe am ersten Nickelatom gebunden ist, angreift. Eine Aminogruppe des Harnstoffes wird durch Nickel₂ gebunden. In dieser Konstellation wird eine Hydroxylgruppe übertragen, dies führt zur Freisetzung von Ammoniak [56].

Urease ist seit langem bekannt für ihre Empfindlichkeit gegenüber dem Einfluss von Schwermetallionen auf die katalytische Aktivität [57–60]. Die relative inhibitorische Wirkung von Schwermetallionen auf Urease aus Schwertbohnen wurde entsprechend hierarchisch in abfallender Reihenfolge bestimmt: Hg²⁺, Mg²⁺, Ag⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Pb²⁺, Mn²⁺ [61]. Trotz geringer Abweichungen in der Reihenfolge wurden Hg²⁺, Ag⁺ und Cu²⁺ konsistent als die Schwermetallionen mit der stärksten inhibitorischen Wirkung identifiziert [61–64].

2.6 Bestimmung des Oxidationsverhaltens von Weinen

Weine unterliegen während der Gärung und der Lagerung komplexen Oxidationsvorgängen, die sowohl für den spezifischen Charakter eines Weines als auch für Weinfehler verantwortlich sein können. Das Oxidationsverhalten von Weinen hängt von der chemischen Zusammensetzung und entsprechend von allen potentiellen Redoxpaaren ab. Bei oxidationsanfälligen Weinen führt bereits ein geringer Sauerstoffeintrag zu einem starken Anstieg des Redoxpotentials und zur Oxidation verschiedener Komponenten. Dies kann beispielsweise im Fall von Xanthyliumsalzbildung zu Fehlfarben, im Fall von 2-Aminoacetophenonbildung zu Fehleraromen führen [65–67]. Diese Fehlfarben und Fehleraromen führen zu einem deutlichen Qualitätsverlust bis hin zu Fehlchargen. Die Anwesenheit von gelösten Metallionen, insbesondere Kupfer- und Eisenionen, katalysieren entsprechende Oxidationsreaktionen, weshalb deren Konzentration möglichst frühzeitig bestimmt werden sollte, um entsprechende Gegenmaßnahmen einleiten und Fehlchargen vermeiden zu können [68]. Der Eintrag von Kupfer in den Wein erfolgt in erster Linie durch die Verwendung kupferhaltiger Pflanzenschutzmittel im Bioweinbau oder in Form von Kupfersulfat zur Bockserbehandlung. Böckser bezeichnet in der Weinproduktion generelle Fehleraromen durch Gärfehler, beispielsweise durch vermehrte Schwefelwasserstofffreisetzung [69].

Eisen und Kupfer gelangen auf physiologischen Weg aus dem Anbauboden in die Pflanzen oder durch den Kontakt mit Gerätschaften oder Behälter in den Wein. Die natürliche Eisenkonzentration verschiedener Weine liegt im Bereich von 2,3 bis 8,0 mg·L⁻¹ [70]. Die Kupferkonzentration von Weinen variiert stark durch den Einsatz von Kupfersulfat als Fungizid. Der gesetzliche Grenzwert liegt bei 1 mg·L⁻¹. Bei Kupferkonzentrationen von mehr als 0,5 mg·L⁻¹ kann es zu Trübungserscheinungen im Wein kommen [71]. Der Zusammenhang des Oxidationsverhaltens von Weinen und der Eisenkonzentration wurde in verschiedenen Studien untersucht. Cacho et al. (1995) untersuchten den Effekt von Eisen-, Kupfer- und Mangan-Sulfat auf die Oxidation von phenolischen Komponenten in Rotweinen und konnten zeigen, dass die Oxidationsgeschwindigkeit mit steigender Eisenkonzentration zunimmt [72]. Osmianski et al. (1996) wies die katalytische Wirkung von Eisen(II)Ionen auf die Oxidation von Catechinen in Modellsystemen nach [73]. Die Oxidationsprozesse in

Rotweinen sind in der Regel deutlich schneller und führen häufiger zu Fehleraromen und Fehlerfarben als in Weißweinen. Als Ursache für dieses Verhalten gilt die höhere Konzentration von oxidierbaren Stoffen in Rotwein, meist Phenolverbindungen [74]. In Wein können Eisenionen zusätzlich Komplexe mit Proteinen, Pektinen und Phenolen bilden, was zu unerwünschten Ausfällungsreaktionen führen kann [73]. Wenn die Eisenkonzentration einen weinabhängigen Grenzwert von $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ überschreitet, werden neben der gesteigerten Oxidationsanfälligkeit durch Reaktion mit phenolischen Komponenten oder Phosphaten zusätzlich schwarze beziehungsweise milchige Niederschläge beobachtet.

Bei einem Verdacht auf erhöhte Eisenkonzentrationen im Wein wurde früher die Blauschönung zur Korrektur verwendet, bei der Eisen durch die Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat ausgefällt und durch Filtration abgetrennt wird [75,76]. Stand der Technik ist der Einsatz von adsorptiven Polymeren auf Basis von Polyvinylpyrrolidon und Polystyrol beziehungsweise der Einsatz präventiver Maßnahmen zur Vermeidung von Schwermetalleinträgen [77,78]. Durch den Einsatz von adsorptiven Polymeren werden neben den unerwünschten Schwermetallen verschiedene Komponenten des Weins adsorbiert, die positiven Einfluss auf die Weinqualität haben. Dies führt zu einer reduzierten Qualität der Endprodukte. Um einen gezielten Einsatz dieser Hilfsmittel mit minimalem Qualitätsverlust zu erreichen ist eine genaue Analyse der Ausgangsprodukte unerlässlich.

Aktuellen Messverfahren zur Bestimmung der Ionenkonzentrationen in Weinen, wie die Voltametrie, basieren in der Regel auf Verfahren der Wasseranalytik und bedürfen entsprechender analytischer Ausstattung, die in Winzereibetrieben in der Regel nicht verfügbar ist. Die entsprechenden Untersuchungen werden in der Regel in Auftragslaboren mit mehrtägiger Verzugszeit durchgeführt, was eine möglichst frühzeitige Einleitung von Gegenmaßnahmen erschwert.

2.6.1 Photometrischer Eisen(II)nachweis

Dinatrium-4-[3-pyridin-2-yl-6-(4-sulfonatophenyl)-1,2,4-triazin-5-yl]benzosulfonat (Ferrozin) gehört zu der Gruppe der Ferrine, es wurde erstmals 1970 als Indikator zur photometrischen Eisen(II)bestimmung vorgestellt [80]. Haupteinsatzbereiche der Eisenbestimmung mittels Ferrozin sind die Wasseranalytik sowie die Bestimmung der Eisenkonzentration in Blutplasma [81,82]. Ferrozin zeigt in wässriger Lösung eine leicht gelbliche Farbe. Durch Bindung von Eisen(II)ionen entsteht ein Komplex, der

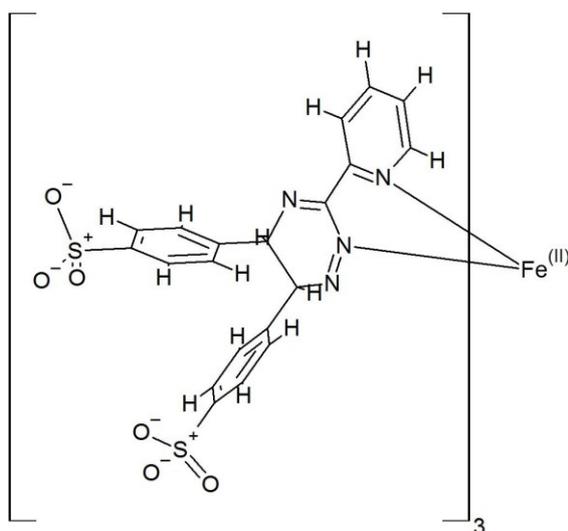


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Komplexbildung von Ferrozin und Fe^{2+} [79].

eine maximale Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm zeigt und photometrisch nachgewiesen werden kann. Der Molare Extinktionskoeffizient (ϵ_λ) bei 562 nm liegt bei $2800 \text{ L}\cdot\text{m}\cdot\text{mol}^{-1}$ [80]. Der molekulare Aufbau sowie das Komplexierungsschema sind in Abbildung 3 dargestellt.

Neben Eisen(II)ionen bilden Kupfer(II)ionen ebenfalls Komplexe mit Ferrozin, die eine maximale Extinktion bei 562 nm zeigen. Der Einfluss von Kupferionen kann durch die Zugabe von 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthrolin, das sehr stabile, farblose Komplexe mit Kupferionen bildet, unterbunden werden [83,84]. Ein Gesamteisennachweis ($Fe(II)$ und $Fe(III)$) ist mit Ferrozin unter der Zugabe von Ascorbinsäure als Reduktionsmittel möglich. In Anwesenheit von Ascorbinsäure werden gelöste Eisen(III)ionen zu Eisen(II)ionen reduziert.

2.6.2 Photometrischer Eisen(III)- und Totaleisennachweis

Der Einsatz von Ammoniumthiocyanat zur Bestimmung von Gelösteisen(III)konzentrationen ist ein, seit langem bekanntes Verfahren [85]. Ammoniumthiocyanat bildet mit Eisen(III)ionen Eisen(III)thiocyanat in verschiedenen Komplexen, was zu einer tief roten Färbung der Lösung führt. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 4 dargestellt.

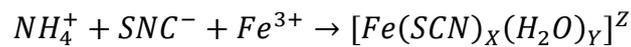


Abbildung 4: Reaktionsschema der Komplexbildung von Ammoniumthiocyanat und Eisen(III)ionen in wässriger Lösung, X: 1-6; Y: 0-5; Z: -3-2 [86].

Die Färbung kann bei einer Wellenlänge von 492 nm photometrisch Quantifiziert werden. Ein Gesamteisennachweis (Fe(II) und Fe(III)) ist mit Ammoniumthiocyanat unter der Zugabe von Natriumpercarbonat als Oxidationsmittel möglich. In Anwesenheit von Percarbonat werden gelöste Eisen(II)ionen zu Eisen(III)ionen oxidiert.

2.7 Bestimmung der Trübung von Weinen

Die Trübungsmessung in der Weinproduktion erfolgt traditionell durch Nephelometrie. Die Nephelometrie basiert auf der Messung der partikelbedingten Lichtstreuung gemäß Abschnitt 2.2.2. Eine exakte und vergleichbare Bestimmung der Trübung von Weinen ist für die Vergleichbarkeit zwischen den Produkten verschiedener Weingüter unerlässlich. Um die Vergleichbarkeit und Akzeptanz der Messung zu gewährleisten, ist die Verwendung nephelometrische Methoden zur Trübungsmessung in diesem Einsatzbereich unerlässlich. Die Trübungsmessung in der Weinproduktion erfolgt in verschiedenen Produktionsschritten unter variierten Zielsetzungen. Während der Gärung dient die Trübungsmessung in Kombination mit der Vitalitätsmessung der Untersuchung des Gärfortschritts. Nach der Filtration des fertigen Weins dient die Trübungsmessung der Qualitätskontrolle und der Bestimmung möglicher Weinefehler durch akute Trübung sowie der Neigung zur Ausbildung einer Eiweißtrübung im Rahmen von Forciertests [87]. Je mehr Trübung im Forciertest auftritt, desto höher ist der Bedarf an Schönungsmitteln, um den Proteingehalt des Weins vor der Abfüllung zu reduzieren [87].

2.7.1 Formazinstandardmethode und Trübungsskala

Im Weinbau werden Formazinstandards, in Anlehnung an Trinkwasseruntersuchungen nach ISO 7027 „*Water quality - Determination of*

turbidity“ zum Kalibrieren von Nephelometern verwendet. Entsprechend beziehen sich die Skalen zur Darstellung der Trübung auf Formazinstandards. Anerkannte Skalen nach ISO 7027 sind dabei *formazine attenuation units* (FAU) und *formazine nephelometric units* (FNU), die sich jeweils im Messverfahren unterscheiden und, bedingt durch Unterschiede in der Partikelgrößenverteilung von Formazinsuspensionen, nicht unmittelbar übertragbar sind. Im Weinbau werden ausschließlich Messungen in FNU verwendet. Es handelt sich um die Messung der Lichtstreuung durch Formazinpartikel in einem Streuwinkel von $90\pm 5^\circ$. Die Herstellung der Standards erfolgt, ebenfalls durch ISO 7027 normiert, durch eine Kondensationsreaktion in wässriger Lösung. Es werden eine wässrige 1,3,5,7-Tetraazaadamantanlösung ($100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) sowie eine wässrige Hydrazoniumsulfatlösung ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) zu gleichen Volumenanteilen gemischt und für 24 h bei einer Temperatur von $25\pm 0,3^\circ\text{C}$ inkubiert.

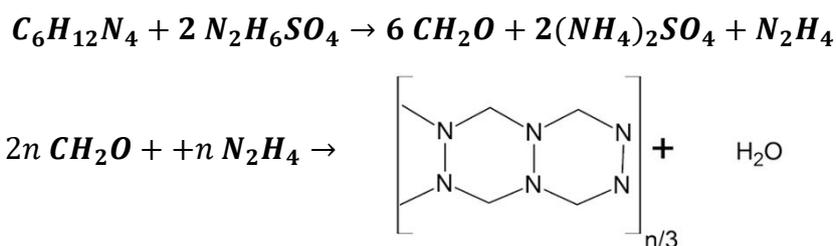


Abbildung 5: Reaktionsschema der Polymerisation von Formazin aus 1,3,5,7-Tetraazaadamantan und Hydrazoniumsulfat in wässriger Lösung. Als Zwischenprodukte entstehen Formaldehyd und Hydrazin

Das Reaktionsschema ist in Abbildung 5 dargestellt. Während der Inkubationszeit fällt Formazin als kolloidale Partikel aus. Der Durchmesser der Partikel liegt zwischen $0,42$ und $0,89 \mu\text{m}$ [88]. Die Trübung der Standardlösung liegt bei 4000 FNU, sie ist bei Raumtemperatur laut Norm vier Wochen lagerstabil.

2.8 Additive Fertigungsverfahren

Additive Fertigungsverfahren, oft als 3D-Druck bezeichnet, gehen auf die Entwicklung der Stereolithographie zur Produktion dreidimensionaler Objekte von Charles W. Hull aus dem Jahre 1984 zurück [89]. Das Verfahren wird neben der Digitaltechnik als eine der umwälzenden Technologien im Bereich der Produktion und allgemein für

potentielle Geschäftsmodelle der letzten Jahrzehnte bezeichnet [90,91]. Additive Fertigungsverfahren bieten unter anderem die Möglichkeit neue Konzepte für Analysegeräte dort zu produzieren wo sie benötigt werden und wechselnden Anforderungen schnell anzupassen. Durch die Digitalisierung bedürfen viele Produkte, vor allem Produkte, die grundlegend aus Informationen bestehen, wie beispielsweise Publikationen, Musik und Briefe keiner physischen Erscheinung mehr. Die rein digitale Form bietet dabei gegenüber der physischen Erscheinung den Vorteil eines ressourceneffizienten und schnellen Transports sowie einfacher Vervielfältigung und Archivierung. Für andere Produkt ist die physische Erscheinung für die Funktionalität zwingend erforderlich. Dennoch bietet die Verwendung digitale Abbildungen dieser Objekte im Bereich der Planung und Entwicklung große Vorteile und wird in allen entsprechenden Bereichen angewandt. Additive Fertigungsverfahren bietet die Möglichkeit die Vorteile der Digitalisierung zu nutzen und gleichzeitig die rein digitalen Objekte ohne zeit- und materialaufwendige Produktionsschritte in eine physische Erscheinung zu überführen. Neben der Möglichkeit Prototypen und individualisierte Produkte kostengünstig und zeitnah produzieren zu können schließt die Technologie der additive Fertigungsverfahren konsequent und ressourcensparend den Kreis zwischen Digitalisierung und physischer Realisierung unter weitgehender Bewahrung der jeweiligen Vorteile und ermöglicht eine flexible, ressourcensparende und schnelle Produktion variabler Güter.

Additive Fertigungsverfahren lassen sich nach ihrem Funktionsprinzip in unterschiedliche Kategorien, mit unterschiedlichen Möglichkeiten und Einsatzbereichen einteilen. Die gängigsten Gruppen sind dabei Laserpolymerisation, Lasersintern, Extrusion, Jettingverfahren, Elektronenstrahlsintern und im begrenztem Umfang adhäsive Verfahren [92]. Die Verfahren unterscheiden sich sowohl in der Art der verwendbaren Rohstoffe als auch in den mechanischen Eigenschaften der Resultate.

Bedingt durch die vergleichsweise geringen Anschaffungskosten und das einfache Benutzerhandling der Geräte sowie der Werkstoffe finden vor allem im Heimgebrauch sowie zur Produktion sehr geringer Stückzahlen Geräte Anwendung, deren Grundprinzip die Extrusion von thermoplastischen Materialien ist. In diesem Fall wird ein Rohstofffilament in einem Extruder bis zur Erweichung erhitzt beziehungsweise vollständig geschmolzen und als dünnes Filament, auf das zu druckende Objekt

aufgetragen. Die mechanische Belastbarkeit sowie die Auflösung und Präzision der Resultate dieses Verfahrens hängen von einer Vielzahl an Faktoren ab und lassen sich nur bedingt vorhersagen [93]. Die mechanische Belastbarkeit hängt, neben den Stoffeigenschaften des verwendeten Thermoplasts maßgeblich vom Grad der Verschmelzung und der Orientierung der einzelnen extrudierten Filamente ab. Ein gängiger thermoplastischer Kunststoff zur Verwendung in extrudierenden Filamentdruckern ist Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer (ABS). Die Zugfestigkeit von ABS liegt zwischen 32 und $56 \text{ N}\cdot\text{mm}^{-2}$. Die Belastbarkeit von Werkstücken, die mittels additiven Fertigungsverfahren durch Extrusion aus diesem Material hergestellt werden ist maßgeblich abhängig von der Orientierung der Krafteinwirkung. Die Zugfestigkeit solcher Werkstücke, in Orientierungsrichtung der gedruckten Filamente liegt mit $32,2$ bis $33,96 \text{ N}\cdot\text{mm}^{-2}$ im Bereich der reinen Stoffeigenschaften des ABS [94,95]. Die Zugfestigkeit orthogonal zur Filamentrichtung ist stark von der Drucktemperatur und dem daraus resultierenden Verschmelzungsgrad der Filamente abhängig. In empirischen Untersuchungen konnten Torrado et al. 2014 und 2015 eine maximale Zugfestigkeit von $17,73$ bis $18,4 \text{ N}\cdot\text{mm}^{-2}$ bezogen auf die Bauteilfläche nachweisen [94,95].

3 Entwicklung photometrischer Konzepte zur Verwendung an Smartphones

Ziel dieses Projektes ist die Entwicklung von transmissionsphotometrischen und nephelometrischer Systemen am Smartphone. Als Zielvoraussetzungen wurden die Messbarkeit der Absorption im sichtbaren Wellenlängenbereich des Lichts sowie die Durchführbarkeit von Trübungsmessungen unter verschiedenen Voraussetzungen verfolgt. Um eine einfache Verbreitung in hoher Stückzahl zu erreichen wurde ein möglichst kostengünstiges Design und flexible Produktionsmöglichkeiten der Hardware angestrebt. Als bevorzugte Betriebssysteme wurden auf Grund der offenen Systemarchitektur und des hohen Marktanteils von rund 83% auf dem deutschen Smartphone Markt, Stand September 2018, Androidsysteme gewählt [96].

Die Nutzung der smartphoneeigenen Sensoren und Lichtquellen wurde als Option definiert, um die Voraussetzung eines möglichst kostengünstigen Designs zu realisieren.

Der Flexibilisierung der Produktion im Sinne einer zeitsparenden Prototypenherstellung und schneller Verbreitung wurde durch die Wahl additiver Herstellungsverfahren Rechnung getragen. Um dem hohen Verwendungsgrad dieser Fertigungssysteme im Bereich der additiven Fertigungsverfahren zu berücksichtigen wird die Konstruktion zur Herstellung mittels extrudierender additiver Verfahren vorgesehen. Das angestrebte Herstellungsverfahren wurde bei der Konzeptionierung und der Konstruktion aller Prototypen berücksichtigt um eine optimale physische Realisierung zu ermöglichen. Die Prüfung der Herstellbarkeit und Qualität der mechanischen Ausführung ist Bestandteil der Bewertung von Prototypen.

3.1 Allgemeine technische Anforderungen an die Lichtquelle

Die Anwendbarkeit der smartphoneeigenen Lichtquellen für photometrische Zwecke hängt maßgeblich vom emittierten Lichtspektrum und dem Absorptionsspektrum der Probe beziehungsweise Assay, die untersucht werden sollen, ab. Weiterhin muss eine ausreichende Lichtintensität gewährleistet sein. Bedingt durch die deutlich höhere Lichtintensität der Blitzlicht-LED im Vergleich zum Bildschirm wurden im Weiteren

lediglich die Eigenschaften des emittierten Lichts der Blitzlicht-LED untersucht. Abbildung 6 zeigt die relative Intensität des emittierten Lichts der Blitzlicht-LED der untersuchten Smartphones.

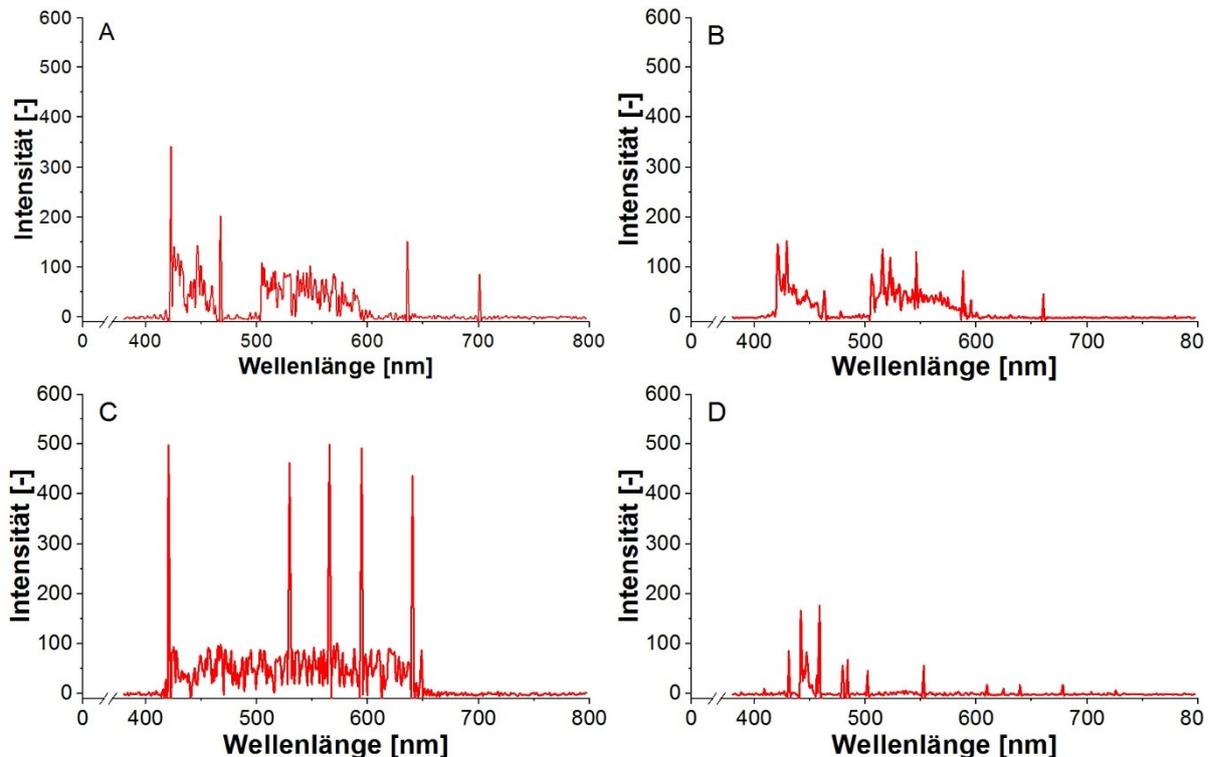


Abbildung 6: Emissionsspektren der Blitzlicht-LED der untersuchten Smartphones, aufgenommen mit einem Fluoreszenzspektrometer (LS 55, PerkinElmer Inc., USA) **A:** HTC one; **B:** Iphone 4; **C:** LG G3; **D:** Sony Xperia Z3.

Die Inhomogenität des Emissionsspektrums bedingt sich durch die Bauweise von Weißlicht-LED, wie der Blitzlicht-LED und LED-Bildschirmen. Weißlicht-LED sind aus verschiedenen roten, grünen und blauen LED zusammengesetzt. Diese Kombination zeigt sich entsprechend in den Emissionsspektren. Die Kombination dieser Spektralbereiche erscheint als weißes Licht auch wenn es sich nicht um vollspektrales Licht handelt. Die Inhomogenität des Emissionsspektrums der Lichtquelle ist bei der Auswahl potentieller Assays zu berücksichtigen. Ein ausreichender Anteil des emittierten Lichts muss durch die Absorption der Proben beziehungsweise des verwendeten Indikators des Assays beeinflusst werden um valide Messungen durchführen zu können. Der Einsatz optischer Filter zur Anpassung des emittierten Lichtspektrums ist auf Basis der Zielsetzung ein möglichst kostengünstiges Photometer zum Einsatz am Smartphone zu entwickeln nicht zielführend. Entsprechend werden zur Anpassung des Emissionsspektrums Filterfolien aus der

Beleuchtungstechnik verwendet. Die Absorptionsspektren der entsprechenden Filterfolien sowie die relative Intensität des transmittierten Lichts sind exemplarisch in Abbildung 7 dargestellt.

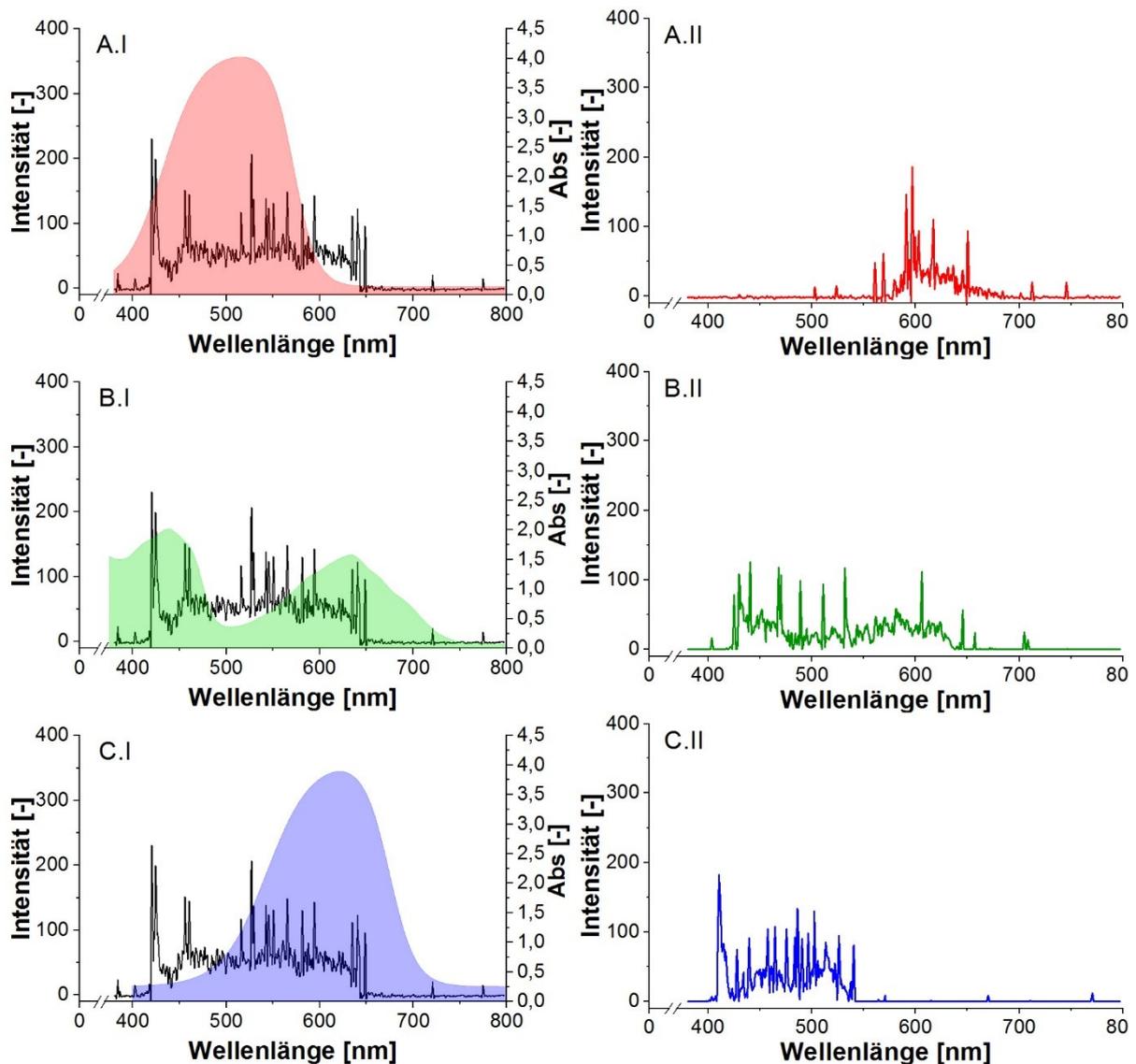


Abbildung 7: **A:** Filterfolie, rot; **B:** Filterfolie, grün **C:** Filterfolie, blau; **I:** Emissionsspektren der Blitzlicht-LED (LG G3) überlagert durch Absorptionsspektren der verwendeten Filterfolien; **II:** Transmissionsspektren nach durchtreten der jeweiligen Filterfolie aufgenommen mit einem Fluoreszenzspektrometer (LS 55, PerkinElmer Inc., USA).

Die Emissionsspektren der untersuchten Blitzlicht-LED liegen im Wellenlängenbereich von 410-675 nm. Absorptionsmessungen sind auf Grundlage der hohen Lichtintensität im gesamten Emissionsbereich möglich. Durch die Verwendung der Filterfolien kann der Emissionsbereich in Unterbereiche eingeteilt werden. Die Unterbereiche liegen bei

410-545 nm, 425-650 und 555-675 nm. Durch die Einteilung in Spektralbereiche wird die gemessene Absorption der verwendeten Indikatoren bei gleichbleibender Konzentration erhöht. Die Absorption kann in diesem Zusammenhang als Integral der Wellenlängenabhängigen Transmissionsintensität, gewichtet mit dem Absorptionsspektrum des verwendeten Indikators, betrachtet werden (vgl. Abschnitte 2.1).

3.2 Betriebsprogramm zur Erfassung und Auswertung der Sensordaten und Gerätesteuerung

Zum Betrieb des Smartphonephotometers mit verschiedenen Android-Smartphones wurde eine entsprechende Android-Applikation (App) programmiert und verwendet. Die App enthält verschiedene Unterroutinen zur Extinktionsbestimmung in Form von Punktmessung sowie kinetische und Langzeitmessungen. Das Unterprogramm für kinetische Messungen dient zur Untersuchung schneller Reaktionen wie dem Reaktionsverlauf von kolorimetrischen Bioassay. Im Fall von kinetischen Messungen ist keine vorherige Kalibration des Systems auf einen Nullwert (I_0) notwendig. Das Signal des Umgebungslichtsensors (I) ist die Grundlage für eine automatische Berechnung der Extinktion (E_λ). Die Anfangslichtstärke der Blitzlicht-LED nach Durchlaufen der Probe (I_0) dient als Basiswert für kinetische Messungen (Gl. 1). Bei der Bestimmung der initialen Lichtintensität ist eine einstellbare Verzögerung von 0,05 bis 1,0 Sekunden zwischen der Aktivierung der Blitzlicht-LED und der Messung der initialen Lichtintensität vorgesehen. Diese Verzögerung reduziert den Einfluss möglicher Variationen des emittierten Lichtspektrums und -intensität in der Einschaltphase der LED. Die Extinktion wird durch die App in Echtzeit grafisch ausgegeben und im Gerätespeicher hinterlegt. Die Differenz der Extinktion in einstellbaren Intervallen von 10 bis 1000 ms wird zur Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit verwendet (Gl. 15).

$$\frac{dE_\lambda}{dt} \approx \frac{\Delta E}{\Delta t} \approx v^* \text{ mit } \Delta t \approx 0 \quad (\text{Gl. 15})$$

Das Berechnungsintervall (Δt) ist entsprechend der erwarteten Reaktionsrate anzupassen, sodass in jedem Intervall näherungsweise von einer konstanten Reaktionsrate ausgegangen werden kann ($\Delta t \approx 0$). Bei den verwendeten Bioassays wurde ein Intervall von 50 ms verwendet. Die Berechnung der wellenlängenabhängigen Extinktion (E_λ) erfolgt, bedingt durch den erweiterten Wellenlängenbereich des verwendeten Messlichts als Integral über den Wellenlängenbereich (E) und die jeweilige Extinktion (Gl. 16).

$$E = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} E_\lambda d\lambda = \log \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \frac{I_{0,\lambda}}{I_\lambda} d\lambda \quad (\text{Gl. 16})$$

Die berechnete Reaktionsrate (v^*) wird in Echtzeit, gemeinsam mit der Extinktion grafisch dargestellt und im Gerätespeicher aufgezeichnet. Dabei gilt unter der Annahme, dass das Lambert-Beer'sche Gesetz (Gl. 1) gilt, dass die Reaktionsrate (v^*) proportional zur Reaktionsrate (v) ist, allerdings in Extinktionseinheiten pro Sekunde angegeben wird (Gl. 17).

$$v^* \simeq v \quad (\text{Gl. 17})$$

Dieser Übergang hat keine Auswirkung auf die Berechnung der inhibitorischen Wirkung als Quotient der Reaktionsrate und der maximalen Reaktionsrate unter Assaybedingungen (Gl. 11). Die maximale Reaktionsrate im Verlauf der Assayreaktion wird unmittelbar nach Abschluss einer Messung berechnet und separat ausgegeben. Obwohl die maximale Reaktionsrate zu Beginn der kinetischen Messung erwartet wird, wurden alle Messungen über einen Zeitraum von 30 Sekunden durchgeführt.

3.3 Küvettenbasierte Photometer zur Transmissionsmessung

Das küvettenbasierte Smartphonephotometer wurde auf Grundlage des Fazits bisheriger photometrischer Anwendungen am Smartphone in Abschnitt 2.4 entwickelt. Zielsetzung ist die Anwendbarkeit zum Nachweis von Schwermetallbelastungen in Gewässer- und Trinkwasserproben im Bereich der *Citizen Sciences* als *point of need* System. Um dieser Zielsetzung gerecht zu werden ist ein möglichst geringer

apparativer Aufwand, einfacher und schneller Verbreitbarkeit und einfaches Benutzerhandling unerlässlich.

Um den Apparative Aufwand und die damit verbundenen Gerätekosten zu minimieren wird ein Design angestrebt, in dem möglichst wenige optische Komponenten wie Linsen, Blenden, Spiegel und Filter benötigt werden. Ist der Einsatz solcher Komponenten unumgänglich sind grundsätzlich möglichst kostengünstige Substitutionskomponenten zu herkömmlichen Komponenten aus der Optik anzustreben.

Die Verbreitung der Systeme wird neben der Verwendung einfacher Komponenten maßgeblich durch die verwendeten Fertigungsverfahren bestimmt. Durch den Einsatz additiver Fertigungsverfahren kann die Verbreitung in digitaler Form angestrebt werden. Die Produktion wird auf diese Weise dezentralisiert wodurch Transportzeiten sowie hoher Ressourceneinsatz zum Transport entfallen. Zusätzlich ist eine Anpassung oder Variation des Systems durch Anwender auf diese Weise bei wechselnden Anforderungen realisierbar.

Um den Einsatz als *point of need* System zu ermöglichen ist neben der technischen Integration der smartphoneeigenen Komponenten zu berücksichtigen, dass die Mobilität der Smartphones durch die analytischen Komponenten unbeeinflusst bleiben sollte. Entsprechend ist ein kompaktes Design anzustreben, dass einen geringen Energiebedarf, der die Laufzeit des Smartphones belastet, aufweist.

Die Entwicklung des küvettenbasierten Smartphonephotometers erfolgte in drei maßgeblichen Konzeptserien mit jeweils ansteigender Realisierung der Zielsetzungen.

3.3.1 Konzeptserie 1

Das Ausgangskonzept des Smartphonephotometers basiert auf bisherigen Entwicklungen in diesem Bereich. Als Lichtquelle wird, anders als bei bisherigen Konzepten, die in der Literatur beschrieben sind, die Blitzlicht-LED des Smartphones verwendet. Durch die Verwendung der Blitzlicht-LED wird der zusätzliche Bedarf elektronischer Komponenten reduziert. Weiterhin entfällt die Notwendigkeit einer zusätzlichen Energiequelle zur Versorgung etwaiger Elektronik. Zur Detektion des

Transmittierten Lichts ist die rückseitige Hauptkamera des Smartphones vorgesehen. Das Gesamtsystem ist in Abbildung 8 dargestellt.

Das Smartphonephotometer der ersten Konzeptserie besteht aus zwei Baugruppen: Einer Basisplatte, die der Fixierung und Positionierung am Smartphone dient sowie einer Küvettenkammer, die alle notwendigen Funktionalitäten zur Lichtführung und Probeaufnahme enthält.

Die Basisplatte kann auf das jeweilige Smartphone aufgesteckt werden. Sie ist individuell an das, zur Verwendung vorgesehene Smartphone angepasst und kann ohne konstruktive Änderungen nicht an anderen Smartphones verwendet werden. Für unterschiedliche Smartphones sind jeweils individuelle Basisplatten vorgesehen. Die Fixierung am Smartphone erfolgt durch einen Rahmen mit vier frontseitigen Haken. Rückseitig befinden sich zwei Lichtdurchlässe an der Basisplatte, die das Durchtreten des emittierten Lichts der Blitzlicht-LED sowie auf die Kamera ermöglichen.

Zusätzlich befindet sich an der Basisplatte eine geteilte Schalenschwanzpassung mit zentraler Führungsschiene. Dieses Schienensystem dient der exakten Positionierung der Küvettenkammer an der Basisplatte.

Die Küvettenkammer dient der Aufnahme und Positionierung einer Filterkassette, der Probenküvette, sowie zweier Spiegel zur Führung des Messlichts auf die Kamera des Smartphones. Weiterhin besitzt die Küvettenkammer zwei Öffnungen als Lichtdurchlässe, die deckungsgleich zu den Öffnungen in der Basisplatte positioniert sind. Das von der Blitzlicht-LED emittierte Licht durchtritt die Öffnungen der Basisplatte und der Küvettenkammer, wird durch den Folienfilter in der Filterkassette der jeweiligen Probe angepasst, durchtritt die Probe, in der es entsprechend der Absorption abgeschwächt wird und wird durch die Spiegel auf die Kamera geleitet, durch die die Detektion der Lichtstärke erfolgt. Die Spiegel stehen jeweils in einem Winkel von 45° zum vorgesehenen Strahlengang und lenken das transmittierte Licht entsprechend um 90° ab.

Die Küvettenkammer kann universell an variierten Basisplatten verwendet werden.

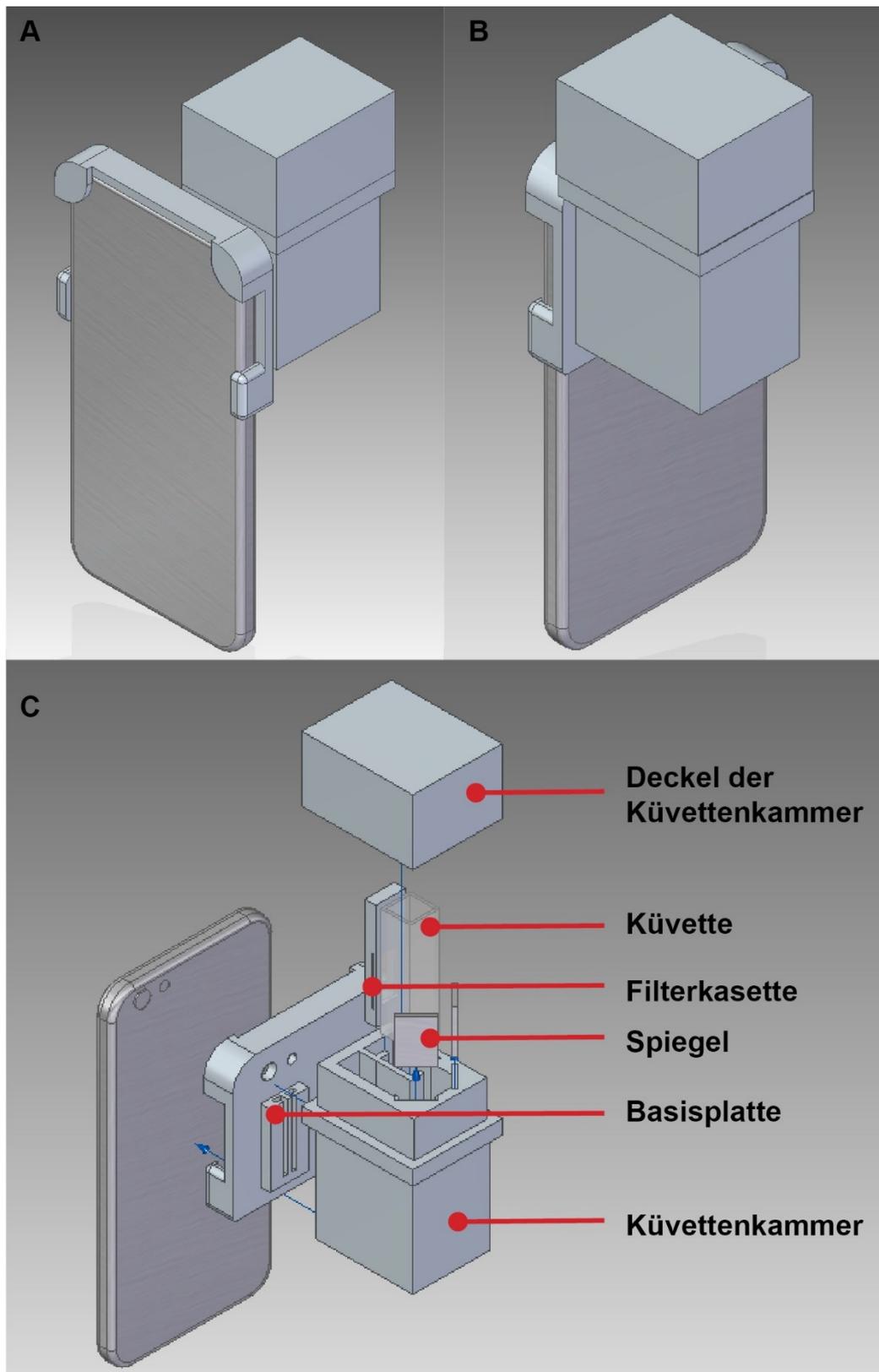


Abbildung 8: Konzeptserie 1 des küvettenbasierten Smartphonephotometers mit Smartphone **A:** Frontansicht; **B:** Rückansicht; **C:** Explosionsdarstellung.

Die Verwendung einer nicht anpassbaren Basisplatte mit universell verwendbaren Küvettenkammer entspricht der Forderung eines möglichst universellen Systems nur teilweise. Die Verwendung der Kamera als Detektor verursacht auf Grund der räumlichen Nähe zur Blitzlicht-LED konstruktive Herausforderungen und ist für nicht spektral auflösende Messungen, die ohne entsprechende optische Komponenten nicht möglich sind, ohne Vorteil gegenüber der Verwendung anderer Komponenten zur Intensitätsmessung einfallenden Lichts, wie beispielsweise dem Umgebungslichtsensor. Die Verwendung von Spiegeln zur Führung des Strahlengangs entspricht ebenfalls nicht der Anforderung möglichst kostengünstige optische Komponenten oder Substitutionskomponente zu verwenden. Weiterhin bedarf die Verwendung von Spiegeln eine winkelgenaue Montage, was dem Einsatz als *Citizen Sciences* System, welches durch die Verwender mittels additiver Verfahren gefertigt werden kann, entgegensteht.

3.3.2 Konzeptserie 2

Die zweite Konzeptserie des Smartphonephotometers basiert auf den Erkenntnissen der ersten Konzeptserie. Die Verwendung der Blitzlicht-LED wurde weiterhin als vielversprechende Option der maximalen Integration der smartphoneeigenen Komponenten verfolgt. Dies wurde neben den allgemeinen Zielsetzungen durch die parallele Untersuchung der Emissionsspektren sowie Absorptionsspektren der entwickelten Assaysysteme, Abschnitt 3.1, unterstützt. Die Detektion der transmittierten Lichtstärke erfolgt abweichend von Konzeptserie 1 durch den Umgebungslichtsensor. Dies ermöglicht durch die größere räumliche Differenz zwischen Lichtquelle und Detektion größere konstruktive Freiheit und reduziert das Risiko einer Beeinflussung der detektierten Lichtintensität durch direktes Streulicht, welches die Probe nicht durchtreten hat.

Das Smartphonephotometer der zweiten Konzeptserie besteht weiterhin aus zwei Baugruppen, die grundlegend die gleiche Funktion erfüllen wie ihre Entsprechungen der ersten Konzeptserie. Die monolithische Basisplatte wurde durch ein weitgehend anpassbares Haltesystem ersetzt. Die Konstruktion der Küvettenkammer wurde der Verwendung des Umgebungslichtsensors des Smartphones angepasst. Die Spiegel

wurden durch einen kostengünstigen Polymerlichtwellenleiter ersetzt. Das Gesamtsystem ist in Abbildung 9 dargestellt.

Das Haltesystem besteht aus einer oberen Frontschiene zur Anbringung des Lichtwellenleiters, die auf das Smartphone aufgesteckt wird. Die Frontschiene muss individuell für verschiedene Smartphones angepasst werden um eine optimale Positionierung zu erzielen. Sie beinhaltet eine Schwalbenschwanzführung mit entsprechendem Gegenstück zur Anbringung des Lichtwellenleiters mittels Presspassung. Die Positionierung auf dem Umgebungslichtsensor wird durch horizontale Verschiebbarkeit der Passung in der Führungsschiene erreicht. An der Rückseite der Frontschiene befindet sich eine weitere Schiene zur Anbringung einer variierten Basisplatte mittels zwei verschiebbaren Haken. Die Basisplatte besitzt eine vertikale Schwalbenschwanzführung zur anpassbaren Positionierung der Küvettenkammer sowie als Lichtdurchlass des emittierten Lichts der Blitzlicht-LED. Die Fixierung der Basisplatte wird durch einen zusätzlichen, einstellbaren Haken an der Unterseite gewährleistet.

Die Küvettenkammer konnte durch den Einsatz eines Lichtwellenleiters deutlich verkleinert werden. Sie dient weiterhin der Aufnahme und Positionierung einer Filterkassette, der Probenküvette und der Fixierung des Lichtwellenleiters zur Führung des Messlichts auf den Umgebungslichtsensor nach durchtreten der Probe. Die Küvettenkammer der zweiten Konzeptserie benötigt lediglich eine Öffnung als Lichtdurchlass für das, von der Blitzlicht-LED emittierte Licht. Das in die Küvettenkammer einfallende Licht wird durch den Folienfilter in der Filterkassette der jeweiligen Probe angepasst, durchtritt die Probe, in der es entsprechend der Absorption abgeschwächt wird und wird durch den Lichtwellenleiter auf den Umgebungslichtsensor geführt.

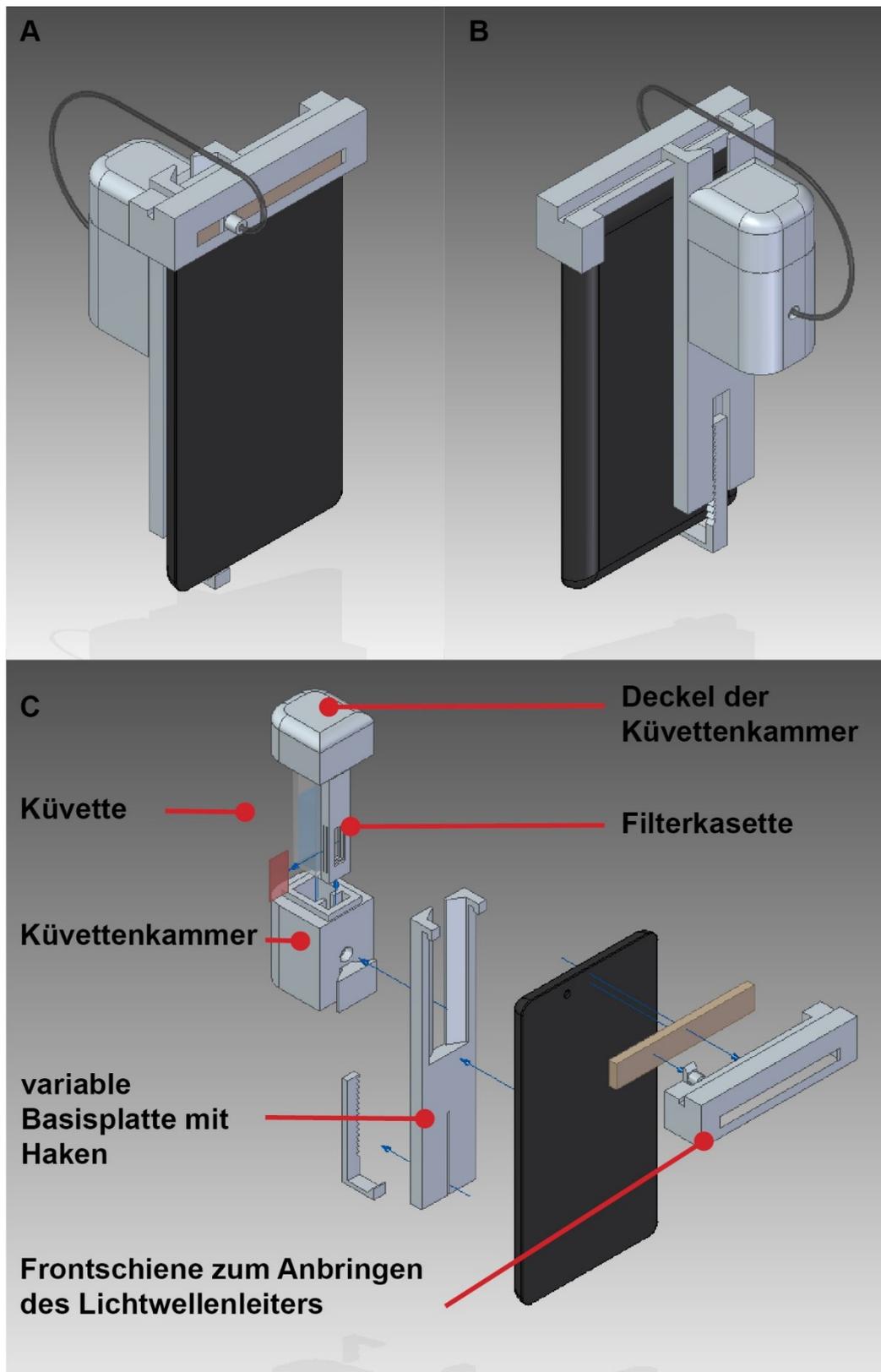


Abbildung 9: Konzeptserie 2 des küvettenbasierten Smartphonephotometers mit Smartphone **A:** Frontansicht; **B:** Rückansicht; **C:** Explosionsdarstellung.

Die zweite Konzeptserie stellt eine deutliche Annäherung an die Zielsetzung dar. Es werden keine herkömmlichen optischen Komponenten verwendet. Einsatz finden lediglich kostengünstige Substitutionskomponente aus der Lichttechnik.

Die Verwendung des anpassbaren Haltesystems mit universell verwendbaren Küvettenkammer entspricht weitgehend der Zielsetzung eines universell verwendbaren Systems. Die Verwendung der Kamera als Detektor wurde durch die Verwendung des Umgebungslichtsensors ersetzt. Die entstandenen konstruktiven Freiheiten konnten genutzt werden um das System anpassbarer zu gestalten. Nichts desto trotz stellt die Frontschiene als zentrale, nicht anpassbare Komponente eine deutliche Einschränkung bei der Realisierung der universellen Einsetzbarkeit dar.

3.3.3 Konzeptserie 3

Das küvettenbasierte Smartphonephotometer der dritten Konzeptserie besteht aus zwei Baugruppen, der Messkammer und dem vollständig variablen Befestigungssystem. Die Messkammer setzt sich aus einem geschlossenen Küvettenhalter mit Deckel sowie den Filterelementen zusammen. Um ein eintreten des Lichts der Blitzlicht-LED in die Messkammer zu ermöglichen ist eine Öffnung auf der smartphonezugewandten Seite der Kammer vorgesehen. Die Filterelemente bestehen aus Folienfiltern, die in der Lage sind die Wellenlängenbereiche des emittierten Lichts der Blitzlicht-LED vor durchtreten der Probe zu separieren und einem Rahmen, der einen einfachen und präzisen Einschub in die Messkammer ermöglicht. Die Messkammer ist darauf ausgelegt handelsübliche Glas- oder Einwegküvetten aufzunehmen, in denen die Untersuchung der jeweiligen Proben durchgeführt werden kann. Die optimale und reproduzierbare Positionierung der Küvetten wird durch eine elastische Keilkonstruktion erreicht, die in dieser Konzeptserie erstmals eingeführt wurde. Zur Überführung des transmittierten Lichts in einen Lichtwellenleiter ist eine Passung auf der smartphoneabgewandten Seite der Messkammer angebracht. Die Messkammer wird durch eine Schalbenschwanzführung mit dem Befestigungssystem verbunden und exakt positioniert.

Das flexible Befestigungssystem besteht aus einer Basisplatte, die zur Aufnahme der Messkammer dient sowie drei einstellbaren Haken zur flexiblen Befestigung am

Smartphone. Die relative Position der Haken zur Basisplatte ist durch eine Zahnpassung einstellbar. Zwei horizontale Haken gewährleisten die Fixierung der Basisplatte in Form einer gleitenden Lagerung. Ein vertikaler Haken, der an der Oberseite des Smartphones angebracht wird, fixiert das System in der dritten Raumkoordinate. Der obere Haken dient zusätzlich als Positionierungssystem für den Lichtwellenleiter. Die anpassbare Positionierung des Lichtwellenleiters zum Übertragen des transmittierten Messlichts auf den Umgebungslichtsensor des Smartphones wird durch eine horizontale Schwalbenschwanzführung im Haken erreicht. In der Schiene wird der Lichtwellenleiter durch einen beweglichen Keil mit integrierter Passung in horizontaler Richtung angepasst. Das Gesamtsystem ist in Abbildung 10 dargestellt.

Alle Komponenten, mit Ausnahme des Lichtwellenleiters und der Filterfolie, sind 3D-druckbar und bestehen aus Acrylnitril-Butadien-Styrol. Die Maße der Konstruktion wurden erstmals in dieser Konzeptserie der Auflösung und Toleranzen des verwendeten Fertigungssystems angepasst. Die Auflösung in der Additiven Fertigung beträgt $0,048 \text{ mm} \cdot 0,178 \text{ mm}$ (XY-Z-Koordinaten). Durch die Anpassung kann eine präzise und Passgenaue Zusammenführung der Komponenten ohne manuelle Nachbearbeitung gewährleistet werden.

In der weiteren Untersuchung der Leistungsfähigkeit des küvettenbasierten Smartphonephotometers anhand verschiedener Beispielsysteme wurde die dritte Konzeptserie verwendet. Alle Messungen am küvettenbasierten Smartphonephotometer an Beispielsystemen wurden mit einem LG G3 und einem Sony Xperia Z3 Compact durchgeführt. Die Auswahl wurde auf Basis der stark unterschiedlichen Baugröße der Geräte sowie großer Unterschiede im Emissionsspektrum der Blitzlicht-LED getroffen um eine möglichst hohe Varianz zu erzielen (vgl. Abbildung 6). Zur Validierung aller Messungen wurde ein konventionelles Laborspektrometer (Varian Cary 50 UV-vis, Agilent Technologies, USA) eingesetzt.

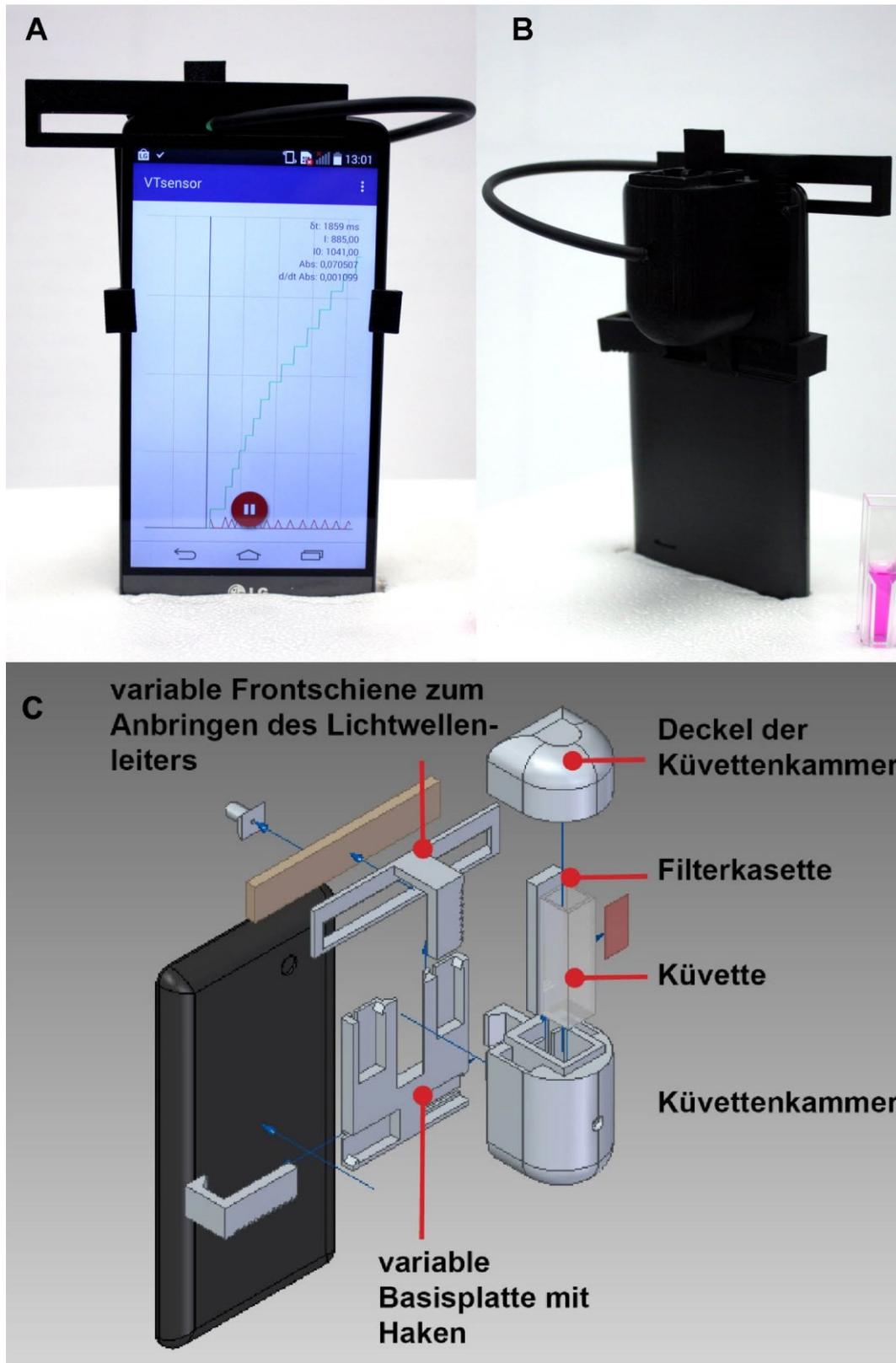


Abbildung 10: Konzeptserie 3 des küvettenbasierten Smartphonephotometers mit Smartphone **A:** Frontansicht; **B:** Rückansicht; **C:** Explosionsdarstellung.

Detaillierte Einzelteilzeichnungen befinden sich im Anhang (B.I Küvettenbasiertes Photometer zur Transmissionsmessung)

3.4 Kapillarbasierte Systeme zur nephelometrischen Trübungsmessung

Das kapillarbasierte Smartphone-nephelometer wurde auf Grundlage der vorherigen Entwicklung des küvettenbasierten Smartphone-photometers entwickelt. Der primäre Einsatzbereich des Smartphone-nephelometers liegt im Bereich der Trübungsmessung in der Weinproduktion. Als Standardverfahren im Weinbau ist die Trübungsmessung mittels Nephelometrie der Messung mittels Transmissionsphotometrie aufgrund der Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Weingütern und der Akzeptanz der potentiellen Verwender vorzuziehen. Die technischen Anforderungen an das kapillarbasierte System zur nephelometrischen Trübungsmessungen und die Integration der smartphoneyeigenen Komponenten, im speziellen der Lichtquelle und der Detektion der Streulichtintensität, entsprechen weitgehend den Anforderungen an das küvettenbasierte System zur Transmissionsmessung. Bedingt durch die Verwendung im Weinbau steht die Robustheit und einfache Anwendung des Systems gegenüber der Maximierung der Flexibilität und Anpassbarkeit an verschiedene Smartphones im Vordergrund der Entwicklung.

Als mögliche Option eine einfache Handhabung des Gesamtsystems zu erreichen, wurde der Einsatz von Kapillaren als Messumgebung gewählt. Die gewählten Kapillaren weisen in diesem Zusammenhang gegenüber Küvetten den entscheidenden Vorteil auf, dass ein präzises und volumengenaues Befüllen durch Kapillarkräfte ohne den Einsatz von Geräten zum Flüssigkeitshandling wie Kolbenhubpipetten erreicht werden kann. Zusätzlich ermöglicht der geringe Querschnitt der Kapillaren im Vergleich zu deren Länge eine Reduzierung des effektiven Einstrahlwinkels des Messlichts. Eine zu große Varianz im Einstrahlwinkel ist im Fall der nephelometrischen Trübungsmessung als Störgröße zu betrachten. In der Entwicklung wurden Kapillaren aus Borosilikatglas mit einer Länge von 30 mm und einem Gesamtvolumen von 30 μL verwendet. Der Innendurchmesser der Kapillaren liegt bei 1,128 mm. Daraus ergibt sich eine maximale Winkelabweichung des gestreuten Messlichts auf halber Länge der Kapillaren von $4,313^\circ$ ($\sin^{-1}(1,128/12)$). Nach ISO 7027 ist eine Winkelabweichung von maximal 5° zur nephelometrischen Trübungsmessung zulässig. Diese Vorgabe wird durch den Einsatz der entsprechenden Kapillaren erreicht.

3.4.1 Konzeptserie 1

Die erste Konzeptserie des kapillarbasierten Smartphone-nephelometers besteht auf einer zentralen Messkammer, die zur Aufnahme und Positionierung der Messkapillaren dient. Die Fixierung und Positionierung der Messkammer am Smartphone wird durch drei, nicht einstellbare Haken an der Messkammer erreicht. Zwei horizontale Haken dienen der Positionierung am Smartphone in Form einer Gleitlagerung. Ein dritter Haken an der Oberseite des Systems dient der Fixierung in vertikaler Richtung. Der obere Haken fixiert zusätzlich einen Polymerlichtwellenleiter vor dem Umgebungslichtsensor des Smartphones und schirmt diesen von Umgebungslichteinflüssen ab. Der Polymerlichtwellenleiter führt vom Umgebungslichtsensor zur Unterseite der Messkammer, wo er das durch das kapillare fallende Streulicht aufnimmt. Die Beleuchtung der Kapillaren erfolgt durch die smartphoneyeigene Blitzlicht-LED, senkrecht zur Kapillarachse. Eine entsprechende Öffnung zum Lichtdurchtritt ist an der smartphonezugewandten Seite der Messkammer angebracht. Der Einfluss des Umgebungslichts kann durch eine senkrecht aufsteckbare Abdeckung eingedämmt werden. Die Senkrechte Positionierung der Kapillaren dient der Sicherstellung einer exakten Schichtdicke, der Probe auch bei unvollständiger Füllung der Kapillaren um maximale Reproduzierbarkeit der Messungen zu erzielen.

A



B



Abbildung 11: Konzeptserie 1 des kapillarbasierten Smartphone-nephelometers zur Trübungsmessung; **A:** Frontansicht; **B:** Rückansicht.

In ersten Funktionstests hat sich herausgestellt, dass die vertikale Positionierung der Messkapillare unter Verwendung von Acrylnitril-Butadien-Styrol als Produktionswerkstoff bedingt durch dessen hydrophilen Eigenschaften zu einem Auslaufen der Kapillaren führt. Die vertikale Positionierung der Kapillaren führt zusätzlich zu einer unzureichend reproduzierbaren Kapillarpositionierung.

Weiterhin führt die kompakte Bauweise unter Verwendung eines einzelnen vertikalen Hakens zur Befestigung zu einer unzureichenden Fixierung des Systems am Smartphone. Diese unzureichende Fixierung führt zu starken gerätebedingten Messwertabweichung und Fehlmessungen.

3.4.2 Konzeptserie 2

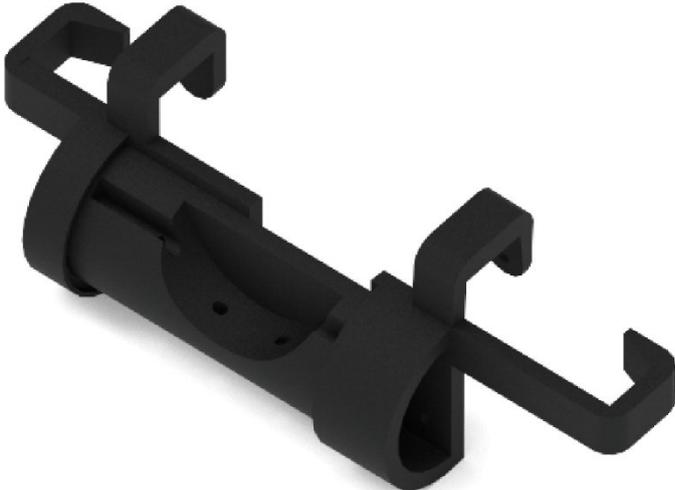
Die zweite Konzeptserie des Smartphone-nephelometers bedient sich einer horizontalen Positionierung der Messkapillaren. Zusätzlich wurde die Einstrahlrichtung des Messlichts variiert.

Die Fixierung und Positionierung der Messkammer am Smartphone wird durch die Verwendung von vier Haken an der Messkammer im Vergleich zur vorherigen Konzeptserie stabilisiert. Zwei horizontale Haken dienen der Positionierung am Smartphone in Form einer Gleitlagerung. Zwei weitere Haken an der Oberseite des Systems fixieren das System in vertikaler Richtung. Einer der oberen Haken nimmt zusätzlich den Polymerlichtwellenleiter auf, positioniert ihn vor dem Umgebungslichtsensor des Smartphones und schirmt diesen von Umgebungslichteinflüssen ab.

Die Lichtführung von der Blitzlicht-LED zur Messkapillaren wird durch einen Polymerlichtwellenleiter erreicht. Das Messlicht fällt in axialer Richtung in die Messkapillare. Die Aufnahme des Streulichtes erfolgt senkrecht zur Messkapillare bei einer variablen Kapillarposition von 10, 15 beziehungsweise 20 mm, gemessen in Richtung des Strahlengangs. Zu diesem Zweck wird der Polymerlichtwellenleiter durch drei separate Passungen an der Unterseite des Smartphones positioniert. Die Konzeptserie ist in Abbildung 12 dargestellt.

Durch die Anpassungen in Konzeptserie zwei konnte eine reproduzierbare und stabile Fixierung des Systems am Smartphone erreicht werden. Alle Zielsetzungen im Bezug auf die Integration des Smartphone-eigenen Komponenten sowie den Einsatz von optischen Komponenten werden erreicht. Ein einfaches und robustes Gerätedesign konnte gewährleistet werden.

A



B

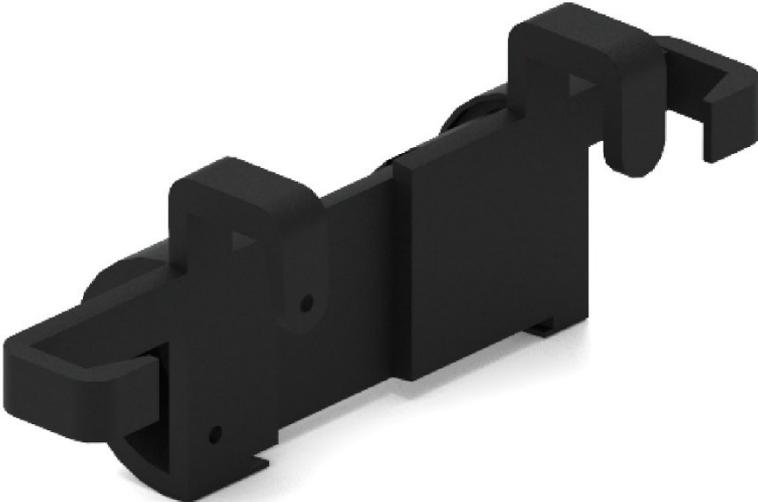


Abbildung 12: Konzeptserie 2 des kapillarbasierten Smartphone-nephelometers zur Trübungsmessung; **A:** Frontansicht; **B:** Rückansicht.

3.5 Kapillarbasierte Systeme zur Transmissionsmessung und Nephelometrie

Das kapillarbasierte Smartphonephotometer beruht maßgeblich auf den Ergebnissen der vorherigen Entwicklung des küvettenbasierten Systems. Der geplante Einsatzbereich liegt abweichend von den bisherigen Systemen in der Überwachung relevanter Parameter im Weinbau. Entsprechend sind abweichende Zielsetzungen und Forderungen an das System zu berücksichtigen. Neben dem Anspruch einer möglichst vollständigen Integration der smartphoneeigenen Funktionalitäten steht die einfache Bedienbarkeit des Apparates sowie der zugehörigen Assaysysteme und ein möglichst robustes Design bei niedrigen Gerätekosten im Zentrum der Anforderungen. Auch in diesem Kontext ist der Einsatz optischer Komponenten sowie externer elektronischer Komponenten als nicht optimal zu betrachten.

Um den mobilen Einsatz unter wechselnden Bedingungen im Weinbau zu ermöglichen ist eine maximale Anpassbarkeit des Photometers gegenüber einer einfachen Handhabung und der Robustheit des Systems nachrangig zu betrachten.

Als mögliche Option eine einfache Handhabung des Gesamtsystems zu erreichen wurde der Einsatz von Kapillaren als Messumgebung gewählt. Die gewählten Kapillaren weisen in diesem Zusammenhang gegenüber Küvetten den entscheidenden Vorteil auf, dass ein präzises und volumengenaues Befüllen durch Kapillarkräfte ohne den Einsatz von Geräten zum Flüssigkeitshandling wie Kolbenhubpipetten erreicht werden kann. Zusätzlich ist es durch Beschichtung der inneren Oberfläche der Kapillaren mit allen benötigten Assaykomponenten möglich vorkonfektionierte Analysysteme anzubieten, die geringe fachliche Voraussetzungen an den Endbenutzer setzen und eine möglichst weite Verbreitung und Anwendung unterstützen. In der Entwicklung wurden Kapillaren aus Borosilikatglas mit einer Länge von 30 mm und einem Gesamtvolumen von 30 μL verwendet.

Die Entwicklung des kapillarbasierten Smartphonephotometers erfolgte in zwei maßgeblichen Konzeptserien mit jeweils ansteigender Variabilität in Bezug auf die durchführbaren Messungen und der Integration der smartphoneeigenen Komponenten.

3.5.1 Konzeptserie 1

Im Zentrum der Entwicklung der ersten Konzeptserie steht eine maximale Robustheit des Systems sowie die Einsetzbarkeit von vorkonfektionierten Assaykapillaren. Um diese Ziele mit Vorrang gegenüber der Allgemeinen Zielsetzung umzusetzen wurde zunächst auf eine Integration der smartphoneeigenen Lichtquelle verzichtet. Als Lichtquelle dient eine externe LED, die den jeweiligen Assays angepasst werden kann. Die Stromversorgung der LED erfolgt mit einer Versorgungsspannung von 5 V über den micro-USB Anschluss des Smartphones.

Das von der externen LED emittierte Licht durchtritt die Messkapillare in axialer Richtung. Daraus ergibt sich bei einer Kapillarlänge von 30 mm eine, im Vergleich zu Küvetten, um Faktor drei erhöhte Probenschichtdicke bei gleichzeitiger Reduzierung des Probenvolumens von 1000 auf 30 μL . Diese Erhöhung der Schichtdicke führt nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Gl. 4) zu einer Erhöhung der gemessenen Extinktion bei gleicher Konzentration des Analyten und damit zu einer Verbesserung der Sensitivität des Systems.

Nach durchtreten der Kapillare wird das Licht durch einen Polymerlichtwellenleiter auf den Umgebungslichtsensor des Smartphones geführt. Die Detektion der Intensität des transmittierten Lichts erfolgt weiterhin, wie bei den küvettenbasierten Systemen über den Umgebungslichtsensor des Smartphones. Ein Befestigungssystem des kapillarbasierten Smartphonephotometers zur Transmissionsmessung am Smartphone ist in dieser Konzeptserie nicht vorgesehen.

Das Gesamtsystem ist in Abbildung 13 mit einem Maßstab von 1 cm Gesamtlänge dargestellt.

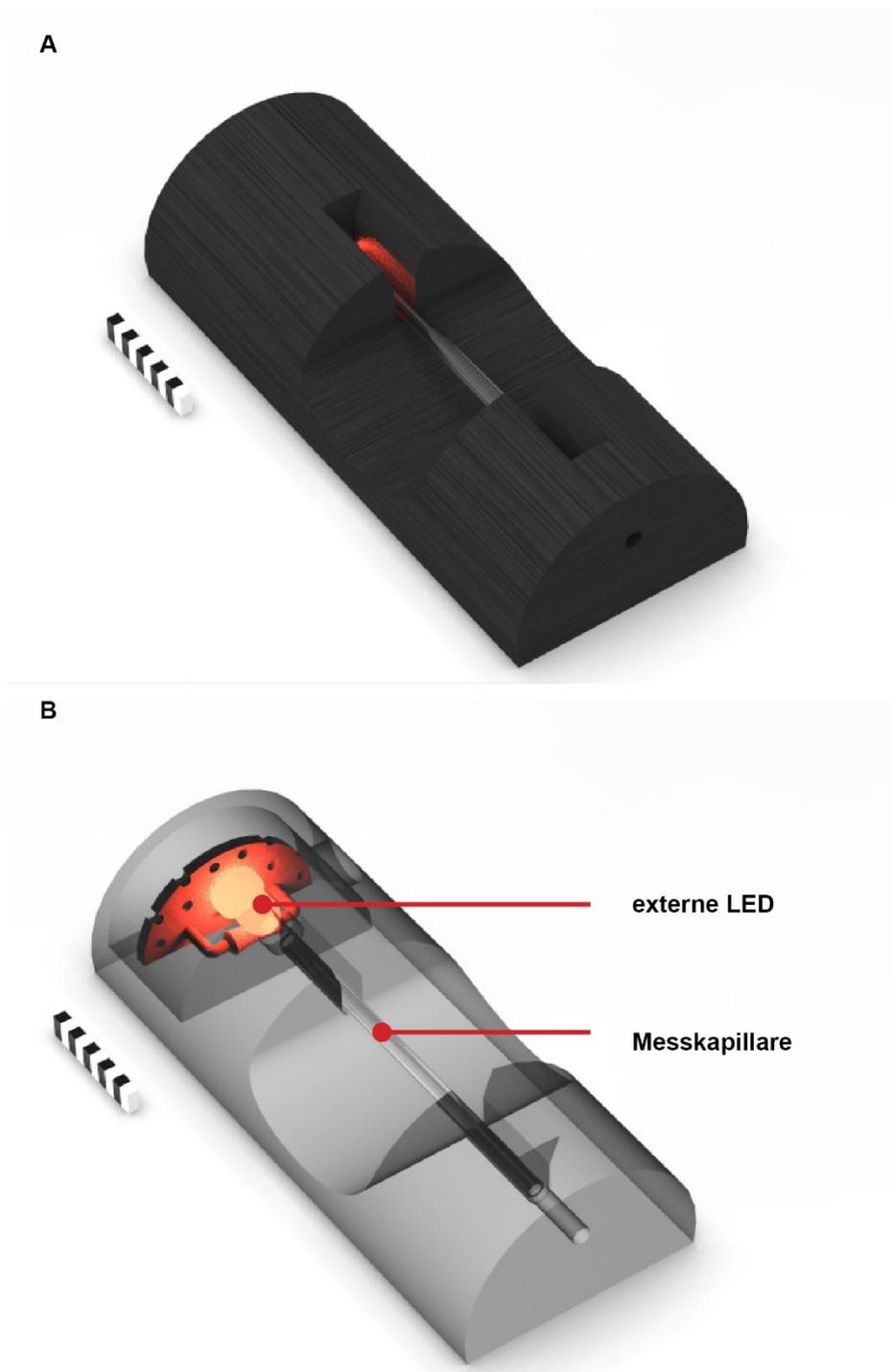


Abbildung 13: Konzeptserie 1 des kapillarbasierten Smartphonephotometers zur Transmissionsmessung; **A:** Gesamtansicht; **B:** halbttransparente Ansicht, Maßstab 1 cm.

Die erste Konzeptserie diente in erster Linie der Überprüfung der allgemeinen Messbarkeit von Assaysystemen in den verwendeten Kapillaren. Sie stellt aufgrund der Verwendung einer externen Lichtquelle eine unvollständige Integration der smartphoneeigenen Funktionalitäten dar.

3.5.2 Konzeptserie 2 Kombinationssystem Nephelometrie und Transmissionsmessung

Die zweite Konzeptserie stellt die apparative Integration des Smartphonenehnelometers und des kapillarbasierten Smartphonephotometers dar. Sie setzt sich aus einer horizontalen Messkammer mit Schiebeverschluss, die zur Aufnahme und Positionierung der Messkapillaren und einem variablen Filterrada dient, sowie einem nicht anpassbaren Hakensystem zusammen.

Die Fixierung und Positionierung der Messkammer am Smartphone wird durch vier Haken an der Messkammer erreicht. Zwei horizontale Haken dienen der Positionierung am Smartphone in Form einer Gleitlagerung. Zwei weitere Haken an der Oberseite des Systems dienen der Fixierung in vertikaler Richtung. Einer der oberen Haken fixiert zusätzlich einen Polymerlichtwellenleiter vor dem Umgebungslichtsensor des Smartphones und schirmt diesen von Umgebungslichteinflüssen ab. Das Gesamtsystem ist in Abbildung 14 dargestellt.

Die Lichtführung von der Blitzlicht-LED zur Messkapillaren wird durch einen Polymerlichtwellenleiter erreicht. Das Messlicht fällt in axialer Richtung in die Messkapillare. Im Fall des Einsatzes als Absorptionsphotometer wird das Spektrum des Messlichts nach durchtreten der Probe in der Messkapillaren durch Folienfilter dem jeweiligen Assaysystem angepasst. Die Folienfilter sind in einem variablen Filterrada angebracht und können durch Drehung des Filterrads in den Strahlengang geschwenkt werden. Nach durchtreten des Filters wird das transmittierte Licht durch einen weiteren Polymerlichtwellenleiter auf den Umgebungslichtsensor geführt und dessen Intensität detektiert.

Wir das System als Smartphonenehnelometer eingesetzt bleibt die Lichtführung vor der Messkapillare identisch zu der Konfiguration bei der Verwendung als Absorptionsphotometer. Die Aufnahme des Streulichtes erfolgt senkrecht zur Messkapillare bei einer Kapillarposition von 15 mm. Zu diesem Zweck wird der Lichtwellenleiter durch eine Passung an der Unterseite des Smartphones positioniert. Eine Anpassung des Spektrums der Blitzlicht-LED ist bei der Verwendung als Nephelometer nicht vorgesehen.

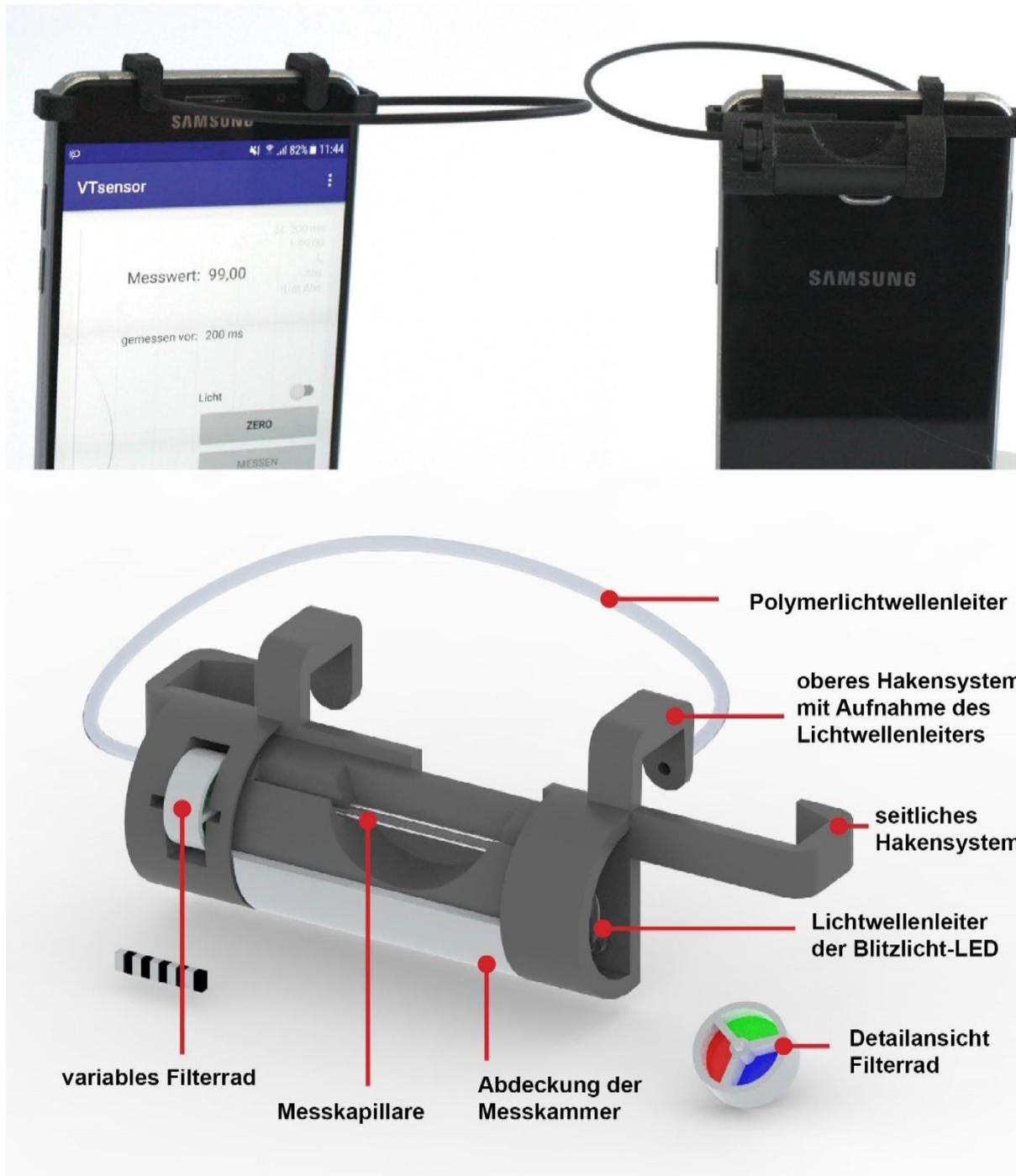


Abbildung 14: Konzeptserie 2 des kapillarbasierten Smartphonephotometers/-nephelometers zur Transmissions- und Trübungsmessung, Maßstab 1 cm.

Die Kombination des kapillarbasierten Smartphonephotometers und des Smartphonephotometers stellt einen maßgeblichen Fortschritt dar. Alle vorgesehenen Funktionalitäten können in dieser Konzeptserie erstmals in einem Gerät vereinigt werden. Die Einführung des variablen Filterrads vereinfacht die Bedienung des Geräts im Vergleich zum Einsatz von Filterkassetten weiterhin. In weiteren

Optimierungsschritten kann die Umstellung des Systems vom Einsatz als Photometer zum Einsatz als Nephelometer weiterhin optimiert werden und die manuelle Positionsänderung des Polymerlichtwellenleiters variiert werden. In der weiteren Untersuchung der Leistungsfähigkeit des kapillarbasierten Kombinationssystems zur Durchführung von absorptionsphotometrischen und nephelometrischen Messungen anhand verschiedener Beispielsysteme wurde die zweite Konzeptserie verwendet.

Alle Messungen mit dem kapillarbasierten Smartphonesystem an Beispielsystemen wurden mit einem Samsung Galaxy A5 durchgeführt. Zur Validierung aller Messungen wurde ein konventionelles Laborspektrometer (Varian Cary 50 UV-vis, Agilent Technologies, USA) eingesetzt. Detaillierte Einzelteilzeichnungen befinden sich im Anhang (Kapillarbasiertes Photo-/Nephelometer zur Transmissions- und Trübungsmessung)

4 Anwendungsfeld: Enzymatische Assays zum Schwermetallnachweis

Als küvettenbasierte Modellmethoden zur Bestimmung enzymatischer Reaktionsparameter wurden als aussichtsreiche Systeme ein Glucoseoxidase-Peroxidaseassay und ein ureasebasierter Assay verwendet. Die grundlegende Messbarkeit der Assays am Smartphonephotometer wurde auf Basis der LED-Emissionsspektren, dargestellt in Abschnitt 3.1, angenommen. Die Überprüfung dieser Annahme und die qualitative Bewertung des Einsatzes von Filterfolien erfolgt für die verschiedenen Assays in Abschnitt 4.1.1 und 4.2.1. Neben der allgemeinen Messbarkeit der Enzymreaktionen am Smartphone steht die Verwendung der Assays zur Bestimmung von Schwermetallkonzentrationen in Gewässerproben im Zentrum dieser Arbeit. Um Schwermetalle mit enzymatischen Assays durch Inhibierung der Reaktion nachweisen zu können muss, neben der Messbarkeit der Reaktion auf Basis der Absorptionsspektren der verwendeten Indikatoren und den Emissionsspektren der Lichtquelle, die Inhibierung der Enzyme verschiedene Kriterien erfüllen: Die Inhibierung muss ein monotonen Verhalten zeigen. Das heißt, dass eine Erhöhung der Schwermetallkonzentration oberhalb der Nachweisgrenze zu einer Reduzierung der Enzymaktivität führt. Weiterhin muss die Inhibierung innerhalb bestimmter Grenzen nichtkompetitiv sein. Die Grenzen werden durch die Substratkonzentration im Verlauf des Assays definiert. Um eindeutige Messungen zu erhalten darf eine sinkende Substratkonzentration im Messintervall nicht zu einer Beeinflussung der Inhibierung führen.

4.1 Ureaseassay

Der auf Urease basierende Bioassay wurde auf Basis des "*high throughput colorimetric assay for rapid urease activity quantification*", veröffentlicht von Okyay und Rodrigues, 2013, unter Berücksichtigung möglichst einfacher Handhabung modifiziert [97]. Bei allen verwendeten Komponenten handelt es sich um preisgünstige Chemikalien mit geringem Gefährdungspotential. Die Hydrolyse von Urea erfolgt über die ureasekatalysierte Bildung von Carbamidsäure unter Ammoniakfreisetzung und einen spontanen Zerfall der Carbamidsäure zu Kohlendioxid und Ammoniak. Ammoniak wird dabei in Relation zu Kohlendioxid im Überschuss gebildet, was zu

einer Erhöhung des pH-Wertes in der Lösung führt. Um den Anstieg des pH-Wertes durch die Reaktion nachzuweisen, ist Phenolphthalein ein geeigneter Indikator mit einem farblosen Neutralpunkt von pH 8,2 [98].

4.1.1 Anforderungen an das verwendete Messlicht zur Transmissionsphotometrie

Um die Verwendbarkeit des ureasebasierten Assay zur Bestimmung von Schwermetallkonzentrationen in Gewässerproben am Smartphonephotometer zu gewährleisten ist, unabhängig von der inhibitorischen Wirkung von Schwermetallionen auf Urease, eine ausreichende Intensität des, durch die verwendeten Filterfolien transmittierten Lichts im Absorptionsbereich von Phenolphthalein notwendig. Die Transmissionsspektren der verwendeten Smartphone-LED nach durchtreten der Filterfolie (grün) sowie das Absorptionsspektrum von Phenolphthalein sind in Abbildung 15 dargestellt.

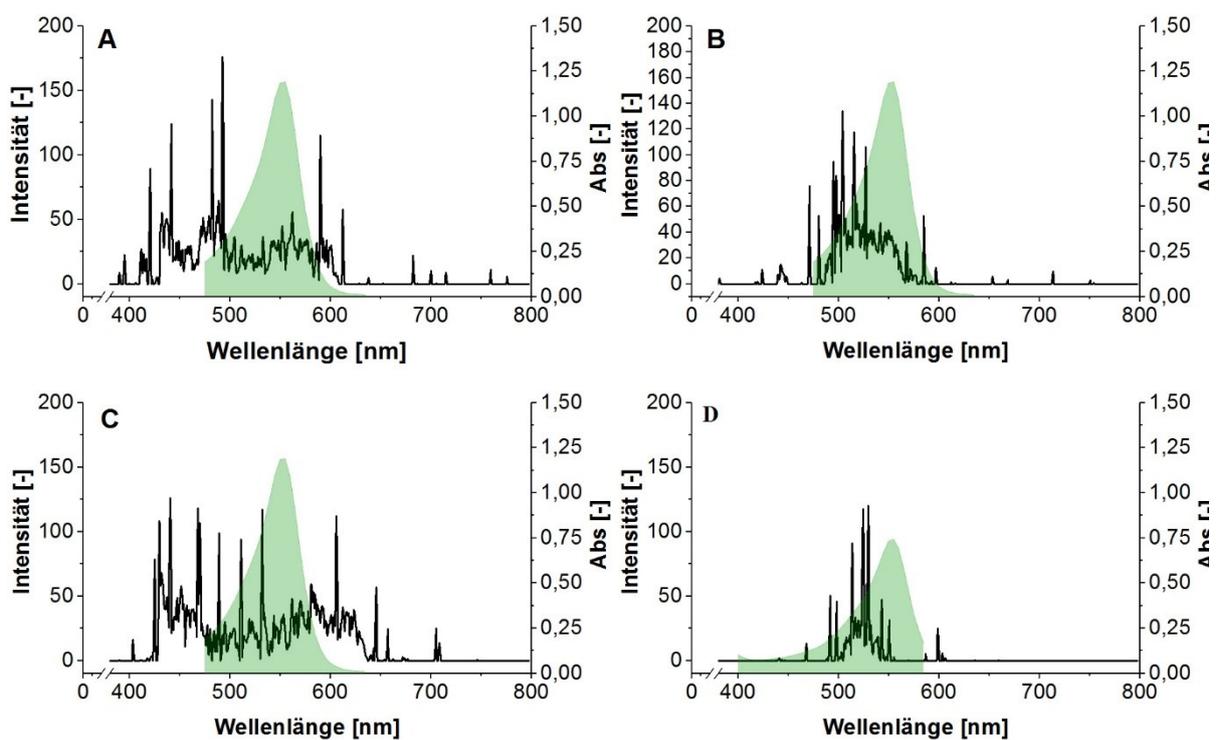


Abbildung 15: Transmissionsspektren der Blitzlicht-LED der untersuchten Smartphones nach durchtreten der Filterfolie, grün, aufgenommen mit einem Fluoreszenzspektrometer (LS 55, PerkinElmer Inc., USA) **A:** HTC one; **B:** Iphone 4; **C:** LG G3; **D:** Sony Xperia Z3; überlagert mit dem Absorptionsspektrum von Phenolphthalein gemessen am Laborspektrometer (Varian Cary 50 UV-vis, Agilent Technologies, USA).

Zur Untersuchung des ureasebasierten Bioassay wird eine ausreichende Lichtintensität im Wellenlängenbereich von ca. 500 bis 600 nm emittiert. Die

verwendete Filterfolie zeigt eine hohe Absorption in den Spektralbereichen von mehr als 650 und weniger als 500 nm. Durch die Verwendung der Filterfolie wird die Lichtintensität, die durch die Absorption von Phenolphthalein nicht beeinflusst wird, stark reduziert. Der Gesamtanstieg der Lichtintensität in Abbildung 15 im Bereich von 475 bis 560 nm wird durch das automatisch einstellbare Photomultipliersystem zum Schutz des Spektrometers verursacht. Das Verhältnis der Intensitäten bei verschiedenen Wellenlängen wird durch diese Einstellung nicht beeinflusst. Durch die Verwendung der Filterfolie kann das Verhältnis von Hintergrund zu Signal deutlich verbessert werden, was zu reduzierten Standardabweichungen in der Bioassay-Messung führt. Eine Quantifizierung der Anpassung des Transmittierten Lichts und der Indikatorabsorption ist auf Grundlage der Intensitätsmessungen nicht möglich. Die gemessene Lichtintensität bei dem verwendeten Fluoreszenzspektrometer (Anhang B) zeigt einen nichtlinearen, in dieser Arbeit nicht exakt spezifizierten Zusammenhang zwischen der gemessenen Lichtintensität und der Wellenlänge bei konstanter Photonendichte. Dieser Zusammenhang lässt sich weiterhin nicht auf Umgebungslichtsensoren von Smartphones übertragen.

4.1.2 Bestimmung der minimal nachweisbaren Substratumsetzung

Grundlage der Reaktionsindikation des ureasebasierten Assay ist der Farbumschlag von Phenolphthalein von farblos zu Magenta bei einem pH-Wert größer 8,2. Zu Beginn der Assayreaktion liegt der pH-Wert bei 7,0. Unter diesen Bedingungen wird Harnstoff gespalten bevor es zu einer messbaren Absorptionzunahme durch den verwendeten Indikator kommt. Um den Ureaseumsatz zu quantifizieren, der benötigt wird um eine initiale Indikation zu erzielen, wurden Assays mit einer Ureaseaktivität von $0,146 \mu\text{kat}\cdot\text{mL}^{-1}$, einer Ureakonzentrationen von 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 und 10 mM und einem kontrollierten Anfangs-pH von 7,0 für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, um die vollständige Harnstoffumsetzung sicherzustellen. Nach der Inkubation wurde der pH-Wert und die Absorption jeder Probe gemessen (Abbildung 16).

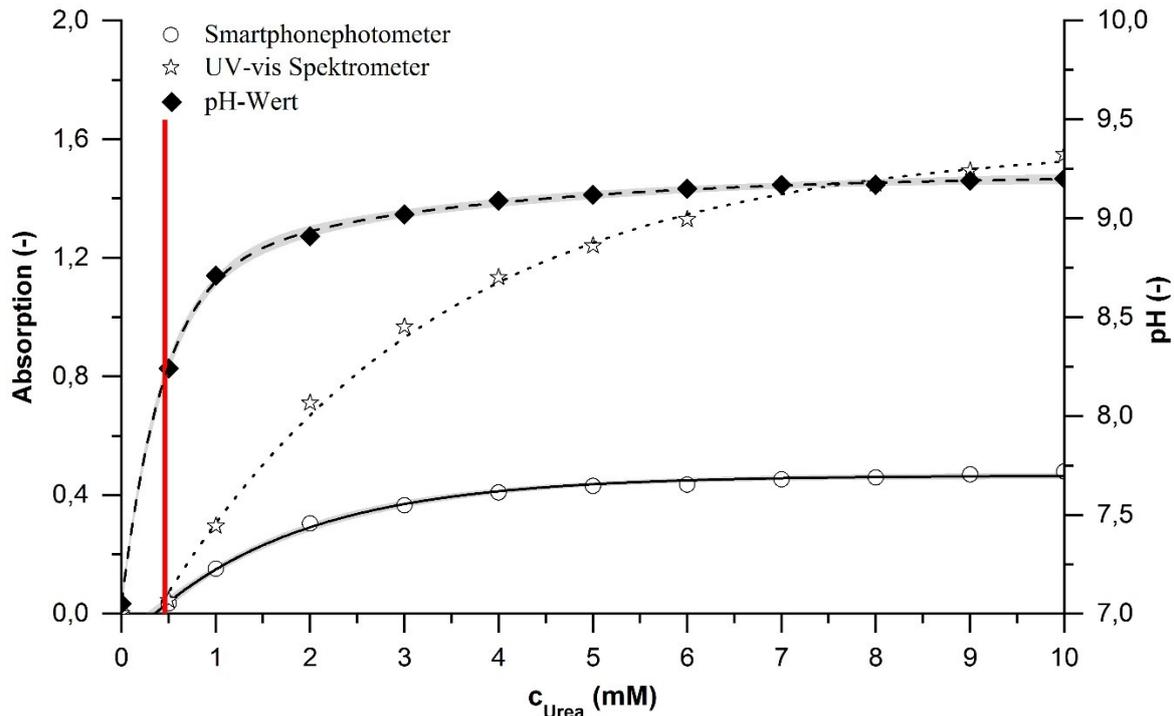


Abbildung 16: Ureabedarf zur Selbstjustierung des pH-Wertes bis zum Umschlagpunkt von Phenolphthalein des ureasebasierten Bioassay ($0,417 \mu\text{kat}\cdot\text{mL}^{-1}$ Urease) gemessen am Smartphonephotometer mit einem LG G3 (LG Corporation, Südkorea) und grünem Filter, und einem UV-vis Spektrometer (Varian Cary 50 UV-vis, Agilent Technologies, USA) ($n = 7$).

Der gemessene pH-Wert der Proben und die Absorption zeigten eine minimale Harnstoffkonversion von $0,46 \text{ mM}$, die erforderlich ist, um eine messbare Farbänderung von Phenolphthalein beziehungsweise eine pH-Verschiebung von $7,0$ bis $8,2$ in dieser Assayzusammensetzung zu induzieren. Die Absorption und der pH-Wert waren nach 1 h Inkubation konstant. Der mit dem UV-Vis-Spektrometer und dem Smartphonephotometer gemessene Absorptionsunterschied lässt sich durch das vergleichsweise breite Lichtspektrum des Smartphonephotometers erklären. Eine ausreichende Absorption für die Berechnung der Reaktionsparameter kann bei einem Ureaumsatz von 2 mM erreicht werden.

4.1.3 Charakterisierung der Einzelstoffinhibierung durch Schwermetallionen

Werden Bioassays zur Messung der Hemmung einer Enzymreaktion eingesetzt, ist es notwendig, die Art der Hemmung und die Substratkonzentration zu bestimmen, die für eine nachweisbare Reaktion mindestens notwendig sind. Die Hemmung der enzymatischen Aktivität durch Schwermetallionen kann generell als nicht-kompetitive Hemmung angenommen werden [99]. Die Substratkonzentration hat somit keinen

Einfluss auf die Hemmung. Unter dieser Annahme können hohe, konstante Reaktionsraten und kurze Messzeiten durch die Verwendung einer möglichst hohen Substratkonzentration erreicht werden, bei der eine Substratinhibierung noch vernachlässigbar ist. Der Ausschluss kompetitiver Inhibierungen durch hohe Substratkonzentrationen trägt zusätzlich dazu bei, dass die Zuverlässigkeit der Schwermetalldetektion, aufgrund der potentiell hohen Anzahl entsprechender Komponenten in Oberflächen- und Trinkwasserproben deutlich verbessert wird. Um die Annahme eines nicht kompetitiven Einflusses von Schwermetallionen auf die Ureaseaktivität zu belegen wurden Assays mit variiertem Substratkonzentration in Anwesenheit von Schwermetallionen durchgeführt. Die Schwermetallkonzentrationen wurden derart gewählt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit um 50% gegenüber der nicht inhibierten Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Harnstoffkonzentration von 50 mM und einer eingesetzten Ureaseaktivität von $0,417 \mu\text{kat}\cdot\text{mL}^{-1}$ reduziert wurde. Die Substratkonzentrationen lagen bei 1, 2,5, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80 und 100 mM im Assay (zehnfach höheren Konzentrationen in der Substrat-Indikatorlösung). Die K_M -Werte wurden durch lineare Extrapolation der Lineweaver-Burk-Gleichung ermittelt. Die Resultate der Untersuchung sind exemplarisch für die Inhibierung durch Kupfer-, Silber-, Cobalt- und Nickelionen in Abbildung 17 dargestellt.

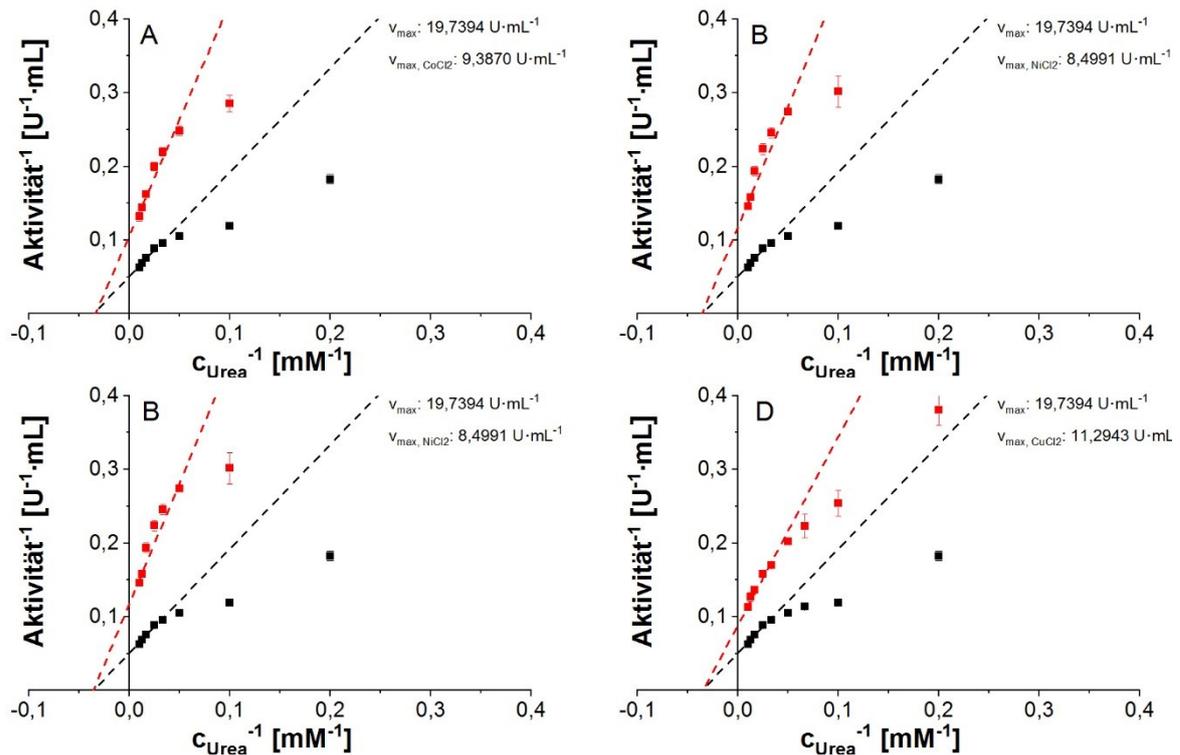


Abbildung 17: Lineweaver-Burk Darstellung des Inhibierungsverhaltens verschiedener Schwermetallionen auf das ureasebasierten Bioassay ($0,417 \mu\text{kat}\cdot\text{mL}^{-1}$ Urease) bei variiertes Substratkonzentration (1, 2,5, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 100 mM) gemessen am Smartphonephotometer mit einem LG G3 (LG Corporation, Süd Korea) und grünem Filter, ($n=7$). **A:** CoCl_2 ; **B:** NiCl_2 ; **C:** AgNO_3 ; **D:** CuCl_2 .

Die K_m -Werte und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für die nicht inhibierte Reaktion wurden mit $32,08 \pm 1,73 \text{ mM}$ und $329 \pm 5,83 \text{ nkat}\cdot\text{mL}^{-1}$ bestimmt. Bedingt durch die Assaybedingungen, ohne Zugabe von Puffersalzen, bei Raumtemperatur weichen diese von Literaturdaten ab. In Abhängigkeit von der Assayzusammensetzung sind K_m -Werte im Bereich von $2,7\text{--}8,81 \text{ mM}$ beschrieben [100–104]. Die Reaktionen in Gegenwart von Silber(I)nitrat, Kupfer(II)chlorid, Cobalt(II)chlorid und Nickel(II)chlorid zeigen K_m -Werte von $30,43 \pm 2,38 \text{ mM}$, $32,9 \pm 4,71 \text{ mM}$ und $32,90 \pm 1,65 \text{ mM}$ und maximale Reaktionsraten von $195,17 \pm 4,667 \text{ nkat}\cdot\text{mL}^{-1}$, $123,17 \pm 7,33 \text{ nkat}\cdot\text{mL}^{-1}$ respektive $185,17 \pm 3,167 \text{ nkat}\cdot\text{mL}^{-1}$. Da kein signifikanter Unterschied in der Michaelis-Menten Konstante über alle Messungen nachweisbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Hemmung nicht kompetitiv ist und die Substratkonzentration die Stärke der Hemmung nicht beeinflusst [105].

Ist die Substratkonzentration wesentlich höher als K_m und ist das Verhältnis von Ausgangssubstratkonzentration zu Substratkonversion bis zum Abschluss der

Messung der Assayreaktion gering, kann die Reaktionskinetik durch Verwendung einer konstanten Substratkonzentration vereinfacht werden.

Aufgrund der Inhibitionsergebnisse und der minimalen nachweisbaren Harnstoffkonzentration wurde in allen folgenden Assays eine anfängliche Harnstoffkonzentration von 100 mM verwendet. Dies führte zu einer maximalen Harnstoffumsetzung von 2% und einer vernachlässigbaren Abnahme der Reaktionsrate im Verlauf der Messung durch die Reduzierung der Substratkonzentration.

Zur Untersuchung der hemmenden Wirkung von Schadstoffen in Oberflächen- und Trinkwasserproben wurden die unteren Nachweisgrenzen (LOD), die Reaktionsrate in Abwesenheit von Schwermetallionen und die Parameter der jeweiligen dose response Funktion für Kobalt(II)chlorid, Kupfer(II)chlorid, Eisen(II)chlorid, Blei(II)nitrat, Mangan(II)chlorid, Quecksilber(II)chlorid, Nickel(II)chlorid und Silber(I)nitrat an Smartphonephotometer bestimmt. Abbildung 18 visualisiert die Reaktion des ureasebasierten Bioassay auf gelöste Schwermetallionen am Beispiel von Silber(I)nitrat.

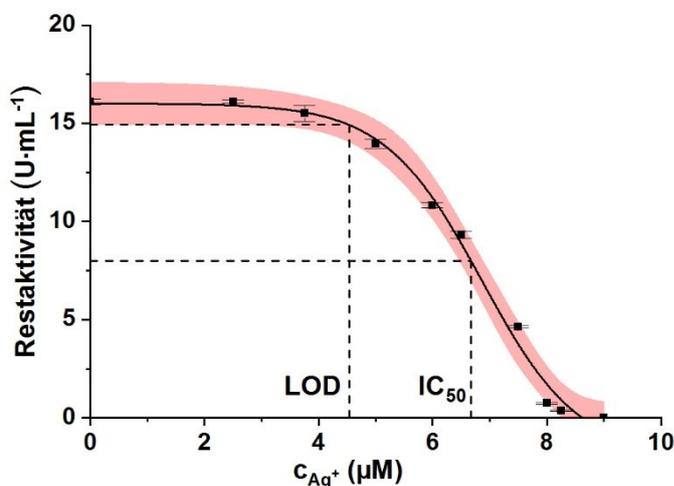


Abbildung 18: Visualisierung der Nachweisgrenze (LOD) und Inhibierungsparameter des ureasebasierten Bioassay ($0,417 \mu\text{kat}\cdot\text{mL}^{-1}$ Urease) gemessen am Smartphonephotometer mit einem LG G3 (LG Corporation, Süd Korea) und grünem Filter.; $p = 0,05$ ($n = 7$).

Aufgetragen ist die gemessene Enzymaktivität in Relation zur Silber(I)nitratkonzentration. Es zeigt sich ein charakteristischer Verlauf mit einer ausgeprägten Plateauphase bei niedrigen Silber(I)nitratkonzentrationen. Die Nachweisgrenze (LOD) gibt an, ab welcher Konzentration die Plateauphase, in der keine Abnahme der Enzymaktivität durch Erhöhung der Silber(I)nitratkonzentration nachweisbar ist endet. Der IC_{50} , als Konzentration, bei der eine

enzymatische Restaktivität von 50% nachgewiesen wird, entspricht unter den

vorgenommenen Annahmen dem Wendepunkt der dose response Funktion (Gl. 10). In diesem Fall entspricht der Steigungsparameter (p) der Steigung der Funktion im Wendepunkt respektive der maximalen Empfindlichkeit der Nachweisreaktion. Die Ergebnisse des Inhibierungsverhaltens von einzelnen Schwermetallen auf Urease unter konstanten Assaybedingungen sind in Relation zu Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie als Referenzverfahren in Tabelle 2 dargestellt.

Anwendungsfeld: Enzymatische Assays zum Schwermetallnachweis

Tabelle 2: Nachweisgrenze (LOD) und Inhibierungsparameter (IC₅₀, p) des ureasebasierten Bioassay (0,417 µkat·mL⁻¹ Urease) im Vergleich zu F-AAS als Referenzverfahren; gemessen am Smartphonephotometer mit einem LG G3 (LG Corporation, Süd Korea); p-Wert 0,05 (n=7).

Metallsalz	LOD (µM)	IC ₅₀ (µM)	Steigungsparameter p (µM ⁻¹)	Referenzwerte LOD _{F-AAS} (µM) ^{*1}	WHO (µM) ^{*2}
CoCl ₂	6,90	20,42 ± 0,54	-0,034 ± 0,008	0,24-0,62 [106]	-
CuCl ₂	2,49	3,15 ± 0,016	-3,27 ± 0,281	0,22-0,57 [106] 0,79-7,08 [107] 2,71 [108]	31,5 [109]
FeCl ₂	92,93	-	-0,011 ± 0,002	0,25-0,65 [106] 0,90-8,06 [107] 3,30-19,98 [110] 4,83 [108]	-
Pb(NO ₃) ₂	58,59	-	-0,018 ± 0,003	0,07-0,18 [106] 0,24-2,17 [107] 0,89-5,39 [110] 4,56 [108]	0,05 [109]
MnCl ₂	13,71	-	-0,024 ± 0,015	0,25-0,66 [106] 1,82 [111] 1,16 [108]	7,3 [109]
HgCl ₂	3,16	3,58 ± 0,018	-4,70 ± 0,319	1,50 [112]	0,03 [109]
NiCl ₂	10,60	8,72 ± 0,62	-0,073 ± 0,024	1,02 [108]	1,2 [109]
AgNO ₃	5,18	6,86 ± 0,18	-0,511 ± 0,085	1,61 [108]	-

*1 Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie (F-AAS) als Referenzsystem

*2 empfohlene WHO-Grenzwerte für Trinkwasser

[106] berechnet, Ausgangseinheit µg·L⁻¹

[107] berechnet, Ausgangseinheit ng·mL⁻¹; Anreicherungsfaktor in der Probenvorbehandlung: 20

[111] berechnet, Ausgangseinheit ng·mL⁻¹

[110] berechnet, Ausgangseinheit µg·L⁻¹; Anreicherungsfaktor in der Probenvorbehandlung: 20-100

[108] berechnet, Ausgangseinheit ng·mL⁻¹; Anreicherungsfaktor in der Probenvorbehandlung: 15-350

[112] berechnet, Ausgangseinheit ng·mL⁻¹; Anreicherungsfaktor in der Probenvorbehandlung: 300

[109] berechnet, Ausgangseinheit µg·L⁻¹

Im Vergleich zu den Nachweisgrenzen von Schwermetallionen durch F-AAS sind die Nachweisgrenzen des ureasebasierten Bioassay in der Regel höher. Die Nachweisgrenze von Cu^{2+} -Ionen stellt in diesem Zusammenhang einen Sonderfall dar und ist mit den unteren Nachweisgrenzen der publizierten F-AAS-Systeme vergleichbar [107,108]. Bei der Kupferdetektion reicht der LOD des mit dem Smartphonephotometer analysierten Bioassays aus, um Konzentrationen zu detektieren, die deutlich niedriger sind als die Richtwerte für die Trinkwasserqualität der WHO. In Anbetracht der Anschaffungs- und Unterhaltskosten von F-AAS-Systemen erscheinen die Ergebnisse zufriedenstellend.

Die Nachweisgrenze wird im Weiteren neben der Eigenschaft, dass sie die niedrigste Konzentration eines einzelnen Inhibitors angibt, der eine nachweisbare Reaktion des Bioassays verursacht als charakteristische Größe zur Bestimmung des kommutativen Inhibierungstyps verwendet. In einer Mischung von unabhängigen Inhibitoren wird die Nachweisgrenze jedes Inhibitors gemäß der Bliss-Unabhängigkeit nicht durch andere Inhibitoren in konstanten Konzentrationen beeinflusst. Gleiches gilt für den IC_{50} unter konstanten Bedingungen und Annahme der Bliss-Unabhängigkeit.

Die gemessene Aktivität ohne Schwermetallionen unter Testbedingungen betrug $268,0 \pm 2,6 \text{ nkat} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($64,32 \pm 0,97\%$ der eingesetzten Enzymaktivität). Der Unterschied zwischen der applizierten Enzymaktivität und der gemessenen Aktivität in Abwesenheit von Schwermetallionen wird durch die nicht optimalen Reaktionsbedingungen für das Enzym im Assay verursacht. Für eine optimale Reaktionsgeschwindigkeit sind gelöste Kaliumionen und ein leicht saurer pH-Wert von 5,5 bis 7 erforderlich [101,113]. Unter Berücksichtigung der Reaktion auf Schwermetallionen ist die reduzierte Reaktionsgeschwindigkeit in Abwesenheit von Kaliumionen und bei einem nicht optimalen pH-Wert von 8,2 akzeptabel. Die Annahme der Bliss-Unabhängigkeit scheint für die Vorhersage der hemmenden Wirkung einer Mischung, die Blei(I)nitrat, Kupfer(II)chlorid, Quecksilber(II)chlorid und Nickel(II)chlorid enthält, durch die Unterschiede in den Steigungsparameter aller Komponenten am vielversprechendsten zu sein (Tabelle 2) [23].

4.1.4 Mehrkomponenteninhibierung

Die Charakterisierung der kumulativen Inhibierung erfolgt unter Annahme der Bliss-Unabhängigkeit (Gl. 13) und der Loewe Additivitätstheorie (Gl. 14) als Gegenthese. Unter Annahme der Bliss-Unabhängigkeit wird der IC_{50} eines beliebigen Inhibitors durch die Anwesenheit von anderen Inhibitoren in konstanter Konzentration nicht beeinflusst. Durch diesen Zusammenhang ist es möglich die Ausgangskonzentration eines Inhibitors in einem Gemisch zu bestimmen, indem die Differenz des IC_{50} des jeweiligen Inhibitors zum experimentell ermittelten IC_{50} im Gemisch bestimmt wird. Die Differenz entspricht in diesem Fall der ursprünglichen Konzentration des Inhibitors in der Probe. Die vorhergesagten Effekte wurden auf Basis der inhibitorischen Parameter der Einzelkomponenten ermittelt (Tabelle 2).

Ein kumulativer inhibitorischer Effekt, der den durch Loewe-Additivität prognostizierten Effekt übersteigt, wird im Weiteren als synergetisch definiert. Ein Effekt, der geringer ist als der, durch Bliss-Unabhängigkeit vorhergesagte Effekt, wird als antagonistisch definiert. Inhibitorische Effekte von Mischungen, deren Effekt zwischen den erwarteten Effekten der beiden Theorien liegen, werden als partiell additive Effekte bezeichnet. Bedingt durch die niedrige Nachweisgrenze und die deutliche Differenz des Steigungsparameters von Kupfer(II)chlorid zu anderen Schwermetallsalzen in Systemen, die lediglich ein Schwermetall enthalten, wurde Kupfer als optimale Modellkomponente zur Konzentrationsbestimmung in komplexen Gemischen identifiziert.

Als komplexe Proben wurden verschiedene Mischungen von Inhibitoren und Trinkwasser-, Meerwasser- und Flusswasserproben verwendet. Kupfer(II)chlorid wurde zur Bestimmung der anfänglichen Konzentration in steigenden Menge zugesetzt.

Vor der Messung müssen Oberflächen- und Trinkwasserproben auf einen pH-Wert von 7,0 bis 8,0 eingestellt werden. Die Einstellung erfolgt mit Salzsäure beziehungsweise Natronlauge. Die Volumenzunahme durch die pH-Werteinstellung ist bei der Bestimmung der Schwermetallkonzentration zu berücksichtigen. Die Voreinstellung des pH-Wertes dient der Gewährleistung, dass sich nicht durch stark erhöhte pH-Werte eine vorzeitige Farbreaktion des Phenolphthaleins einstellt. Weiterhin führt ein stark erniedrigter pH-Wert zu einer reduzierten Harnstoffkonzentration durch

Selbstjustierung des pH-Wertes durch Hydrolyse vor Beginn der Farbreaktion. Die Verwendung von Puffern ist aufgrund des Funktionsprinzips des Assays nicht möglich.

Um die ureasekatalysierte Hydrolyse von Harnstoff als Bioassay für den Nachweis von Schwermetallionen in Wasserproben zu nutzen, werden zwei Arbeitslösungen und die Proben respektive die Standards mit Schwermetallionen hergestellt. Die Arbeitslösungen sind eine ungepufferte Ureaselösung mit einer Aktivität von 0,833 bis 3,33 $\mu\text{kat}\cdot\text{mL}^{-1}$ und eine Substrat-Indikatorlösung. Die Substrat-Indikatorlösung besteht aus 10 bis 1000 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Harnstoff und 4,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Phenolphthalein, gelöst in 30% (v/v) Ethanol/Reinstwasser. Um die Art der Hemmung durch Schwermetallionen zu bestimmen, wurde die Harnstoffkonzentration von 10 bis 1000 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ variiert. Die Art der Hemmung sowie die Bestimmung kumulativer und Einstoffinhibierungen wurden ermittelt. Zusätzlich wurden die untere Nachweisgrenze (LOD) und die untere Messgrenze (LOQ) des Bioassays für verschiedene Schwermetallionen in Mehr- und Einkomponenten-Schwermetalllösungen bestimmt. Um die Messung in einer Halbmikroküvette mit einem Gesamtvolumen von 1000 μL durchzuführen, wurden 800 μL der Wasserprobe mit 100 μL Enzymlösung versetzt. Oberflächenwasserproben müssen durch einen Sterilfilter geleitet werden, um die Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen auszuschließen, die zu einer Überschätzung der restlichen Ureaseaktivität führen könnte. Für die Sterilfiltration wird ein Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 0,2 μm verwendet. Die mit Urease versetzten Proben werden 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Enzymreaktion wird nach dem Einbringen der Küvette in das Smartphone-Photometer mit dem Gemisch aus Enzymlösung und Wasserprobe durch Zugabe von 100 μL der Substrat-Indikatorlösung gestartet. Als Basiswert wird ein kompletter Assay ohne Urease verwendet. Der Basiswert wird verwendet um eine mögliche katalytische Hintergrundaktivität von nativen Proben nach der Sterilfiltration auszuschließen. In diesem Fall besteht der Assay aus 800 μL der Wasserprobe, 100 μL Reinstwasser und 100 μL Substrat-Indikatorlösung ohne zusätzliches Enzym.

Die in dieser Anordnung gemessene, Größe ist die Reaktionsrate der Harnstoffhydrolyse, die durch die Urease katalysiert wird, die durch den pH-Wertanstieg hervorgerufene Farbänderung angezeigt wird.

Die Kombination von pH-indizierter Reaktion und pH-Verschiebung durch Hydrolyse von Harnstoff führt zu einer Selbstanpassung des pH-Wertes des Assay, während die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt wird. Dies setzt voraus, dass der pH-Wert zu Beginn der Reaktion niedriger als 8,2 ist. In diesem Fall wird die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit am Neutralpunkt von Phenolphthalein (pH 8,2) gemessen. Die Geschwindigkeit der pH-Werterhöhung und die damit einhergehende Erhöhung der Farbintensität wird durch die Schwermetallionenkonzentration beeinflusst. Die inhibierende beziehungsweise inaktivierende Wirkung von Schwermetallionen wurde für Kobalt(II)chlorid, Kupfer(II)chlorid, Eisen(II)chlorid, Blei(II)nitrat, Mangan(II)chlorid, Quecksilber(II)chlorid, Nickel(II)chlorid und Silber(I)nitrat gemessen und spezifiziert. Sind außer Schwermetallionen keine weiteren Inhibitoren zu erwarten, kann eine inhibierende Wirkung in direkter Abhängigkeit von der Schwermetallkonzentration angenommen werden.

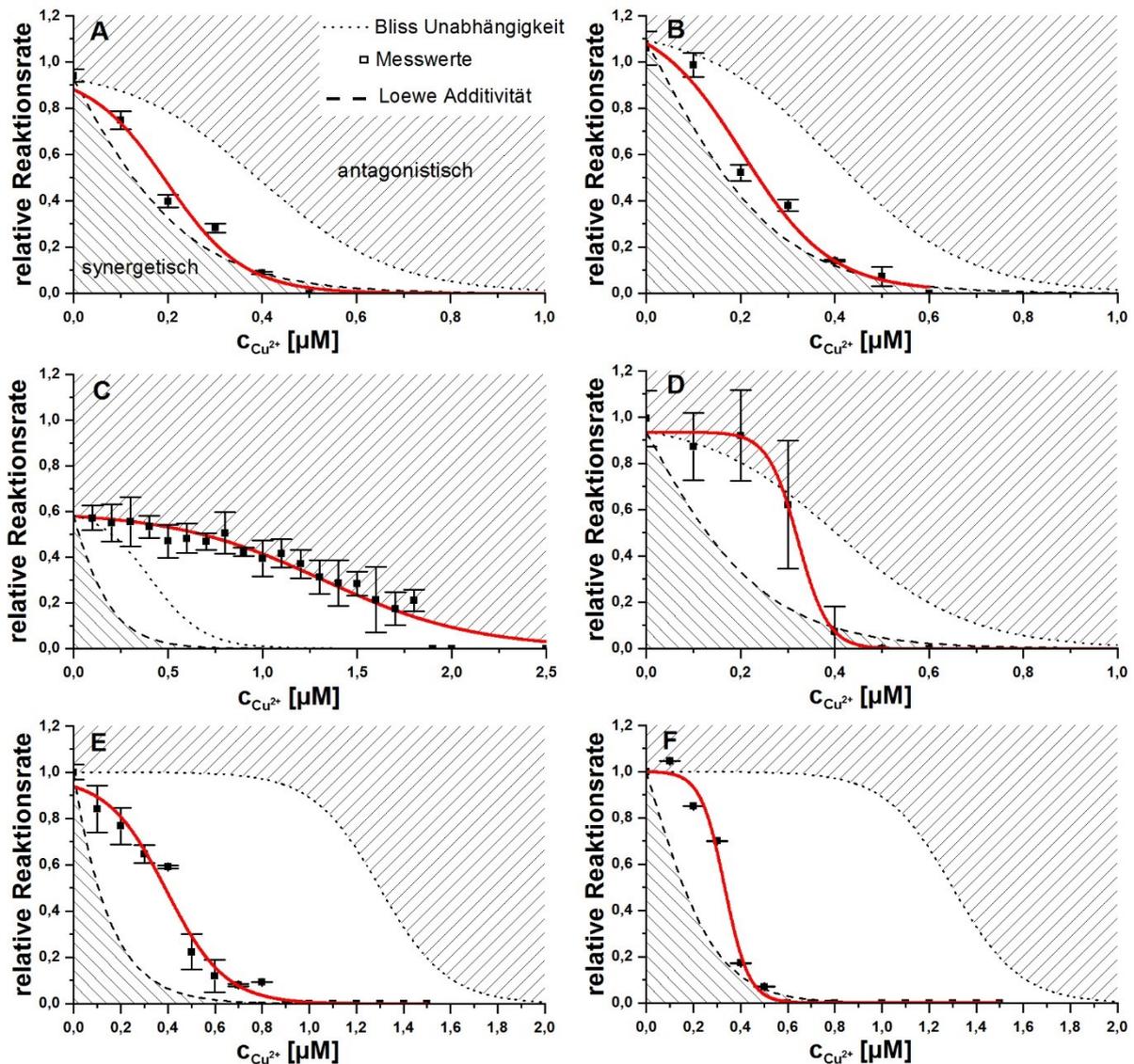


Abbildung 19: Kumulative inhibitorische Effekte, gemessen am Smartphonephotometer, LG G3 (LG Corporation, Süd Korea) ($n = 5$); **A:** 10,0 nM CuCl_2 , 20 nM MnCl_2 , 20 nM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 20 nM NiCl_2 , 30 nM CoCl_2 ; **B:** 5,0 nM CuCl_2 , 5 nM MnCl_2 , 5 nM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 5 nM NiCl_2 , 5 nM CoCl_2 ; **C:** 6 μM NiCl_2 ; **D:** Trinkwasser; **E:** Meerwasser (Nordsee, November 2016); **F:** Flusswasser; CuCl_2 wird im Bereich von 0–3,0 μM zugegeben.

Die komplexen Mischungen von CuCl_2 , MnCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, NiCl_2 und CoCl_2 zeigen keine Inhibierungseffekte, die durch die Bliss Unabhängigkeitstheorie vorhergesagt werden könnten, obwohl die Dose Response Parameter unabhängige Inhibitionsmechanismen nahelegen (Abbildung 19 A und B). Die Inhibierung der Enzymaktivität durch die ausgewählten Inhibitoren ist durch Loewe-Additivität mit antagonistischer Aberration annähernd vorhersagbar. Da es sich bei Urease um ein nickelabhängiges Enzym handelt, bei dem Nickel kovalent im aktiven Zentrum des Holoenzym gebunden ist, kann die antagonistische Aberration der kumulativen Hemmung als Folge des NiCl_2 im Inhibitorgemisch angenommen werden. Darüber

hinaus zeigt die Hemmung der Ureaseaktivität durch CuCl_2 in Gegenwart von $6 \mu\text{M}$ Nickelionen einen deutlichen antagonistischen kumulativen Inhibierungsmechanismus (Abbildung 19 C), der diese These untermauert. Die Proben von Trinkwasser, Meerwasser und Flusswasser (Abbildung 19 D-F) zeigen keine eindeutige Tendenz zu einem der verwendeten Modelle. In niedrigeren Konzentrationen ist der kumulative Effekt näherungsweise durch die Bliss-Unabhängigkeit vorhersagbar; höhere Konzentrationen von CuCl_2 folgen dem Loewe-Additivitätsmodell. Eine mögliche Erklärung für diesen komplexen Zusammenhang in der hemmenden Wirkung von CuCl_2 -haltigen Schwermetallgemischen könnte das Vorliegen mehrerer inhibitorischer Mechanismen der Kupferionen auf die Urease sein. Es wird vermutet, dass Kupfer einerseits durch Wechselwirkung mit Histidin-Gruppen und andererseits durch Thiol-Blockierung, die zur Polymerisation und Inaktivierung des Enzyms führt, die Urease hemmt [114]. Die Polymerisation durch Wechselwirkung von Kupfer und Histidin-Gruppen an den Positionen 134, 136, 219, 246 oder 320 in der Aminosäuresequenz der Urease (*Canavalia ensiformis*) führt zu einer Inaktivierung des Enzyms durch sterische Effekte und Verlust des koordinierten Nickels im aktiven Zentrum [56]. Die Gegenwart von freien Nickelionen im aktiven Zentrum erschwert möglicherweise die Wechselwirkung von Kupferionen durch Verdrängung, was zu dem beobachteten antagonistischen kumulativen Inhibierungseffekt führt. Die Komplexität der Schwermetall-Inhibierungsmechanismen legt nahe, dass es nicht möglich ist, gemischte Inhibitionseffekte durch Modelle wie Bliss-Unabhängigkeit oder Loewe-Additivität vorherzusagen.

Wenn kumulative inhibitorische Effekte nicht durch Bliss-Unabhängigkeit oder vergleichbare Theorien mit unabhängigen Inhibitoren beschrieben werden können, wie sie für Mischungen von Schwermetallionen und Oberflächen- und Trinkwasserproben gezeigt werden konnte, ist es nicht möglich, die Wirkung einzelner Komponenten in der Mischung separat zu bestimmen. Ist die Bestimmung der Wirkung einer einzelnen Komponente nicht möglich, kann die genaue Konzentration des einzelnen Inhibitors in der Mischung ebenfalls nicht bestimmt werden. Durch die Hemmung von Urease, einem wichtigen Enzym im Stoffwechsel verschiedener Bakterien und Pflanzen, ist es jedoch möglich, die Biokompatibilität von Wasserproben vergleichbar mit anderen biologischen Wasserüberwachungssystemen wie Daphnientoxizitätstests oder

Fischembryotoxizitätsassay zu ermitteln, ohne mit lebenden Organismen umgehen zu müssen.

4.1.5 Matrixeffekte

Im Rahmen etwaiger Matrixeffekte wurde die allgemeine Salztoleranz des Assays bestimmt. Die Salztoleranz ist vor allem zur genauen Abgrenzung der Einsetzbarkeit des Systems zur Untersuchung von Meerwasserproben von besonderer Bedeutung.

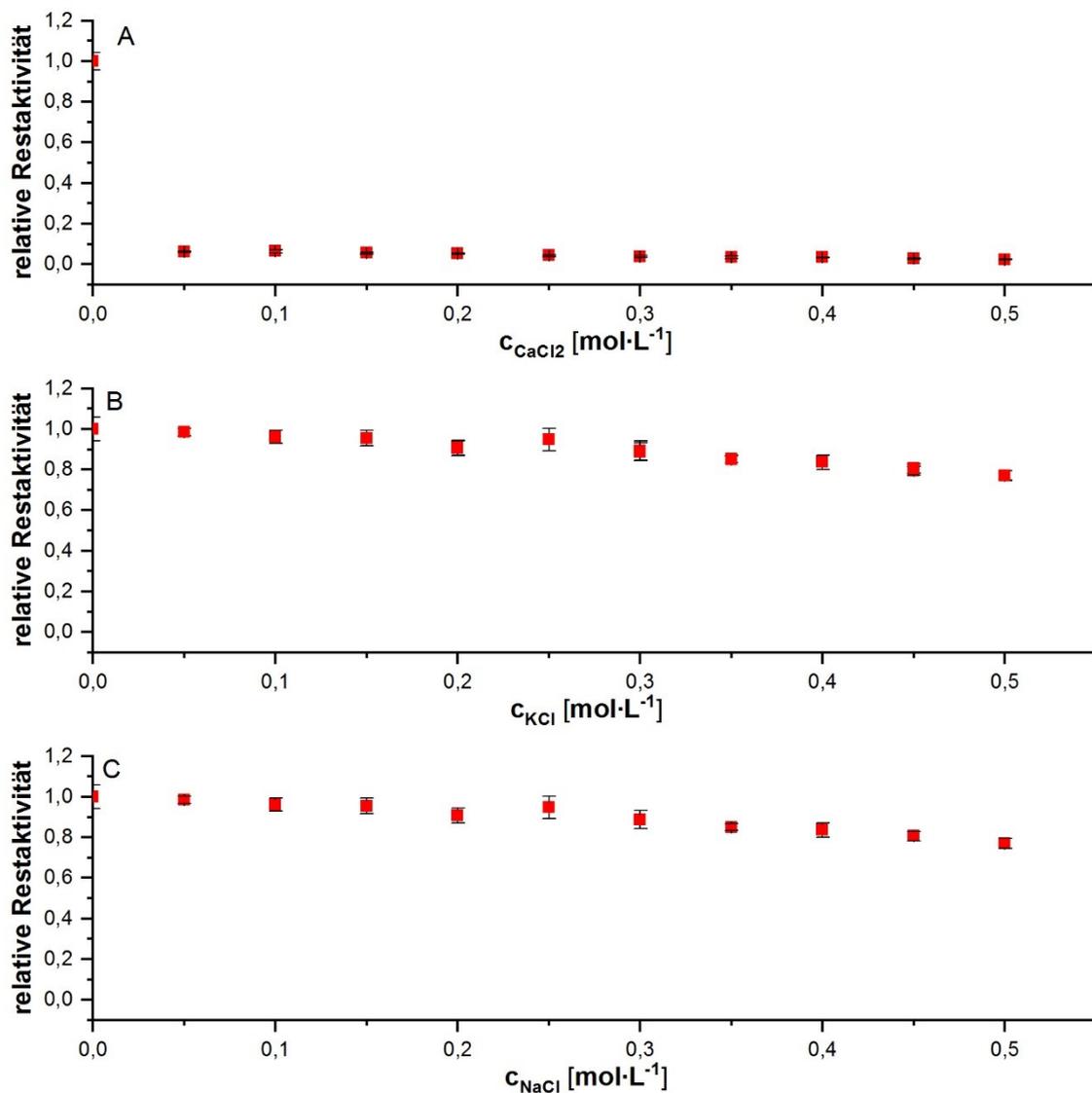


Abbildung 20: Reaktion des Ureaseassay auf erhöhte Salzkonzentrationen; A: CaCl₂; B: KCl; C: NaCl.

Als Modellkomponenten wurden zweiwertige Ionen der Erdalkalimetallgruppe und einwertige Ionen der Alkalimetallgruppe verwendet. Die Reaktion des Assays auf

NaCl, KCl und CaCl₂ in Konzentrationen bis zu 0,5 mol·L⁻¹ wurde untersucht. Die Untersuchungsergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt. Der Test zeigt eine hohe Toleranz gegenüber einwertigen Ionen mit einer linearen Reduktion der Restaktivität auf 77,1 ± 2,5% bei einer Salzkonzentration von 0,5 mol·L⁻¹ für NaCl und KCl. Die hemmende Wirkung von CaCl₂ ist vergleichbar mit der Wirkung von Schwermetallionen. Die Aktivität bei einer Konzentration von 0,5 mol·L⁻¹ wird auf 2,2 ± 0,2% reduziert. Aufgrund dieses Effekts sind zweiwertige Erdalkalimetallionen als Störgröße zu betrachten. Bei der Untersuchung von Schwermetallkonzentrationen in Wasserproben muss deren Konzentration berücksichtigt werden.

4.2 Glucoseoxidase-Peroxidaseassay

Der Glucoseoxidase-Peroxidaseassay wurde basiert auf dem Assay zum Nachweis von verschiedenen Schwermetallen entwickelt, veröffentlicht von Wu et al., 2017 [115]. Um einen kostengünstigen Einsatz zu gewährleisten wurde auf den Einsatz von katalytischen Eisenoxidpartikeln verzichtet. Als Substituent wird Peroxidase verwendet. Als Indikator der enzymatischen Reaktion dient TMB in verschiedenen oxidationsstufen, aus denen sich unterschiedliche Absorptionsspektren ergeben. Die vollständige Assayzusammensetzung ist in Abschnitt C.I dargestellt.

4.2.1 Anforderungen an das verwendete Messlicht zur Transmissionsphotometrie

Die Messbarkeit des Glucoseoxidase-Peroxidaseassays zur Bestimmung von Schwermetallkonzentrationen am Smartphonephotometer ist von einer ausreichenden Intensität des, durch die verwendeten Filterfolien transmittierten, Lichts im Absorptionsbereich der verschiedenen Formen des oxidierten TMB abhängig. Die Bestimmung der Reaktionsrate zu Beginn der Reaktion erfolgt durch die Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 652 nm.

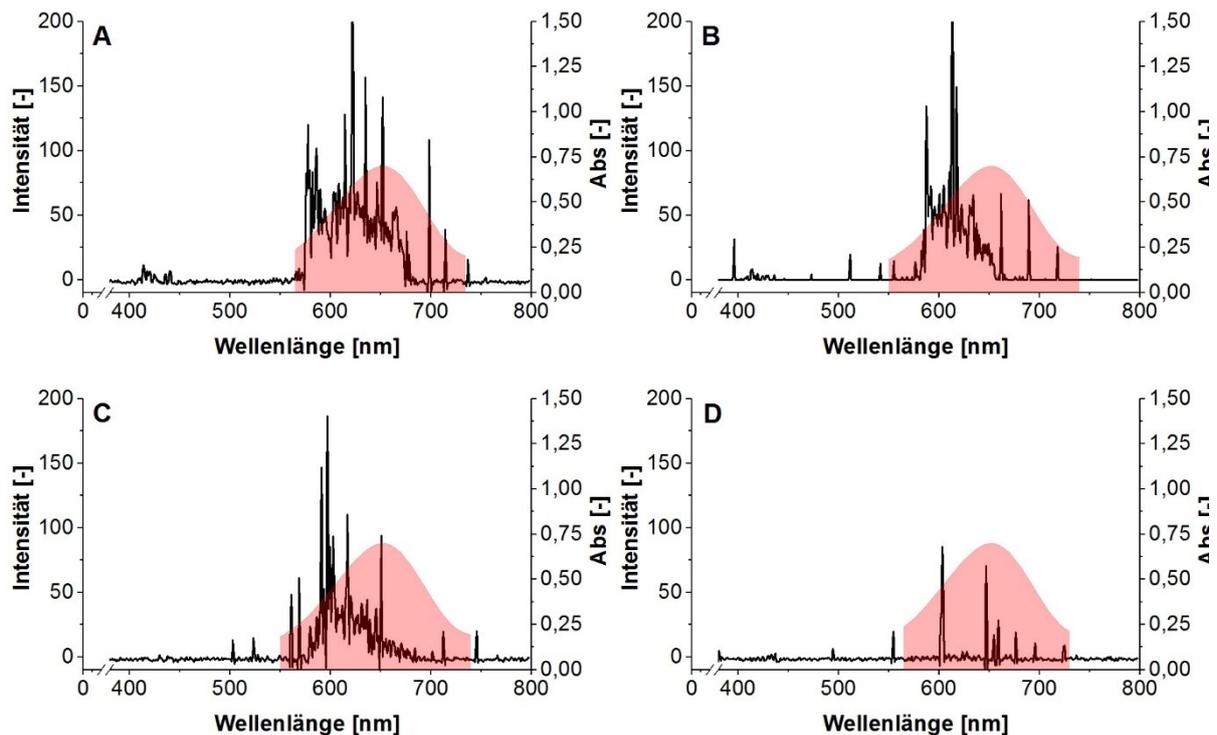


Abbildung 21: Transmissionsspektren der Blitzlicht-LED der untersuchten Smartphones nach durchtreten der Filterfolie, rot, aufgenommen mit einem Fluoreszenzspektrometer (LS 55, PerkinElmer Inc., USA) **A:** HTC one; **B:** Iphone 4; **C:** LG G3; **D:** Sony Xperia Z3; überlagert mit dem Absorptionsspektrum von TMB-dimer, oxidiert gemessen am Laborspektrometer (Varian Cary 50 UV-vis, Agilent Technologies, USA).

Die Absorptionzunahme in diesem Spektralbereich bedingt sich durch die Anwesenheit von Dimeren, bestehend aus der oxidierten und der reduzierten Form des Indikators TMB. Die Transmissionsspektren der verwendeten Smartphone-LED nach durchtreten der Filterfolie (rot) sowie das Absorptionsspektrum von TMB in dimerer Form sind in Abbildung 21 dargestellt.

Die Verwendung des Glucoseoxidase-Peroxidaseassays wird durch die hinreichende Überlagerung der Transmissionsspektren der einzelnen Blitzlicht-LED nach durchdringen des Filters unterstützt, Abbildung 21. Die verwendete Filterfolie zeigt eine hohe Absorption in den Spektralbereichen unterhalb von 600 nm (vgl. Abbildung 7 A.I).

Auch wenn die Bestimmung der Reaktionsrate der verwendeten Enzymsysteme auf Basis der Grundannahmen der Michaelis-Menten Kinetik zu Beginn der Reaktion bestimmt wird, kann die Bestimmung der Reaktionsrate zu späteren Zeitpunkten von Interesse sein. Die Reaktionsrate bei Fortschreiten der Reaktion wird durch die Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Die

Absorptionszunahme in diesem Spektralbereich bedingt sich durch die zunehmende Oxidation des Indikators. Liegt TMB in oxidiert Form in Relation zur reduzierten Form im Überschuss vor, ist eine vollständige Dimerisierung nicht mehr möglich. Das oxidierte TMB in monomerer Form weist ein Absorptionsmaximum bei 432 nm auf. Die Transmissionsspektren der verwendeten Smartphone-LED nach Durchtreten der Filterfolie (blau) sowie das Absorptionsspektrum von TMB in dimerer Form sind in Abbildung 22 dargestellt.

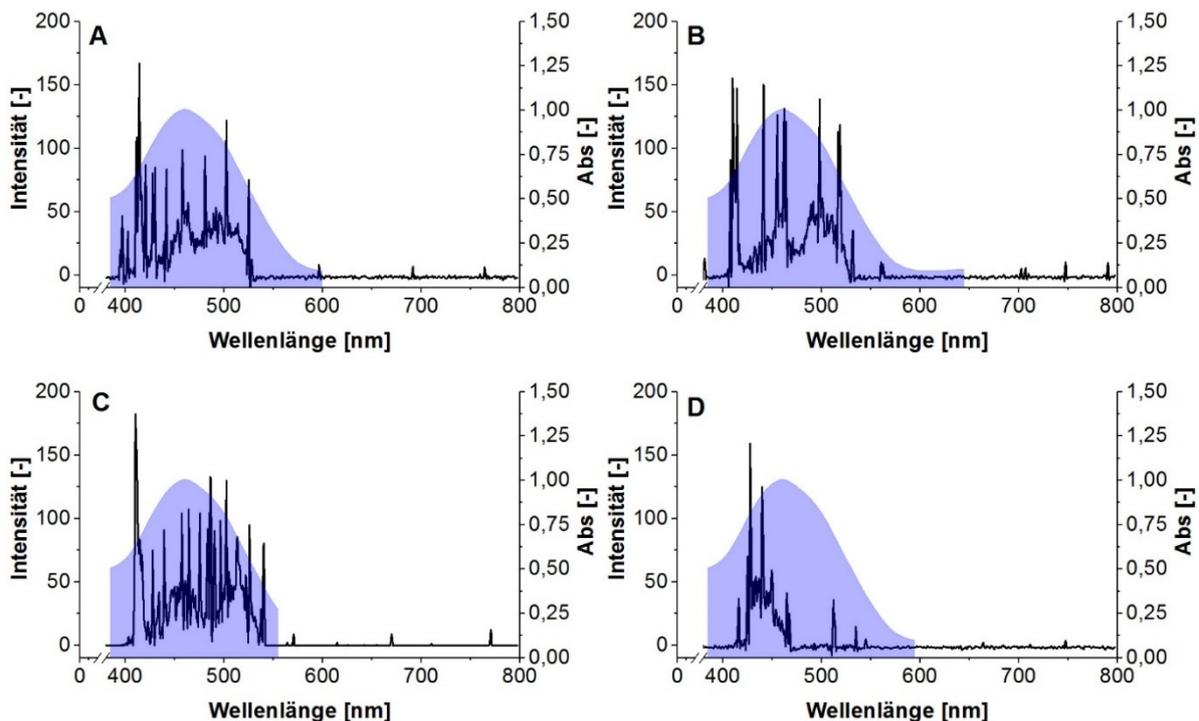


Abbildung 22: Transmissionsspektren der Blitzlicht-LED der untersuchten Smartphones nach durchtreten der Filterfolie, blau, aufgenommen mit einem Fluoreszenzspektrometer (LS 55, PerkinElmer Inc.,USA) **A:** HTC one; **B:** Iphone 4; **C:** LG G3; **D:** Sony Xperia Z3; überlagert mit dem Absorptionsspektrum von TMB-monomer, oxidiert, gemessen am Laborspektrometer (Varian Cary 50 UV-vis, Agilent Technologies, USA).

Die Verwendung von TMB als Indikator des Glucoseoxidase-Peroxidaseassays zur Bestimmung der Reaktionsrate zu späteren Zeitpunkten wird durch die entsprechenden Absorptionsspektren des oxidierten TMB sowie der Transmissionsspektren der verwendeten Smartphone-LED nach Durchtreten der Filterfolie (blau) unterstützt.

Auf Basis der technischen Anforderungen durch die verwendeten smartphoneeigenen Lichtquellen in Kombination mit den Filterfolien zur Optimierung des Spektralbereichs und den Absorptionsspektren des TMB Dimers und oxidierten Monomers erscheint der

Glucoseoxidase-Peroxidaseassay mit TMB als Indikator als geeignetes Nachweissystem zur Verwendung am Smartphonephotometer.

4.2.2 Charakterisierung der Einzelstoffinhibierung durch Schwermetallionen

In ersten Vorversuchen wurde der generelle Einfluss von Schwermetallen auf die Reaktionsrate des Glucoseoxidase-Peroxidaseassays untersucht. Zunächst wurde die Reaktionsrate des Assays in Gegenwart von Kupfer(II)ionen in variiertem Konzentration bestimmt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 23 dargestellt.

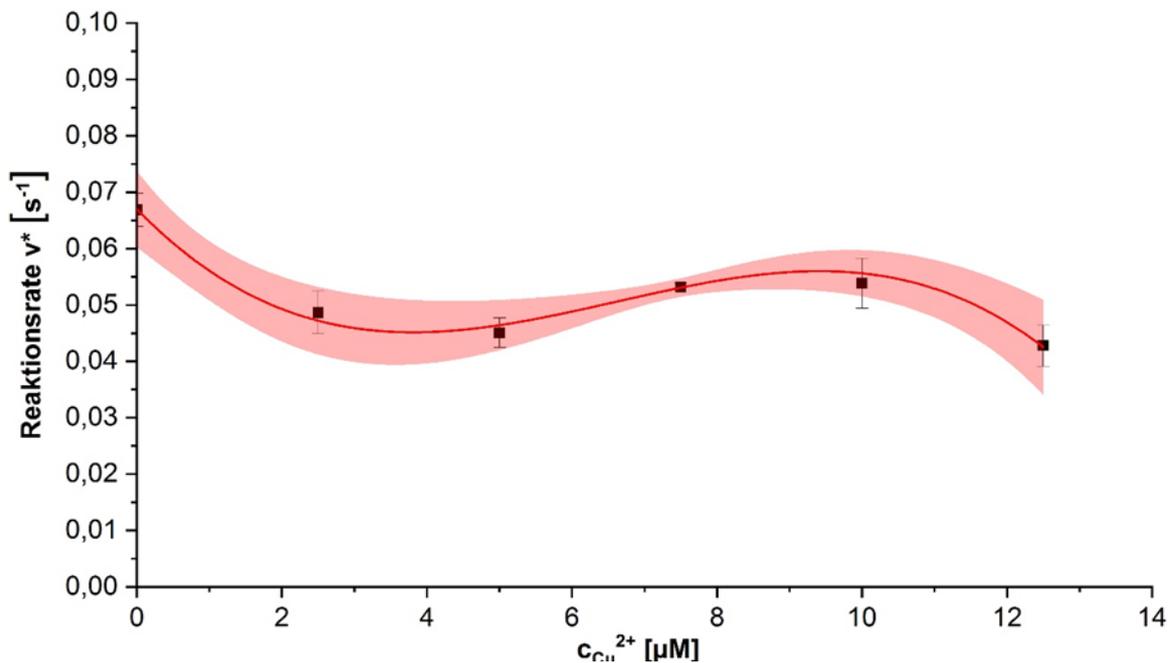


Abbildung 23: Visualisierung des inhibitorischen Verhaltens von Kupfer(II)ionen auf den Glucoseoxidase-Peroxidaseassay (2 $\mu\text{kat}\cdot\text{mL}^{-1}$ GOD; 6 $\text{nkat}\cdot\text{mL}^{-1}$ POD, 10 mM Glucose; 0,015 μM TMB, 0,1 M Acetatpuffer, pH 5,5) gemessen am Smartphonephotometer mit einem LG G3 (LG Corporation, Süd Korea); Konfidenzintervall $p= 0,05$ ($n = 7$).

Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktionsrate (v^*) durch die Anwesenheit von Kupfer(II)ionen bis zu einer Konzentration von $4\pm 1 \mu\text{M}$ reduziert wird. Bei weiterer Erhöhung der Kupfer(II)ionenkonzentration im Assay zeigt sich eine leichte Erhöhung der Reaktionsrate bis zu einer Konzentration von 10 μM . Bei Überschreiten dieser Konzentration fällt die Reaktionsrate abermals ab. Diese Beobachtung lässt auf einen komplexen Inhibierungsmechanismus schließen, der als Folge der Verwendung einer Enzymkaskade, bestehend aus zwei Enzymen entsteht. Auf Basis des komplexen Inhibierungsverhaltens kann ein Zusammenhang der Reaktionsrate und der

Schwermetallionenkonzentration nicht als monotone Funktion (vgl. Abschnitt 2.5.1) dargestellt werden. Diese Darstellbarkeit ist eine Grundvoraussetzung für den Einsatz des Assays zur exakten Konzentrationsbestimmung von Schwermetallionen in Gewässerproben.

Um den Einfluss der Verwendung einer Enzymkaskade zu bestimmen, wurde eine entsprechende Versuchsreihe ohne die Verwendung von Glucoseoxidase durchgeführt. Als Substrat wurde dem Assay unmittelbar Wasserstoffperoxid zugesetzt. Einziges Enzym im Assay ist Peroxidase. Die Ergebnisse der Versuchsreihe sind in Abbildung 23 dargestellt.

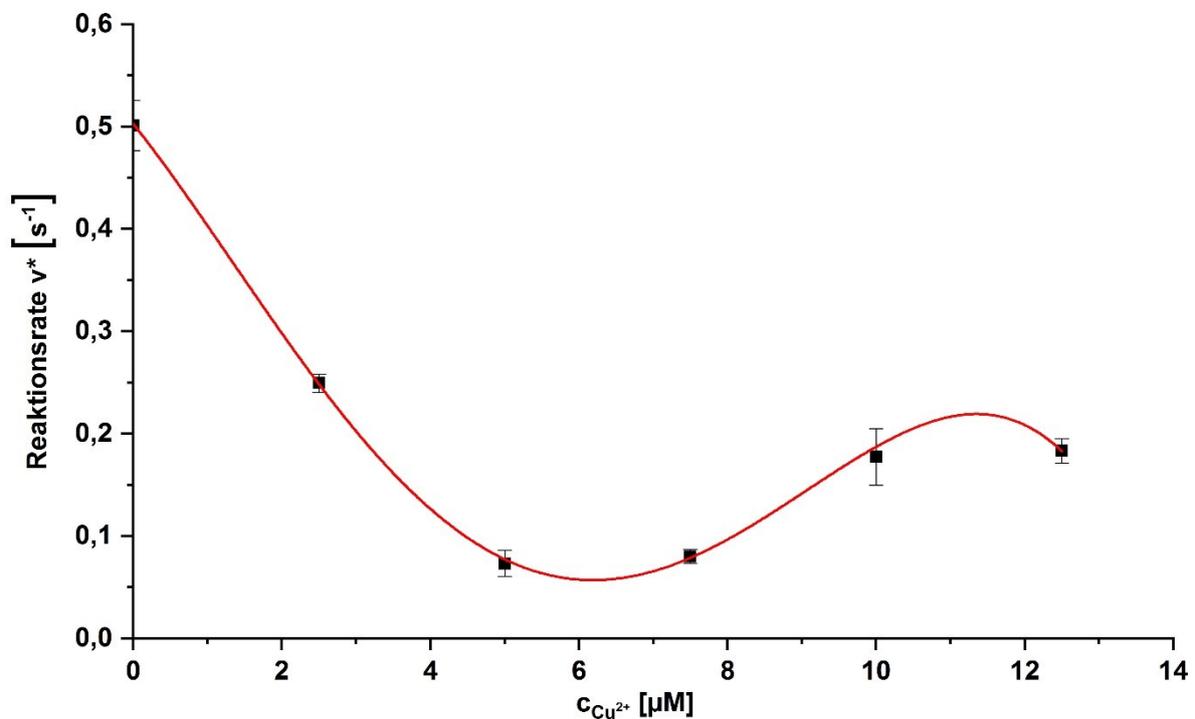


Abbildung 24: Visualisierung des inhibitorischen Verhaltens von Kuper(II)ionen auf den Peroxidaseassay (4 nkat·mL⁻¹ POD, 10 mM H₂O₂; 0,015 μM TMB, 0,1 M Acetatpuffer, pH 5,5) gemessen am Smartphonephotometer mit einem LG G3 (LG Corporation, Süd Korea); Konfidenzintervall $p=0,05$ ($n=7$).

Der Verlauf der Reaktionsrate des Peroxidaseassays bei variiertem Kuper(II)ionenkonzentration entspricht dem Verlauf der Reaktionsrate des Glucoseoxidase-Peroxidaseassays. Auffällig ist, dass die maximale Reaktionsrate des Assays die Reaktionsrate des Assays mit beiden Enzymen deutlich übersteigt, die minimale Reaktionsrate jedoch im gleichen Bereich liegt. Die stark erhöhte Reaktionsrate entspricht der Ausgangsforderung, dass die Peroxidase im Vergleich

zur Glucoseoxidase im deutlichen Überschuss vorliegen muss um die Aktivität der Glucoseoxidas bestimmen zu können. Die Übereinstimmung der minimalen Reaktionsrate in beiden Systemen spricht dafür, dass die Peroxidaseaktivität deutlich stärker durch die Anwesenheit von Kupfer(II)ionen beeinflusst wird als die Glucoseoxidasaktivität. Die Inhibierung der Peroxidase zeigt weiterhin eine nicht monotone Tendenz und kann ebenfalls nicht als monotone Funktion (vgl. Abschnitt 2.5.1) dargestellt werden. Die Verwendung von deutlich höheren Peroxidasekonzentrationen zum Ausgleich dieser stärkeren Beeinflussung und Messung der Inhibierung der Glucoseoxidase erscheint nicht zielführend, da von einer Komplexierung der Schwermetalle durch die Peroxidase ausgegangen werden muss. Diese Komplexierung würde zu stark erhöhten Nachweisgrenzen durch die Glucoseoxidase führen. Der Glucoseoxidase-Peroxidaseassay wurde, trotz der optimalen Übereinstimmung des Absorptionsspektrums von TMB und des Emissionsspektrums der Blitzlicht-LED, in den weiteren Untersuchungen nicht in Betracht gezogen.

5 Anwendungsfeld: Weinanalytik

Als chemischer Parameter, der im Weinbau von besonderer Bedeutung ist, wurde die Durchführbarkeit von quantitativen Eisennachweisen am kapillarbasierten Smartphonephotometer untersucht (vgl. Abschnitt 2.6). Für alle verwendeten Systeme ist eine Vorkonfektionierung der Assaykapillaren vorgesehen. Die Fixierung der Assaykomponenten erfolgt durch Vorlage der Komponenten in gelöster Form mit anschließender Trocknung bei einer Temperatur von 55°C für 24 h.

5.1 Eisen(II)-, Eisen(III)- und Totaleisennachweis

Der Eisennachweis erfolgt im Fall von Eisen(II) mithilfe von Ammoniumthiocyanat (vgl. Abschnitt 2.6.1), im Fall von Eisen(III) mit Ferrozin (vgl. Abschnitt 2.6.2). Der Gesamteisennachweis wird durch die Oxidation von Eisen(II) zu Eisen(III) mittels Natriumpercarbonat, respektive der Reduktion von Eisen(III) zu Eisen(II) mittels Ascorbinsäure, erreicht. Um eine Benutzerfreundliche Handhabung zu gewährleisten wird eine Messzeit von unter zehn Minuten angestrebt. Diese kurze Messzeit ermöglicht die Durchführung der Messung direkt im Weinkeller und führt voraussichtlich zu einer erhöhten Akzeptanz der Analytik durch geringe Beeinflussung

der Arbeitsabläufe. Als abgeschlossene Messung wird das Erreichen von 95% des stationären Absorptionswertes definiert.

5.1.1 Anforderungen an das verwendete Messlicht zur Transmissionsphotometrie

Um die Verwendbarkeit des Ferrozinsassays zum Eisen(II)nachweis am Smartphonephotometer zu gewährleisten, ist eine ausreichende Intensität des, durch die verwendeten Filterfolien transmittierten, Lichts im Absorptionsbereich des Ferrozineisenkomplexes notwendig. Die Transmissionsspektren der verwendeten Smartphone-LED nach Durchtreten der Filterfolie (grün) sowie das Absorptionsspektrum des Ferrozineisenkomplexes sind in Abbildung 25 dargestellt. Die maximale Absorption des Ferrozineisenkomplexes liegt bei 562 nm. Die Absorptionszunahme in Anwesenheit von Eisen liegt im Bereich von 420 bis 620 nm.

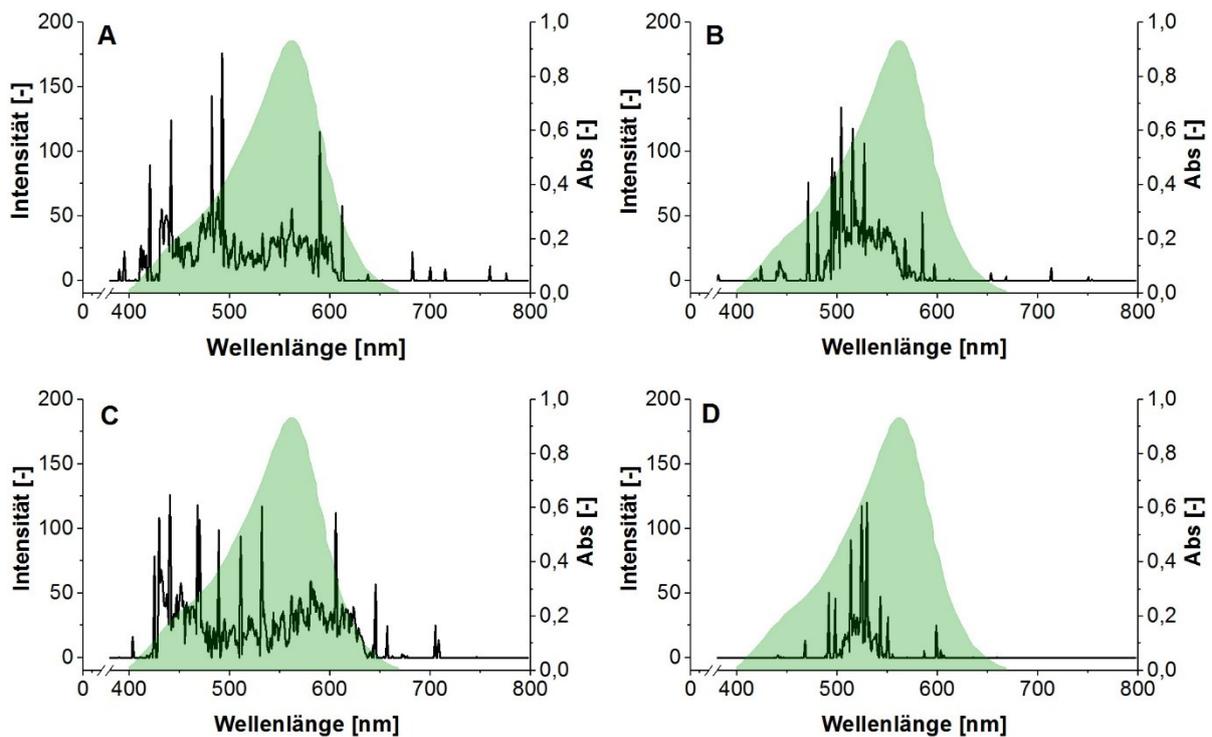


Abbildung 25: Transmissionsspektren der Blitzlicht-LED der untersuchten Smartphones nach durchtreten der Filterfolie, grün, Abbildung 7, aufgenommen mit einem Fluoreszenzspektrometer (LS 55, PerkinElmer Inc., USA) **A:** HTC one; **B:** Iphone 4; **C:** LG G3; **D:** Sony Xperia Z3; überlagert mit dem Absorptionsspektrum von Ferrozin gemessen am Laborspektrometer (Varian Cary 50 UV-vis, Agilent Technologies, USA).

Die verwendete Filterfolie zeigt eine hohe Absorption in den Spektralbereichen von mehr als 650 und weniger als 500 nm. Durch die Verwendung der Filterfolie wird die Lichtintensität, die durch die Absorption des Ferrozineisenkomplexes nicht beeinflusst

wird, stark reduziert. Durch die Verwendung der Filterfolie kann das Verhältnis von Hintergrund zu Signal im Vergleich zur direkten Verwendung der Blitzlicht-LED deutlich verbessert werden, was zu reduzierten Standardabweichungen und Nachweisgrenze des Assays führt. Anhand der Transmissionsspektren der Blitzlicht-LED nach Durchtreten der Filterfolie und des Absorptionsspektrums kann davon ausgegangen werden, dass der Assay am Smartphonephotometer messbar ist.

Davon ausgehend, dass die Absorptionsmaxima von Ammoniumthiocyanat in Anwesenheit von Eisen(III)ionen bei 492 nm liegt, wurde die Messbarkeit des Assays anhand von Literaturdaten des Absorptionsspektrums in Kombination mit den Transmissionsspektren angenommen [79]. Der Eisen(III)- und der Totaleisennachweis mittels Ammoniumthiocyanat wird unter Verwendung der blauen Filterfolie am Smartphonephotometer durchgeführt (vgl. abschnitt 3.1).

5.1.2 Eisen(II)- und Eisen(III)nachweis

Um den, in Weinen relevanten, Eisenkonzentrationsbereich von 2,3 bis 8,0 mg·L⁻¹, entsprechend 0,041 bis 0,14 mM abzudecken und möglichst hohe Reaktionsraten des Assays zu erreichen, wurden Kapillaren mit einer Ferrozinbeschichtung versehen, die zu einer Konzentration von 2 mM beim Füllen der Kapillaren führt, verwendet. Die theoretische maximal nachweisbare Eisenkonzentration liegt damit bei 1 mM. Neocuproin dient in einer Konzentration von 0,6 mM der Maskierung von Kupferionen, die zu einem fälschlich erhöhten Absorptionssignal führen würden. Ammoniumacetat dient in einer Konzentration von 0,1 M der Variation der Feststoffkonzentration in den Kapillaren und hat keinen direkten Einfluss auf die Assayreaktion, beeinflusst allerdings die Morphologie der Kapillarbeschichtung. Als Lösungsmittel werden sowohl Wasser als auch Methanol verwendet. Der Wechsel des Lösungsmittels dient der Optimierung der Beschaffenheit und Verteilung der Kapillarbeschichtung. Die Komposition der verwendeten Ferrozinassays ist in Tabelle 3 aufgeführt. Alle Komponenten werden in gelöster Form in den Kapillaren vorgelegt. Die Fixierung der Assaykomponenten erfolgt durch Trocknung bei 55°C für 24 h.

Tabelle 3: Verwendete Assaykompositionen zur Kapillarbeschichtung zum Eisen(II)nachweis; verwendet wurden Borosilikatglaskapillaren, v: 30 µL, l: 30 mm; Befüllung der Kapillaren durch Kapillareffekt mit anschließender Trocknung bei 55°C, 24 h; (n=100).

Serie Nr.	C _{Ferrozin} [mM]	C _{Neocuproin} [mM]	C _{Ammoniumacetat} [M]	C _{Ascorbinsäure} [M]	Lösungsmittel
-----------	----------------------------	------------------------------	---------------------------------	--------------------------------	---------------

Anwendungsfeld: Weinanalytik

1	2,0	0,6	-	-	H ₂ O, reinst
2	2,0	0,6	0,1	-	H ₂ O, reinst
3	2,0	0,6	-	-	Methanol, pa.
4	2,0	0,6	0,1	-	Methanol, pa.

Nach der Trocknung werden die Kapillaren für Eisen(II)-messungen in wässrigen Modellsystemen eingesetzt. Verwendet wird Eisen(II)-chlorid in Konzentrationen von 0; 0,2; 0,5; 1,0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 und 500 μM .

Die Ergebnisse der Funktionstests der ferrozinbasierten Assaykapillaren am Kapillarphotometer der letzten Generation sind in Abbildung 26 dargestellt.

Die Zugabe von Ammoniumacetat zeigt in Systemen, die mit Wasser als Lösungsmittel hergestellt wurden, keinen Einfluss auf die generierten Messwerte. In Kapillaren, die mit Methanol als Lösungsmittel hergestellt wurden, zeigt sich durch die Zugabe von Ammoniumacetat eine deutliche Reduzierung der Messwertstreuung. Diese Reduzierung kann durch einen hohen Feststoffanteil in der Kapillare bei gleichzeitig geringer Löslichkeit der Komponenten erklärt werden. Durch diesen Sachverhalt wird bereits zu Beginn der Trocknung Feststoff gleichmäßig an der Kapillarwandung angelagert. Bei höherer Löslichkeit oder reduzierter Feststoffkonzentration erfolgt diese Ablagerung erst bei stark reduziertem Flüssigkeitsvolumen punktuell, an nicht reproduzierbaren Positionen der Kapillaren. Die punktuelle Ablagerung führt zu verlängerten Diffusionsstrecken bei der Befüllung der Kapillaren mit der zu analysierenden Lösung mit erhöhter Streuung in den Absorptionswerten.

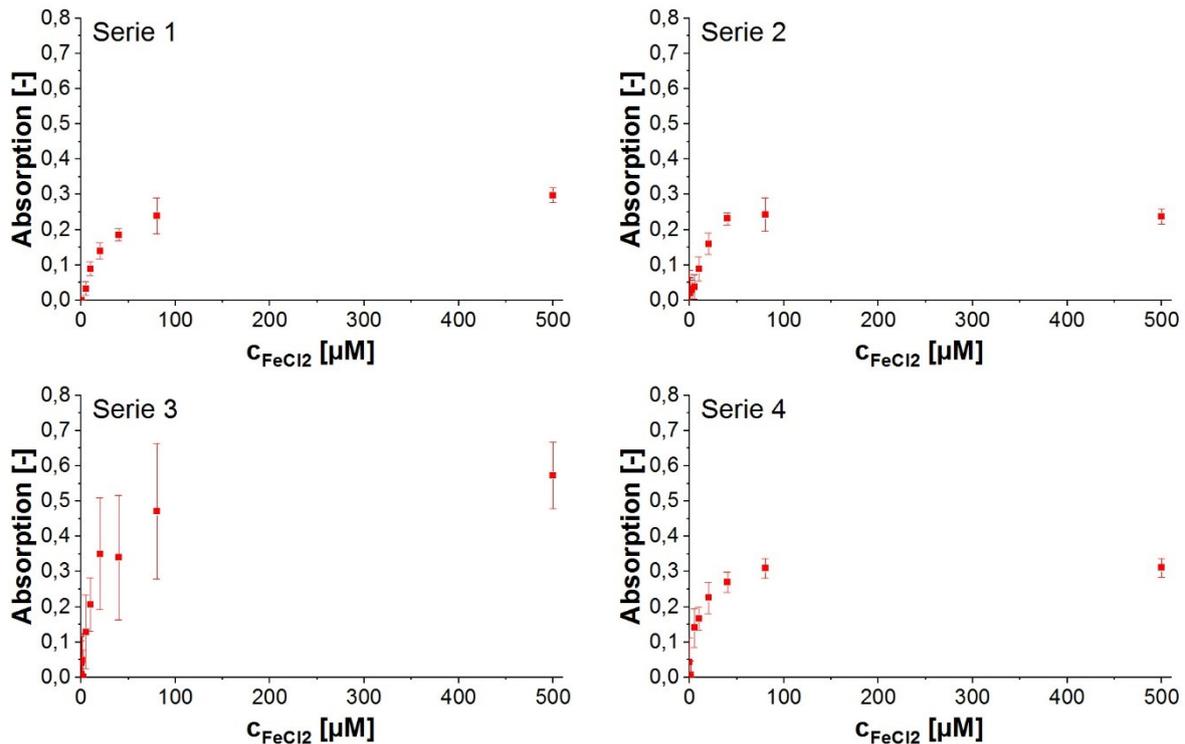


Abbildung 26: Eisen(II)nachweis mittels Ferrozin mit vorbeschichteten Kapillaren variierter Assaykompositionen (vgl. **Tabelle 3**) am kapillarbasierten Smartphonephotometer in Kombination mit einem Samsung A5, 6; unter Verwendung der grünen Filterfolie verwendet wurden Borosilikatglaskapillaren, v: 30 µL, l: 30 mm; (n=10); Testlösung mit FeCl₂.

In Abwesenheit von Ammoniumacetat führt die Verwendung von Methanol als Lösungsmittel im Vergleich zu Wasser zu stark erhöhten Messwertstreuungen.

In allen untersuchten Assaykompositionen liegt der lineare Messbereich unterhalb von 40 µM bei einer Absorption von maximal 0,245. Unter Berücksichtigung des angestrebten Messbereichs ist eine Erhöhung der Ferrozinkonzentration in weiteren Versuchen anzustreben.

Unter der möglichen Zielsetzung der Steigerung der Nachhaltigkeit in der Produktion durch Reduzierung des Einsatzes von unbedenklichen Lösungsmitteln kann Serie 1, bedingt durch die Verwendung von Wasser als Lösungsmittel und einer minimalen Komplexität in der Assayzusammensetzung als optimal angesehen werden.

Zur Herstellung der Assaykapillaren auf Basis von Ammoniumthiocyanat wurde eine Ammoniumthiocyanatkonzentration von 0,2 M verwendet. Eine Maskierung von weiteren Metallionen ist bei der Verwendung von Ammoniumthiocyanat nicht erforderlich. Die Komposition des verwendeten Assays ist in Tabelle 4 aufgeführt. Auf Grund der mangelhaften Löslichkeit und der kristallinen Struktur der

Assaykomponenten ist eine Verwendung von Methanol als Lösungsmittel zur Beschichtung der Kapillaren nicht möglich.

Tabelle 4: Verwendete Assaykompositionen zur Kapillarbeschichtung zum Eisen(III)nachweis; verwendet wurden Borosilikatglaskapillaren, v: 30 μ L, l: 30 mm; Befüllung der Kapillaren durch Kapillareffekt mit anschließender Trocknung bei 55°C, 24 h; (n=100).

Serie Nr.	C _{Ammoniumthiocyanat} [M]	C _{Natriumpercarbonat} [M]	Lösungsmittel
5	0,2	-	H ₂ O, reinst

Die Beschichtung der Assaykapillaren mit Ammoniumthiocyanat erfolgt äquivalent zur Beschichtung der ferrozinbasierten Assaykapillaren. Nach der Trocknung werden die

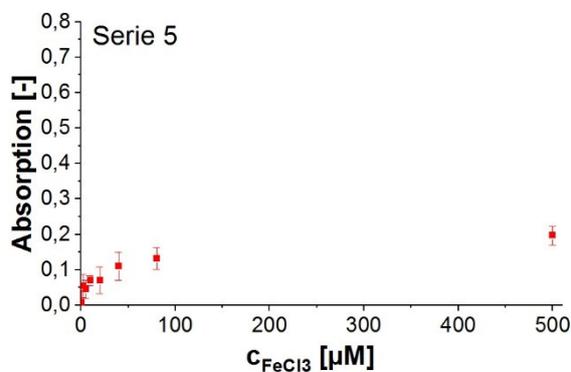


Abbildung 27: Eisen(II)nachweis mittels Ammoniumthiocyanat mit vorbeschichteten Kapillaren variierter Assaykompositionen (vgl. Tabelle 4) am kapillarbasierten Smartphonephotometer in Kombination mit einem Samsung A5, 6; unter Verwendung der grünen Filterfolie; verwendet wurden Borosilikatglaskapillaren, v: 30 μ L, l: 30 mm; (n=10); Testlösung mit FeCl₂.

Kapillaren für Eisen(III)messungen in wässrigen Modellsystemen eingesetzt. Die Messergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt. Verwendet wird Eisen(III)chlorid in Konzentrationen von 0; 0,2; 0,5; 1,0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 und 500 μ M.

In der untersuchten Assaykomposition auf Basis von Ammoniumthiocyanat liegt der lineare Messbereich unterhalb von 2,5 μ M bei einer Absorption von maximal 0,077. Dieser, im Vergleich zum ferrozibasierten Assay, sehr

niedrige Messbereich sowie die niedrige Absorption erschweren den Einsatz des Ammoniumthiocyanatassays in der bisherigen Komposition zur Eisenbestimmung in Wein- und Mostproben. Die Verwendung von Ferrozin als Eisenindikator erscheint vorteilhaft.

5.1.3 Oxidation und Reduktion von Eisenspezies im Assay

Im Rahmen einer Vorversuchsreihe wurde die Reduktion- beziehungsweise Oxidationskinetik der entsprechenden Eisenspezies untersucht. Eine ausreichende Geschwindigkeit der Umsetzung ist für die Gesamtmesszeit der angestrebten Eisennachweisreaktionen, als geschwindigkeitsbestimmender Schritt, von zentraler

Bedeutung. Die Untersuchung erfolgt mit gelösten Assaykomponenten in herkömmlichen Küvetten. Der Nachweis der Konzentration der jeweiligen resultierenden Eisenspezies erfolgt auf gleichem Wege, der im späteren Assay in Kapillaren angestrebt wird. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt.

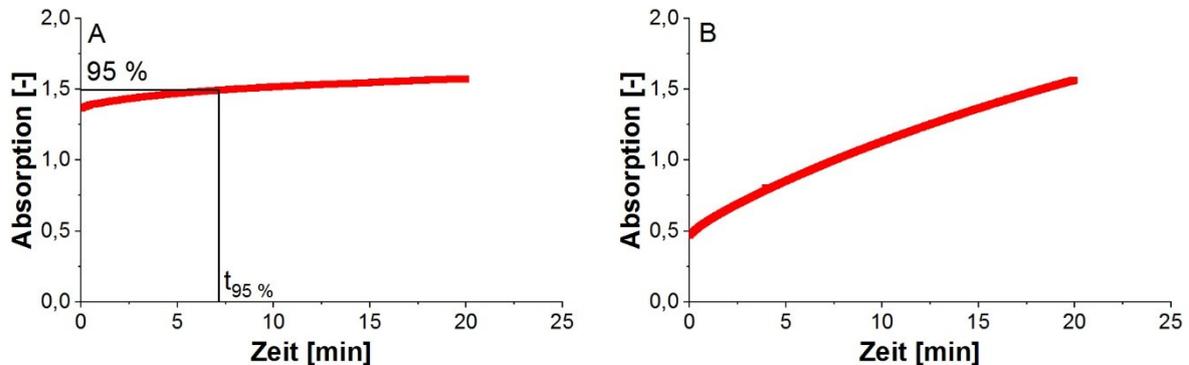


Abbildung 28: A: Kinetik der Eisen(II)oxidation mittels Natriumpercarbonat unter Assaybedingungen; 0,2 M Ammoniumthiocyanat, 0,1 M Natriumpercarbonat, 0,35 mM FeCl₂; **B:** Kinetik der Eisen(III)reduktion mittels Ascorbinsäure unter Assaybedingungen; 2 mM Ferrozin, 0,6 mM Neocuproin, 0,1 M Ascorbinsäure, 0,35 mM FeCl₂; gemessen am Laborspektrometer (Varian Cary 50 UV-vis, Agilent Technologies, USA) (n=10).

Die Oxidation von Eisen(II) (0,35 mM FeCl₂) zu Eisen(III) mit Natriumpercarbonat in einer Konzentration von 0,1 M zeigt eine Absorptionwert von 95% des stationären Endwertes zu erreichen, wird eine Zeit von 7:12 Minuten benötigt. Diese Zeit liegt deutlich unterhalb der Zielsetzung einer abgeschlossenen Messung nach zehn Minuten. Die Reduktion von Eisen(III) (0,35 mM FeCl₃) mittels Ascorbinsäure in einer Konzentration von 0,1 M ist nach einer Messzeit von 20 Minuten nicht abgeschlossen und verfehlt damit die Zielsetzung deutlich. Der erhöhte Startwert der Absorption bedingt sich in beiden Fällen durch die hohe Reaktionsrate zu Beginn der Umsetzung.

Auf Basis der thermischen Instabilität von Natriumpercarbonat, mit einer Zersetzungstemperatur von 60°C [117], und der deutlich besseren Resultate der Eisennachweisreaktionen mittels Ferrozin wurden in den Präparationsversuchen der vorkonfektionierten Assaykapillaren trotz der unzureichenden Reaktionsrate zusätzlich Kapillaren mit Ascorbinsäurezugabe zum Eisennachweis untersucht.

5.1.4 Totaleisennachweis

Der Totaleisennachweis erfolgt unter identischen Bedingungen wie der Eisen(II)- und Eisen(III)nachweis. Die jeweiligen Assaykompositionen werden durch den Zusatz von Ascorbinsäure als Reduktionsmittel beziehungsweise Natriumpercarbonat als

Oxidationsmittel variiert. Die Komposition der verwendeten Ferrozinassays ist in Tabelle 5 aufgeführt. Alle Komponenten werden weiterhin in gelöster Form in den Kapillaren vorgelegt. Die Fixierung der Assaykomponenten erfolgt durch Trocknung bei 55°C über einen Zeitraum von 24 h.

Tabelle 5: Verwendete Assaykompositionen zur Kapillarbeschichtung zum Totaleisennachweis mittels Ferrozin; verwendet wurden Borosilikatglaskapillaren, v: 30 µL, l: 30 mm; Befüllung der Kapillaren durch Kapillareffekt mit anschließender Trocknung bei 55°C, 24 h; (n=100).

Serie Nr.	C _{Ferrozin} [mM]	C _{Neocuproin} [mM]	C _{Ammoniumacetat} [M]	C _{Ascorbinsäure} [M]	Lösungsmittel
6	2,0	0,6	-	0,1	Methanol, pa.
7	2,0	0,6	-	0,1	H ₂ O, reinst
8	2,0	0,6	0,1	0,1	H ₂ O, reinst
9	2,0	0,6	0,1	0,1	Methanol, pa.

Nach der Trocknung werden die Kapillaren für Totaleisennachweise in wässrigen Modellsystemen eingesetzt. Als Modellsystem wird eine wässrige Lösung mit Eisen(III)chlorid in Konzentrationen von 0; 0,2; 0,5; 1,0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 und 500 µM verwendet. Die Verwendung von Eisen(III)chlorid stellt in diesem Zusammenhang einen Fall dar, in dem ein maximaler Umsatz durch Reduktion benötigt wird. Ein direkter Nachweis von Eisen(III) durch Ferrozin erfolgt nicht. Die Ergebnisse der Untersuchung am kapillarbasierten Smartphonephotometer sind in Abbildung 29 dargestellt.

In Abwesenheit von Ammoniumacetat führt die Verwendung von Methanol als Lösungsmittel im Vergleich zu Wasser auch beim Nachweis von Eisen(III)chlorid zu stark erhöhten Messwertstreuungen. Als weitere Effekt lässt sich zusätzlich eine deutliche Erhöhung der Absorption in dieser Assaykomposition im Vergleich zu den restlichen Kompositionen feststellen.

In allen weiteren untersuchten Assaykompositionen liegt die maximale Absorption deutlich unterhalb der gemessenen Absorption bei der Verwendung von Eisen(II)chlorid. Diese Reduzierung der maximalen Absorption spricht für eine unvollständige Reduktion des Eisen(III)chlorids durch Ascorbinsäure und lässt sich auf die zuvor bestimmte Reduktionskinetik zurückführen.

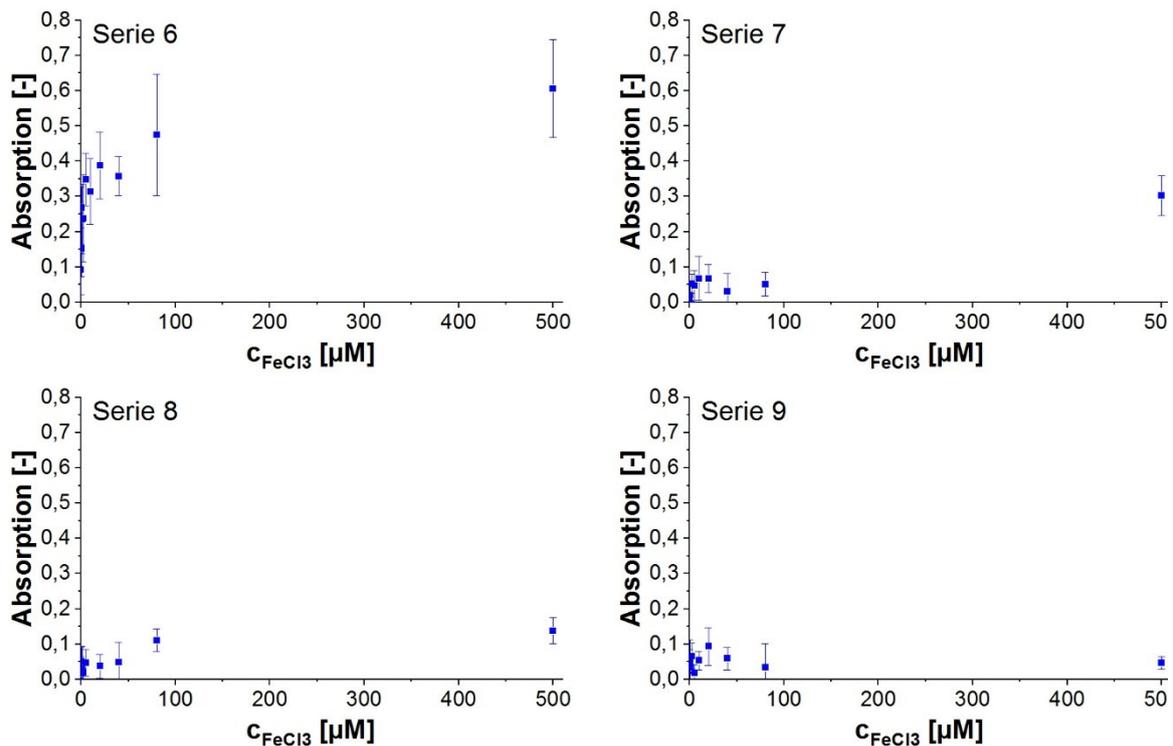


Abbildung 29: Totaleisennachweis mittels Ferrozin mit vorbeschichteten Kapillaren variiert Assaykompositionen (vgl. **Tabelle 5**) am kapillarbasierten Smartphonephotometer in Kombination mit einem Samsung A5, 6; unter Verwendung der grünen Filterfolie; verwendet wurden Borosilikatglaskapillaren, v: 30 µL, l: 30 mm; (n=10); Testlösung mit FeCl₃.

Die Komposition der verwendeten Ammoniumthiocyanatassays ist in Tabelle 6 aufgeführt. Alle Komponenten werden weiterhin in gelöster Form in den Kapillaren vorgelegt. Die Fixierung der Assaykomponenten erfolgt durch Trocknung bei 55°C für 24 h.

Tabelle 6: Verwendete Assaykompositionen zur Kapillarbeschichtung zum Totaleisennachweis mittels Ammoniumthiocyanat; verwendet wurden Borosilikatglaskapillaren, v: 30 µL, l: 30 mm; Befüllung der Kapillaren durch Kapillareffekt mit anschließender Trocknung bei 55°C, 24 h; (n=100).

Serie Nr.	C _{Ammoniumthiocyanat} [M]	C _{Natriumpercarbonat} [M]	Lösungsmittel
10	0,2	0,1	H ₂ O, reinst

Nach der Trocknung werden die Kapillaren für Totaleisenmessungen in wässrigen Modellsystemen eingesetzt. Als Modellsystem wird eine wässrige Lösung mit Eisen(II)chlorid in Konzentrationen von 0; 0,2; 0,5; 1,0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 und 500 µM verwendet. Die Verwendung von Eisen(II)chlorid stellt in diesem Zusammenhang einen Fall dar, in dem ein maximaler Umsatz durch Oxidation erreicht wird. Ein direkter Nachweis von Eisen(II) durch Ammoniumthiocyanat erfolgt nicht. Die

Ergebnisse der Untersuchung am kapillarbasierten Smartphonephotometer sind in Abbildung 30 dargestellt.

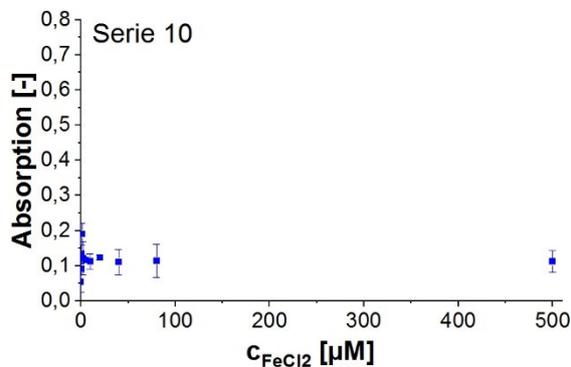


Abbildung 30: Totaleisennachweis mittels Ammoniumthiocyanat mit vorbeschichteten Kapillaren variiert Assaykompositionen (vgl. **Tabelle 6**) am kapillarbasierten Smartphonephotometer in Kombination mit einem Samsung A5, 6; unter Verwendung der grünen Filterfolie; verwendet wurden Borosilikatglaskapillaren, v : 30 μL , l : 30 mm; ($n=10$); Testlösung mit FeCl_2 .

In der untersuchten Assaykompositionen liegt die maximale Absorption leicht unterhalb der gemessenen Absorption bei der Verwendung von Eisen(III)chlorid. Diese Reduzierung der maximalen Absorption spricht für eine unvollständige Oxidation des Eisen(II)chlorids durch Natriumpercarbonat. Die Reduzierung der maximalen Absorption liegt im Vergleich zum Ferrozinassay deutlich niedriger. Auf Basis der kinetischen

Daten der Eisen(II)oxidation und des Eisen(II)nachweises mittels Ammoniumthiocyanat bieten sich weitere Untersuchungen mit erhöhter Indikatorkonzentration an. Auf diesem Wege erscheint die Ausweitung des linearen Messbereichs sowie eine optimale Messbarkeit der Totaleisenkonzentration mit dem System aus Natriumpercarbonat und Ammoniumthiocyanat realisierbar.

5.2 Kapillarbasierte Modellmethode zur Trübungsmessung

In Vorversuchen wurde die Wellenlängenabhängige Abnahme der transmittierten Lichtintensität mit einem herkömmlichen Laborphotometer untersucht. Unter der Annahme, dass Absorptionseffekte durch Partikel wellenlängenunabhängig sind, kann die relative Streulichtintensität anhand der scheinbaren Extinktion bestimmt werden. Der wellenlängenabhängige Verlauf der Streulichtintensität ist in Abbildung 31 dargestellt.

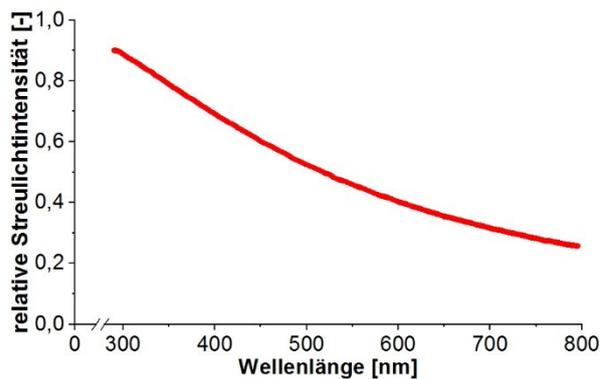


Abbildung 31: Wellenlängenabhängige Messung der relativen Streulichtintensität von Formazinstandards nach ISO 7027 am Spektrometer (Varian Cary 50 UV-vis, Agilent Technologies, USA) unter Annahme fehlender Absorption durch Partikel.

Der Verlauf der relativen Streulichtintensität bei konstanten Volumen, Partikelzahl und – Eigenschaften zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Wellenlänge des Messlichts. Die Stärke der Wellenlängenabhängigkeit lässt sich jedoch nicht durch eine Wellenlängenabhängigkeit in vierter Potenz beschreiben (vgl. Gl. 18). Daraus kann geschlossen werden,

dass es sich bei der Lichtstreuung an Formazinpartikeln nicht um Rayleighstreuung handelt. Es ist anzunehmen, dass komplexe Streuungsphänomene mit geringerem Einfluss der Wellenlänge zugrunde liegen. Bedingt durch die Partikelgröße der kolloidalen Formazinpartikel von $2,5\ \mu\text{m}$ ist anzunehmen, dass es sich um geometrische Streuung im Übergangsbereich zur Mie-Streuung handelt [118]. Die, im Vergleich zur Annahme der Rayleighstreuung, reduzierte Wellenlängenabhängigkeit der Streuung führt zu einem reduzierten Einfluss des Emissionsspektrums individueller Blitzlicht-LED am Smartphonenephelometer und damit zu einer erhöhten Vergleichbarkeit verschiedener Geräte.

Die Einsetzbarkeit des kapillarbasierten Smartphonenephelometers wurde auf Grundlage der Trübungsmessung mittels Formazinstandards nach ISO 7027 im Vergleich zur Trübungsmessung mittels Smartphonephotometer und herkömmlichen Laborphotometer überprüft. Die vergleichenden Messungen wurden in einem Trübungsbereich von 0 bis 4000 FNU respektive FAU durchgeführt. 4000 FAU

entsprechen in diesem Zusammenhang einer optischen Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm, von $9,674 \pm 0,024$. Die Ergebnisse der Vergleichsmessungen sind in Abbildung 32 dargestellt.

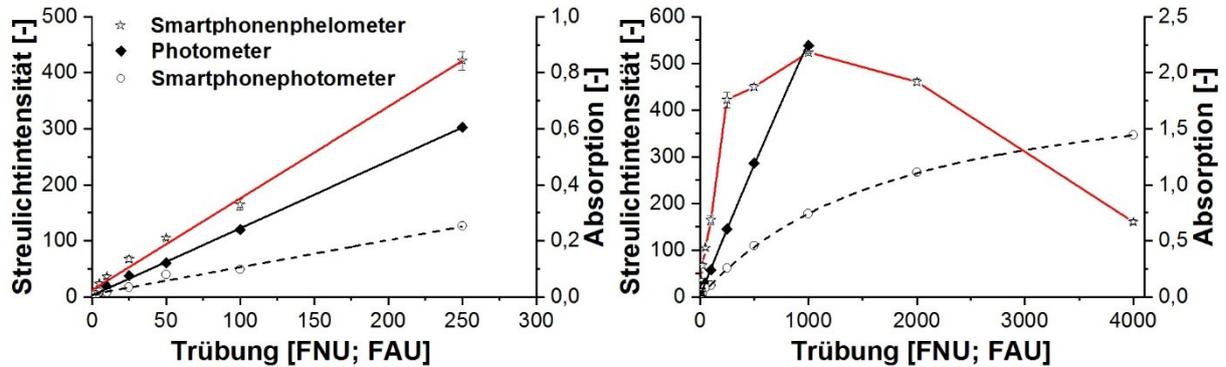


Abbildung 32: Trübungs- und Absorptionsmessungen von Formazinstandards nach ISO 7027 am Smartphone-nephelometer ($R^2: 0,9938$), Smartphone-photometer in Kombination mit einem Samsung A5, 6 ohne Filter ($R^2: 0,9718$) und einem konventionellen Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm ($R^2: 0,9979$) (Varian Cary 50 UV-vis, Agilent Technologies, USA), ($n = 5$)

Im Trübungsbereich von 0 bis 250 FNU respektive FAU zeigen alle untersuchten Systeme einen linearen Zusammenhang zwischen Trübung und Messwert. Die lineare Korrelation der Daten des Smartphone-nephelometers zeigt einen Korrelationskoeffizienten von 0,9938, die des Smartphone-photometers 0,9718 und die des konventionellen Photometers 0,9979 bei vergleichbarer Messwertstreuung. Die deutliche Differenz zwischen den Ergebnissen des Smartphone-photometers und des herkömmlichen Photometers lässt sich in geringem Maße auf die Variation des Spektralbereichs des Messlichts zurückführen. Maßgeblichen Einfluss hat die Kammergeometrie des Smartphone-photometers, die eine Winkelabweichung von der Messachse des eintretenden Lichts von bis zu $32,23^\circ$ zulässt. Auf Grundlage dieser hohen Winkeltoleranz kann die Abschwächung des transmittierten Lichts durch Streuung nicht präzise gemessen werden. Die unmittelbare Messbarkeit von Trübungen bis zu 250 FNU am Smartphone-nephelometer ist für den geplanten Einsatzbereich im Weinbau ausreichend. In der Qualitätskontrolle von verkaufsfertigen Weinen ist eine Trübung unterhalb von 50 FNU zu erwarten. Bei der Kontrolle der Hefekonzentration während der Gärung sind Trübungswerte über 250 FNU bedingt durch das Sedimentieren der Hefe ebenfalls nicht zu erwarten.

In Trübungsbereichen über 250 FNU nimmt die Intensität des detektierten Streulichts beim Smartphone-nephelometer ab. Diese Abnahme ist auf die Länge des Strahlengangs vor der Streuungsmessung zurückführbar. Die Intensität der

Beleuchtung des untersuchten Volumenelements nimmt im Fall von hohen Trübungswerten ab. Dies führt zu einer Reduzierung von I_0 und somit zu einer Reduzierung der Streulichtintensität I (vgl. Gl. 3). Um eine Winkeltoleranz, entsprechend ISO 7027 sowie eine Erhöhung der maximal messbaren Trübung am Smartphonenephelometer zu erreichen, ist die konstruktive Einbringung eines Freistrahls mit begrenztem Steigungswinkel vor der eigentlichen Messkapillaren möglich. Auf diese Weise kann die Länge des Strahlengangs im getrübbten Medium und somit Abschattungseffekte reduziert werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnten verschiedene, den jeweiligen Anwendungsanforderungen angepasste, photometrische und nephelometrische Analysegeräte für die Verwendung an Android-Smartphones entwickelt werden. Das küvettenbasierte Smartphonephotometer, das kapillarbasierte Smartphonephotometer und das kapillarbasierte Smartphonenephelometer genügen dem Anspruch ohne externe elektronische und kostenintensive optische Komponenten die Durchführung vielseitiger Messverfahren zu erlauben. Anhand ausführlicher Untersuchungen der technischen Gegebenheiten der verwendeten Smartphones konnte gezeigt werden, dass die Blitzlicht-LED von Smartphones eine geeignete Lichtquelle zur Durchführung von photometrischen Messungen in Wellenlängenbereichen von 410-545 nm, 425-650 und 555-675 nm ist.

Das küvettenbasierte Smartphonephotometer weist ein möglichst einfaches Design auf und kann nahezu vollständig und ortsunabhängig an herkömmlichen 3D-Druckern hergestellt und an eine Vielzahl von Smartphones, ohne konstruktive Änderungen am Photometer, angepasst werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich das küvettenbasierte Smartphonephotometer zur Durchführung detaillierter kinetischer Enzymstudien eignet. Diese Eignung konnte anhand von Glucoseoxidase-Peroxidas-, Peroxidase- und Ureaseassays nachgewiesen werden.

Im Bereich der Umweltanalytik eignet sich das küvettenbasierte Smartphonephotometer zum Nachweis von Schwermetallen im mikromolaren Konzentrationsbereich. In Kombination mit dem eigens entwickelten ureasebasierten Bioassay ist es gelungen gelöste Kupferionen sowie andere Schwermetallbelastungen in Gewässerproben in einem Bereich zu detektieren, der unterhalb der

Trinkwasserrichtlinien der WHO liegt und zur Durchführung von Umweltanalytischen Messungen herangezogen werden kann. Das küvettenbasierte Smartphonephotometer eignet sich damit für den angestrebten Einsatz im Bereich der *Citizen Sciences* sowie als ergänzendes Analysesystem im naturwissenschaftlichen Unterricht von Allgemeinbildenden Schulen. Zusätzlich konnte anhand der kinetischen Messungen am küvettenbasierten Smartphonephotometer weiterhin gezeigt werden, dass der Einfluss von einzelnen Schwermetallspezies auf die enzymatische Aktivität von Urease in komplexen Gemischen nicht den gängigen theoretischen Beschreibungen von kumulativen Inhibitionen nach Loewe-Additivität oder Bliss-Unabhängigkeit folgt.

Für das kapillarbasierte Smartphonephotometer zur Verbreitung transmissionsphotometrischer Prozessanalytik in Klein- und Kleinstbetrieben des Weinbaus konnte das Design des Smartphonephotometers im Hinblick auf Robustheit und Reproduzierbarkeit stark vereinfacht werden. In ersten Studien konnte nachgewiesen werden, dass der Einsatz vorkonfektionierte Assaykapillaren zur Bestimmung zentraler Produkteigenschaften in diesem Industriezweig möglich ist. Durch die Verwendung vorkonfektionierter Kapillaren konnte der experimentelle Aufwand für das durchführende Personal stark reduziert werden. In diesem Rahmen konnte gezeigt werden, dass der Einzelnachweis von Eisen(II)- und Eisen(III)ionen problemlos durchführbar ist. Der Nachweis der Gesamteisenkonzentration bedarf in diesem Zusammenhang weitergehende Untersuchungen und Optimierungen.

Die angestrebte Quantifizierung der Stoffwechselaktivität von Hefen ist in den bisherigen Studien nicht gelungen. In weiteren Untersuchungen sollte in diesem Zusammenhang der Einsatz weiterer Assaysysteme in Betracht gezogen werden. Als potentiell messbarer Assay bietet sich für weitere Tests beispielsweise ein System auf Basis von Neutralrot an.

Im Rahmen der konstruktiven Optimierung der kapillarbasierten Analsysteme ist es gelungen das kapillarbasierte Smartphonephelometer und –photometer zu kombinieren. Diese Kombination führt im Vergleich zu Einzelsystemen zu einer weiteren Reduzierung der Apparatkosten und einer Flexibilisierung des Gesamtsystems. Das Smartphonephelometer ist dabei in der Lage Trübungen bis zu 250 FNU ohne Probevorbereitung oder –verdünnung zu quantifizieren und bewegt

sich damit in einer vergleichbaren Größenordnung wie konventionelle Photometer. Durch eine Optimierung des Strahlengangs sollte es in weiteren Studien möglich sein diesen Messbereich deutlich zu erweitern.

Besonderes Weiterentwicklungspotential der vorgestellten Systeme liegt neben den explizit anwendungsorientierten Assaysystemen in der konstruktiven Weiterentwicklung der kapillarbasierten optischen Analysesysteme. In weiteren Konzeptserien kann in diesem Zusammenhang beispielsweise die Anpassbarkeit der Systeme an verschiedene Smartphones fokussiert werden. Durch individuell anpassbare Systeme könnte die Verbreitung und Akzeptanz in der Zielgruppe deutlich gesteigert werden.

Weiteres Entwicklungspotential liegt im Bereich der Steuer- und Auswertungssoftware der Analysesysteme. Diese bietet in der bisherigen Form lediglich Funktionalitäten konventioneller Photometer und ließe sich, mit Hinblick auf die Anwendung in der Prozessüberwachung durch Auswertungsunterstützungsroutinen für entsprechende Messungen erweitern.

7 Literatur

- [1] J.I. Kenyon, R. Poropatich, Cell Phones in Telehealth and Otolaryngology, *Otolaryngol. Clin. North Am.* 44 (2011) 1351–1358. doi:10.1016/J.OTC.2011.08.013.
- [2] J.M. Ruano-López, M. Agirregabiria, G. Olabarria, D. Verdoy, D.D. Bang, M. Bu, A. Wolff, A. Voigt, J.A. Dziuban, R. Walczak, J. Berganzo, The SmartBioPhone™, a point of care vision under development through two European projects: OPTOLABCARD and LABONFOIL, *Lab Chip*. 9 (2009) 1495–1499. doi:10.1039/b902354m.
- [3] Z.J. Smith, K. Chu, A.R. Espenson, M. Rahimzadeh, A. Gryshuk, M. Molinaro, D.M. Dwyre, S. Lane, D. Matthews, S. Wachsmann-Hogiu, Cell-Phone-Based Platform for Biomedical Device Development and Education Applications, *PLoS One*. 6 (2011) e17150. doi:10.1371/journal.pone.0017150.
- [4] V. Oncescu, M. Mancuso, D. Erickson, Cholesterol testing on a smartphone, *Lab Chip*. 14 (2014) 759–763. doi:10.1039/C3LC51194D.
- [5] S. Kanchi, M.I. Sabela, P.S. Mdluli, Inamuddin, K. Bisetty, Smartphone based bioanalytical and diagnosis applications: A review, *Biosens. Bioelectron.* 102 (2018) 136–149. doi:10.1016/J.BIOS.2017.11.021.
- [6] M. Sharafeldin, A. Jones, J.F. Rusling, 3D-Printed Biosensor Arrays for Medical Diagnostics., *Micromachines*. 9 (2018). doi:10.3390/mi9080394.
- [7] G. Rateni, P. Dario, F. Cavallo, Smartphone-based food diagnostic technologies: A review, *Sensors (Switzerland)*. 17 (2017). doi:10.3390/s17061453.
- [8] C. Zhang, J.P. Kim, M. Creer, J. Yang, Z. Liu, A smartphone-based chloridometer for point-of-care diagnostics of cystic fibrosis, *Biosens. Bioelectron.* 97 (2017) 164–168. doi:10.1016/j.bios.2017.05.048.
- [9] S. Kanchi, M.I. Sabela, P.S. Mdluli, Inamuddin, K. Bisetty, Smartphone based bioanalytical and diagnosis applications: A review, *Biosens. Bioelectron.* 102 (2018) 136–149. doi:10.1016/j.bios.2017.11.021.
- [10] J.P. Kim, Z. Xie, M. Creer, Z. Liu, J. Yang, Citrate-based fluorescent materials

- for low-cost chloride sensing in the diagnosis of cystic fibrosis, *Chem. Sci.* 8 (2017) 550–558. doi:10.1039/C6SC02962K.
- [11] Z. Geng, X. Zhang, Z. Fan, X. Lv, Y. Su, H. Chen, Z. Geng, X. Zhang, Z. Fan, X. Lv, Y. Su, H. Chen, Recent Progress in Optical Biosensors Based on Smartphone Platforms, *Sensors*. 17 (2017) 2449. doi:10.3390/s17112449.
- [12] D. Erickson, D. O'Dell, L. Jiang, V. Oncescu, A. Gumus, S. Lee, M. Mancuso, S. Mehta, Smartphone technology can be transformative to the deployment of lab-on-chip diagnostics, *Lab Chip*. 14 (2014) 3159–3164. doi:10.1039/C4LC00142G.
- [13] L. Bellina, E. Missoni, Mobile cell-phones (M-phones) in telemicroscopy: increasing connectivity of isolated laboratories, *Diagn. Pathol.* 4 (2009) 19. doi:10.1186/1746-1596-4-19.
- [14] E. (Ernst) Lambert, Johann Heinrich; *Anding, Photometrie. Photometria, sive De mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae*, (1760) 141. https://archive.org/details/bub_gb_zmpJAAAAYAAJ.
- [15] B. Milićević, G. Eigenmann, Assoziationserscheinungen bei Azofarbstoffen, *Helv. Chim. Acta.* 47 (1964) 1039–1047. doi:10.1002/hlca.19640470414.
- [16] C. Wunderly, Eine nephelometrische Methode zur Charakterisierung der Serumeiweißkörper im Hitzekoagulat, *Kolloid-Zeitschrift*. 93 (1940) 318–323. doi:10.1007/BF01509782.
- [17] N. Liappis, Bestimmung der IgA-, IgG-, IgM-, α_1 -Antitrypsin-, Haptoglobin- und Transferrin-Konzentration im Serum mit der Methode der kinetischen Nephelometrie. Vergleich der Methoden kinetische Nephelometrie/radiale Immundiffusion, *Klin. Pädiatrie*. 192 (1980) 370–378. doi:10.1055/s-2008-1035610.
- [18] Praxisleitfaden Oenologie 2018, Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Mosel (DLR), 2018.

- [19] M. Ruby, A.W.-E.S.& Technology, undefined 1981, Intercomparison of integrating nephelometer measurements, ACS Publ. (n.d.). <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es00083a014> (accessed December 14, 2018).
- [20] R. Kneer, M.H. Zenk, Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning, *Phytochemistry*. 31 (1992) 2663–2667. doi:10.1016/0031-9422(92)83607-Z.
- [21] W.R. Greco, G. Bravo, J.C. Parsons, The search for synergy: a critical review from a response surface perspective., *Pharmacol. Rev.* 47 (1995) 331–385.
- [22] C.I. Bliss, THE TOXICITY OF POISONS APPLIED JOINTLY, *Ann. Appl. Biol.* 26 (1939) 585–615. doi:10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x.
- [23] S. Chaperon, S. Sauvé, Toxicity interaction of metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to urease and dehydrogenase activities in soils, *Soil Biol. Biochem.* 39 (2007) 2329–2338. doi:10.1016/j.soilbio.2007.04.004.
- [24] S. Loewe, H. Muischnek, Über Kombinationswirkungen, *Arch. Für Exp. Pathol. Und Pharmakologie*. 114 (1926) 313–326. doi:10.1007/BF01952257.
- [25] D. Gallegos, K.D. Long, H. Yu, P.P. Clark, Y. Lin, S. George, P. Nath, B.T. Cunningham, Label-free biodetection using a smartphone., *Lab Chip*. 13 (2013) 2124–32. doi:10.1039/c3lc40991k.
- [26] S. Dutta, A. Choudhury, P. Nath, Evanescent wave coupled spectroscopic sensing using smartphone, *IEEE Photonics Technol. Lett.* 26 (2014) 568–570. doi:10.1109/LPT.2013.2297700.
- [27] I. Navruz, A.F. Coskun, J. Wong, S. Mohammad, D. Tseng, R. Nagi, S. Phillips, A. Ozcan, Smart-phone based computational microscopy using multi-frame contact imaging on a fiber-optic array, *Lab Chip*. 13 (2013) 4015. doi:10.1039/c3lc50589h.
- [28] D. Tseng, O. Mudanyali, C. Oztoprak, S.O. Isikman, I. Sencan, O. Yaglidere, A. Ozcan, Lensfree microscopy on a cellphone, *Lab Chip*. 10 (2010) 1787. doi:10.1039/c003477k.

- [29] M. Zangheri, L. Cevenini, L. Anfossi, C. Baggiani, P. Simoni, F. Di Nardo, A. Roda, A simple and compact smartphone accessory for quantitative chemiluminescence-based lateral flow immunoassay for salivary cortisol detection, *Biosens. Bioelectron.* 64 (2015) 63–68. doi:10.1016/j.bios.2014.08.048.
- [30] Y. Wang, X. Liu, P. Chen, N.T. Tran, J. Zhang, W.S. Chia, S. Boujday, B. Liedberg, Smartphone spectrometer for colorimetric biosensing, *Analyst.* 141 (2016) 3233–3238. doi:10.1039/C5AN02508G.
- [31] H. Yu, Y. Tan, B.T. Cunningham, Smartphone fluorescence spectroscopy, *Anal. Chem.* 86 (2014) 8805–8813. doi:10.1021/ac502080t.
- [32] D.B. Hernández, J.L. Marty, R.M. Guerrero, Smartphone as a Portable Detector, Analytical Device, or Instrument Interface, in: *Smartphones from an Appl. Res. Perspect.*, 2017. doi:10.5772/intechopen.69678.
- [33] S.K. Vashist, O. Mudanyali, E.M. Schneider, R. Zengerle, A. Ozcan, Cellphone-based devices for bioanalytical sciences Multiplex Platforms in Diagnostics and Bioanalytics, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 3263–3277. doi:10.1007/s00216-013-7473-1.
- [34] A.M. Nicolini, C.F. Fronczek, J. Yoon, Droplet-based immunoassay on a 'sticky' nanofibrous surface for multiplexed and dual detection of bacteria using smartphones, *Biosens. Bioelectron.* 67 (2015) 560–569. doi:10.1016/j.bios.2014.09.040.
- [35] C.F. Fronczek, T.S. Park, D.K. Harshman, A.M. Nicolini, J.-Y. Yoon, Paper microfluidic extraction and direct smartphone-based identification of pathogenic nucleic acids from field and clinical samples, *RSC Adv.* 4 (2014) 11103. doi:10.1039/c3ra47688j.
- [36] Q. Wei, H. Qi, W. Luo, D. Tseng, S.J. Ki, Z. Wan, Z. Göröcs, L.A. Bentolila, T.T. Wu, R. Sun, A. Ozcan, Fluorescent imaging of single nanoparticles and viruses on a smart phone, *ACS Nano.* 7 (2013) 9147–9155. doi:10.1021/nn4037706.

- [37] M.A. Hossain, J. Canning, S. Ast, K. Cook, P.J. Rutledge, A. Jamalipour, Combined dual absorption and fluorescence smartphone spectrometers, *Opt. Lett.* 40 (2015) 1737–1740. doi:10.1364/OL.40.001737.
- [38] K.D. Long, H. Yu, B.T. Cunningham, Smartphone instrument for portable enzyme-linked immunosorbent assays, *Biomed. Opt. Express.* 5 (2014) 3792. doi:10.1364/BOE.5.003792.
- [39] M. Arafat Hossain, J. Canning, S. Ast, K. Cook, P.J. Rutledge, A. Jamalipour, Combined “dual” absorption and fluorescence smartphone spectrometers, *Opt. Lett.* 40 (2015) 1737. doi:10.1364/OL.40.001737.
- [40] S. Dutta, G.P. Saikia, D.J. Sarma, K. Gupta, P. Das, P. Nath, Protein, enzyme and carbohydrate quantification using smartphone through colorimetric digitization technique, *J. Biophotonics.* 10 (2017) 623–633. doi:10.1002/jbio.201500329.
- [41] I. Hussain, A.J. Bora, D. Sarma, K.U. Ahamad, P. Nath, Design of a Smartphone Platform Compact Optical System Operational Both in Visible and Near Infrared Spectral Regime, *IEEE Sens. J.* 18 (2018) 4933–4939. doi:10.1109/JSEN.2018.2832848.
- [42] R. Wilson, A.P.F. Turner, Glucose oxidase: an ideal enzyme, *Biosens. Bioelectron.* 7 (1992) 165–185. doi:10.1016/0956-5663(92)87013-F.
- [43] C.M. Wong, K.H. Wong, X.D. Chen, Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78 (2008) 927–938. doi:10.1007/s00253-008-1407-4.
- [44] S.B. Bankar, M. V. Bule, R.S. Singhal, L. Ananthanarayan, Glucose oxidase — An overview, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 489–501. doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2009.04.003.
- [45] Y. Meng, M. Zhao, M. Yang, Q. Zhang, J. Hao, Y. Meng, Production and characterization of recombinant glucose oxidase from *Aspergillus niger* expressed in *Pichia pastoris*, *Lett. Appl. Microbiol.* 58 (2014) 393–400. doi:10.1111/lam.12202.

- [46] R. Kaur, J. Dhari, O. Sharma, G. Gupta, V. Kharb, Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, (2012). <https://pdfs.semanticscholar.org/072b/2609c0a4f877517da843ea7cdbf0c9c0441b.pdf> (accessed April 6, 2019).
- [47] S.B. Bankar, M. V. Bule, R.S. Singhal, L. Ananthanarayan, Glucose oxidase — An overview, Biotechnol. Adv. 27 (2009) 489–501. doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2009.04.003.
- [48] M.E. Ghica, R.C. Carvalho, A. Amine, C.M.A. Brett, Glucose oxidase enzyme inhibition sensors for heavy metals at carbon film electrodes modified with cobalt or copper hexacyanoferrate Glucose oxidase enzyme inhibition sensors for heavy metals at carbon film electrodes modified with cobalt or copper hexacya, Sensors Actuators, B Chem. 178 (2013) 270–278. doi:10.1016/j.snb.2012.12.113.
- [49] W. Chen, X. Fang, H. Li, H. Cao, J. Kong, A Simple Paper-Based Colorimetric Device for Rapid Mercury(II) Assay, Sci. Rep. 6 (2016) 31948. doi:10.1038/srep31948.
- [50] J.S.-J. of B. Chemistry, undefined 1926, The isolation and crystallization of the enzyme urease preliminary paper, ASBMB. (n.d.). <http://www.jbc.org/content/69/2/435.short> (accessed December 21, 2018).
- [51] L. Mazzei, M. Cianci, A. Gonzalez Vara, S. Ciurli, The structure of urease inactivated by Ag(I): A new paradigm for enzyme inhibition by heavy metals, Dalt. Trans. 47 (2018) 8240–8247. doi:10.1039/c8dt01190g.
- [52] N. Dixon, C. Gazzola, R. Blakeley, B. Zerner, Metal ions in enzymes using ammonia or amides, Science (80-.). 191 (1976) 1144–1150. doi:10.1126/science.769157.
- [53] B. Krajewska, S. Ciurli, Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. Probing acid–base groups of the active site by pH variation, Plant Physiol. Biochem. 43 (2005) 651–658. doi:10.1016/J.PLAPHY.2005.05.009.

- [54] B.K.-J. of M.C.B. Enzymatic, undefined 2009, Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review, Elsevier. (n.d.). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117709000150> (accessed December 21, 2018).
- [55] A. Balasubramanian, K. Ponnuraj, Crystal Structure of the First Plant Urease from Jack Bean: 83 Years of Journey from Its First Crystal to Molecular Structure, *J. Mol. Biol.* 400 (2010) 274–283. doi:10.1016/j.jmb.2010.05.009.
- [56] E.L. Carter, N. Flugga, J.L. Boer, S.B. Mulrooney, R.P. Hausinger, Interplay of metal ions and urease, (2009). doi:10.1039/b903311d.
- [57] L. Hellerman, M.E. Perkins, W.M. Clark, Urease Activity as Influenced by Oxidation and Reduction., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 19 (1933) 855–60. doi:10.1073/PNAS.19.9.855.
- [58] J.F. Ambrose, G.B. Kistiakowsky, A.G. Kridl, Inhibition of Urease by Silver Ions, *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 1232–1236. doi:10.1021/ja01147a106.
- [59] W.H.R. Shaw, The Inhibition of Urease by Various Metal Ions, *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 2160–2163. doi:10.1021/ja01637a034.
- [60] W.H.R. Shaw, D.N. Raval, The Inhibition of Urease by Metal Ions at pH 8.9, *J. Am. Chem. Soc.* 83 (1961) 3184–3187. doi:10.1021/ja01476a004.
- [61] B. Krajewska, W. Zaborska, M. Chudy, Multi-step analysis of Hg²⁺ ion inhibition of jack bean urease, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1160–1168. doi:10.1016/j.jinorgbio.2004.03.014.
- [62] B. Kuswandi, Simple optical fibre biosensor based on immobilised enzyme for monitoring of trace heavy metal ions, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 1104–1110. doi:10.1007/s00216-003-2001-3.
- [63] M.R. Guascito, C. Malitesta, E. Mazzotta, A. Turco, Inhibitive determination of metal ions by an amperometric glucose oxidase biosensor. Study of the effect of hydrogen peroxide decomposition, *Sensors Actuators, B Chem.* 131 (2008) 394–402. doi:10.1016/j.snb.2007.11.049.

- [64] B. Krajewska, Urease immobilized on chitosan membrane. Inactivation by heavy metal ions, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 52 (2007) 157–162. doi:10.1002/jctb.280520203.
- [65] J. Oszmianski, V. Cheynier, M. Moutounet, Iron-Catalyzed Oxidation of (+)-Catechin in Model Systems, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 1712–1715. doi:10.1021/jf9507710.
- [66] V.F. Laurie, A.L. Waterhouse, Oxidation of Glycerol in the Presence of Hydrogen Peroxide and Iron in Model Solutions and Wine. Potential Effects on Wine Color, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 4668–4673. doi:10.1021/jf053036p.
- [67] J. Cacho, J.E. Castells, A. Esteban, B. Laguna, N. Sagristá, Iron, Copper, and Manganese Influence on Wine Oxidation, *Am. J. Enol. Vitic.* 46 (1995) 380–384. <http://www.ajevonline.org/content/46/3/380.short>.
- [68] J. American Society of Enologists., J.E. Castells, A. Esteban, B. Laguna, N. Sagristá, *American journal of enology and viticulture.*, American Society of Enologists, 1995. <http://www.ajevonline.org/content/46/3/380.short> (accessed March 23, 2018).
- [69] J. C., Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper, *Am. J. Enol. Vitic.* 25 (2007) 119–126. <http://www.ajevonline.org/content/58/1/53.short> (accessed December 12, 2018).
- [70] L.G. Saywell, B.B. Cunningham, Determination of Iron: Colorimetric o-Phenanthroline Method, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 9 (1937) 67–69. doi:10.1021/ac50106a005.
- [71] X. Sun, T. Ma, J. Yu, W. Huang, Y. Fang, J. Zhan, Investigation of the copper contents in vineyard soil, grape must and wine and the relationship among them in the Huaizhuo Basin Region, China: A preliminary study, *Food Chem.* 241 (2018) 40–50. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2017.08.074.
- [72] J. Cacho, J.E. Castells, A. Esteban, B. Laguna, N. Sagristá, Iron, Copper, and Manganese Influence on Wine Oxidation, *Am. J. Enol. Vitic.* 46 (1995) 380–384.

- [73] A. Vernhet, P. Pellerin, C. Prieur, J. Osmianski, M. Moutounet, Charge properties of some grape and wine polysaccharide and polyphenolic fractions, *Am. J. Enol. Vitic.* 47 (1996) 25–30. doi:10.1038/nrendo.2016.224.
- [74] N. Vivas, F. Zamora, Y. Glories, Incidence de certains facteurs sur la consommation de l'oxygène et sur le potentiel d'oxydoréduction, *J. Int. Des Sci. La Vigne Du Vin.* 27 (1993) 23–34.
- [75] V. Schneider, B. Schneider-Oenologie, Die Stabilität des Kupfers, *Schneider-Oenologie.De.* (n.d.). <http://schneider-oenologie.de/downloads/boecksernstabilitaet-des-kupfers.pdf> (accessed December 12, 2018).
- [76] A.H.-Z. für U. der Lebensmittel, undefined 1930, Colorimetrische Bestimmungsmethode der zur Blauschönung erforderlichen Blutlaugensalzmenge, Springer. (n.d.). <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF01663544.pdf> (accessed December 12, 2018).
- [77] E. Reinhard, Anwendung metallselektiver Harze zur Kupfer- und Eisenentfernung im W Eisenentfernung im Wein, *Alva.At.* (n.d.). <http://www.alva.at/images/Publikationen/alva2001/ederrein.pdf> (accessed December 12, 2018).
- [78] M. Schubert, Untersuchungen zum Einsatz von PVI/PVP bei Bier und Wein, (2011). <https://opendata.uni-halle.de/handle/1981185920/7472> (accessed December 12, 2018).
- [79] S.P.- Analyst, undefined 1995, Determination of the oxidation states of iron in natural waters. A review, *Pubs.Rsc.Org.* (n.d.). <http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/1995/an/an9952002655> (accessed December 30, 2018).
- [80] P. Carter, Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine), *Anal. Biochem.* 40 (1971) 450–458. doi:10.1016/0003-2697(71)90405-2.

- [81] C.R. Gibbs, Characterization and application of FerroZine iron reagent as a ferrous iron indicator, *Anal. Chem.* 48 (1976) 1197–1201. doi:10.1021/ac50002a034.
- [82] P.C.-A. biochemistry, undefined 1971, Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine), Elsevier. (n.d.). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269771904052> (accessed December 25, 2018).
- [83] A. Aguiar, A.F.- Chemosphere, undefined 2007, Fe³⁺-and Cu²⁺-reduction by phenol derivatives associated with Azure B degradation in Fenton-like reactions, Elsevier. (n.d.). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653506007296> (accessed December 25, 2018).
- [84] A.-P. Arrigo, S. Viot, S. Chaufour, W. Firdaus, C. Kretz-Remy, C. Diaz-Latoud, Hsp27 Consolidates Intracellular Redox Homeostasis by Upholding Glutathione in Its Reduced Form and by Decreasing Iron Intracellular Levels, *Antioxid. Redox Signal.* 7 (2005) 414–422. doi:10.1089/ars.2005.7.414.
- [85] J. Woods, M. Mellon, Thiocyanate Method for Iron: A Spectrophotometric Study, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 13 (1941) 551–554. doi:10.1021/i560096a013.
- [86] E. Riedel, C. Janiak, *Anorganische Chemie*, De Gruyter, 2007.
- [87] K.F. Pocock, E.J. Waters, Protein haze in bottled white wines: How well do stability tests and bentonite fining trials predict haze formation during storage and transport?, *Aust. J. Grape Wine Res.* 12 (2006) 212–220. doi:10.1111/j.1755-0238.2006.tb00061.x.
- [88] P.W. Gales, A Comparison of Visual Turbidity with Turbidity Measured by Commercially Available Instruments, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 58 (2000) 101–107. doi:10.1094/ASBCJ-58-0101.
- [89] Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography, (1984). <https://patents.google.com/patent/US4575330A/en> (accessed November 7, 2018).

- [90] T. Rayna, L. Striukova, From rapid prototyping to home fabrication: How 3D printing is changing business model innovation, *Technol. Forecast. Soc. Change.* 102 (2016) 214–224. doi:10.1016/j.techfore.2015.07.023.
- [91] R. Jiang, R. Kleer, F.T. Piller, Predicting the future of additive manufacturing: A Delphi study on economic and societal implications of 3D printing for 2030, *Technol. Forecast. Soc. Change.* 117 (2017) 84–97. doi:10.1016/j.techfore.2017.01.006.
- [92] H. Bikas, P. Stavropoulos, G. Chryssolouris, Additive manufacturing methods and modelling approaches: a critical review, *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 83 (2016) 389–405. doi:10.1007/s00170-015-7576-2.
- [93] B. N. Turner, R. Strong, S. A. Gold, A review of melt extrusion additive manufacturing processes: I. Process design and modeling, *Rapid Prototyp. J.* 20 (2014) 192–204. doi:10.1108/RPJ-01-2013-0012.
- [94] A.R. Torrado, C.M. Shemelya, J.D. English, Y. Lin, R.B. Wicker, D.A. Roberson, Characterizing the effect of additives to ABS on the mechanical property anisotropy of specimens fabricated by material extrusion 3D printing, *Addit. Manuf.* 6 (2015) 16–29. doi:10.1016/j.addma.2015.02.001.
- [95] A.R. Torrado Perez, D.A. Roberson, R.B. Wicker, Fracture Surface Analysis of 3D-Printed Tensile Specimens of Novel ABS-Based Materials, *J. Fail. Anal. Prev.* 14 (2014) 343–353. doi:10.1007/s11668-014-9803-9.
- [96] Statista; Deutschland; Kantar Worldpanel, Marktanteile von Android und iOS am Absatz in Deutschland | Statista, (n.d.). <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/256790/umfrage/marktanteile-von-android-und-ios-am-smartphone-absatz-in-deutschland/> (accessed December 7, 2018).
- [97] T. Onal Okyay, D. Frigi Rodrigues, High throughput colorimetric assay for rapid urease activity quantification, *J. Microbiol. Methods.* 95 (2013) 324–326. doi:10.1016/j.mimet.2013.09.018.

- [98] B. Peng-Lim, S. Ganesan, G.P. Maniam, M. Khairuddean, Sequential conversion of high free fatty acid oils into biodiesel using a new catalyst system, *Energy*. 46 (2012) 132–139. doi:10.1016/J.ENERGY.2012.09.013.
- [99] E.S. Barron, G. Kalnitsky, The inhibition of succinoxidase by heavy metals and its reactivation with dithiols., *Biochem. J.* 41 (1947) 346–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16748171> (accessed May 31, 2016).
- [100] Ł. Berlicki, M. Bochno, A. Grabowiecka, A. Białas, P. Kosikowska, P. Kafarski, N-substituted aminomethanephosphonic and aminomethane-P-methylphosphinic acids as inhibitors of ureases, *Amino Acids*. 42 (2012) 1937–1945. doi:10.1007/s00726-011-0920-4.
- [101] K.S. Mangaldas, Y.S. Rajput, R. Sharma, Urease Immobilization on Arylamine Glass Beads and its Characterization, *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 19 (2010) 73–77. doi:10.1007/BF03323438.
- [102] B. Krajewska, Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 59 (2009) 9–21. doi:10.1016/j.molcatb.2009.01.003.
- [103] T. Godjevargova, K. Gabrovska, Kinetic Parameters of Urease Immobilized on Modified Acrylonitrile Copolymer Membranes in the Presence and Absence of Cu(II) Ions, *Macromol. Biosci.* 5 (2005) 459–466. doi:10.1002/mabi.200400188.
- [104] N. Du, L. Sheng, H. Xu, C. Song, S. Chen, Kinetics of competitive inhibition of jack bean urease by boric acid, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 82 (2012) 53–58. doi:10.1016/j.molcatb.2012.06.008.
- [105] H. Lineweaver, D. Burk, The Determination of Enzyme Dissociation Constants, *J. Am. Chem. Soc.* 56 (1934) 658–666. doi:10.1021/ja01318a036.
- [106] M. Soylak, M. Tuzen, Diaion SP-850 resin as a new solid phase extractor for preconcentration-separation of trace metal ions in environmental samples, *J. Hazard. Mater.* 137 (2006) 1496–1501. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.04.027.
- [107] N. Pourreza, R. Hoveizavi, Simultaneous preconcentration of Cu, Fe and Pb as methylthymol blue complexes on naphthalene adsorbent and flame atomic absorption determination, *Anal. Chim. Acta.* 549 (2005) 124–128. doi:10.1016/j.aca.2005.06.037.

- [108] H. Matusiewicz, M. Kopras, Methods for Improving the Sensitivity in Atom Trapping Flame Atomic Absorption Spectrometry: Analytical Scheme for the Direct Determination of Trace Elements in Beer, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 1287–1291.
- [109] H.G. Gorchev, G. Ozolins, WHO guidelines for drinking-water quality, *WHO Chron.* 38 (2011) 104–108. doi:10.1016/S1462-0758(00)00006-6.
- [110] U. Divrikli, A. Akdogan, M. Soylak, L. Elci, Solid-phase extraction of Fe(III), Pb(II) and Cr(III) in environmental samples on amberlite XAD-7 and their determinations by flame atomic absorption spectrometry, *J. Hazard. Mater.* 149 (2007) 331–337. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.03.084.
- [111] A.P. Dos Anjos, L. Cornejo-Ponce, S. Cadore, N. Baccan, Determination of manganese by flame atomic absorption spectrometry after its adsorption onto naphthalene modified with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN), *Talanta.* 71 (2007) 1252–1256. doi:10.1016/j.talanta.2006.06.026.
- [112] M. Ghaedi, M. Reza Fathi, A. Shokrollahi, F. Shajarat, Highly Selective and Sensitive Preconcentration of Mercury Ion and Determination by Cold Vapor Atomic Absorption Spectroscopy, *Anal. Lett.* 39 (2006) 1171–1185. doi:10.1080/00032710600622167.
- [113] J.F. Marlier, L.I. Robins, K.A. Tucker, J. Rawlings, M.A. Anderson, W.W. Cleland, A kinetic and isotope effect investigation of the urease-catalyzed hydrolysis of hydroxyurea, *Biochemistry.* 49 (2010) 8213–8219. doi:10.1021/bi100890v.
- [114] C. Follmer, Insights into the role and structure of plant ureases, *Phytochemistry.* 69 (2008) 18–28. doi:10.1016/j.phytochem.2007.06.034.
- [115] Y. Wu, L. Chu, W. Liu, L. Jiang, X. Chen, Y. Wang, Y. Zhao, The screening of metal ion inhibitors for glucose oxidase based on the peroxidase-like activity of nano-Fe₃O₄, *RSC Adv.* 7 (2017) 47309–47315. doi:10.1039/C7RA07081K.
- [116] E. Borenfreund, J.A. Puerner, Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicol. Lett.* 24 (1985) 119–124. doi:10.1016/0378-4274(85)90046-3.

- [117] A. McKillop, W.R. Sanderson, Sodium perborate and sodium percarbonate: further applications in organic synthesis, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*. 0 (2000) 471–476. doi:10.1039/a804579h.
- [118] C.J. Gippel, The use of turbidimeters in suspended sediment research, *Hydrobiologia*. 176–177 (1989) 465–480. doi:10.1007/BF00026582.

Beitragende Studierende

- Marincic, Karmela; Masterarbeit: „Measuring of heavy metal polutions by colorimetric enzyme-based biosensors“; 04/2015-10/2015.
- Ujdur, Tomislav; Masterarbeit: „Construction of a low-cost smartphone spectrometer for heavy metal measuring“; 04/2015-10/2015.
- Weisbeck, Joseph; Projektarbeit: „Bestimmung von Schwermetallbelastungen mittels enzymbasierter Biosensoren“; 04/2015-11/2015.
- Sonnevile, Galatee; Projektarbeit: „Bestimmung einer Methode zur Messung von Eisenkonzentrationen mittels Smartphone-Photometer“, 11/2017-06/2018.

Anhang A Chemikalien

Acetaldehyd	(p.a., Anhydrid, $\geq 99.5\%$)
AgNO ₃	(Anhydrid, 99.999%)
Ammoniumacetat	($\geq 98\%$)
Ammoniumthiocyanat	(ACS reagent, $\geq 97.5\%$)
L-Ascorbinsäure	(BioXtra, $\geq 99.0\%$, kristallin)
CaCl ₂	(Dihydrat, BioUltra, für Molekularbiologie, $\geq 99.5\%$)
Citronensäure	(Monohydrat $\geq 99\%$)
CoCl ₂	(Anhydrid, zur Synthese)
CuCl ₂	(BioReagent, $\geq 99\%$)
Ethanol	(zur Spektroskopie, 99,9%)
FeCl ₂	($\geq 98\%$)
Ferrozin	3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazin-p,p'- Disulfonsäure-Mononatriumsalz Hydrat, (Indikator, $\geq 97\%$)
D-Glucose	(Anhydrid, $\geq 99\%$)
HgCl ₂	(Anhydrid, $\geq 99.998\%$)
KCl	(BioXtra, $\geq 99\%$)
Methanol	(für HPLC, $\geq 99.9\%$)
MnCl ₂	(trace metal basis, $\geq 99\%$)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyltetrazoliumbromid, ($\geq 97.5\%$)
NaCl	(ACS reagent, reag. ISO, reag. Ph. Eur., $\geq 99.5\%$)
Dinatriumhydrogenphosphat	(Pufferqualität)
Natriumpercarbonat	(verfügb. H ₂ O ₂ 20-30%)

Anhang A Chemikalien

Neocuproin	2,9-Dimethyl-1,10-phenanthrolin, ($\geq 98\%$)
NiCl ₂	(Hexahydrat, für Zellkultur)
Pb(NO ₃) ₂	($\geq 99.99\%$)
Phenolphthalein	(ACS reagent, reag. Ph. Eur., Indikator, 98-102%)
TMB	(Monohydrat $\geq 98\%$)
Uera	(für Zellkultur, $\geq 98\%$)
Urease, <i>Canavalia ensiformis</i>	(Type IX powder, 50 – 100 kU·g ⁻¹ solid, EC 3.5.1.5)

Anhang B Geräte

B.I Verwendete Geräte

Analysewaage	(KERN ABS 220-4, Australien)
Magnetrührer	(Snijders Hotplate 34532 Stirrer, Niederlande)
pH-Meter	(Hanna Instruments pH 211, USA)
Vortexmischer	(IKA Lab Dancer, Deutschland)
UV/VIS Spektrophotometer	(Agilent Cary 60 UV-VIS, USA)
Kolbenhubpipetten 10, 100, 1000 µL	(Eppendorf Research plus Pipettes, Kanada)
Ultraschallbad	(DK255P, Bandelin, Deutschland)
Laboreismaschine	(ICE MAKER AP-01A, BATEC, China)
LG G3 smartphone	(LG Corporation, Süd Korea)
Sony Xperia Z3 Compact	(Sony, Japan)
Fluoreszenzspektrometer	(LS 55Perkin Elmer Inc., USA)
Remote Fiber Optic Accessory	(Perkin Elmer Inc., USA)
MakerBot Replicator 2	(MakerBot Industries, USA)
IPhone 6	(Apple Inc., USA)
HTC One M8	(HTC Corporation, Taiwan)
Folienfilter	(Thomann, Deutschland)
Polymerlichtwellenleiter - Solid 3S	(G&G Lichtdekor GmbH, Deutschland)

B.II Küvettenbasiertes Photometer zur Transmissionsmessung

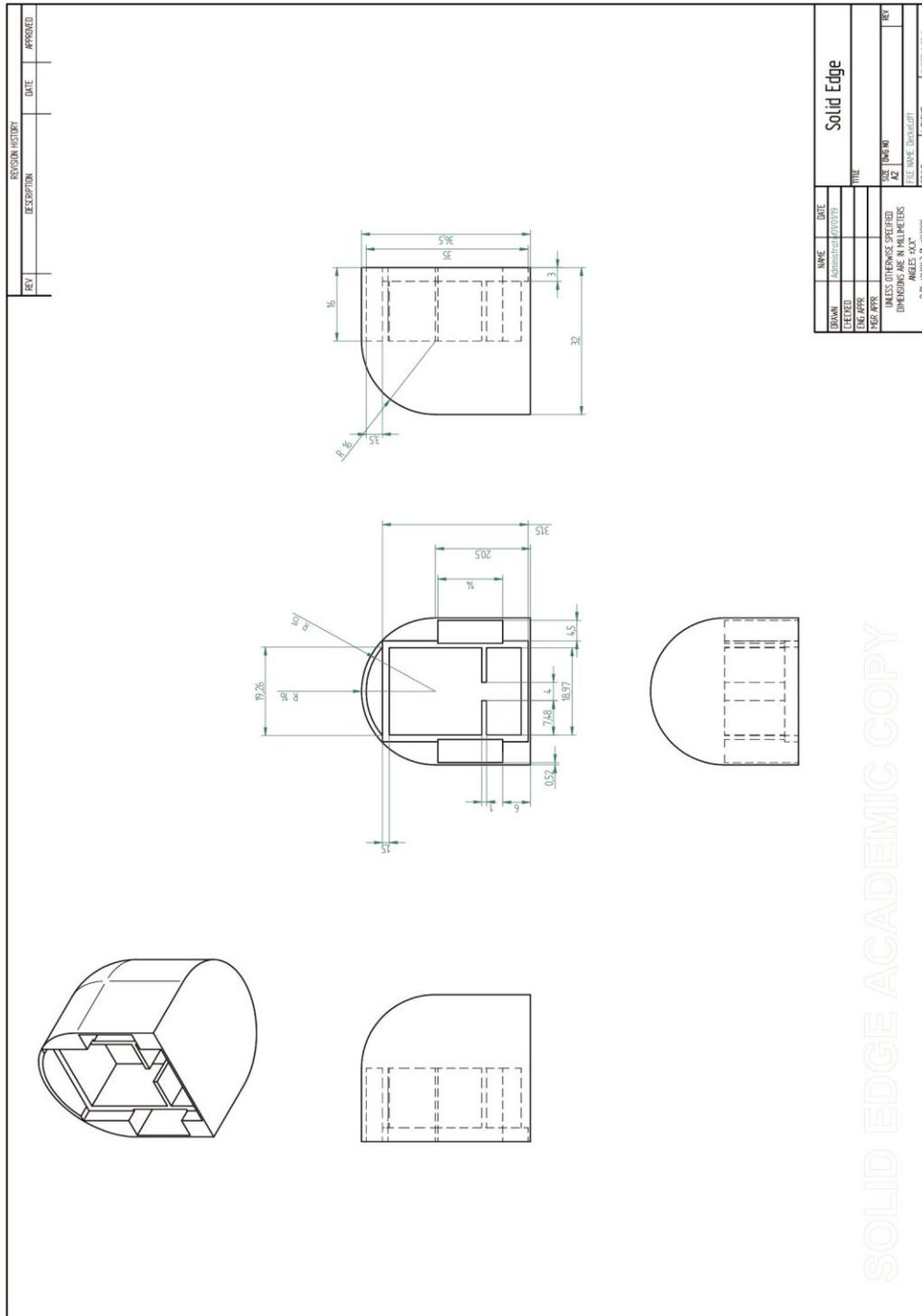


Abbildung B 1: Konstruktionszeichnung küvettenbasiertes Smartphonephotometer, Deckel.

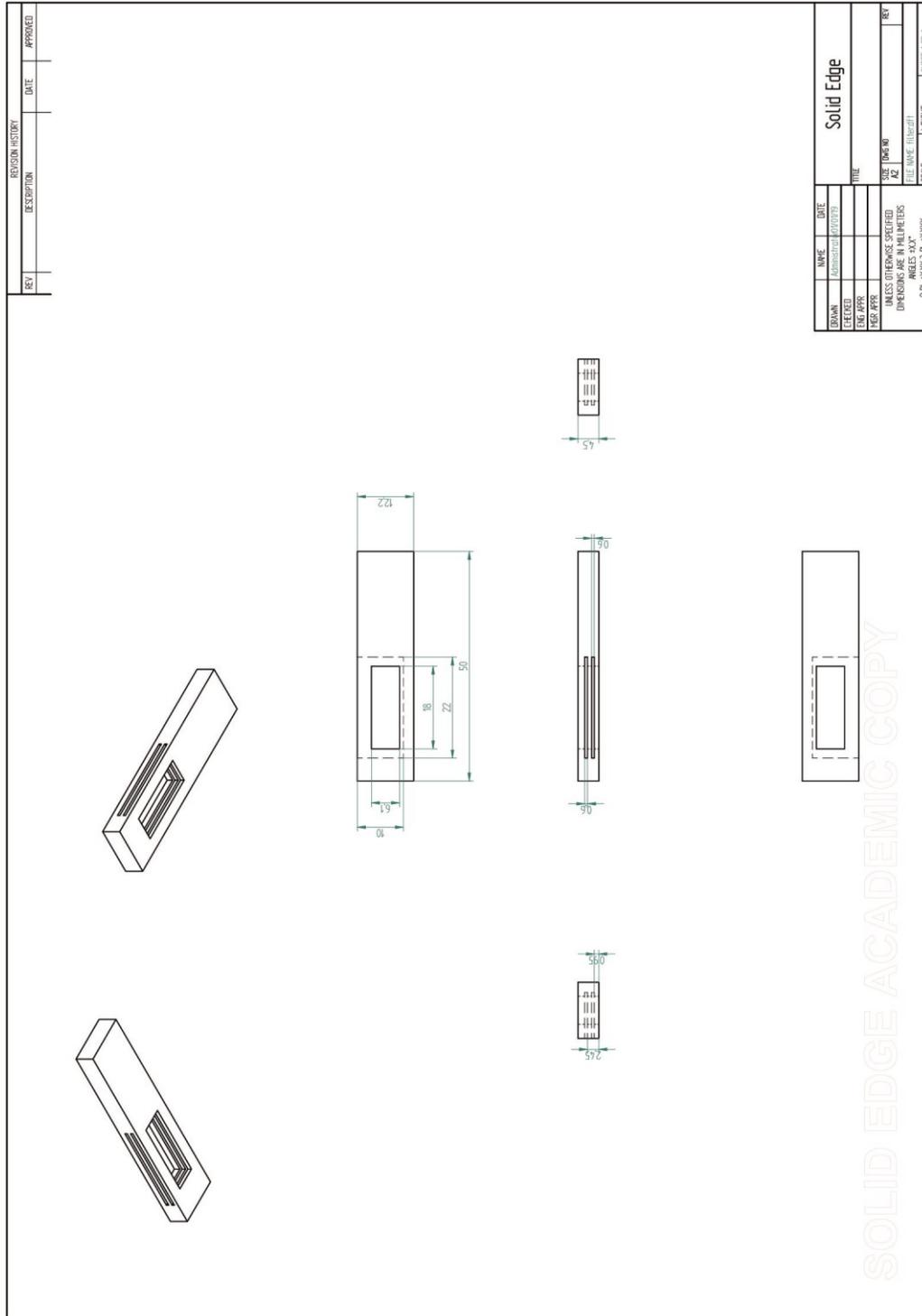


Abbildung B 2: Konstruktionszeichnung küvettenbasiertes Smartphonephotometer, Filterrahmen.

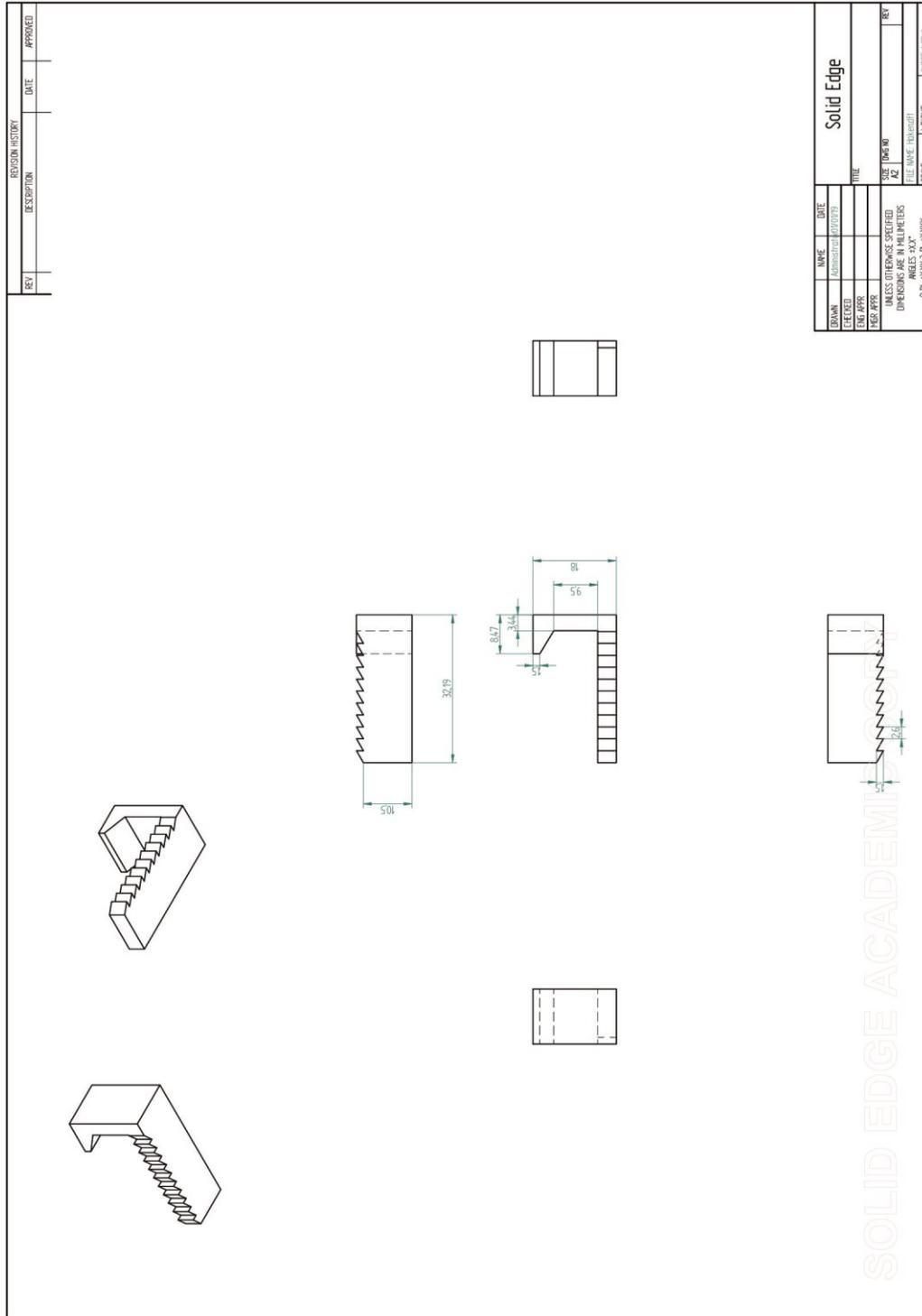


Abbildung B 3: Konstruktionszeichnung küvettenbasiertes Smartphonephotometer, seitlicher Haken.

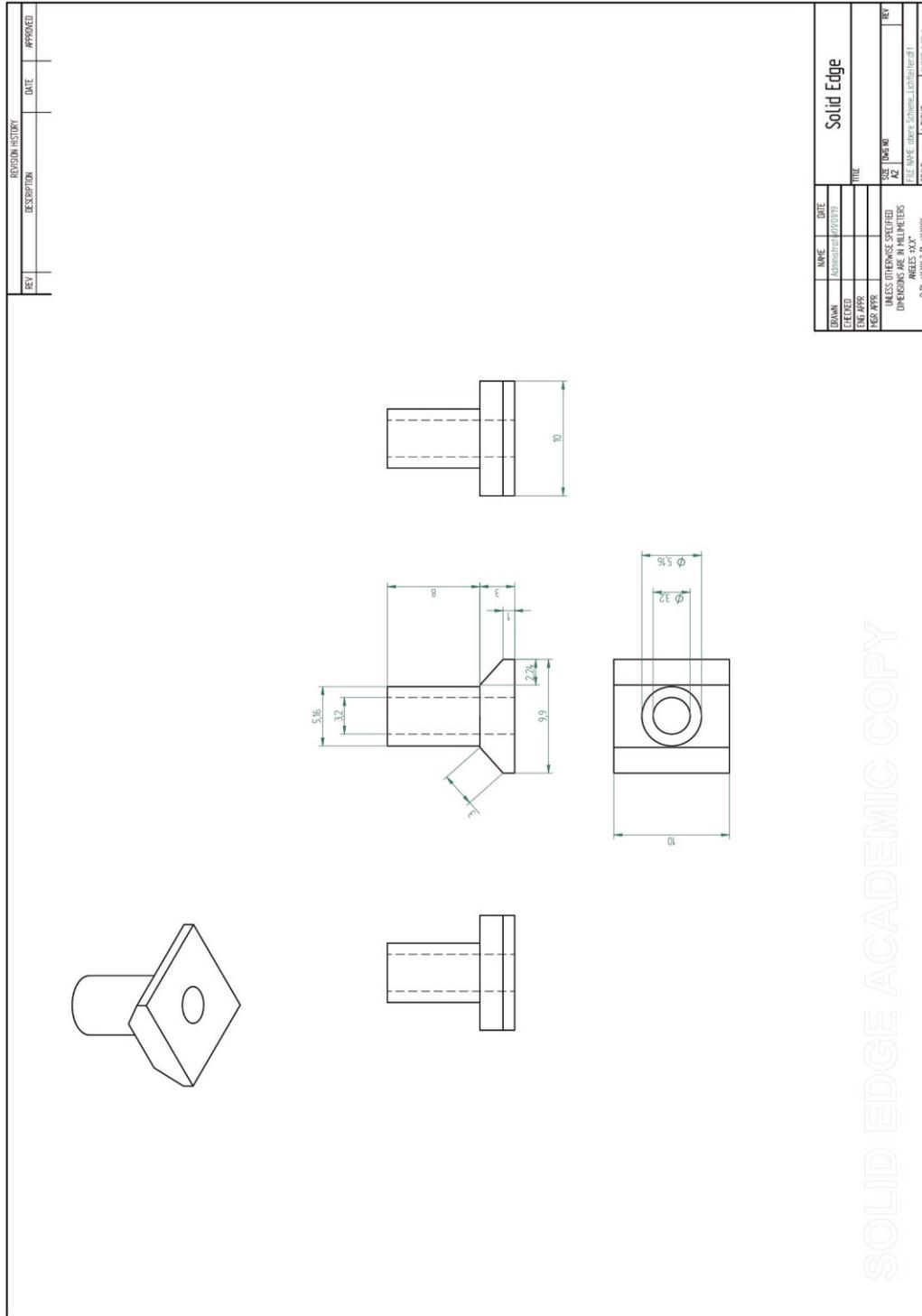


Abbildung B 4: Konstruktionszeichnung küvettenbasiertes Smartphonephotometer, Fronthalterung Lichtwellenleiter.

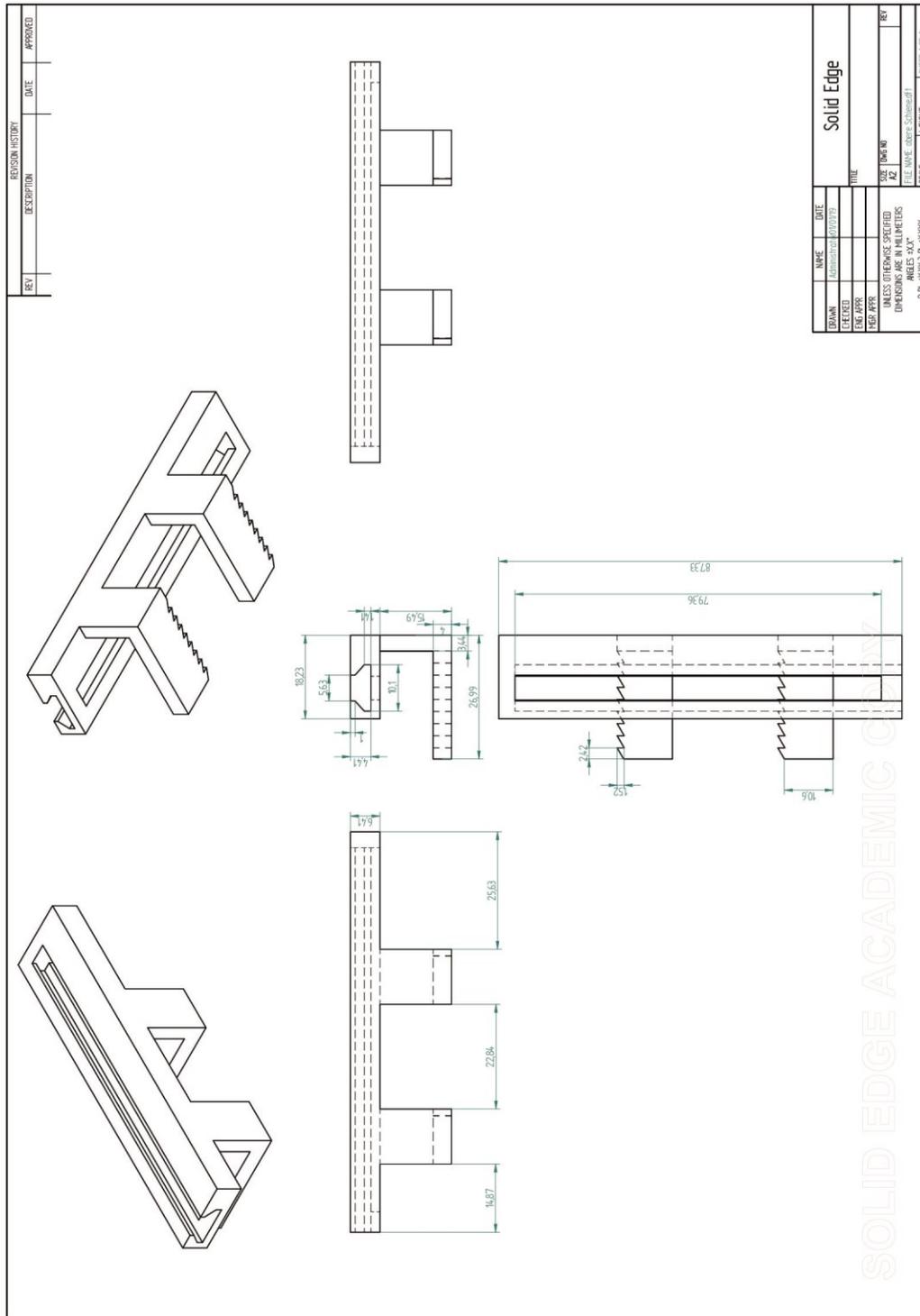
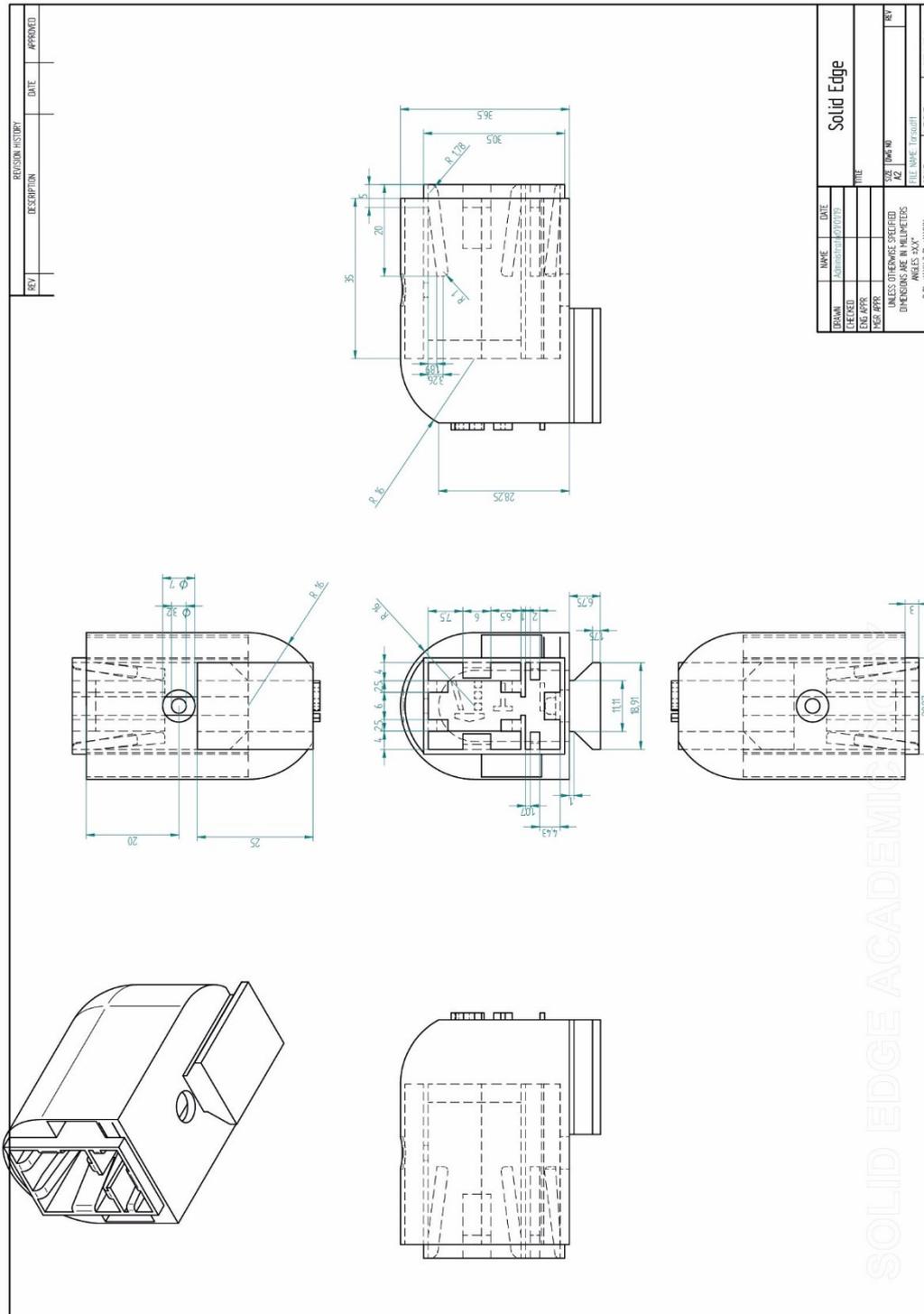


Abbildung B 5: Konstruktionszeichnung küvettenbasiertes Smartphonephotometer, oberer Haken und Frontschiene Lichtwellenleiter.



DESIGNER	NAME	DATE	Solid Edge
CHECKED	APPROVED	TITLE	
ENG APPR			
MGR APPR			
UNLESS OTHERWISE SPECIFIED DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS ANGLES 30°			SIZE
FILE NAME: Transmitt			A2
SCALE: 2:1, 300:3 R: 40000			WEIGHT
			SHEET 1 OF 1

Abbildung B 6: Konstruktionszeichnung küvettenbasiertes Smartphonephotometer, Torso.

B.III Kapillarbasiertes Photo-/Nephelometer zur Transmissions- und Trübungsmessung

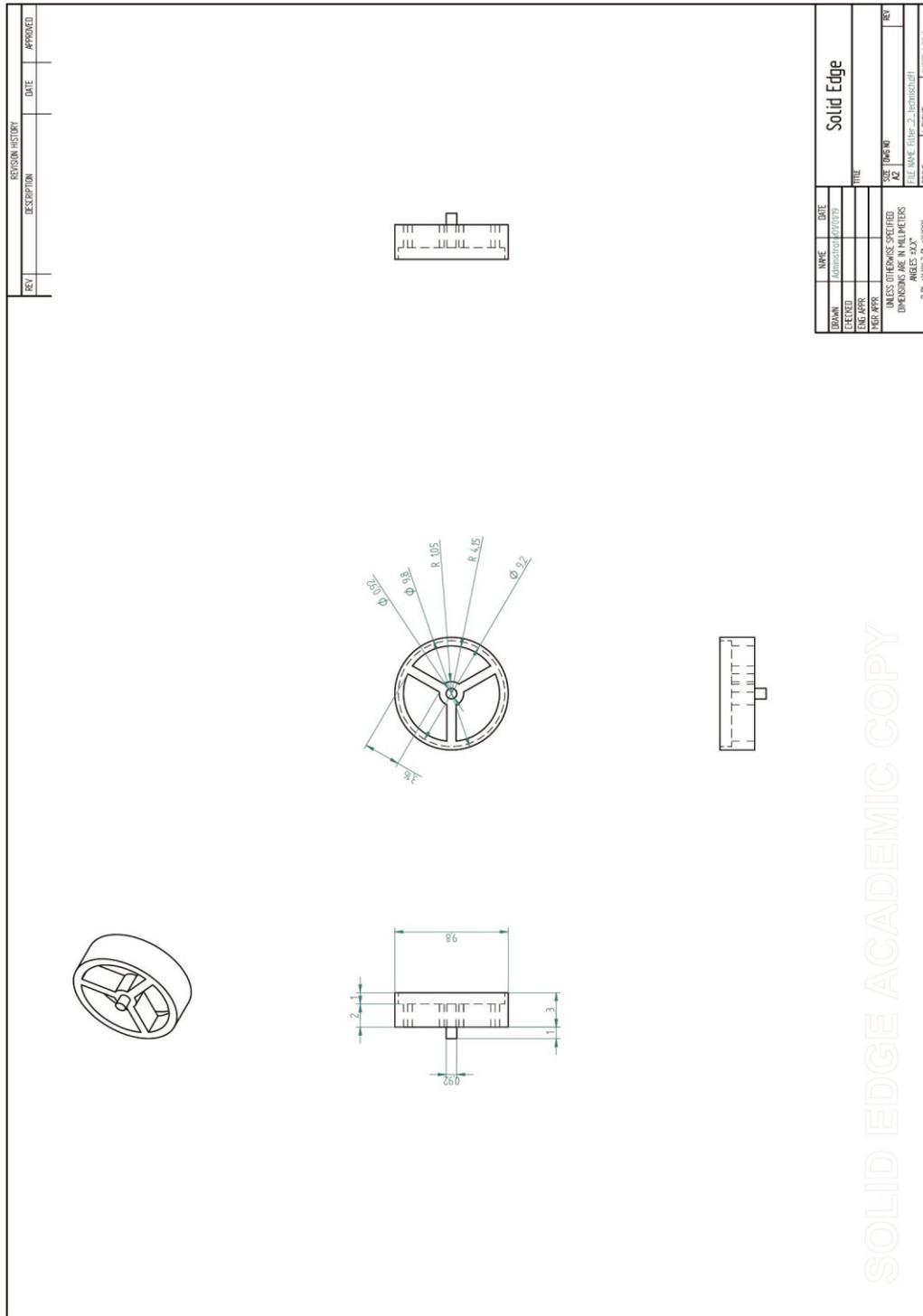


Abbildung B 7: Konstruktionszeichnung kapillarbasiertes Smartphonephotometer, Filterrad Teil 1.

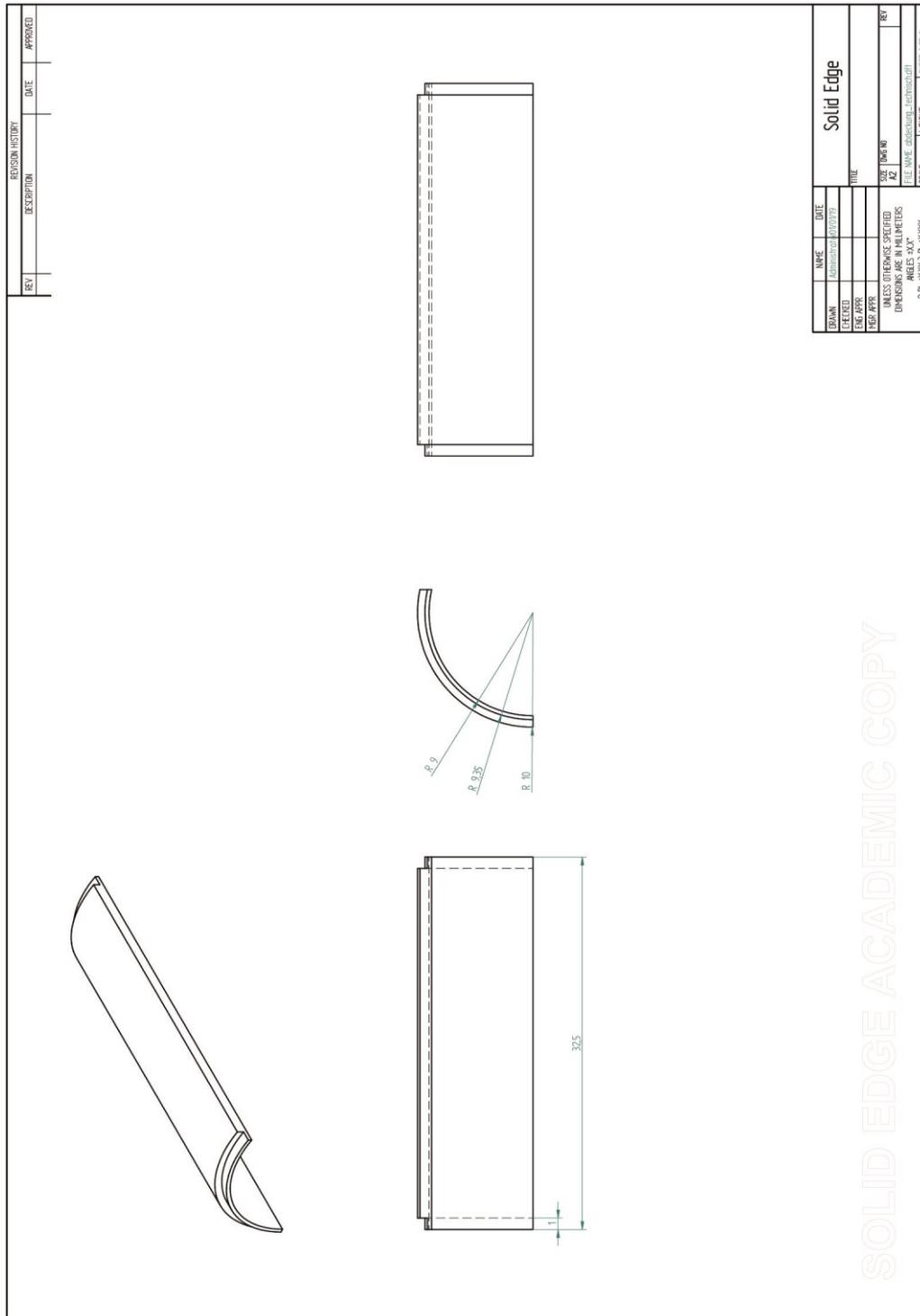


Abbildung B 9: Konstruktionszeichnung kapillarbasiertes Smartphonephotometer, Kammerabdeckung.

Anhang C Methoden

C.I Glucoseoxidase-Peroxidaseassay

0,1 M Citrate-Phosphate-Puffer (McIlvain)

- 10,505 g Citronensäure gelöst in 500 mL H₂O, reinst
- 17,845 g Dinatriumhydrogenphosphat gelöst in 500 mL H₂O, reinst
- Die Dinatriumhydrogenphosphatlösung wird der Citronensäurelösung zugegeben bis sich ein pH-Wert von 4,5 einstellt

1 M Natriumacetatpuffer

- 4,1015 g Natriumacetat gelöst in 50 mL H₂O, reinst.
- 2,8595 mL Essigsäure, aufgefüllt auf 50 mL mit H₂O, reinst.
- Die Essigsäure wird der Natriumacetatlösung zugegeben bis sich ein pH-Wert von 4,5 einstellt.

0,2 M Glucoselösung

- 1,8 g Glucose gelöst in 50 mL H₂O, reinst. Spätestens 24 h vor Versuchsbeginn lösen, Lagerung bei 8°C.

10 $\mu\text{kat}\cdot\text{mL}^{-1}$ Glucoseoxidaselösung

- 30 mg of GOD ($1,667 \text{ mkat}\cdot\text{g}^{-1}$) gelöst in 5 mL Citrate-Phosphate-Puffer (pH 4,5), Lagerung max. 8 h auf Eis.

600 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Peroxidaselösung

- 12 mg of POD ($4,167 \text{ mkat}\cdot\text{g}^{-1}$) gelöst in 5 mL Citrate-Phosphate-Puffer (pH 4,5), Lagerung max. 8 h auf Eis.

Arbeitslösung GOD/POD

- 5 μL Glucoseoxidaselösung ($10 \mu\text{kat}\cdot\text{mL}^{-1}$) und 10 μL Peroxidaselösung ($10 \mu\text{kat}\cdot\text{mL}^{-1}$) aufgefüllt auf 5 mL mit Natriumacetatpuffer (pH 4,5). Lagerung max. 8 h auf Eis.

Schwermetall/Enzymlösung

- 1 mL Arbeitslösung GOD/POD und 9 mL der jeweiligen Schwermetalllösung werden gemischt und vor der Messung 30 Minuten auf Eis inkubiert

0,025 M TMB-Stocklösung

- 60 mg of TMB gelöst in 1 mL Aceton und 9 mL Methanol. Zum Lösen 5 Minuten im Ultraschallbad bei maximaler Leistung. Lagerung auf Eis, dunkel.

TMB-Arbeitslösung

- 1,5 mL TMB-Stocklösung (0,025 M) werden mit 6,2 mL Natriumacetatpuffer verdünnt. Lagerung max. 8 h auf Eis, dunkel.

Assayzusammensetzung

- 900 µL Schwermetall/Enzymlösung
- 50 µL TMB-Arbeitslösung
- 50 µL Glucosestocklösung
- Messung bei Raumtemperatur

C.II Ureaseassay

8,333 $\mu\text{kat}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ureasestocklösung

- 50 mg of urease ($0,833 \text{ mkat}\cdot\text{g}^{-1}$) gelöst in 5 mL H_2O , reinst.
Lagerung max. 8 h auf Eis.

Schwermetall/Ureaselösung

- 110 μL Ureaselösung (entsprechend aus Stocklösung verdünnt) und 880 μL Schwermetalllösung werden gemischt und vor der Messung 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Substrat/Indikatorlösung

- 600,6 mg Urea und 0,05 g Phenolphthalein werden in 2 mL Ethanol teilgelöst und mit H_2O , reinst auf 10 mL aufgefüllt.

Assayzusammensetzung

- 900 μL Schwermetall/Enzymlösung
- 50 μL Substrat/Indikatorlösung
- Messung bei Raumtemperatur

C.III Eisen(II)nachweis

Serie 1

- 98,5 mg Ferrozin und 12,5 mg Neocuproin gelöst in 100 mL H₂O, reinst.

Serie 2

- 98,5 mg Ferrozin, 0,7708 g Ammoniumacetat und 12,5 mg Neocuproin gelöst in 100 mL H₂O, reinst.

Serie 5

- 98,5 mg Ferrozin und 12,5 mg Neocuproin gelöst in 100 mL Methanol, pa.

Serie 6

- 98,5 mg Ferrozin, 0,7708 g Ammoniumacetat und 12,5 mg Neocuproin gelöst in 100 mL Methanol, pa.

Die Assaykomponenten werden in 30 µL Glaskapillaren vorgelegt und bei 55°C für 24 h getrocknet. Die Probenauftragung erfolgt durch Kapillarkraft.

C.IV Eisen(III)nachweis

Serie 9

- 1,522 g Ammoniumthiocyanat gelöst in 100 mL H₂O, reinst.

Die Assaykomponenten werden in 30 µL Glaskapillaren vorgelegt und bei 55°C für 24 h getrocknet. Die Probenauftragung erfolgt durch Kapillarkraft.

C.V Totaleisennachweisnachweis mittels Ferrozin

Serie 7

- 98,5 mg Ferrozin, 1,7612 g Ascorbinsäure und 12,5 mg Neocuproin gelöst in 100 mL H₂O, reinst.

Serie 8

- 98,5 mg Ferrozin, 1,7612 g Ascorbinsäure, 0,7708 g Ammoniumacetat und 12,5 mg Neocuproin gelöst in 100 mL H₂O, reinst.

Serie 6

- 98,5 mg Ferrozin, 1,7612 g Ascorbinsäure und 12,5 mg Neocuproin gelöst in 100 mL Methanol, pa.

Serie9

- 98,5 mg Ferrozin, 1,7612 g Ascorbinsäure, 0,7708 g Ammoniumacetat und 12,5 mg Neocuproin gelöst in 100 mL Methanol, pa.

Die Assaykomponenten werden in 30 µL Glaskapillaren vorgelegt und bei 55°C für 24 h getrocknet. Die Probenauftragung erfolgt durch Kapillarkraft.

C.VI Totaleisennachweisnachweis mittels

Ammoniumthiocyanat

Serie 10

- 1,522 g Ammoniumthiocyanat und 3,14 g Natriumpercarbonat gelöst in 100 mL H₂O, reinst.

Die Assaykomponenten werden in 30 µL Glaskapillaren vorgelegt und bei 55°C für 24 h getrocknet. Die Probenauftragung erfolgt durch Kapillarkraft.

C.IX Herstellung Formazinstandard

Gemäß ISO 7027 wird ein Formazin-Standard (FAU, FNU) zur Bestimmung der Trübung wie folgt hergestellt:

Die verwendeten Chemikalien sollten wenigstens dem Reinheitsgrad zur Analyse genügen und in Glasflaschen vorliegen. Für den Lösungsansatz wird hochreines Wasser verwendet; gegebenenfalls wird destilliertes Wasser über einen vorgewässerten (eine Stunde) und vorgespülten Membranfilter mit 0,1 µm Porenweite zweimal filtriert.

Lösung 1

10 Gramm Hexamethylentetramin werden in H₂O, reinst gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.

Lösung 2:

1 Gramm Hydrazinsulfat wird in H₂O, reinst gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.

Formazin-Stammlösung:

Je 5 ml der Lösungen 1 und 2 werden gemischt und 24 Stunden bei 25 °C (+/- 0,3 °C) gelagert.

Die Trübheit dieser Standardlösung beträgt 4000 FAU beziehungsweise 4000 FNU und ist im Dunkeln bei 25 °C ca. 4 Wochen haltbar.

Verdünnungen erfolgen mit H₂O, reinst.

Curriculum Vitae

Matthias Schäfer

geboren in Wader, Deutschland

05/2015 – 02/2019

wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrgebiet für Bioverfahrenstechnik, Technische Universität Kaiserslautern

04/2012 - 02/2015

Master (M.Sc.), Bioverfahrenstechnik, Technische Universität Kaiserslautern, Thema der Masterthesis: „Butanolabtrennung aus Fermentationen mittels Membranverfahren“.

09/2008 - 02/2012

Bachelor (B.Eng.), Bio-, Umwelt und Prozessverfahrenstechnik, Schwerpunkt Bioverfahrenstechnik, Fachhochschule Trier, Standort Birkenfeld, Thema der Bachelorthesis: „Hochzelldichtefermentation mit *Pichia pastoris*“.

08/2005 - 06/2008

Staatlich geprüfter Biologisch-technischer Assistent, Berufskolleg Olsberg.