

**Einsatz der Planarchromatographie  
mit wirkungsbezogener Detektion  
zur Untersuchung von Wässern**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

DOCTOR RERUM NATURALIUM

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Fakultät Nachhaltigkeit (Institut für Umweltchemie)

der Universität Leuphana Lüneburg

von Stefan Christian Weiß

geboren am 09.04.1982 in Schwäbisch Gmünd

Gutachter:

Prof. Dr.-Ing. Wolfgang K.L. Ruck  
(Institut Umweltchemie, Universität Leuphana Lüneburg)

Hon.-Prof. Dr. Ralf Ebinghaus  
(Institut Umweltchemie, Universität Leuphana Lüneburg, Leiter der  
Abteilung Umweltchemie, Institut für Küstenforschung des GKSS  
Forschungszentrums in Geesthacht)

Eingereicht am: 02.08.2017

Tag der Disputation: 20.09.2018



## I. Zusammenfassung

Unter Wirkungsbezogener Analytik (WBA) wird die Kopplung eines chromatographischen Trennverfahrens mit einem biologischen Testsystem verstanden. Der Vorteil bei dieser Herangehensweise ist, dass die zuvor getrennten Probeninhaltsstoffe anhand ihrer Aktivität mit einem *in vitro*-Testsystem detektiert werden. Es hat sich gezeigt, dass die Hochleistungs-dünnschichtchromatographie (HPTLC) besonders geeignet für die WBA ist [1, 2]. Die Literaturrecherche ergab, dass die WBA mit der HPTLC an unterschiedlichen Proben z. B. Pflanzextrakte oder Wasserproben durchgeführt wurden. Doch bislang konnte nicht gezeigt werden, dass die WBA mit HPTLC auch als routinefähige Methode eingesetzt wurde. In dieser Arbeit erfolgte eine Optimierung der Detektion der Endpunkte Biolumineszenzhemmung (*Aliivibrio fischeri*), antibiotische Wirkung (*Bacillus subtilis*), Neurotoxizität (Acetylcholinesterase) von der HPTLC-Platte hinsichtlich Routinefähigkeit. Zusätzlich konnte in ersten Versuchen gezeigt werden, dass es möglich ist, direkt gentoxische Verbindungen mittels des umu-Tests auf der HPTLC-Platte nachzuweisen.

Für die einzelnen Biotests sind unterschiedliche Inkubationszeiten, die von Minuten bis Stunden reichen, notwendig. Dies führt aufgrund von Diffusion auf der HPTLC-Platte zu einer Bandenverbreiterung. Es wurden unterschiedliche Methoden und Arbeitsweisen zur Verminderung der Diffusion erprobt und optimiert. Eine Möglichkeit ist die mechanische Eindämmung durch die Einbringung einer Gaze in eine verfestigte Calciumalginatschicht. Optimiert wurde dieses Verfahren am *Bacillus subtilis*-Hemmtest. Hier konnte gezeigt werden, dass zwar durch das Einbringen der Gaze die Sensitivität sinkt, aber bislang wurde noch kein geeigneteres Material gefunden.

Für Enzymtests ist eine vergleichsweise kurze Inkubationszeit notwendig, daher tritt hier eine geringere Bandenverbreiterung auf, womit eine mechanische Einschränkung der Diffusion nicht geeignet ist. Um die auftretende Bandenverbreiterung möglichst gering zu halten, wurde besonders die Aufbringung des Substrats optimiert. Dies geschah am Beispiel des HPTLC-Acetylcholinesterasehemmtests. Durch Aufsprühen des Substrats konnte das Ergebnis im Vergleich zu dem in der Literatur beschriebenen Verfahren wesentlich verbessert werden. Die Ermittlung der unterschiedlichen bandenverbreiternden Einflussfaktoren wie beispielsweise Inkubationszeit, Auftragesgeschwindigkeit und Konzentration des Substrats und deren gegenseitige Beeinflussungen (Wechselwirkungen) erfolgte mittels statistischer Versuchsplanung. In absteigender Reihenfolge hatten folgende Faktoren den größten Einfluss auf die Zielgröße Bandenverbreiterung: Substratmenge > Wechselwirkung von Substratmenge und Umsatzzeit des Substrats > Umsatzzeit des Substrates = Enzymaktivität. Anhand dieser Erkenntnis konnte die Methode soweit optimiert werden, dass die bei der De-



tektion von AChE-Inhibitoren auftretende Bandenverbreiterung sehr gering gehalten werden kann. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Verfahrens lassen sich selbst geringe Spuren von Verunreinigungen in Referenzsubstanzen detektieren.

Besonders für den Routineeinsatz der WBA mit der HPTLC ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erforderlich. Dazu wurde anhand des HPTLC-Leuchtbakterienhemmtests mit *Aliivibrio fischeri* eine Auswertestrategie erarbeitet. Die Ermittlung der Biolumineszenzhemmung findet analog zum Küvettentest statt und kann orts aufgelöst als Hemmwert-Chromatogramm dargestellt werden. Die Darstellung der Hemmung in einem  $\Gamma$ -Wert-Chromatogramm gleicht die Stauchung der Peaks aufgrund des sigmoiden Verlaufs der Dosis-Wirkungsbeziehung teilweise aus. Durch die nichtlineare Beziehung zwischen Konzentration bzw. Flächenmasse und Wirkung der unbekannt Substanzen ist es für den Vergleich von Proben notwendig, einen Bezugspunkt zu setzen. Bewährt hat sich dafür der EC50-Wert. Da aber in den meisten Fällen die Konzentration unbekannt ist, wird als Bezugspunkt das Auftragevolumen gewählt, welches erforderlich ist um eine Hemmung von 50 % auszulösen. Der Kehrwert des berechneten Auftragevolumens für 50% Hemmung stellt das reziproke Iso-Hemmvolume (RIHV) dar. Dieser RIHV-Wert hat sich für den Probenvergleich in verschiedenen Anwendungen bewährt. Das Prinzip der Auswertung kann vom HPTLC-Leuchtbakterientest mit Anpassung auf den HPTLC-*Bacillus subtilis*-Hemmtest übertragen werden. Für den Vergleich der Wirkung auf die Acetylcholinesterase-Hemmung wird in Anlehnung zum RIHV, das reziproke Iso-Aktivitätsvolume (RIAV) herangezogen. Hier wird das Auftragevolumen, welches notwendig ist, eine Aktivität der AChE von 50% zu erreichen, als Kehrwert angegeben.

Zur Ermittlung der Messunsicherheit der Chromatographie und der detektierten Wirkung wurden parallel zu den Proben Referenzverbindungen untersucht. Bei der Überwachung einer gesicherten Deponie über einen Zeitraum von 4,5 Jahren konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Hochleistungsdünnschichtchromatographie mittels automatisierter Mehrfachentwicklung (HPTLC/AMD) um ein reproduzierbares Chromatographiesystem handelt. Bei der Anwendung des Leuchtbakterien-, *Bacillus subtilis*- und des Acetylcholinesterase-Hemmtests auf verschiedene Deponie- und Abwasserproben wurden über einen Zeitraum von 7 Monaten Standardabweichungen von 5-9 % Hemmung für die testspezifischen Referenzsubstanzen ermittelt. Als Ergebnis der Validierung wurden der HPTLC-*Aliivibrio fischeri*-, der HPTLC-*Bacillus subtilis*- und der HPTLC-Acetylcholinesterase-Hemmtest am 24.03.2015 von der deutschen Akkreditierungsstelle (DAkkS) akkreditiert (Akkreditierungsurkunde D-PL-18961-01-00).

Zur Ermittlung potenziell genotoxischer Substanzen wurde der umu-Test ausgewählt. Da es sich beim umu-Test auch um einen Test mit einer notwendigen langen Inkubationszeit (2 h) handelt, muss hier ebenso die Bandenverbreiterung durch geeignete Maßnahmen minimiert werden. Hierzu wurde die aufwendige Calciumalginatverfestigung in Kombination mit einer medizinischen Gaze nach Baumann et al. [3] vereinfacht. Mit dem umu-Test auf der HPTLC-Platte ist es derzeit möglich, die aus der DIN 38415-3 [4] bekannte direkt wirkende genotoxische Substanz 4-Nitroquinolin-N-oxid (4-NQO) auf der HPTLC-Platte nachzuweisen. Die Nachweisgrenze für 4-NQO liegt bei einer Auftragemenge von 3 ng. Für einen erfolgreichen Nachweis von indirekt wirkenden Substanzen, die erst nach der Aktivierung durch Stoffwechsellenzyme genotoxisch wirken, war es nicht möglich, das erforderliche Metabolisierungssystem auf der HPTLC-Platte aufrecht zu erhalten.

Zur Durchführung der WBA ist für die meisten Wasserproben (z. B. Oberflächenwasser oder Grundwasser) eine Anreicherung erforderlich. Parallel zu den Arbeiten mit den biologischen Testsystemen erfolgte die Optimierung der Anreicherung von organischen Verbindungen aus Wasserproben. Für die Festphasenextraktion (SPE) wurden verschiedene Materialien bei den pH-Werten 2, 7 und 9 mit Substanzen unterschiedlicher Polarität getestet. Die besten Wiederfindungen über den gesamten Polaritätsbereich erzielte die Phase „Agilent Plexa“ (Polydivinylbenzol) mit einer angepassten Elutionsabfolge. Bei der Auswahl des Materials und der Anpassung der Elutionsabfolge wurde auch auf einen möglichst geringen Blindwert für den Biolumineszenz-Hemmtest mit *Aliivibrio fischeri* geachtet. Damit wurde eine für die WBA geeignete Anreicherungsmethode gefunden. Zur Verbesserung der Extraktionsausbeute von polaren Verbindungen mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) wurde die Mikro-LLE mit dem in allen Verhältnissen mit Wasser mischbaren Extraktionsmittel Acetonitril getestet. Die im Blindwert auftretenden störenden Substanzen konnten durch Ausheizen des zur Phasentrennung erforderlichen Natriumchlorids erheblich reduziert werden. Bei den Untersuchungen zur Wiederholbarkeit mit einer Deponiesickerwasserprobe und der Detektion der Biolumineszenz von *Aliivibrio fischeri* waren nur geringe Abweichungen der Hemmwerte detektierbar.

Aufgrund der zu erwartenden komplexen Zusammensetzung von Proben aus dem Deponiebereich ist eine Gradientenelution für die HPTLC/AMD notwendig. Anhand von Referenzverbindungen und Extrakten aus verschiedenen Deponien wurde die HPTLC/AMD-Trennung für ein Screening optimiert. Mit diesem Screening-Gradient ist es möglich, die wirkenden Probenbestandteile über die gesamte Trennstrecke zu verteilen. Zusätzlich fand noch eine Entwicklung einer isokratischen HPTLC-Trennung für eine schnelle Beurteilung von Proben statt, wobei bei dieser Methode Abstriche bezüglich der Trennleistung gemacht werden mussten.

Zudem konnte gezeigt werden, dass der aufwendige Identifizierungsprozess durch spezifische postchromatographische Derivatisierungsreaktionen auf der HPTLC-Platte unterstützt werden kann. Dazu wurde der Bratton-Marshall-Nachweis von primären Aminen optimiert. Durch den Nachweis von austauschbaren Protonen mittels des H/D-Austausches lassen sich die denkbaren Strukturen deutlich einschränken. Für einen nahezu vollständigen H/D-Austausch hat sich die Kopplung von HPTLC und Massenspektrometer (MS) als besonders geeignet gezeigt, da hier nur wenige Milliliter an deuterierten Lösemitteln benötigt werden.

Erprobt wurden die optimierten Methoden an verschiedenen Wässern, welche aus Kläranlagen und aus dem Umfeld von Deponien stammen. Durch die Einführung des RIHV- bzw. RIAV-Wertes ist es möglich Wässer von verschiedenen Probennahmestellen, z. B. Deponiesickerwässer, anhand ihrer Wirkung vergleichend zu beurteilen. Auch kann damit die Veränderung des Wirkungsmusters über einen Aufbereitungsprozess beobachtet werden. Die Untersuchungsergebnisse zeigen zudem, dass auch bei der WBA Feldblindproben entscheidend sind, um Proben sicher beurteilen zu können.

## II. Summary

In effect-directed analysis (EDA), the coupling of a chromatographic separation process is understood using a biological test system. The benefit with this approach is that the previously separated substances contained in the sample are detected in vitro in a test system, on the basis of your activity. It has been demonstrated that high performance liquid chromatography (HPLC) is particularly eligible for the EDA [1,2]. The research literature indicated that the EDA is performed with the HPLC on different samples but was not used as a routine method, e.g. for identifying contaminated sites. In this work, detecting the endpoint of the bioluminescence inhibition (*Aliivibrio fischeri*), antibiotic effect (*Bacillus subtilis*), and neurotoxicity (Acetylcholinesterase) of the HPLC plate was optimized with regard to routine capabilities. It could additionally be demonstrated in the first trials that it is possible to prove direct genotoxic links using the umu test on the HPLC plate.

Different incubation times are required for the individual biotests, which last from minutes to hours. This leads to a band broadening due to diffusion on the HPLC plate. Different methods and ways of working to minimise diffusion were tested and optimized. Mechanical containment is one possibility, where gauze is inserted into the solidified calcium alginate layer. The process was optimized on the *Bacillus subtilis* inhibition assay. It could be demonstrated here that sensitivity is lowered by inserting the gauze, however, thus far a more eligible material has not yet been found.

A comparatively short incubation period is necessary for enzyme tests. As a result a shorter band broadening occurs, whereby the mechanical containment of the diffusion is not eligible. In order to keep the occurring band broadening as minimal as possible, application of the substrate in particular was optimized. This occurred, as an example, with the HPLC acetylcholinesterase inhibition assay. In comparison to the process described in the literature, outcomes could be substantially improved by spraying the substrate. Nevertheless, a slight band broadening still occurs. The statistical method of "design of experiment" is used for determining different band broadening determinants, for example, incubation period, application speed and concentration on the substrate and their mutual influences (interactions). In descending order, the following factors had the greatest influence on the band broadening target figure: Substrate volume > interaction of substrate volume and turnover time of the substrate > turnover time of the substrate = enzyme activity. Using this knowledge, the method could be optimized to such an extent that the band broadening occurring when detecting

AChE inhibitor can be kept very minimal. Based on the high sensitivity of the procedure, low traces of impurities can be detected in the reference substances.

The comparability of the outcomes is particularly necessary for routine use of the EDA with the HPLC. Furthermore, an evaluation strategy was compiled using the HPLC luminescent bacteria inhibition assay with *Aliivibrio fischeri*. Determining the bioluminescence inhibition takes place analogous to the cuvette test and can be represented as a chromatogram inhibition value that is resolved on location. The representation of inhibition in a  $\Gamma$ -value chromatogram partially offsets the compression of the peaks based on the sigmoid process of the dose-response relationship. It is necessary to set a reference point for comparing samples due to using the non-linear relationship between concentration or surface dimension and the effect of the unknown substances. EC50 value was proven for this. However, since the concentration is unknown in most cases, the application volume selected as the reference point is chosen based on what is required to trigger an inhibition of 50%. The inverse of the calculated application volume for 50% inhibition represents the reciprocal iso-inhibition volume (RIHV). This RIHV value was proven for the sample comparison in different applications. The principle for the evaluation can, with adjustment, be transferred from the HPLC luminescent bacteria test to the HPLC *Bacillus subtilis* inhibition assay. In accordance with the RIHV, the reciprocal iso-activity volume (RIAV) is used for comparing the effect on the acetylcholinesterase inhibition. Here the application volume is added as an inverse, which is necessary to reach an acetylcholinesterase activity of 50%.

Reference compounds were assessed parallel to the samples for determining the measurement uncertainty of the chromatography and the detected effect. When monitoring a protected landfill over a period of 4.5 years, it could be demonstrated that it concerns a reproducible chromatographic system with HPLC/AMD. Standard deviations of 5–9% inhibition for the test-specific reference substances were determined when applying the luminescent bacteria, *Bacillus subtilis*- and the acetylcholinesterase inhibition assay on different landfill and waste water samples over a period of 7 months. As an outcome of the validation, the HPLC *Aliivibrio fischeri*-, HPLC *Bacillus subtilis* and the HPLC acetylcholinesterase inhibition assay was accredited on 24/03/2015 by the Deutschen Akkreditierungsstelle (DAkKS [German Accreditation Body] (accreditation document D-PL-18961-01-00)).

The umu test was selected for determining potential genotoxic substances. Since the umu test necessitates a long incubation period (2 hours), the band broadening must also be minimised here through eligible measures. Here, according to Baumann et al., a complex combination of calcium alginate solidification and the medical gauze was simplified for this [3]. Using the umu test on the HPLC plate, it is possible to detect the effective genotoxic substance 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO) known from DIN 38415-3 [4] on the HPLC plate. The detection limit for 4-NQO is an application amount of 3 ng. It is not possible to keep the required metabolising system upright on the HPLC plate to successfully detect the indirectly acting substances, which only have a genotoxic effect after activation by the metabolic enzymes.

An enrichment is necessary to perform the EDA for most water samples (e.g. surface water or ground water). The enrichment of organic compounds from water samples is optimized in parallel to the work with biological test systems. Different materials were tested for the solid-phase extraction (SPE) with substances of various polarities for pH values 2, 7 and 9. The best recovery across the entire polarity range was achieved by the phase "Agilent Plexa" (polydivinylbenzene) with an adjusted elution sequence. When selecting the material and adjusting the elution sequence, a blank value as low as possible was regarded on the bioluminescence inhibition assay with *Aliivibrio fischeri*. Consequently, an enrichment method eligible for the EDA was found. To improve the extraction yield of polar compounds using liquid-liquid extraction (LLE), the micro LLE were tested along with the extractant acetonitrile, which is miscible in water in all conditions. The occurring substances disturbing the blank value could be significantly reduced by heating the sodium chloride required for phase separation. Only few deviations in the inhibition value could be detected when investigating reproducibility with a landfill soil water sample and detecting the bioluminescence of *Aliivibrio fischeri*.

Based on the expected complex structure of samples from the landfill area, a gradient elution is necessary for the high performance liquid chromatography using automatic multiple development (HPLC/AMD). Based on the reference compounds and extracts from various landfills, the HPLC/AMD separation was optimised for a screening. With this screening gradient, it is possible to distribute the acting sample constituents across the entire isolating distance. Moreover, a development of an isocratic HPLC separation still occurred for a quick assessment of the samples, whereby it was necessary for compromises to be made for this method with regard to separation efficiency.

Additionally, it could be demonstrated that the extensive identification process can be facilitated by specific post chromatographic derivatization reactions on the HPLC plate. The Bratton-Marshall test was optimised by primary amines. The conceivable structure can be significantly limited by testing the exchangeable protons using the H/D exchange. The coupling of HPLC and mass spectrometer was demonstrated as particularly eligible for a nearly complete H/D exchange because only a few millilitres of the deuterated solvent are required here.

The optimized methods were tested on different water samples, which come from sewage treatment plants and from the surrounding landfill areas. It is possible to comparatively assess water from different sampling locations, e.g. landfill leachate, by introducing RIHV or RIAV values based on their effect. This means that the change in impact pattern can be observed across treatment processes. The assessment outcomes also demonstrate that field blank tests are also crucial with the EDA in order to be able to reliably assess samples.

### **III. Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand im Betriebs- und Forschungslaboratorium der Landeswasserversorgung in Kooperation mit dem Institut Umweltchemie der Leuphana Universität Lüneburg. Die Finanzierung erfolgte durch den Zweckverband Landeswasserversorgung und der Firma Camag.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wolfgang K. L. Ruck möchte ich sehr für meine Zulassung als Doktorand an der Leuphana Universität Lüneburg, das mir entgegengebrachte Vertrauen und den großen Freiraum bei der Bearbeitung des Themas danken.

Herrn Hon.-Prof. Dr. Ralf Ebinghaus danke ich für die Erstellung des zweiten Gutachtens.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Wolfgang Schulz bedanken. In ungezählten fachlichen Diskussionen entstanden viele Ideen, die nicht nur wertvoll für das Fortschreiten der Arbeit waren, sondern von denen ich bestimmt auch noch in Zukunft profitieren werde.

Ebenso möchte ich Dr. Walter H. Weber für die Vermittlung deines Wissens zur Dünnschichtchromatographie, dein Interesse an meiner Arbeit und der Bereitstellung der optimalen Rahmenbedingungen, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danken. Ich wünsche Dir alles Gute im Ruhestand und weiterhin viel Erfolg mit deiner umfangreichen Tomatenzucht.

Bei Dr. Rudi Winzenbacher möchte ich mich für sein Interesse an der Wirkungsbezogenen Analytik und die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Prof. Dr. Michael Oehme (Institut für angewandte Analytische Chemie, Appenzell, Schweiz), danke ich für die vielen, immer interessanten Diskussionen, die mir halfen mich stets zu verbessern.

Ein ganz großer Dank gilt Nicole Egetenmeyer und Dr. Alexander Müller für die großartige Zusammenarbeit, euren Korrekturen, Ratschlägen und der Unterstützung bei meinen Projekten. Zudem sorgte die Zeit, die wir abseits der Arbeit miteinander verbrachten immer für eine angenehme geistige Entspannung.

Bei Sarah Künzel bedanke ich mich für die immer zuverlässige und unkomplizierte Hilfe bei der Aufarbeitung von unzählbaren Proben, Entwicklungen von HPTLC-Platten und deren Auswertung.



Ein großes Dankeschön gilt Dr. Wolfram Seitz und Dr. Regine Fischeider für eure Korrekturen und Unterstützung bei meinen Projekten.

Für ihre engagierte Mitarbeit möchte ich den Studentinnen und Studenten in chronologischer Reihenfolge danken: Judith Barth, Hans Georg Leukhardt, Mewes Baudisch, Christine Grözingler, Sandra Fleischer, Dinah Albrecht, Robert Goßmann und Adrian Hofmann. Weiterhin möchte ich mich bei Janina Stieber und Kathrin Wenger für das sorgfältige Korrekturlesen bedanken.

Genauso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dirk Flottmann (Hochschule Aalen, Fakultät Chemie) für die Betreuung meiner Diplomarbeit und der Ermutigung diese Arbeit zu beginnen.

Allen nicht namentlich erwähnten Kolleginnen und Kollegen danke ich für eure unkomplizierte Unterstützung und die angenehme Atmosphäre im Labor.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Wasserchemischen Gesellschaft für die Gewährung von Stipendien für die Jahrestagungen bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, dafür dass ihr immer an mich geglaubt und mich unterstützt habt.

## IV. Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>9</b>
<b>III.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>11</b>
<b>IV.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>16</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>19</b>
1.1	Wirkungsbezogene Analytik.....	20
1.1.1	<i>Das Toxicity Identification Evaluation-Konzept</i> .....	20
1.1.2	<i>Das Konzept der Wirkungsbezogenen Analytik</i> .....	21
1.1.3	<i>Anreicherungs- und Fraktionierungstechniken in der Wirkungsbezogenen Analytik</i> .....	22
1.2	WBA mit der HPTLC .....	25
1.2.1	<i>Bioautographie</i> .....	25
1.2.2	<i>Biochemische Detektion</i> .....	26
1.2.3	<i>Detektion spezifischer chemischer Eigenschaften</i> .....	27
1.2.4	<i>Anwendungen in der Umweltanalytik</i> .....	27
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>Entwicklung von Auswertemethoden für die HPTLC-WBA</b> .....	<b>33</b>
3.1	Auswertung der Biolumineszenzhemmung von <i>Aliivibrio fischeri</i> .....	33
3.1.1	<i>Ermittlung der Biolumineszenzhemmung</i> .....	33
3.1.2	<i>Semi-quantitative Auswertung von Proben</i> .....	38
3.2	Auswertung der Acetylcholinesterase-Hemmung.....	42
3.2.1	<i>Bestimmung der Hemmung</i> .....	42
3.2.2	<i>Semi-quantitative Auswertung der AChE-Hemmung</i> .....	44
3.3	Auswertung der Hemmung von <i>Bacillus subtilis</i> .....	46
3.3.1	<i>Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung</i> .....	49
3.4	Zusammenfassung .....	51
<b>4</b>	<b>Entwicklung von HPTLC-Methoden</b> .....	<b>53</b>
4.1	Grundlagen.....	53
4.1.1	<i>HPTLC-Trennung</i> .....	53
4.1.2	<i>Automatisierte Mehrfachentwicklung</i> .....	54
4.2	Ergebnisse und Diskussion.....	56
4.2.1	<i>Isokratische Trennung</i> .....	56

4.2.2	<i>HPTLC/AMD-Trennung</i> .....	59
4.3	Zusammenfassung .....	63
<b>5</b>	<b>Anpassung der Probenvorbereitung für die HPTLC-WBA</b> .....	<b>64</b>
5.1	Festphasenextraktion .....	64
5.1.1	<i>Grundlagen</i> .....	64
5.1.2	<i>Durchführung und Ergebnisse</i> .....	64
5.1.3	<i>Untersuchung der Wiederfindung mit „Agilent Plexa“ und angepasster Elution.</i> .....	70
5.2	Flüssig-Flüssig-Extraktion .....	76
5.2.1	<i>Grundlagen</i> .....	76
5.2.2	<i>Durchführung und Ergebnisse</i> .....	77
5.3	Größenausschlusschromatographie (GPC) .....	84
5.3.1	<i>Durchführung und Ergebnisse</i> .....	84
5.4	Zusammenfassung Probenvorbereitung .....	88
<b>6</b>	<b>HPTLC-Leuchtakterien-Hemmtest</b> .....	<b>90</b>
6.1	Grundlagen zum Leuchtbakterium <i>Aliivibrio fischeri</i> .....	90
6.1.1	<i>Biochemie der Biolumineszenz von Aliivibrio fischeri</i> .....	91
6.1.2	<i>Regulation der Biolumineszenz</i> .....	91
6.1.3	<i>Biolumineszenzreaktion</i> .....	93
6.1.4	<i>Toxikologische Wirkweisen</i> .....	94
6.1.5	<i>Bestimmung der Biolumineszenzhemmung</i> .....	96
6.1.6	<i>TLC-Biolumineszenzhemmtest</i> .....	96
6.2	Grenzen der Biolumineszenzauswertung.....	97
6.2.1	<i>Zeitabhängigkeit der Biolumineszenzdetektion</i> .....	97
6.2.2	<i>Einfluss der Helligkeitsverstärkung auf die Bildauswertung</i> .....	100
6.2.3	<i>Einfluss der Inkubationszeit auf die RIHV-Werte</i> .....	102
6.2.4	<i>Grenzen der RIHV-Bestimmung</i> .....	103
6.2.5	<i>Einfluss des Vakuums bei der HPTLC/AMD-Trennung auf die Hemmung...</i> .....	105
6.3	Untersuchung von Grund- und Oberflächenwässern .....	107
6.4	Untersuchung der Elastikschicht eines Kunstrasens .....	108
6.5	Überwachung einer gesicherten Sondermülldeponie .....	111
6.5.1	<i>Beschreibung des Standortes</i> .....	111
6.5.2	<i>Qualitätssicherung</i> .....	113
6.5.3	<i>Methode</i> .....	118

6.5.4	<i>Ergebnisse und Diskussion</i> .....	119
6.5.5	<i>Zusammenfassung der Untersuchung der Deponie D</i> .....	142
6.6	Zusammenfassung .....	143
<b>7</b>	<b>HPTLC-<i>Bacillus subtilis</i>-Hemmtest</b> .....	<b>145</b>
7.1	Grundlagen zum <i>Bacillus subtilis</i> -Hemmtest .....	145
7.2	Ergebnisse und Diskussion .....	147
7.2.1	<i>Wiederholbarkeit</i> .....	151
7.2.2	<i>Zusammenfassung</i> .....	157
<b>8</b>	<b>HPTLC-Acetylcholinesterase-Hemmtest</b> .....	<b>158</b>
8.1	Grundlagen zur Acetylcholinesterase .....	158
8.1.1	<i>Der Neurotransmitter Acetylcholin</i> .....	158
8.1.2	<i>Die Acetylcholinesterase</i> .....	159
8.1.3	<i>Inhibition der AChE</i> .....	160
8.1.4	<i>Nachweis von AChE-Inhibitoren</i> .....	163
8.1.5	<i>TLC-AChE-Hemmtest</i> .....	164
8.2	Ergebnisse und Diskussion .....	165
8.2.1	<i>Vergleich der Substratauftragetechniken</i> .....	165
8.2.2	<i>Auswahl des Substrats</i> .....	166
8.2.3	<i>Ermittlung von Einflussgrößen auf den HPTLC-AChE-Hemmtest durch Aufstellung eines statistischen Versuchsplans</i> .....	170
8.2.4	<i>Auswertung der Ergebnisse der vollfaktoriellen-Versuchsreihe</i> .....	173
8.2.5	<i>Optimierung des HPTLC-AChE-Hemmtests</i> .....	181
8.2.6	<i>Austausch der Acetylcholinesterase</i> .....	183
8.2.7	<i>Untersuchung von Referenzsubstanzen</i> .....	183
8.2.8	<i>Wiederholbarkeit innerhalb einer HPTLC-Platte</i> .....	184
8.2.9	<i>Anwendung auf Wasserproben</i> .....	186
8.2.10	<i>Zusammenfassung</i> .....	189
<b>9</b>	<b>HPTLC-umu-Test</b> .....	<b>190</b>
9.1	Grundlagen zum umu-Test .....	190
9.1.1	<i>Gentoxizität und Fremdstoffmetabolismus</i> .....	190
9.1.2	<i>Prinzip des umu-Tests</i> .....	191
9.1.3	<i>Nachweis Gentoxizität / Mutagenität auf der HPTLC-Platte</i> .....	193
9.1.4	<i>Ergebnisse und Diskussion</i> .....	194
9.1.5	<i>Zusammenfassung</i> .....	204

<b>10</b>	<b>Kombinierte Anwendung der entwickelten HPTLC-WBA-Methoden.....</b>	<b>205</b>
10.1	Untersuchungskonzept.....	205
10.1.1	<i>Summenwirkung des SPE-Blindwerts und des Laborreinstwassers auf Aliivibrio fischeri.....</i>	<i>209</i>
10.2	Qualitätssicherung .....	211
10.2.1	<i>Biolumineszenzhemmung (Aliivibrio fischeri).....</i>	<i>211</i>
10.2.2	<i>Bacillus subtilis-Hemmtest.....</i>	<i>212</i>
10.2.3	<i>Acetylcholinesterase-Hemmtest.....</i>	<i>214</i>
10.2.4	<i>R<sub>F</sub>-Stabilität der isokratischen HPTLC-Trennung.....</i>	<i>215</i>
10.2.5	<i>R<sub>F</sub>-Stabilität der Gradientenelution mit HPTLC/AMD.....</i>	<i>217</i>
10.3	Deponie A .....	218
10.3.1	<i>Übersicht zu den Proben.....</i>	<i>218</i>
10.3.2	<i>Vorscreening.....</i>	<i>220</i>
10.3.3	<i>Deponiesickerwasser (A1) .....</i>	<i>222</i>
10.3.4	<i>Vorfeldmessstelle (A2).....</i>	<i>224</i>
10.3.5	<i>Proben A3 (vor Abwassereinigung) und A4 (nach Abwasserreinigung) ..</i>	<i>226</i>
10.3.6	<i>Proben FB A2 und TB.....</i>	<i>228</i>
10.3.7	<i>Non-Target Screening.....</i>	<i>229</i>
10.3.8	<i>Zusammenfassung und Fazit Deponie A.....</i>	<i>230</i>
10.4	Deponie C.....	233
10.4.1	<i>Übersicht zu den Proben.....</i>	<i>233</i>
10.4.2	<i>Vorscreening.....</i>	<i>233</i>
10.4.3	<i>Probe von der Vorfeldmessstelle C1 .....</i>	<i>235</i>
10.4.4	<i>Abstrom der Deponie (Probe C2).....</i>	<i>237</i>
10.4.5	<i>Feld- und Spülblindproben .....</i>	<i>240</i>
10.4.6	<i>Non-Target Screening.....</i>	<i>241</i>
10.4.7	<i>Zusammenfassung und Fazit Deponie C.....</i>	<i>242</i>
10.5	Kommunale Deponie E und kommunale Kläranlage G.....	243
10.5.1	<i>Übersicht zu den Proben.....</i>	<i>243</i>
10.5.2	<i>Vorscreening.....</i>	<i>244</i>
10.5.3	<i>Sickerwasser der Deponie (Probe E1) .....</i>	<i>248</i>
10.5.4	<i>Gefasstes Sauberwasser der Deponie (Probe E2).....</i>	<i>249</i>
10.5.5	<i>Ablauf der kommunalen Kläranlage G (Probe G1) .....</i>	<i>250</i>
10.5.6	<i>Feldblindproben .....</i>	<i>251</i>

10.5.7	<i>Zusammenfassung und Fazit Deponie E und Abwasserreinigungsanlage G</i>	252
10.6	Industriekläranlage H	253
10.6.1	<i>Beschreibung des Probenahmestandorts</i>	253
10.6.2	<i>Vorscreening</i>	254
10.6.3	<i>WBA mit HPTLC/AMD vom Gesamtablauf der Industriekläranlage (H1)</i>	255
10.6.4	<i>Feldblindprobe (FB H1)</i>	257
10.6.5	<i>Non-Target Screening</i>	258
10.6.6	<i>Zusammenfassung und Fazit Abwasserreinigungsanlage H</i>	259
10.7	Zusammenfassung der kombinierten Anwendung der entwickelten HPTLC-WBA-Methoden	261
<b>11</b>	<b>Entwicklung von Hilfswerkzeugen zur Identifizierung von Substanzen</b>	<b>263</b>
11.1	Grundlagen	263
11.1.1	<i>TLC-MS</i>	263
11.1.2	<i>Derivatisierung</i>	264
11.2	Ergebnisse und Diskussion	265
<b>12</b>	<b>Ausblick</b>	<b>281</b>
<b>13</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>284</b>
13.1	Geräte	284
13.2	Verbrauchsmaterialien	285
13.3	Chemikalien	286
13.4	Methoden	290
13.4.1	<i>Festphasenextraktion</i>	290
13.4.2	<i>Flüssig-Flüssig-Extraktion</i>	291
13.4.3	<i>HPTLC-Trennmethoden</i>	292
13.4.4	<i>HPTLC-<i>Aliivibrio fischeri</i> Hemmtest</i>	303
13.4.5	<i>HPTLC-Bacillus subtilis Hemmtest</i>	304
13.4.6	<i>HPTLC-Acetylcholinesterase Hemmtest</i>	307
13.4.7	<i>HPLC-MS-Methoden</i>	310
13.4.8	<i>Derivatisierung</i>	317
<b>V.</b>	<b>Publikationsverzeichnis</b>	<b>319</b>
<b>VI.</b>	<b>Akkredierung von WBA/HPTLC-Methoden</b>	<b>325</b>
<b>VII.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>327</b>

---

## V. Abkürzungsverzeichnis

4-NQO	4-Nitroquinolin-N-oxid
Abs	Absorption
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonicacid-Radikal
Ac	Enzymaktivität
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AMD	automatisierte Mehrfachentwicklung
AMQI	7-Acetoxy-1-methyl-chinoliniumiodid
ARA	Abwasserreinigungsanlage
ATP	Adenosin-triphosphat
$a_{z,j}$	Lageparameter der Dosis-Wirkungsbeziehung
BS	<i>Bacillus subtilis</i>
$b_{z,j}$	Steigungsparameter der Dosis-Wirkungsbeziehung
CCD	Charge-coupled Device (ladungsgekoppeltes Bauelement)
CPM Maleimide	N-(4-(7-Diethylamino-4-methylcoumarin-3yl)phenyl)maleimid
$c_{z,j}$	Konzentration bzw. Flächenmasse
DAkKS	Deutschen Akkreditierungsstelle
DB	Direkt-Bioautographie
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNPH	2,4-Dinitrophenyl-hydrazine
DOC	Gelöste organischer Kohlenstoff
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazol-Radikal
DTNB	5,5`-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
$E_t$	Enzymkonzentration nach Inkubationszeit t
$E_0$	Enzymkonzentration vor Reaktionsbeginn
EDA	Effect-directed analysis
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtAc	Ethylacetat
FB	Feldblindproben
FMNH <sub>2</sub>	Flavinmononucleotids
FS	Spülblindprobe
GC	Gaschromatographie
GOW	Gesundheitlichen Orientierungswert
GPC	Größenausschlusschromatographie
H/D-Austausches	Wasserstoff/Deuterium-Austausch
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPLC-MS/MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer

---

HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
HPTLC/AMD	Hochleistungsdünnschichtchromatographie mit automatisierte Mehrfachentwicklung
HRMS	hochauflösenden Massenspektrometer
Inh	Hemmung
Inh <sub>Rf</sub>	Hemmung bei Rf
Inh <sub>z</sub>	Hemmzone
Inh <sub>z,j</sub>	Hemmung der Substanzbande z der Probe j
I <sub>p</sub>	Lichtintensität Probe
I <sub>p,Rf</sub>	Lichtintensität bei Rf auf der Probefahrbahn
IQR	Interquartilsabstand
I <sub>R</sub>	Lichtintensität Referenz
I <sub>R,Rf</sub>	Lichtintensität bei Rf auf der Referenzbahn
i <sub>r,w</sub>	Lichtintensität des Pixel bei r,w
i <sub>s,v</sub>	Lichtintensität des Pixel bei s,v
k	Hemmkonstante
K <sub>OW</sub>	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
LB	Leuchtbakterien
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometer
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumsalz
MUG	4-Methylumbelliferyl-β-D-galactopyranosid
MWL-Scan	Mehrwellenlängenscan
NADH	Nicotinamidadeninucleotid (reduzierte Form von NAD <sup>+</sup> )
NADPH	Nicotinamidadeninucleotidphosphat (Reduzierte Form von NADP <sup>+</sup> )
NTS	Non-Target-Screening
OHHL	N-(3-Oxohexanoyl)-L-homoserin lacton
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
PAK	Polycyclisch Aromatischen Kohlenwasserstoff
PCA	Hauptkomponentenanalyse
R	Referenz
r und w	Kantenlängen der Referenzfläche
Rf	Retentionsfaktor
RIAV	Reziproke iso-Aktivitätsvolumen
RIHV	Reziprokes iso-Hemmvolume
S	Probe
s und v	Kantenlängen der Probefläche
SPE	Festphasenextraktion
TBME	tertiär-Butyl-methylether
TIE	Toxicity Identification Evaluation
TLC	Dünnschichtchromatographie

---



TNB	5-Thio-2-nitrobenzoat
TOFMS	Flugzeitmassenspektrometer
US EPA	United States Environmental Protection Agency
UV/VIS	Wellenlängenbereich des ultravioletten (UV) und sichtbaren (VIS) Lichts
WBA	Wirkungsbezogen Analytik
x-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
$\beta$ -Front	Entmischungsfrent
$\Gamma_{z,j}$	Gamma-Wert der Substanzbande z der Probe j
$\lambda$	Wellenlänge

# 1 Einleitung

Unterschiedlichste organische Verbindungen anthropogenen Ursprungs, wie beispielsweise Pharmazeutika, Pestizide, Industrie- oder Haushaltschemikalien gelangen über das Abwasser, die Landwirtschaft, Altlasten oder Straßenabläufe in die Umwelt [5-9]. Durch Transformationsprozesse in der Umwelt und bei der Abwasserbehandlung wird die Anzahl der Verbindungen weiter erhöht [10, 6, 11, 12]. Diese anthropogenen Stoffe stellen eine potentielle Gefährdung für die aquatische Umwelt und damit auch für Trinkwasserressourcen dar [5, 13].

Für eine erste toxikologische Einschätzung der in einer Wasserprobe vorhandenen Stoffen wird deren Wirkung mittels verschiedener biologischer Testsystemen überprüft [14-16]. Da bei diesen Verfahren die Summenwirkung aller in den Proben vorhandenen Substanzen betrachtet wird, ist es schwierig, die detektierte Wirkung auf die tatsächlich verantwortlichen Verbindungen zurückzuführen. Nachteilig ist zudem, dass diese Testverfahren keine Strukturinformationen zu den wirksamen Verbindungen liefern. Diese sind aber notwendig, um die Herkunft der Substanzen zu ermitteln. Erst dadurch ist es möglich, gezielt Kontaminationen zu reduzieren.

Im Gegensatz dazu werden in der instrumentellen Einzelstoffanalytik die Proben gezielt auf bekannte Schadstoffe untersucht. Die Auswahl der zu untersuchenden Zielsubstanzen orientiert sich meist anhand von bekannten Wirkungen oder ihres Produktionsvolumens. Oftmals wird dazu die Gas- (GC) oder die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) mit einem Massenspektrometer (MS) gekoppelt [17, 18]. Dadurch ist es möglich, eine große Anzahl an organischen Verbindungen sehr selektiv und empfindlich zu bestimmen [19]. Häufig lassen sich viele dieser organischen Substanzen mittels HPLC-MS ohne vorherige Anreicherung direkt aus der wässrigen Probe nachweisen [20]. Doch angesichts der Menge an möglichen Verbindungen [12, 21], stößt die Einzelstoffanalytik hier rasch an ihre Grenze. Zur Erfassung der großen Anzahl an möglichen Stoffen wird, neben der Einzelstoffanalytik, das Non-Target-Screening eingesetzt [22]. Dazu wird eine HPLC, gekoppelt mit einem hochauflösenden Massenspektrometer (HRMS) eingesetzt. Das Non-Target-Screening erlaubt es, auch Substanzen zu erfassen nach denen nicht gezielt gesucht wird [23]. So konnten mit dieser Analysetechnik eine Reihe von organischen Spurenstoffen in der aquatischen Umwelt entdeckt werden [24, 25]. Einen Überblick zur Anwendung des Non-Target-Screenings geben Bletsou et al. [25], Leendert et al. [26] oder Schymanski et al. [27]. Diese physikalisch-chemische Analysenmethode liefert jedoch keine Aussage über die Wirkung der Substanzen. Auch fehlen oftmals toxikologische Daten für die identifizierten Komponenten. Wenn keine Aussage über die Wirkung einer Kontamination herangezogen werden kann, ist die

Bewertung allerdings nur schwer möglich. Daher ist der erhebliche Aufwand, der für eine Identifizierung betrieben werden muss, im Verhältnis zum Informationsgewinn in vielen Fällen unverhältnismäßig hoch.

Die Informationslücke zwischen instrumenteller organischer Spurenstoffanalytik und *in-vitro*-Bioassays wird durch die Wirkungsbezogene Analytik (WBA) geschlossen [26]. Hier wird die Probe zuerst aufgetrennt und anschließend die Wirkung der Probenbestandteile ermittelt. Dies ermöglicht eine Fokussierung bei der Identifizierung auf die wirkenden Verbindungen.

## 1.1 Wirkungsbezogene Analytik

### 1.1.1 Das Toxicity Identification Evaluation-Konzept

Ende der 1980er Jahre veröffentlichte die „United States Environmental Protection Agency“ (US EPA) Anleitungen zum sogenannten „Toxicity Identification Evaluation“-Verfahren (TIE-Verfahren) [28-30]. Das TIE-Konzept entstand mit dem Ziel, Wasserorganismen in Oberflächengewässern vor dem Einfluss von Abwässern zu schützen, indem die dort beinhaltenen toxischen Stoffe identifiziert werden [31]. Später wurde das TIE-Konzept durch Anpassungen auf Porenwasser und Sedimente erweitert [32, 33]. TIE ist ein selbständiges Verfahren zur WBA, welches den Fokus auf wässrige Proben legt und hauptsächlich mit *in vivo*-Testsystemen arbeitet [34]. Beim TIE-Konzept wird über ein Ausschlussverfahren die Ursache der Wirkung ermittelt. Die Untersuchung der Probe wird beim TIE-Verfahren in drei Phasen unterteilt:

1. Charakterisierung durch Zuordnung der Wirkung auf Substanzgruppen [30]
2. Identifizierung der für die Wirkung verantwortlichen verdächtigen Verbindungen [29]
3. Bestätigung der identifizierten Verbindung als Ursache für die Wirkung [28]

Tritt in der unveränderten Wasserprobe eine Wirkung auf, erfolgt in der ersten Phase des TIE-Verfahrens eine Vielzahl an verschiedenen parallel durchgeführten Manipulationen der Probe zur Entfernung bzw. Veränderung von Substanzgruppen mit anschließender Untersuchung der Wirkung. Die dazu notwendigen Techniken umfassen Belüftung, Festphasenextraktion (SPE) mit einem C18-Material, Zugabe von Additiven (EDTA, Zeolite, Natriumthiosulfat) und Veränderung des pH-Wertes im physiologisch tolerierbaren Bereich. Damit können die wirkenden Substanzgruppen anhand ihrer Flüchtigkeit, Polarität (C18-Eluat), ihrer Reaktivität mit EDTA (Kationische Metalle), Zeoliten (Ammonium) oder  $\text{NaS}_2\text{O}_3$  (Oxidanten) und ihrer Wirkung bei verschiedenen pH-Werten klassifiziert werden [30, 35, 36, 31, 37].

Das Vorgehen der Identifikation der wirkenden Substanzen in Phase 2 findet in Abhängigkeit von den Ergebnissen aus Phase 1 statt. Dabei kann die Phase 2 auch eine weitere Probenmanipulation mit anschließendem Wirkungstest beinhalten. Sollte sich z. B. zeigen, dass die Wirkung von Substanzen daher herrührt, dass sie durch die C18-Phase entfernt wird, ist eine weitere Fraktionierung durch Reversed-Phase HPLC sinnvoll. Nach weiteren Biotest-Untersuchungen kann dann die toxische Fraktion mittels HPLC- oder GC-MS weiteruntersucht und die verursachende(n) Substanz(en) identifiziert werden [29, 31].

In der abschließenden Phase 3 wird überprüft, ob die identifizierten Substanzen tatsächlich für die Wirkung verantwortlich sind. Die Bestätigungsversuche beinhalten unter anderem die Berechnung der Korrelation zwischen der Wirkung eines vermeintlichen Wirkstoffes in der Probe und seiner Konzentration, sowie die Bewertung der speziesabhängigen Empfindlichkeit durch Hinzufügen oder Entfernen des verdächtigen Wirkstoffes [38, 31].

### 1.1.2 Das Konzept der Wirkungsbezogenen Analytik

Die WBA ist ein integratives Untersuchungskonzept welches aus Techniken der organischen Spurenstoffanalytik und verschiedenen Biotests besteht. Für dieses Analysenkonzept sind neben dem Begriff der WBA bzw. „effect-directed analysis“ (EDA) in der Literatur auch andere Begriffe gebräuchlich, beispielsweise toxicity-directed analysis oder bioassay-directed fractionation [39].

Bei der WBA werden die Spurenstoffe aus der meist komplex zusammengesetzten Probe zuerst angereichert. Anschließend erfolgt die Fraktionierung mit einem Trennverfahren (z. B. mittels HPLC) und die Detektion mit *in vitro*-Biotests [40]. Unter dem Begriff WBA wird eine Vielzahl an verschiedenen Ansätzen zusammengefasst, doch beinhalten alle die Abfolge folgender Schritte:

1. Probenvorbereitung/-anreicherung
2. Trennung bzw. Fraktionierung
3. Untersuchung der Fraktionen auf ihre Wirkung
4. (Identifizierung)

Durch die vorangegangene Trennung werden die Matrixeffekte der anschließenden Wirkungstests reduziert. So stört z. B. elementarer Schwefel die Untersuchung der Wirkung auf *Aliivibrio fischeri* von anthropogenen Stoffen in Sedimenten [38, 41, 42].

Die Hauptzielsetzung der WBA ist es, die Wirkung einer Fraktion, im besten Fall einer Substanz, zuzuordnen. Oftmals ist nicht nur in einer Fraktion eine Wirkung detektierbar. So ergibt sich für jede Probe über die Stärke und Art der Wirkung in den einzelnen Fraktionen

ein Muster. Damit kann eine Probenahmestelle über die Zeit beobachtet werden. Auch kann ein Prozess über den Mustervergleich von Probenahmestellen, die in einem räumlichen Zusammenhang stehen, beobachtet werden.

Eine weitere Zielsetzung der WBA ist es, anhand der Wirkungsprioritäten für die Strukturaufklärung von unbekanntem Verbindungen zu setzen. Durch die Zuordnung zwischen Wirkung und Fraktion ist die Identifizierung der wirkungsauslösenden Substanz(en) wesentlich wahrscheinlicher [40, 43]. Unterstützend liefert die vorherige Trennung zusätzlich Information über die Eigenschaften der wirkenden Substanzen (z. B. den Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ( $K_{ow}$ )) [40]. Dabei ist es für die Identifizierung von Vorteil, dass schon eine erste orientierende Bewertung für die Substanz vorliegt.

Eine abschließende toxikologische Bewertung der nun bekannten Verbindungen kann mit Referenzsubstanzen erfolgen. Doch nicht immer ist es notwendig eine oftmals aufwendige Identifizierung durchzuführen. Bei bestimmten Fragestellungen ist ein Mustervergleich ausreichend.

### **1.1.3 Anreicherungs- und Fraktionierungstechniken in der Wirkungsbezogenen Analytik**

Da viele organische Spurenstoffe in sehr geringen Konzentrationen vorliegen, müssen diese für die wirkungsbezogene Detektion erst angereichert werden. Weitverbreitete Anreicherungstechniken für die WBA sind, wie auch bei der instrumentellen Analytik, die SPE und die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE). Für die Fraktionierung werden bei den verschiedenen WBA-Ansätzen unterschiedliche Trenntechniken ausgewählt.

#### ***Anreicherung und Fraktionierung mittels Festphasenextraktion***

Der Ansatz der sequentiellen Elution beruht auf dem unterschiedlichen Elutionsverhalten von Substanzen. Hier erfolgt nach der Anreicherung, die Elution der Substanzen durch eine Abfolge von verschiedenen Lösemitteln mit zunehmender Elutionskraft, wobei die verschiedenen Eluate jeweils separat gesammelt werden [44-46].

Ein anderer Ansatz beruht auf dem unterschiedlichen Extraktionsverhalten der Substanzen auf verschiedenen SPE-Materialien. Hier erfolgt die Extraktion der Substanzen mit verschiedenen SPE-Materialien. Im ersten Schritt findet die Extraktion der unpolaren Substanzen auf einem C18-Material statt, dazu wird die Probe auf pH 7 eingestellt. Auf der anschließenden Polystyrol-divinylbenzol-Phase werden die etwas polareren Verbindungen angereichert [47-49]. Damit sich auch die sauren Verbindungen erfassen lassen, wird das Eluat angesäuert und wieder mit einer Polystyrol-divinylbenzol-Phase extrahiert [47].

Es gibt auch Kombinationen der beiden Ansätze [50, 51]. Beim Ansatz von Faber und Bierl [51] wird ein Teil der Probe mit einer C18-Phase extrahiert. Parallel dazu erfolgt die Anreicherung über die Reihenschaltung zweier SPE-Kartuschen. Die erste Kartusche enthält eine Polymerphase und die zweite eine Mischung aus einem schwachen Anionen- und einem starken Kationenaustauscher. Eluiert wird die C18-Phase mit einem Gemisch aus n-Hexan und Dichlormethan. Für die parallel durchgeführte sequentielle SPE werden aus der Polymerphase zwei Fraktionen gewonnen. Eine durch die Elution mit Ethylacetat und die andere durch die Elution mit Methanol. Die Mischphasen-SPE aus den beiden Ionenaustauscher-Materialien wird nacheinander zuerst mit einem Gemisch aus Methanol, Ethylacetat und Ameisensäure und danach mit Methanol, Ethylacetat und Ammoniak eluiert. Die beiden Eluate werden dann miteinander zu einer Fraktion vereint. Durch diese Prozedur wird die Probe in vier Fraktionen aufgetrennt.

### ***Säulenchromatographische Fraktionierung***

In der WBA sind chromatographische Trennverfahren weitverbreitet. Besonders bei der Kopplung der HPLC mit biologischen Testsystemen fand aufgrund ihrer hohen Trennleistung und weitgehender Automatisierung viel Entwicklungsarbeit statt. Hier werden besonders zwei Strategien verfolgt. Zum einen die Offline-Detektion, bei der die Fraktionen aufgefangen und danach einem Biotest zugeführt werden [45]. Zum anderen die Online-Detektion direkt nach der HPLC-Trennung. Der größte Nachteil der HPLC für die WBA ist die Verwendung von organischen Lösemitteln, die häufig in den anschließenden Biotests störend wirken. Daher muss für die Offline-Detektion nach der HPLC-Trennung ein Lösemittelwechsel vorgenommen werden. Bei der Offline-Detektion ist zu beachten, dass hierbei die Erfassung der Wirkung über das Chromatogramm diskret erfolgt. Dabei kann es passieren, dass getrennte bzw. angetrennte Substanzen, mit jeweils einer Wirkung, wieder zusammen erfasst werden und die ursprüngliche chromatographische Auflösung damit verloren geht. Die Fraktionierung kann ereignis- oder zeitabhängig erfolgen. Am gebräuchlichsten ist eine zeitabhängige Fraktionierung mit konstanten Zeitfenstern, da von der Größe des physikalischen Signals nicht unbedingt auf die Wirkung geschlossen werden kann.

Neben der Automatisierung soll der Nachteil der diskreten Fraktionierung bei der Online-Detektion umgangen werden. Doch muss hier die Verträglichkeit der organischen Lösemittel und der Zusätze zuvor abklärt werden. Daher ist die Trennung meist nur mit einem begrenzten organischen Lösemittelanteil möglich. Auch ist die schnelle Trennung oftmals für die Online-Detektion nachteilig, da viele Biotests eine längere Inkubationszeit benötigen bis sie auf die Substanzen reagieren. Daher gibt es nur wenige echte HPLC-Online-WBA-Verfahren, meist handelt es sich dabei um schnell reagierende Enzym-Hemmtests, wie beispielsweise

den Acetylcholinesterase-Hemmtest [52-54] oder die Protease Cathepsin B [55]. Doch auch für das Leuchtbakterium *Aliivibrio fischeri* wurde ein Online-System vorgestellt [56], da hier die Wirkung durch die Veränderung der Biolumineszenz schnell detektiert werden kann. Auch bei diesen Tests ist eine obere Grenze des organischen Lösemittelanteils zu beachten.

Nicht so verbreitet wie die HPLC ist die Größenausschlusschromatographie (GPC) in der WBA. Gründe dafür dürften die geringe Trennleistung und der starke Verdünnungseffekt der Extrakte sein. Doch können mit dieser Technik z.B. Lipide oder elementarer Schwefel aus den gewonnenen Extrakte entfernt werden [57]. Zweckmäßig ist der Einsatz der GPC bei der Untersuchung von Abwasserproben [58]. Eingebunden in eine Fraktionierungsabfolge bestehend aus Ultrafiltration, GPC und einer zweistufigen SPE bei pH 3 und 7, zeigte die GPC ihre Stärke zur Reduzierung der Matrixbelastung für die SPE. Außerdem wurde durch die anschließende SPE der Nachteil des Verdünnungseffektes aufgehoben [59].

### ***Dünnschichtchromatographische Fraktionierung***

Im Gegensatz zur HPLC, handelt es sich bei der HPTLC um ein offenes Trennsystem. Die Erfassung der aufgetrennten Substanzen erfolgt anhand der Lage der Substanzen auf der stationären Phase. Die Trennleistung der HPTLC ist zwar nicht so hoch wie die der HPLC, doch da hier die Substanzen nach der Trennung lösemittelfrei auf der HPTLC-Platte vorliegen, haben die angewendeten Fließmittel keinen Einfluss auf den anschließenden Biotest. Daher ist es möglich, die wirkungsbezogene Detektion direkt auf der Platte durchzuführen. Des Weiteren besitzt die HPTLC eine hohe Matrixtoleranz [60]. Da bei der Auftragung das Lösemittel entfernt wird, und somit keinen Einfluss auf die Chromatographie hat, ist es auch möglich, das Auftragevolumen über einen großen Bereich zu variieren. Die parallele Chromatographie von mehreren Proben erlaubt eine schnelle Untersuchung vieler Proben [61]. Auch werden Störungen dadurch reduziert, dass für jeden Analysendurchgang eine neue Platte verwendet wird. Da es sich um ein offenes Trennsystem handelt, werden auch nicht chromatographierbare Substanzen erfasst. Zudem besitzt die HPTLC eine sehr hohe Flexibilität bei der Wahl der Detektionstechnik, ohne dass ein aufwendiges Umrüsten stattfinden muss [62, 63]. Doch ist die HPTLC-Kopplung mit Biotests, besonders bei Testsystemen mit einer Bandenverbreiterung, eine besondere Herausforderung. Außerdem können mit der HPTLC keine leichtflüchtigen Verbindungen detektiert werden. Die bisher nicht vollständige Automatisierung von der Probenaufgabe bis zur Detektion ist im Moment noch ein Hindernis für den Einsatz in der Routineanalytik.

## 1.2 WBA mit der HPTLC

Bei der HPTLC mit WBA wird zwischen Bioautographie und biochemischer Detektion unterschieden. Neben diesen beiden Gruppen wird oftmals noch der Nachweis von spezifischen chemischen Eigenschaften zu den WBA-Methoden gezählt. Im engeren Sinne handelt es sich dabei nicht um Wirkungstests, da hierbei aufgrund einer chemischen Eigenschaft auf eine Wirkung geschlossen wird. Eine Übersicht zu den unterschiedlichen HPTLC-WBA-Techniken zeigt Tabelle 1-1.

**Tabelle 1-1: Übersicht der verschiedenen HPTLC-WBA-Techniken.**

HPTLC-WBA-Technik	Untergruppe	Testsystem (Beispiele)	Lit. (Beispiel)
Bioautographie	Diffusion (Kontakt)	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus</i>	[64, 65]
	Überschichtung	<i>Bacillus subtilis</i>	[66, 67]
	Direkt	<i>Aliivibrio fischeri</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	[68, 69]
Biochemische Detektion	Enzym-Hemmung	Acetylcholinesterase	[70]
	Immunostaining	Anti-Glycosphingolipid Antikörper	[71]
Spezifische chemische Eigenschaft	-	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazol radical	[72]

### 1.2.1 Bioautographie

In der Bioautographie erfolgt die Detektion der Wirkung mittels Mikroorganismen. Je nachdem, wie die Organismen mit den auf der HPTLC-Platte getrennten Substanzen in Kontakt gebracht werden, wird die Bioautographie wiederum in Agar-Diffusions-Bioautographie, Agar-Überschichtungs-Bioautographie und Direkt-Bioautographie unterteilt [73, 74].

Für die Agar-Diffusions-Bioautographie wird die stationäre Phase auf die Oberfläche eines mit dem ausgewählten Mikroorganismus angeimpften Agar aufgelegt. Nach einer gewissen Zeit diffundieren die Substanzen von der HPTLC-Platte zum Agar. Nach dem Abheben der Platte und einer weiteren Inkubationsphase erfolgt die Detektion der Wirkung [75, 65, 76]. Ein großes Problem bei dieser Technik ist, dass die Diffusion in den Agar von der Polarität der Substanzen abhängig ist. Daher wird sie heute kaum noch angewendet.

Bei der Agar-Überschichtungs-Bioautographie wird die Platte entweder in das Agarmedium getaucht oder mit einer Agarschicht bedeckt. Die Agarschicht härtet dann auf der stationären Phase aus. In beiden Fällen ist auch hier der Agar bereits angeimpft. Während der Inkubati-



onsphase und der Detektion bleibt die Agarschicht auf der Platte [66]. Auch hier besteht das Problem der Abhängigkeit von der Polarität der Probenkomponenten.

Für die Direkt-Bioautographie (DB) wird die Platte in eine Suspension des gewählten Mikroorganismus mit der notwendigen Nähr-Bouillon getaucht [77]. Die Inkubation erfolgt in einer feuchten Atmosphäre. Damit wird das Eintrocknen des Nährmediums auf der Platte verhindert. Für einige Bakterien bzw. Pilze wurden die Wachstumsbedingungen für die TLC-DB optimiert [78-82]. Bei der DB muss überprüft werden, ob die Mikroorganismen durch die stationäre Phase gehemmt werden.

### **1.2.2 Biochemische Detektion**

Neben den bioautographischen Methoden kann bei der HPTLC-WBA die Erfassung der Wirkung auch über biochemische Detektionstechniken erfolgen. Bei der Detektion von enzymhemmenden Substanzen wird nach der Chromatographie eine Enzymlösung auf die Platte aufgebracht. Nach einer bestimmten Inkubationszeit erfolgt die Visualisierung der Hemmung mittels eines Substrates, welches von dem ausgewählten Enzym meist zu einer farbigen Verbindung umgesetzt wird. Zu beachten ist, dass die Enzyme in Kombination mit einem Puffer auf die Platte aufgebracht werden sollten, damit das pH-Optimum des Enzyms erreicht wird. Um den Umsatzes des Substrats zu einer bestimmten Zeit zu stoppen, wird die HPTLC-Platte oftmals kurz auf einer Heizplatte erhitzt [83].

Mit der von Magnani et al. [84] eingeführten TLC-Immunostaining-Technik können nach der Trennung verschiedene steroidale Alkaloidglycoside [85], Glycosphingolipide [86, 87], Ganglioside [88, 89] oder Antiphospholipid-Antikörper [90-93] durch spezifisch bindende Liganden detektiert werden. Die Untersuchung erfolgt nach dem bekannten Prinzip des Enzymgekoppelten Immunadsorptionsverfahrens (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Als Liganden dienen hierbei Proteine wie Antikörper und Toxine sowie spezifisch bindende Viren und Bakterien. Im ersten Schritt binden die Liganden an die passenden Gegenstücke. Im Falle von Toxinen, Viren und Bakterien erfolgt im nächsten Schritt eine Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern. An die gebundenen Antikörper binden im darauf folgenden Schritt nun mit einem Enzym markierte sekundäre Antikörper. Die Enzyme setzen anschließend ein Substrat in einen Farbstoff um [94]. Zu beachten ist, dass bei HPTLC-Immunostaining zwischen den beschriebenen Schritten immer eine Inkubationsphase und ein Waschschrift stehen. Dabei kann sich das Kieselgel von dem Trägermaterial lösen, deshalb wird dieses vor dem Immunostaining meist mit Polyisobutylmethacrylat fixiert. Eine detaillierte Beschreibung zum HPTLC-Immunostaining findet sich bei Meisen et al. [94] und Conti et al. [95].

### 1.2.3 Detektion spezifischer chemischer Eigenschaften

Weiterhin gibt es Tests, bei denen man aufgrund einer chemischen Reaktion auf eine biologische Wirkung schließt. Diese Tests werden vorwiegend bei der Untersuchung der Eigenschaften von Pflanzeninhaltsstoffen angewendet.

Zur Detektion von sogenannten Antioxidantien in Produkten auf pflanzlicher Basis wird das Ausbleichen von  $\beta$ -Carotin bestimmt. Dabei erscheinen Substanzen mit einer „antioxidativen Wirkung“ nach dem Aussetzen im Sonnenlicht oder unter UV-Licht bei 366 nm als orange-farbige Zone vor einem hellen Hintergrund [96-98].

Ob Substanzen Radikale einfangen können, wird mit Hilfe der stabilen Radikale 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazol-Radikal (DPPH) oder 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonicacid-Radikal (ABTS) getestet. Im Falle von DPPH erscheinen die Radikal fangenden Substanzen als gelbe bis weiße Zonen vor einem violettfarbigen Hintergrund [99, 100, 72]. Wird ABTS eingesetzt, erscheinen diese als pinke bis weiße Zonen vor einem grünen Hintergrund [101].

### 1.2.4 Anwendungen in der Umweltanalytik

Da die HPTLC aufgrund ihrer Vorteile bei Untersuchungen von komplexen Matrices, wie z. B. von Pflanzenextrakten, eine weit verbreitete Analysentechnik ist [102, 103], finden sich in der Literatur viele Anwendungen der HPTLC-WBA aus diesem Bereich [104, 2]. Doch auch für die Untersuchung von verschiedenen Umweltproben sind einige Anwendungen beschrieben (Tabelle 1-2).

**Tabelle 1-2: Zusammenstellung von Anwendungen der HPTLC-WBA mit verschiedenen Bioassays zur Untersuchung von Umweltproben.**

Matrix	Endpunkt	Bioassay	Lit.
Abwasser	Biolumineszenzhemmung	<i>Aliivibrio fischeri</i>	[105-108]
	Endokrine Wirkung	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BJ3505	[109, 110]
Oberflächenwasser	Biolumineszenzhemmung	<i>Aliivibrio fischeri</i>	[111, 107]
	Antibakterielle Wirkung	<i>Bacillus subtilis</i>	[107]
	Fungizide Wirkung	<i>Penicillium spec.</i>	[107]

<b>Matrix</b>	<b>Endpunkt</b>	<b>Bioassay</b>	<b>Lit.</b>
	Neurotoxizität	Acetylcholinesterase	[107]
Deponiesickerwasser	Biolumineszenzhemmung	<i>Aliivibrio fischeri</i>	[111]
	Endokrine Wirkung	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BJ3505	[109, 112]
Sedimente	Photosynthese Hemmer	Bohnenblätterchloroplasten	[113]
	Fungizide Wirkung	<i>Phytophthora boehmeriae</i>	[114]

## 2 Zielsetzung

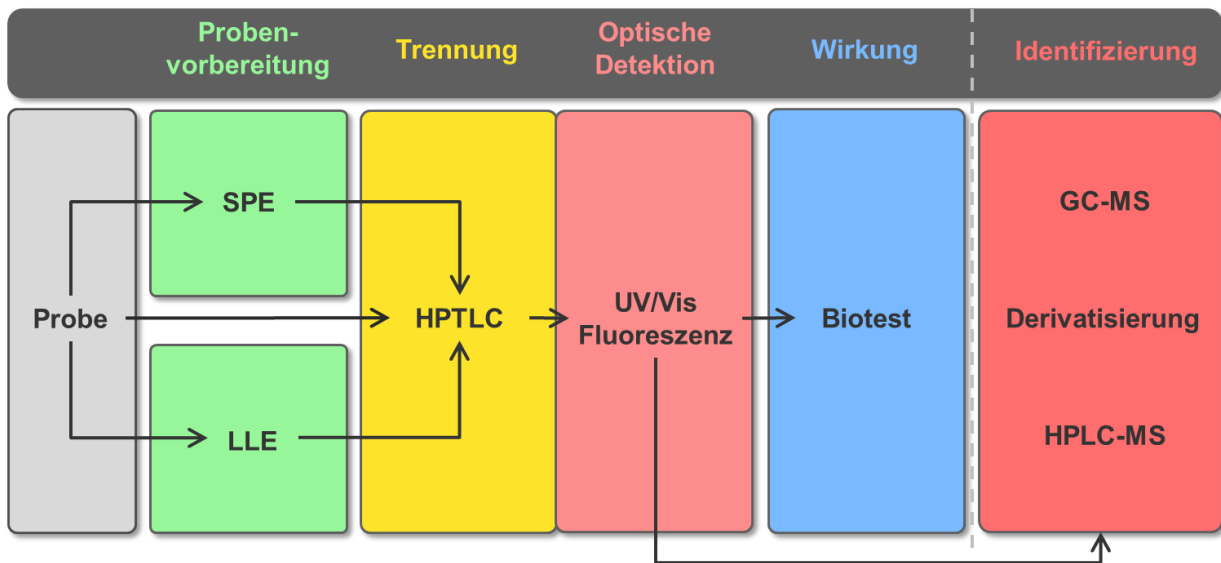
Auch wenn TIE viele Ähnlichkeiten zur WBA besitzt, so gibt es doch einige Unterschiede zwischen den beiden Herangehensweisen. So wird bei TIE die Ursache für die Wirkung im Ausschlussprinzip durch Entfernung von Probenbestandteilen bestimmt, während bei der WBA die Wirkung für die einzelnen Fraktionen erfasst wird. Auch liegt der Schwerpunkt der WBA auf organischen Verbindungen, während beim TIE auch anorganische toxische Substanzen erfasst werden. Durch die Fokussierung auf organische Substanzen stehen der WBA weitentwickelte Trenntechniken zur Verfügung. Des Weiteren erfolgt bei dem TIE-Konzept die Erfassung der Wirkung hauptsächlich mit *in vivo*-Testsystemen und in der WBA mit *in vitro*-Biotests. Doch werden *in vitro*-Tests mit höheren Lebewesen, z. B. Fische, aus tierschutzrechtlichen Gründen kritisch gesehen. Durch die Anwendung von *in vitro*-Tests wird bei der WBA oftmals eine spezifische Wirkung detektiert, wobei auf die Bioverfügbarkeit der Substanzen häufig keine Rücksicht genommen wird. Im TIE ist die erfasste Wirkung weniger spezifisch, doch ist die Aussage zur ökologischen Relevanz der Toxizität höher einzuordnen [37].

Das WBA-Konzept könnte das TIE-Verfahren in der TIE-Phase 2 ergänzen. Besonders wenn in der TIE-Phase 1 organische Verbindungen als Ursache für die Wirkung erkannt wurden, könnte die WBA mit ihren Fraktionierungstechniken und spezifischen *in vitro*-Tests das TIE-Verfahren vervollständigen [37]. Doch da bei der WBA hauptsächlich mit Extrakten aus organischen Lösemitteln gearbeitet wird und damit die Bioverfügbarkeit nicht beachtet wird, gilt es als schwierig, die Ergebnisse der *in vitro*-Tests mit den Ergebnissen der *in vivo*-Tests in Beziehung zu setzen. Dies betrifft besonders die Untersuchungen von Sedimenten [37]. Auch sind die *in vitro*-Tests oftmals sensitiver als Tests mit lebenden Organismen [37].

Da die WBA mit den in der organischen Spurenstoffanalytik etablierten chromatographischen Trenntechniken arbeitet und die eingesetzten *in vitro*-Tests neben der hohen Sensitivität auch spezifische Endpunkte besitzen, soll in dieser Arbeit ein WBA-Konzept erarbeitet und optimiert werden. Auch die einfachere Handhabung von *in vitro* Tests im Vergleich zu höheren Organismen spricht für den Einsatz der WBA im Labor eines Trinkwasserversorgers. Zudem kann mit der WBA, im Gegensatz zum TIE, ein hoher Probendurchsatz erreicht werden.

Als Trennmethode wurde die HPTLC gewählt, da bei dieser die Substanzen nach der Trennung lösemittelfrei vorliegen. Dies erlaubt die direkte Anwendung von *in vitro* Testsystemen auf der Platte und erspart den Arbeitsschritt des Umlösens von Fraktionen, wie es nach einer HPLC-Fraktionierung erfolgen müsste. Die zu entwickelnde Trennmethode soll Substanzen über einen weiten Polaritätsbereich trennen. In Abb. 2-1 ist das Konzept der WBA mit der

HPTLC dargestellt. Dieses Konzept soll eine effektive Überwachung von verschiedenen Wässern anhand der Ermittlung von Exposition (Konzentrationen der Spurenstoffe) und Wirkung (Reaktion eines biologischen Systems) ermöglichen. In dieser Arbeit sollen die verschiedenen Teilschritte der WBA mit der HPTLC optimiert und aufeinander abgestimmt werden. Ziel ist es die in der Literatur beschriebenen Ansätze zur praktischen Anwendungsreife zu bringen und deren Grenzen zu ermitteln. Zudem sollen auch standardisierte Testprotokolle für die Übertragung von ausgewählten *in vitro*-Testsystemen auf die HPTLC-Platte erstellt werden.



**Abb. 2-1: Konzept der Wirkungsbezogenen Analytik mit der HPTLC.**

Da die meisten Analyten für die Detektion in nicht ausreichenden Konzentrationen vorliegen, sollen diese während eines Probenvorbereitungsschritts angereichert werden. Eine bewährte Anreicherungstechnik stellt die SPE dar. Es soll eine SPE-Methode entwickelt werden mit der sich Substanzen über einen weiten Polaritätsbereich mit einer ausreichenden Wiederfindung anreichern lassen. Zusätzlich soll der mögliche Einsatz der LLE in der WBA geprüft werden. Es ist vorstellbar, dass sich, durch Ausnutzung der Mischungslücke, polare Verbindungen in der organischen Phase anreichern lassen.

Die Kombination von Biotestsystemen mit der HPTLC ist eine der zentralen Aufgaben dieser Arbeit. Die Testsysteme unterscheiden sich unter anderem anhand der benötigten Inkubationszeit bis der entsprechende Endpunkt detektiert werden kann (Tabelle 2-1). Da die Testsysteme in wässrigen Medien ablaufen, vergrößern sich Substanzzonen mit fortschreitender Inkubationszeit auf der Kieselgelschicht (Normalphase). Das Verhindern dieser Zonenvergrößerung aufgrund der benötigten Inkubationszeit soll Bestandteil der Arbeit sein.

Tabelle 2-1: Einteilung von *in vitro* Assays anhand ihrer Inkubationszeit.

Minimale Inkubationszeit ≤ 30 min			Minimale Inkubationszeit > 30 min		
Test	Endpunkt	TLC Erfahrung	Test	Endpunkt	TLC Erfahrung
Leuchtbakterien	Basistoxizität	[68, 115, 49]	<i>Bacillus subtilis</i>	Antibiotische Wirkung	[69, 116]
Acetylcholinesterase	Neurotoxische Wirkung	[117-119]	YES	Östrogene Wirkung	[120]
Urease	Nitrifikationshemmung	[121]	Ames	Mutagene Wirkung	[122]
			Mutatox	Mutagene Wirkung	
			umu	Gentoxische Wirkung	[3]
			Chloroplasten	Herbizide Wirkung (Photosynthesehemmung)	[123, 113]

Bei der Auswahl der zu untersuchenden Biotests sind solche bei der Übertragung auf die HPTLC-Platte zu bevorzugen, welche eine gewisse Relevanz für einen Wasserversorger besitzen. Dabei gibt es bei den in Tabelle 2-1 genannten Tests, mit Ausnahme des Mutatox-Tests, erste Erfahrungen in der Kombination mit der HPTLC.

In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um eine Anwendung für spezielle Matrices mit dem Schwerpunkt der Detektion auf der Dünnschichtplatte und der dadurch erreichbaren Empfindlichkeitssteigerung im Vergleich zu klassischen Verfahren. Die Kombination des Tests mit dem Ziel der Beibehaltung der erreichten Trennleistung der HPTLC ist in den Publikationen nur von untergeordneter Bedeutung. Für eine Routineanwendung im Wasserbereich lagen nahezu keine Erfahrungen vor.

Exemplarisch sollen jeweils zwei Tests mit einer kurzen und einer langen Inkubationszeit bearbeitet werden. Es ist denkbar, dass die bei diesen Tests optimierten Techniken auf andere Tests mit einer ähnlichen Inkubationszeit, bis auf wenigen Abänderungen, zu übertragen sind.

Als Tests mit einer kurzen Inkubationszeit wurden der Leuchtbakterientest und als schnell reagierender Enzymtest der Acetylcholinesterase-Hemmtest ausgewählt. Die Biolumineszenz des Leuchtbakteriums *Aliivibrio fischeri* ist direkt an dessen Stoffwechsel gekoppelt. Eine Beeinflussung des Stoffwechsels kann daher sehr schnell anhand der Veränderung der Biolumineszenz erkannt werden. Die erfasste Biolumineszenzhemmung gilt als unspezifisch

und ist daher geeignet, um die Belastung einer Probe anhand der Basistoxizität abzuschätzen. Zudem ist der Leuchtbakterienhemmtest in der Küvette ein genormtes Verfahren. Die Acetylcholinesterase-Hemmung ist ein spezifischer Endpunkt zur Erfassung von neurotoxischen Wirkungen und hat daher humantoxikologische Bedeutung. Dieser Test ist ebenso ein als Küvettentest genormtes Verfahren.

Als Vertreter von Tests mit einer längeren Inkubationszeit wurden der *Bacillus subtilis* und der umu-Test ausgewählt. Mit dem *Bacillus subtilis*-Test werden antibiotisch wirkende Verbindungen detektiert. Zudem ist *Bacillus subtilis* ein gram-positives Bakterium, während das zur Biolumineszenz befähigte Bakterium *Aliivibrio fischeri* gram-negativ ist. Außerdem ist die Detektion des Endpunkts weniger komplex als bei den anderen Tests, so dass mit diesem erste Erfahrungen mit der längeren Inkubationszeit gesammelt werden können. Der Endpunkt beim umu-Test ist die potentielle Gentoxizität von Substanzen. Die Gentoxizität ist Grundlage für die Bewertung und Festlegung von Grenzwerten für das Trinkwasser (Konzept des Gesundheitlichen Orientierungswert, GOW [124]). Auch die summarische Erfassung der Gentoxizität mittels des umu-tests in der Küvette bzw. Mikrotiterplatte ist genormt.

Der YES-Test auf östrogene Wirkung in Kombination mit der HPTLC wird von A. Schönborn (Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften, Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen, Zürich, Schweiz) in Zusammenarbeit mit G. Reifferscheid (Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz, Deutschland) weiterentwickelt. Um Doppelarbeit zu vermeiden soll in dieser Arbeit auf die Weiterentwicklung des Tests verzichtet werden.

Ebenso wird die Entwicklung eines HPTLC-AMES-Tests als nicht durchführbar angesehen, da die Literatur zeigte, dass es schwierig ist, die TLC-Bande auf die verwendete Agar-Agar-Schicht zu übertragen [122]. Außerdem ist die Inkubationszeit mit 3 Tagen sehr lang [122] und es entsteht eine große Bandendiffusion, die eine Zuordnung der detektierten potenziellen Mutagenität zu einer Substanz stark erschwert. Da mit dem Mutatox-Test schlechte Erfahrungen gemacht wurden [125], soll dieser Test ebenfalls nicht auf die TLC-Platte übertragen werden.

Des Weiteren fehlen bislang Auswerteverfahren zur Ermittlung der Stärke der Wirkung von Proben auf das Testsystem für die Kombination von HPTLC und Wirkungstests. Diese sollen entwickelt und auf ihre Grenzen getestet werden.

Bei der Identifizierung von Substanzen handelt es sich um einen oftmals aufwendigen und langwierigen Prozess. Anhand der Wirkung ist es möglich, die Stoffe zu priorisieren, welche zuerst diesem Prozess unterworfen werden sollen. Wenn hierfür ein hochauflösendes Massenspektrometer zur Verfügung steht, lässt sich zumeist eine Summenformel ermitteln. Doch

für diese gibt es häufig eine Vielzahl an möglichen Strukturen. Die Interpretation eines MS/MS-Experiments gestaltet sich oftmals als schwierig. In dieser Arbeit soll ermittelt werden in welcher Form bereits bekannte spezifische Derivatisierungsreaktionen die Identifizierung mittels Massenspektrometrie unterstützen können.

### 3 Entwicklung von Auswertemethoden für die HPTLC-WBA

#### 3.1 Auswertung der Biolumineszenzhemmung von *Aliivibrio fischeri*

##### 3.1.1 Ermittlung der Biolumineszenzhemmung

Anhand einer Aufnahme mittels einer gekühlten CCD-Kamera wird die Biolumineszenz von *Aliivibrio fischeri* auf der HPTLC-Platte detektiert. Hemmende Substanzen erscheinen im Bild als dunkle Banden vor einem hellen Hintergrund. Damit die Biolumineszenzhemmung nicht nur qualitativ anhand von Bildern miteinander vergleichbar bleibt, ist ein Bildauswerteverfahren notwendig. In dem hier vorgestellten Ansatz wird das Auswerteverfahren des Küvetten-tests auf den HPTLC-Test übertragen [126]. Beim Küvettentest wird die Lichtintensität von der Referenz ( $I_R$ ) und Probe ( $I_P$ ) bestimmt und daraus die Hemmung ( $Inh$ ) nach Gleichung 3-1 berechnet.

$$Inh = \frac{I_R - I_P}{I_R} \cdot 100 \% \text{ Gleichung 3-1}$$

Beim HPTLC-Biolumineszenzhemmtest werden die unterschiedlichen Lichtintensitäten auf der Platte in einem 8 bit Graustufenbild erfasst. Dabei werden die unterschiedlichen Lichtintensitäten mittels Graustufen in 256 Abstufungen von Schwarz (0) bis Weiß (255) dargestellt. Voraussetzung des Transfers der Berechnung der Biolumineszenzhemmung vom Küvettentest auf die Bildaufnahme von der HPTLC-Platte ist, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Lichtintensität und den resultierenden Graustufen besteht. Zur Überprüfung dieses Zusammenhangs wurden Graugläser, die der Überprüfung von Photometern dienen, eingesetzt. Diese Graugläser wurden auf den Objektträger, mit der darin enthaltenen HPTLC-Leuchtbakterienplatte, gelegt und ein Bild von der Abschwächung der Biolumineszenz aufgenommen (Abb. 3-1).

Damit sich die Hemmung analog zu Gleichung 3-1 auswerten lässt, ist es notwendig für die Hemmfläche  $s \cdot v$  den Mittelwert der Graustufen der Pixel (Leuchtintensitäten,  $I_P$ ) zu ermitteln (Gleichung 3-2). Für die Referenzzonen, links und rechts von der Hemmzone, wird der Mit-



telwert der Graustufen über beide Flächen ermittelt (Gleichung 3-3 und Gleichung 3-4). Mit diesen Werten lässt sich die Hemmung der Hemmzone ( $Inh_z$ ) nach Gleichung 3-5 berechnen.

$$I_P = \frac{\sum_{\text{Referenzfläche}} i_{s,v}}{s*v} \quad \text{Gleichung 3-2}$$

$$I_R = \frac{\sum_{\text{Probenfläche}} i_{r,w}}{r*w} \quad \text{Gleichung 3-3}$$

$$\bar{I}_R = \frac{I_{R1} + I_{R2}}{2} \quad \text{Gleichung 3-4}$$

$$Inh_z = 1 - \frac{I_P}{\bar{I}_R} \quad \text{Gleichung 3-5}$$

Mit:  $I_P$  bzw.  $I_R$ : Lichtintensität der Probefläche bzw. Referenzfläche,  $s$  und  $v$  bzw.  $r$  und  $w$ : Kantenlängen der Probefläche bzw. Referenzfläche,  $i_{s,v}$ : Lichtintensität des Pixel bei  $s,v$ ,  $i_{r,w}$ : Lichtintensität des Pixel bei  $r,w$   $Inh_z$ : Hemmung der Probefläche.

Durch die Analogie der Bestimmung der Hemmung und der Absorption über die Lichtintensitäten, ist es möglich die Hemmwerte in einen Absorptionswert umzurechnen. Dies gelingt durch Einsetzen der Gleichung 3-6 in Gleichung 3-5. Die sich daraus ergebende Gleichung 3-7 ermöglicht die Berechnung der Absorption durch die Graugläser anhand der ermittelten Hemmwerte.

$$Abs = \lg \frac{1}{T} = \frac{I_R}{I_P} \quad \text{(Gleichung 3-6)}$$

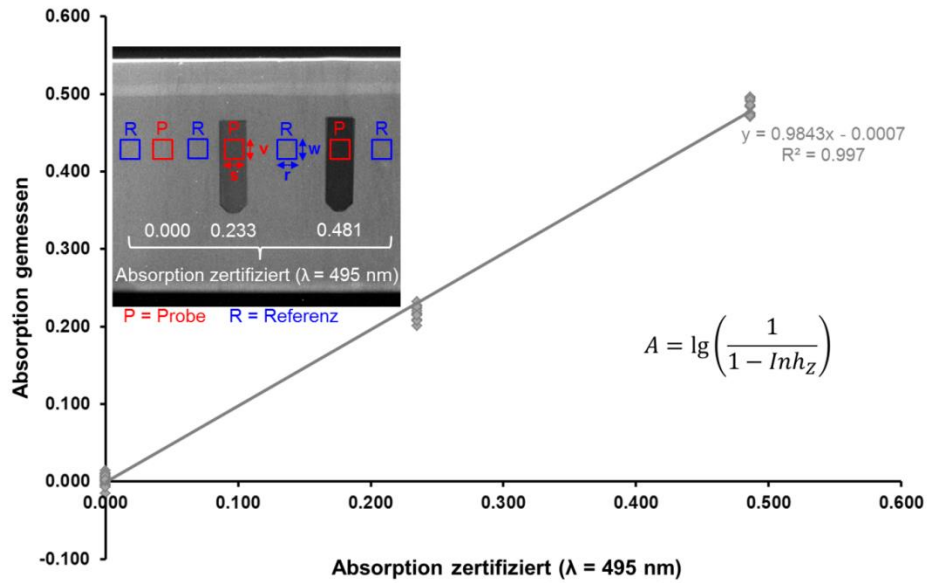
$$Inh_z = 1 - \frac{I_P}{\bar{I}_R} = 1 - T \quad \text{(Gleichung 3-5)}$$

$$\lg T = \lg(1 - Inh_z) \quad \text{(Gleichung 3-6 in Gleichung 3-5)}$$

$$Abs = \lg \left( \frac{1}{1 - Inh_z} \right) \quad \text{(Gleichung 3-7)}$$

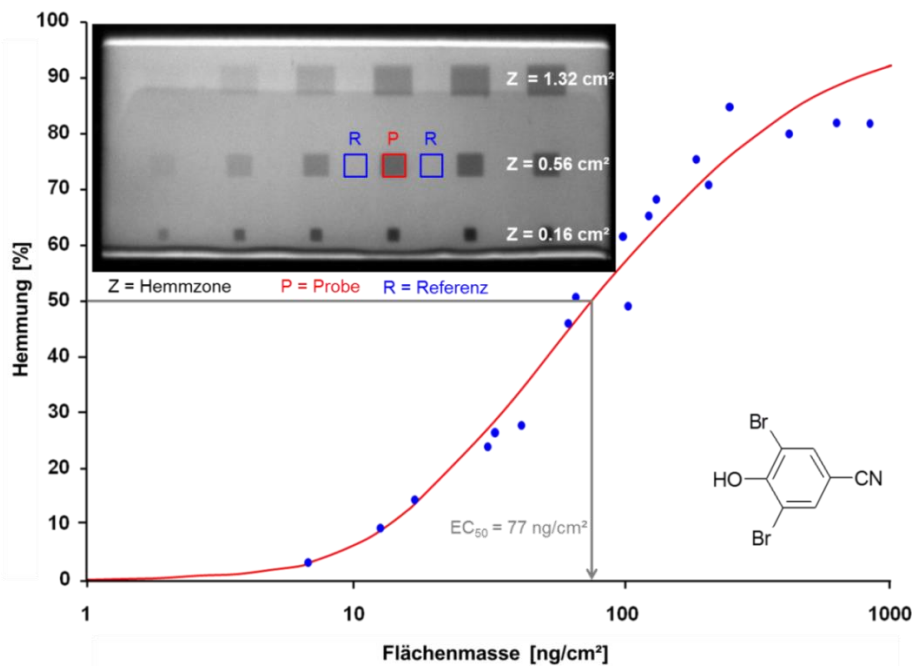
Mit:  $Abs$ : Absorption,  $T$  = Transmission  $Inh_z$ : Hemmung der Probefläche.,  $I_P$  bzw.  $I_R$ : Lichtintensität der Probefläche bzw. Referenzfläche.

Die berechneten Absorptionswerte werden gegen die zertifizierte Absorption bei  $\lambda = 495$  nm abgetragen (Abb. 3-1). 495 nm ist die zertifizierte Absorptionswellenlänge für die Graugläser, welche am nächsten an der Wellenlänge des Emissionsmaximums von *Aliivibrio fischeri* ( $\lambda_{em} = 490$  nm [127]) liegt. Für alle drei Absorptionswerte wurde die Messung zwölfmal wiederholt. Die Annäherung an die Winkelhalbierende zeigt, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Lichtintensität und den Graustufen des aufgenommenen Bild existiert.



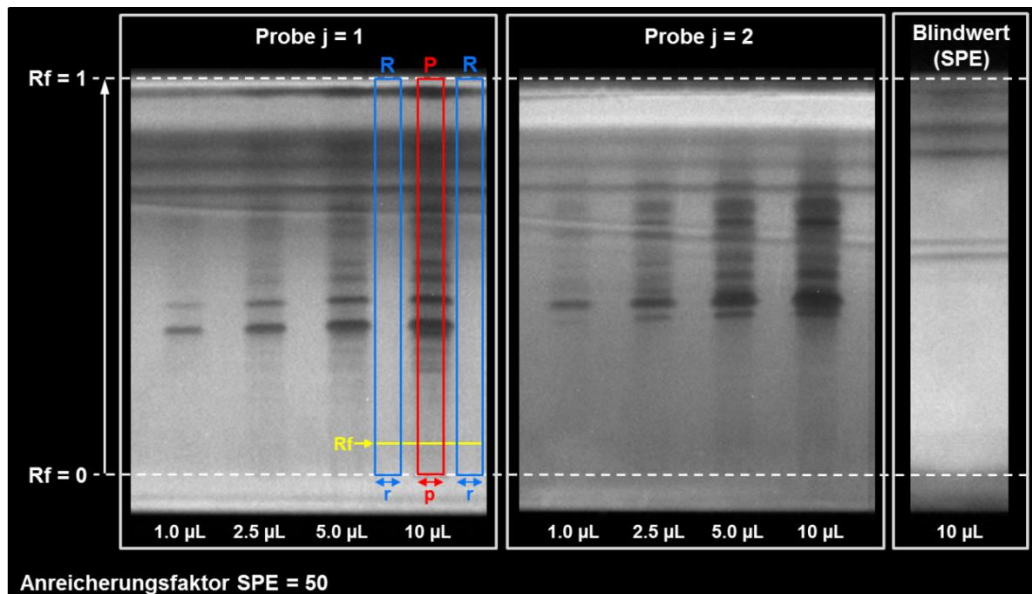
**Abb. 3-1: Bestätigung des linearen Zusammenhangs zwischen der Lichtintensität und den Graustufen des digitalen Fotos anhand der zertifizierten Absorption von Graugläsern.**

Das gleiche Prinzip der Auswertung kann angewendet werden, um die Wirkung auf *Aliivibrio fischeri* von flächenhaft aufgetragenen Substanzen zu ermitteln. Wenn unterschiedliche Mengen aufgetragen werden, lässt sich für diese Substanz eine Dosis-Wirkungsbeziehung aus dem Foto generieren. In Abb. 3-2 ist die aus der Biolumineszenzaufnahme ermittelte Dosis-Wirkungsbeziehung für Bromoxynil gezeigt. Abgetragen werden hierbei die Flächenmasse gegen die Hemmung.



**Abb. 3-2: Dosis-Wirkungsbeziehung der Biolumineszenzhemmung von *Aliivibrio fischeri* für Bromoxynil.**

Damit auch die Biolumineszenz-Hemmung von einer Probe über die Laufstrecke nach Entwicklung bestimmt werden kann, ist eine Anpassung der beschriebenen Auswertemethode notwendig. Dies soll anhand von SPE-Extrakten von Grundwässern gezeigt werden, die von einem Altlastenstandort stammen. Von diesen Extrakten wurden jeweils vier verschiedene Aliquoten aufgetragen und mit dem HPTLC/AMD-Gradienten 2 entwickelt. Abb. 3-3 zeigt die Aufnahmen der Biolumineszenz nach einer Inkubationszeit von 10 min der beiden Proben  $j = 1$  und 2. Zusätzlich ist der SPE-Blindwert von einem Typ 1 Reinstwasser [128] gezeigt.



**Abb. 3-3: Aufnahmen der Biolumineszenzhemmung zweier Proben nach HPTLC/AMD-Trennung (Gradient 2) aus unterschiedlichen Bereichen einer Deponie und der SPE-Blindprobe. Für die Bildauswertung notwendigen Bereiche sind beispielhaft bei der Probe 1 eingezeichnet: P Probenbahn, R Referenzbahn, s bzw. r gibt die Breite der Bahnen an.**

Damit ein Hemmwert-Chromatogramm erzeugt werden kann, sind zwei Referenzspuren (R) notwendig. Diese befinden sich links und rechts von der Probenbahn (P). Die Anforderungen an die Referenzspuren sind:

- paralleler Verlauf zur Probenbahn
- müssen mit derselben Pixelreihe wie die Probenbahn beginnen und enden
- nicht durch die Probenbahn beeinflusst werden
- sollen möglichst nah an der Probenbahn liegen

Zuerst werden die Mittelwerte der Lichtintensität ( $I_{P,Rf}$ ) als Graustufen für jeden Retentionsfaktor (Rf) (Pixelreihe) für die Probenbahn berechnet (Gleichung 3-8). Die Mittelwertberechnung für die Referenz erfolgt analog (Gleichung 3-9). Die Werte für beide Referenzbahnen werden nochmals gemittelt (Gleichung 3-10).

$$I_{p,Rf} = \frac{1}{p} \sum_p i_{p,Rf} \quad (\text{Gleichung 3-8})$$

$$I_{r,Rf} = \frac{1}{r} \sum_r i_{r,Rf} \quad (\text{Gleichung 3-9})$$

$$\overline{I_{r,Rf}} = \frac{I_{R1,Rf} + I_{R2,Rf}}{2} \quad (\text{Gleichung 3-10})$$

Mit:  $I_{p,Rf}$  bzw.  $I_{r,Rf}$ : Lichtintensität bei Rf auf der Probefahrbahn bzw. Referenzbahn.

Mit den ermittelten Werten lässt sich nach Gleichung 3-11 für jede Pixelreihe bzw. jeden Rf-Wert für die Probefahrbahn ein Hemmwert ( $Inh_{Rf}$ ) ermitteln.

$$Inh_{Rf} = \left( 1 - \frac{I_{p,Rf}}{I_{r,Rf}} \right) \cdot 100\% \quad (\text{Gleichung 3-11})$$

Wenn die erhaltenen Hemmwerte gegen den Rf-Wert aufgetragen werden, ergibt sich ein Hemmwertchromatogramm. In Abb. 3-4 ist das Hemmwert-Chromatogramm für die in Abb. 3-3 markierte Probefahrbahn gezeigt. Beim Vergleich des Hemmwert-Chromatogramms mit dem Absorptions-Chromatogramm (Abb. 3-4) wird deutlich, dass die Hemmwertsignale etwas verbreitert sind. Neben dem Effekt der Diffusion ist dies auf die nicht lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung zurückzuführen. Dies führt zu einer geringeren Empfindlichkeit bei kleineren bzw. größeren Konzentrationen. Wird aus den Hemmwerten der Gamma-Wert ( $\Gamma$ -Wert, Gleichung 3-12) berechnet und ebenso orts aufgelöst abgetragen, nähern sich die Signalspitzen denen der UV-Detektion an.

$$\Gamma = \frac{Inh [\%]}{100 \% - Inh [\%]} \quad (\text{Gleichung 3-12})$$

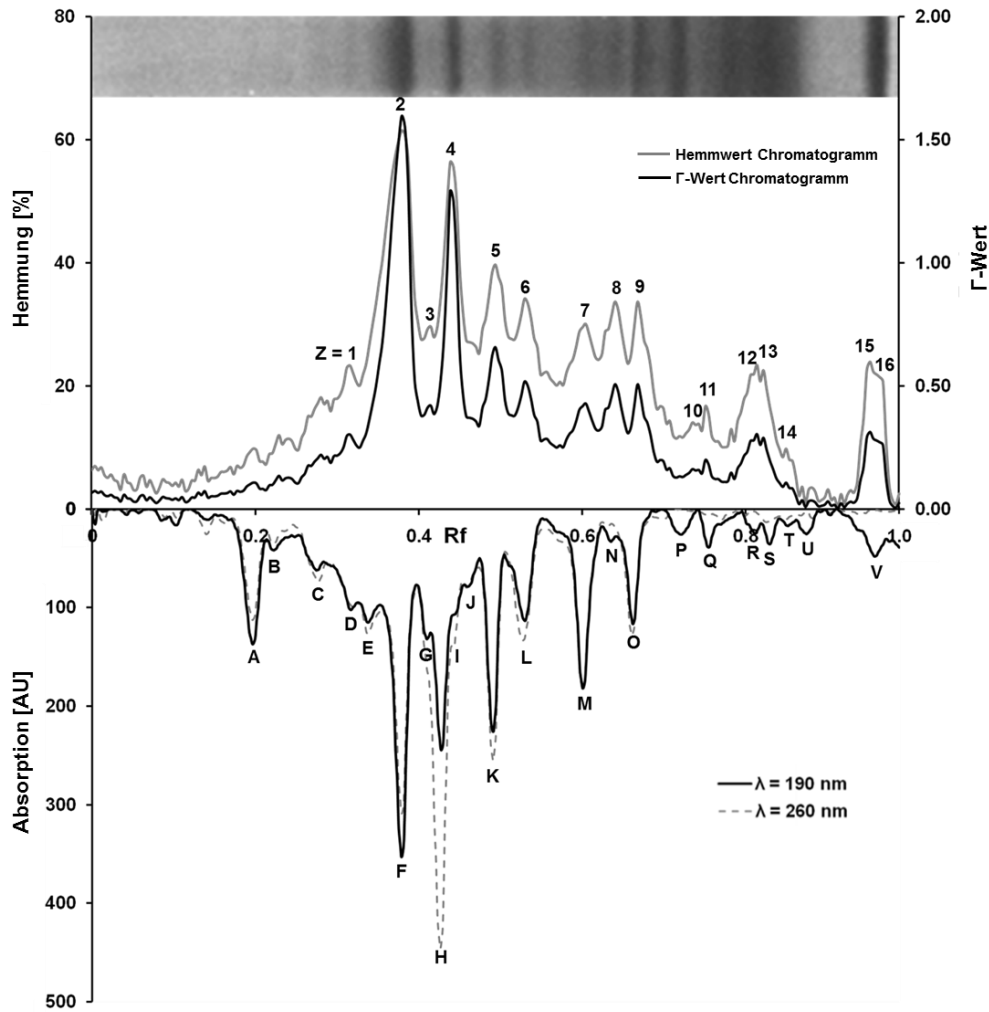


Abb. 3-4: Vergleich des Hemmwert-,  $\Gamma$ -Wert und des UV-Chromatogramms der 10  $\mu\text{L}$  Auftragung der Probe aus der Probenahmestelle 1.

### 3.1.2 Semi-quantitative Auswertung von Proben

Der Vergleich von Proben bzw. Probenbestandteile kann nicht anhand der Hemmung erfolgen, da die Wirkung durch eine substanzspezifische, sigmoid verlaufende Dosis-Wirkungsbeziehung beschrieben wird (Gleichung 3-13). Charakterisiert wird die spezifische Dosis-Wirkungsbeziehung durch den Lageparameter  $a$  und der Steigung  $b$ .

$$\text{Inh}_{z,j} = \frac{1-k}{1+e^{(a_{z,j}-b_{z,j} \ln c_{z,j})}} + k \quad (\text{Gleichung 3-13})$$

Mit:  $\text{Inh}_{z,j}$ : Hemmung der Substanzbande  $z$  der Probe  $j$ ;  $k$ : Wirkung der Kontrolle (im Allgemeinen wird  $k = 0$  gesetzt);  $a_{z,j}$ : Lageparameter der Dosis-Wirkungsbeziehung;  $b_{z,j}$ : Steigungsparameter der Dosis-Wirkungsbeziehung;  $c_{z,j}$ : Konzentration bzw. Flächenmasse (Dosis); alle aufgeführten Parameter sind dimensionslos

Zumeist sind die Verbindungen in einer Probe und damit auch deren Konzentrationen sowie deren Dosis-Wirkungsbeziehungen unbekannt. Ist das Auftragevolumen bekannt, kann an-

statt der Konzentration das Auftragevolumen in die Dosis-Wirkungsbeziehung eingesetzt werden. Wie in Abb. 3-2 gezeigt ist die Biolumineszenzhemmung der HPTLC-Platte abhängig von der Flächenmasse (Substanzmasse pro Fläche) und damit ebenso vom Auftragevolumen.

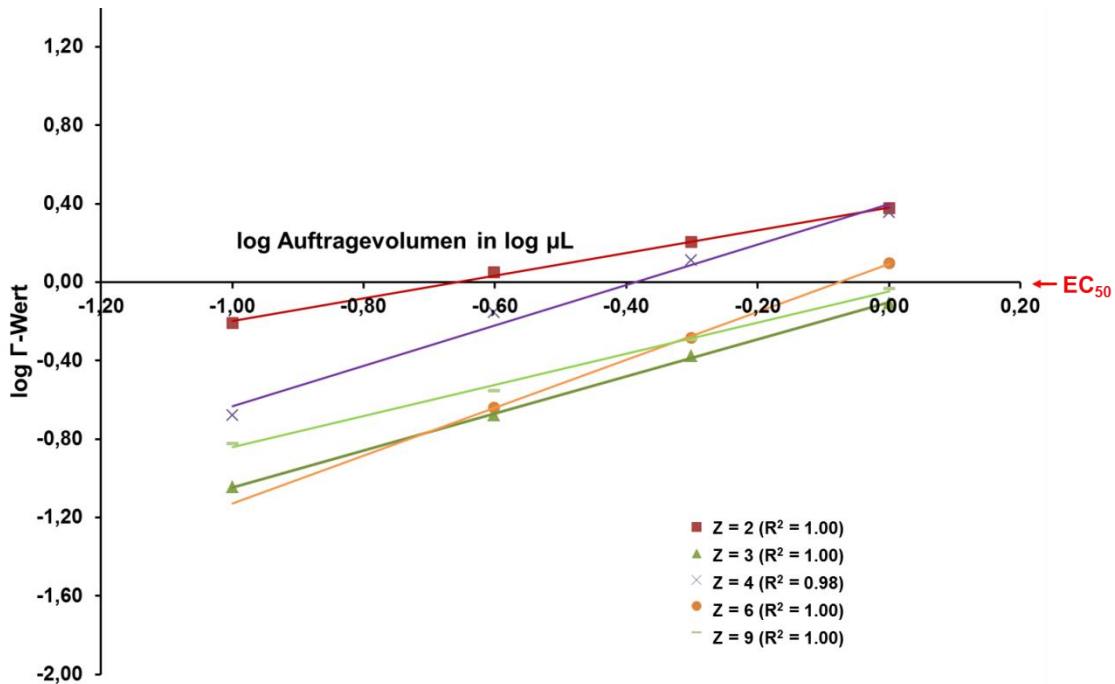
Durch das Einsetzen der Gleichung 3-13 in die  $\Gamma$ -Wert-Berechnung (Gleichung 3-12) ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des  $\Gamma$ -Werts und dem Logarithmus der Dosis (Gleichung 3-14) [126].

$$\lg \Gamma_{z,j} = a_{z,j} + b_{z,j} \cdot \lg V_{z,j} \quad (\text{Gleichung 3-14})$$

Mit  $\Gamma_{z,j}$ : Gamma-Wert der Substanzbande z der Probe j,  $a_{z,j}$ : Lageparameter der Dosis-Wirkungsbeziehung;  $b_{z,j}$ : Steigungsparameter der Dosis-Wirkungsbeziehung;  $V_{z,j}$ : Auftragevolumen

In Abb. 3-5 sind die linearisierten Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Hemmbanden der Probe j = 1 (Abb. 3-5) gezeigt. Anhand dieser Funktionen ist es möglich als Vergleichswert für die jeweilige Hemmbande das Auftragevolumen zu bestimmen, welches notwendig ist um eine Hemmung von 50 % zu erreichen ( $V_{z,j}(50)$ ). Die Hemmung von 50 % ergibt einen  $\Gamma$ -Wert von 1. In der linearisierten Dosis-Wirkungs-Beziehung ist daher der Schnittpunkt mit der x-Achse, die Konzentration bei 50 %Hemmung ( $EC_{50}$ -Wert) bzw. das Volumen bei 50 %Hemmung ( $V_{50}$ -Wert) (Gleichung 3-15).

$$\text{Inh} = 50 \% \rightarrow \Gamma = 1 \rightarrow 0 = a_{z,j} + b_{z,j} \cdot \lg V_{z,j} (50) \quad (\text{Gleichung 3-15})$$



**Abb. 3-5: Linearisierte Dosis-Wirkungsbeziehungen ausgewählter Hemmbanden der Probe 1 (Abb. 3-3).**

Wenn in beiden Proben die gleiche Substanz vorhanden ist und die Hemmung für diese Substanzzone gleich groß ist, bedeutet dies, dass sich die gleichen Masse der Hemmsubstanz auf der Platte befinden. In Gleichung 3-16 wird dies für die Substanzmasse bei einer Hemmung von 50 % gezeigt.

$$m(50)_{z,1} = m(50)_{z,2} \quad (\text{Gleichung 3-16})$$

Mit Hilfe des der  $V_{z,j}(50)$  lässt sich dadurch auf das Konzentrationsverhältnis der Substanz in den Probenextrakten  $j = 1$  und  $j = 2$  schließen (Gleichung 3-17).

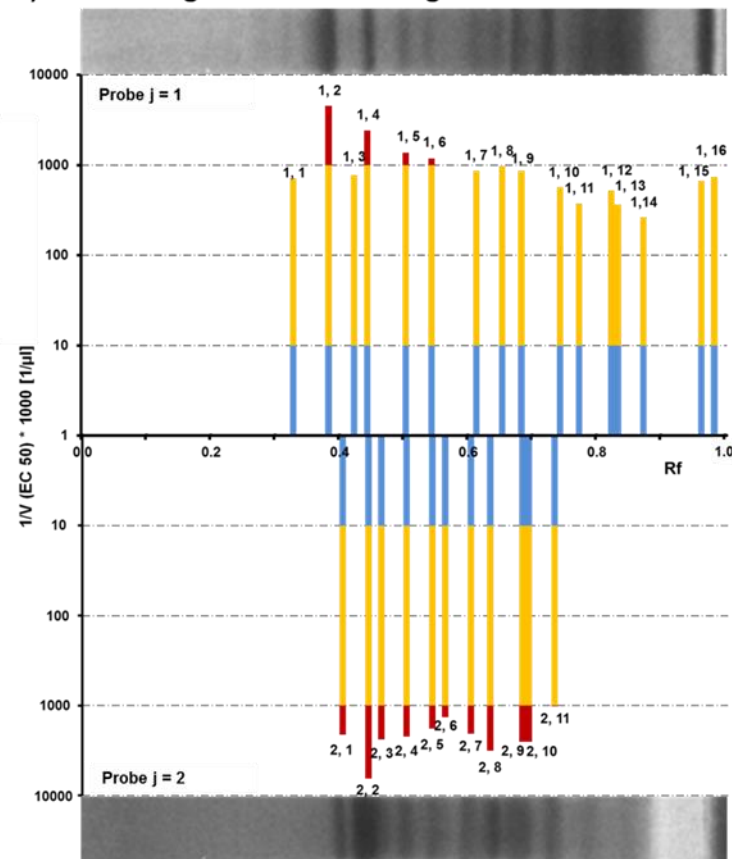
$$\frac{c(50)_{z,1}}{c(50)_{z,2}} = \frac{V(50)_{z,2}}{V(50)_{z,1}} \quad (\text{Gleichung 3-17})$$

Aufgrund der umkehrten Proportionalität von  $V_{z,j}(50)$  zu  $c_{z,j}(50)$  wird die Wirkung im Folgenden immer als reziprokes Isohemmvolumen (RIHV) angegeben. Das RIHV ist direkt proportional zur Konzentration der Substanz  $z$  in der jeweiligen Probe  $j$  und gibt an welches Volumen einer Probe aufgetragen werden muss, damit für eine bestimmte Hemmbande die Hemmung von 50 % erreicht wird. Mit dem RIHV ist es möglich unterschiedliche Proben unabhängig vom Auftragvolumen miteinander zu vergleichen. Je größer der RIHV-Wert ist, desto kleiner ist das benötigte Volumen zum Erreichen des  $EC_{50}$ -Wertes und desto größer ist die Konzentration der hemmenden Substanz  $z$  im Extrakt der zu vergleichenden Proben.

Zur besseren Handhabung der Zahlenwerte wird das Ergebnis der Auswertung mit dem Faktor 1000 multipliziert. In Abb. 3-6 A) ist die RIHV-Auswertung der Hemmbanden der Proben j = 1 und 2 als Histogramm dargestellt. Zu beachten ist dabei, dass die RIHV-Werte auf einer logarithmischen Skala abgetragen werden. Zur Verdeutlichung der logarithmischen Skalierung wurden drei Farbabstufungen für die Größe des mit 1000 multiplizierten RIHV-Wertes eingeführt. Blau für RIHV-Werte  $\leq 10 \cdot [1000/\mu\text{L}]$ , Gelb  $> 10 \cdot [1000/\mu\text{L}]$  und Rot für Werte  $\geq 1000 \cdot [1000/\mu\text{L}]$ .

Damit es möglich ist eine große Anzahl von Proben miteinander leicht zu vergleichen, wird ein logarithmisches Polardiagramm verwendet. Dazu werden die Rf-Werte mit den dazugehörigen RIHV-Werten im Uhrzeigersinn von 0 bis 1 abgetragen (Abb. 3-6 B)).

A) Säulendiagramm-Darstellung



B) Polardiagramm-Darstellung

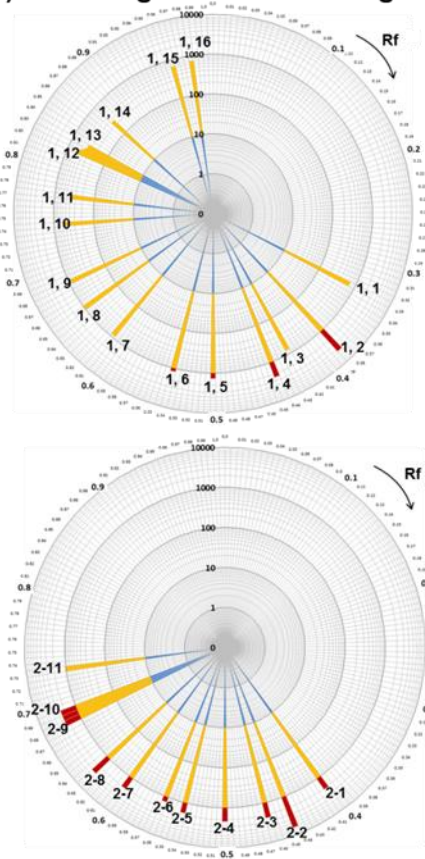


Abb. 3-6: Vergleich zweier Probenahmestellen anhand der halblogarithmischen Darstellung des reziproken Iso-Hemmvolumens (RIHV). A) Säulendiagramm-Darstellung B) Polardiagramm-Darstellung.



## 3.2 Auswertung der Acetylcholinesterase-Hemmung

### 3.2.1 Bestimmung der Hemmung

Beim Acetylcholinesterase-Hemmtest (AChE-Hemmtest) erscheinen Hemmzonen als dunkler Bereich vor einem blau fluoreszierenden Hintergrund (Kap. 8.2.2). Die Auswertung der Hemmung erfolgt anhand des bei  $\lambda = 366$  nm aufgenommenen Bildes. Eine Detektion der Fluoreszenz mittels eines TLC-Scanners kann nicht erfolgen, da sich die Hemmung mit fortschreitender Reaktionszeit zu schnell verändert. Eine Möglichkeit die Reaktion zu stoppen ist die Denaturierung des Enzyms durch Erhitzen der Platte [70]. Die Veränderung der Hemmung wird aber für eine Semi-quantitative Auswertung benötigt (Kapitel 3.2.2). Damit die Auswertung der Hemmung analog der Biolumineszenzhemmung von *Aliivibrio fischeri* erfolgen kann, muss in einem ersten Schritt das 24 bit RGB-Farbbild (256 Abstufungen je Farbe) in ein 8 bit Graustufenbild umgewandelt werden. In dem Bildbearbeitungsprogramm Gimp® 2.8 stehen dafür drei verschiedene Verfahren zur Auswahl. Bei der Umwandlung des Farbbildes über die Helligkeit wird der Maximal und Minimal-Wert aus dem RGB-Farbraum bestimmt. Der Mittelwert dieser beiden Werte ergeben die Helligkeit bzw. die Graustufe (Gleichung 3-18).

$$\text{Helligkeit} = \frac{1}{2} * (\max(R, G, B) + \min(R, G, B)) \quad (\text{Gleichung 3-18})$$

Für die Umwandlung der Farben in Graustufen über die Leuchtkraft werden nach dem sRGB-Verfahren [129] die einzelnen Farbstufen unterschiedlich gewichtet aufsummiert (Gleichung 3-19).

$$\text{Leuchtkraft} = 0,21 * R + 0,72 * G + 0,07 * B \quad (\text{Gleichung 3-19})$$

Die Bildumwandlung über die Option „Durchschnitt“ erfolgt über die Mittelwertbildung aus allen drei Farbabstufungen (Gleichung 3-19).

$$\text{Durchschnitt} = \frac{1}{3} * (R + G + B) \quad (\text{Gleichung 3-19})$$

Die Abb. 3-7 stellt die Ergebnisse der drei beschriebenen Graustufenumwandlungsverfahren anhand eines aufgetrennten Deponiesickerwasserextrakts gegenüber. Besonders deutlich unterscheiden sich die verschiedenen Verfahren bei der Wiedergabe der fluoreszierenden Bereiche. Beim „Helligkeits“- sowie dem „Durchschnitts“-Verfahren erscheinen diese Bereiche sehr deutlich. Das Umwandlungsverfahren „Leuchtkraft“ gibt am besten den Helligkeitseindruck wieder. Daher erfolgten alle Umwandlungen eines Farbbildes in ein Graustufenbild in der vorliegenden Arbeit mit diesem Verfahren.

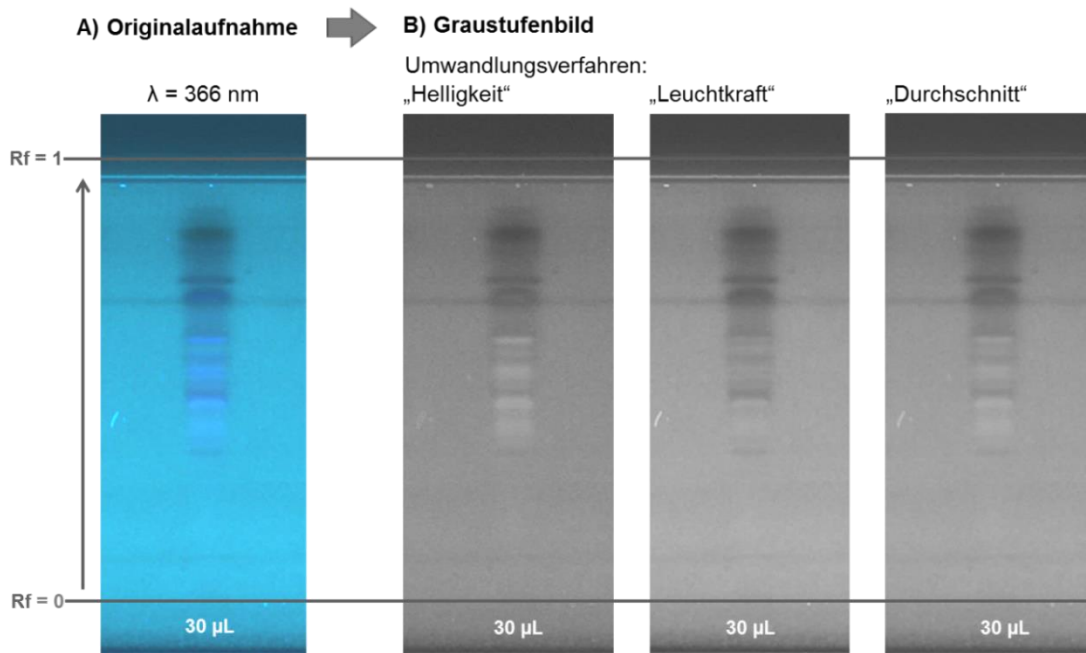


Abb. 3-7: Ergebnis der Umwandlung eines 24 bit Farbaufnahme der AChE-Hemmung einer aufgetrennten Deponiesickerwasserprobe mit drei Umwandlungsverfahren in 8 bit Graustufenbilder. Die Aufnahme erfolgte nach einer Inkubationszeit von 11 min.

In dem erhaltenen Graustufenbild kann nun, gleich wie aus den HPTLC-Biolumineszenzbildern, die Hemmung über die Probepbahn mit den Gleichungen 3-4 bis 3-10 ausgewertet werden.

$$Inh_{Rf} = \left(1 - \frac{I_{P,Rf}}{I_{R,Rf}}\right) \cdot 100\% \quad (\text{Gleichung 3-11})$$

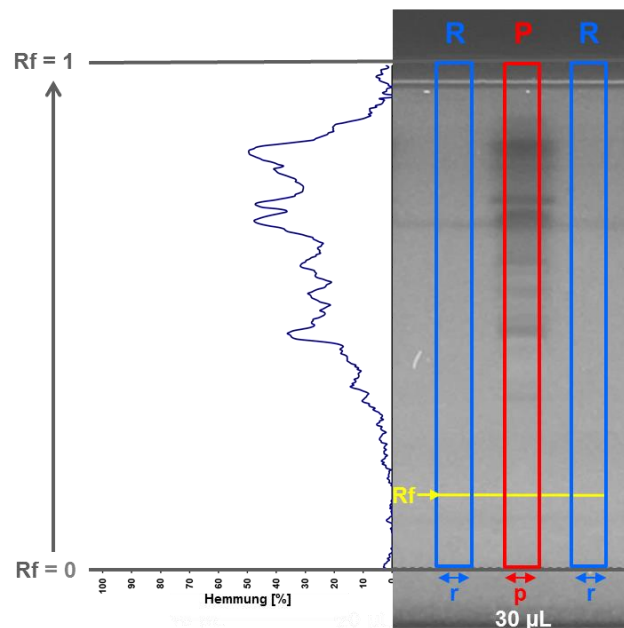


Abb. 3-8: Ermittlung des HPTLC-AChE-Hemmwertchromatogramms mit den zur Bildauswertung notwendigen Bereichen. P Probepbahn, R Referenzbahn, p bzw. r gibt die Breite der Bahnen an.

### 3.2.2 Semi-quantitative Auswertung der AChE-Hemmung

Zur Abschätzung der Stärke der Wirkung ist beim Acetylcholinesterase-Hemmtest die Betrachtung der Hemmung alleine nicht ausreichend. Daher wird zur Beschreibung der Stärke der Hemmwirkung einer Substanz die Hemmkonstante  $k_i$  herangezogen (Gleichung 3-20). Die Herleitung von  $k_i$  kann bei Herzsprung et al. [130] bzw. bei Walz und Schwack [131] nachgeschlagen werden.

$$k_i = \frac{\ln(E_0/E)}{t*[S]} = \frac{\ln(1/Ac)}{t*[S]} \quad \text{Gleichung 3-20}$$

Mit:  $k_i$ : Hemmkonstante,  $E_0$ : Enzymkonzentration vor Reaktionsbeginn (Entspricht 100 % Aktivität),  $E$ : Enzymkonzentration nach Inkubationszeit  $t$  [S]: Konzentration Substrat,  $Ac$ : Enzymaktivität

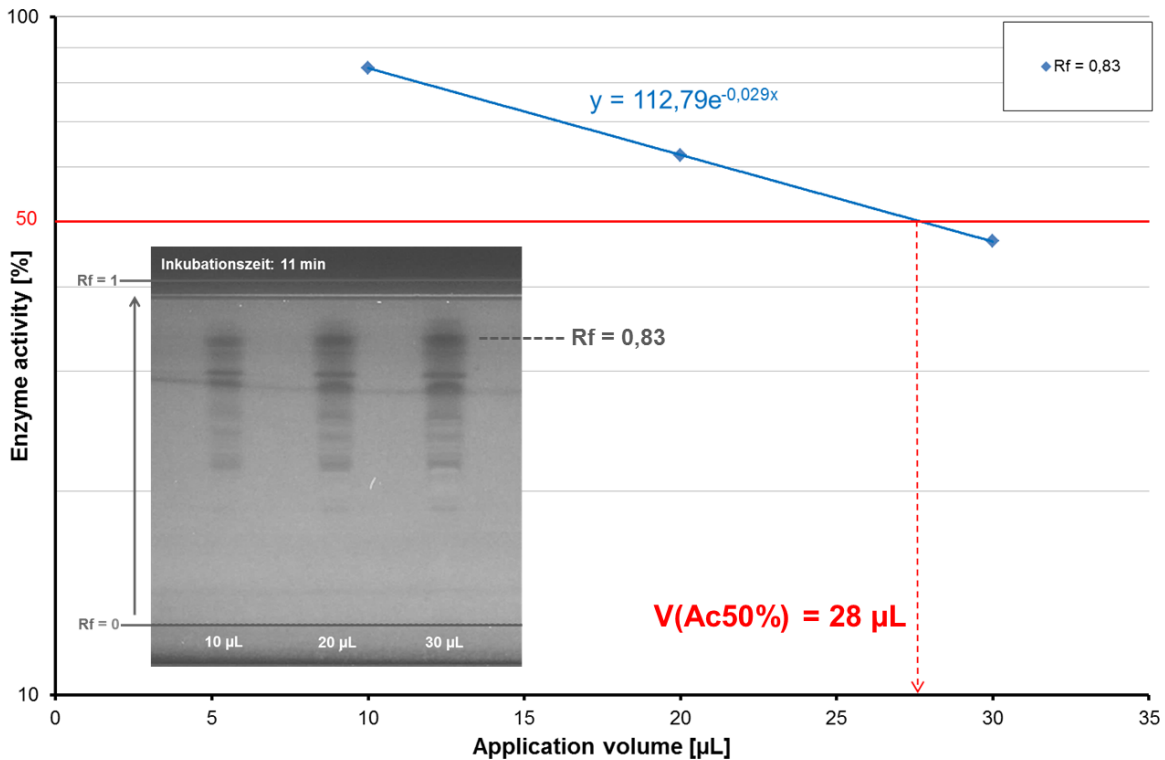
Der Vergleich der Hemmwirkung mittels des  $k_i$ -Wertes setzt voraus, dass die Reaktivierung der AChE deutlich langsamer ist als die Reaktivierung des Enzyms. Im Falle von irreversiblen AChE-Inhibitoren wie Phosphorsäureester stimmt diese Annahme. Bei Carbamaten kann bei einem Beobachtungszeitraum von  $t \leq 30$  min auch von einer irreversiblen Reaktion ausgegangen werden [132]. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass die Hemmverbindung in einem deutlichen Überschuss (Faktor  $\geq 10$ ) vorliegt. Unter diesen Annahmen ist die Hemmung der AChE eine Reaktion pseudoerster Ordnung und der  $k_i$ -Wert beschreibt das Hemmpotential dieser Substanz. Da aber in der Regel die Konzentration des Inhibitors unbekannt ist, können für die Hemmbanden keine Hemmkonstanten berechnet werden.

Unabhängig von der Konzentration kann jedoch die Enzym-Aktivität ( $Ac$ ) einer Hemmzone bestimmt werden. Die Bestimmung auf der HPTLC-Platte erfolgt analog zum Küvettentest. Dazu werden zur Detektion der Acetylcholinesterase-Hemmung im Abstand von einer Minute Bilder von der HPTLC-Platte aufgenommen. Diese Bilder werden wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben in Graustufenbilder umgewandelt. Analog zum Küvettentest [130], erfolgt die Bestimmung der Aktivität ( $Ac$ ) einer Hemmbande über den Quotienten der Steigungen der zeitlich veränderten Lichtintensitäten ( $\Delta i$ ) für die Probe (S) und der Referenz (R) (Gleichung 3-21).

$$Ac(t) [\%] = \frac{\Delta i_{Rf}^S(t)}{\Delta i_{Rf}^R(t)} * 100 \% \quad \text{Gleichung 3-21}$$

Die Lichtintensität  $i$  wird wie beim HPTLC-Biolumineszenzhemmtest aus dem Graustufenbild anhand der 256 Graustufen (0 = Schwarz, 255 = Weiß) ermittelt. Als Referenz wird der Mittelwert der Intensität zum Zeitpunkt  $t$  links und rechts von der Hemmbande gewählt.

Für eine semiquantitative Auswertung wird das RIHV Konzept (Kapitel 3.1.2) auf die Enzymaktivität übertragen. Dafür werden unterschiedliche Volumina des Probenextraktes aufgetragen und nach der Trennung die Enzymaktivitäten der Hemmzonen bestimmt. In Abb. 3-9 ist zu sehen, dass die Aktivität der Acetylcholinesterase für die Hemmzone bei einem Rf-Wert von 0,83 erwartungsgemäß mit steigendem Auftragevolumen zurückgeht.



**Abb. 3-9: Ermittlung des Auftragevolumens zur Erreichung einer Enzymaktivität von 50 % für die Hemmbande bei  $R_f = 0,83$ .**

Aus der logarithmischen Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Auftragevolumen lässt sich das Volumen berechnen, welches notwendig ist um eine Aktivität der Acetylcholinesterase von 50 % zu erreichen ( $V_{Ac50\%}$ ) (Gleichung 3-22, Gleichung 3-23).

$$\ln(Ac) = b_{z,j} * V_{z,j} + a_{z,j} \quad \text{Gleichung 3-22}$$

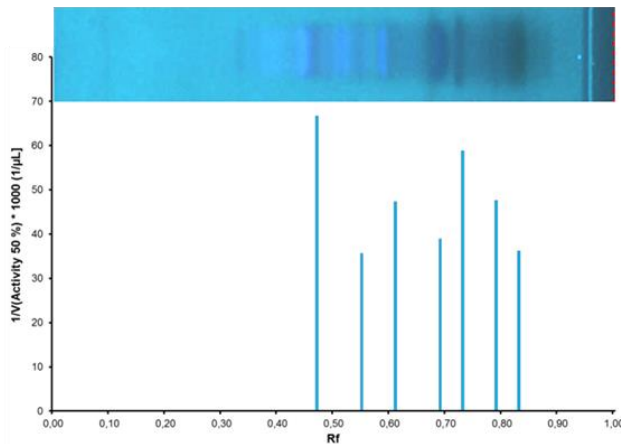
$$\ln(Ac_{50\%}) = 3,91 = b_{z,j} * V_{z,j}(Ac_{50\%}) + a_{z,j} \quad \text{Gleichung 3-23}$$

Mit  $a_{z,j}$ : Lageparameter;  $b_{z,j}$ : Steigungsparameter;  $V_{z,j}$ : Auftragevolumen

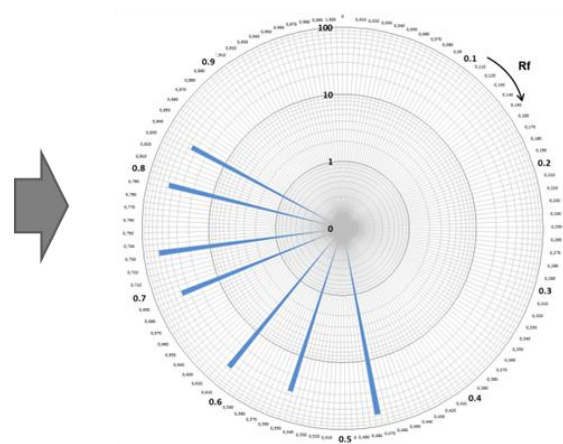
Aufgrund des reziproken Zusammenhangs von Volumen und Konzentration eines Stoffes wird der Kehrwert des ermittelt Volumens für 50 % Aktivität berechnet (3-17). Dieser Wert wird reziprokes iso-Aktivitätsvolumen (RIAV) genannt. Wie beim RIHV gilt, je größer das RIAV ist, desto stärker wirkt eine Substanz auf die Acetylcholinesterase. Da die erhaltenen Zahlenwerte sind oftmals sehr klein sind, werden diese zur besseren Handhabe mit dem

Faktor 1000 multipliziert und in  $[1000/\mu\text{L}]$  angegeben. In Abb. 3-10 sind die RIAV aller Hemmbanden für die gezeigte Probe dargestellt. Die RIAV-Werte werden aufgrund der besseren Vergleichbarkeit von Proben, ebenso als Polardiagramme dargestellt.

**A) Säulendiagramm-Darstellung**



**B) Polardiagramm-Darstellung**

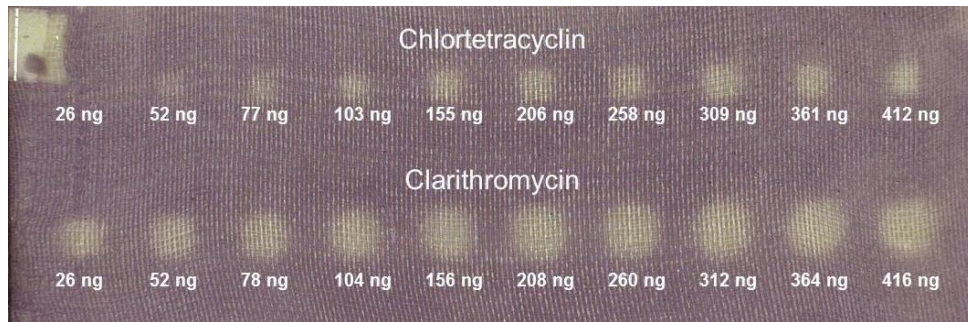


**Abb. 3-10:** Säulendiagramm- und Polardiagramm-Darstellung der reziproken Iso-Aktivitätsvolumina (RIAV) aller AChE-Hemmbanden einer Probe.

**3.3 Auswertung der Hemmung von *Bacillus subtilis***

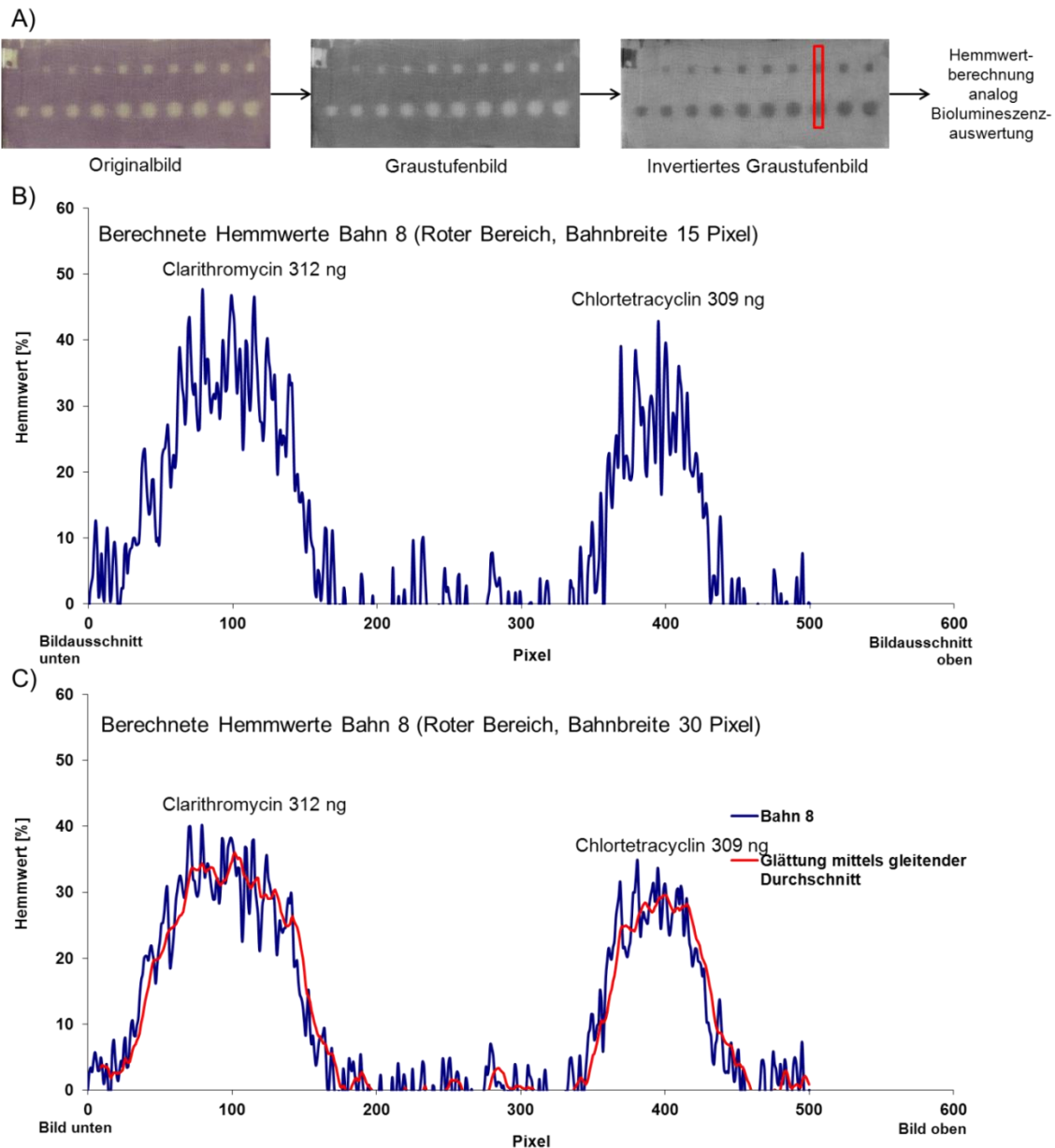
Der Nachweis der Hemmung von *Bacillus subtilis* erfolgt anhand von hellen Zonen vor einem violetten Hintergrund. Damit die Hemmung aus diesem Bild bestimmt werden kann, muss auch dieses Bild wie beim AChE-Hemmtest mit der gleichen Methode zunächst in ein Graustufenbild umgewandelt werden. Danach erscheinen die Hemmflächen als helle Flächen vor einem dunklen Hintergrund; dies würde bei der herkömmlichen Auswertung zu negativen Hemmungen führen. Deshalb werden die Graustufen invertiert. Nun ist wie beim Biolumineszenzhemmtest die Hemmung als dunkle Fläche vor einem hellen Hintergrund zu sehen (Abb. 3-11 A) und die Hemmung kann mit derselben Formel berechnet werden (Gleichung 3-11).

Veranschaulicht werden soll die Auswertung anhand der Auswertung der Konzentrationsreihe der zwei Antibiotika Chlortetracyclin und Clarithromycin. Diese wurden in zwei Reihen, jeweils auf eine quadratische Fläche von  $25 \text{ mm}^2$  aufgetragen. Die Detektion der Hemmung erfolgt ohne vorherige Trennung und ist in Abb. 3-11 dargestellt.



**Abb. 3-11: Konzentrationsabhängige Hemmung von *Bacillus subtilis* durch Chlortetracyclin (obere Reihe) und Clarithromycin (untere Reihe). Die Substanzen wurden flächenförmig (5 x 5 mm) aufgetragen und vor der Detektion nicht chromatographiert.**

Besonders deutlich ist die Zunahme der Hemmfläche mit steigender Konzentration für Clarithromycin zu erkennen. Für Chlortetracyclin fällt die Hemmung bei fast gleicher aufgetragener Substanzmenge schwächer aus. Für die Auswertung wurde dieses Bild, wie beschreiben vorbereitet (Abb. 3-12 A). Die Auswertung der Hemmung erfolgte Bahnweise, so dass je Bahn eine ähnliche Substanzmenge von Chlortetracyclin und Clarithromycin ortsaufgelöst erfasst wird. In Abb. 3-12 B ist beispielhaft diese Auswertung für die achte Bahn dargestellt.



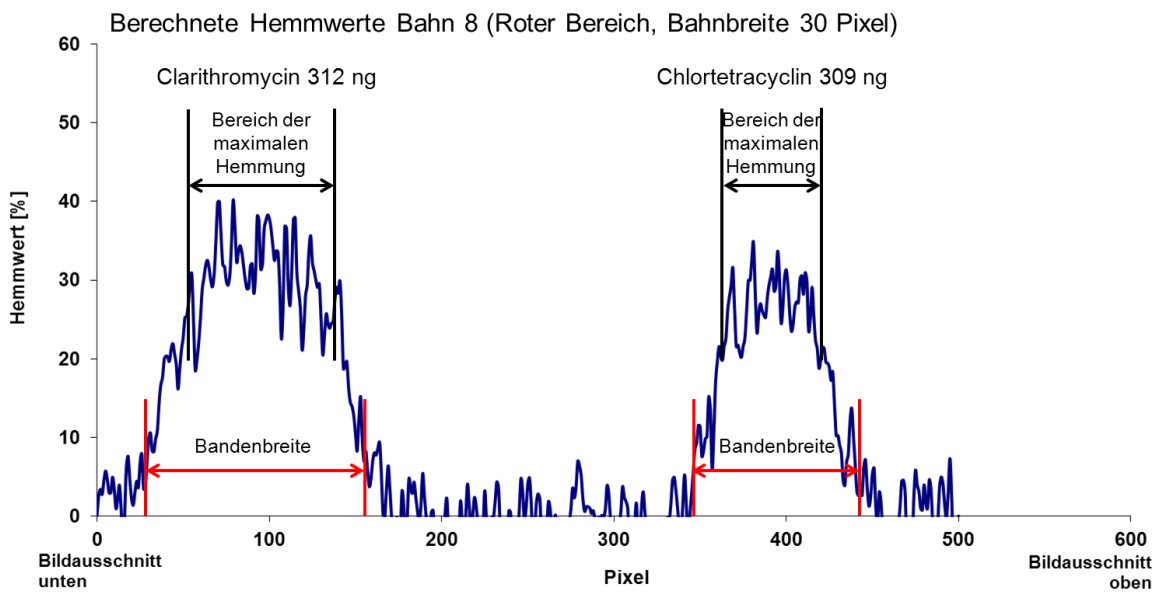
**Abb. 3-12:** A) Ablaufschema der Vorbereitung des Bildes aus Abb. 3-11 für die Hemmwertberechnung analog der Biolumineszenzhemmung von *Aliivibrio fischeri*. B) Ortsaufgelöste berechnete Hemmwerte für Clarithromycin (312 ng) und Chlortetracyclin (309 ng). Die ausgewertete Bahnbreite beträgt 15 Pixel. C) Auswertung derselben Bahn wie in B) mit einer Bahnbreite von 30 Pixeln. Zusätzliche Glättung der berechneten Hemmwerte mittels des gleitenden Durchschnitts zur Reduzierung des Rauschens.

Wird für die in Abb. 3-12 A gezeigte Bahn 8 eine Breite von 15 Pixel gewählt, so ist ein starkes Rauschen der ortsaufgelösten Hemmung zu erkennen (siehe Abb. 3-12 B). Dies wird durch die aufgelegte Gaze verursacht (Kapitel 7.2). Da das Bild aufgrund der hierbei eingesetzten Kamera aber eine vielfach bessere Auflösung besitzt als die Aufnahmen der Biolumineszenz, kann die Auswertebahn auf 30 Pixel verbreitert werden. Dadurch wird die Hemmung besser gemittelt und das Rauschen verringert sich deutlich (siehe Abb. 3-12 C). Eine höhere Wahl der Pixelanzahl für die Breite der Auswertebahn ist aufgrund der Bildauflösung

nicht möglich. Durch Glätten kann das Rauschen weiter unterdrückt werden. Im vorliegenden Fall wurden die Hemmwerte mittels des gleitenden Durchschnitts (10 Datenpunkte) geglättet (Abb. 3-12 C, rote Hemmkurve).

### 3.3.1 Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung

Nachstehend werden zwei Methoden zur Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen beschrieben. Die Werte, die in die Berechnung einfließen, sind in Abb. 3-13 als Bereich der maximalen Hemmung gekennzeichnet.

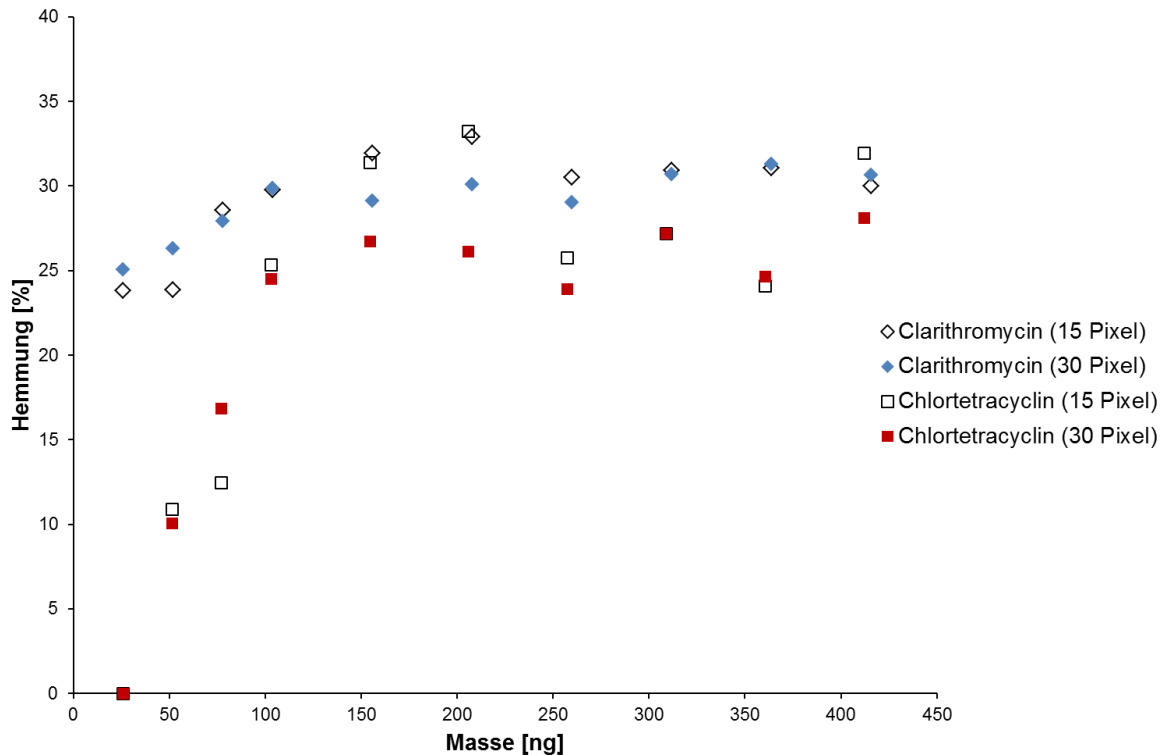


**Abb. 3-13: Auswahlbereiche für die Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von *Bacillus subtilis* auf der HPTLC-Platte.**

#### **Methode 1 (Hemmwert)**

Es werden die orts aufgelösten Hemmwerte, die den Bereich der maximalen Hemmung bilden (siehe Abb. 3-13), gemittelt und gegen die aufgetragene Konzentrationen der Antibiotika abgetragen. Die berechneten Dosis-Wirkungs-Beziehungen von Clarithromycin (26 ng – 416 ng) bzw. Chlortetracyclin (26 ng - 412 ng) und *Bacillus subtilis* sind in Abb. 3-14 abgebildet.





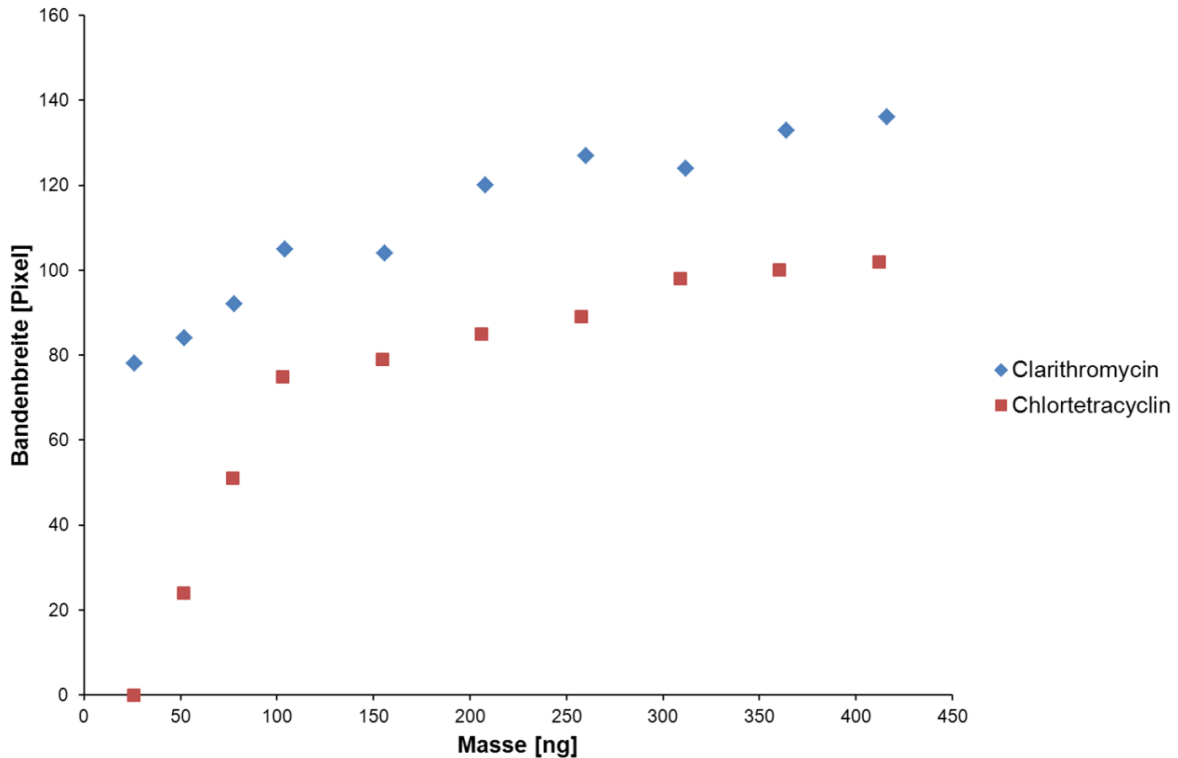
**Abb. 3-14: Dosis-Wirkungs-Beziehungen von Clarithromycin bzw. Chlortetracyclin mit *Bacillus subtilis*. Durch Abtragung der gemittelten Werte im Bereich der maximalen Hemmung wird der Unterschied zwischen den unterschiedlich breiten Auswertebahnen (Pixelzahl) deutlich.**

Die für Clarithromycin aufgetragenen Substanzmengen befinden sich hier bereits im Bereich der maximal erreichbaren Wirkung. Chlortetracyclin zeigt bei 26 ng noch keinen Effekt aber bereits bei einer Auftragemenge von ca. 150 ng ist die maximale Hemmung erreicht.

Bei den breiteren Auswertebahnen (30 Pixel) sind die Schwankungen zwischen den Werten geringer und folgen damit besser dem Verlauf der Dosis-Wirkungs-Beziehung. Es ist zu sehen, dass beide Substanzen eine maximale Hemmung von 30 % nicht überschreiten. Möglicherweise hat die aufgelegte Gaze einen Einfluss auf den Effekt, da die Substanzen nicht vollständig durch die Gaze-Bakteriensuspensionsschicht dringen.

### **Methode 2 (Hemmfläche)**

Als weitere Möglichkeit für die Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung schlägt Choma vor, die Fläche der Hemmung zu nutzen [1]. Da keine Software zur Verfügung stand, mit der die Bildfläche bestimmt werden kann, wurde die Bandenbreite aus den 30 Pixeln breiten Auswertebahnen (Abb. 3-13) gegen die Substanzmenge aufgetragen (Abb. 3-15).



**Abb. 3-15: Dosis-Wirkungs-Beziehung für Clarithromycin und Chlortetracyclin. Als Maß für die Stärke des Effekts auf *Bacillus subtilis* wurde die Bandenbreite (Abb. 3-13) herangezogen.**

Die Kurve für Chlortetracyclin flacht bei ca. 150 ng ab (Abb. 3-15) und bestätigt damit den Kurvenverlauf der Hemmwertmethode über die Stärke der Farbintensität (Abb. 3-14). Im Unterscheid zur Hemmwertmethode steigt die Kurve bei der Auswertung nach Choma in ihrem Endverlauf leicht an. Dies lässt sich mit der Diffusion der Substanz auf der Platte erklären. Bei steigender Konzentration vergrößert sich die detektierbare Diffusionsfläche, ohne dass die Hemmung tatsächlich zunimmt. Dieses leichte Ansteigen der Kurve nach dem Abknicken (bei 100 ng) stellt die Grenze der Auswertemethode nach Choma dar. Es wird folglich die Hemmwert-Auswertemethode verwendet.

### 3.4 Zusammenfassung

Für den HPTLC-Leuchtbakterienhemmtest mit *Aliivibrio fischeri* lässt sich die Hemmung analog zum Küvettentest ermitteln und orts aufgelöst als Hemmwert-Chromatogramm darstellen. Durch die Berechnung des  $\Gamma$ -Wertes aus der Hemmung und dessen orts aufgelöste Darstellung gleicht sich die Stauchung der Peaks aufgrund des sigmoiden Verlaufs der Dosis-Wirkungsbeziehung teilweise aus. Durch die nichtlineare Beziehung zwischen Konzentration bzw. Flächenmasse und Wirkung der unbekannt Substanzen ist es für den Vergleich von Proben notwendig, einen Bezugspunkt zu setzen. Bewährt hat sich dafür der  $EC_{50}$ -Wert. Da aber in den meisten Fällen die Konzentration unbekannt ist, wird als Bezugspunkt das Auf-

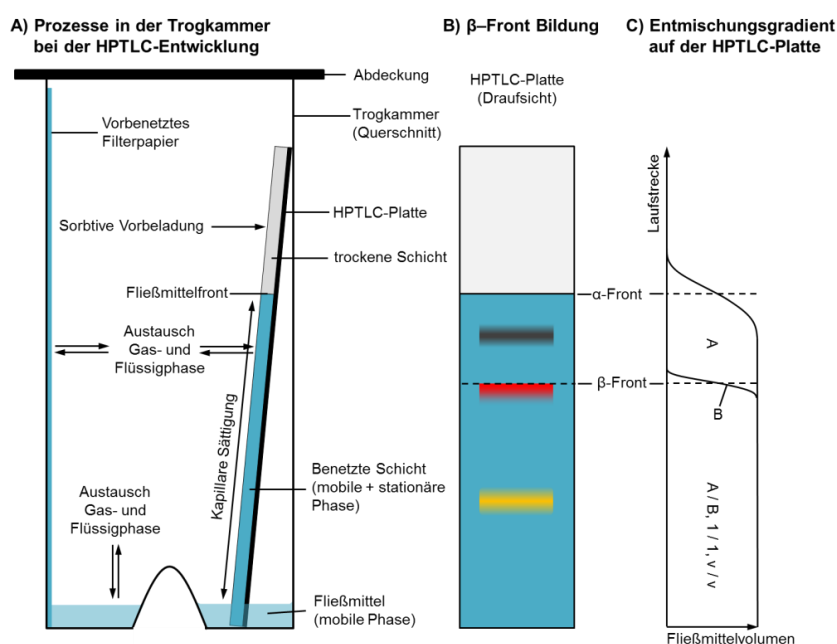
tragevolumen gewählt, welches erforderlich ist um eine Hemmung von 50 % auszulösen. Der Kehrwert des berechneten Auftragevolumens für 50% Hemmung stellt das reziproke iso-Hemmvolumen (RIHV) dar. Dieses beim HPTLC-Leuchtbakterientest erprobte Auswerteverfahren lässt sich auf den HPTLC-Acetylcholinesterase-Hemmtest übertragen. Für den Vergleich der Wirkung zwischen Hemmbanden bzw. Proben wird das Auftragevolumen herangezogen welches notwendig ist um eine Aktivität der Acetylcholinesterase von 50 % zu erreichen. Dieses Volumen wird auch als Kehrwert angegeben und als reziprokes iso-Aktivitätsvolumen (RIAV) bezeichnet.

## 4 Entwicklung von HPTLC-Methoden

### 4.1 Grundlagen

#### 4.1.1 HPTLC-Trennung

Die chromatographische Entwicklung einer TLC bzw. HPTLC-Platte findet in einer geschlossenen Entwicklungskammer statt, die mit wenigen Millilitern eines auf das Trennproblem abgestimmten Fließmittels befüllt ist. Wie in Abb. 4-1 gezeigt, taucht für die Trennung der untere Rand der HPTLC-Platte in das Fließmittel. Durch den Kapillareffekt wandert das Fließmittel über die stationäre Phase. Dabei bildet sich eine sichtbare Laufmittelfront ( $\alpha$ -Front) aus. Während der Wanderung eines binären Lösemittelgemisches (A und B) auf der stationären Phase kann es zur Entmischung des Fließmittels kommen und es bildet sich eine Entmischungsfrent ( $\beta$ -Front) aus. Die mobile Phase im Bereich zwischen  $\alpha$ -Front und  $\beta$ -Front wird dabei nur aus einer Komponente (A) gebildet, während der Bereich unterhalb der  $\beta$ -Front aus beiden Lösemitteln besteht. Substanzen, die an der  $\beta$ -Front mitlaufen bilden dabei eine gestauchte Bande [133].



**Abb. 4-1: Schema der ablaufenden Prozesse zwischen Gasphase, Flüssigphase und stationären Phase bei HPTLC-Entwicklung in einer Entwicklungskammer (A). (A verändert nach [134] B und C verändert nach [133])**

Da es sich bei der HPTLC um ein offenes Trennsystem handelt, hat neben der stationären Phase und der mobilen Phase auch die Gasphase einen Einfluss auf die Trennung. Während der Entwicklung verdunstet ein Teil der Lösemittel vom Fließmittelvorrat am Boden der Kammer und von der HPTLC-Platte (Abb. 4-1 A). Über den Dampfraum wird dann der unbe-

netzte Abschnitt der Platte mit den Lösemitteln vorbeladen. Damit in der Trogkammer während der Trennung immer die gleichen Bedingungen herrschen wird u. a. vor der Trennung der Dampfraum mit den verwendeten Lösemitteln mittels eines Filterpapiers gesättigt. Erst dadurch kann eine reproduzierbare Chromatographie gewährleistet werden.

#### 4.1.2 Automatisierte Mehrfachentwicklung

Eine Weiterentwicklung der Kapillar-HPTLC stellt die automatisierte Mehrfachentwicklung (engl.: Automated Multiple Development, AMD) dar. Diese Chromatographietechnik für die TLC wurde erstmals 1973 von J. Perry für die Mehrfachentwicklung mit nur einem Fließmittel vorgestellt (programmed multiple Development, PMD) [135]. Diese Technik wurde um die automatisierte Gradientenelution (AMD) mit mehreren Fließmitteln von K. Burger erweitert [136]. Der prinzipielle Ablauf der HPTLC/AMD ist in Abb. 4-2 dargestellt. Die Entwicklung der Platte erfolgt bei der HPTLC/AMD schrittweise, wobei zwischen den Entwicklungsstufen die Polarität des Fließmittels abnimmt und sich die Laufstrecke konstant verlängert. Typisch sind Gradienten von 10 bis zu 40 Einzelläufen bei denen die Laufstreckenverlängerung jeweils 1 - 3 mm beträgt.

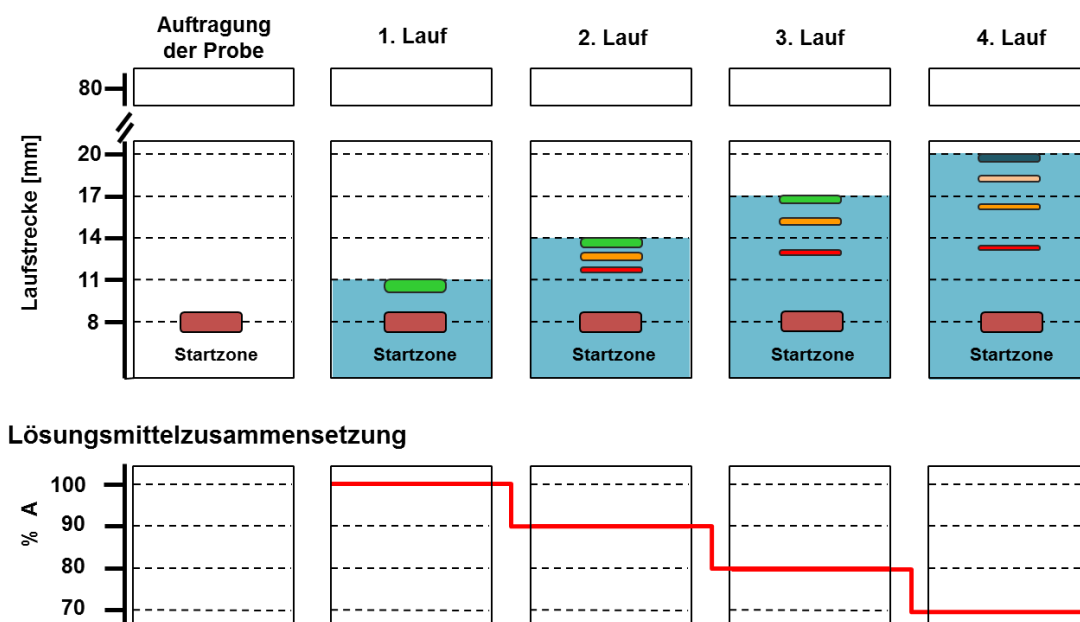
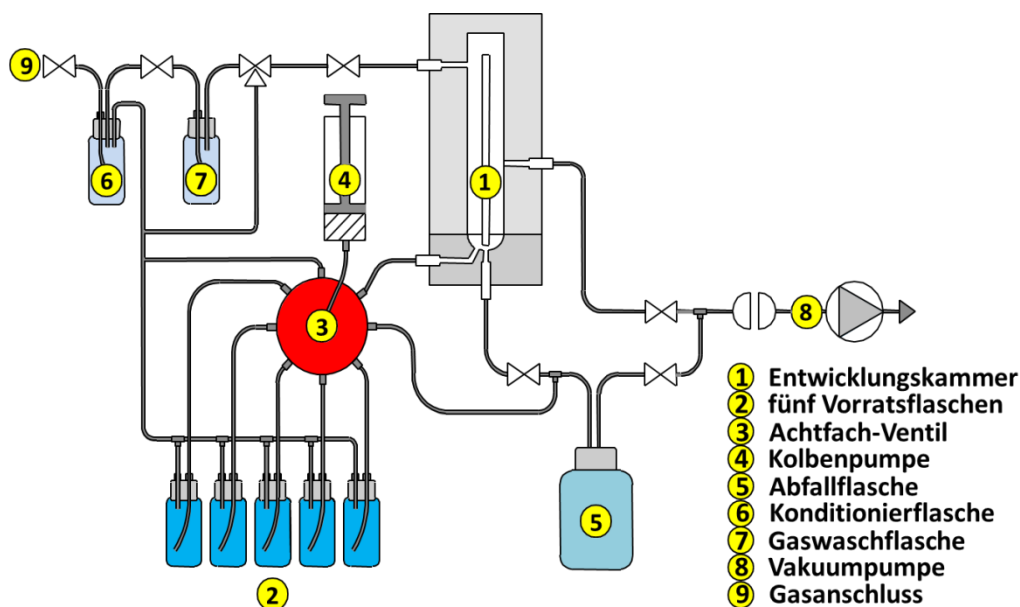


Abb. 4-2: Schematische Darstellung der Gradientenelution bei der automatisierten Mehrfachentwicklung. (Verändert nach [137])

Der AMD-Prozess beginnt mit dem Trocknen der HPTLC-Platte durch Evakuieren der Chromatographiekammer. Dabei werden Lösemittelreste, sowie leichtflüchtige Analyten der aufgetragenen Probenlösungen aus dem Sorbens der HPTLC-Platte entfernt, da diese den Chromatographievorgang beeinflussen würden. Dann wird mit einem sauberen inerten Gas ( $N_2$ ) das Vakuum aufgehoben und anschließend nach Einbringen des Fließmittels in den Tank der erste Entwicklungslauf gestartet. Wenn der Eluent die vorher festgelegte Laufstrecke

cke zurückgelegt hat, wird dieser aus der Kammer abgesaugt. Der nächste Zyklus beginnt wieder mit der Trocknung, gefolgt von der Begasung, Befüllung der Chromatographiekammer mit einem neuen Fließmittel und der Entwicklung mit einer etwas längeren Laufstrecke. Dies wird so lange wiederholt, bis das gesamte vorgegebene Entwicklungsprogramm abgearbeitet ist. Die beschriebenen Arbeitsschritte werden vollautomatisch in der AMD-Entwicklungseinheit durchgeführt, deren schematischer Aufbau in Abb. 4-3 zu sehen ist. Ein typischer AMD-Gradient besteht aus einem Basislösemittel bzw. -fließmittel, welches eine mittlere Polarität besitzt und die Selektivität bestimmt. Das Lösemittel mit einer höheren Elutionskraft wird als Verstärker bezeichnet und wird in den ersten Entwicklungsstufen eingesetzt. Abgeschlossen wird ein Gradient mit einem unpolaren Lösemittel bzw. Fließmittel, dem Abschwächer.



**Abb. 4-3: Schematischer Aufbau einer AMD 2-Entwicklungseinheit**

Bei jedem Entwicklungsschritt werden die Probenbanden zuerst an der Unterkante vom Eluent erfasst, dort verlagern sich die Moleküle früher als im oberen Bereich der Bande. Aufgrund dieses Effektes werden die Substanzen fokussiert, was die Bandenverbreiterung durch Diffusion zurückdrängt. Deshalb ergeben sich trotz langer Laufstrecken schmale Zonen. Im Vergleich zur klassischen HPTLC resultieren daraus eine hohe Trennstufenzahl und niedrige Nachweisgrenzen.

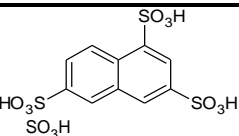
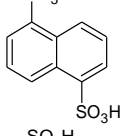
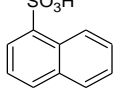
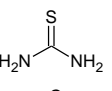
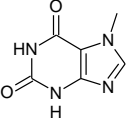
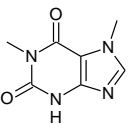
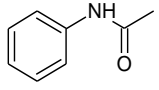
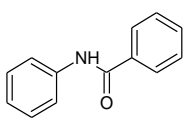
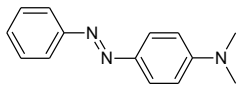
Auch wenn die AMD-Gradientenelution bis heute nicht sehr weit verbreitet ist, konnte sie ihre Leistungsfähigkeit für verschiedene analytische Fragestellungen zeigen. So finden sich Anwendungen der HPTLC/AMD für die Analyse von Lipiden [138, 139], Lebensmitteln [140], Phytopharmaka [141] und in der Umweltanalytik [142, 143].

## 4.2 Ergebnisse und Diskussion

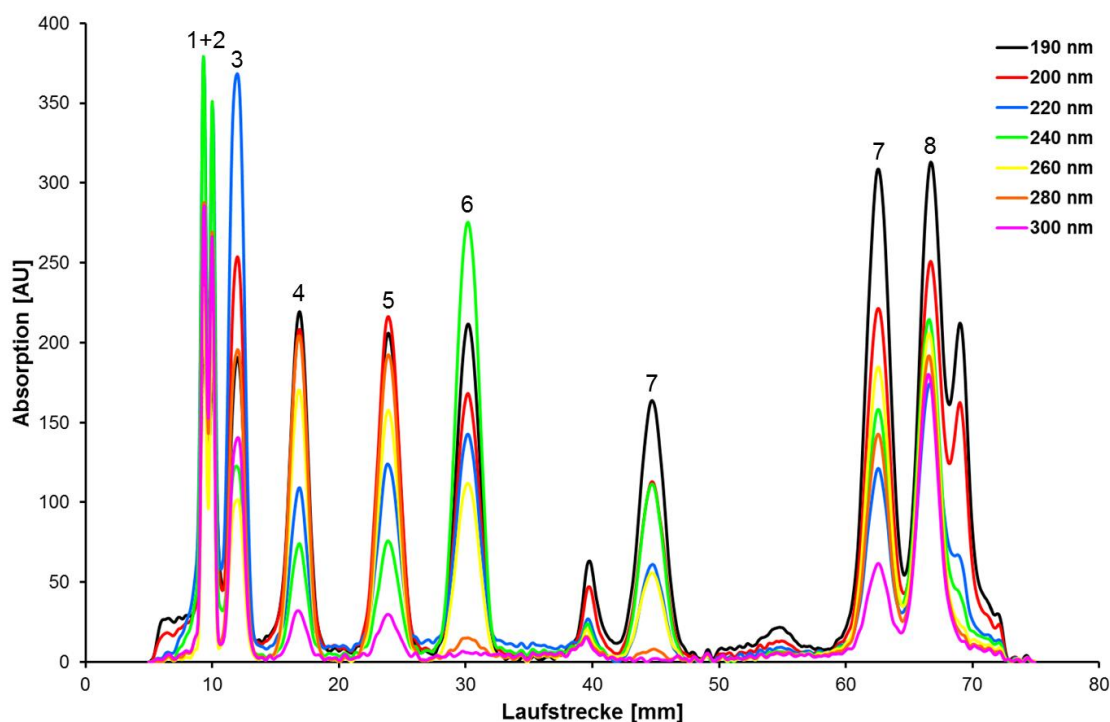
### 4.2.1 Isokratische Trennung

Die Zielsetzung der Entwicklung einer isokratischen HPTLC-Methode ist es eine Probe, trotz Trennung, schnell zu beurteilen. Mit der zu entwickelten Methode sollen die Substanzen möglichst über die gesamte Trennstrecke verteilt werden. Zur Beschreibung der Trennung wird ein Referenzmix herangezogen der aus 9 Substanzen besteht und einen  $\log K_{OW}$ -Bereich von ca. -1 bis 4 abdeckt. In Tabelle 4-1 sind die Substanzen des Kontroll-Mixes samt Strukturformel dargestellt. Für die Naphthalinsulfonsäuren lässt sich kein  $\log K_{OW}$ -Wert angeben, da deren n-Octanol/Wasser-Verteilungsgleichgewicht vom pH-Wert abhängig ist. Zur Polaritätsbeschreibung dieser Substanzen wird der pH-abhängige  $\log D$ -Wert genutzt.

**Tabelle 4-1: Substanzen des Chromatographie-Kontroll-Mix mit Strukturformeln und  $\log K_{OW}$ -Werten. Die  $\log D$ -Werte wurden mit dem „logD Predictor“ von ChemAxon berechnet (<https://disco.chemaxon.com/apps/demos/logd/>, Zugriff: 02.03.2016).**

Nr.	Substanz	Strukturformel	CAS	$\log K_{OW}$
1	1,3,6-Naphthalintrisulfonsäure		86-66-8	$\log D$ ( $\text{pH} \geq 2$ ) -6,61
2	1,5-Naphthalindisulfonsäure		81-04-9	$\log D$ ( $\text{pH} \geq 2$ ) -3,42
3	1-Naphthalinsulfonsäure		85-47-2	$\log D$ ( $\text{pH} \geq 2$ ) -0,22
4	Thioharnstoff		62-56-6	-0,95
5	Theobromin		83-67-0	-0,52
6	Coffein		58-08-2	-0,07
7	Acetanilid		103-84-4	1,16
8	Benzanilid		93-98-1	3,07
9	Dimethylgelb		60-11-7	4,14

Die HPTLC-Methodenentwicklung erfolgte nach dem von Reich und Georg entwickelten Fließschema, bei dem systematisch der Einfluss von Lösemitteln unterschiedlicher Selektivitätsklassen und deren Kombinationen auf die Trennung getestet wird [144]. Mit einem Fließmittel bestehend aus 49 Vol.-%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ / 50 Vol.-% Acetonitril/ 1 Vol.-% Ameisensäure, bei einer Probenauftragehöhe von 10 mm und einer Laufstrecke von 70 mm gelang es, sieben der neun Substanzen zu trennen. Nur die beiden sehr polaren Verbindungen 1,3,6-Naphthalinsulfonsäure und 1,5-Naphthalindisulfonsäure zeigten keine Migration (Abb. 4-4). Diese beiden Substanzen lassen sich mit der isokratischen HPTLC nicht voneinander trennen, ohne gleichzeitig die Trennung der anderen Substanzen zu verschlechtern.



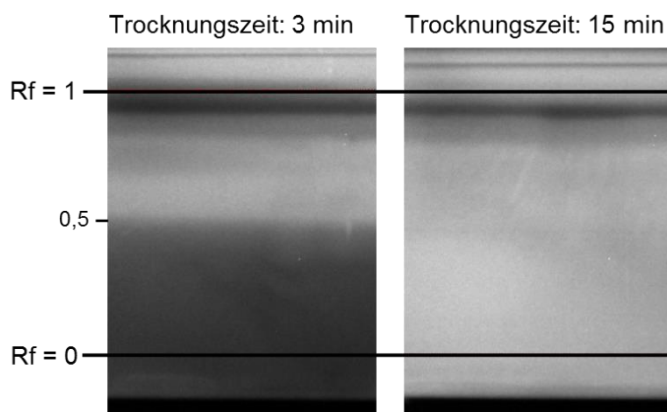
**Abb. 4-4:** Lage der Substanzen aus dem Chromatographie-Kontroll-Mix nach Trennung mit der isokratischen HPTLC-Screening-Methode (1: 1,3,5-Naphthalintrisulfonsäure ( $R_f = 0,00$ ), 2: 1,5-Naphthalindisulfonsäure ( $R_f = 0,00$ ), 3: 1-Naphthalinsulfonsäure ( $R_f = 0,03$ ), 4: Theobromin ( $R_f = 0,13$ ), 5: Coffein ( $R_f = 0,26$ ), 6: Thioharnstoff ( $R_f = 0,33$ ), 7: Acetanilid ( $R_f = 0,60$ ), 8: Benzanilid ( $R_f = 0,86$ ), 9: Dimethylgelb ( $R_f = 0,94$ )).



**Tabelle 4-2: Parametereinstellung der isokratischen HPTLC-Screeningmethode.**

Parameter	Einstellung
Platte	LiChrospher
Probeauftragung	10 mm
Laufstrecke Fließmittel	70 mm
Fließmittel	49 Vol.-% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / 50 Vol.-% Acetonitril / 1 Vol.-% Ameisensäure
Dauer Feuchtigkeitseinstellung (Luftstrom getrocknet durch ein Molekulasieb)	1 min (Rel. Luftfeuchtigkeit: 35 %)
Kammersättigung	15 min
Vorkonditionierung	30 s
Trocknungszeit im Kaltluftstrom	15 min

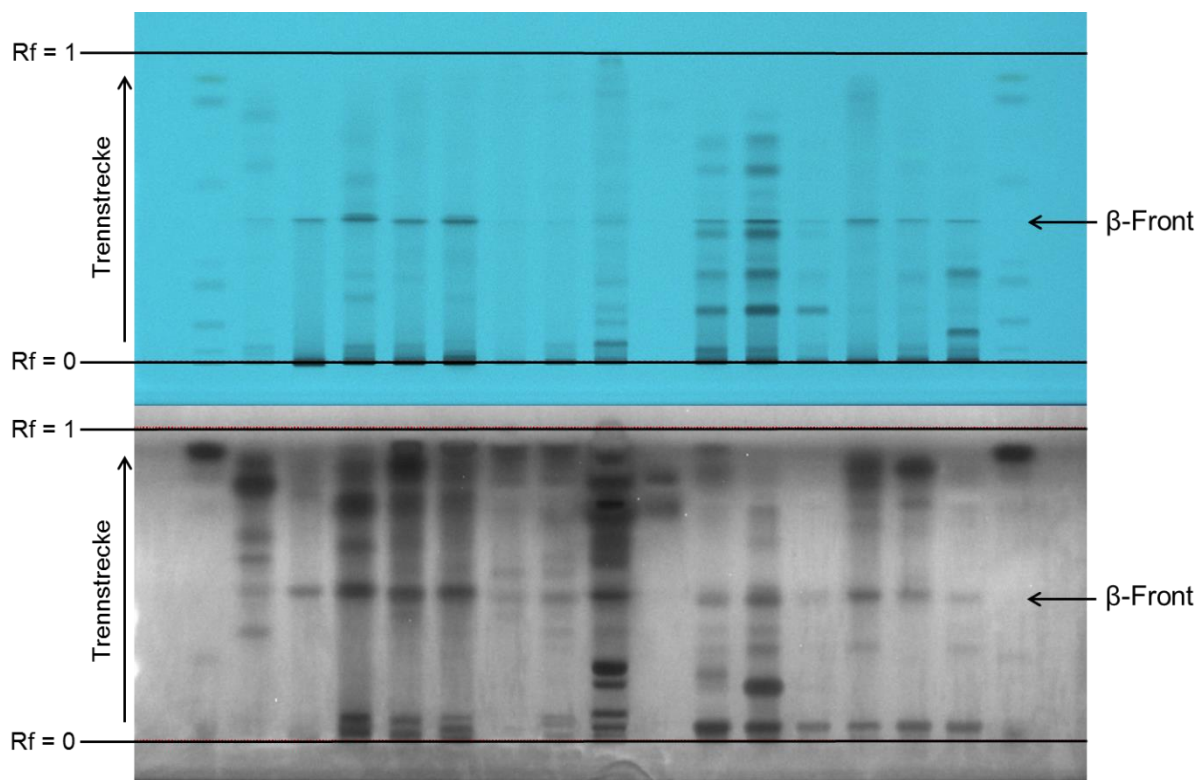
Nach der Trennung mit der beschriebenen Methode muss die Platte für 15 min im Kaltluftstrom getrocknet werden. Bei kürzeren Trocknungszeiten befinden sich noch geringe Spuren an Acetonitril in der Platte, das zu einer Hemmung der Biolumineszenz der Leuchtbakterien führt (Abb. 4-5). Die Hemmung ist nicht über die ganze Platte zu sehen, da es während der Chromatographie zu einer Entmischung der Lösemittel kommt und sich eine sogenannte  $\beta$ -Front ausbildet (Kap. 4.1.1).



**Abb. 4-5: Untersuchung des Einflusses der Trocknungszeit bei der isokratischen HPTLC-Screening-Methode auf die Biolumineszenzhemmung. Die Platten wurden ohne Proben entwickelt.**

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit dieser Trennmethode wurden verschiedene SPE-Extrakte von Deponie- und Kläranlagenproben aufgetragen und getrennt. Bei der Betrachtung der Platte unter einer UV-Lampe bei 254 nm zeigte sich eine Vielzahl gut getrennter Fraktionen, die über den gesamten Chromatographiebereich verteilt sind. Deutlich zu sehen ist die  $\beta$ -Front anhand der gestauchten Banden. Die Laufstrecke der  $\beta$ -Front stimmt mit der Höhe der durch den Rest an Acetonitril verursachten Hemmung überein (Abb. 4-5). Des Weiteren wurde die Platte nach der Entwicklung mit dem Leuchtbakterientest untersucht, da die-

ser auf eine große Anzahl von Verbindungen anspricht. In Abb. 4-6 ist zu erkennen, dass auch die Hemmbanden über den gesamten Rf-Bereich verteilt sind. Damit wird die Eignung dieser isokratischen Trennmethode für ein schnelles Screening bestätigt.



**Abb. 4-6: Isokratische Trennung der SPE-Extrakte von verschiedenen Deponie- und Kläranlagenproben. Oben: Aufnahme der Trennung bei 254 nm. Unten: Detektion der Biolumineszenz-Hemmung von *Aliivibrio fischeri* (Inkubationszeit: 10 min).**

#### 4.2.2 HPTLC/AMD-Trennung

Zur besseren Differenzierung der Wirkung einer Probe ist die höhere chromatographische Auflösung der Gradientenelution mittels HPTLC/AMD notwendig. Doch auch bei dieser Technik wird die Trennleistung durch die limitierte Trennstrecke eingeschränkt.

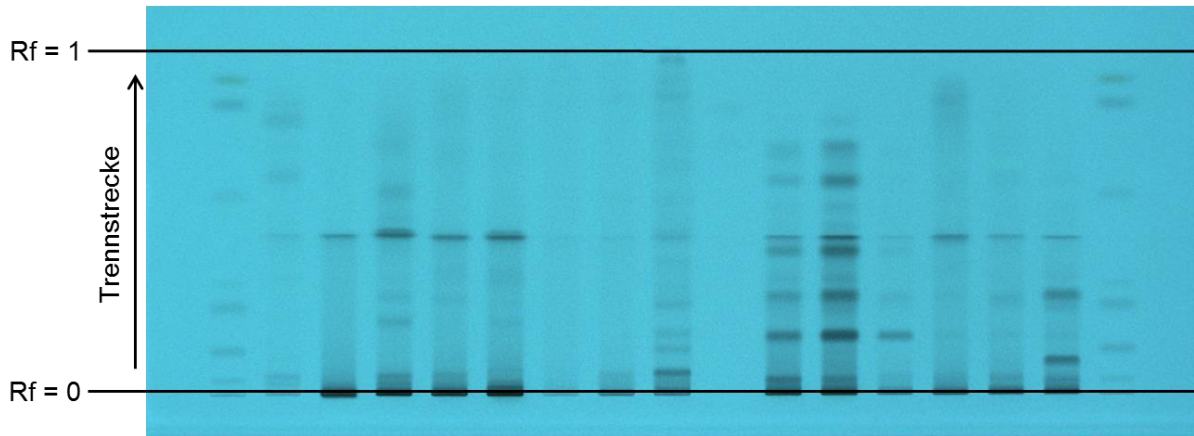
Im Verlauf der Arbeit wurden an verschiedenen Grund-, Deponiesicker- und Abwasserproben unterschiedliche HPTLC/AMD-Gradienten entwickelt. Charakterisiert werden die HPTLC/AMD-Gradienten mit dem Chromatographie-Kontroll-Mix (Tabelle 4-1). In Abb. 4-8 wird eine Übersicht der Trennfähigkeiten der getesteten Gradienten gegeben. Die Rf-Werte der einzelnen Verbindungen sind als farbige Kästchen dargestellt. Die gelb markierten Reihen beschreiben den Rf-Wert (erste Reihe gleich erste Nachkommastelle; zweite Reihe gleich zweite Nachkommastelle). So kann beispielsweise 1,3,6-Naphthalinsulfonsäure bei der Trennung mit Gradient 1 dem Rf-Wert 0,23 zugeordnet werden. Abb. 4-8 zeigt, dass es möglich ist, die Substanztrennung je nach Polaritätsbereich zu optimieren. So wird beim Gradienten 2 die gesamte Trennstrecke gleichmäßig ausgenutzt, um die 9 Referenzverbin-

dungen zu trennen. Gradient 1 trennt zwar auch alle Substanzen, lässt aber im unteren Rf-Bereich noch Platz für weitere Verbindungen mit höherer Polarität. Dafür liegen die Substanzen mit einem Rf-Wert  $> 0,5$  enger beieinander. Zusätzlich ist in dieser Übersicht die isokratische HPTLC-Screening-Methode eingezeichnet. Zu beachten ist, dass die Kästchen nur die Lage der Bande zeigt und nicht deren Breite.

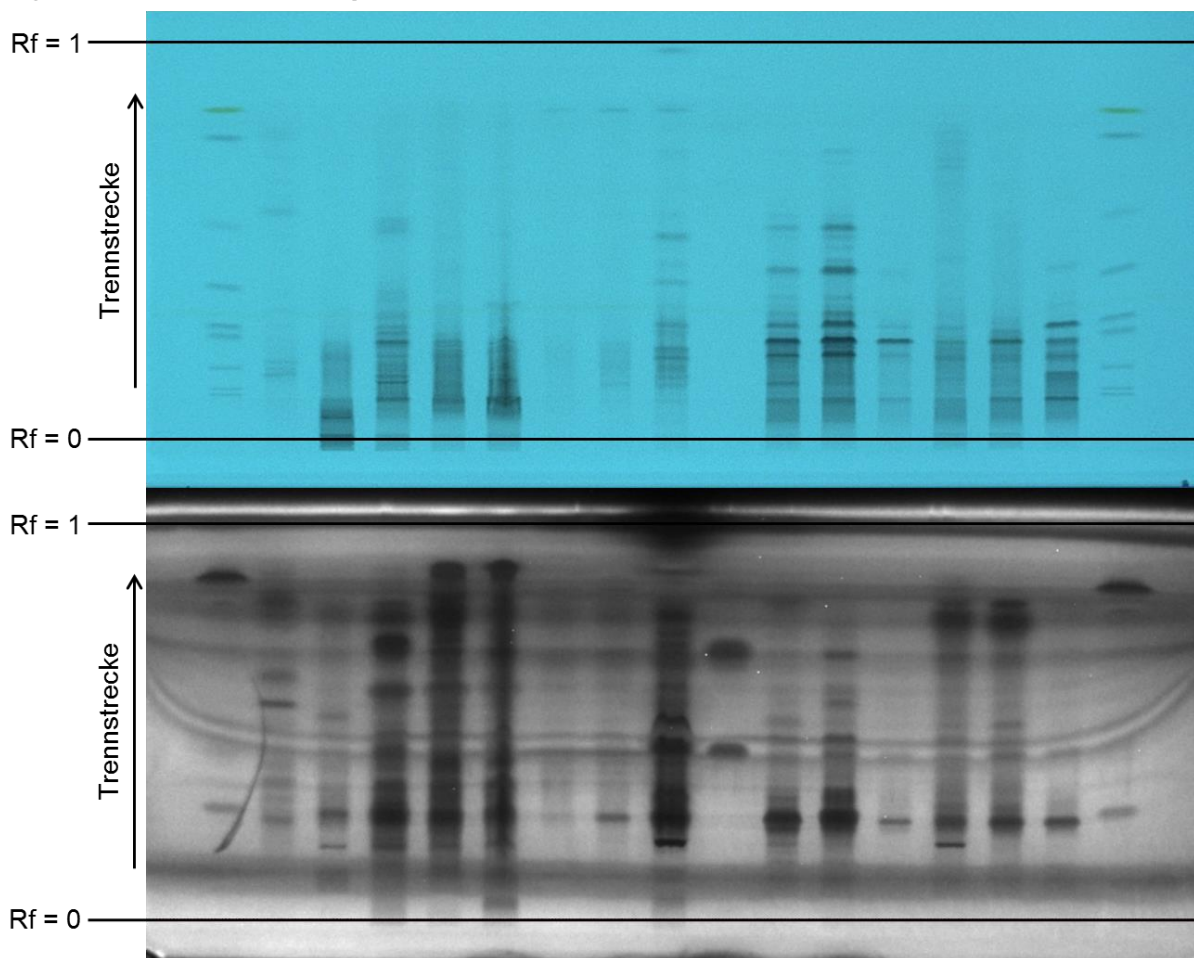
Als Screening-Gradient für unbekannte Proben hat sich Gradient 13 als besonders geeignet erwiesen. Dieser Gradient wurde so angepasst, dass der Rf-Bereich, in dem sich keine wirkenden Verbindungen befanden, verkleinert wurde. Dafür wurde der Rf-Bereich mit den meisten Wirkungen erweitert. Weiterhin ist es möglich mit diesem Gradienten alle 9 Substanzen des Referenzmix zu trennen (Abb. 4-8). Mit einer Entwicklungsdauer des Gradienten von 3 h kann zudem eine zufriedenstellende Effizienz im Probendurchsatz erreicht werden.

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des modifizierten Gradienten wurden dieselben SPE-Extrakte, wie für die isokratische Trennung verwendet. Die verbesserte Trennung im Vergleich zur isokratischen HPTLC-Chromatographie zeigte sich bei der Aufnahme der Platte unter der UV-Lampe bei 254 nm (Abb. 4-7). Hier ist eine große Anzahl sehr feiner Banden zu sehen, die sich über einen weiten Rf-Bereich verteilen. Bei der Detektion der Biolumineszenz-Hemmung von *Aliivibrio fischeri* ist auch die Wirkung nahezu über den gesamten Rf-Bereich verteilt. Für manche Proben ist ein vermeintliches Verschmieren der Hemmung über die gesamte Trennstrecke zu sehen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es sich hier um eine sehr feine Auftrennung der Substanzen handelt, welche aber aufgrund der teilweisen starken Wirkung wieder überlappen.

**A) Isokratische HPTLC-Trennung**



**B) Gradienten-Trennung mittels HPTLC/AMD**



**Abb. 4-7:** Trennung von SPE-Extrakten von verschiedenen Deponie- und Kläranlagenproben mit dem HPTLC/AMD-Gradienten 13. Oben: Aufnahme der isokratischen HPTLC-Trennung bei 254 nm. Mitte: Aufnahme der HPTLC/AMD-Trennung bei 254 nm. Unten: Detektion der Biolumineszenz-Hemmung von *Aliivibrio fischeri* (Inkubationszeit: 10 min).



### 4.3 Zusammenfassung

Zur Untersuchung von unbekanntem Proben ist es sinnvoll diese mit einer Screening-Trennmethode aufzutrennen, welche einen weiten Polaritätsbereich abdeckt. Mit Hilfe eines Mix, bestehend aus 9 Substanzen, konnte die unterschiedliche HPTLC-Trennung beschrieben werden. Anhand dieser Substanzen wurde eine HPTLC/AMD-Trennung entwickelt, die einen weiten Polaritätsbereich abdeckt (log K<sub>OW</sub> von ca. -6 bis 4). Damit auch eine Probe trotz Trennung schnell beurteilt werden kann, wurde eine isokratische HPTLC-Methode entwickelt. Diese ermöglicht trotz geringerer Leistungsfähigkeit eine Auftrennung von Substanzen mit log K<sub>OW</sub>-Werten von ca. -1 bis 4. Der abschließende Test zur Beurteilung der Eignung der entwickelten HPTLC-Methoden für eine Screening-Methode wurde anhand der Auftrennung eines stark belasteten Sickerwassers vorgenommen. Beide Methoden haben dabei ihre Eignung für ein Screening bestätigen können.

## 5 Anpassung der Probenvorbereitung für die HPTLC-WBA

Zur Durchführung der WBA ist für die meisten kontaminierten Wasserproben (z. B. Oberflächenwasser, Grundwasser) eine Anreicherung erforderlich. Die Schwierigkeit der Probenvorbereitung liegt darin, möglichst viele Substanzen zu erfassen. Eine Möglichkeit der Probenanreicherung ist die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE). Hier werden die Substanzen an einem festen Adsorbens angereichert. Im Gegensatz dazu erfolgt bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion (Liquid-Liquid-Extraction, LLE) die Extraktion einer wässrigen Probe mit einem nicht mit der Probe mischbaren organischen Lösemittel.

### 5.1 Festphasenextraktion

#### 5.1.1 Grundlagen

Bei der SPE finden Materialien wie beispielsweise modifizierte Kieselgele oder Polystyroldivinylbenzole mit funktionellen Gruppen, die auch in der Flüssigkeitschromatographie Anwendung. Das Material befindet sich zwischen zwei Fritten in einer Kunststoff- oder Glaskartusche. Die Anreicherung der Analyte erfolgt durch deren Wechselwirkungen mit dem Adsorbens (z. B. Dipol-Dipol-Wechselwirkung, van der Waals-Wechselwirkung, Ionenaustausch, H-Brücken).

Die Durchführung der SPE erfolgt in drei Schritten. Das Festphasenmaterial wird zunächst durch ein geeignetes Lösemittel oder eine Lösemittelabfolge konditioniert (Vorreinigung, Quellen des Adsorbens). Anschließend wird die Wasserprobe durch die Kartusche gesaugt. Dabei adsorbieren die Analyten an der Festphase. Mit einem organischen Lösemittel hoher Elutionskraft (z. B. Methanol) werden die Analyten vom Adsorbens eluiert.

#### 5.1.2 Durchführung und Ergebnisse

Aufgrund von Erfahrungswerte zu SPE-Materialien mit denen viele Substanzen gut angereichert werden, wurden folgende SPE-Materialien für eine Voruntersuchung ausgewählt:

- „Baker SDB 1“
- „Strata SDB-L“
- „Bekolut C18“
- „Agilent Plexa“
- „Agilent PPL“
- „Isolute ENV+“
- „Merck LiChrolut“

Zur Voruntersuchung die Kartuschen mit jeweils 5 mL n-Hexan, Dichlormethan, Aceton, Methanol und pH-Wert angepasstes Reinstwasser konditioniert. Zur Untersuchung des Anreicherungsvermögens wurde Reinstwasser auf pH 2, 7 und 9 mit Schwefelsäure bzw. Natronlauge eingestellt und mit einem Substanzgemisch (siehe Abb. 5-1) von sauren, neutralen und basischen Substanzen dotiert, die einen großen Polaritätsbereich abdecken. Die Elution erfolgte mit insgesamt 6 mL Methanol. Die Bestimmung der 28 Substanzen im SPE-Extrakt erfolgte mit einem HPLC-Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (HPLC-MS/MS). Tabelle 5-1 fasst die Anzahl der extrahierbaren Verbindungen getrennt nach Phase und pH-Wert für eine Wiederfindung größer 50 % zusammen. Keine der Phasen ist bei den genannten Bedingungen imstande alle Substanzen anzureichern.

**Tabelle 5-1: Anzahl der angereicherten Substanzen (total 28) auf den getesteten SPE-Materialien bei unterschiedlichen pH-Werten mit einer Wiederfindung von > 50 %.**

Rang	SPE Material (Anzahl angereicherte Substanzen mit Wiederfindung > 50% von 28 Substanzen)		
	pH 2	pH 7	pH 9
1	Baker SDB 1 (12)	Agilent Plexa (22)	Baker SDB 1 (13)
2	Agilent PPL (9)	Isolute ENV+ (20)	Agilent Plexa (13)
3	Bekolut C18 (9)	Baker SDB 1 (18)	Strata SD-L (12)
4	Merck LiChrolut (7)	Agilent PPL (16)	Merck LiChrolut (11)
5	Agilent Plexa (7)	Merck LiChrolut (16)	Agilent PPL (10)
6	Strata SD-L (5)	Bekolut C18 (14)	Isolute ENV+ (9)
7	Isolute ENV+ (2)	Strata SD-L (13)	Bekolut C18 (7)
Baker SDB 1	Polystyrol-divinylbenzol		Fa. Baker
Agilent Plexa	Polydivinylbenzol		Fa. Agilent
Agilent PPL	Polystyrol-divinylbenzol (modifiziert)		Fa. Agilent
Strata SD-L	Polystyrol-divinylbenzol		Fa. Phenomenex
Merck LiChrolut EN	Ethyl-vinyl-benzol-divinyl-benzol-Polymer		Fa. Merck
Isolute ENV+	Hydroxyliertes Polystyrol-divinylbenzol		Fa. Isolute
Bekolut C18	Kieselgelbasierendes Sorbens mit C18-Funktionalität		Fa. Bekolut

Die Phase „Agilent Plexa“ war dieser Versuchsreihe im neutralen Bereich mit 21 von 28 Substanzen bei einer Wiederfindung > 50% am besten. Abb. 5-1 zeigt für diese Phase den Mittelwert der Wiederfindung (N = 3) bei pH 2, pH 7 und pH 9 für die untersuchten Substanzen. Die Substanzen sind dabei nach abnehmenden logarithmierten Octanol-Wasser-



Verteilungskoeffizienten ( $\log K_{ow}$ ) angeordnet. Dieser beschreibt u. a. die Polarität von Substanzen ( $>3$  eher apolar,  $<2$  eher polar).

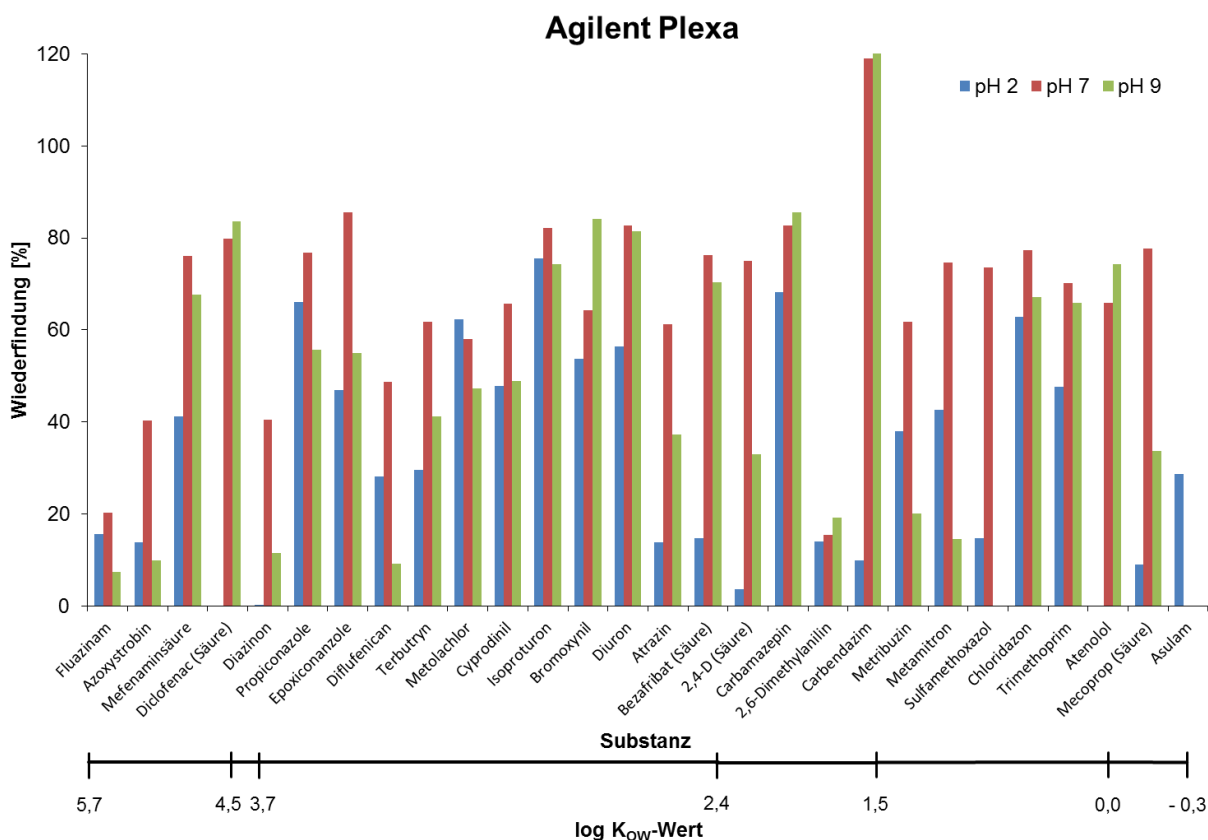


Abb. 5-1: Vergleich des Mittelwertes (N=3) der Wiederfindung für „Agilent Plexa“ bei pH 2 (blau), pH 7 (rot) und pH 9 (grün) für Substanzen geringer (Fluazinam log Kow 5,7) bis hoher Polarität (Asulam log Kow -0,3).

Bei pH 2 werden die meisten Substanzen mit „Baker SDB 1“ erfasst (11 von 28). Bei pH 9 konnten ebenfalls mit „Baker SDB 1“ und mit „Agilent Plexa“ jeweils 12 von 28 Substanzen angereichert werden. Durch eine kombinierte Anwendung von „Agilent Plexa“ bei pH 7 und „Baker SDB 1“ für pH 2 und pH 9 könnten 24 der 28 eingesetzten Substanzen mit einer Wiederfindungsrate  $> 50\%$  erfasst werden.

Auffallend ist, dass die Anreicherung von sauren Verbindungen wie beispielsweise Diclofenac, Bezafibrat oder 2,4-D aus dem auf pH 2 angesäuerten Wasser schlechte Wiederfindungen aufzeigen. Daher wurde für die nachfolgende Untersuchung die Elution angepasst.

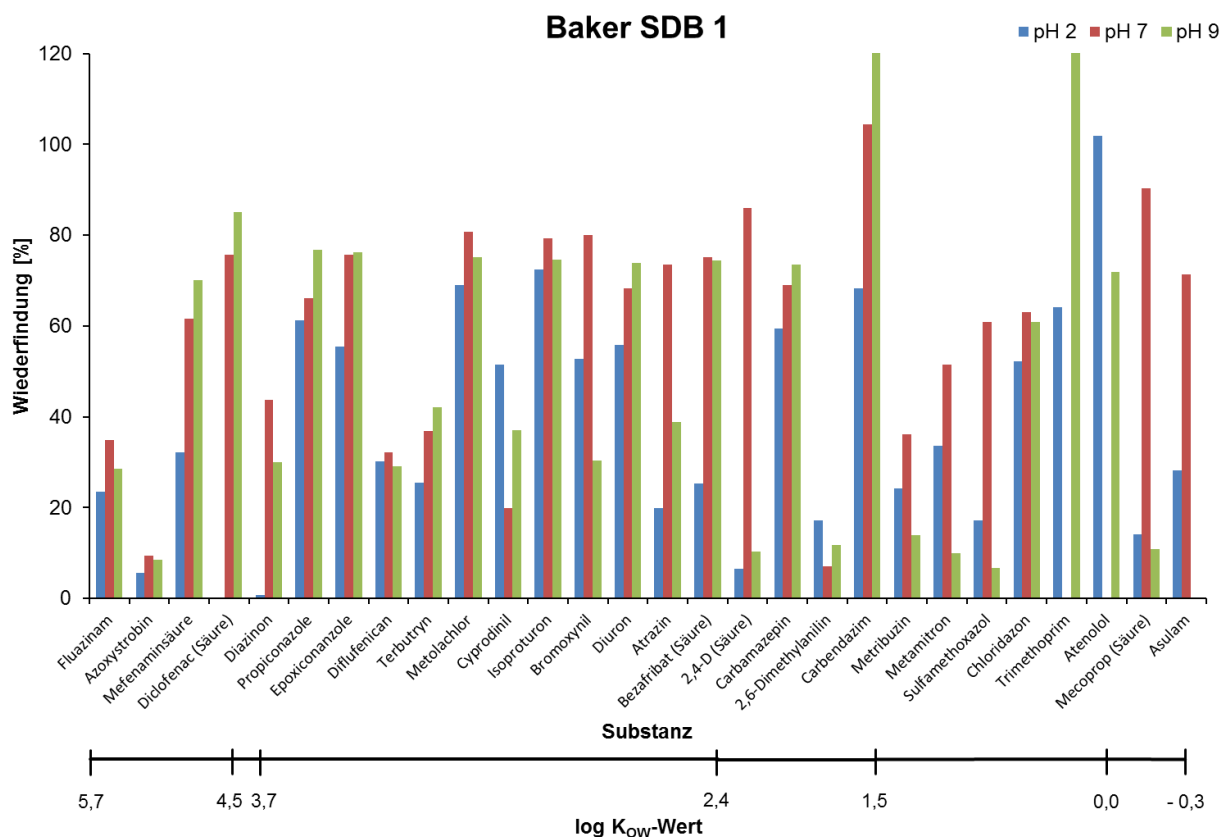


Abb. 5-2: Vergleich des Mittelwertes (N=3) der Wiederfindung für „Baker SDB 1“ bei pH 2 (blau), pH 7 (rot) und pH 9 (grün) für Substanzen geringer (Fluazinam log Kow 5,7) bis hoher Polarität (Asulam log Kow -0,3).

### **Blindwertuntersuchung verschiedener SPE-Materialien bei verschiedenen Extraktionsbedingungen**

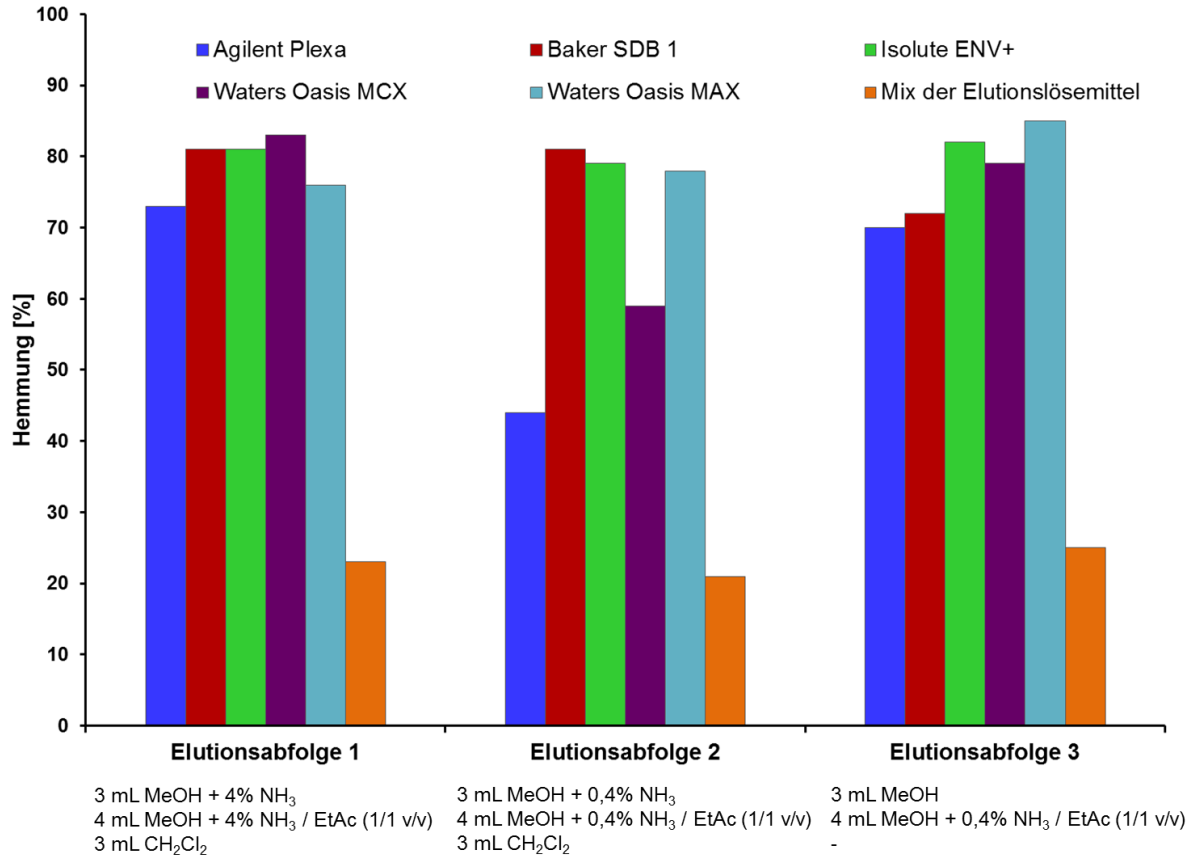
Für die Untersuchung wurden SPE-Materialien ausgewählt, welche ein besonders großes Spektrum an Substanzen erfassen. Bei der Auswahl der Materialien wurde die Wiederfindungstabelle aus der Voruntersuchung herangezogen. Dabei wurde nicht nur die Menge der Substanzen mit einer Wiederfindung > 20 % berücksichtigt, sondern zusätzlich noch die Anzahl an Substanzen, welche mit einer Wiederfindung > 50 % erfasst werden können. Ausgewählt wurden dabei die SPE-Materialien „Baker SDB“, „Agilent Plexa“ und „Isolute ENV+“. Erweitert wurde die Auswahl um SPE-Materialien mit der auf der Polymerphase noch eine zusätzlich Ionenaustauschfunktionalitäten besitzen. Dabei handelt es sich um „Oasis MAX“ (Anionenaustauscherfunktionalität) und „Oasis MCX“ (Kationenaustauscherfunktionalität).

Für die Blindwertuntersuchung wurden die SPE-Kartuschen konditioniert, danach ohne Anreicherung einer Probe direkt getrocknet und eluiert. Während der Elution wurde das Extrakt vor-

sichtig unter erwärmten Stickstoff (40 °C) eingeengt und am Schluss in 1 mL Methanol aufgenommen. Die Konditionierung wurde von der Voruntersuchung übernommen. Parallel zur SPE-Elution wurde das gleiche Volumen an Elutionslösemitteln eingeengt. Damit lässt sich der Anteil des Blindwerts aus den Lösemitteln zu ermitteln. Anschließend erfolgte die Auftragung von 300 µL der Extrakte auf eine Fläche von 5 \* 5 mm sowie die Tauchung der Platte in eine Leuchtbakteriensuspension (Abb. 5-3, Elutionsabfolge 1). Deutlich zu sehen ist, dass der Blindwertanteil aus dem Elutionsmittel zu vernachlässigen ist. Die Extrakte aller drei SPE-Kartuschen erzeugen einen massiven Blindwert. Ein Unterschied konnte nicht festgestellt werden.

In einem nachfolgenden Versuch (Abb. 5-3, Elutionsabfolge 2) wurde der NH<sub>3</sub>-Anteil im ersten Elutionsschritt von 4 % auf 0,4 % reduziert. Dabei reduzierte sich der Blindwert besonders deutlich für „Agilent Plexa“. Ein Versuch, bei welchem komplett auf das ammoniakalische Methanol für die SPE-Extraktion zu verzichtet wurde, verbesserte den Blindwert nicht. Wurde während der Konditionierung sowie der Elution auf Dichlormethan verzichtet, verschlechterte sich der Blindwert (Abb. 5-3, Elutionsabfolge 3).

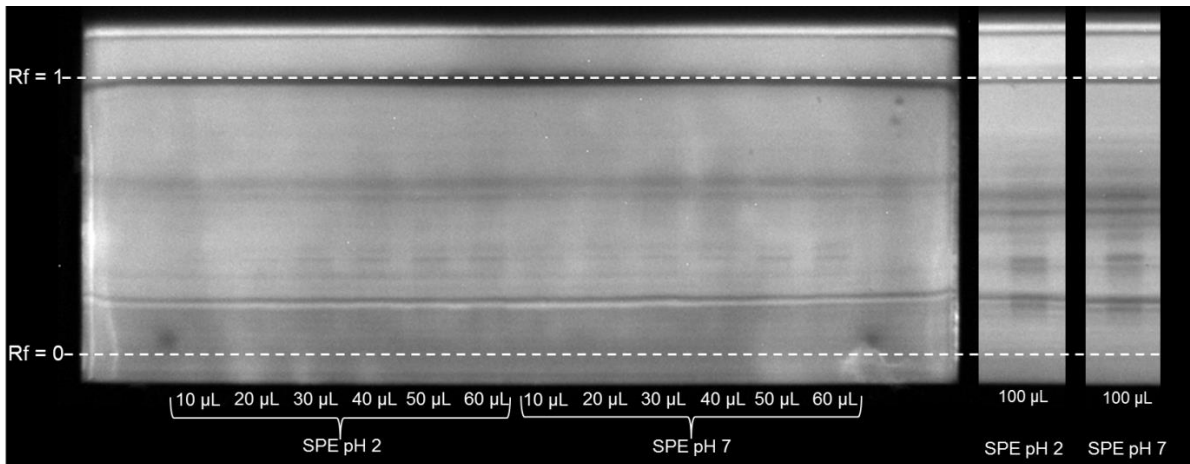
Da das SPE-Material „Agilent Plexa“ mit der Elutionsabfolge 2 die geringste Hemmung aufweist, wurde, für diese SPE-Methode in den nachfolgenden Versuchen das maximale Auftragevolumen ohne das störende Blindwerte auftreten und die Wiederfindung des genannten Substanzmix ermittelt.



**Abb. 5-3: Untersuchung der durch die ausgewählten SPE-Materialien erzeugten Hemmwerte bei einer Flächenauftragung von 5 \* 5 mm auf *Aliivibrio fischeri*. Die Kartuschen für die Elutionsabfolgen 1 und 2 folgendermaßen konditioniert: 5 mL n-Hexan, Dichlormethan, Aceton, Methanol, Laborreinstwasser (pH 7). Für die Elutionsabfolge 3 wurde bei der Konditionierung auf Dichlormethan verzichtet. Für das SPE-Material mit Anionenaustauscherfunktionalität „Oasis MAX“ wurde Methanol mit 2 V% bzw. 0,2 V% Ameisensäuren anstelle von Ammoniak verwendet.**

### **Ermittlung des maximalen Auftragevolumens von SPE-Extrakten**

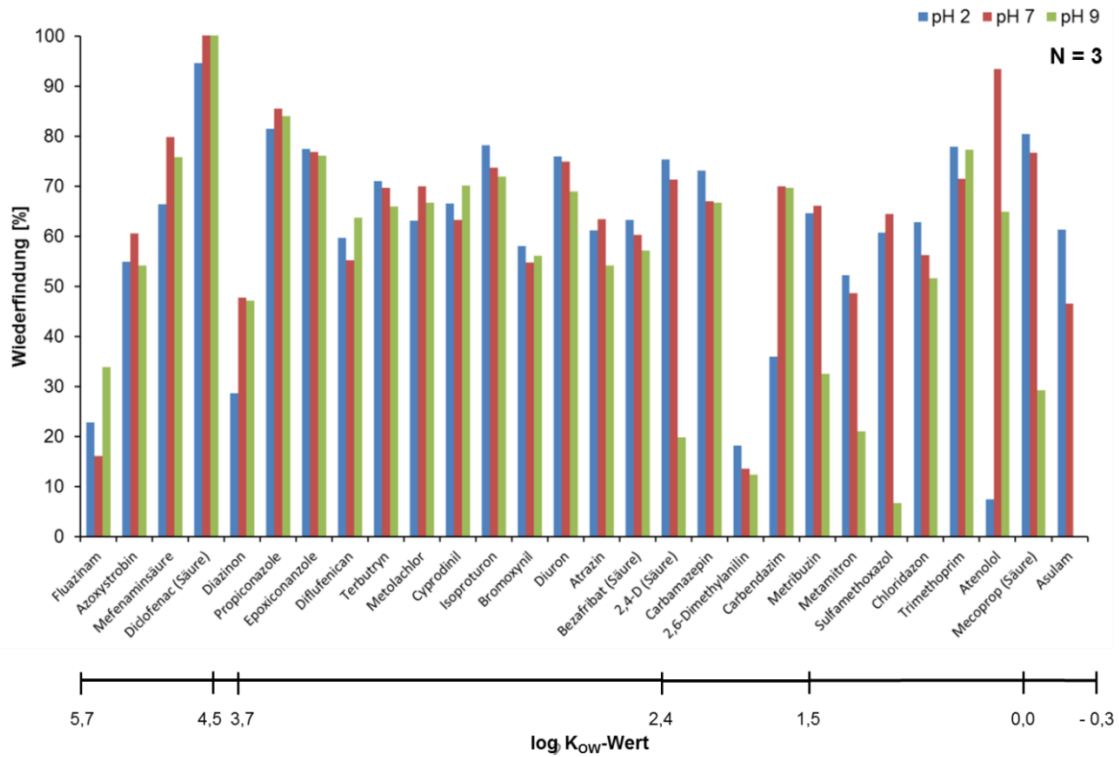
Auch wenn der Blindwert durch die angepasste Elution reduziert werden konnte, so muss er dennoch weiterhin beachtet werden. Deshalb wurden unterschiedliche Volumina des Extrakts der verbesserten SPE-Methode auf eine HPTLC-Platte aufgetragen, mit dem HPTLC/AMD-Gradienten 9 entwickelt und in eine Leuchtbakteriensuspension getaucht. In Abb. 5-4 ist zu sehen, dass ein Auftragevolumen von 60  $\mu\text{L}$  von dem SPE-Extrakt auf die Platte aufgetragen werden kann, ohne dass die SPE-Blindwerte die Analyse stören. Ab einem Auftragevolumen von 100  $\mu\text{L}$  sind die ersten stärkeren Blindwert-Hemmbanden zu sehen. Für die Untersuchung von Umweltproben bedeutet dies, dass bei Sauberwässern ein größerer Anreicherungsfaktor benötigt wird. Daher sollte für die Untersuchung von Sauberwässern ein Anreichervolumen von 1 L gewählt werden.



**Abb. 5-4: Ermittlung des maximalen Auftragevolumens des SPE-Extraktes von „Agilent Plexa“ nach angepasster Elution für den HPTLC-Biolumineszenz-Hemmtest.**

#### **5.1.3 Untersuchung der Wiederfindung mit „Agilent Plexa“ und angepasster Elution**

Nach der Blindwerteuntersuchung wurde das SPE-Sorbens „Agilent Plexa“ ausgewählt und die Wiederfindung, analog zur Voruntersuchung, anhand der Wiederfindung von 28 Referenzverbindungen geprüft. Konditioniert und eluiert wurde das Material mit der in Abb. 5-3 gezeigten Elutionsabfolge 2. Die Extraktion mit den drei Anreicherungs-pH-Werten wurde jeweils dreimal wiederholt. Das Ergebnis ist in Abb. 5-5 als Säulendiagramm dargestellt.



**Abb. 5-5: Wiederfindung eines Referenzmix für das SPE-Sorbens „Agilent-Plexa“ für die pH-Werte 2, 7 und 9 mit der angepassten Elution.**

Bei einer Einordnung der Wiederfindungen für „Agilent Plexa“ mit angepasster Elution im Vergleich zu den anderen Materialien zeigte sich, dass das „Agilent Plexa“ zur Spitzengruppe bezogen auf die Anreicherung von Substanzen mit einer Wiederfindung > 20 % zählt. Wenn zusätzlich die Wiederfindung über 50 % berücksichtigt wird, ist dieses Sorbens mit der angepassten Elution das beste Material bei gleichzeitig vermindertem Blindwert (siehe Tabelle 5-2).

**Tabelle 5-2: Anzahl der angereicherten Substanzen (total: 28) auf den getesteten SPE-Materialien bei unterschiedlichen pH-Werten mit einer Wiederfindung von > 20 %. In roter Schrift ist die Einordnung der verbesserten Elution für das SPE-Material „Agilent Plexa“ zu sehen.**

**Sortiert nach pH-Wert und Wiederfindung >20%**

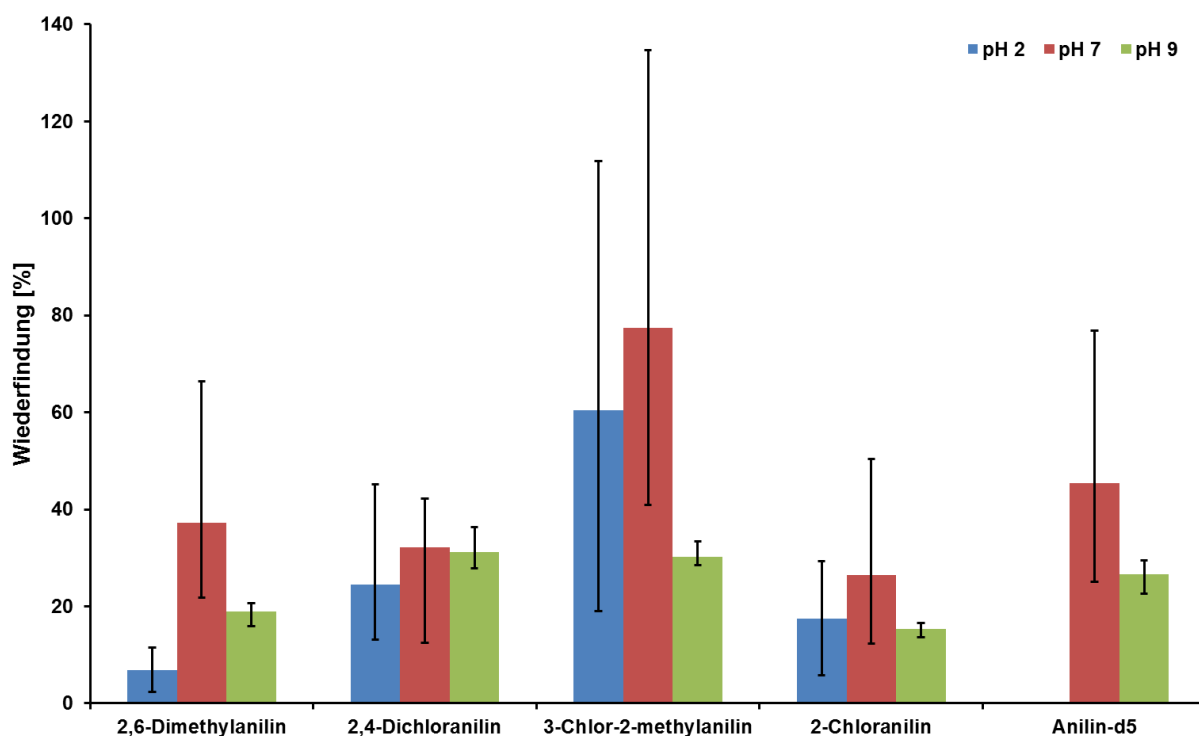
pH-Wert	Material	Anzahl > 20 %	Anzahl > 50 %
pH 2	Waters Oasis MCX (4)	26	12
	Waters Oasis MAX (5)	26	12
	<b>Agilent Plexa (2)</b>	<b>26</b>	<b>23</b>
	Baker SDB (1)	20	12
	Agilent PPL (1)	20	9
	Waters Oasis MCX (3)	20	4
	Bekulut C18 (1)	19	9
	Merck LiChrolut (1)	19	8
	Agilent Plexa (1)	16	7
	Strata SDL (1)	14	5
Isolute ENV+ (1)	10	2	
pH 7	Waters Oasis MCX (4)	27	13
	<b>Agilent Plexa (2)</b>	<b>26</b>	<b>23</b>
	Strata SDL (1)	26	13
	Agilent Plexa (1)	26	22
	Agilent PPL (1)	26	16
	Isolute ENV+ (1)	25	20
	Merck LiChrolut (1)	25	16
	Waters Oasis MAX (5)	25	14
	Baker SDB (1)	23	18
	Bekulut C18 (1)	21	14
Waters Oasis MCX (3)	21	6	
pH 9	Waters Oasis MCX (4)	27	16
	<b>Agilent Plexa (2)</b>	<b>23</b>	<b>19</b>
	Waters Oasis MAX (5)	24	9
	Agilent PPL (1)	22	10
	Waters Oasis MCX (3)	21	5
	Baker SDB (1)	20	13
	Strata SDL (1)	20	12
	Agilent Plexa (1)	20	13
	Merck LiChrolut (1)	19	11
	Isolute ENV+ (1)	17	9
Bekulut C18 (1)	16	7	

Elutionsabfolgen:

- (1) 6 mL Methanol
- (2) 3 mL Methanol + 0,4 % NH<sub>3</sub>, 4 mL Methanol + 0,4 % NH<sub>3</sub>/EtAc (1/1), 3 mL Dichlormethan
- (3) 3 mL Methanol, 4 mL Methanol-EtAc + 0,2 % NH<sub>3</sub>, 3 mL Dichlormethan
- (4) 3 mL Methanol + 4 % NH<sub>3</sub>, 4 mL Methanol + 0,4 % NH<sub>3</sub> / EtAc (1/1), 3 mL Dichlormethan
- (5) 3 mL Methanol + 2 V% HCOOH, 4 mL Methanol + 0,2 % HCOOH / EtAc (1/1), 3 mL Dichlormethan

**Untersuchungen zur SPE-Anreicherung von Anilin und Anilin-Derivaten**

Die Wiederfindung mit dem SPE-Sorbens „Agilent Plexa“ liegt für die meisten untersuchten Substanzen mit Ausnahme von 2,6-Dimethylanilin bei mindestens einem der untersuchten pH-Werte bei über 50 %. Anilin-Derivate gehören aber zu den Substanzen, die häufig in Altlastenstandorte gefunden werden. Daher wurden fünf Aniline mit der in Kapitel 5.1.2 beschriebenen angepassten Methode angereichert und mittels GC-MS deren Wiederfindung bestimmt. In Abb. 5-6 sind die Ergebnisse dargestellt. Hierbei wurden die Proben auf wenige Mikroliter eingengt.



**Abb. 5-6: Wiederfindungen von Anilin und Anilin-Derivate für das SPE Sorbens „Agilent Plexa“ bei den pH-Werten 2, 7 und 9 mit der angepassten Elution (N = 3, Fehlerbalken: Minimum bzw. Maximum).**

In der DIN 38407 F16 „Bestimmung von Anilin-Derivaten mittels Gaschromatographie“ [145] gibt den Hinweis, dass diese Substanzen sehr empfindlich beim Einengen des Eluats sind. Besonders das Einengen unter 1 mL kann zu Substanzverlusten führen. Zudem wird bei der DIN-Methode nach der Anreicherung dem Eluat ein interner Standard zugesetzt, um Volumenschwankungen beim Aufkonzentrieren zu korrigieren.



In einem weiteren Anreicherungsversuch wurde darauf geachtet, dass das Eluat nur bis zu einem Volumen von 1 mL eingengt wird. Die Zugabe eines internen Standards zur Korrektur der Volumenschwankung ist bei der WBA nicht möglich. In Abb. 5-7 sind die Wiederfindungen gezeigt. Bei mindestens einem der drei Anreicherungs-pH-Werten wird eine Wiederfindung von mindestens 60 % erreicht. Auch die Streuungen haben sich in den meisten Fällen verringert, aber oftmals immer noch über einen weiten Bereich erstreckt. Es ist davon auszugehen, dass dieses Ergebnis auf andere mittelflüchtige Verbindungen übertragbar ist. Bei der wirkungsbezogenen Untersuchung eines entsprechend belasteten Altlastenstandorts ist daher, auch bei Einhaltung eines Minimalenvolumens von 1 mL beim Einengen, mit einer größeren Streuung der detektierten Wirkungen zu rechnen.

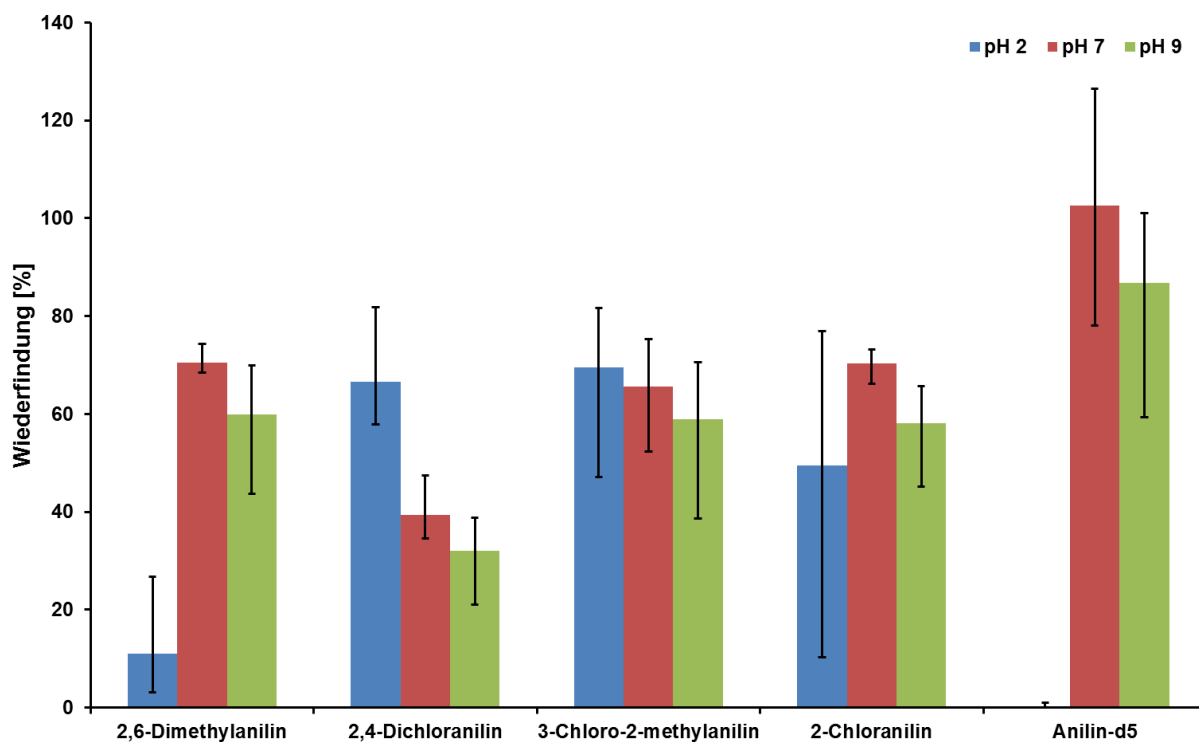
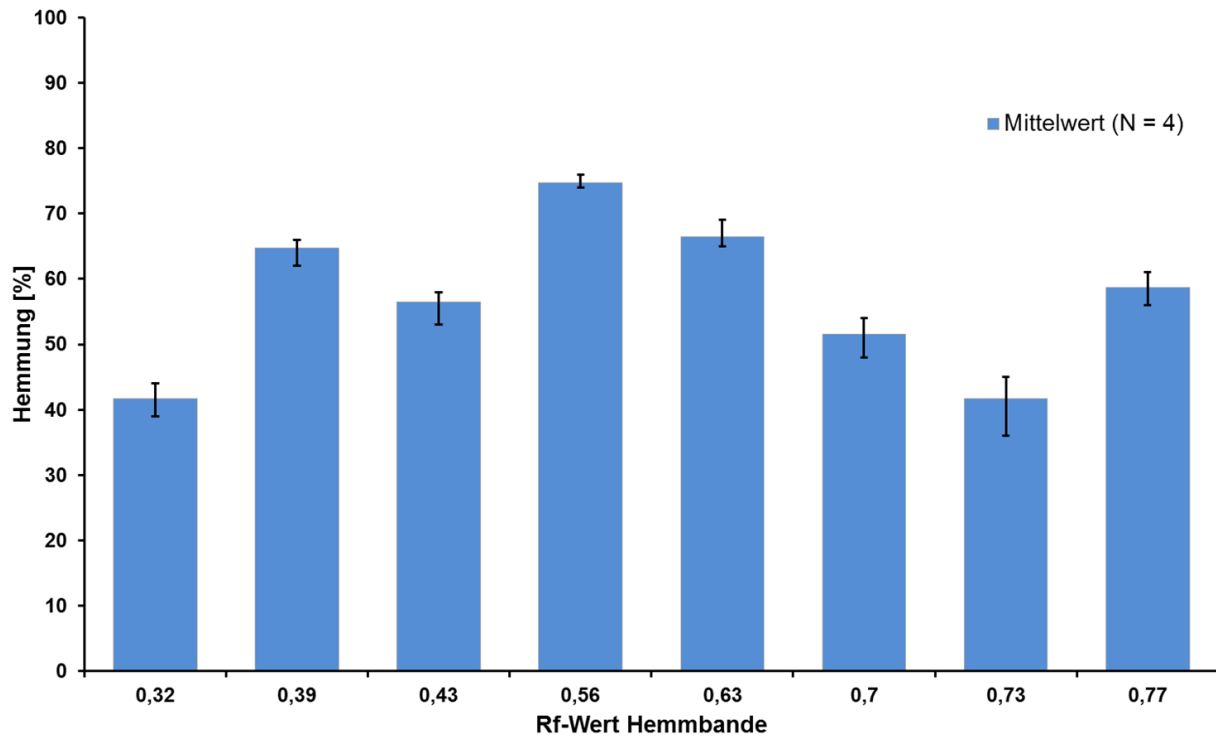


Abb. 5-7: Wiederfindungen von Anilin und Anilin-Derivate für das SPE Sorbens „Agilent Plexa“ bei den pH-Werten 2, 7 und 9 und Begrenzung des Einengvolumen auf 1 mL (N =3, Fehlerbalken: Minimum bzw. Maximum).

**Wiederholbarkeit bei der Anwendung auf Wasserproben**

Die Überprüfung der Wiederholbarkeit der optimierten SPE erfolgte an einer Deponiesickerwasserprobe bei pH 2, 7 und 9 jeweils viermal parallel. Das Probenvolumen von 20 mL wurde auf ein Extraktvolumen von 1 mL angereichert. Alle Extrakte wurden auf eine HPTLC-Platte aufgetragen und entwickelt. Damit soll der Einfluss der Messunsicherheit bei der Biolumineszenzdetektion minimiert werden. Die Auswertung erfolgt nach dem in Kapitel 3.1 beschriebenen Verfahren. In Abb. 5-8 sind die Mittelwerte mit Minimal- und Maximalwerte bei der pH 7 Anreicherung gezeigt. Die Hemmwerte der Banden bei gleichen Extraktions-pH-Werten und Rf-Werten zeigten Abweichungen von 1,6 – 8,4 % ( $\pm 2 \times$  Standardabweichung) (siehe Tabelle 5-3 und Tabelle 5-4). Die Abweichungen liegen damit im Bereich der Messgenauigkeit bei der Bestimmung der Biolumineszenzhemmung (siehe Kapitel 3.1.2).



**Abb. 5-8: Bestimmung der Wiederholbarkeit der optimierten SPE-Extraktion bei pH 7 einer Deponiesickerwasserprobe (N = 4) anhand von Biolumineszenzhemmbanden nach HPTLC/AMD-Trennung (Gradient 13). Fehlerbalken geben Mini- bzw. Maximalwerte an.**

**Tabelle 5-3: Übersicht der Wiederholbarkeit der optimierten SPE bei pH 2 und 7 einer Deponiesickerwasserprobe nach HPTLC/AMD-Trennung und Detektion der Biolumineszenzhemmung.**

SPE pH 2 (Sickerwasser Sondermüldeponie)					SPE pH 7 (Sickerwasser Sondermüldeponie)				
Bande (Rf)	Mittelwert Hemmung (N = 4) [%]	Minimum Hemmung [%]	Maximum Hemmung [%]	Standard-abweichung (Absolut) [%]	Bande (Rf)	Mittelwert Hemmung (N = 4) [%]	Minimum Hemmung [%]	Maximum Hemmung [%]	Standard-abweichung (Absolut) [%]
0,32	40	39	42	1,1	0,32	42	39	44	1,8
0,39	62	61	63	0,8	0,39	65	62	66	1,6
0,43	56	56	57	0,4	0,43	57	53	58	2,1
0,48	53	47	57	4,2	0,56	75	74	76	0,8
0,56	73	71	74	1,1	0,63	67	65	69	1,7
0,63	64	62	65	1,3	0,70	52	48	54	2,3
0,70	52	51	53	0,8	0,73	42	36	45	3,4
0,73	55	52	58	2,5	0,77	59	56	61	1,9
0,77	57	56	60	1,6	0,81	61	60	62	0,7
0,81	58	55	59	1,7					

**Tabelle 5-4: Übersicht der Wiederholbarkeit der optimierten SPE bei pH 9 einer Deponiesickerwasserprobe nach HPTLC/AMD-Trennung und Detektion der Biolumineszenzhemmung.**

SPE pH 9 (Sickerwasser Sondermüldeponie)				
Bande (Rf)	Mittelwert Hemmung (N = 4) [%]	Minimum Hemmung [%]	Maximum Hemmung [%]	Standard-abweichung (Absolut) [%]
0,32	41	39	42	1,2
0,39	62	60	63	1,2
0,43	53	51	54	1,2
0,56	74	73	75	0,8
0,63	65	64	66	0,8
0,7	51	49	52	1,2
0,73	43	41	44	1,2
0,77	59	59	60	0,5
0,81	59	57	63	2,6

## 5.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion

### 5.2.1 Grundlagen

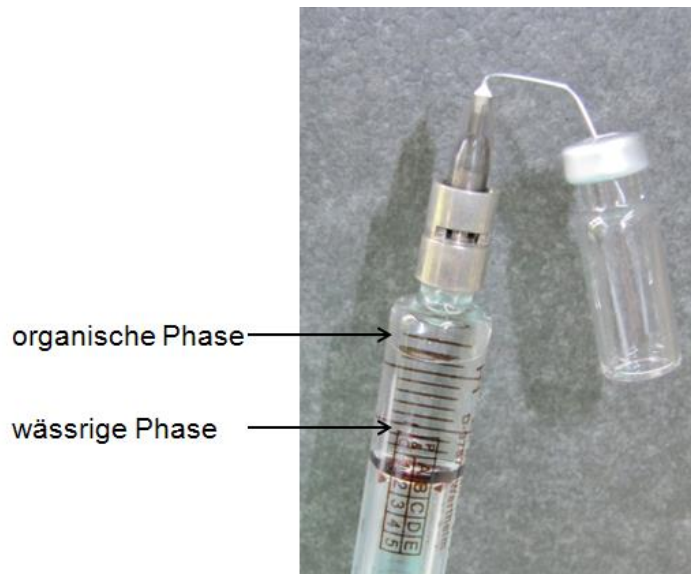
Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion (Liquid-Liquid-Extraction, LLE) findet eine Verteilung der Analyten nach dem Nernst'schen Verteilungsgesetz zwischen den Phasen statt. Dabei reichern sich eher unpolare Verbindungen Substanzen im organischen Lösemittel an. Die Extraktionsausbeute für polare und damit gut wasserlösliche Verbindungen kann durch die Anwendung von polaren Extraktionsmitteln (z. B. Acetonitril) deutlich verbessert werden. Da diese Extraktionsmittel mit Wasser mischbar sind, muss zur Phasentrennung ein inerte Elektrolyt (z. B. NaCl) zur Erhöhung der Ionenstärke (Aussalzeffekt) zugegeben werden. Bei der LLE lassen sich durch Ausnutzen der Mischungslücke sehr polare Substanzen besser anreichern als bei der SPE

[146]. Durch die Anwendung der Mikro-LLE werden der Verbrauch an organischem Lösemittel sowie das benötigte Probenvolumen deutlich reduziert. Liu et al. führte die Mikro-LLE in einer Spritze mit Acetonitril durch [147]. Acetonitril ist im Vergleich zu vielen anderen organischen Lösemitteln in einer hohen Reinheit erhältlich.

### 5.2.2 Durchführung und Ergebnisse

Für die Mikro-LLE-Versuche wurde Reinstwasser auf pH 2, pH 7 und pH 9 eingestellt und jeweils mit 300 ng/L des in Kapitel 5.1 beschriebenen Substanzgemisches aus neutralen, sauren und basischen Substanzen dotiert. Das Probenvolumen betrug 2 mL. Darin wurden 600 mg NaCl gelöst und danach wurde nach Zusatz von 600  $\mu$ L Acetonitril durch einminütiges durchmischen mit einer Vortex-Apparatur extrahiert.

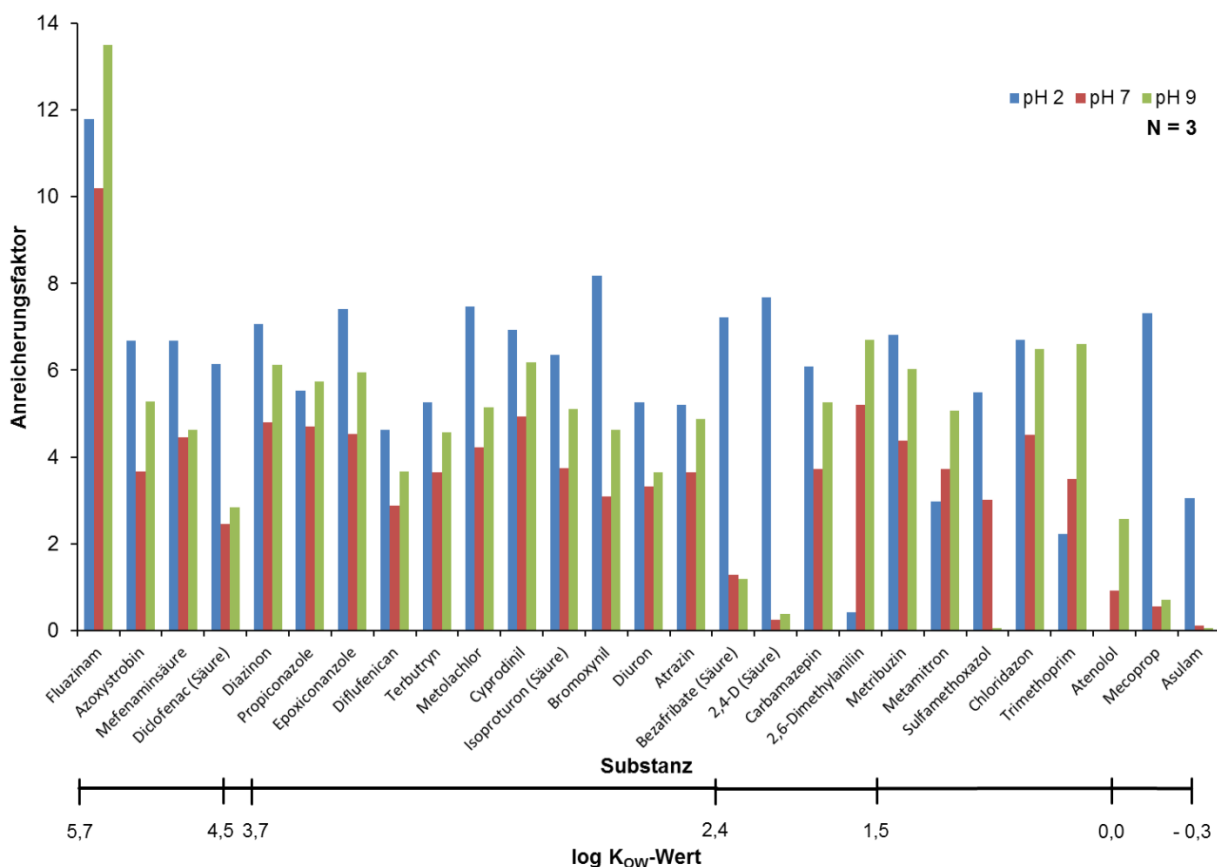
Zur Phasentrennung wurde das Extraktionsgemisch aus dem Extraktionsgläschen in eine Glasspritze überführt. Nach der Phasentrennung wurde die organische Phase über eine Kanüle in ein Probengläschen überführt (Abb. 5-9). Die Bestimmung der Konzentrationen der zugegebenen Substanzen in der Acetonitril-Phase erfolgte mittels HPLC-MS/MS.



**Abb. 5-9: Phasentrennung in einer Glasspritze und Überführung der organischen Phase in ein Vial.**

In Abb. 5-10 sind die Anreicherungsfaktoren der Mikro-LLE für das Extraktionsmittel Acetonitril bei drei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Die Substanzen sind nach abnehmenden  $\log K_{ow}$

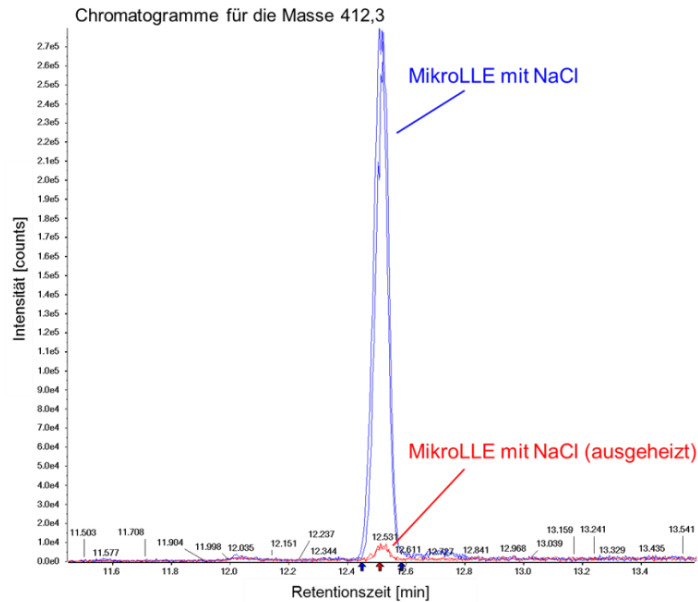
angeordnet. Es zeigt sich, dass sich 70% der getesteten Verbindungen durch die Mikro-LLE mit Acetonitril mit einem Faktor >6 anreichern lassen.



**Abb. 5-10: Vergleich der Anreicherungsfaktoren der Mikro-LLE mit Acetonitril bei pH 2 (blau), pH 7 (rot) und pH 9 (grün), für Substanzen geringer (Fluazinam log Kow 5,7) bis hoher Polarität (Asulam log Kow -0,3).**

Zur ersten Prüfung der Eignung der Mikro-LLE als Probenvorbereitung für ein Screening von Realproben (Oberflächenwasserprobe, Donau) kam ein HPLC-TOFMS zum Einsatz. Um die zusätzliche Anzahl an Substanzen zu ermitteln, die nach der Anreicherung detektiert werden können, wurde einmal 100 µL Donauprobe ohne Anreicherung (Direktinjektion) und einmal der Acetonitril-Extrakt injiziert. Alle in der Direktinjektion gefundenen Komponenten konnten auch im Extrakt nachgewiesen werden, d. h. es wird keine der mit Elektrospray-Ionisation (ESI) erfassbaren Substanz diskriminiert. Darüber hinaus wurden im Extrakt ca. 4000 zusätzliche Komponenten detektiert, wovon aber ca. 700 Komponenten auch im Blindwert zu sehen waren. Eine Hauptquelle von Kontaminanten war das verwendete NaCl. Durch Ausheizen bei 450 °C für eine Stunde konnte der Blindwert signifikant gesenkt werden.

Die vergleichende statistische Auswertung der HPLC-TOFMS Daten für den Extrakt ohne ausgeheiztem NaCl und den Extrakt mit ausgeheiztem NaCl mittels Hauptkomponentenanalyse in Kombination mit der Diskriminanzanalyse ergab eine Reduktion der Komponentenanzahl um 80 %. Abb. 5-11 zeigt beispielhaft für die Substanz mit der Masse 412,3 eine Reduktion der Signalintensität > 95 % bei Verwendung von ausgeheiztem NaCl. Daher wird bei der Mikro-LLE bei 450 °C ausgeheiztes NaCl zur Phasentrennung verwendet.



**Abb. 5-11: Vergleich der Intensitäten der Komponente mit der Masse 412,3 mit unbehandeltem NaCl (blau) und bei 450 °C für eine Stunde ausgeheiztem NaCl (rot).**

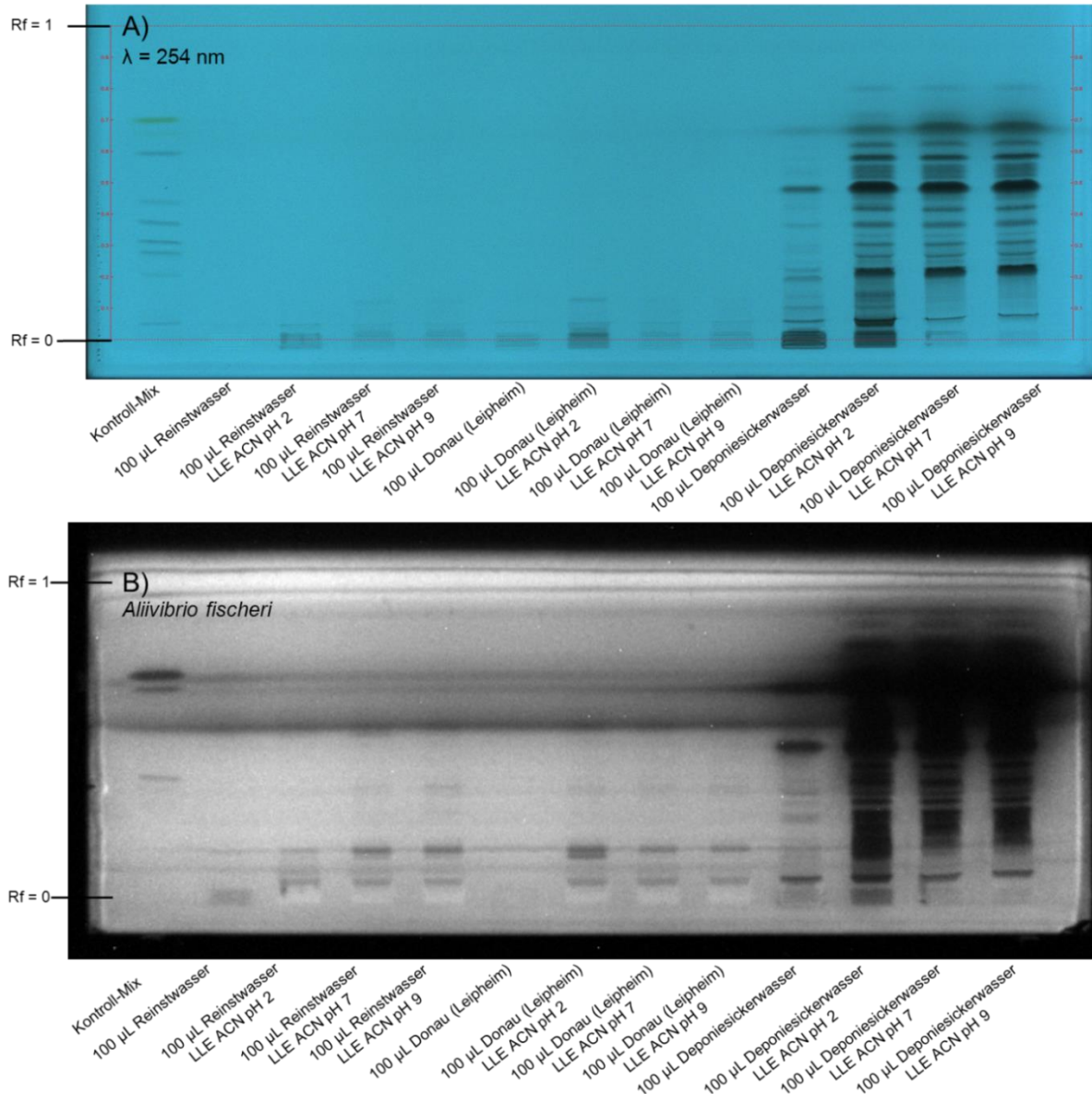
### **Anwendung auf unterschiedliche Wasserproben**

Es wurden Reinstwasser, Oberflächenwasser (Donau bei Leipheim) und Deponiesickerwasser mit Acetonitril bei unterschiedlichen pH-Werten mittels Mikro-LLE angereichert. Die Proben wurden jeweils bei pH 2, pH 7 und pH 9 aufgearbeitet und 100 µL der Acetonitrilextrakte auf eine HPTLC-Platte aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit Fluoreszenzlösung und Leuchtbakterien (*Aliivibrio fischeri*). Zusätzlich zu den Extrakten wurden 100 µL der jeweiligen Wässer zum Vergleich ohne Anreicherung auf dieselbe HPTLC-Platte aufgetragen.

Die Abb. 5-12 zeigt das Bild der Fluoreszenzlösung bei  $\lambda = 254$  nm (A) und die Hemmung der Leuchtbakterien (B). Besonders gut ist der Unterschied zwischen Originalprobe und Mikro-LLE-Extrakt bei der Deponiesickerwasserprobe zu sehen. Bei der Mikro-LLE werden bei pH 2 im

Gegensatz zu pH 7 bzw. 9 besonders Substanzen extrahiert, die unter den eingesetzten chromatographischen Bedingungen einen Rf-Wert von 0,0 bis 0,2 (polarer Bereich) besitzen. Für Substanzen mit  $R_f > 0,2$  ist die Extraktionsausbeute bei den verschiedenen pH-Werten gleich gut. Bei der Detektion mit *Aliivibrio fischeri* ergibt sich eine ähnliche Aussage. Hier ist die Wirkung der Substanzen im Bereich von  $R_f = 0,4 - 0,7$  zu groß, um einen Unterschied im Muster festzustellen.

Bei den Reinstwasserproben fällt in Abb. 5-12 A) auf, dass insbesondere nach der Mikro-LLE bei pH 2 Substanzen angereichert werden, die mit dem HPTLC/AMD-Gradienten 9 an der Auftragefläche verbleiben, Auch sind in der Biolumineszenzdetektion (Abb. 5-12 B) im unteren Rf-Bereich Banden zu erkennen.



**Abb. 5-12: Chromatographierte Reinstwasser-, Oberflächenwasser- (Donau bei Leipheim) und Deponiesickerwasserproben vor und nach der Anreicherung mit der Mikro-LLE mittels Acetonitril (ACN) bei verschiedenen pH-Werten. In Bild A ist die HPTLC-Platte bei  $\lambda$  254 nm gezeigt und in Bild B die Detektion der Biolumineszenzhemmung von *Aliivibrio fischeri* derselben HPTLC-Platte.**

### **Wiederholbarkeit bei der Anwendung auf Wasserproben**

Zur Überprüfung der Wiederholbarkeit, wurde eine Deponiesickerwasserprobe mittels Mikro-LLE bei pH 2, 7 und 9 jeweils viermal parallel mit Acetonitril extrahiert. 30  $\mu\text{L}$  dieser Extrakte wurden aufgetragen und mittels eines HPTLC/AMD-Gradienten 9 aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit dem Leuchtbakterium *Aliivibrio fischeri*. Für die Extrakte des jeweiligen pH-Wertes ergab sich eine sehr gute Übereinstimmung des Hemmmusters. Das verwendete Acetonitril



erzeugte keine Hemmung bei gleichem Auftragevolumen. Die Hemmwerte der Banden bei gleichen Extraktions-pH-Werten und Rf-Werten zeigten Abweichungen von 1 - 9 % ( $\pm 2 \times$  Standardabweichung) (siehe Tabelle 5-5). Diese Abweichungen liegen innerhalb der Messgenauigkeit bei der Bestimmung der Biolumineszenzhemmung.

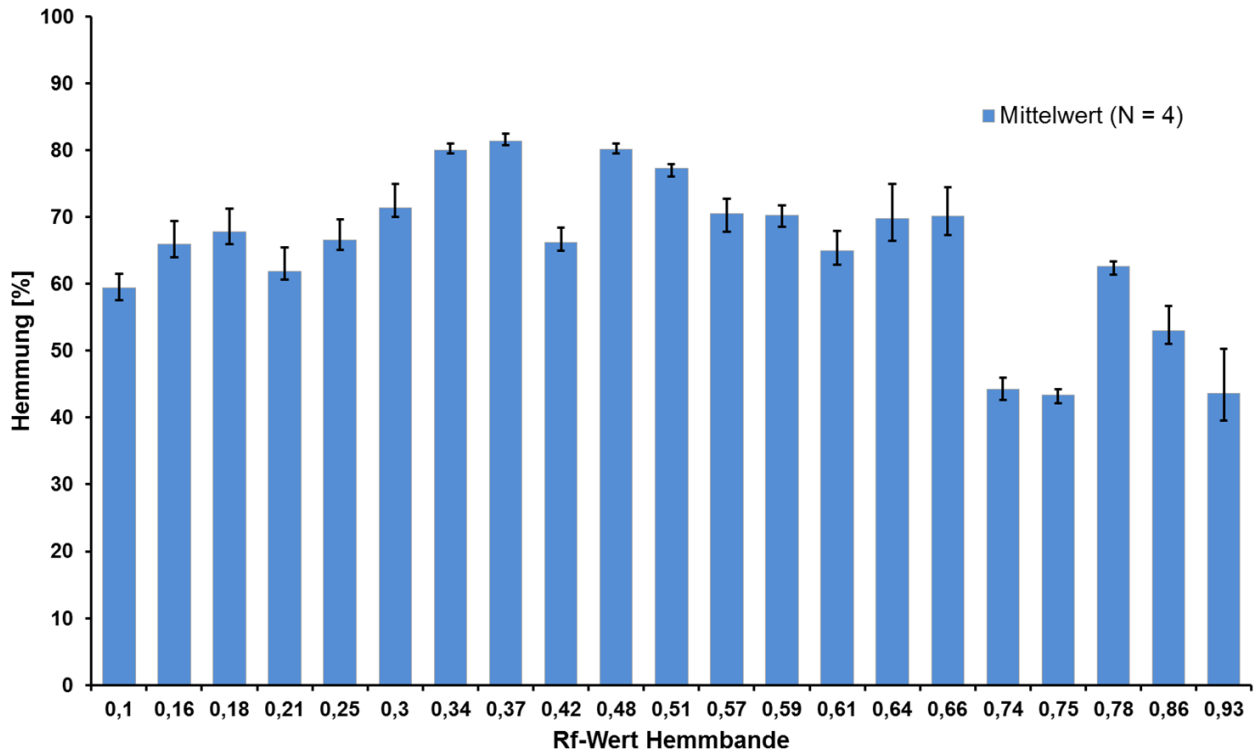


Abb. 5-13: Bestimmung der Wiederholbarkeit der Mikro-LLE bei pH 2 einer Deponiesickerwasserprobe (N = 4) anhand von Biolumineszenzhemmbanden nach HPTLC/AMD-Trennung (Gradient 9). Fehlerbalken geben Mini- bzw. Maximalwerte an.

**Tabelle 5-5: Übersicht der Wiederholbarkeit der Mikro-LLE bei verschiedenen pH-Werten einer Deponiesickerwasserprobe nach HPTLC-Trennung und Detektion der Biolumineszenzhemmung.**

Mikro-LLE pH 2 (Sickerwasser Sondermüldeponie)					Mikro-LLE pH 7 (Sickerwasser Sondermüldeponie)					Mikro-LLE pH 9 (Sickerwasser Sondermüldeponie)				
Bande (Rf)	Mittelwert Hemmung (N = 4) [%]	Minimum Hemmung [%]	Maximum Hemmung [%]	Standard-abweichung (Absolut) [%]	Bande (Rf)	Mittelwert Hemmung (N = 4) [%]	Minimum Hemmung [%]	Maximum Hemmung [%]	Standard-abweichung (Absolut) [%]	Bande (Rf)	Mittelwert Hemmung (N = 4) [%]	Minimum Hemmung [%]	Maximum Hemmung [%]	Standard-abweichung (Absolut) [%]
0.10	59	58	62	1.4	0.09	37	32	40	3.1	0.05	33	32	35	1.2
0.16	66	64	69	2.1	0.15	36	34	38	1.5	0.12	30	29	32	1.0
0.18	68	66	71	2.1	0.17	40	39	41	0.8	0.14	37	33	40	2.5
0.21	62	61	65	2.1	0.20	37	36	38	0.9	0.18	28	27	30	1.4
0.25	67	65	70	1.8	0.25	54	54	55	0.5	0.23	50	48	52	1.5
0.30	71	70	75	2.1	0.26	54	52	58	2.4	0.29	52	49	56	2.4
0.34	80	80	81	0.6	0.30	56	55	57	0.7	0.33	64	63	65	0.6
0.37	81	81	83	0.7	0.34	66	65	67	0.5	0.36	53	51	57	2.1
0.42	66	65	68	1.4	0.37	56	54	59	1.7	0.39	54	53	57	1.8
0.48	80	80	81	0.6	0.38	54	53	54	0.6	0.42	57	56	59	1.1
0.51	77	76	78	0.7	0.42	53	52	56	1.8	0.48	80	80	82	0.8
0.57	70	68	73	2.0	0.48	78	78	80	0.7	0.51	79	78	81	1.2
0.59	70	69	72	1.4	0.51	77	76	78	0.9	0.56	79	78	81	1.4
0.61	65	63	68	1.9	0.55	70	68	71	1.4	0.58	81	80	82	0.9
0.64	70	66	75	3.2	0.57	73	71	76	1.7	0.61	78	77	80	1.3
0.66	70	67	75	2.7	0.59	72	70	73	1.0	0.63	81	79	82	1.5
0.74	44	43	46	1.2	0.60	70	68	72	1.5	0.64	80	78	81	0.9
0.75	43	42	44	0.8	0.62	70	68	72	1.3	0.67	77	76	79	1.1
0.78	63	61	63	0.7	0.68	70	69	71	1.0	0.74	47	44	50	2.3
0.86	53	51	57	2.2	0.78	59	58	60	0.5	0.79	59	56	62	2.5
0.93	44	40	50	4.2	0.85	49	46	50	1.6	0.81	52	47	59	4.5
					0.93	41	39	46	2.8	0.85	50	48	52	1.4
										0.92	48	45	52	2.8

## 5.3 Größenausschlusschromatographie (GPC)

In realen Proben können Substanzen mit größeren Molmassen auftreten, die oftmals an der Auftragsfläche zurückbleiben und die Chromatographie stören. Zur Vermeidung dieses Effekts soll neben der Flüssig-Flüssig-Chromatographie und der Festphasenextraktion auch die Größenausschlusschromatographie (auch Gelpermeationschromatographie, GPC, genannt) zur Probenvorbereitung eingesetzt werden. Bei dieser Chromatographietechnik werden die Moleküle in erster Linie nach ihrer Größe getrennt. Dabei durchlaufen große Moleküle die Trennsäule schneller als kleine. Mit der GPC sollen Makromoleküle abgetrennt werden, die sich störend auf die HPTLC auswirken, aber keine Wirkung auf die angewandten Testsysteme haben.

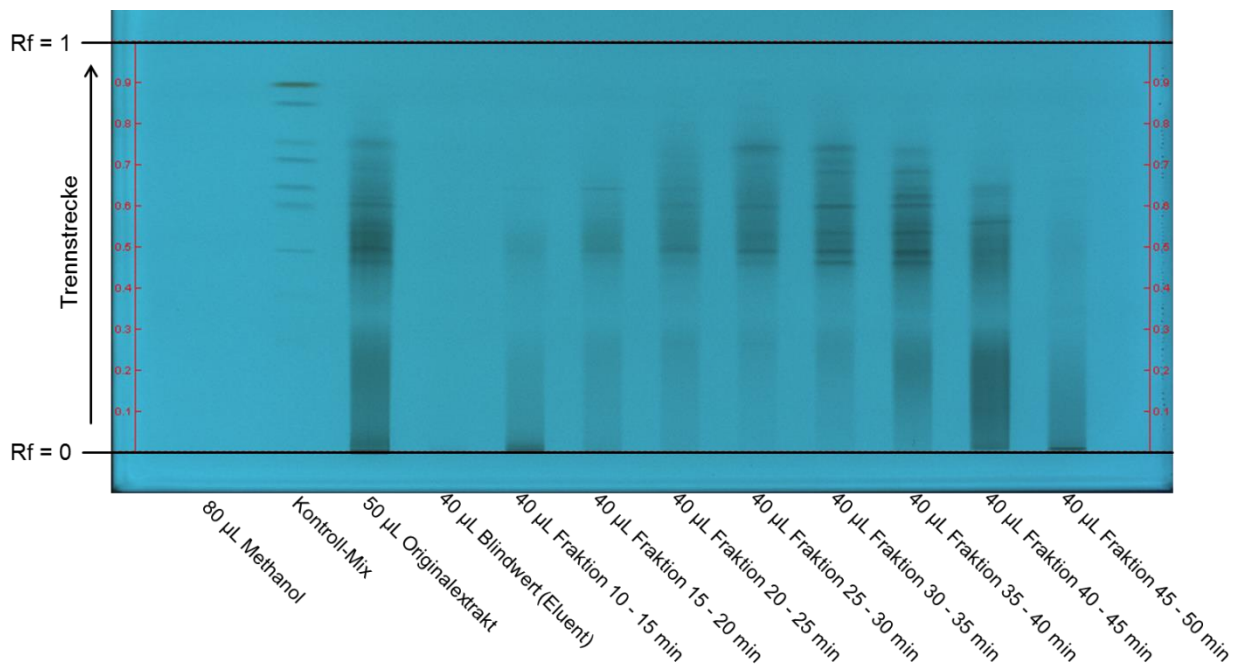
### 5.3.1 Durchführung und Ergebnisse

Für die Untersuchungen wurde das Gel „Sephadex LH-20“, welches neben der Trennung von Naturstoffen [148] auch in der Umweltanalytik eingesetzt wurde, ausgewählt [149-151]. Als Eluent diente eine 1:1 Mischung von Methanol und Iso-Propanol. Bei der Auswahl der Eluenten ist zu beachten, dass ein Teil der Probe ausfallen kann, beispielsweise in Toluol oder reinem Iso-Propanol. Die Füllhöhe der Trennsäule ( $\varnothing$  25 mm) betrug 32 cm, der Eluentenfluss 5 mL/min. Als Probe diente ein 1 mL SPE-Extrakt (ENV+) von einem Kläranlagenablauf. 900  $\mu$ L dieses Extraktes wurde für die GPC-Trennung verwendet. Nach einer Vorlaufzeit von 10 min erfolgte eine Fraktionierung in 5 min Schritten bis 50 min. Die restlichen 100  $\mu$ L wurden ohne GPC-Trennung als Referenz für die GPC-Fraktionen bei der HPTLC-Trennung verwendet.

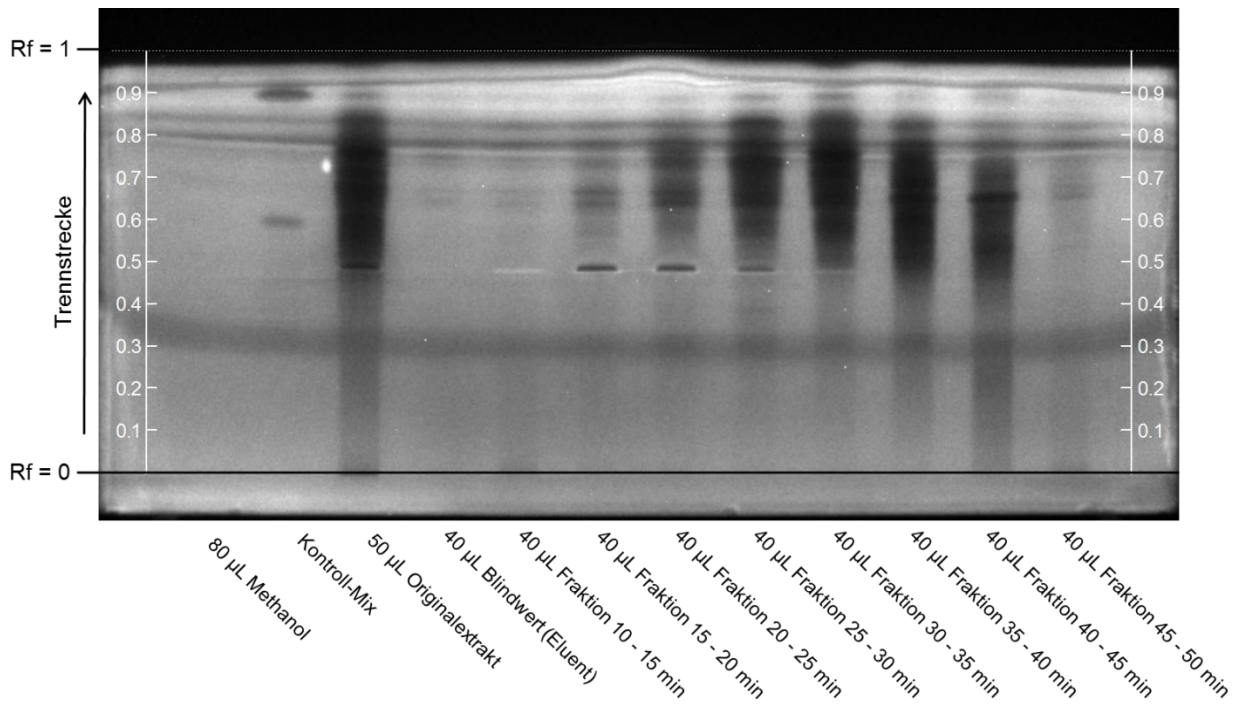
Die in einem Spitzkolben aufgefangenen 25 mL Fraktionen wurden bei einem Druck von 250 mbar und 50 °C am Rotationsverdampfer fast bis zur Trockene eingengt. Danach wurde der Rest des Lösungsmittels mit Stickstoff bei 50 °C in einem Vial abgeblasen und der Rückstand in 200  $\mu$ L Methanol aufgenommen. Zur Bestimmung des Blindwertes dienten 25 mL des in gleicher Weise behandelten Eluenten. Für die HPTLC-Trennung wurden jeweils 40  $\mu$ L der aufkonzentrierten Fraktionen aufgetragen. Parallel dazu wurden 50  $\mu$ L des ursprünglichen SPE-Extraktes aufgetragen.

In Abb. 5-14 ist das Ergebnis der anschließenden HPTLC-Trennung mit Detektion der Fluoreszenzlöschung bei  $\lambda$  254 nm abgebildet. In der Fraktion 15 - 20 min sind zwei diffuse Zonen zwischen den Rf-Wert-Bereichen 0,0 - 0,3 und 0,45 - 0,55 zu erkennen. Die Intensität des unteren Rf-Bereiches nimmt bis zur Fraktion 30 - 35 min kontinuierlich ab. Besonders stark ist die Absorption für diesen Bereich in der Fraktion 40 - 45 min. Die Anzahl der erkennbaren Banden nimmt von der Fraktion 15 - 20 min bis zur Fraktion 35 - 40 min deutlich

zu. Die Banden haben alle einen Rf-Wert > 0,4. Zum Teil treten die Banden in aufeinanderfolgenden Fraktionen auf. Für den Leuchtbakterientest war die Auftragemenge zu hoch, um die Wirkung von einzelnen Banden zu erkennen (siehe Abb. 5-15). Die Bakterien wurden im Rf-Bereich von 0,4 - 0,8 gehemmt. Die Fraktionen mit der über den größten Bereich ausgelösten Hemmung waren die Fraktionen von 20 - 45 min. Auffällig ist, dass die nicht chromatographierbaren Anteile (Startzone) nur in der ersten und letzten Fraktion auftreten. Diese zeigen bei der Detektion mit Leuchtbakterien keine Hemmung. Durch Verwerfen dieser beiden Fraktionen kann somit die störende Matrix mittels der GPC entfernt werden.



**Abb. 5-14:** Aufnahme der HPTLC-Trennung von GPC-Fractionen eines SPE-Extraktes von einem Kläranlagenablauf bei  $\lambda$  254 nm.



**Abb. 5-15: Aufnahme der Biolumineszenzhemmung (Inkubationszeit 5 min) nach HPTLC-Trennung von GPC-Fractionen eines SPE-Extraktes von einem Kläranlagenablauf (Gleiche HPTLC-Platte wie in Abb. 5-14).**

Zur Untersuchung der Molmassenverteilung unter den beschriebenen Bedingungen wurde ein Gemisch aus 32 Substanzen der Molmasse 121 bis 465 g/mol (siehe Tabelle 5-6, Konzentration = 500 µg/L, Injektionsvolumen = 1 mL) auf die GPC-Säule aufgegeben und fraktioniert. Zur Bestimmung der Substanzen mittels HPLC-MS wurden die in Methanol aufgenommenen Fraktionen um den Faktor 1000 mit Reinstwasser verdünnt. Das Ergebnis für die Trennung mit „Sephadex LH-20“ ist in Tabelle 5-6 dargestellt. Die Substanzen sind aufsteigend nach ihrer Molmasse sortiert. Die ermittelte Wiederfindung in den einzelnen Fraktionen ist mit einem Farbverlauf aufsteigend von Blau über Gelb nach Rot hinterlegt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Trennung nicht nach dem Prinzip des Größenausschlusses erfolgt. Hierbei müssten die Substanzen mit großer Molmasse in den ersten Fraktionen und die Substanzen mit den kleinsten Molmassen in den letzten Fraktionen auftreten. Der dominierende Trennmechanismus bei diesen Bedingungen ist die Adsorption.

**Tabelle 5-6: Übersicht der Wiederfindungen von Substanzen aus einem Gemisch in den GPC-Fractionen nach der Trennung auf „Sephadex LH-20“. Die Wiederfindung ist farblich hinterlegt (Blau: geringe Wiederfindung, Rot: hohe Wiederfindung. Die Substanzen sind aufsteigend nach ihrer molaren Masse angeordnet.**

Substanz	Molare Masse [g/mol]	Fraktion 1 (10-15 min)	Fraktion 2 (15-20 min)	Fraktion 3 (20-25 min)	Fraktion 4 (25-30 min)	Fraktion 5 (30-35 min)	Fraktion 6 (35-40 min)	Fraktion 7 (40-45 min)	Fraktion 8 (45-50 min)	Summe
2,6-Dimethylanilin	121,18	0%	0%	0%	0%	31%	0%	0%	0%	31%
Levetiracetam	170,21	0%	0%	5%	68%	2%	0%	0%	0%	75%
Gabapentin	171,24	0%	0%	30%	23%	0%	0%	0%	0%	53%
Carbendazim	191,19	0%	0%	0%	0%	2%	39%	30%	1%	73%
Metamitron	202,22	0%	0%	0%	0%	1%	30%	40%	1%	71%
Isoproturon	206,29	0%	0%	55%	22%	0%	0%	0%	0%	77%
Metribuzin	214,28	0%	0%	0%	0%	6%	45%	8%	0%	58%
Mecoprop	214,65	75%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	75%
Atrazin	215,68	0%	0%	1%	54%	22%	0%	0%	0%	77%
2,4-D	221,04	87%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	87%
Chloridazon	221,66	0%	0%	0%	0%	28%	51%	2%	0%	81%
Cyprodinil	225,29	0%	0%	0%	0%	13%	58%	4%	0%	75%
Asulam	230,24	0%	53%	28%	0%	0%	0%	0%	0%	81%
Diuron	233,09	0%	0%	1%	66%	18%	0%	0%	0%	84%
Carbamazepin	236,27	0%	0%	0%	2%	50%	22%	0%	0%	75%
Mefenaminsäure	241,29	17%	57%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	75%
Terbutryn	241,36	0%	0%	2%	63%	9%	0%	0%	0%	74%
Sulfamethoxazol	253,28	0%	0%	0%	1%	6%	53%	26%	1%	87%
Atenolol	266,34	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	3%	3%
Bromoxynil	276,91	67%	15%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	81%
Metolachlor	283,79	0%	0%	58%	14%	0%	0%	0%	0%	72%
Trimethoprim	290,32	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%
Diclofenac	296,15	66%	11%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	77%
Diazinon	304,35	0%	1%	67%	2%	0%	0%	0%	0%	70%
Epoxiconazole	329,76	0%	0%	0%	34%	44%	0%	0%	0%	79%
Propiconazole	342,22	0%	0%	15%	64%	1%	0%	0%	0%	80%
Fenofibrate	360,83	0%	0%	20%	47%	1%	0%	0%	0%	68%
Bezafibrate	361,82	95%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	96%
Prochloraz	376,67	0%	0%	10%	31%	0%	0%	0%	0%	41%
Diflufenican	394,29	0%	0%	8%	72%	3%	0%	0%	0%	83%
Azoxystrobin	403,99	0%	0%	0%	26%	45%	1%	0%	0%	73%
Fluazinam	465,09	33%	40%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	73%

Das Ziel, die bei der HPTLC störende Matrix nach ihrer Größe abzutrennen und die relevanten Zielsubstanzen in einem relativ kleinen Retentionszeitfenster zu erfassen, konnte mit der oben genannten Phase „Sephadex LH-20“ nicht erreicht werden. Daher wurde zusätzlich noch die „SX-3 Bio Beads“-Phase, ein neutrales, poröses Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer, getestet. Dieses Material wird in der US EPA Methode 3640A [152] verwendet, um hochmolekulare Matrix abzutrennen.

Die Trennung erfolgte nach der Standardmethode US EPA Methode 3640A. Die Säulenbettlänge ( $\varnothing$  25 mm) betrug 54 cm. Als Eluent diente Dichlormethan mit einem Fluß von 5 mL/min. Die Untersuchung der Molmassenverteilung erfolgte analog zur „Sephadex LH-20“-Phase. Die in einem Spitzkolben aufgefangenen 25 mL Fraktionen wurden bei einem Druck von 800 mbar und 40 °C bis auf einen kleinen Rest (ca. 2 mL) eingengt. Dieser Rest wurde in ein Vial überführt und mit 50  $\mu$ L Wasser versetzt. Anschließend wird der Rest unter Stickstoff bei 50 °C bis fast zur Trockene abgeblasen und der Rückstand in 200  $\mu$ L Methanol aufgenommen. Das Ergebnis für „SX-3 Bio Beads“ ist in Tabelle 5-7 dargestellt (analog Tabelle 5-7). Die meisten der eingesetzten Substanzen eluieren, wie in der US EPA Methode 3640A [152] für diese Molmassen beschrieben, zwischen 25 und 35 min. Einige der Sub-

stanzen wurden im Vergleich zur „Sephadex LH20“-Methode nicht mehr in den Extrakten gefunden; auch ist die Summe der Wiederfindungen über die einzelnen Fraktionen mit „SX-3 Bio Beads“ schlechter als bei der „Sephadex LH20“-Methode.

**Tabelle 5-7: Übersicht der Wiederfindungen von Substanzen aus einem Gemisch in den GPC-Fraktionen nach der Trennung auf „SX-3 Bio Beads“. Die Wiederfindung ist farblich hinterlegt (Blau: geringe Wiederfindung, Rot: hohe Wiederfindung). Die Substanzen sind aufsteigend nach ihrer molaren Masse angeordnet.**

Substanz	Molare Masse [g/mol]	Fraktion 1 (15-20 min)	Fraktion 2 (20-25 min)	Fraktion 3 (25-30 min)	Fraktion 4 (30-35 min)	Fraktion 5 (35-40 min)	Fraktion 6 (40-45 min)	Fraktion 7 (45-50 min)	Fraktion 8 (50-55 min)	Fraktion 9 (55-60 min)	Summe
2,6-Dimethylanilin	121,18	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Levetiracetam	170,21	0%	0%	61%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	61%
Gabapentin	171,24	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Carbendazim	191,19	0%	0%	32%	22%	0%	0%	0%	0%	0%	55%
Metamitron	202,22	0%	0%	0%	62%	0%	0%	0%	0%	0%	62%
Isoproturon	206,29	0%	0%	56%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	56%
Metribuzin	214,28	0%	0%	4%	38%	0%	0%	0%	0%	0%	42%
Mecoprop	214,65	0%	0%	0%	0%	0%	0%	2%	5%	5%	13%
Atrazin	215,68	0%	0%	22%	19%	0%	0%	0%	0%	0%	41%
2,4-D	221,04	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Chloridazon	221,66	0%	0%	0%	65%	0%	0%	0%	0%	0%	65%
Cyprodinil	225,29	0%	0%	0%	38%	0%	0%	0%	0%	0%	38%
Asulam	230,24	0%	0%	0%	21%	12%	0%	0%	0%	0%	33%
Diuron	233,09	0%	0%	18%	47%	0%	0%	0%	0%	0%	65%
Carbamazepin	236,27	0%	0%	35%	20%	0%	0%	0%	0%	0%	55%
Mefenaminsäure	241,29	0%	0%	0%	28%	21%	0%	0%	0%	0%	49%
Terbutryn	241,36	0%	0%	14%	24%	0%	0%	0%	0%	0%	37%
Sulfamethoxazol	253,28	0%	0%	63%	5%	0%	0%	0%	0%	0%	69%
Atenolol	266,34	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Bromoxynil	276,91	0%	0%	0%	0%	0%	0%	7%	9%	5%	22%
Metolachlor	283,79	0%	1%	44%	1%	0%	1%	0%	1%	1%	50%
Trimethoprim	290,32	0%	0%	26%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	26%
Diclofenac	296,15	0%	0%	0%	12%	43%	0%	0%	0%	0%	55%
Diazinon	304,35	0%	0%	33%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	33%
Epoxiconazole	329,76	0%	0%	53%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	53%
Propiconazole	342,22	0%	0%	62%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	62%
Fenofibrate	360,83	0%	0%	65%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	65%
Bezafibrate	361,82	0%	0%	0%	0%	0%	4%	3%	2%	0%	9%
Prochloraz	376,67	0%	3%	58%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	61%
Diflufenican	394,29	0%	0%	70%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	70%
Azoxystrobin	403,99	0%	22%	31%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	55%
Fluazinam	465,09	2%	3%	50%	3%	2%	2%	2%	2%	2%	70%

## 5.4 Zusammenfassung Probenvorbereitung

Nach einer ausgedehnten Untersuchung verschiedener SPE-Materialien auf ihre Fähigkeit ein breites Spektrum an Substanzen anzureichern und gleichzeitig ein möglichst geringen Blindwert auf *Aliivibrio fischeri* zu erzeugen, zeigte sich das Material „Agilent Plexa“ am geeignetsten für die WBA mit der HPTLC. Ein Blindwert durch das SPE-Material kann nicht vollständig vermieden werden, doch durch eine Festlegung des maximalen Auftragevolumens lässt sich dessen Problematik umgehen.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Miko-LLE mit Acetonitril für die WBA geeignet ist. Während der Methodenentwicklung wurden die Blindwerte, hervorgerufen durch das eingesetzte Natriumchlorid, minimiert. Aufgrund der Extraktion mit Acetonitril können Substanzen nun in einem größeren Polaritätsbereich mit der LLE angereichert werden. Die Ergebnisse aus Wiederholbarkeitsuntersuchungen zeigen, dass die Abweichung der Extraktion innerhalb

der Unsicherheit der Biolumineszenzhemmung von *Aliivibrio fischeri* liegt. Doch muss dabei beachtet werden, dass die Ausbeute des organischen Lösemittels nur gering ist und die Anreicherungsfaktoren nicht so flexibel angepasst werden können wie bei der SPE. Daher ist diese Probenaufarbeitungstechnik nur bedingt für saubere Wässer geeignet.

Die ersten GPC-Versuche zur Extraktaufarbeitung mit „Sephadex LH-20“ als stationäre Phase zeigten, dass die Probenbestandteile nicht ausschließlich nach ihrer Größe getrennt werden. Bei den Versuchen mit „SX-3 Bio Beads“ eluieren die meisten eingesetzten Referenzsubstanzen in einem relativ engen Retentionszeitfenster, aber mit schlechten Wiederfindungen. Aufgrund dessen wurde die Entfernung der Matrix mittels GPC nicht weiter verfolgt.



## 6 HPTLC-Leuchtbakterien-Hemmtest

### 6.1 Grundlagen zum Leuchtbakterium *Aliivibrio fischeri*

*Aliivibrio fischeri* ist ein maritimes, gram negatives, fakultativ anaerobes Leuchtbakterium mit Flagellen, das zu der Klasse der Gamma-Proteobakterien gehört [153]. Es wurde erstmals 1889 von Martinus Beijerinck isoliert [154]. Bis 2007 erfolgte die Zuordnung des Bakteriums zur der Gattung der *Vibrio*. Aufgrund anderer taxonomischen Kriterien wurde das Bakterium teilweise auch als *Photobacterium fischeri* bezeichnet. Auf der Grundlage von genetischen Untersuchungen wurde das Leuchtbakterium neu klassifiziert und der Gattung *Aliivibrio* zugeordnet [155]. Es sind noch andere biolumineszierende maritime Bakterien wie z. B. *Aliivibrio logei*, *Vibrio harveyi* oder *Photobacterium phosphoreum* bekannt. Alle Leuchtbakterien haben gemeinsam, dass sie gram-negativ, freibeweglich und keine Sporenbildner sind [156]. Da in dieser Arbeit nur mit *Aliivibrio fischeri* gearbeitet wurde, wird Leuchtbakterium als Synonym für *Aliivibrio fischeri* verwendet.

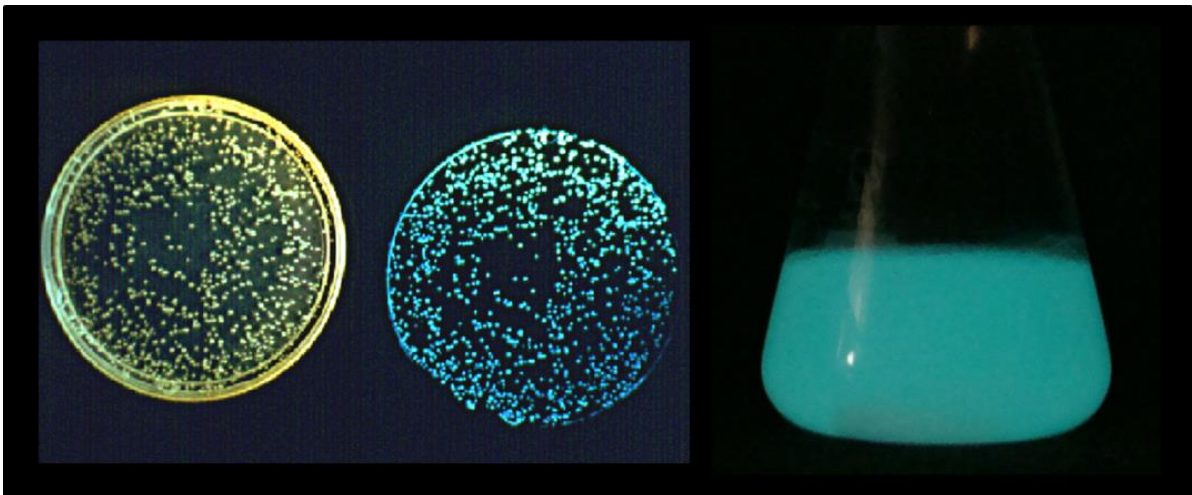


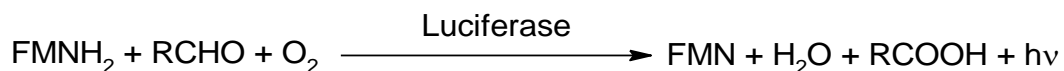
Abb. 6-1 Kolonien von *Aliivibrio fischeri* auf Agar unter Kunstlicht<sup>1</sup> (links) bzw. Biolumineszenz<sup>1</sup> (Mitte) sowie Biolumineszenz einer Bakteriensuspension im Erlenmeyerkolben (rechts)

<sup>1</sup> W. Hastings, Harvard University, E. G. Ruby, University of Hawaii, zur Verfügung gestellt von der National Science Foundation ([https://www.nsf.gov/news/mmg/mmg\\_disp.jsp?med\\_id=51885&from=](https://www.nsf.gov/news/mmg/mmg_disp.jsp?med_id=51885&from=), Zugriff:21.5.2013)

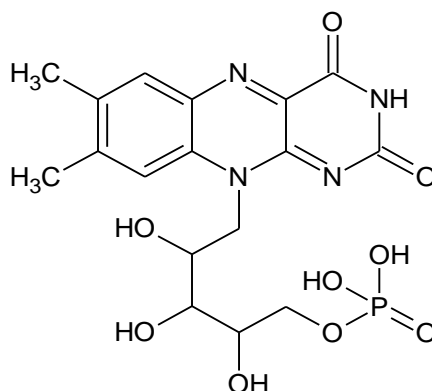
### 6.1.1 Biochemie der Biolumineszenz von *Aliivibrio fischeri*

Unter Biolumineszenz wird die Fähigkeit von lebenden Organismen verstanden, sichtbares Licht zu erzeugen. Die Biolumineszenz ist eine besondere Form der Chemilumineszenz. Im Allgemeinen wird das Licht durch die Oxidation eines Substrats, das Luziferin, mit Hilfe eines Enzyms, Luciferase, erzeugt [157]. Da sich die Biolumineszenz parallel mehrmals entwickelt hat, gibt es verschiedene Substrate mit entsprechenden Enzymen [158]. Sie werden alle als Luziferin bzw. Luciferase bezeichnet [159]. Die einzige Gemeinsamkeit der verschiedenen Biolumineszenzreaktionen ist, neben der Lichtemission, die Notwendigkeit des Vorhandenseins von Sauerstoff [160].

Bei biolumineszierenden Bakterien wird die Lichtemission durch bakterielle Luziferase katalysiert. Das Enzym besteht aus einem Komplex von zwei Proteinen [161], die als LuxA und LuxB bezeichnet werden. Die Luciferase katalysiert die Oxidation eines reduzierten Flavinmononucleotids (FMNH<sub>2</sub>) und einem langkettigen Aldehyd (RCHO). Dabei wird bei *Aliivibrio fischeri* ein blau-grünes Licht emittiert, welches ein Emissionsmaximum von 490 nm besitzt [162, 163]. Die Biolumineszenz von Leuchtbakterien ist im Gegensatz zu z. B. von Leuchtkäfern kontinuierlich [164, 165].



**Abb. 6-2: Nettoreaktionsgleichung zur Biolumineszenz durch die Oxidation des reduzierten Flavinmononucleotids mittels einem langkettigen Aldehyds und bakterieller Luziferase in *Aliivibrio fischeri*.**

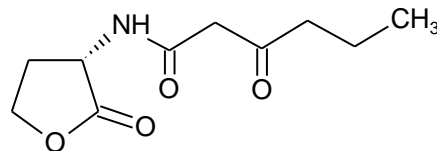


**Abb. 6-3: Struktur von Flavinmononucleotid (FMN), auch Riboflavin-5'-phosphat genannt.**

### 6.1.2 Regulation der Biolumineszenz

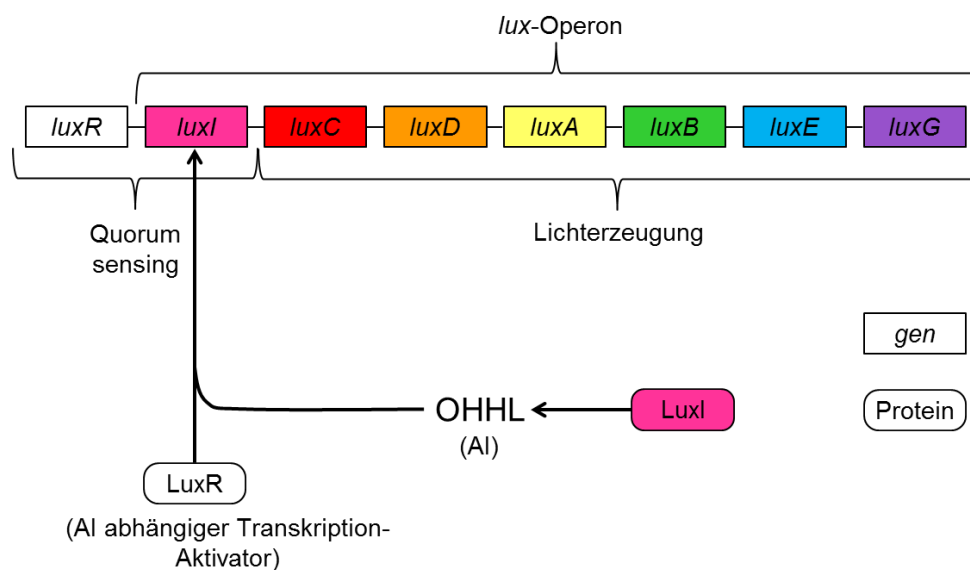
Die Luziferase-Synthese und damit auch die Biolumineszenz ist zell-dichte abhängig [166]. Bei einer geringen Zelldichte wird kaum Luciferase und Licht erzeugt, sobald eine hohe Zelldichte erreicht wird (10<sup>8</sup> Zellen/mL) [164] steigt die Menge an produzierter Luciferase pro

Bakterium um das 100 - 1000fache an, während die Leuchtkraft sich sogar um den Faktor  $10^3 - 10^6$  erhöht. Diese, der Leuchtbakterium-Population unterworfenen, Luciferase-Synthese bzw. Biolumineszenz wird über ein leicht membrangängiges Signalmolekül, ein sogenannter Autoinduktor (AI), gesteuert [167]. Bei *Aliivibrio fischeri* handelt es sich dabei um N-(3-Oxohehexanoyl)-L-homoserin lacton (OHHL), auch N-( $\beta$ -Ketocaproyl)-L-homoserin lacton genannt (Abb. 6-4) [168, 156]. Die zell-dichte-abhängige Reaktion wird als Quorum sensing bezeichnet [169].



**Abb. 6-4: Struktur des Autoinduktors (AI) N-(3-Oxohehexanoyl)-L-homoserin lacton (OHHL) in *Aliivibrio fischeri*.**

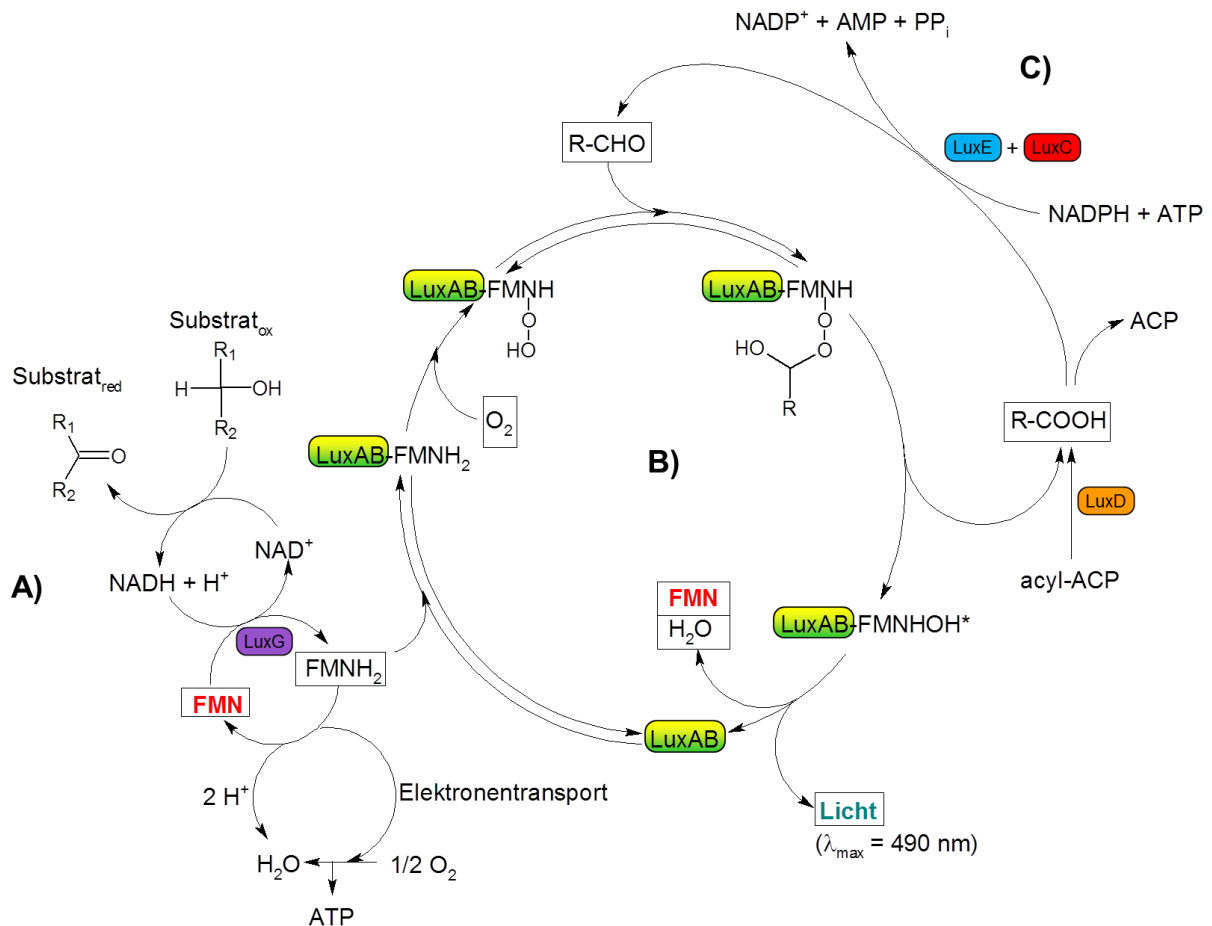
In *Aliivibrio fischeri* sind die Quorum sensing regelnden Gene *luxI* und *luxR* mit dem *lux*-Operon verknüpft (Abb. 6-5). Das *luxR*-Gen liegt oberhalb vom *lux*-Operon und wird nicht zusammen mit diesem transkribiert. Das *luxR*-Gen ist für die Bildung des LuxR-Proteins verantwortlich, welches mit dem Autoinduktor OHHL ein Komplex bildet. Dieser Komplex bindet sich wiederum an den *lux*-Operon-Promoter. Das löst dann zusammen mit der RNA-Polymerase die Transkription der lichterzeugenden Gene aus [170, 166, 156]. Das zweite regulierende Gen *luxI* ist für die Bildung der AHL-Synthase (LuxI) verantwortlich, welches OHHL bildet [171]. Das *luxI*-Gen ist zudem das erste Gen des *lux*-Operon (*luxICDABEG*) [156].



**Abb. 6-5: Lux Operon Quorum sensing [verändert nach [172]]**

Nach einer einfachen Modellvorstellung zum Quorum sensing in *Aliivibrio fischeri*, wird in der Zelle auf einem niedrigen Level OHHL gebildet. Dieses diffundiert aus der Zelle in die Umgebung. Bei einer geringen Zelldichte kann sich OHHL nicht akkumulieren und damit wird auch der *lux*-Operon nicht ausgelöst. Ab einem bestimmten Schwellenwert der Zelldichte ist die OHHL-Konzentration hoch genug damit die Transkription des *lux*-Operon gestartet wird. Da *luxI* ein Teil des *lux*-Operon ist führt eine Transkription zu einem Anstieg der OHHL-Synthese, was wiederum zu einem schnellen Anstieg der Luziferase-Synthese und damit zu einer starken Biolumineszenz führt [156].

### 6.1.3 Biolumineszenzreaktion



**Abb. 6-6: Schematische Darstellung der Biochemie der Biolumineszenz in *Aliivibrio fischeri* [verändert nach [173, 174, 172]]**

Zur Erzeugung der Biolumineszenz bindet sich FMNH<sub>2</sub> an die Luziferase (LuxAB) und reagiert mit Sauerstoff zu einem Flavin-4a-hydroperoxid-Komplex. Durch die Oxidation eines langkettigen aliphatischen Aldehyds, über die Zwischenstufe eines Flavin-4a-peroxyhemiacetal, entsteht ein an die Luziferase gebundenes angeregtes Flavin-4a-hydroxyd. Dieses zerfällt unter Lichtemission in FMN und Wasser (chemically induced elect-

ron exchange luminescence mechanism, CIEEL-Mechanismus) (Abb. 6-6, B.) [175-177, 174]. Danach steht die Luziferase wieder für einen neuen Reaktionszyklus zur Verfügung.

Der Biolumineszenzzyklus ist über FMNH<sub>2</sub> mit der Atmungskette verknüpft (Abb. 6-6, A.). Womit der Biolumineszenzzyklus mit der Atmungskette um FMNH<sub>2</sub> konkurriert. In der Atmungskette wird FMNH<sub>2</sub> für den Elektronentransportprozess benötigt. Dieser Prozess dient dem Gewinn von Energie in Form von Adenosin-triphosphat (ATP). Die Regeneration des verbrauchten FMNH<sub>2</sub> erfolgt in der Atmungskette mit einer NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase (LuxG) [127]. Die entstandene aliphatische Säure wird mit NADPH und ATP zum Aldehyd reduziert. Diese Regeneration erfolgt mittels der Proteine LuxC und LuxE. Zusätzlich wird die Synthese der gleichen Säure durch das Enzym LuxD katalysiert (Abb. 6-6, C) [178]. Aufgrund des Verbrauchs an ATP zur Regeneration bzw. Synthese des benötigten Aldehyds und der Konkurrenz um das in der Atmungskette benötigte FMNH<sub>2</sub>, ist die Biolumineszenz sehr energieaufwendig. Für die Erzeugung eines Lichtquants werden ca. 6 ATP-Moleküle verbraucht [179]. Anhand der Leuchtkraft hat sich der Anteil des Sauerstoffverbrauchs für die Biolumineszenz am Gesamtsauerstoffverbrauches auf bis zu 17 - 20 % abschätzen lassen [180, 174]. Da die Biolumineszenzreaktion direkt an den Energiestoffwechsel gekoppelt ist, lassen sich bei Einwirkungen von Substanzen die Beeinträchtigung des Leuchtbakteriums anhand der Abnahme der Leuchtintensität beobachten.

Auf zellulärer Ebene existieren einige Ähnlichkeiten zwischen den Atmungsketten von Leuchtakterien und Mitochondrien. So wird die Reduktion des Sauerstoffs bei den Leuchtakterien ebenso durch eine im Periplasma vorkommende Cytochrom-c-Oxydase katalysiert [174]. Des Weiteren besitzen sie äquivalente Komplexe zu den mitochondrialen Atmungskettenkomplexen I und II. Wobei diese im Leuchtbakterium als NDH-1 und NDH-2 bezeichnet werden [182, 174]. Zwischen den EC<sub>50</sub>-Werten für *Aliivibrio fischeri* und den LC<sub>50</sub>-Werten für andere Wasserorganismen z. B. Zebrafisch oder *Daphnia magna* wurden Korrelationen gefunden. Der Regressionskoeffizient  $r^2$  des Leuchtbakterienhemmtest gegenüber von 11 Fischarten liegt bei dieser Studie zwischen 0,58 und 0,93 [183].

#### **6.1.4 Toxikologische Wirkweisen**

Substanzen können über verschiedene und komplexe Mechanismen die Biolumineszenz verändern [184]. So können Verbindungen mit Rezeptoren der Zelloberfläche wechselwirken, die Zellmembranfunktion stören, chemische Reaktionen mit zellulären Komponenten eingehen oder Enzymsysteme hemmen [185].

Eine Vielzahl an anthropogenen Stoffen stört den Energiemetabolismus an der Zellmembran über verschiedene Wirkungsweisen wie der Basistoxizität, Entkopplung des Protonengradienten, der Hemmung des Elektronentransports oder der Hemmung des ATP-Synthase [186].

Die **Basistoxizität** ist mit dem pharmazeutischen Mechanismus der Narkose direkt verknüpft und beschreibt die Verlangsamung des Stoffwechsels von Zellen durch einen oder mehrere Stoffe [179]. Die Basistoxizität entspricht der minimalen Toxizität jeder Substanz [187]. Da viele Rückschlüsse aus der Pharmazie auch in der Ökotoxikologie relevant sind, wird auch oft der Begriff der narkotischen Wirkung anstatt der Basistoxizität verwendet. Der Begriff der Narkose wird in der Pharmazie hauptsächlich im Zusammenhang mit Nervenzellen und spezifischen Wechselwirkungen mit Rezeptoren verwendet. Deshalb sollte dieser in der Ökotoxikologie vermieden werden [186]. Die Basistoxizität ist das Ergebnis einer nicht spezifischen Störung der Membranintegrität und -funktion durch Diffusion von Substanzen in die Membran und Ausbildung eines Verteilungsgleichgewichtes [188]. Dabei handelt es sich um einen reversiblen Mechanismus. Der genaue Mechanismus ist bislang unbekannt, dennoch ist es allgemein akzeptiert, dass die Basistoxizität von der Konzentration der Substanzen in der Membran abhängt [188, 186]. Die Aktivität der Substanzen steht in Beziehung mit ihrer Hydrophobizität bzw. dem Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ( $K_{OW}$ ). Ältere Literatur unterscheidet aufgrund unterschiedlicher Regressionen beim Abtragen von  $K_{OW}$  gegen die Wirkung zwischen polaren und unpolaren „Narkotika“ [186]. Wenn anstatt des  $K_{OW}$ , der Liposom-Wasser-Verteilungskoeffizient  $K_{lipw}$  verwendet wird, liegen polare und unpolare „Narkotika“ auf einer Linie, was auf einen gemeinsamen Wirkungsmechanismus schließen lässt [186]. Schätzungen zufolge besitzen 60 % aller industriell hergestellten Chemikalien eine Basistoxizität [189, 188]. Viele Substanzen mit einer spezifischen Wirkung weisen unterhalb ihrer Wirkungsschwelle bereits eine Basistoxizität auf [190]. In Mischungen sind basistoxisch wirkende Substanzen konzentrationsadditiv [191].

Bei der **Entkopplung des Protonengradienten** wird der Sauerstoffverbrauch der Zelle von der Erzeugung von ATP (oxidativen Phosphorylierung) entkoppelt. Bei der Zellatmung werden Protonen unter Verbrauch von NADH und Sauerstoff aus der Zelle gepumpt. Dabei entsteht ein elektrochemischer Gradient über die Zellwand. Beim Rückfluss der Protonen in die Zelle wird die wieder frei werdende Energie genutzt, um aus ADP mithilfe der ATP-Synthase ADP zu bilden. Voraussetzung zur Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gradienten ist, dass die Membran nicht für Protonen durchlässig ist. Entkoppelnde Substanzen machen die Membran für Protonen durchlässig indem sie diese in oder aus der Zelle transportieren. Daher sind die meisten entkoppelnde Substanzen schwache Säuren oder Basen wie 2,4-Dinitrophenol oder Pentachlorophenol [192]. Bei dem sogenannten Shuttle-Mechanismus nimmt die Base ein Proton aus dem umgebenden Medium auf. Die nun nach außen hin neut-

rale Säure diffundiert in die Zelle und gibt dort das Proton ab. Damit gelangen Protonen ohne die ATP-Synthase und ohne den Aufbau von ATP in die Zelle.

Durch **Hemmung des Elektronentransports** wird die protonentreibende Kraft herabgesetzt und es werden keine Protonen mehr aus der Zelle gepumpt und kein ATP gebildet. Beim Elektronentransport werden über eine Kaskade von Elektronentransport-Komplexe in der Zellmembran Elektronen zu einem Elektronenakzeptor z. B. Sauerstoff befördert. Die dabei freiwerdende Energie dient dem Transport von Protonen aus der Zelle. Aus dem reduzierten Sauerstoff wird mit der ATP-Synthase und zurückfließenden Protonen ATP gebildet. Bekannte Inhibitoren des Elektronentransports sind Retenon oder Amobarbital [192].

### 6.1.5 Bestimmung der Biolumineszenzhemmung

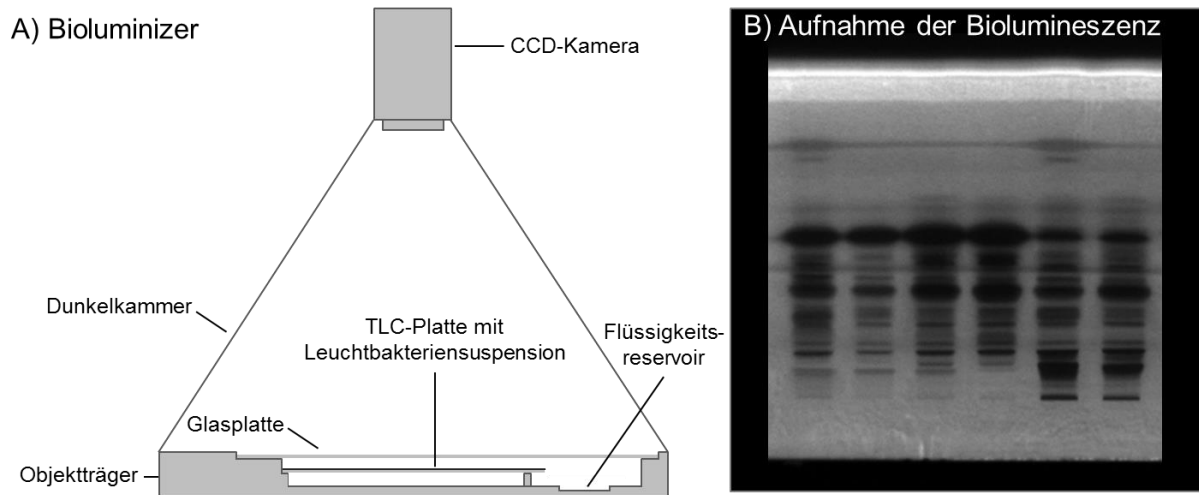
Die Vielzahl an Substanzen die Einfluss auf die Biolumineszenz nehmen, wird in dem vom Bulich und Isenberg [193] eingeführten und inzwischen in vielen Ländern standardisierten Küvetten-Test [126] genutzt. Für diesen Test wird die Leuchtbakteriensuspension mit der Probe versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 15 °C erfolgt die Messung der Biolumineszenz der Probe gegen die Referenzlösung. Das Ergebnis wird in Prozent-Hemmung angegeben. Oftmals wird als Ergebnis die Verdünnungsstufe G angegeben bei der die Probe weniger als 20 % Hemmung verursacht [126].

Bei diesem Test muss beachtet werden, dass neben einem variierenden Salzgehalt auch die Löslichkeit von Substanzen problematisch sein kann [194]. Der Leuchtbakterientest wird neben der Untersuchung von Oberflächen- und Grundwasser [195, 196] auch zur Untersuchung von Abwässern und Sedimentproben genutzt [197-199, 15]. Der Test ist samt Ausrüstung bei verschiedenen Herstellern erhältlich. Der Vergleich von drei verschiedenen kommerziell vertriebenen Leuchtbakterientests zeigte für 81 untersuchte Substanzen vergleichbare Ergebnisse [184]. In einem Ringversuch an dem 10 Labore aus 8 Europäischen Ländern teilgenommen haben, zeigte eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der untersuchten Proben. In der Studie wurden in einem Zeitraum von 5 Monaten 6 Probenserien, bestehend aus jeweils 3 Standardlösungen und 3 Realproben von den teilnehmenden Laboren untersucht. Auch hier konnten keine Unterschiede bei den verschiedenen kommerziellen Testsystemen festgestellt werden [200].

### 6.1.6 TLC-Biolumineszenzhemmtest

Beim TLC-Biolumineszenzhemmtest wird nach der Trennung, die Platte getrocknet und in die lumineszierende *Aliivibrio fischeri*-Suspension getaucht. Die Detektion der Biolumineszenzhemmung erfolgt in einer Dunkelkammer an deren Oberseite eine empfindliche CCD-Kamera angebracht ist. Die mit der Leuchtbakteriensuspension benetzte TLC-Platte befindet

sich in einem Objektträger, der mit einer Glasplatte abgedeckt ist, um eine Austrocknung zu verhindern (Siehe Abb. 6-7). Zusätzlich befindet sich auf dem Objektträger noch ein Flüssigkeitsreservoir, um die Luftfeuchtigkeit aufrechtzuerhalten. Da die Platte nur mit einem sehr dünnen Film der Leuchtbakteriensuspension benetzt ist, benötigt es zur Detektion des schwachen Leuchtens eine Belichtungszeit von 45 - 55 s.



**Abb. 6-7: Querschnitt der Dunkelkammer mit einer CCD-Kamera und einem Objektträger für die TLC-Platte (A) zur Detektion der Biolumineszenz auf der TLC-Platte (B).**

Erstmals zeigten Eberz et al. die erfolgreiche Kombination des Leuchtbakterientests mit der TLC [68]. Dieser Ansatz wurde kurz darauf erfolgreich von Weins und Jork übernommen [115]. Seit dem findet diese WBA-Methode in verschiedenen Bereichen wie z. B. bei der Untersuchung von Naturstoffen [201-203], Körperpflegemitteln [204, 205] oder Eluate von Gummiprodukten [67, 111] Anwendung. Auch wurde der HPTLC-Biolumineszenzhemmtest bei der Analyse von Oberflächenwasser [206], Abwasser [105] und Deponiesickerwasser [111] erfolgreich eingesetzt. Des Weiteren lässt sich auch mit dieser Methode die unterschiedliche Hemmung, durch im Grundwasser entstandenen Metabolite [207] sowie bei der Ozonung erzeugten Desinfektionsnebenprodukte [111, 208], beobachten.

## 6.2 Grenzen der Biolumineszenzauswertung

### 6.2.1 Zeitabhängigkeit der Biolumineszenzdetektion

Da die Platte in dem Objektträger über einen langen Zeitraum feuchtgehalten werden kann, ist es möglich, die Veränderung über mehrere Stunden zu beobachten. Nach wenigen Stunden ist oftmals eine Umkehrung des Leuchtens zu sehen, d. h. Bereiche, die zuvor dunkel waren erscheinen nun heller als die umliegenden Bereiche. Diese scheinbare Verstärkung der Biolumineszenz ist nicht auf eine Adaption der Substanz von dem Bakterium zurückzuführen, sondern auf einen unterschiedlich schnellen Verbrauch des Nährmediums auf der

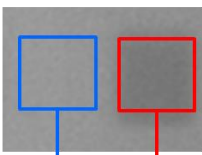




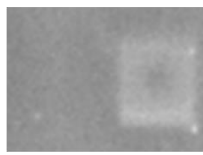
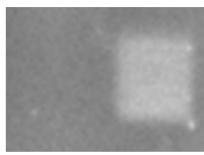




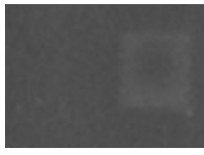
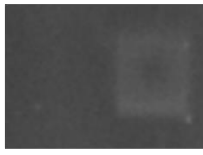
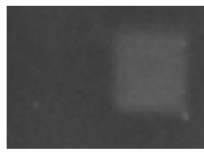


Platte. In Bereichen in denen die Biolumineszenz gehemmt ist, läuft der Stoffwechsel langsamer ab als in den umgebenden Bereichen. Damit wird dort auch weniger Nährmedium verbraucht als auf der restlichen Platte. Zusätzlich passt die Software den Verstärkungsgrad der Bildhelligkeit automatisch an. Durch diese beiden Faktoren kann der Eindruck entstehen, dass die Biolumineszenz nach einigen Stunden verstärkt wird.

In Tabelle 6-1 ist dieses Phänomen am Beispiel von Methyl-desphenyl-chloridazon, ein Metabolit des Pflanzenschutzmittel Chloridazon, gezeigt. Auf eine quadratische Fläche wurde von Methyl-desphenyl-chloridazon eine Flächenmasse von 174 ng/mm<sup>2</sup> aufgetragen und die Biolumineszenzhemmung von *Aliivibrio fischeri* über einen Zeitraum von 10 h detektiert. In der Tabelle 6-1 ist zum jeweiligen Aufnahmezeitpunkt immer derselbe Ausschnitt aus dem Biolumineszenzbild gezeigt. Im oberen Teil der Tabelle sind die Bilder zu sehen wie sie durch die automatische Helligkeitsverstärkung („Gain“) der Bildauswertesoftware wiedergegeben wird. Im unteren Teil der Tabelle sind dieselben Bilder gezeigt, doch wurde hier die Helligkeitsverstärkung auf den Wert des Bildes nach 10 min festgelegt. Für die Auftragefläche von Methyl-desphenyl-chloridazon und der links benachbarten Referenzfläche wurde in den einzelnen Bildern der Mittelwert der Graustufe ermittelt.

Die Aufnahmen bis zu einer Inkubationszeit von 60 min zeigen eine Hemmung für Methyl-desphenyl-chloridazon. Doch nach einer Inkubationszeit von 3 h tritt anstelle der Hemmung eine scheinbare Verstärkung der Biolumineszenz auf. Diese wird im Verlauf der Zeit immer stärker. Beim Abgleich der Graustufenauswertung der Bilder mit automatischer Helligkeitsverstärkung wird dieser Eindruck bestätigt. Wird die Helligkeitsverstärkung fixiert, zeigt sich das die Grauwerte für die Auftragefläche mit laufender Inkubationszeit immer geringer, also dunkler werden. Ähnliches ist für die Referenzfläche zu beobachten. Hier fallen jedoch die Grauwerte schneller ab als für die Auftragefläche. Daher entsteht der Eindruck, dass die Biolumineszenz verstärkt wird. Bei der hier vorliegenden Helligkeitsverstärkung kann kein signifikanter Einfluss des angepassten oder fixierten Verstärkungsgrad auf die Berechnung der Hemmung festgestellt werden.

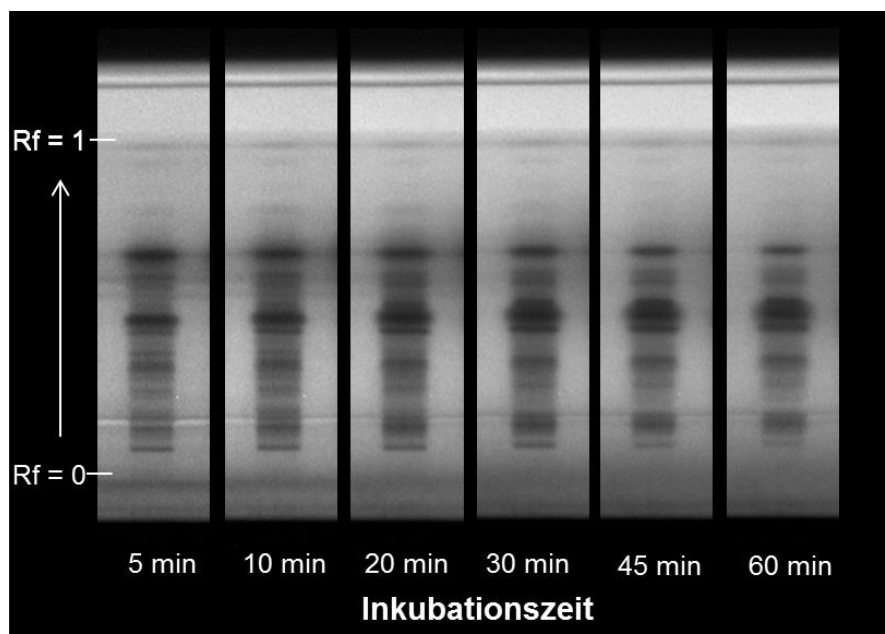
Tabelle 6-1: Detektion der Biolumineszenz-Hemmung durch Methyl-desphenyl-chloridazon auf *Aliivibrio fischeri* über einen Zeitraum von 10 h. Für jede angegebene Inkubationszeit erfolgte die Auswertung des aufgenommenen Bildes nach automatischer und festgelegter Helligkeitsverstärkung.

		Inkubationszeit													
		10 min		20 min		60 min		180 min		300 min		450 min		600 min	
Automatische Helligkeitsverstärkung	Verstärkungsgrad	2,38		2,52		2,59		4,18		4,91		4,79		4,86	
	Methyl- desphenyl- chloridazon (174 ng·mm <sup>-2</sup> )														
	Graustufe (Mittelwert aus 441 Pixel)	151	122	162	130	178	139	171	175	165	177	146	170	133	183
	Hemmung	19 %		19 %		22 %		-2 %		-7 %		-16 %		-38 %	
Fixierte Helligkeitsverstärkung	Verstärkungsgrad	2,38		2,38		2,38		2,38		2,38		2,38		2,38	
	Methyl- desphenyl- chloridazon (174 ng·mm <sup>-2</sup> )														
	Graustufe (Mittelwert aus 441 Pixel)	151	122	153	124	151	121	97	99	80	85	73	84	65	89
	Hemmung	19 %		19 %		20 %		-2 %		-6 %		-15 %		-37 %	

8 bit Graustufenbild: 0 = Schwarz, 255 = Weiß

### 6.2.2 Einfluss der Helligkeitsverstärkung auf die Bildauswertung

Aus dem in Tabelle 6-1 gezeigten Versuch zeigt sich anhand der stabilen Graustufe für die Referenzfläche, dass die Biolumineszenz mindestens 60 min stabil ist. Daher lässt sich für diesen Zeitraum die Veränderung der Biolumineszenzhemmung durch eine Probe beobachten. Die Abb. 6-8 zeigt die Aufnahmen der Biolumineszenz für eine aufgetrennte Deponiesickerwasserprobe über 60 min mit automatischer Helligkeitsverstärkung. Die aufgetrennte Probe zeigt Banden mit unterschiedlich starken Hemmungen. Auch hier ergeben sich bei einem Vergleich der Biolumineszenzaufnahmen über die Zeit Unterschiede in der Schwärzung der einzelnen Hemmbanden.



**Abb. 6-8: Veränderung der Hemmung mit fortschreitender Inkubationszeit für eine Probe (SPE-Anreicherung: ENV+, pH 2; Anreicherungsfaktor: 20, Auftragevolumen: 1  $\mu$ L)**

Bei diesem Versuch soll geklärt werden welchen Einfluss die Helligkeitsverstärkung auf den Hemmwert bzw.  $\Gamma$ -Wert hat. Dazu wurde die in Abb. 6-8 gezeigte Probe nach einer Inkubationszeit von 10 min und 60 min ausgewertet. Bei dem Bild nach 10 min beträgt der Gain-Wert der automatischen Helligkeitsverstärkung 5,61 und nach 60 min 3,58. D. h. die Lichtintensität über die gesamte Platte ist nach 60 min intensiver als nach einer Inkubationszeit von 10 min. Dies ist vermutlich auf ein weiteres Wachstum von *Aliivibrio fischeri* in diesem Zeitraum zurückzuführen. Neben den beiden Bildern mit automatischer Helligkeitsverstärkung wurden für beide Inkubationszeiten jeweils noch 3 Bilder mit geringer und höher eingestellten Gain-Werten ausgewertet. Die erhaltenen  $\Gamma$ -Wert-Chromatogramme wurden für einen Vergleich übereinander gelegt (Abb. 6-9).

Es zeigt sich, dass die unterschiedlichen Helligkeitsverstärkungen nur einen geringen Einfluss auf die  $\Gamma$ -Werte haben, wenn sie mehr als zwei Gain-Werte von der automatischen Einstellung abweichen. Dies ist damit zu erklären, dass die Bilder dann zu dunkel bzw. zu hell ausfallen und nicht mehr alle möglichen 256 Graustufen zur Darstellung des Bildes ausgenutzt werden. Diese verringerte Anzahl an Abstufungen führt zu den beobachteten geringeren bzw. höheren  $\Gamma$ -Werten im Vergleich zu der automatischen Einstellung.

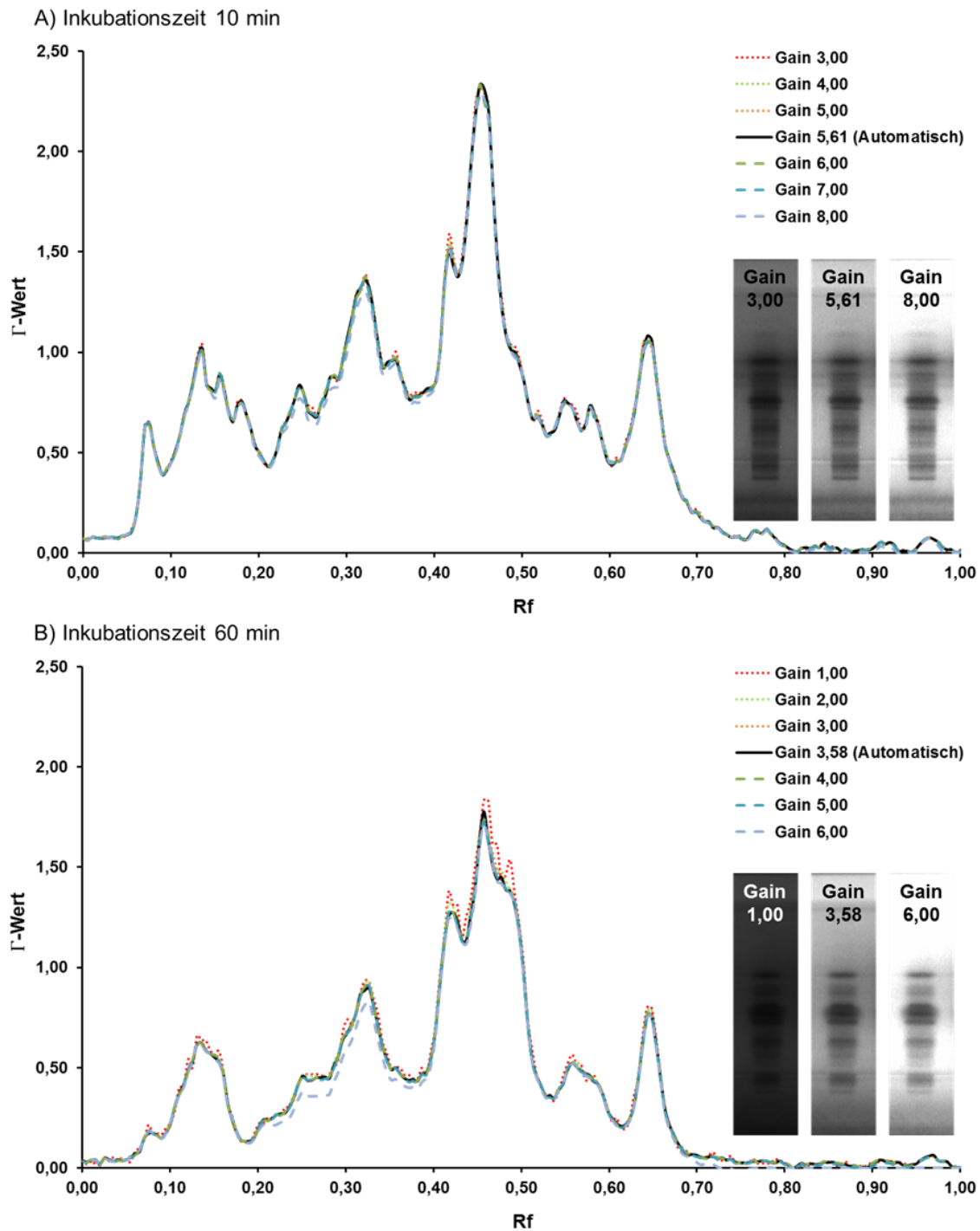


Abb. 6-9: Vergleich der  $\Gamma$ -Wert-Chromatogramme für unterschiedliche Helligkeitsverstärkungen der Biolumineszenzaufnahme.

### 6.2.3 Einfluss der Inkubationszeit auf die RIHV-Werte

Die Hemmung verändert sich mit fortlaufender Inkubationszeit. Dies ist beispielsweise bei der aufgetrennten Probe aus Abb. 6-8 bzw. in den aus den Bildern resultierenden  $\Gamma$ -Wert-Chromatogramme zu sehen (Abb. 6-9). Neben den in Abb. 6-8 gezeigten Auftragevolumen von 1  $\mu\text{L}$  wurden noch 2, 5 und 10  $\mu\text{L}$  aufgetragen, womit sich die RIHV-Werte der Hemmbanden nach einer Inkubationszeit von 5, 10, 20, 30, 45 und 60 min ermitteln und deren Veränderung beobachten lassen. Die dazu notwendigen  $\Gamma$ -Werte wurden aus den Bildern mit automatischer Helligkeitsverstärkung bestimmt. Die Veränderung der RIHV-Werte für die einzelnen Hemmbanden ist uneinheitlich (Abb. 6-10). So gibt es Banden, z. B.  $R_f = 0,32$ , bei denen der RIHV-Wert mit fortschreitender Inkubationszeit stabil bleibt. Eine Abnahme der RIHV-Werte lässt sich beispielsweise für die Banden mit  $R_f = 0,07$  oder 0,45 beobachten. Dagegen nehmen die RIHV-Werte der Bande bei 0,35 zu. Für die Banden mit  $R_f = 0,42$  und 0,64 nimmt die Wirkung erst zu und später wieder ab.

Dieses Ergebnis verdeutlicht die Notwendigkeit für einen Vergleich der Wirkung, die RIHV-Werte nach einer definierten Inkubationszeit zu bestimmen. Für diese Arbeit wurde, wenn nicht anders angegeben, die Biolumineszenz nach einer Inkubationszeit von 10 min ausgewertet.

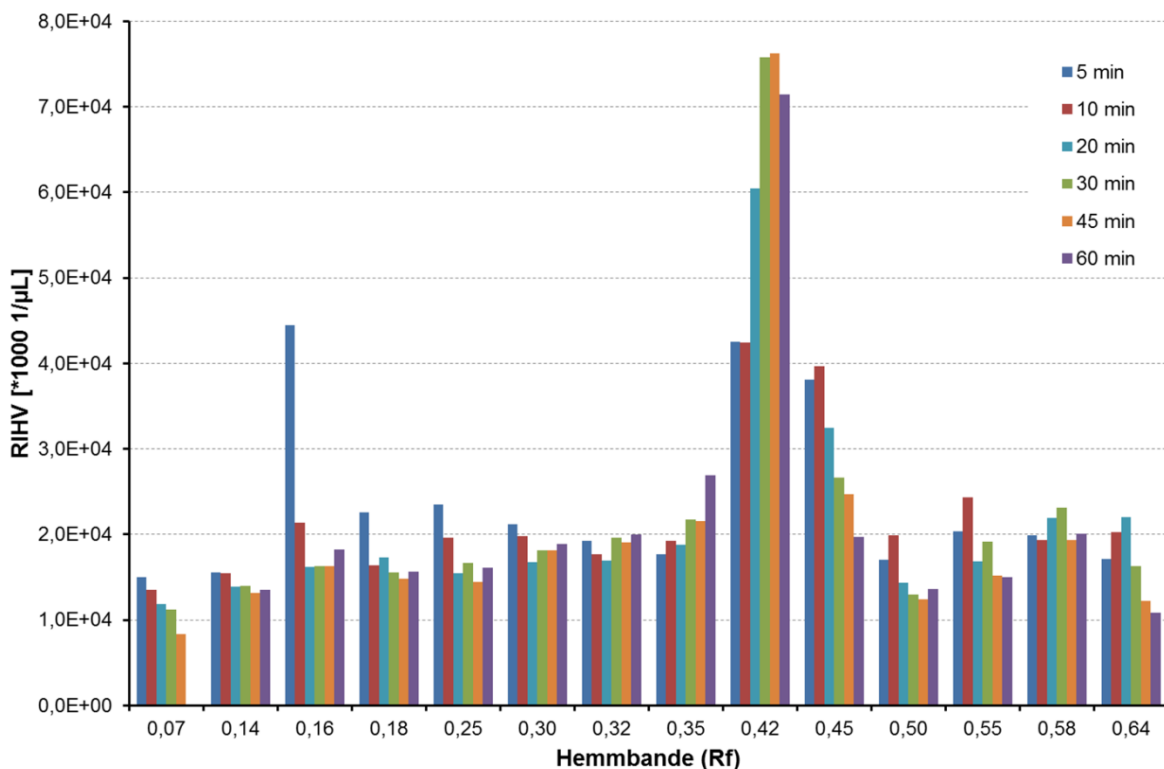
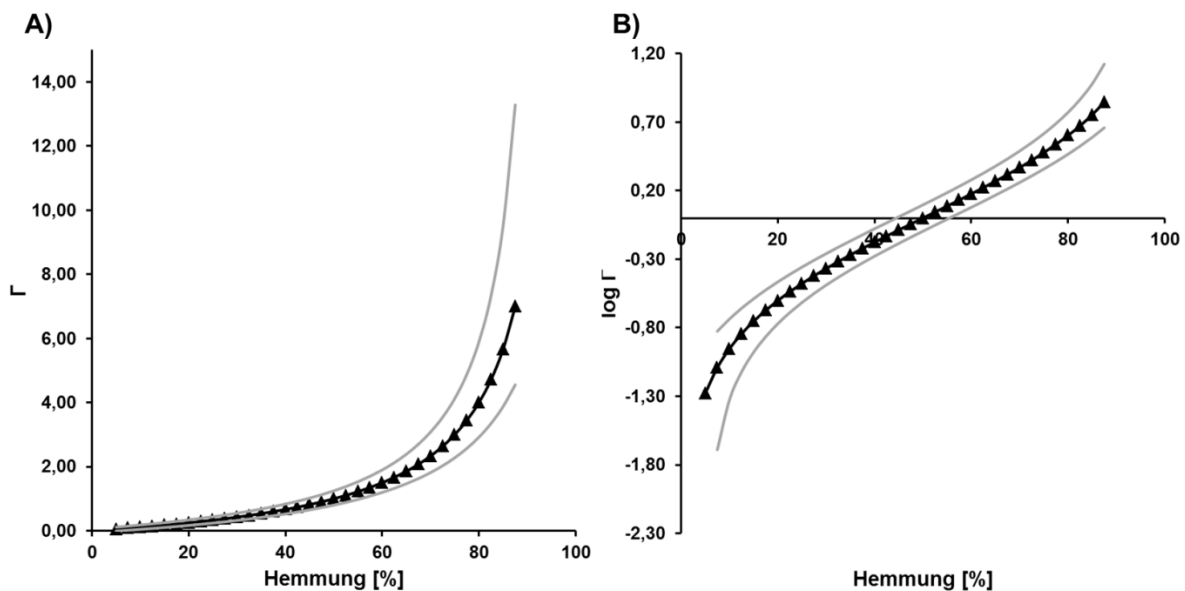


Abb. 6-10: Verlauf der RIHV-Werte mit fortschreitender Inkubationszeit für die Hemmbanden der Probe aus Abb. 6-8.

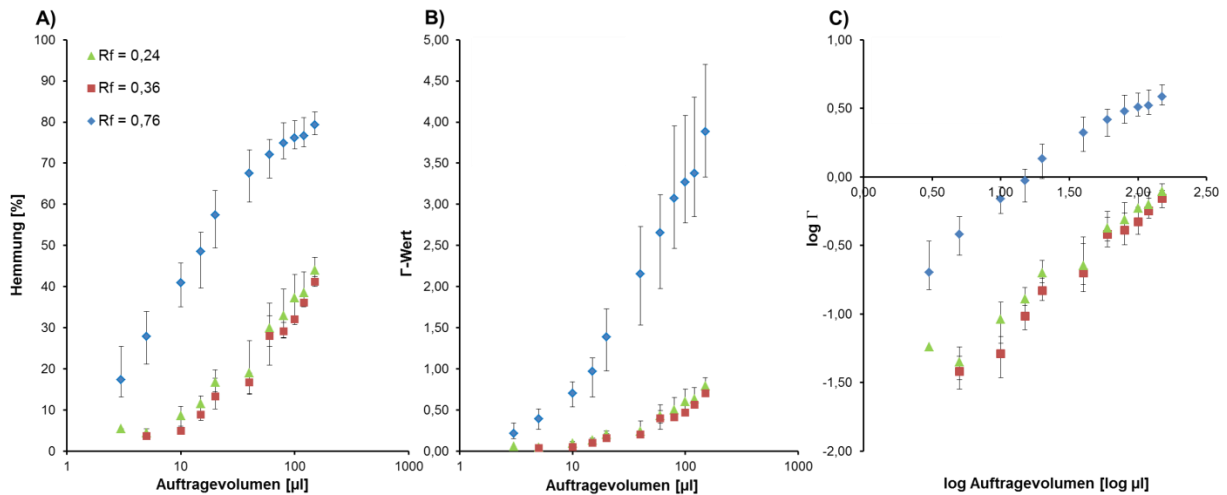
### 6.2.4 Grenzen der RIHV-Bestimmung

Zur Abschätzung der Messunsicherheit der RIHV-Auswertung ist in Abb. 6-11, A) der  $\Gamma$ -Wert in Abhängigkeit von der Hemmung abgetragen. Zur Abschätzung des Vertrauensbandes wurde die Standardabweichung von 5,5 %Hemmung herangezogen. Diese Standardabweichung wurde für Ibuprofen und Bromoxynil über einen Zeitraum von 4 Jahren aus jeweils 117 Werten ermittelt (siehe Kapitel 0). Bei dem für die RIHV-Wert genutzten  $\log \Gamma$ -Wert wird das Vertrauensband bei kleinen sowie großen Hemmwerten (< 15 %Hemmung bzw. >85 %Hemmung) besonders breit (Abb. 6-11, B)). Daher sollten Hemmungen, die kleiner bzw. größer als diese Werte ausfallen nicht für die RIHV-Wert-Bestimmung herangezogen werden.



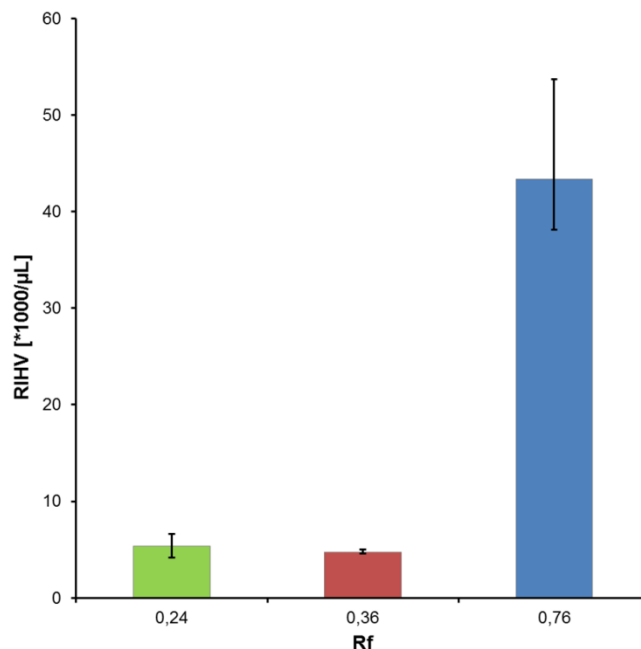
**Abb. 6-11:  $\Gamma$ -Wert in Abhängigkeit von der Hemmung mit eingezeichneten Vertrauensband bei einer angenommenen Standardabweichung von 5,5 %-Hemmung.**

Zur Überprüfung der Streuung des RIHV-Wertes wurde eine künstliche Probe, bestehend aus Coffein ( $R_f = 0,24$ ,  $40 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ), Methyl-desphenyl-chloridazon ( $R_f = 0,36$ ,  $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) und Bromoxynil ( $R_f = 0,76$ ,  $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) hergestellt. Von dieser Probe wurden unterschiedliche Volumina aufgetragen, mit der entwickelten isokratischen HPTLC-Methode aufgetrennt (Kapitel 4.2.1) und die Biolumineszenzhemmung detektiert. Dieser Versuch wurde an zwei weiteren Tagen wiederholt. In Abb. 6-12 A) und B) sind die Dosis-Wirkungsbeziehungen der drei Hemmbanden als Hemmung bzw.  $\Gamma$ -Wert in Abhängigkeit vom Auftragevolumen dargestellt. Wie vorhergesagt, fallen in der linearisierten Dosis-Wirkungsbeziehung ( $\log \Gamma$ ) die Streuung für die kleinen Hemmwerte (geringes Auftragevolumen) am größten aus.



**Abb. 6-12: Dosis-Wirkungsbeziehungen für die RIHV-Wertbestimmungen von Hemmbanden einer künstlichen Probe, bestehend aus Coffein (Rf = 0,24), Methyl-desphenyl-chloridazon (Rf = 0,36) und Bromoxynil (Rf = 0,76). Die Fehlerbalken stellen den minimalen bzw. den maximalen Wert dar (N = 3).**

Für die Hemmbanden bei Rf = 0,24 bzw. 0,36 ergeben sich mit jeweils 5 [1000/µL] sehr geringe RIHV-Werte (Abb. 6-13). Diese Werte streuen zudem über einen Bereich von 2,4 bzw. 0,4 [1000/µL]. Für die Hemmbande bei Rf = 0,76 (Bromoxynil) ergibt sich ein RIHV-Wert von 43 [1000/µL] mit einer Streuung von 15 [1000/µL]. Über alle drei Hemmbanden ergibt sich eine mittlere relative Standardabweichung von 13 % für die ermittelten RIHV-Werte.



**Abb. 6-13: RIHV-Werte dreier Hemmbanden einer künstlichen Probe. Die Fehlerbalken stellen den minimalen bzw. den maximalen Wert dar (N = 3).**

### 6.2.5 Einfluss des Vakuums bei der HPTLC/AMD-Trennung auf die Hemmung

Ein Nachteil der HPTLC-Trennung ist, dass leichtflüchtige Substanzen nicht erfasst werden können. Durch das Anlegen eines Vakuums ( $< 0,0$  mbar) zur Trocknung der Platte bei der stufenweise Entwicklung bei der HPTLC/AMD wird diese Problematik verstärkt (Kap. 4.1.2). Die Summe der Trocknungszeit unter Vakuum bei der HPTLC/AMD-Trennung liegt oftmals zwischen 60 und 120 min. Daher ist davon auszugehen, dass bei unterschiedlich langen Gradienten und mit den damit einhergehende unterschiedlich langen Gesamtvakuumzeiten der Substanzverlust Auswirkungen auf die Hemmung hat.

Zur Untersuchung des Einflusses des Vakuums auf die Hemmung wurden auf eine Fläche von  $25 \text{ mm}^2$  Ibuprofen ( $16 \text{ ng/mm}^2$ ), Bromoxynil ( $4 \text{ ng/mm}^2$ ) und 3,4-Dichloranilin ( $8 \text{ ng/mm}^2$ ) aufgetragen. Erwartungsgemäß sinkt besonders für 3,4-Dichloranilin mit einem vergleichsweise hohen Dampfdruck von  $0,18 \text{ Pa}$  bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) [209] die Hemmung mit Dauer des angelegten Vakuums (Abb. 6-14). Bromoxynil und Ibuprofen besitzen deutlich geringere Dampfdrücke und dementsprechend fällt die Abnahme der Hemmung mit der Vakuumanlegezeit geringer aus bzw. bleibt stabil. Jedoch ist der Dampfdruck von Bromoxynil mit  $1,7 \cdot 10^{-4} \text{ Pa}$  (bei  $25$ ) [210] geringer als für Ibuprofen ( $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}$  bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  [211]), trotzdem fällt die Hemmung für Bromoxynil stärker ab als für Ibuprofen. Daher lässt sich die Abnahme der Hemmung nicht alleine mit dem Dampfdruck erklären. Die Ursache für diesen Effekt konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Der Versuch zeigt jedoch, dass die Einhaltung der Gesamttrocknungszeit im Vakuum für vergleichbare Ergebnisse notwendig ist. Dies gilt auch für Platten, die mit einem sauren Gradienten entwickelt, anschließend im  $\text{NH}_3$ -Dampf neutralisiert und das überschüssige  $\text{NH}_3$  im Vakuum abgezogen wurde. Des Weiteren zeigt dieser Versuch, dass die Wirkungen zwischen verschiedenen Gradienten nicht vergleichbar sind. Daher müssen für verschiedene HPTLC/AMD-Gradienten separate Qualitätsregelkarten geführt werden.



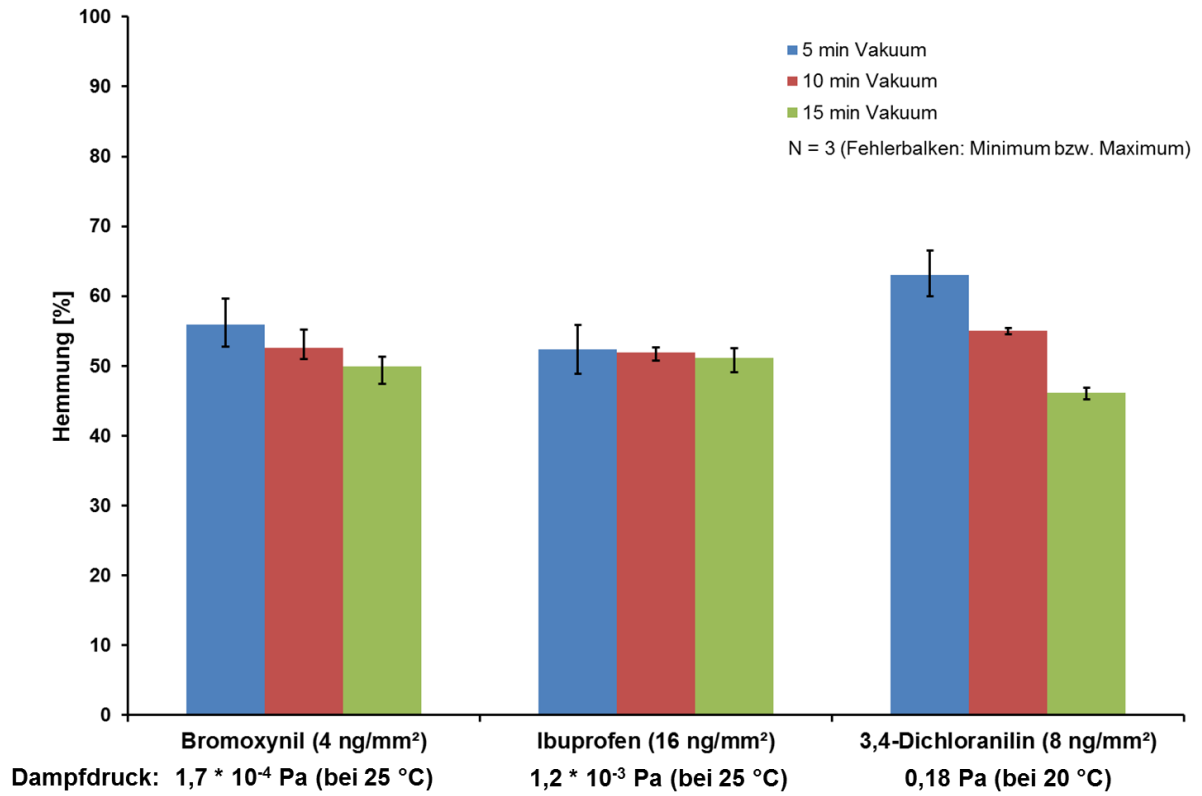


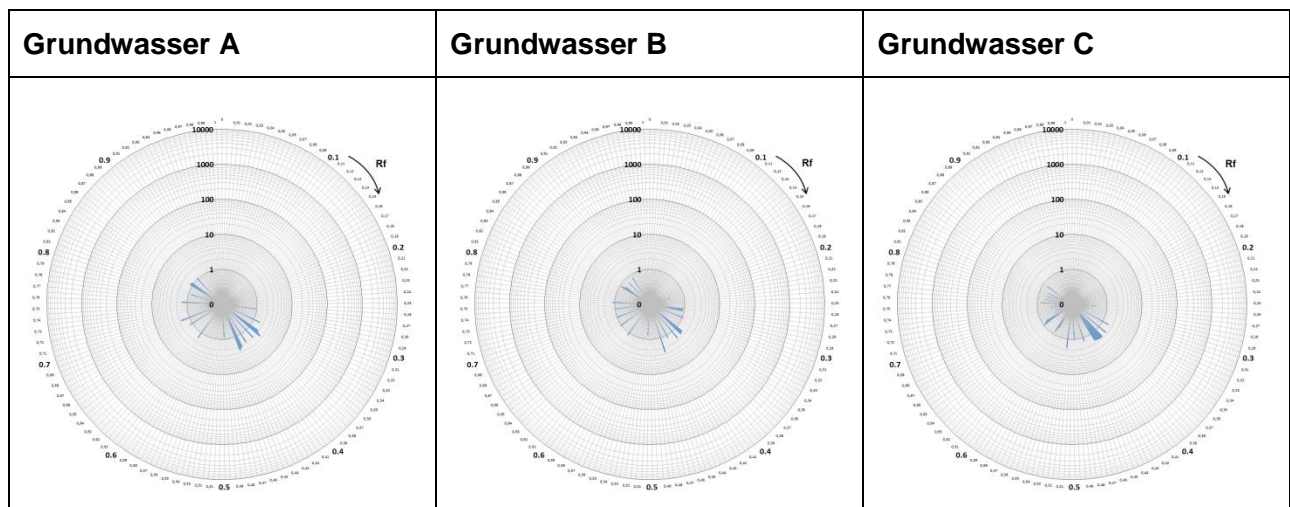
Abb. 6-14: Einfluss des Vakuums der AMD auf die Hemmung am Beispiel von Bromoxynil, Ibuprofen und 3,4-Dichloranilin.

### 6.3 Untersuchung von Grund- und Oberflächenwässern

Da die Leuchtbakterien auf eine Vielzahl an Substanzen reagieren, ist es bei einer ausreichenden Anreicherung möglich auch in unbelasteten Wässern eine Hemmung zu detektieren. Damit die detektierte Hemmung bzw. die daraus resultierende RIHV-Werte eingeschätzt werden können, wurden neun verschiedene Grundwässer und fünfmal Oberflächenwasser von der Donau bei Leipheim (ca. 15 km Stromabwärts von Ulm) untersucht. Die Grundwässer besitzen bereits Trinkwasserqualität. Die Anreicherung von 200 mL der entnommenen Proben auf 1 mL Extrakt erfolgte bei pH 2 mit der optimierten SPE-Methode (Kapitel 5.1) und die Trennung mit dem HPTLC/AMD-Gradienten 13 (Kapitel 4.2.2).

In Tabelle 6-2 sind die RIHV-Werte für drei Grundwässer als Polardiagramm dargestellt. Für alle Grundwässer können mit der eingesetzten Methode schwache Hemmbanden detektiert werden. Die ermittelten RIHV-Werte für die Hemmbanden liegen zwischen 0,3 und 3 [1000/μL].

**Tabelle 6-2: RIHV-Polardiagramme der Biolumineszenzhemmung von *Allivibrio fischeri* für verschiedene Grundwässer.**



Die Probenahme aus der Donau erfolgte an fünf aufeinanderfolgenden Wochentagen. Die RIHV-Polardiagramme der Biolumineszenzhemmung von drei Tagen sind in Tabelle 6-3 dargestellt. Bei der Untersuchung wurden mit RIHV-Werten von 2 bis 8 [1000/μL] etwas größere Werte als für die Grundwässer ermittelt. Für die in dem Polardiagramm markierten Banden wurde beispielhaft der Wochenverlauf in Abb. 6-15 abgetragen. Mit Ausnahme der Hemmbande mit  $R_f = 0,28$ , die bei der Freitagsprobenahme nicht zu beobachten ist, können während des Untersuchungszeitraumes nur geringfügige Veränderungen beobachtet werden. Anhand dieser Ergebnisse lassen sich Proben bis zu RIHV-Werten von 10 [1000/μL] als geringfügig mit organischen Spurenstoffen belastet abschätzen.

Tabelle 6-3: RIHV-Polardiagramme der Biolumineszenzhemmung von *Allivibrio fischeri* für Oberflächenwasser aus der Donau bei Leipheim.

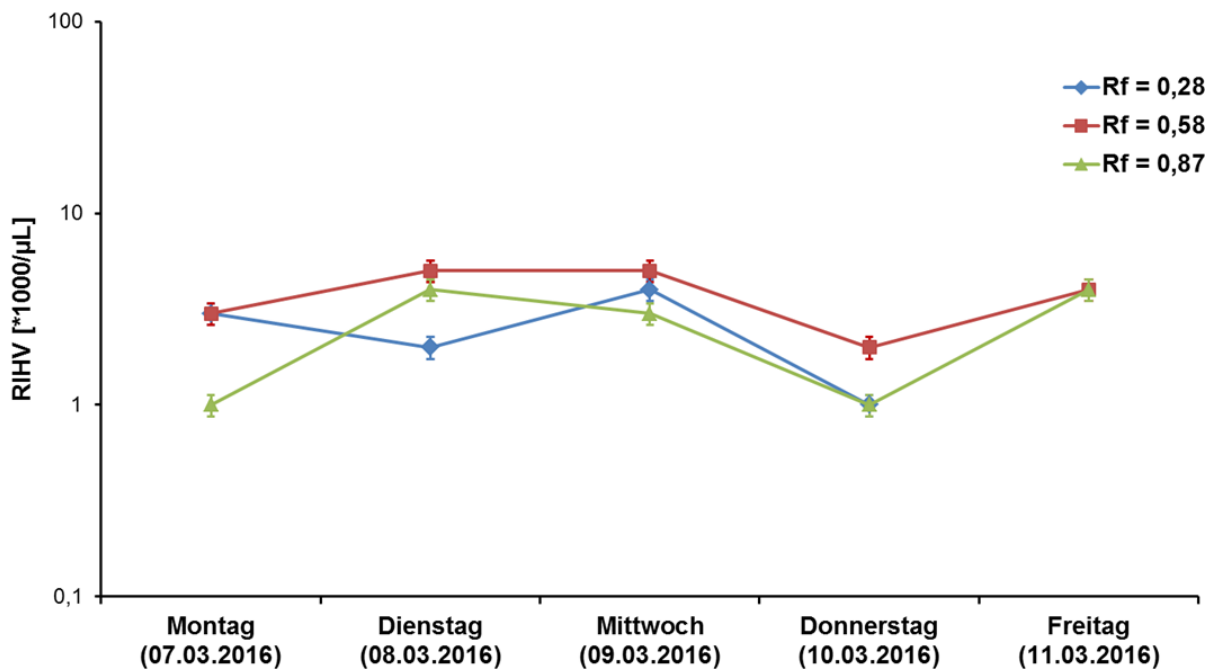
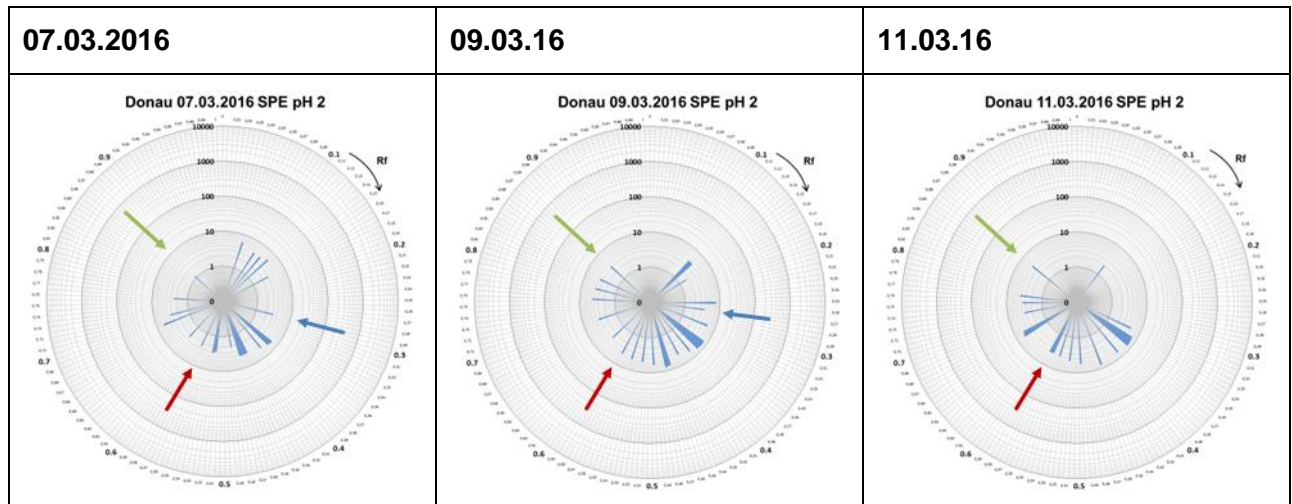


Abb. 6-15: Wochenverlauf von drei ausgewählten Hemmbanden von der Donau bei Leipheim.

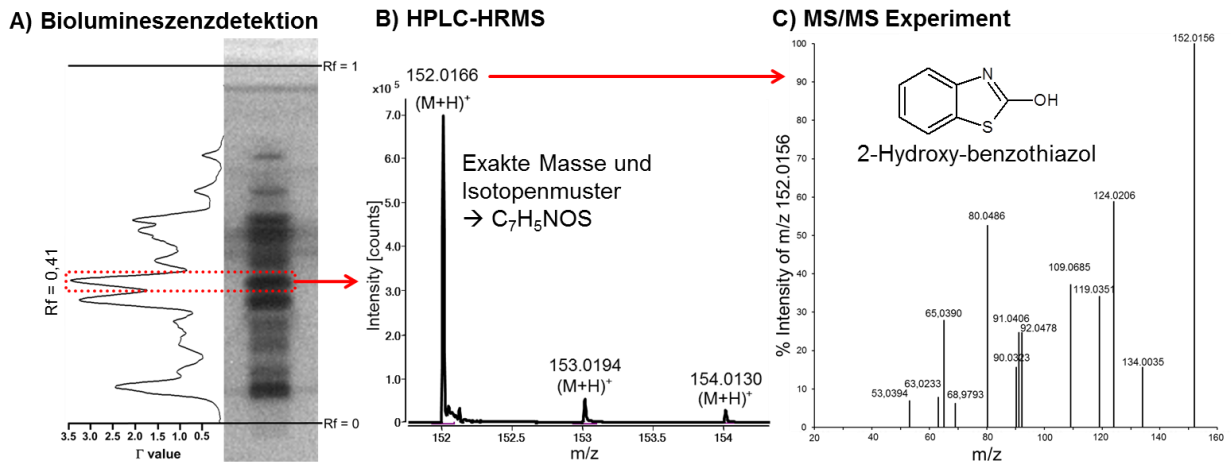
## 6.4 Untersuchung der Elastikschicht eines Kunstrasens

Die Qualität des Grundwassers kann auf unterschiedlichste Weise beeinflusst werden. So können selbst aus Kunstrasen-Sportplatzbelägen umweltrelevante Substanzen durch den Regen ausgewaschen werden und bei einer fehlenden oder unzureichenden Drainage in das Grundwasser gelangen. Kunstrasenflächen finden zunehmend für Fußball und andere Sportarten Verwendung. Die Elastikschicht des Kunstrasens besteht meist aus polyurethan-

gebundenen Gummigranulaten. Für diese Schicht werden außer neuen synthetischen Gummigranulaten (Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk, EPDM) auch Gummirecyclate, die beispielsweise von Altreifen stammen, eingesetzt. Neben der Erfüllung der Sportfunktion für die einzelnen Sportarten und der Schutzfunktion des Sportlers muss der Belag bestimmte Umweltaforderungen erfüllen [212]. Im vorliegenden Fall wurde ein Kunstrasen im Einzugsgebiet einer kommunalen Grundwasserfassung verlegt. Anhand einer Probe aus der verlegten Elastikschicht soll überprüft werden, ob Substanzen ausgewaschen und in das Grundwasser gelangen können. Für diese „Non-Target-Fragestellung“ wurde der HPTLC-Biolumineszenz-Hemmtest mit *Aliivibrio fischeri* ausgewählt, da das Leuchtbakterium auf sehr viele Substanzen reagiert.

Zur Simulation der Auswaschung durch Regen wurde eine Probe der Elastikschicht des frisch verlegten Kunstrasens 24 h mit Laborreinstwasser im Batchversuch eluiert. Anschließend erfolgte eine Extraktion des wässrigen Eluates mit tertiär-Butyl-methylether (TBME) und die Auftragung eines aliquoten Extraktanteils auf die HPTLC-Platte. Nach der HPTLC/AMD-Entwicklung (Gradient 9) und Tauchung der Platte in eine Leuchtbakterien-Suspension erfolgte die Aufnahme der Leuchtaktivität der Bakterien, wobei sich eine Vielzahl von Hemmbanden zeigten (Abb. 6-16, A)).

Mit den direkt auf der Platte gemessenen UV/VIS-Remissionsspektren wurde in einer selbst erstellten Spektrenbibliothek eine Abfrage unter Einbezug der R<sub>f</sub>-Wertes durchgeführt. Zusätzlich erfolgte zur Identifizierung der einzelnen Hemmsubstanzen, eine Entwicklung unter gleichen Trennbedingungen auf einer zweiten Platte. Von dieser wurden die einzelnen Substanzbanden mittels eines TLC-MS-Extraktors zunächst in ein Vial extrahiert und anschließend mit einem HPLC-QTOFMS-System (Agilent 1100 und Agilent6510) weiter untersucht. Anhand der exakten Masse und des Isotopenmusters der gefundenen Features wird eine Summenformeln generiert und gegebenenfalls durch das MS/MS-Spektrum verifiziert. Durch die Kombination der Informationen aus UV-Spektrum und MS-Daten in Verbindung mit der Priorisierung durch eine nachgewiesene Wirkung ist es möglich relevante Umweltkontaminanten nachzuweisen. So wurde beispielsweise für die in Abb. 6-16, A) markierte Bande die Substanz 2-Hydroxybenzothiazol identifiziert. Weiterhin lassen sich auf diese Weise noch 2-Aminobenzothiazol und Benzothiazol identifizieren. Zum Nachweis dieser Substanzen in der nahegelegenen Grundwasserfassung wurde für diese Substanzen eine anreicherungsfreie HPLC-MS/MS-Methode mit Triple-Quadrupol-Massenspektrometer entwickelt.



**Abb. 6-16: Identifizierung von 2-Hydroxy-benzothiazol als Ursache einer Biolumineszenzhemmung auf *Aliivibrio fischeri* (A) mittels HPLC-HRMS (B) und MS/MS (C).**

Neben den identifizierten Verbindungen wurden weitere Substanzen berücksichtigt von denen nur die exakte Masse bekannt war. Hierzu wurden die aus der QTOF-Messung ermittelten Massenübergänge auf die HPLC-MS/MS-Methode übertragen. Ausgehend von den erhaltenen Fragmentmassen ließen sich die Kollisionsenergien des Triple-Quadrupol-Massenspektrometers für die verschiedenen Übergänge optimieren. Anhand dieser Massenspektren erfolgte eine Untersuchung der Fassung nach Kontaminanten, die im Eluat der Elastiksicht des Kunstrasens vorhanden waren. In Abb. 6-17 ist beispielhaft der Massenübergang 413.2/177.0 dargestellt. Im wässrigen Eluat sind die Peaks der Triple-Quadrupol-MS-Messungen deutlich zu sehen, während in der Fassung diese nicht nachgewiesen werden konnten. In den untersuchten Proben dieser Fassung konnten weder die oben genannten identifizierten Stoffe, noch die über die exakte Masse und MS/MS charakterisierten Substanzen nachgewiesen werden. Eine weitere regelmäßige Überwachung des Grundwassers erscheint jedoch sinnvoll, da es sich um einen neuen Kunstrasen handelt und deshalb die Kontaminanten verzögert ins Grundwasser gelangen können.

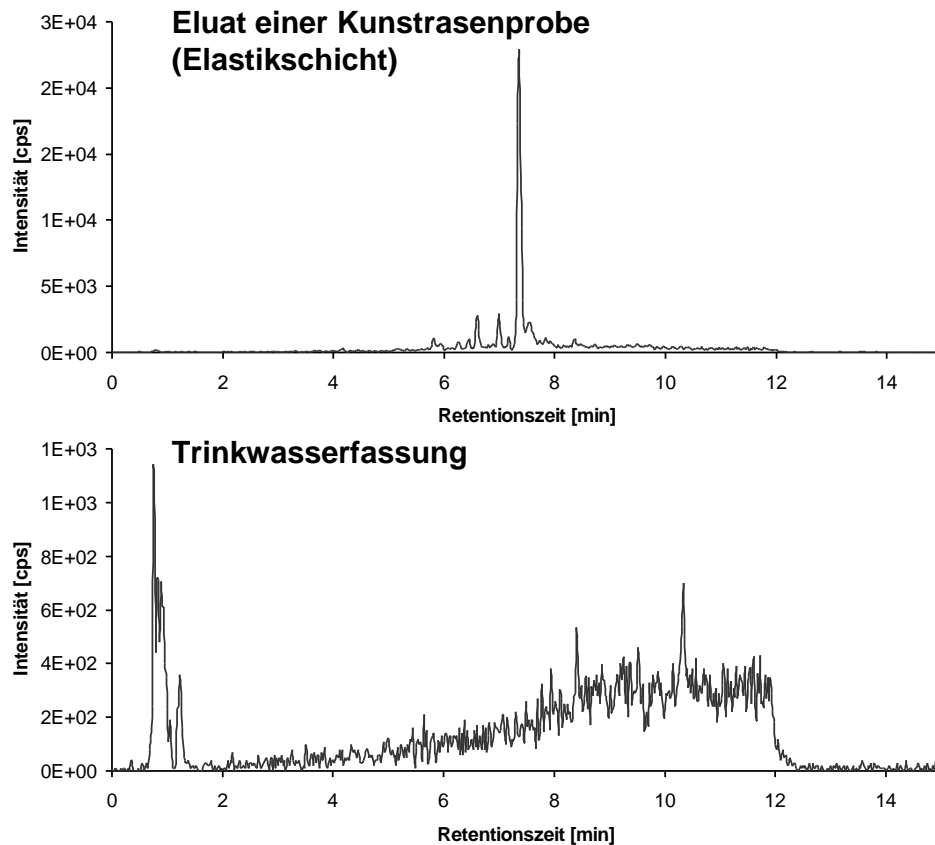


Abb. 6-17: Überwachung mit einem HPLC-Triplequadrupols einer Trinkwasserfassung auf eine in der Elastikschicht eines Kunstrasens enthaltene unbekannte Substanz mit dem Massenübergang 413.2/177.0.

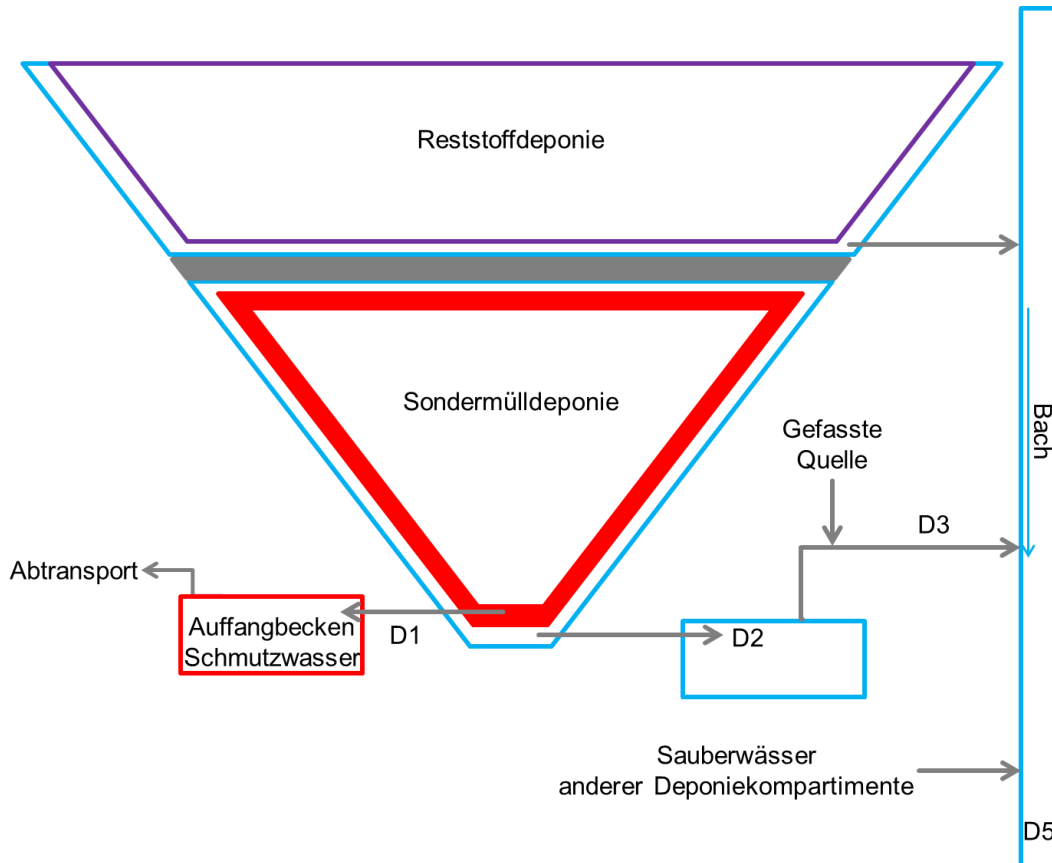
## 6.5 Überwachung einer gesicherten Sondermülldeponie

### 6.5.1 Beschreibung des Standortes

Die Sondermülldeponie D ist in einer Großdeponie integriert. In Abb. 6-18 ist die Sondermülldeponie inklusive den untersuchten Probeentnahmestellen schematisch dargestellt. Die Deponie liegt in einem engen V-förmigen Tal. Der ursprünglich durch das Tal fließende Bach wurde um die Großdeponie geleitet und fließt erst unterhalb der Deponie in seinem ursprünglichen Bett. Der Deponieinhalt besteht aus Fässern mit festem Inhalt, die nebeneinanderstehend einbetoniert wurden. Zur Erstellung der Zwischenschichten wurden neben Beton leicht kontaminiertes Erdmaterial und mit Zement verfestigte Schlacken eingebracht. Dieser Sondermüll-Kompartiment ist von Basis-, Talflanken- und Oberflächenabdichtungen umgeben. Die darin eingebauten Drainagen und damit die Sickerwässer münden kontrolliert in ein abflussloses Auffangbecken am Fuß der Sondermülldeponie. Zur Absicherung vor eindringendem Hangwasser, wurde zwischen Dichtung und Untergrund eine weitere Kiesschicht als Sauberwasserentwässerung eingebracht. Das aufgefangene Sickerwasser wird abtransportiert und nach behördlichen Vorgaben entsorgt. Das anfallende Sauberwasser wird über Kontrollbecken in den Bach unterhalb der Großdeponie eingeleitet. Inzwischen wurde die

Sondermülldeponie geschlossen und mit einer festen Endabdeckung versiegelt. Das restliche Talvolumen wird von einer ebenso abgeschlossenen Reststoffdeponie aufgefüllt. Das Drainagesystem der Reststoffdeponie ist von dem der Sondermülldeponie unabhängig.

Zusätzlich wird Talabwärts zur Sondermülldeponie noch eine Schlackendeponie und ein Bioreaktor betrieben. Deren Sickerwässer werden separat gefasst, am Fuß des Bioreaktors gesammelt und in die kommunale Abwasserreinigungsanlage abgeleitet. Die in diesen Bereichen gefassten Sauberwässer werden in den Bach unterhalb der Deponie eingeleitet.



**Abb. 6-18: Schematische Darstellung der Sondermülldeponie D mit Probenentnahmestellen D1 – D5.**

**Tabelle 6-4: Beschreibung der untersuchte Probenahmestellen.**

Probenahmestelle	Probenart	Probenahme
D1	Sickerwasser Sondermülldeponie	Mischprobe
D2	Gefasstes Sauberwasser des Sondermüllkompartiments.	Stichprobe
D3	Ablauf Sauberwasser aus D2 und Zufluss zweier Quellen. Probenahmestelle repräsentiert den Ablauf in D5.	Sammelprobe

Probenahmestelle	Probenart	Probenahme
D4	Schöpfprobe aus einer Kontrollbohrung im Schlackekompartiment unterhalb des Sondermüllkompartimentes (Sickerwasser des Schlackekompartiments und Grundwasser)	Stichprobe
D5	Oberflächenwasser des umgeleiteten Bachs unterhalb der Deponie (enthält alle in den jeweiligen Deponiekompartimenten gefassten und anschließend eingeleiteten Sauerwasser)	Stichprobe

## 6.5.2 Qualitätssicherung

### Stabilität der HPTLC/AMD-Trennung

Zur Stabilitätsbeurteilung der chromatographischen Entwicklung wurde vor jeder Chromatographie der sogenannte Kontroll-Mix vermessen. Dabei handelt es sich um eine Mischung aus 9 Substanzen (siehe Abb. 6-19), mit Rf-Werten im Bereich von 0,1 - 0,75 zusätzlich zu den Proben auf die HPTLC-Platte aufgetragen. Abb. 6-19 zeigt die Trennung der Verbindungen nach der HPTLC/AMD-Entwicklung mit dem verwendeten Gradienten, dargestellt als Mehrwellenlängenscan.

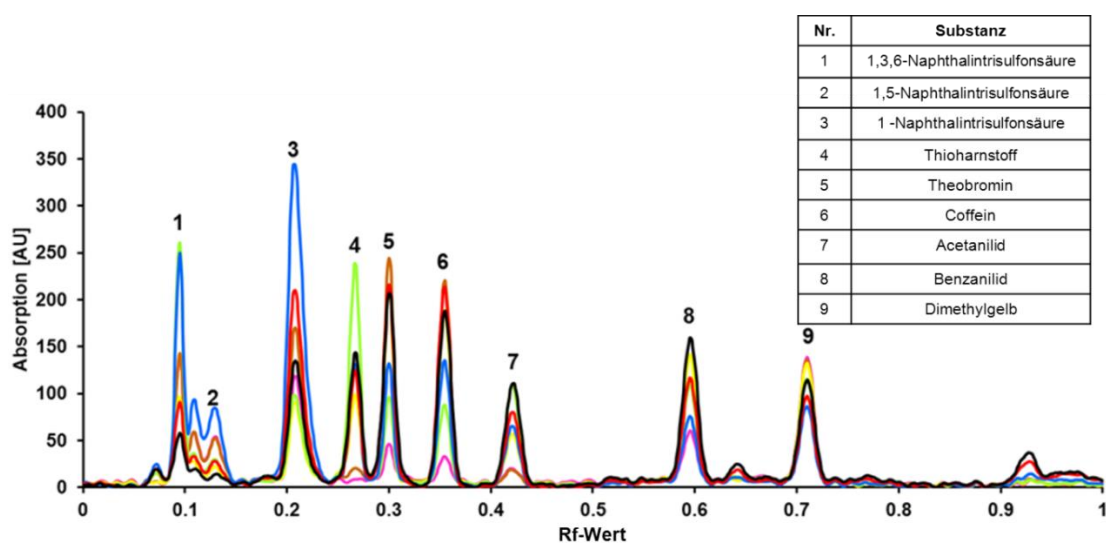
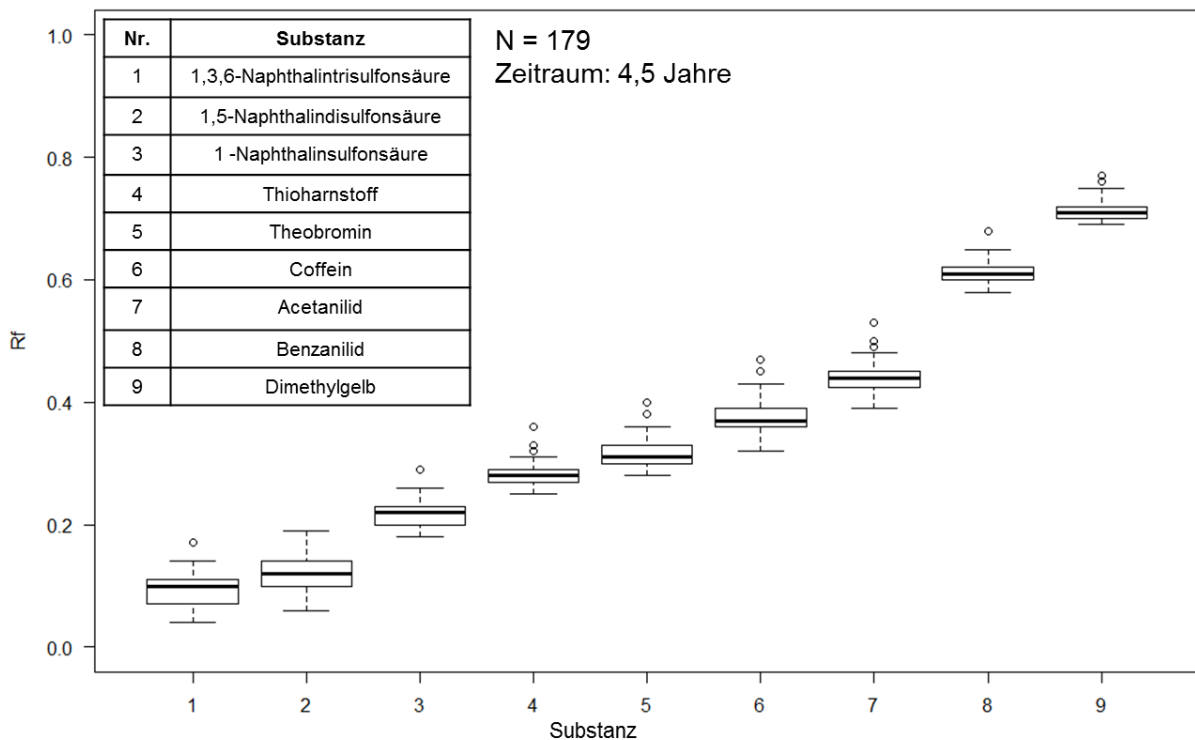


Abb. 6-19: Chromatogramm der Substanzen des Kontroll-Mixes nach der HPTLC/AMD-Entwicklung (Gradient 9).



Zur Beschreibung der gesammelten Rf-Werte der Kontroll-Substanzen über die Probenahmeserien wurde die Boxplot und Whisker-Darstellung gewählt. Alle Werte, die außerhalb der Whisker liegen werden durch einen Punkt gekennzeichnet und gelten im Allgemeinen als ausreißerverdächtig.

Zur Betrachtung der Stabilität der Chromatographie von der Probenahmeserie 1 (Mai 2011) bis 6 (Oktober 2015) wurden die Rf-Werte der Substanzen des Kontroll-Mix ermittelt und zusammengefasst. In dem Zeitraum über 4,5 Jahren wurden 179 HPTLC-Platten in 6 Analysenblöcken von wenigen Wochen (insgesamt 24 Wochen) entwickelt. Während dieser Zeit kamen drei baugleiche AMD2-Geräte zum Einsatz. In Abb. 6-20 werden die Streuungen der Rf-Werte als Boxplots dargestellt. Für die Rf-Werte aller Kontrollsubstanzen lässt sich eine Standardabweichung von  $\leq 0,03$  bzw. Interquartilsabstände von  $\leq 0,04$  ermitteln. Diese Werte zeigen, dass es sich bei der HPTLC/AMD um ein stabiles Trennsystem handelt. Damit ist gewährleistet, dass die Lagen von Substanzen auf den HPTLC-Platten über einen großen Zeitraum hinweg stabil bleiben.



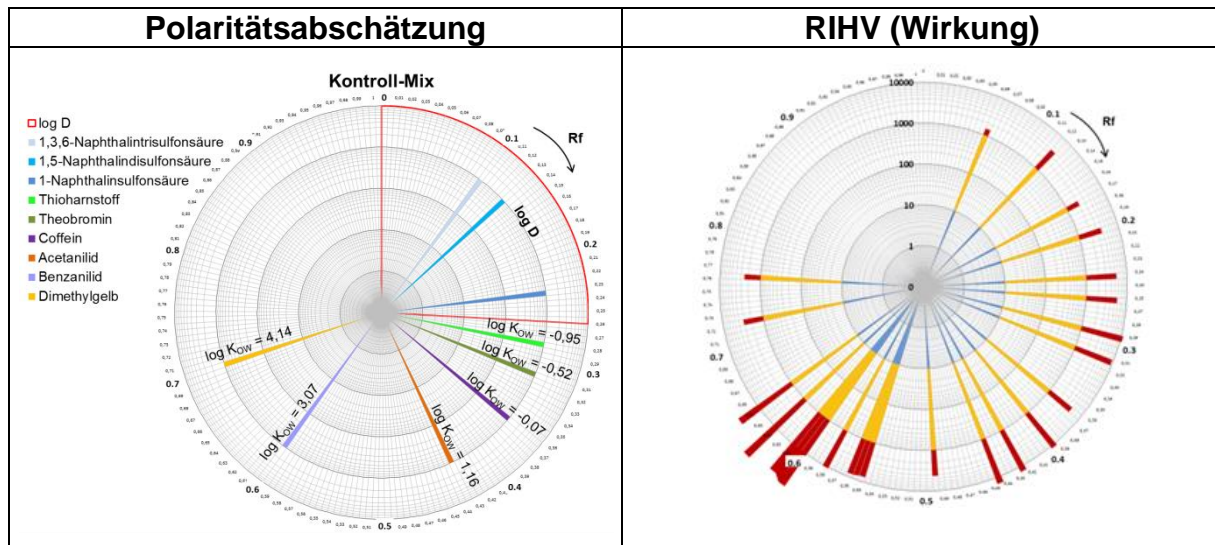
**Abb. 6-20: Boxplot-Darstellung der Stabilität der Rf-Werte der Substanzen aus dem Kontroll-Mix nach der HPTLC/AMD-Chromatographie für die Serie 1 bis 6 für einen Zeitraum von 4,5 Jahren über alle 6 Serien (N = 179 HPTLC-Platten auf 3 AMD2-Geräten).**

**Tabelle 6-5: Median der Rf-Werte der Substanzen aus dem Kontroll-Mix und die Breite der Interquartilsabstände für die Serie 1 bis 6 (N = 179 HPTLC-Platten auf 3 AMD2-Geräte).**

Nr.	Substanz	Rf (Median)	Standardabweichung	Interquartilsabstand (IQR)	1,5 IQR
1	1,3,6-Naphthalintrisulfonsäure	0,10	0,02	0,04	0,06
2	1,5-Naphthalindisulfonsäure	0,12	0,03	0,04	0,06
3	1-Naphthalinsulfonsäure	0,22	0,02	0,03	0,05
4	Thioharnstoff	0,28	0,02	0,02	0,03
5	Theobromin	0,31	0,02	0,03	0,05
6	Coffein	0,37	0,03	0,03	0,05
7	Acetanilid	0,44	0,02	0,03	0,04
8	Benzanilid	0,61	0,01	0,02	0,03
9	Dimethylgelb	0,71	0,01	0,02	0,03

Die Polarität der Substanzen aus dem Kontroll-Mix kann mit dem dekadischen Logarithmus des Verteilungskoeffizient zwischen n-Octanol und Wasser ( $\log K_{OW}$ ) beschrieben werden. Anhand der  $\log K_{OW}$ -Werte der Verbindungen des Kontroll-Mixes und deren Retentionsverhalten bei der HPTLC/AMD lassen sich die Polaritäten der Substanzen abschätzen. Für einen schnellen Vergleich zwischen der Lage der Hemmbanden und den Banden der Kontroll-Mix-Substanzen wurden letztere in ein Rf-Polardiagramm für den verwendeten Gradienten abgetragen (Tabelle 6-6). Für die Naphthalinsulfonsäuren lässt sich nur ein pH-abhängiger  $\log D$ -Wert angeben, da deren n-Octanol/Wasser-Verteilungsgleichgewicht pH-Wert abhängig ist (siehe Kap. 4.2.1). Da während der Gradientenelution sich der pH-Wert ändert, kann für die Naphthalinsulfonsäuren keine direkte Zuordnung zu einem  $\log D$ -Wert getroffen werden. Deshalb ist in Tabelle 6-6 der Rf-Bereich der stark polaren Verbindungen rot umrandet.

**Tabelle 6-6: Polaritätsabschätzung der Hemmbande über die Lage der Substanzen aus dem Chromatographie-Kontroll-Mix und den dazugehörigen  $\log K_{OW}$ -Werten für die Probe D1 SPE pH 2 Serie 6.**



### **Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmung**

Die Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmung durch hemmende Stoffe erfolgte durch Auftragen einer Positiv-Kontrolle. Diese besteht seit der Serie 2 (September 2011) aus, den Referenzsubstanzen Bromoxynil und Ibuprofen. Die Berechnung der durchschnittlichen Flächenmasse dieser zwei Verbindungen erfolgte aus der Konzentration in der Standardlösung, dem Auftragevolumen und der Bandenbreite nach der Entwicklung. Mit dem eingesetzten Gradient lassen sich diese Ibuprofen und Bromoxynil deutlich voneinander trennen (Ibuprofen  $R_f = 0,18$ , Bromoxynil  $R_f = 0,27$ ).

Seit der Serie 2 wurde die Positiv-Kontrolle auf 117 HPTLC-Platten aufgetragen und die Hemmung bestimmt. Dadurch lässt sich die Reproduzierbarkeit über einen Zeitraum von vier Jahren mit 5 Analysenblöcken von jeweils wenigen Wochen (insgesamt 18 Wochen) ermitteln. Für diesen Zeitraum liegt die mittlere Hemmung für Ibuprofen bei 60 % und für Bromoxynil bei 57 %. Die relativen Standardabweichungen von 9 bzw. 10 % sprechen für ein sehr stabiles biologisches Messsystem (Abb. 6-21).

Zusammen mit der guten Reproduzierbarkeit der  $R_f$ -Werte über mehrere Jahre zeigt, dass es möglich ist die Hemmwertmuster nach der chromatographischen Auftrennung einer Probenahmestelle über einen langen Zeitraum miteinander zu vergleichen. Größere Abweichungen der Lage und Stärke der Hemmung einer Bande sind daher auf Unterschiede in den Proben und nicht auf das Messsystem zurückzuführen.

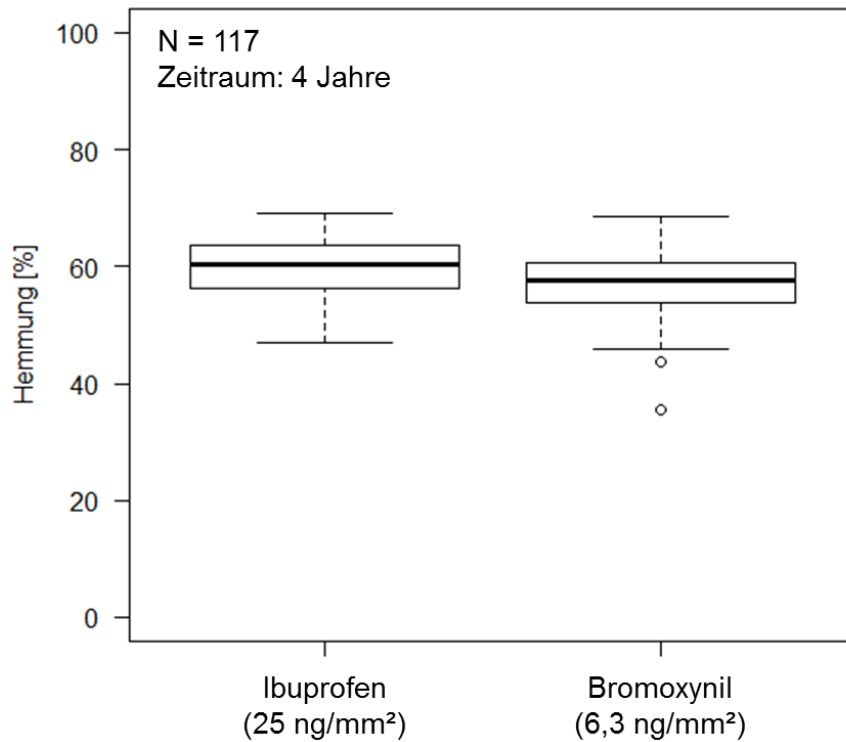


Abb. 6-21: Boxplot-Darstellung der Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmung durch Ibuprofen und Bromoxynil nach der HPTLC/AMD-Chromatographie für die Serie 2 bis 60 für einen Zeitraum von 4 Jahren (N = 117 HPTLC-Platten auf 3 AMD2-Geräten).

Tabelle 6-7: Mittlere Hemmungen, relative Standardabweichungen und Interquartilsabstände für Ibuprofen und Bromoxynil über die Serien 2 bis 6.

Substanz	Rf-Wert	Flächenmasse [ng/mm <sup>2</sup> ]	Mittlere Hemmung [%]	Standardabweichung	Relative Standardabweichung aller Werte [%]	Interquartilsabstand (IQR)	1,5 IQR
Ibuprofen	0,18	25	60	5,2	8,9	7,3	11,0
Bromoxynil	0,27	6,3	57	5,6	9,7	6,8	10,1

### 6.5.3 Methode

#### ***Probenvorbereitung und HPTLC***

##### Festphasenextraktion

Probenvolumen:	200 mL
pH-Wert:	2 und 7
SPE-Material:	Isolute ENV+
Säulenkonditionierung:	1.) 6 mL n-Hexan 2.) 6 mL Aceton 3.) 6 mL Methanol 4.) 6 mL H <sub>2</sub> O pH = 2 bzw. pH = 7
Pumpengeschwindigkeit:	4 mL/min
Elution:	6 mL Methanol
Extraktvolumen:	1 mL in Methanol

##### Flüssig-Flüssigextraktion mit tert.-Butyl-methyl-ether (TBME)

Probenvolumen:	100 mL
pH-Wert:	2 und 7
NaCl (ausgeglüht bei 450 °C):	12 g
TBME Volumen:	6 mL
Extraktionszeit:	1 h

##### HPTLC

HPTLC/AMD-Gradient:	9
---------------------	---

#### ***Flüssigkeitschromatographie mit hochauflösender Massenspektrometrie (HPLC-HRMS)***

Die Anwendung der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt an ein Flugzeitmassenspektrometer (HPLC-QTOFMS) ermöglicht die Messung auch von unbekanntem Substanzen über die exakte Masse bzw. des m/z und Retentionszeit (Rt). Für diese Analysetechnik wurden ein HPLC von Shimadzu (LC20) und ein QTOFMS von Sciex (TripleTOF 5600) verwendet. Das Massenspektrometer misst zu jedem Zeitpunkt der Chromatographielaufzeit ein komplettes Massenspektrum (Abtastrate minimal 1 Spektrum pro Sekunde). Die Massen der Ionen werden mit einer Genauigkeit von kleiner 5 ppm ermittelt. Aufgrund der Vielzahl an Ionen, die bei der Elektrosprayionisation (ESI) gebildet werden, sind im Totalionenstromchromatogramm meist keine chromatographischen Peaks zu erkennen. Deshalb muss ein spezieller Algorithmus zum Herausfiltern der Komponenten angewendet werden. Dabei stellt eine Komponente eine mögliche Verbindung mit der exakten Masse und der Rt dar. Die gefundenen Komponenten bei der HPLC-QTOFMS-Analyse der Proben werden in einem Masse-Retentionszeit-Diagramm, auch „Punktwolke“ genannt, dargestellt.

Die Aufgabe des Non-Target-Screenings besteht darin, so viele wie möglich dieser vorhandenen Informationen durch eine systematische Datenbearbeitung und Auswertung herauszufiltern und zu interpretieren. Zur detaillierteren Auswertung der ermittelten Punktwolken werden diese als Mengen im mathematischen Sinne betrachtet. Die Elemente der Menge sind die ermittelten Komponenten in der Probe, gegeben durch die exakte Masse und die Retentionszeit ( $m/z@RT$ ). Die Mengen unterschiedlicher Proben können unter Berücksichtigung der Messunsicherheit miteinander verrechnet werden. Eine wichtige Größe beim Vergleich der Punktwolken von Probe A und B ist die Schnittmenge ( $A \cap B$ ). Diese gibt die Anzahl der Komponenten an, die gemeinsam in den Proben vorkommen (Übereinstimmungen ohne Berücksichtigung der Intensität) [23].

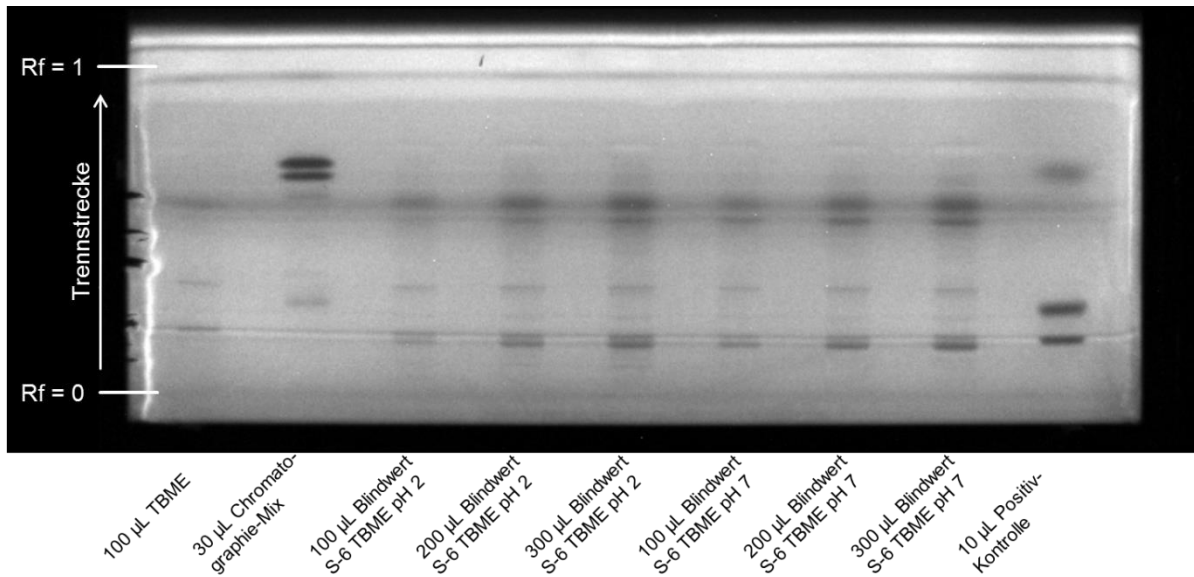
#### **6.5.4 Ergebnisse und Diskussion**

##### ***Blindwerte***

Zur Erfassung der Blindwerte bei der Probenaufbereitung wurde Wasser aus einer Laborreinstwasseranlage (Typ 1 Reinstwasseranlage nach ASTM D1193-91 [128]) in gleicher Weise wie die Proben mit LLE (TBME) und SPE angereichert. Zusätzlich fand noch eine Untersuchung des Blindwertes, welcher nur von der SPE-Kartusche erzeugt wird, statt. Mit Feldblindproben sollten Querkontamination über die Luft während der Probenahme und des Transports erfasst werden. Diese wurde durch abfüllen von Reinstwasser in Probenflaschen an den Probenahmestellen erzeugt.

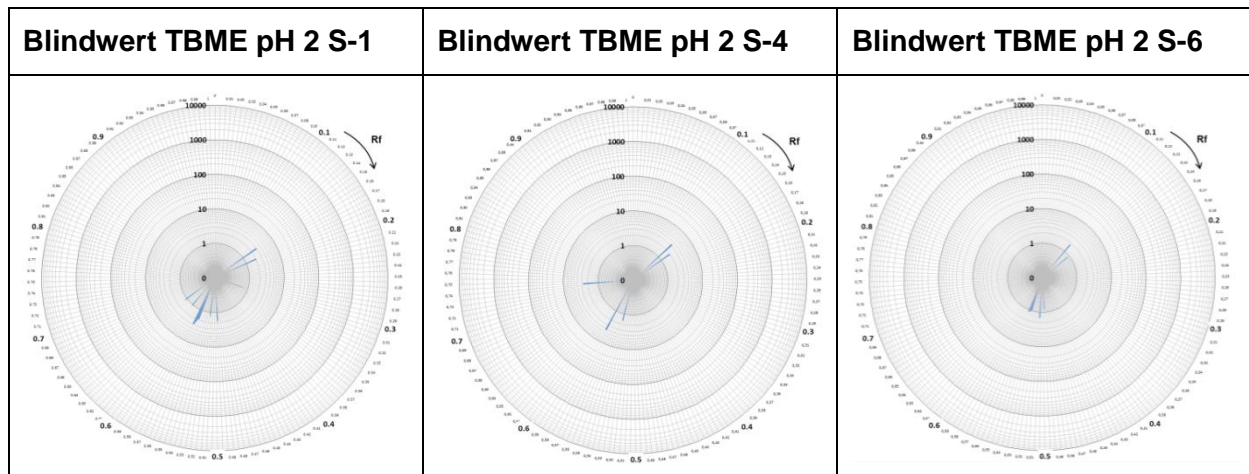
##### TBME Blindwerte

Nach der LLE mit TBME des Laborreinstwassers konnten einige schwach hemmende Banden nach der Trennung detektiert werden (siehe Abb. 6-22). Dabei zeigt sich, dass nicht alle Hemmbanden aus dem Reinstwasser stammen bzw. nicht als Eintrag während der Probenvorbereitung gewertet werden können. Doch fallen die RIHV-Werte für diese Hemmbanden mit 1-3 [1000/ $\mu$ L] sehr gering aus. Zudem fällt bei der Betrachtung dieser Blindwerte über die Serien auf, dass sich das Hemmmuster über die Jahre verändert (Tabelle 6-8). Die Ursache ist unbekannt.



**Abb. 6-22:** Aufnahme der Biolumineszenzhemmung für die Blindwertuntersuchung der Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels TBME bei pH 2 bzw. pH 7 der Serie 3 nach der Trennung und nach einer Inkubationszeit von 10 min.

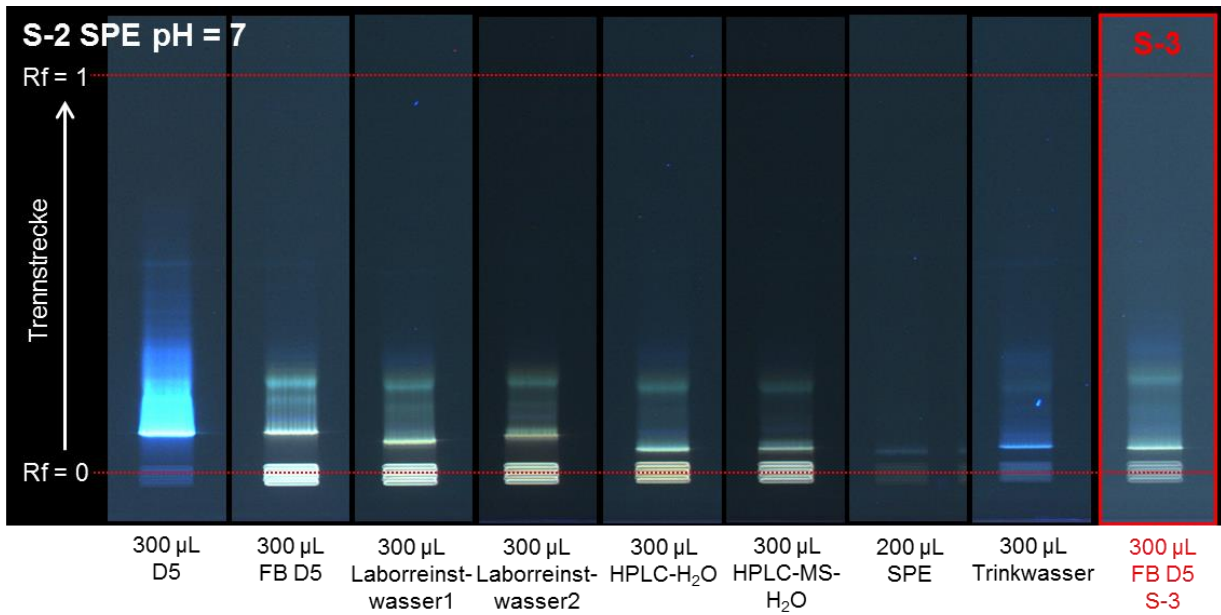
**Tabelle 6-8:** Ausgewählte RIHV-Polardiagramme der Biolumineszenzhemmung von *Aliivibrio fischeri* durch pH 2 Blindproben nach TBME-Extraktion.



### SPE -Blindwerte

Bei Untersuchungen der SPE-Blindwerte während der Probenahmeserie 2 konnte mit Hilfe der Detektion der Eigenfluoreszenz bei  $\lambda = 366 \text{ nm}$  gezeigt werden, dass aus sogenannten Reinstwässern verschiedener Quellen fluoreszierende Substanzen extrahiert werden können. Das Muster der Fluoreszenz war dabei für alle untersuchten „Reinstwässer“ nach der HPTLC/AMD-Entwicklung sehr ähnlich (Abb. 6-23). Die Fluoreszenzaufnahmen bei  $\lambda = 366 \text{ nm}$  der Feldblindwerte der Serie 3 und 4 zeigten wieder ein ähnliches Fluoreszenzmuster, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass ein ähnliches Reinstwasser wie bei Serie 2 für die Feldblindwertuntersuchung eingesetzt wurde.

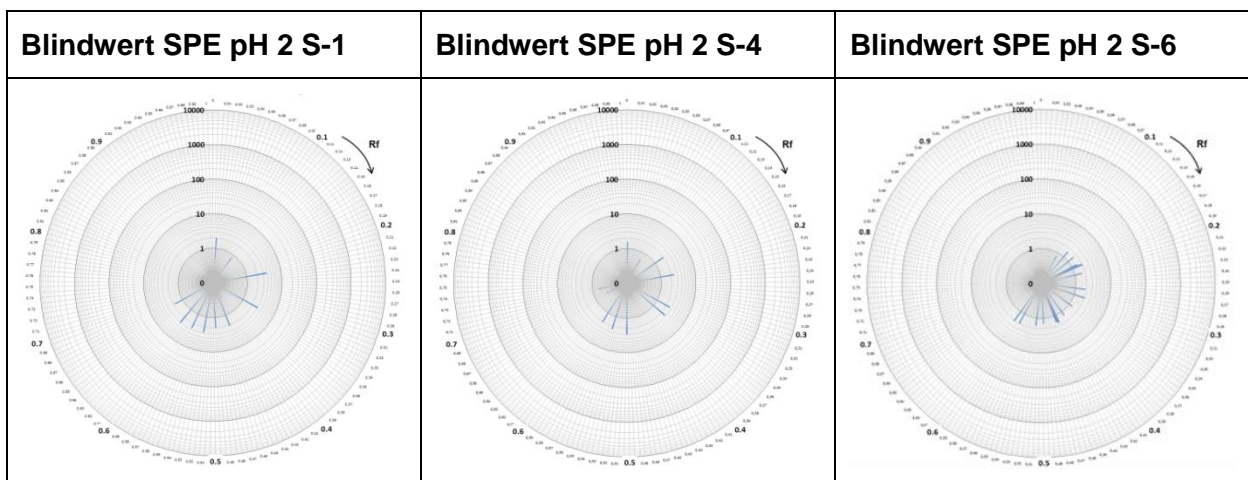




**Abb. 6-23:** Untersuchung der Herkunft von Blindwerte mittels SPE-Extrakten von D5 (S-2), Feldblindwert D5 (S-2), verschiedene Reinstwässer, Trinkwasser und einem Extrakt von einer SPE-Kartusche ohne Anreicherung einer Trinkwasserprobe und ein SPE-Extrakt von einem Feldblindwert T6 der Serie 3.

In Tabelle 6-9 sind die Blindwerte für die SPE Extraktion bei pH 2 für die Serien 1, 4 und 6 gegenübergestellt. Alle RIHV-Werte der Hemmbanden der Untersuchung der Laborblindwerte bzw. Feldblindwerte sind < 10. Damit ist es trotz der Blindwertproblematik möglich, Auffälligkeiten in den RIHV-Wert-Polardiagrammen zu erkennen.

**Tabelle 6-9:** Ausgewählte RIHV-Polardiagramme der Biolumineszenzhemmung von *Aliivibrio fischeri* durch Blindproben nach SPE-Extraktion.



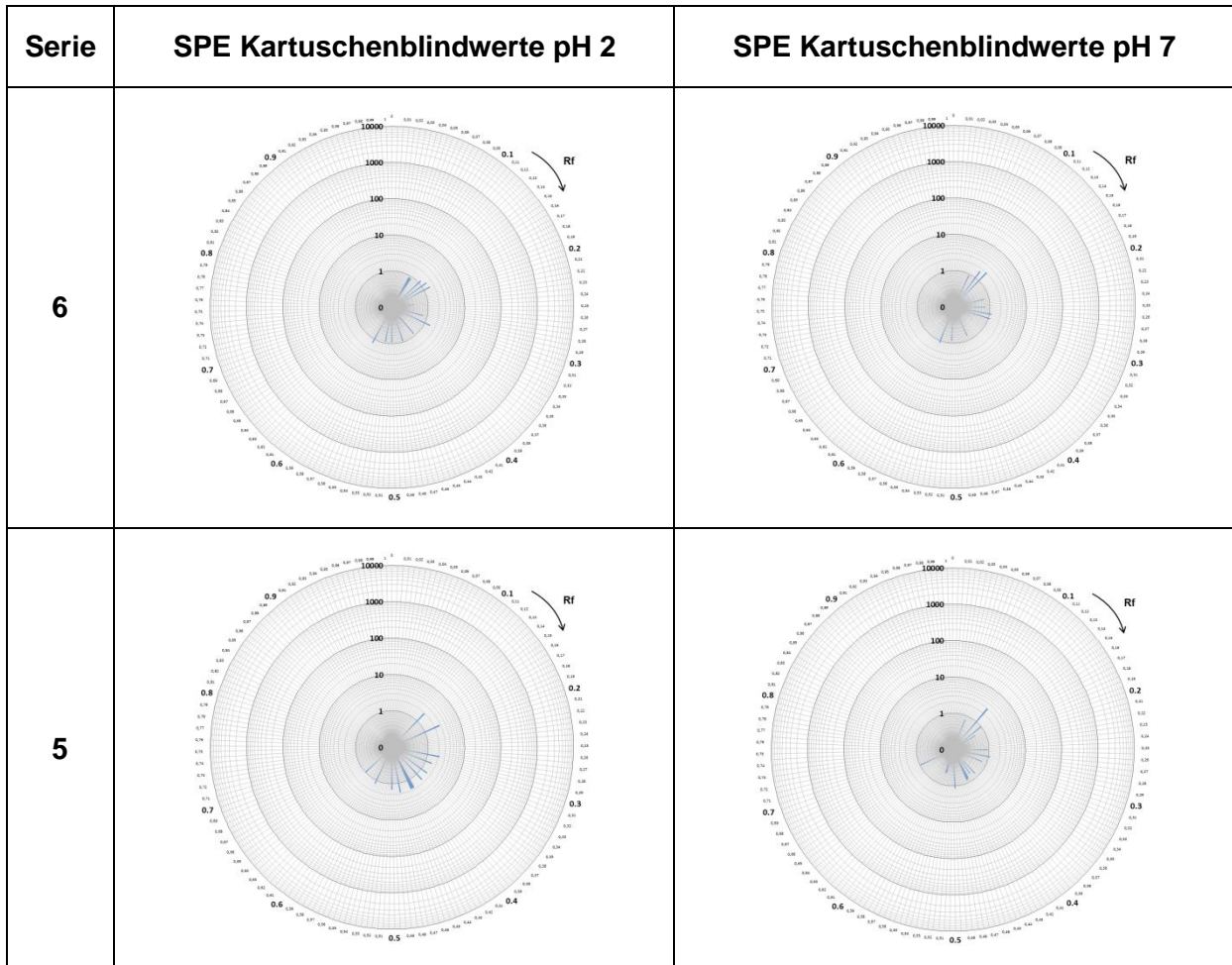
SPE-Kartuschenblindwerte

Ergänzend wurden aufgrund der Ergebnisse der Blindwertuntersuchungen mit Laborreinstwasser in den Serien 5 und 6 die SPE-Kartuschenblindwerte betrachtet (Tabelle 6-10). Diese



Blindwerte werden erzeugt, indem das SPE-Material konditioniert, getrocknet und im Anschluss mit Laborreinstwasser eluiert wird, ohne dass das Laborreinstwasser durch das SPE-Material gesaugt wird. Auch hier sind sehr schwache Hemmzonen zu beobachten. Diese Hemmbanden besitzen einen RIHV-Wert zwischen 0,5 und 3 [1000/ $\mu$ L] und sind damit als sehr gering einzustufen.

**Tabelle 6-10: Polardiagrammdarstellung der RIHV-Werte der SPE-Kartuschenblindwerte der Serien 5 und 6.**



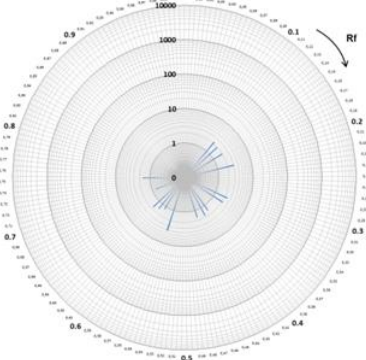
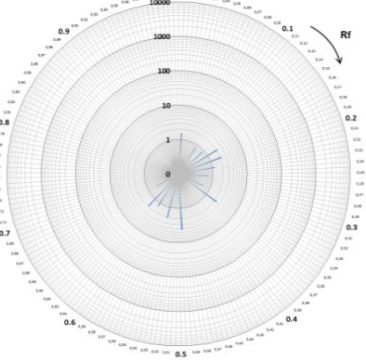
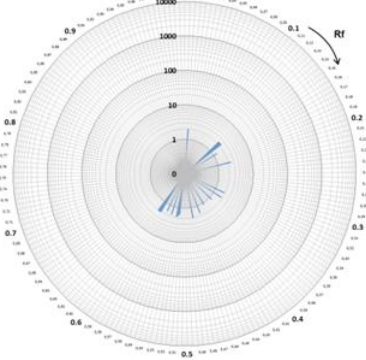
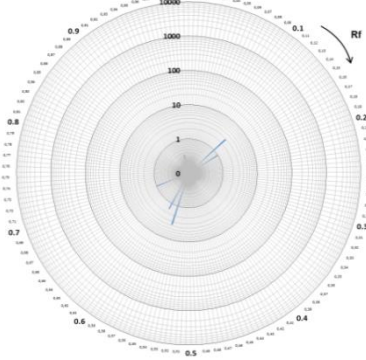
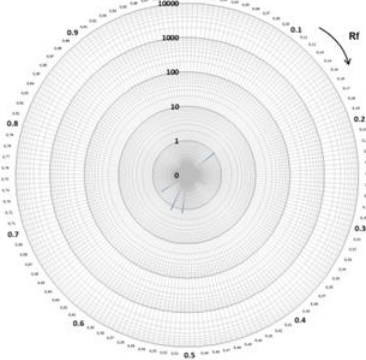
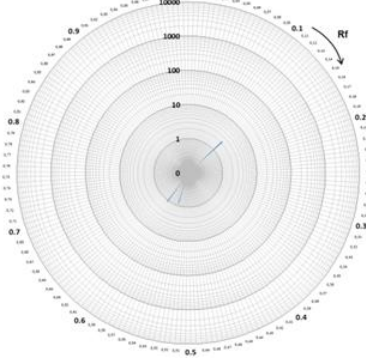
Feldblindproben

Die Feldblindproben (FB) wurden wie die als Sauberwasser eingestuft Proben behandelt. Da sich die Probenahmestellen für D2 und D1 in enger Nachbarschaft befinden, repräsentiert die FB D2 auch D1.

In der Tabelle 6-11 sind die FB der Serien 3 und 4 für die unterschiedlichen Anreicherungen gegenübergestellt. Bei allen entnommenen Feldblindwerten konnten wie bei den Blindwerten aus Reinstwasser einige Hemmbanden detektiert werden (siehe Tabelle 6-8 und Tabelle 6-9). Diese stimmen nur zum Teil mit Laborblindwerten überein, da ein anderes Reinstwasser verwendet wurde. Auch eine mögliche Kontamination während der Probenahme ist nicht

auszuschließen, da sich die Feldblindwerte auch untereinander etwas unterscheiden. Aber alle RIHV-Werte sind deutlich kleiner 10 [1000/μL] und stellen somit nur eine geringe Hemmung dar und erlauben die Detektion von größeren Auffälligkeiten.

**Tabelle 6-11: Feldblindproben von den Probenahmestellen D2 und D4 nach SPE bzw. LLE mit TBME.**

FB D4 S-5 SPE pH 2	FB D4 S-6 SPE pH 2	FB D2 S-6 SPE pH 2
		
FB D4 S-5 TBME pH 2	FB D4 S-6 TBME pH 2	FB D2 S-6 TBME pH 2
		

### **Monitoring des Deponiesickerwassers von D1**

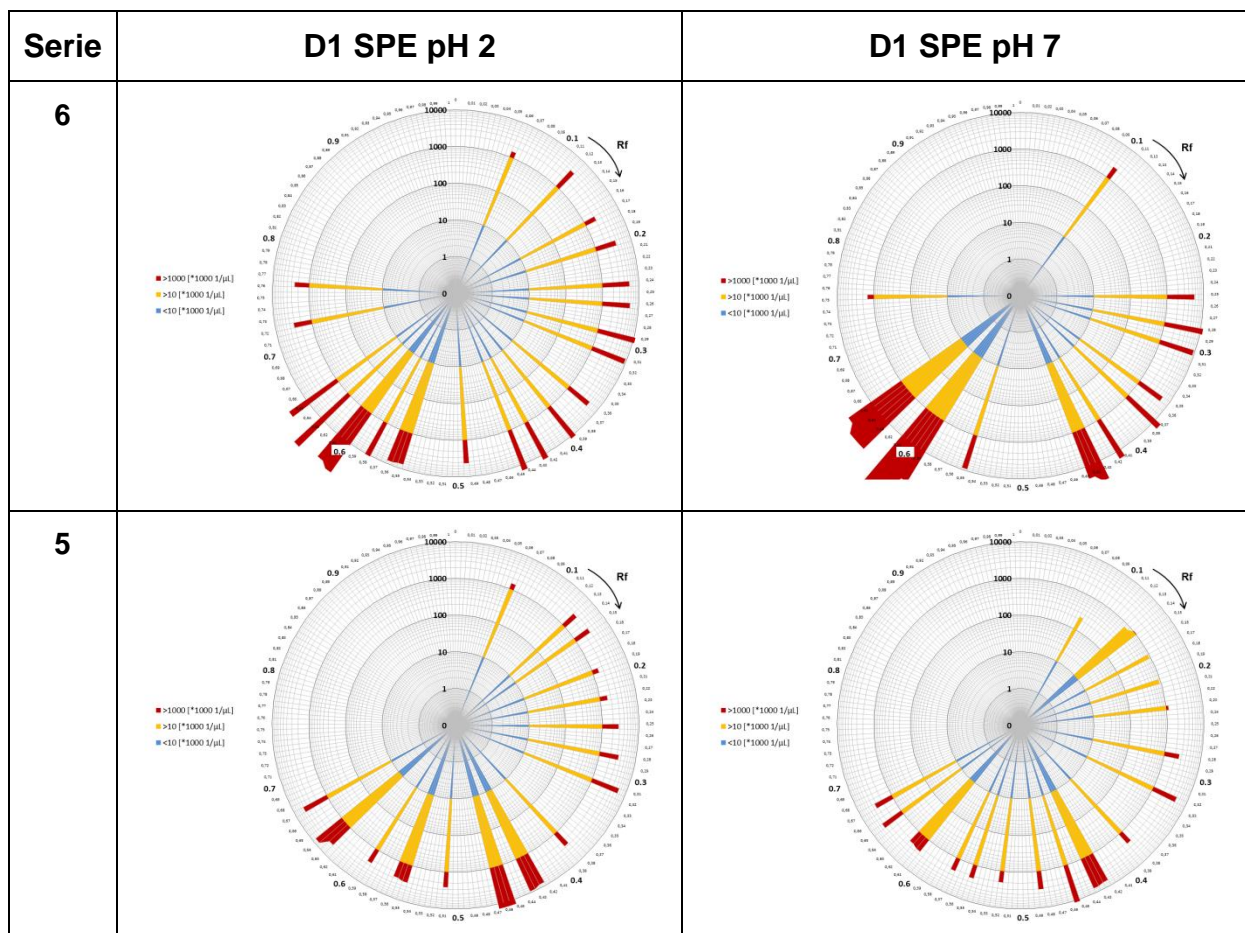
Bei den Proben aus D1 handelt es sich um Sickerwasser aus dem Sondermüllkompartiment der Deponie. Erwartungsgemäß zeigen die Extrakte der SPE- bzw. LLE-Anreicherung bereits bei einem geringen Auftragevolumen eine Vielzahl an stark hemmenden Banden über einen weiten Rf-Bereich. Über alle Probenahmeserien hinweg ist eine Zunahme der Wirkung im Sickerwasser festzustellen.

In Tabelle 6-12 und Tabelle 6-13 sind die logarithmischen Polardiagramme der RIHV-Werte für die Proben D1 der Serien 1 - 6 mit SPE und LLE Anreicherung zusammenfasst und die beiden Extraktions-pH-Werte jeweils gegenübergestellt. Bei den SPE-Extrakten sind die RIHV-Werte bei beiden pH-Werten für fast alle Banden > 1000 [1000/μL]. Auch wenn sich das Hemmmuster in Stärke und Lage der Hemmbanden von Serie zu Serie etwas unterscheidet, fällt die Hemmung in der Serie 6 für die Hemmbanden bei Rf = 0,60 und

0,64 [1000/ $\mu$ L] mit Werten von 57000 [1000/ $\mu$ L] und 55000 [1000/ $\mu$ L] bei pH 7 besonders stark aus. Bei pH 2 werden besonders im Rf-Bereich von 0,00 - 0,25 einige Hemmbanden zusätzlich erfasst. In diesem Bereich liegen viele Substanzen, deren log K<sub>OW</sub> vom pH-Wert abhängig sind.

Aufgrund des geringeren Anreicherungsfaktors fällt bei der LLE mit TBME die Hemmung immer etwas geringer aus als bei der SPE. Da es sich hierbei um eine ergänzende Extraktionstechnik handelt, ist auch nicht mit dem gleichen Hemmmuster zu rechnen wie für die SPE. Doch auch hier fallen bei der Serie 6 die RIHV-Werte deutlich höher aus, als in den Serien zuvor. Damit wird das Ergebnis der SPE-Extrakte bestätigt.

**Tabelle 6-12: Polardiagrammdarstellung der RIHV-Werte für D1 nach SPE-Extraktion der Serien 1 - 6.**





HPTLC-Leuchtbakterien-Hemmtest

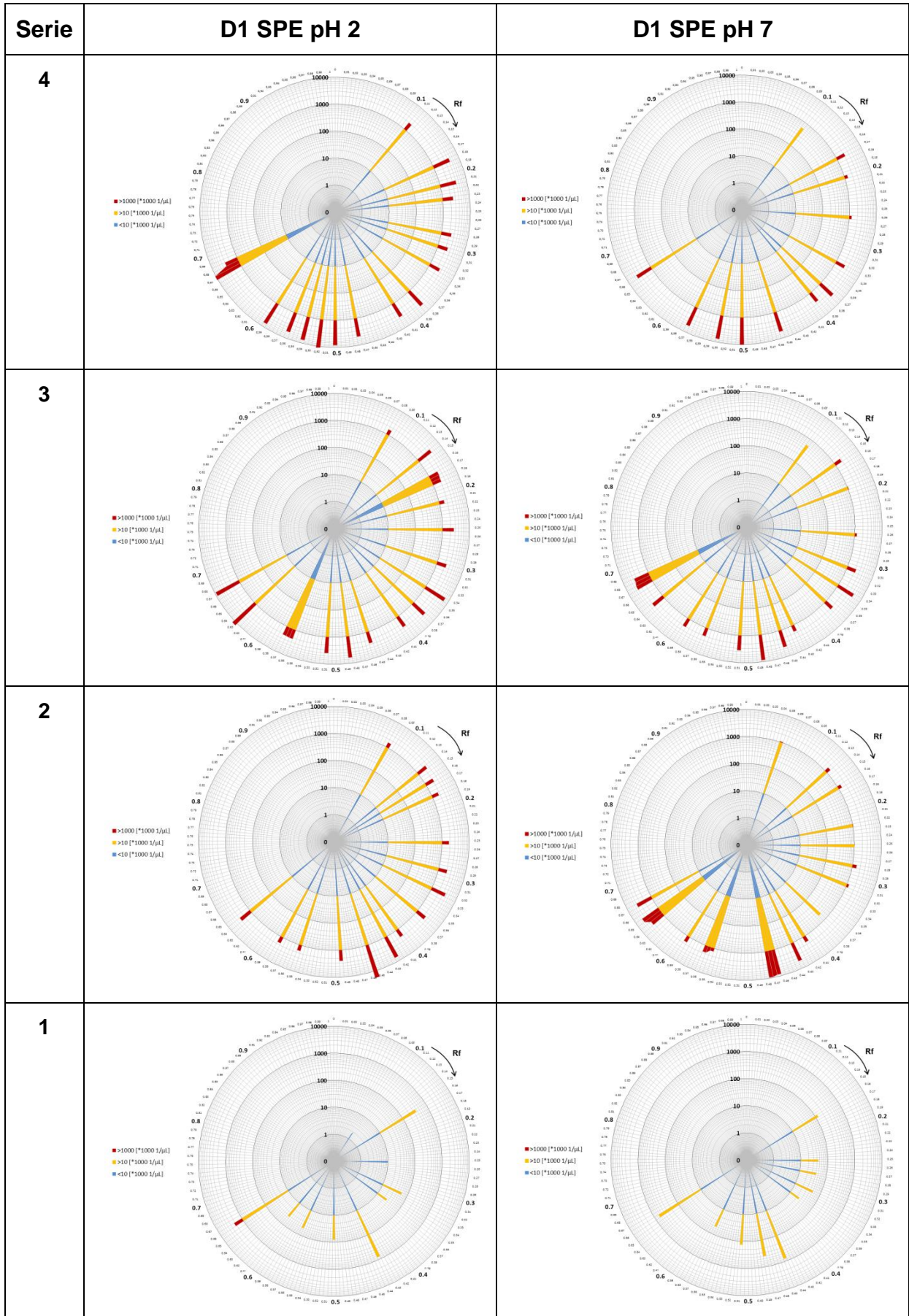
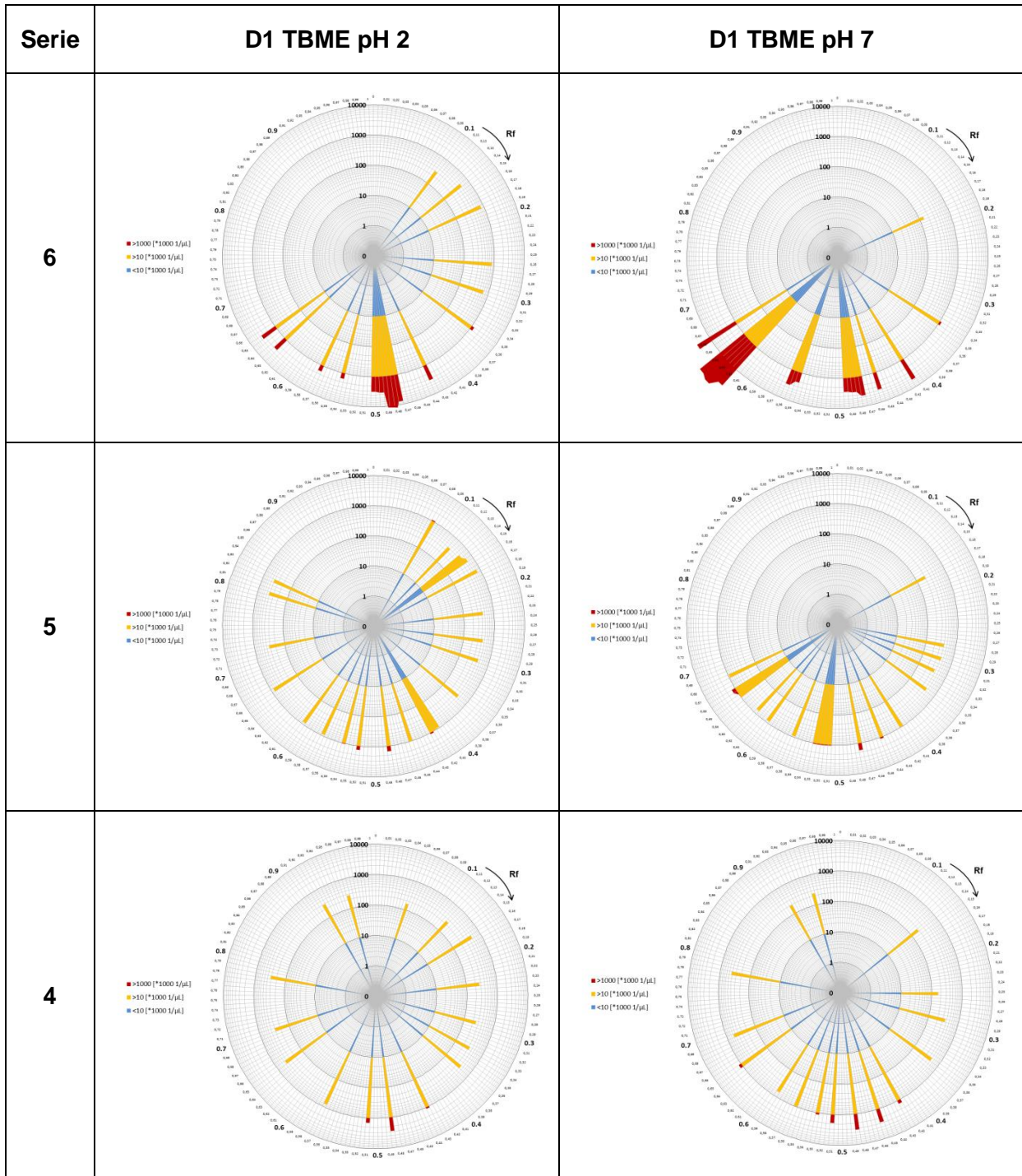
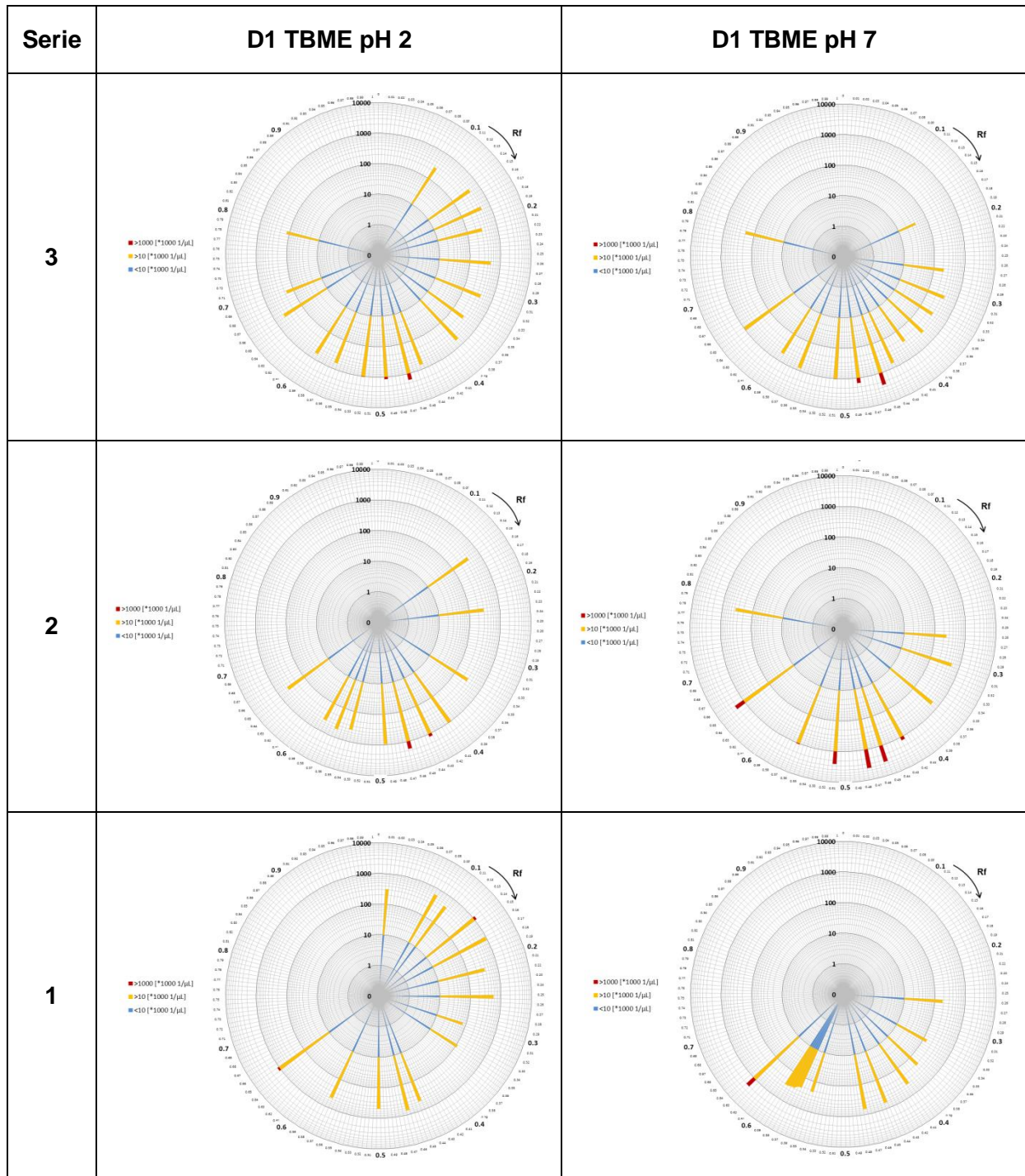


Tabelle 6-13: Polardiagrammdarstellung der RIHV-Werte für D1 nach Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels TBME der Serien 1 - 6.



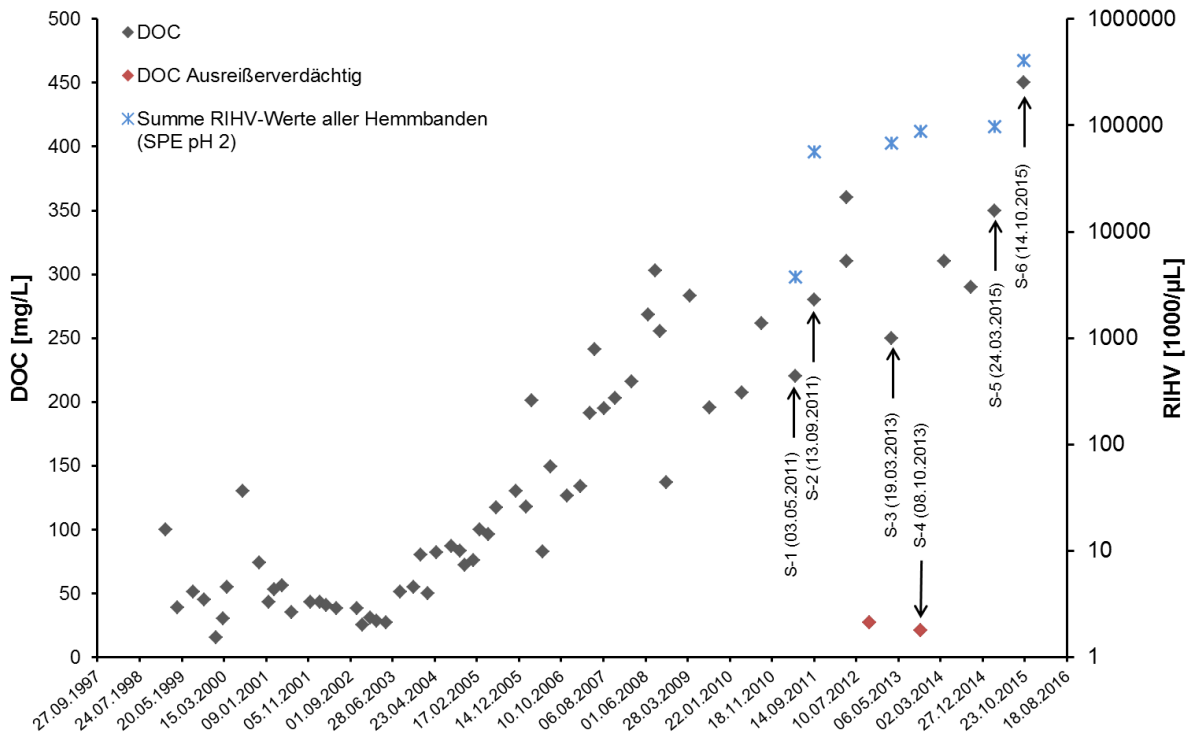




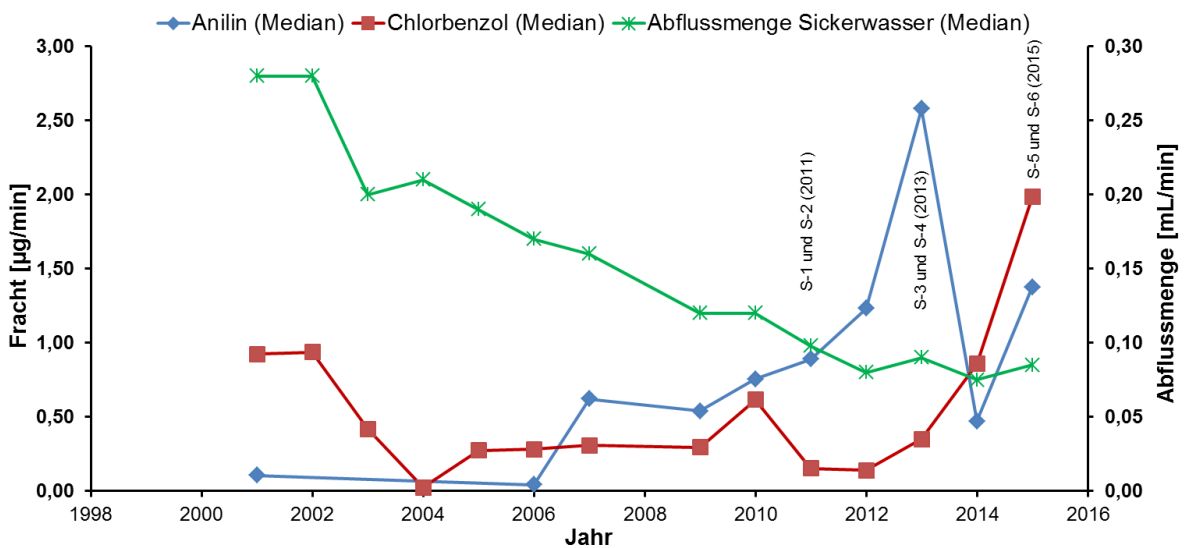
Der parallel gemessenen gelöste organische Kohlenstoff (DOC) (Abb. 6-24) zeigen, dass die Belastung an organischen Substanzen im Sickerwasser ebenso ansteigt. Auch wird in der Serie 6 der bislang höchste DOC-Wert seit Aufzeichnungsbeginn 1999 gemessen. Damit bestätigen die DOC-Werte die Ergebnisse der wirkungsbezogenen Analytik.

Der Anstieg des DOC kann seit Fertigstellung der Endabdeckung der Sondermülldeponie beobachtet werden. Erwartungsgemäß verringerte sich seit dem auch die Sickerwassermenge kontinuierlich und stabilisiert sich seit 2012 auf eine Menge von  $0,083 \pm 0,006$  mL/min

(Abb. 6-25). Die Zusammensetzung des DOCs ändert sich jedoch über die Zeit, wobei kein Trend erkennbar ist. Das ist in Abb. 6-25 beispielhaft an der Fracht von Anilin und Chlorbenzol gezeigt. Die Veränderung der Zusammensetzung des Sickerwassers wird durch die unterschiedlichen Hemmmuster beim HPTLC-Leuchtbakterientest in den verschiedenen Probenahmeserien bestätigt (Tabelle 6-12, Tabelle 6-13).

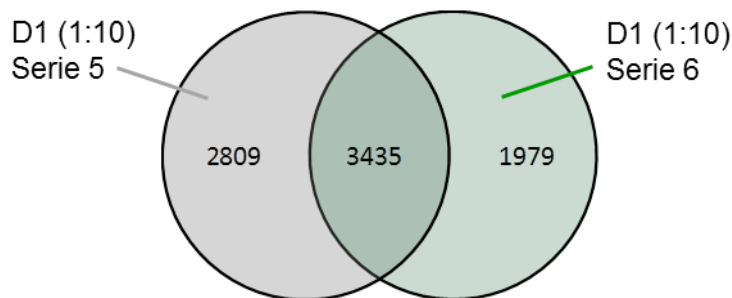


**Abb. 6-24: Gegenüberstellung der Summe der RIHV-Werte aller Hemmbanden und der gemessenen DOC-Werte für die Proben aus D1. Rot markiert sind ausreißerverdächtige DOC-Werte. (Quelle DOC-Werte: Deponiebetreuendes Ingenieurbüro).**



**Abb. 6-25: Medianwerte des Monitorings der Abflussmenge des Sickerwassers aus D1 und den darin enthaltenen Frachten Anilin und Chlorbenzol für die Sondermülldeponie D. (Quelle Deponiebetreuendes Ingenieurbüro)**

Neben der WBA wurden die Proben von D1 der Serie 5 und 6 mit der HPLC-HRMS untersucht. Da es sich hierbei um stark belastetes Wasser mussten diese zuvor um den Faktor 10 verdünnt werden. Dabei konnten für die Probe der Serie 5 6244 Komponenten und für die der Serie 6 5414 Komponenten detektiert werden. Die Venn-Diagramme der untersuchten Proben sind in Abb. 6-26 dargestellt. Es sind somit 3435 gemeinsame Komponenten in den bei der Serien 5 und 6 der Probenahmestelle D1 (entspricht 55 % der Serie 5 bzw. 63 % Serie 6). Dieser Unterschied bestätigt ebenso die Veränderung des Musters der Hemmdigramme.



**Abb. 6-26: Venn-Diagramme zum Vergleich der HPLC-QTOFMS-Ergebnisse der Probenahmestelle D1 der Serien 5 und 6.**

#### ***Monitoring der Probenahmestelle D4***

Bei den Proben von D4 handelt es sich um eine Schöpfprobe aus einer Kontrollbohrung im Schlackenkompartiment des Sondermüllkompartiments. Die Probebohrung liegt ca. 20 m talabwärts vom Kontrollbauwerk der Sondermülldeponie und reicht bis in den Kieskörper an der Basis des Schlackenkompartiments (Entwässerungskörper) und im Bachschutt. Die dort entnommene Probe beinhaltet sowohl Sickerwasser des Schlackenkompartiments als auch Grundwasser. Das Wasser in D6 könnte von der Sondermülldeponie her, höchstens via Versickerung von kontaminiertem Sauberwasser in den Fels (Molasse) bzw. Gehängeschutt oder über Schmutzwasserverluste zufolge einer stirnseitigen Leckage in der Dichtung via die Kapillarbarriere beeinflusst werden. Dieses Wasser wird von den separaten Basisdrainagen des Schlackenkompartiments aufgefangen, am Fuß des Tales gesammelt und anschließend in die kommunale Abwasserreinigungsanlage abgeleitet.

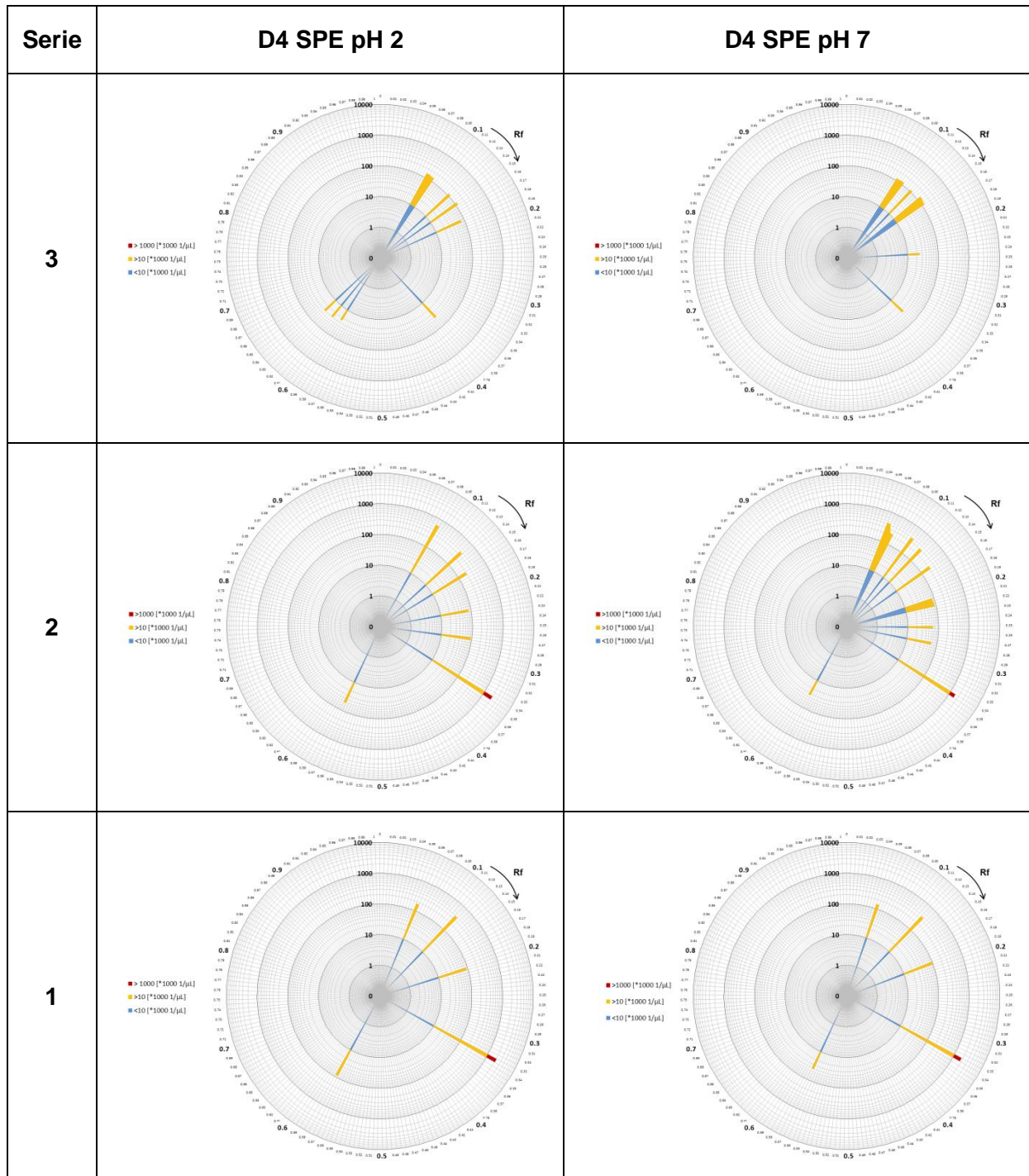
Da es sich hier um belastetes Wasser handelt wurden Auftragevolumina von 5, 10, 20 und 30 µL gewählt. In Tabelle 6-14 sind die RIHV-Werte für D6 bei unterschiedlichen pH-Werten für SPE Anreicherungen der Serien 1 - 6 zusammengefasst. Bei Betrachtung der RIHV-Werte zeigt sich, dass die Wirkungen über alle Hemmbanden seit der Serie 3 (März 2013) abnehmen. Besonders wenige Hemmbanden sind in den Extrakten der Serie 6 zu beobachten. Die RIHV-Werte der Hemmbanden in den SPE-Extrakten der Serien 5 und 6 liegen im



Rf-Bereich < 0,35 bei 50 - 100 [1000/μL] und bei den Hemmbanden Rf > 0,35 bei 10 - 20 [1000/μL].

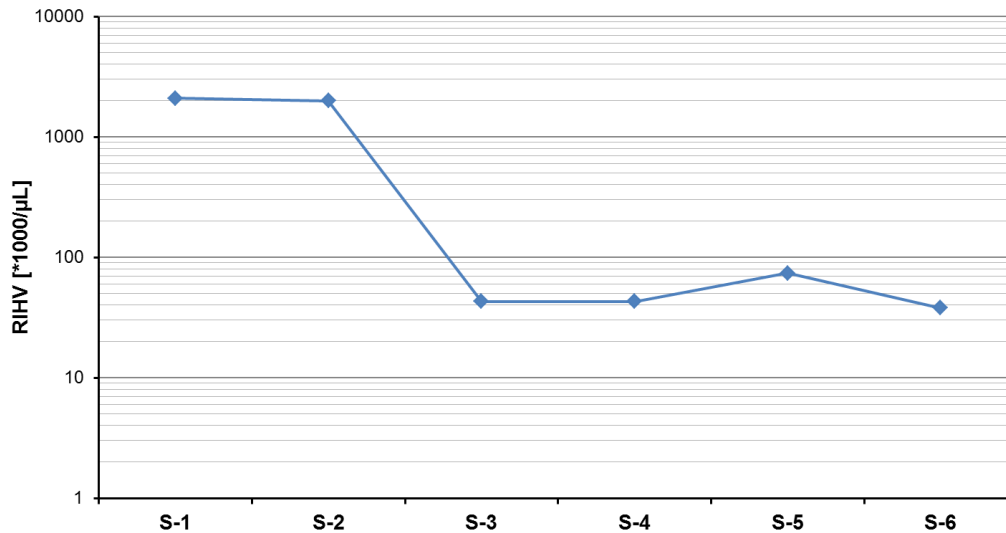
**Tabelle 6-14: Polardiagrammdarstellung der RIHV-Werte für D4 nach SPE-Extraktion der Serien 1 - 6.**

Serie	D4 SPE pH 2	D4 SPE pH 7
6		
5		
4		



In Abb. 6-27 ist der Verlauf des RIHV- der in den ersten beiden Serien markanten Bande dargestellt. Hier ist sehr deutlich der Abfall der Werte zwischen der Serie 2 (September 2011) und 3 (März 2013) von ca. 2000 auf 40 [ $\cdot 1000/\mu\text{L}$ ] zusehen. In den folgenden Probenahmeserien stabilisiert sich die Hemmung dieser Bande auf Werte im Bereich von 40 – 70 [ $\cdot 1000/\mu\text{L}$ ].

Die beobachtet abnehmende Wirkung kann möglicherweise auf eine Änderung der Fließrichtung des Sickerwassers und damit einhergehende Verdünnung erklärt werden. Auch eine Veränderung innerhalb des Schlackenkompartiments ist nicht auszuschließen.



**Abb. 6-27: Monitoring der Hemmbande der Probenahmestelle D4 bei  $R_f = 0,34$  mittels des RIHV-Wertes über 4,5 Jahre.**

**Vergleich der Probenahmestellen D2, D3 und D5**

Für die Probenahmestelle D5 wurden während einiger Messserien auffällig hohe RIHV-Werte detektiert. Besonders starke Wirkungen wurden in den Proben der Serie 1 (Mai 2011) und 2 (September 2011) festgestellt. In der Serie 2 ist eine hohe Ähnlichkeit des Wirkungsmusters mit der D2 Probe festzustellen. Doch die Intensitätszunahme widerspricht dem Verdünnungseffekt, die das Wasser von D2 über D3 nach D5 erfährt. Das Wirkungsmuster der auffällig hohen Werte in D5 entspricht nicht dem von D2 oder D3 und bestätigt die Vermutung, dass die Hauptbelastung für D5 aus einer anderen Quelle stammt.

**Tabelle 6-15: Gegenüberstellung der RIHV-Polardiagramm der SPE pH 2 Extrakte von D2, D3 und D5 der Serie 1.**

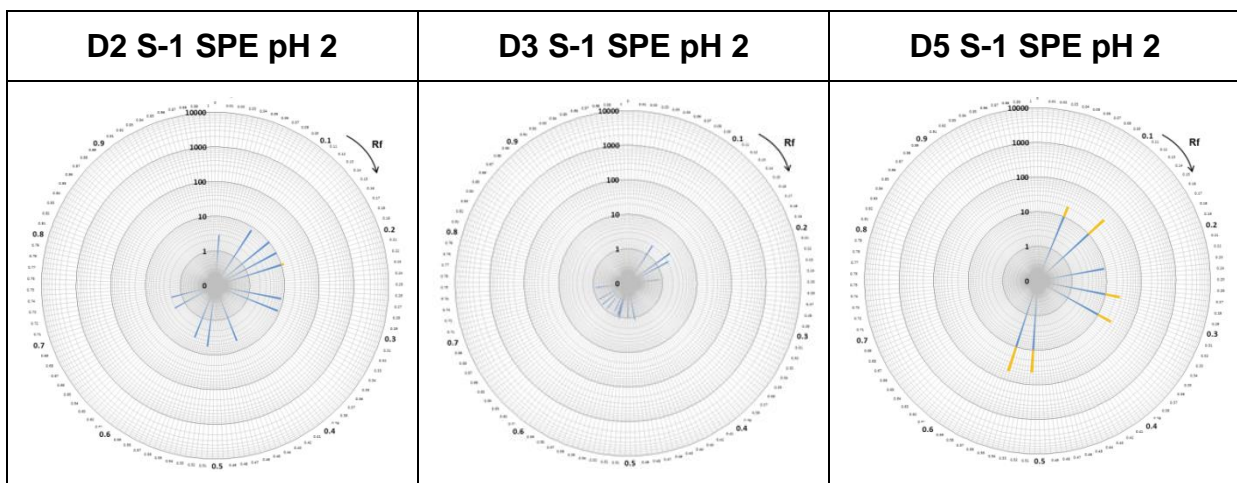




Tabelle 6-16: Gegenüberstellung der RIHV-Polardiagramm der SPE pH 2 Extrakte von D2, D3 und D5 der Serie 2.

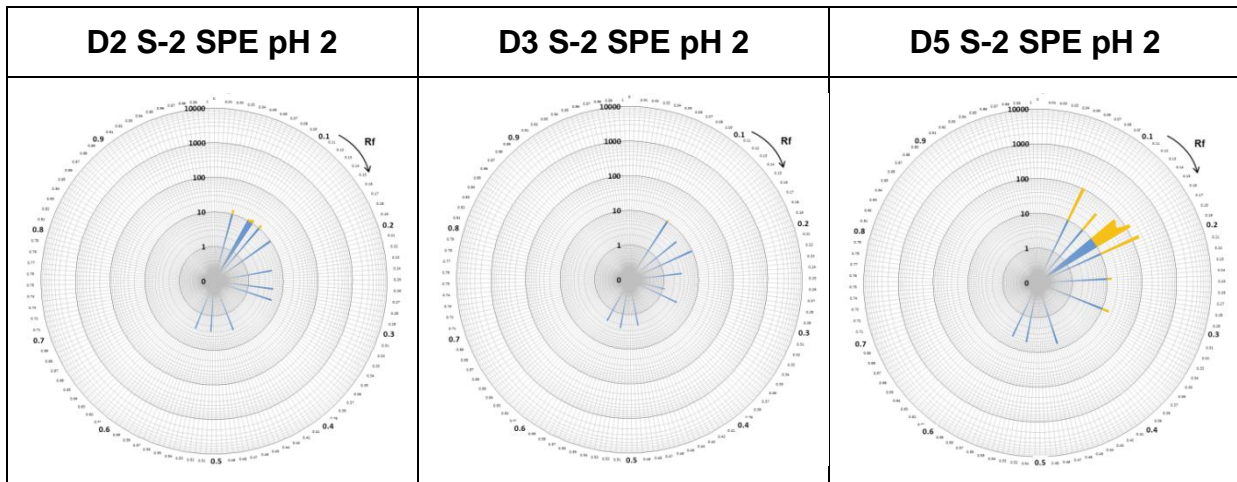


Tabelle 6-17: Gegenüberstellung der RIHV-Polardiagramm der SPE pH 2 Extrakte von D2, D3 und D5 der Serie 3.

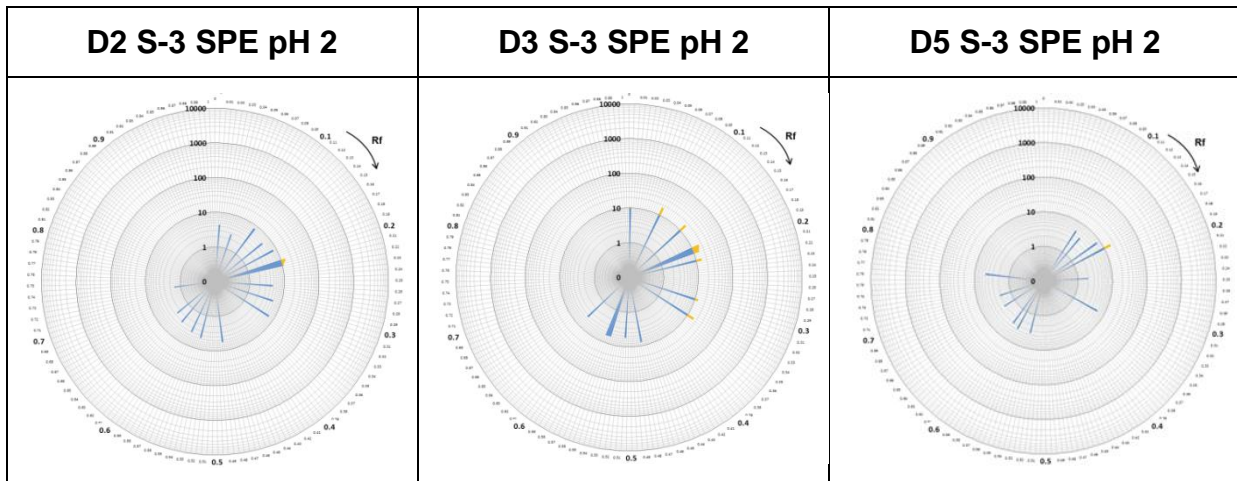
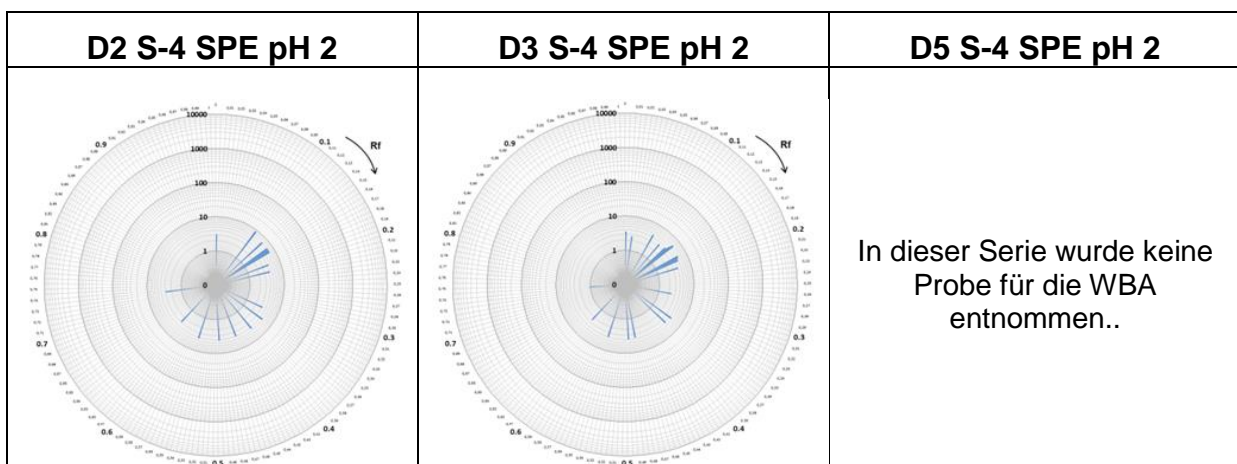
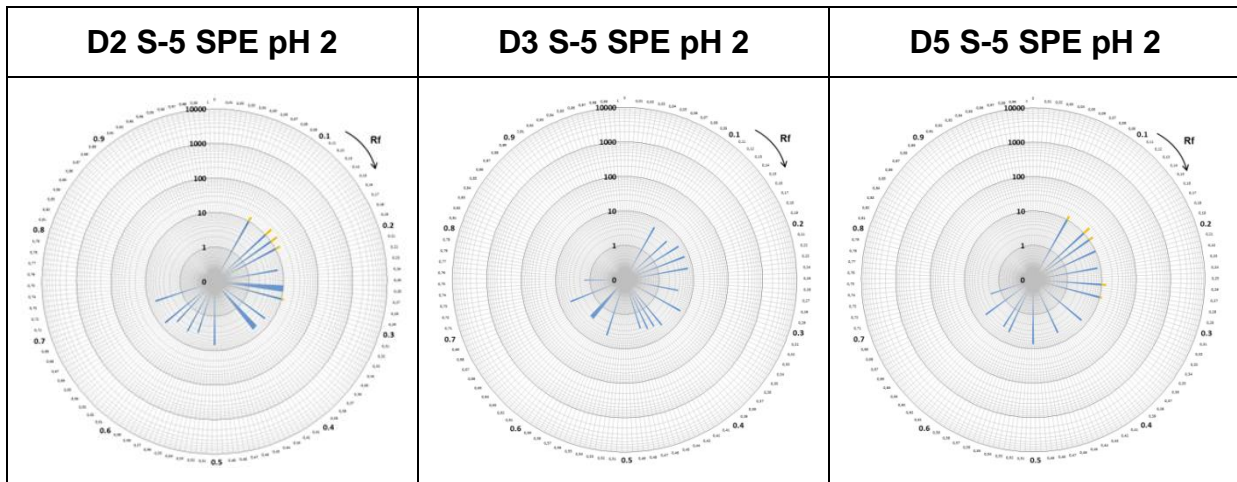


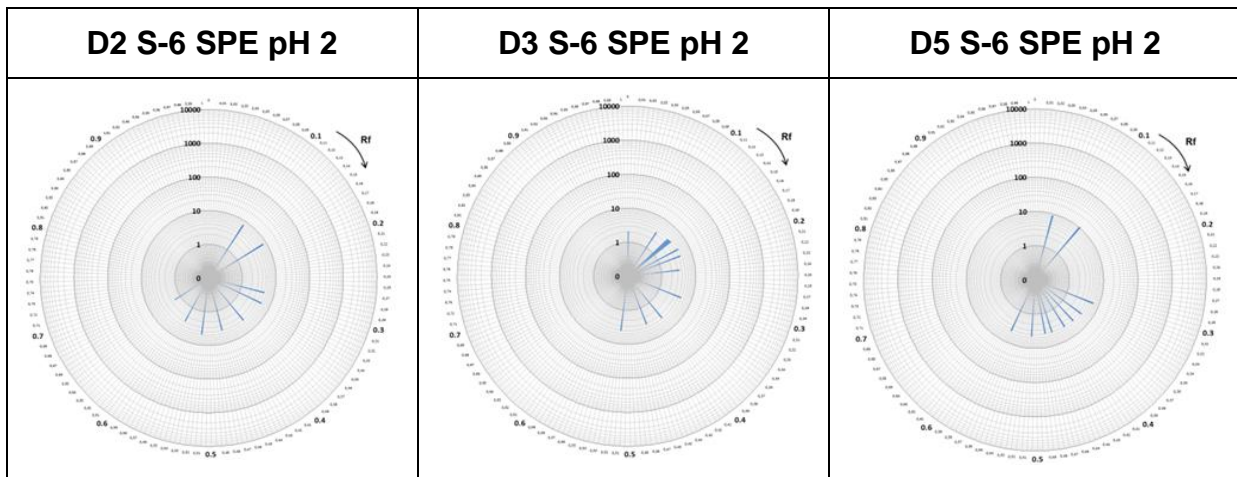
Tabelle 6-18: Gegenüberstellung der RIHV-Polardiagramm der SPE pH 2 Extrakte von D2, D3 und D5 der Serie 4.



**Tabelle 6-19: Gegenüberstellung der RIHV-Polardiagramm der SPE pH 2 Extrakte von D2, D3 und D5 der Serie 5.**



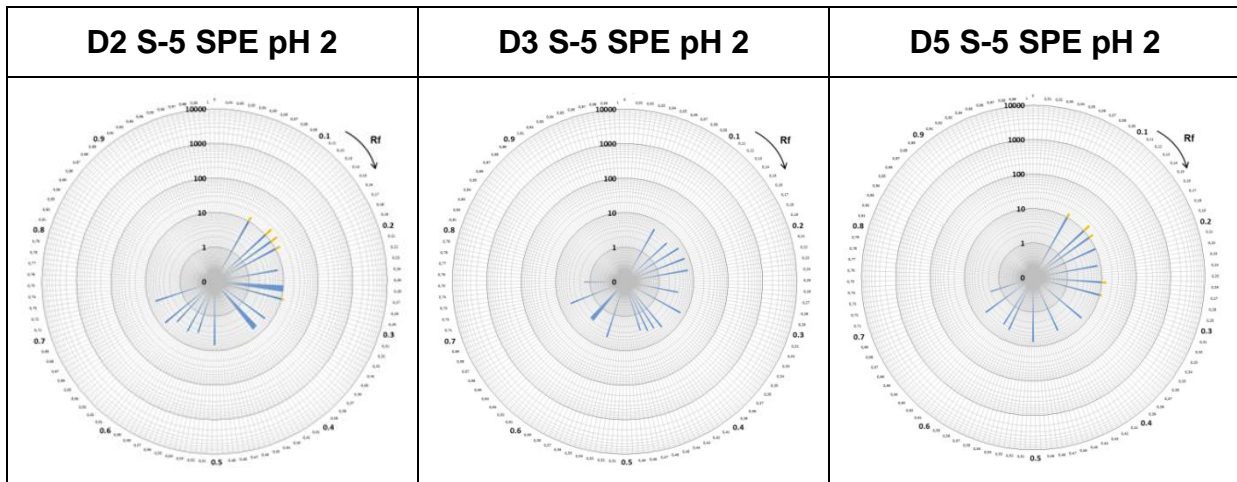
**Tabelle 6-20: Gegenüberstellung der RIHV-Polardiagramm der SPE pH 2 Extrakte von D2, D3 und D5 der Serie 6.**



In der Serie 5 (März 2015) konnte in den Proben von D2, D3 und D5 im Rf-Bereich 0,0 - 0,4 eine Ähnlichkeit im Wirkungsmuster festgestellt werden. In

Tabelle 6-19 sind die RIHV-Polardiagramme für die SPE pH 2-Extrakte gegenübergestellt und in Tabelle 6-22 sind die dazugehörigen Werte nochmals zusammengefasst. Aufgrund der Verdünnung durch andere Zuflüsse fallen die Wirkungen in D3 erwartungsgemäß schwächer aus als in D2. Dass in D3 nur die Hemmbande bei  $R_f = 0,28$  und nicht wie in D2 die Hemmbanden mit den  $R_f$ -Werten 0,26, 0,27 und 0,29 erscheinen, liegt an der geringeren Hemmung in D3. Doch, obwohl das Wasser von D3 in D5 weiter verdünnt wird, verstärken sich hier wiederum die Wirkungen.

**Tabelle 6-21: Gegenüberstellung der RIHV-Polardiagramm der SPE pH 2 Extrakte von D2, D3 und D5 der Serie 5.**



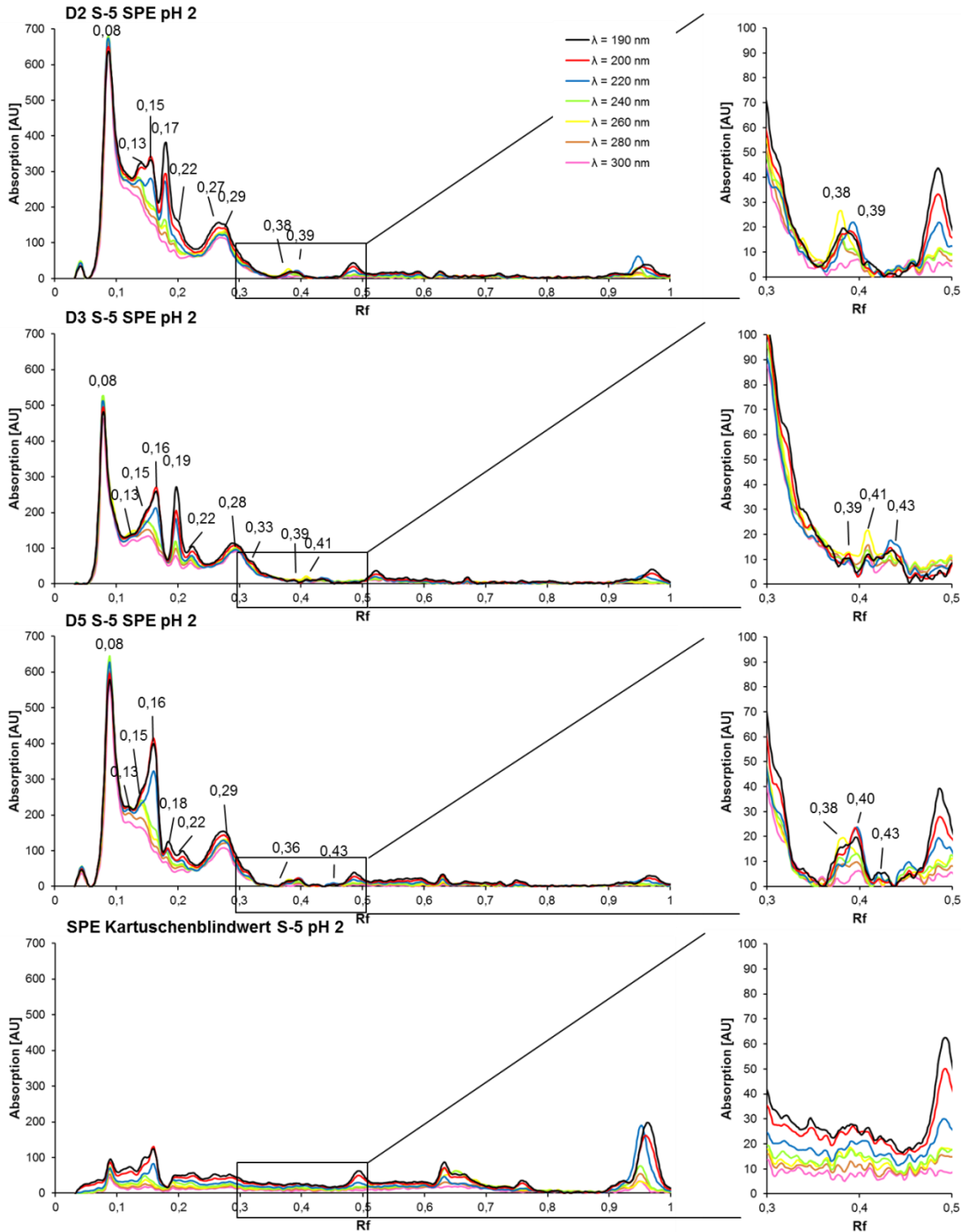
**Tabelle 6-22: Überblick der Hemmbanden mit Rf- und RIHV-Werten für die SPE pH 2-Extrakte von D2, D3, D5 und des SPE-Kartuschenblindwertes.**

D2 S-5 SPE pH 2		D3 S-5 SPE pH 2		D5 S-5 SPE pH 2		SPE Kartuscheblindwert S-5 pH 2	
Rf	RIHV [1000/µL]	Rf	RIHV [1000/µL]	Rf	RIHV [1000/µL]	Rf	RIHV [1000/µL]
0,08	14	0,08	6	0,08	13	0,12	2
0,13	17	0,13	5	0,13	17	0,18	3
0,15	17	0,16	7	0,15	14		
0,17	14	0,19	7	0,18	10		
0,21	7	0,22	7	0,22	8		
0,26	10	0,28	4	0,26	14		
0,27	10			0,28	2		
0,29	12			0,29	12	0,31	2
0,35	6	0,33	7	0,36	7	0,35	2
0,38	6	0,39	5			0,38	2
0,39	6	0,41	4			0,42	2
		0,43	4	0,43	5	0,43	2
		0,45	3			0,47	2
0,5	7			0,5	7	0,5	1
0,55	4	0,55	5				
0,56	4			0,57	5	0,57	1
0,58	4			0,59	4		
0,62	4	0,61	3			0,63	1
0,64	7	0,62	3	0,65	5		
0,7	6	0,69	5	0,7	2		
0,75	0	0,75	1				

Die sehr großen Ähnlichkeiten zwischen D2 und D3 sind auch in den Mehrwellenlängenscans (MWL-Scan) der SPE pH 2-Extrakte zu sehen (Abb. 6-28). Der MWL-Scan ist nicht spezifisch genug für eine eindeutige Beschreibung der Banden, doch liefert dieser erste Hinweise, ob die parallel gemessenen Proben dasselbe Substanzgemisch beinhalten.

Obwohl für D3 die Signalintensität geringer ausfällt als für D2, doch gleichen sich die Muster über weite Bereiche. So sind die für D2 charakteristischen Banden, innerhalb des Toleranzbereiches des Rf-Werts auch in D3 zu sehen. Aufgrund der größeren Intensität der Bande mit Rf = 0,17 in D2 ist die Bande bei Rf = 0,22 dort nur in der Flanke des Signals zu erkennen. In D5 ist dieses Bandenpaar ebenfalls zu sehen, aber in Folge des Verdünnungseffektes in deutlich geringerer Intensität. Des Weiteren fällt die Signalintensität der Bande bei 0,16

deutlich größer aus als in D2 und D3. Zudem ist in dieser Probe eine schwache neue Bande bei 0,40 zu sehen, deren MWL-Signal sich von den Banden mit ähnlichem Rf-Wert unterscheidet.



**Abb. 6-28:** Mehrwellenlängenscans der SPE pH 2-Extrakte nach HPTLC/AMD-Trennung von D2, D3, D5 und des SPE Kartuschenblindwertes der Serie 5 bei einem Auftragevolumen von 100  $\mu$ L.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass der Verdünnungseffekt von D2 und D3 auch mit dem MWL-Scan beobachtet werden kann. Es gibt zudem eine gewisse Ähnlich-

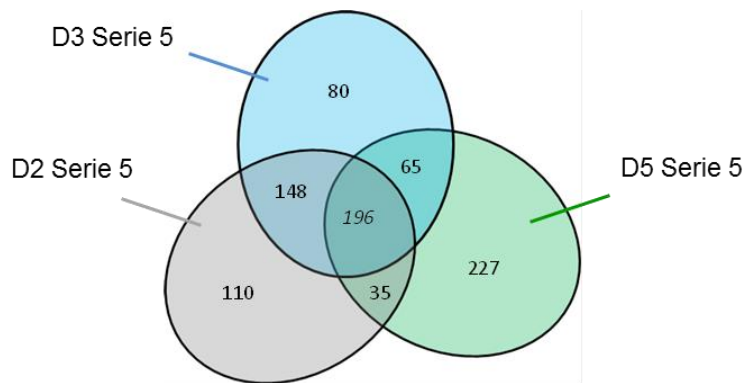
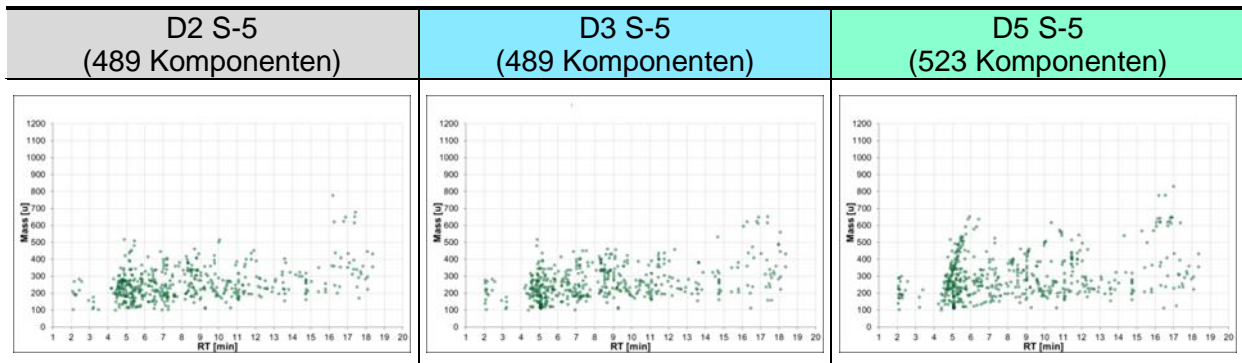


keit des Hemmmusters von D2 und D5 aber die Unterschiede der Absorptions-Messsignale deuten darauf hin, dass die Wirkung wahrscheinlich eine andere Ursache hat.

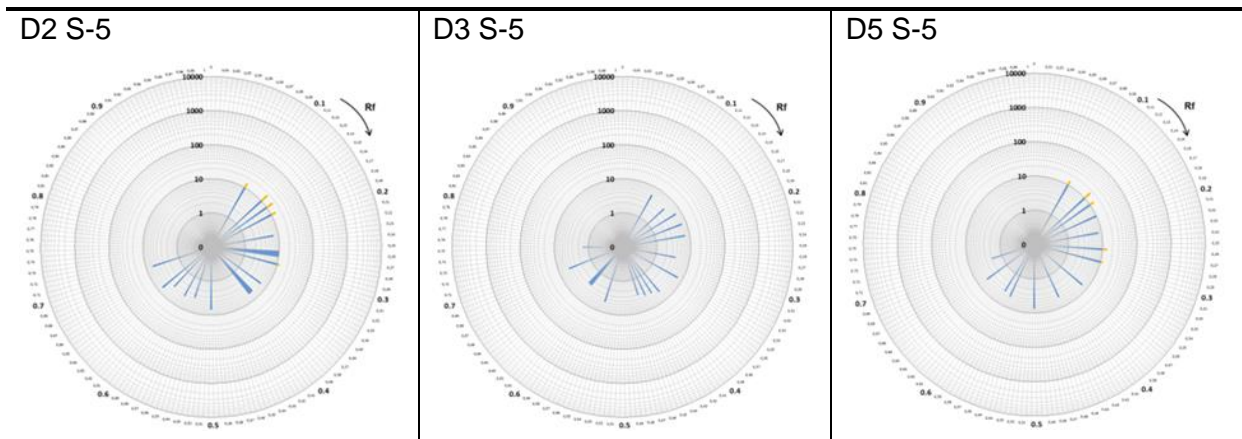
Zur genaueren Charakterisierung der Unterschiede in den Proben D2, D3 und D5 der Serie 5 erfolgte ein Vergleich der ermittelten Masse-Retentionszeit-Diagramme. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6-23 zusammengestellt. Von den mit der LC-QTOFMS ermittelten Komponenten sind 196 in allen drei Proben vorhanden. Dies entspricht einem Anteil von ca. 40 % Auffällig ist die erhöhte Anzahl an Komponenten (227) die ausschließlich in der Probe D5 verglichen mit den anderen Proben (D2: 110, D3: 80) vorliegen. Dies stützt die These der Vorbelastung der Probenahmestelle D5.

**Tabelle 6-23: Vergleich der Punktwolken und Hemmdiagramme von den Probenahmestelle D2, D3 und D5 der Probenahmen S-5.**

**HPLC-HRMS**



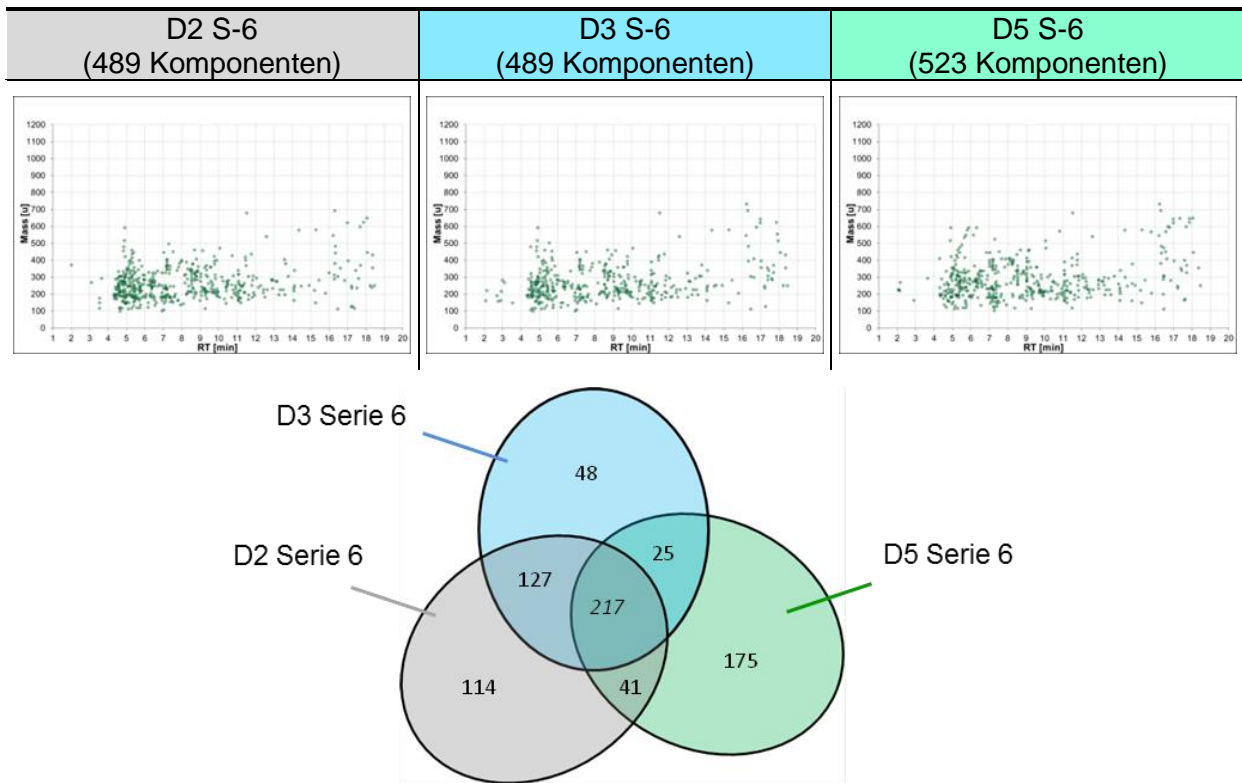
**HPTLC-*Allivibrio fischeri*-Hemmtest**



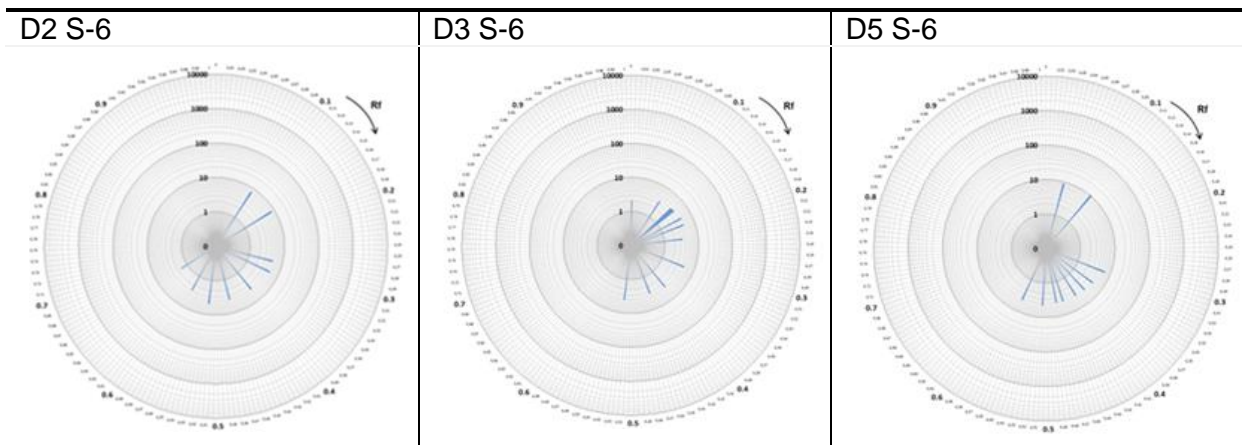
Die in der Serie S-5 festgestellten Unterschiede der Probenahmestellen D2, D3 und D5 traten bei der Serie S-6 nicht auf. Aus dem Vergleich der Komponenten ist zu erkennen, dass in der Probe D5 die größte Anzahl an probenspezifischen Komponenten (175) vorliegen. Die PCA zeigt im Vergleich zur Serie S-5 (siehe Abb. 6-29 und Abb. 6-31) einen geringeren Unterschied der Proben besonders für die Probe von D5. Die RIHV Polardiagramme zeigen zudem eine deutlich geringere Wirkung der Proben aus S-6.

**Tabelle 6-24: Vergleich der Punktwolken und Hemmdiagramme von den Probenahmestelle D2, D3 und D5 der Probenahmen S-6.**

**HPLC-HRMS**



**HPTLC-*Allivibrio fischeri*-Hemmtest**

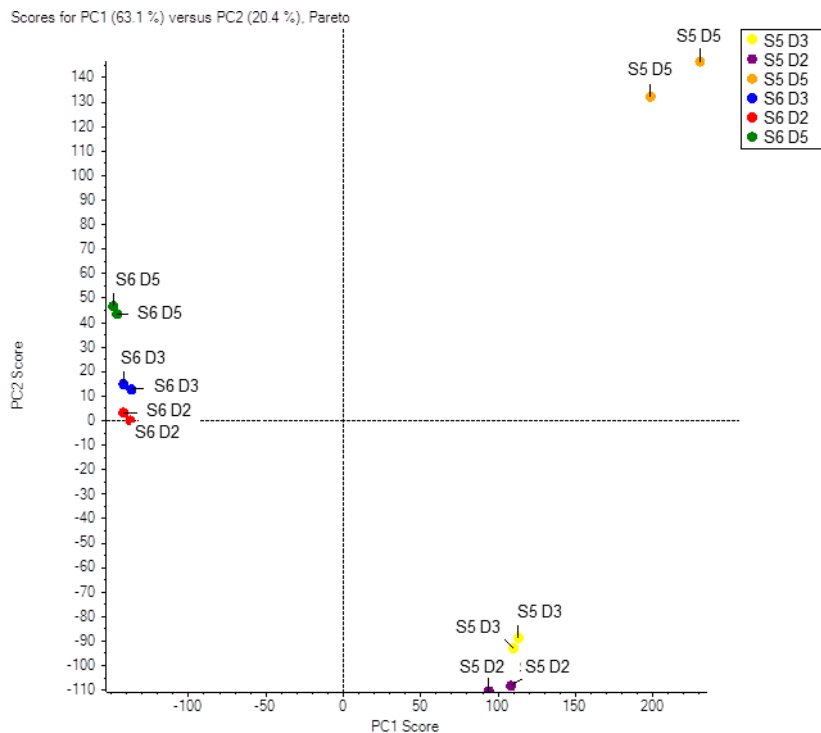


Zur Ermittlung der Ursachen für die Unterschiede in den Proben der Serie 5 und 6 wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abb. 6-29

bis Abb. 6-32 dargestellt. Für die PCA wurden die Proben D2, D3 und D5 beider Probenahmeserien S-5 und S-6 (Doppelmessung) herangezogen. Die PCA erfolgte getrennt für die positive (Abb. 6-29 und Abb. 6-30) und negative Ionisation (Abb. 6-31 und Abb. 6-32). Dargestellt sind jeweils der Score-Plot und der Loading-Plot für die Hauptkomponenten PC1 und PC2.

Aus den Score-Plots (Abb. 6-29 und Abb. 6-31) sind deutliche Separierungen der beiden Serien S-5 und S-6 zu erkennen. Der PC1 Score liegt für die Serie S-5 bei positiven und für S-6 bei negativen Werten. Im PC2 Score erfolgt eine Separierung der Probenahmestelle D5, die bei der Serie S-5 in beiden Polaritäten ESI + und ESI - deutlich ausgeprägt ist. Bei Serie S-6 ist dies nur im negativen Ionisationsmodus (ESI -) zu erkennen. Dies weist auf eine Besonderheit in der Probe D5 der Serie S-5 hin. Die dafür verantwortlichen Komponenten können aus dem dazugehörigen Loading-Plot (Abb. 6-30 und Abb. 6-32) ermittelt werden.

Der Loading-Plot gibt den „Einfluss“ einer Komponente (Masse/Retentionszeit) auf die jeweilige Hauptkomponente (PC) wieder. Je größer die Gewichtung der Komponente, umso größer der Wert für das PC Loading. Aus der Abb. 6-30 ist eine deutliche Komponentenfolge in Richtung der Lage von Probe D5 der Serie S-5 im Score-Plot zu erkennen. Die dazugehörigen Komponenten sind (621,5/16,3), (623,5/16,8), (595,5/16,1), (436,3/11,5) und (419,2/11,5). Für die negative Ionisation (ESI-) ergeben sich die Komponenten (417,2/11,5), (619,5/16,3), (463,2/11,5), (417,2/11,8), (199,0/6,1), (593,5/16,1) und (485,2/11,5).



**Abb. 6-29: Score-Plot der PCA für die Proben D2, D3 und D5 der Serien S-5 und S-6 mit den durch ESI + detektierten Komponenten.**

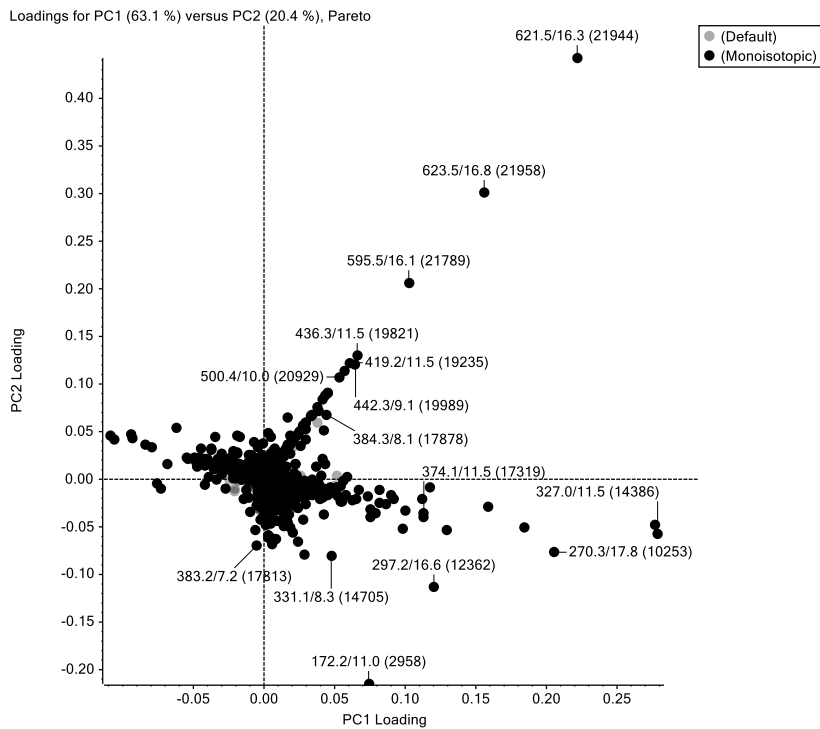


Abb. 6-30: Loading-Plot der PCA für die Proben D2, D3 und D5 der Serien S-5 und S-6 mit den durch ESI + detektierten Komponenten.

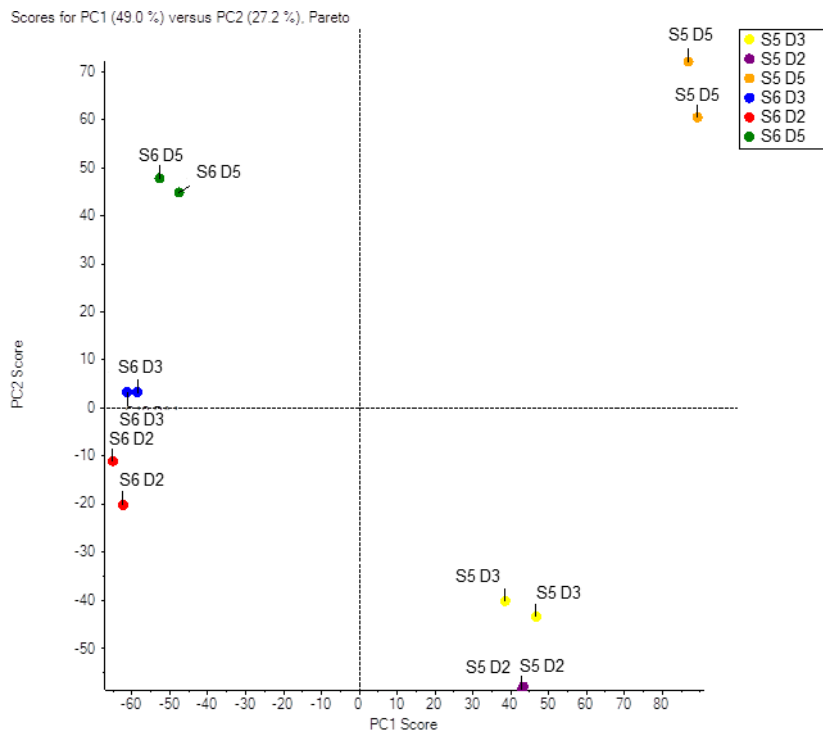
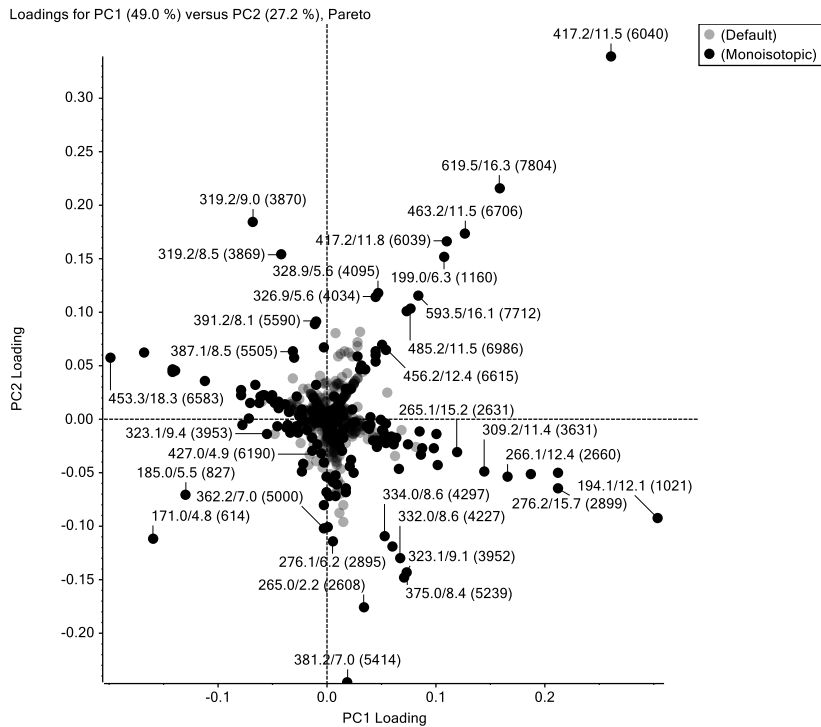


Abb. 6-31: Score-Plot der PCA für die Proben D2, D3 und D5 der Serien S-5 und S-6 mit den durch ESI - detektierten Komponenten.



**Abb. 6-32: Loading-Plot der PCA für die Proben D2, D3 und D5 der Serien S-5 und S-6 mit den durch ESI - detektierten Komponenten.**

Zur abschließenden Klärung ob der Bach vor der Einleitung der Sauberrwässer belastet ist muss in zukünftigen Untersuchungskampagnen eine zusätzliche Probenahmestelle vor der Deponie beprobt werden. Erst damit lässt sich zum einen der Einfluss von D2 bzw. D3 auf den Bach genauer angeben und zum andern können durch Probenvergleich von Zu- und Abstrom des Bachs über die HPLC-HRMS Vorbelastungen beispielsweise aus der Landwirtschaft konkretisiert werden. Auch die Untersuchung der anderen Zuflüsse von D3 würde helfen, die Einflüsse auf D5 besser zu verstehen.

### 6.5.5 Zusammenfassung der Untersuchung der Deponie D

Das Ziel der Untersuchung der Sondermülldeponie und deren angrenzenden Kompartimenten mit dem HPTLC-Leuchtbakterientest war es, mögliche Veränderungen zu erfassen und die Erkennung einer möglichen Infiltration von belasteten Wässern in unbelastete Wässer, sowie dessen Relevanz zu bestimmen. Die ergänzende Untersuchung mittels HPLC-HRMS ermöglichte es, die anhand der Wirkung erkannten Unterschiede in den einzelnen Proben und zwischen den Probenahmeserien zu mittels Masse-Retentionszeit-Diagrammen zu untermauern und mithilfe einer PCA zu konkretisieren.

Zur Qualitätskontrolle werden für die WBA zwei Qualitätsregelkarten geführt, mit denen anhand von Referenzverbindungen zum einen die Rf-Wert-Stabilität (seit Mai 2011) und zum anderen die Biolumineszenzhemmung von *Aliivibrio fischeri* (seit September 2011) überprüft

wird. Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Kombination von HPTLC und dem Leuchtbakterien-Hemmtest um ein reproduzierbares Verfahren handelt.

Zur Probenvorbereitung wurde, neben der Festphasenextraktion, ergänzend die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit TBME eingesetzt. Aus der Analyse der TBME-Extrakte konnten in den Serien 1 - 6 keine zusätzlichen Erkenntnisse gewonnen werden. Daher kann bei künftigen Untersuchungen mit dem HPTLC-Leuchtbakterientest auf diese Probenvorbereitungstechnik verzichtet werden. Doch bestätigte die Flüssig-Flüssig-Extraktion oftmals das Ergebnis der Festphasenextraktion.

Bei den Untersuchungen konnte erwartungsgemäß für die Sickerwasserproben aus dem Sondermülldeponiekörper (D1) eine Vielzahl an stark die Biolumineszenz von *Aliivibrio fischeri* hemmende Banden detektiert werden. Besonders stark wirkende Hemmbanden konnten für die Probe aus D1 der Serie 6 detektiert werden. Zudem unterscheidet sich das Hemmmuster zwischen den Serien. Wobei im Verlauf der Probenahmeserien einen Anstieg der Stärke der Hemmung zu beobachten ist. Die ergänzende Untersuchung mittels HPLC-HRMS bestätigt dieses Ergebnis für die Serien 5 und 6. Der Vergleich der Messdaten zeigt, dass 2800 Komponenten gefunden werden, die in den Proben beider Serien enthalten sind. Dies entspricht für Serie 5 55 % bzw. für Serie 6 63 % aller gemessener Komponenten.

In der Serie 5 lässt sich in den Proben von D2, D3 und D5 im Rf-Bereich 0,0 - 0,4 eine Ähnlichkeit im Wirkungsmuster feststellen. Aufgrund des Verdünnungseffektes sind Wirkungen der Hemmbanden für D3 etwas geringer als für D2. Doch in D5 konnte eine ähnlich starke Hemmung beobachtet werden wie für SM1. Das HPLC-HRMS-Screening deutet darauf hin, dass die Belastung von D5 nicht vom Sondermüllkompartiment stammt, sondern sich wahrscheinlich auf eine Vorbelastung des als Vorfluter genutzten Baches zurückzuführen. In der Serie 6 konnten keine weiteren Auffälligkeiten gefunden werden.

## 6.6 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass die oftmals beobachtete Umkehrung der Biolumineszenz nicht auf eine Adaption der Substanz von *Aliivibrio fischeri* zurückzuführen ist, sondern auf einen unterschiedlich schnellen Verbrauch des Nährmediums auf der Platte. Dieses Phänomen tritt aber nur bei Inkubationszeiten, die länger als 60 min sind auf. Die aufgenommenen Biolumineszenzbilder werden zur optimalen Darstellung der Hemmung mit einer automatischen Helligkeitsverstärkung angepasst. Doch, abgesehen von Extremwerten, hat die Helligkeitsverstärkung keinen Einfluss auf die Hemmwerte bzw.  $\Gamma$ -Werte. Damit möglichst viele Abstufungen zur Beschreibung der Schwärzung herangezogen werden, ist es ratsam die automatische Einstellung beizubehalten.

Die Untersuchung des Einfluss der Inkubationszeit auf den RIHV-Wert verdeutlicht, dass nur Proben mit derselben Inkubationszeit vergleichbar sind. Für diese Arbeit wurde, wenn nicht anders angegeben, die Biolumineszenz nach einer Inkubationszeit von 10 min ausgewertet. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Vertrauensband bei den für die RIHV-Wert Bestimmung genutzten log  $\Gamma$ -Werte bei kleinen sowie großen Hemmwerten (< 15 %Hemmung bzw. >85 %Hemmung) besonders breit wird. Daher sollte Werte außerhalb dieser Grenzen für die RIHV-Auswertung vermieden werden.

Die Untersuchung von verschiedenen sauberen Wässern ergab, dass als unbelastet geltende Grundwässer bei einem Anreicherungsfaktor von 200 sich mit RIHV-Werte von 0,3 und 3 [1000/ $\mu$ L] kennzeichnen. Für Oberflächenwasser aus der Donau bei Leipheim wurden Werte von 2 bis 8 [1000/ $\mu$ L] ermittelt.

Anhand der Untersuchung auf eine mögliche Grundwasserbeeinflussung durch Sickerwasser von der Elastikschicht eines Kunstrasens wurde dargestellt, wie es möglich ist Leuchtbakterien hemmende Verbindungen mittels hochauflösender Massenspektrometrie zu identifizieren. Das Vorhandensein dieser Substanzen und weiterer, anhand ihres Massenübergangs charakterisierten, Komponenten konnte für die nachgelegene Grundwasserfassung ein angepasstes HPLC-MS/MS-Analysenprogramm aufgestellt werden.

Die mehrjährige Überwachung einer Sondermülldeponie ermöglichte es die Stabilität der HPTLC/AMD-Trennung und der Biolumineszenz-Hemmung aufzuzeigen. Erwartungsgemäß konnte in den Proben aus der Sondermülldeponie sehr große RIHV-Werte (> 1000 [1000/ $\mu$ L]) ermittelt werden. Zudem stellte sich heraus, dass sich das Muster der Hemmung zwischen den Messserien verändert und ein Anstieg der RIHV-Werte zu beobachten ist. Die ergänzende Untersuchung mittels HPLC-HRMS bestätigt dieses Ergebnis. Ferner wurde eine Auffälligkeit erkannt, die sich aber nicht auf die Sondermülldeponie zurückzuführen lässt.

## 7 HPTLC-*Bacillus subtilis*-Hemmtest

### 7.1 Grundlagen zum *Bacillus subtilis*-Hemmtest

*Bacillus subtilis* ist ein gram-positiver, stäbchenförmiger, aerob wachsender Endosporenbildner. Das Testkriterium (Endpunkt) beim *Bacillus subtilis*-Test ist die Dehydrogenase-Aktivität des Bakteriums. Mit dem HPTLC-Bacillus subtilis-Hemmtest sollen die auf dieses Bakterium antibiotisch wirkenden Verbindungen nachgewiesen werden. Bei antibiotisch wirkenden Stoffen wird anhand ihrer Wirkungsweise zwischen Bakteriostatika, die das Wachstum hemmen, und Bakteriziden, die das Bakterium abtöten, unterschieden. In Tabelle 7-1 sind die wichtigsten Wirkungsorte und Wirkungsmechanismen von Antibiotika zusammengefasst [213-215].

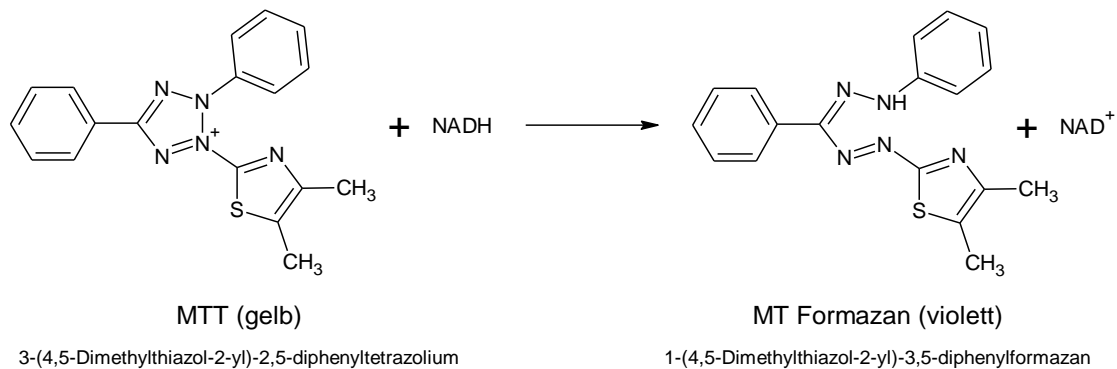
Antibiotika werden in der Humanmedizin wie in der Veterinärmedizin eingesetzt. Über verschiedene Eintragspfade können diese in die Umwelt gelangen. Wobei für die humanmedizinischen Anwendungen die Kläranlage und für die tiermedizinischen Anwendungen über die Ausbringung von Gülle bzw. Dung die wichtigsten Eintragspfade für die aquatische Umwelt darstellen. Ein weiterer Eintragspfad stellen die Aquakulturen von Fischen dar [216]. Antibiotika konnten sowohl in Oberflächen- wie auch in Grundwasser nachgewiesen werden [216]. Besonders in Regionen mit einer hohen Tierbesatzdichte lassen sich regelmäßig Antibiotika nachweisen. Hier wurden mit großen zeitlichen Schwankungen Antibiotika aus der Gruppe der Sulfonamide in Grundwässern gemessen [217]. Ein erhöhter Eintrag von Antibiotika in die Umwelt könnte zum Risiko der Resistenzbildung beitragen [218].



**Tabelle 7-1: Übersicht zu den Wirkungsorten und -mechanismen von Antibiotika.**

Wirkungsort	Wirkungsmechanismus	Wirkstoffgruppe (Wirkungsweise)	Beispiel
Zellwandsynthese	Hemmung der Mureinsynthese, wodurch die bakterielle Zellwand zerstört wird.	$\beta$ -Lactam-Antibiotika (Bakterizid)	Penicillin Cephalosporin
Zellmembran	Interaktion mit den Lipopolysacchariden der bakteriellen Zellmembran, wodurch es zur Depolarisation des Membranpotentials kommt	Polypeptidantibiotika (Bakterizid)	Daptomycin Tyrothricin
Proteinbiosynthese am Ribosom	Tetracycline: Anlagerung an 30S-Untereinheit, verhindert damit die Verlängerung der Proteinkette	Tetracycline (Bakteriostatisch)	Chlortetracyclin (Tetracyclin), Clarithromycin (Makrolidantibiotika)
	Makrolidantibiotika: Anlagerung an 50S-Untereinheit, verhindert damit die Verlängerung der Proteinkette	Makrolidantibiotika (Bakteriostatisch)	
Folsäurestoffwechsel	Blockierung der Synthese der Folsäure, dadurch kommt es zur Hemmung der Nucleinsäurensynthese	Sulfonamide (Bakteriostatisch)	Sulfanilamid
DNA-abhängige RNA-Polymerase	Bindung an die $\beta$ -Untereinheit der RNA-Polymerase, wodurch die RNA-Transkription und damit die Proteinsynthese gehemmt wird.	Rifamycine (Bakterizid)	Rifampin
DNA-Gyrase	Hemmung der bakteriellen DNA-Gyrase, wodurch das Verdrillen der DNA verhindert wird.	Chinolone (Bakterizid)	Nalidixinsäure, Ciprofloxacin

Beim HPTLC-*Bacillus subtilis*-Hemmtest wird die Bakteriensuspension nach der Trennung auf die HPTLC-Platte aufgetragen. Für die Detektion von wirkenden Substanzen ist eine Inkubationszeit von mehreren Stunden in einer feuchten Kammer notwendig. Nach der Inkubationsphase wird die Aktivität der Bakterien mittels Tetrazoliumsalze überprüft. Meist wird dazu das gelbe 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumsalz (MTT-Reagenz) auf die Platte aufgesprüht. Dabei wird MTT durch NADH zu einem violetten Formazan reduziert (Abb. 7-1: Reduktion des MTT-Reagenz durch NADH) [219]. Daher werden erscheinen auf *Bacillus subtilis* antibiotisch wirkende Substanzen als gelbliche Banden vor einem violetten Hintergrund [1].

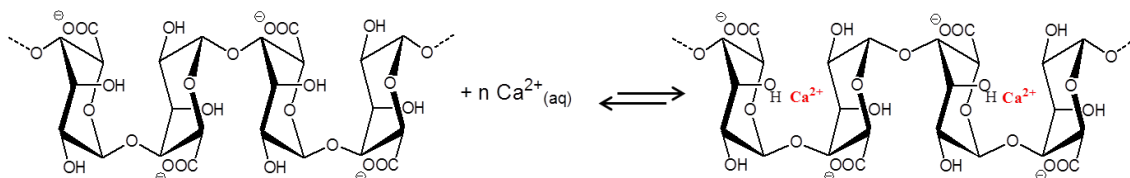


**Abb. 7-1: Reduktion des MTT-Reagens durch NADH**

Neben der Untersuchung mit *Bacillus subtilis* auf antibakterielle Stoffe aus unterschiedlichsten Pflanzenextrakten wurde in der Literatur gezeigt, dass es möglich ist, verschiedene Antibiotika in Lebensmitteln wie z. B. in Milch [107] oder Hühnerleber zu detektieren [220]. Außerdem war es möglich, antibakteriell wirkende Substanzen in angereicherten Abläufen von Kläranlagen und Oberflächenwässern qualitativ nachzuweisen [107]. Aber aufgrund der notwendigen langen Inkubationszeit der Bakterien im feuchten Milieu kommt es bei den genannten Beispielen auf der Kieselgelschicht zu starken Bandenverbreitungen, sodass die detektierte Wirkung nicht einer der ursprünglich gut getrennten Banden zugeordnet werden kann.

## 7.2 Ergebnisse und Diskussion

Um die Bandenverbreiterung nutzt Baumann et al. die Calciumalginatverfestigung beim *Bacillus subtilis*-Hemmtest [3]. Bei der Calciumalginatverfestigung wird eine CaCl<sub>2</sub>-Lösung und die Bakteriensuspension, die Natriumalginat enthält, auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Mit den Calciumkationen vernetzen sich die Alginatmoleküle (Gelbildung, Abb. 7-2) untereinander. Dies führt sofort zu einer Verfestigung der Bakteriensuspension auf der Platte. Ein gleichmäßiges Auftragen der CaCl<sub>2</sub>-Lösung gelingt unter Verwendung eines Sprühautomaten.



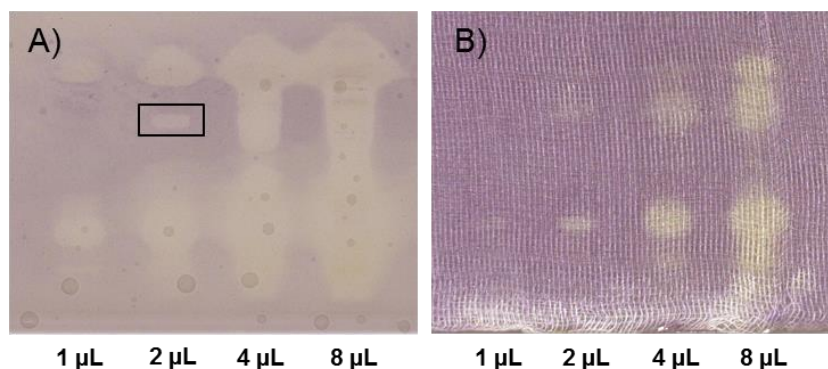
**Abb. 7-2: Calciumalginatgelbildung**

Im gleichen Artikel beschreiben Baumann et al. die Anwendung einer medizinischen Gaze beim HPTLC-umu-Test. Die Autoren nutzen die Gaze zur weiteren Stabilisierung des Gels,

da diese nach der Inkubation von der Platte abgehoben wird, um auf der Rückseite die genotoxisch wirkenden Verbindungen nachzuweisen. Doch ist es denkbar, dass die Gaze nicht nur das Gel weiter stabilisiert, sondern durch die regelmäßige Struktur der Fäden Barrieren bildet und damit die Möglichkeit der Bandenverbreiterung einschränkt.

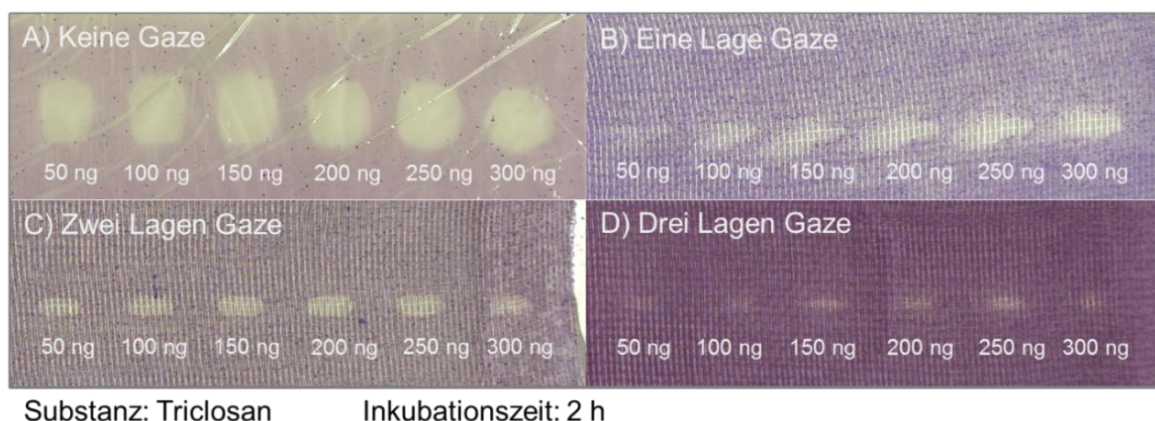
Zur Untersuchung der Auswirkung der Gel-Gazeschicht auf die Bandenverbreiterung wird die HPTLC-Platte mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösung besprüht und die Gaze aufgelegt. Das gleichmäßige Aufbringen der Mikroorganismen auf die HPTLC-Platte ist ein kritischer Schritt. Es kann dabei eine ungleichmäßige Verteilung der Bakteriensuspension, eine Diffusion durch überstehende Lösung sowie ein möglicher Chromatographieeffekt auftreten. Deshalb wird hier im Gegensatz zum Verfahren nach Baumann et al. (Auftragen der Mikroorganismen auf die HPTLC-Platte mit einer Pipette), die HPTLC-Platte in die *Bacillus subtilis*-Suspension eingetaucht. Die Suspension kann sich dann schnell und gleichmäßig auf der HPTLC-Platte verteilen. Zur Verfestigung der Oberseite wird die Platte noch ein zweites Mal mit der  $\text{CaCl}_2$ -Lösung besprüht. Danach folgt eine Inkubationsphase von 2 Stunden bei 30 °C. Im Anschluss wird für den Nachweis der lebenden Mikroorganismen das MTT-Reagenz mit dem Sprühautomaten aufgebracht. Nach einer weiteren Inkubationszeit von einer Stunde sind die weißen Hemmzonen gut zu erkennen.

Für den Vergleich des Einflusses der Gaze auf die Bandenverbreiterung wurde das SPE-Extrakt einer Deponiesickerwasserprobe zweimal mit der gleichen Methode (Gradient 9) aufgetrennt. Der Nachweis der Wirkung auf *Bacillus subtilis* erfolgte einmal ohne und einmal mit Einarbeitung der Gaze in das Gel. In Abb. 7-3 ist das Ergebnis des Vergleichs gezeigt. Durch Auflegen von medizinischer Gaze vor dem Aufbringen der Mikroorganismen auf die chromatographierte HPTLC-Platte kann die Diffusion deutlich reduziert werden (siehe Abb. 7-3, B). Durch die Gaze (4-lagig) wird aber auch die Empfindlichkeit der Detektion verringert (vgl. Abb. 7-3 A und B). So ist die markierte Bande in Abb. 7-3 unter Verwendung der Gaze kaum noch zu erkennen.



**Abb. 7-3: Vergleich des HPTLC-Bacillus subtilis-Hemmtest ohne (A) und mit der medizinischen Gaze (B) anhand einer Deponiesickerwasserprobe. Die markierte Bande ist unter Verwendung der Gaze (4-lagig) nicht mehr deutlich zu erkennen.**

Ein Test mit unterschiedlichen Schichten an eingesetzter Gaze zeigte, dass eine 2-lagige Gaze die Bandendiffusion ohne großen Verlust an Empfindlichkeit noch ausreichend stark reduziert (Abb. 7-4).



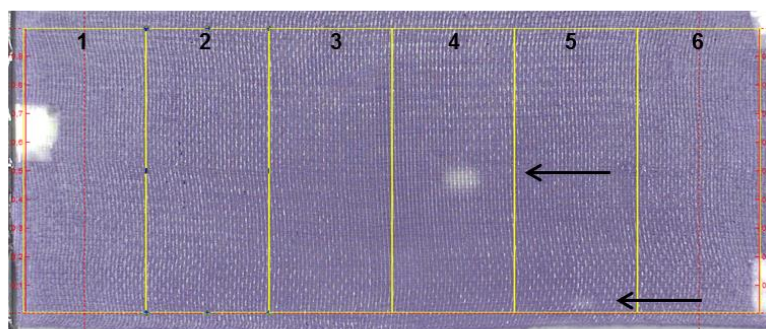
**Abb. 7-4: Vergleich unterschiedlicher Menge an verwendeter Gaze beim HPTLC-Bacillus subtilis-Hemmtest.**

Als Alternativen zur grobmaschigen medizinischen Gaze wurden ein Viskosevlies, ein Kosmetiktuch, ein Glasfasermaterial sowie ein Polyester-Netz mit der Maschenweite von 1 mm getestet. Die ersten beiden Materialien erwiesen sich wegen zusätzlicher Verstärkung der Bandenverbreiterung und mangelnder Stabilität als ungeeignet. Bei Verwendung des stabileren Glasfasermaterials erreichten die aufgetragenen Substanzen die Glasfasern nicht. Das Material ist zum einen zu dick, zum anderen perlte die Bakteriensuspension beim Auftragen auf das Material ab und verteilte sich schließlich unkontrolliert auf dem Material. Ein ähnliches Verhalten zeigte auch das Polyester-Netz. Es wurde bisher kein alternatives Material zur Gaze gefunden.

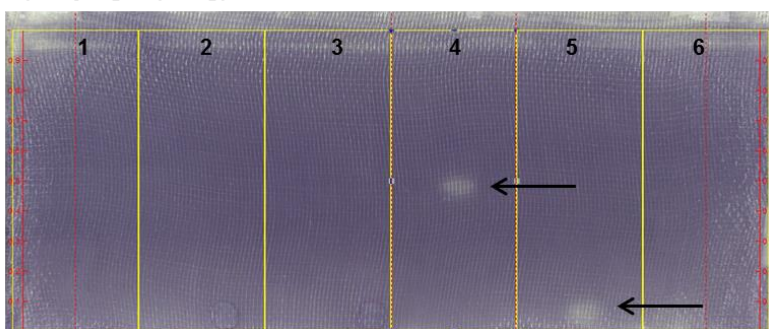
Neben dem verwendeten Alginat wurde vor Verwendung der Realproben das Verdickungsmittel Phytigel (CAS-Nr.: 71010-52-1) getestet. Während Alginat aus zwei Uronsäuren auf-

gebaut wird, setzt sich Phytigel aus Rhamnose und Glucuronsäure sowie zwei Glucose-Molekülen, die mit Essig- und Glycerinsäure verestert sind, zusammen. Phytigel zeigt im Vergleich zum Alginat eine bessere und schnellere Löslichkeit im Nährmedium. Für den Vergleich wurden HPTLC-Platten mit den beiden Antibiotika Clarithromycin (Bahn 4, CAS-Nr.: 81103-11-9) und Doxycyclin (Bahn 5, CAS Nr.: 564-25-0) vor dem Tauchen chromatographiert. Mit 2,2 g Phytigel lassen sich diese beide Substanzen deutlich nachweisen. Zudem konnte die Diffusion der Banden mit Phytigel weiter vermindert werden (Abb. 7-5). Eine Menge von 5 g Phytigel führte zur unbrauchbaren Verfestigung des Nährmediums. Für die weiteren Versuche wurden 2,2 g Phytigel als Verdickungsmittel verwendet.

A) Alginat (5,0 g)



B) Phytigel (2,2 g)



**Abb. 7-5: Vergleich von Phytigel und Alginat. 1: Leerbahn, 2: Methanol, 3: Chromatographie-Kontroll-Mix, 4: Clarithromycin (300 ng), 5: Doxycyclin (300 ng), 6: Leerbahn.**

Eine Schwierigkeit für die Auswertung stellt die Auswahl des Zeitpunkts der auszuwertenden Aufnahme dar. Es wurden für die Auswertung die Aufnahmen nach 60 min Inkubation mit dem MTT-Reagenz gewählt. Wie im folgenden Beispiel zu sehen ist, können sich nach einigen Stunden noch deutlichere Hemmbanden bzw. eine Wachstumsverstärkung der Mikroorganismen zeigen (Abb. 7-6, B). Jedoch ist die HPTLC-Platte dann auch nahezu vollständig getrocknet und somit der Kontrast zwischen Gaze und Plattenuntergrund erhöht. Dies führt zu stärkerem Rauschen bei den ausgewerteten Hemmwertchromatogrammen.



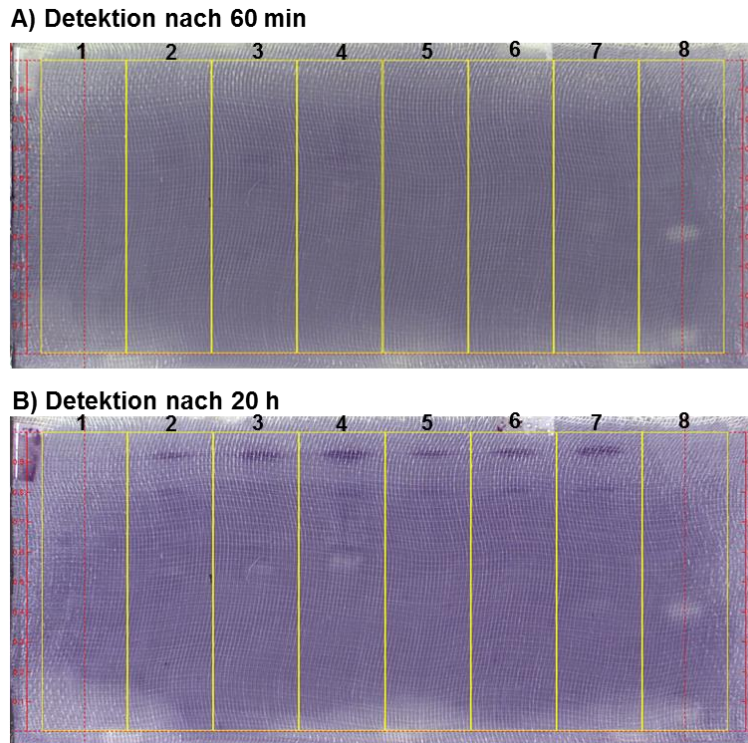


Abb. 7-6: Vergleich der Detektion nach 60 Minuten (oben) und am nächsten Morgen (unten) einer Sondermülldeponieprobe. 1) 30 µL Chromatographie-Kontroll-Mix 2) 100 µL Probe pH 2 3) 200 µL Probe pH 2 4) 300 µL Probe pH 2 5) 100 µL Probe pH 7 6) 200 µL Probe pH 7 7) 300 µL Probe pH 7 8) Mix aus Clarithromycin (300 ng) und Doxycyclin (300 ng).

### 7.2.1 Wiederholbarkeit

Zur Validierung der Hemmwertberechnung von *Bacillus subtilis* mussten zunächst Substanzen gefunden werden, die nicht nur eine Wirkung auf *Bacillus subtilis* haben, sondern sich auch gut chromatographisch voneinander trennen lassen.

Im ersten Schritt wurden die Substanzen in Tabelle 7-2 bezüglich ihrer Wirkung auf *Bacillus subtilis* getestet. Dabei handelt es sich um verschiedene Antibiotika bzw. Substanzen mit antibiotischer Wirkung. Für die Tests wurden jeweils 50, 100, 200 und 400 ng von diesen Substanzen auf eine quadratische Fläche von 25 mm<sup>2</sup> aufgetragen. Verbindungen, die die Bakterien hemmen, sind in Tabelle 7-2 mit „+“ gekennzeichnet.

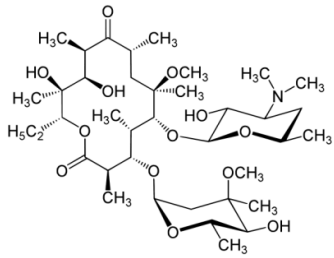
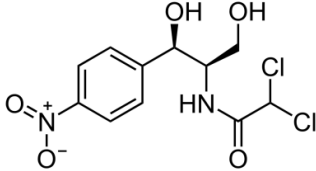
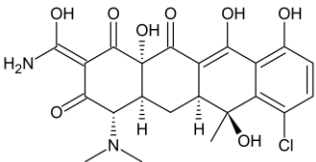
Tabelle 7-2: Übersicht der getesteten Substanzen mit potentieller Wirkung auf *Bacillus subtilis*.

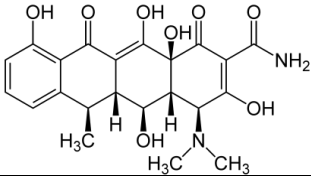
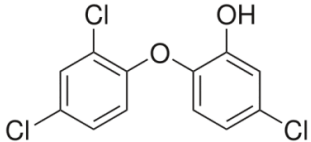
Substanz	Wirkung	Substanz	Wirkung
Sulfamethoxazol	-	Doxycyclin (aus Doxycyclinhyclat)	+
Triclosan	+	Erythromycin	+
Clarithromycin	+	Tetracyclin	+
Roxithromycin	+	Sulfadimidin	-

Substanz	Wirkung	Substanz	Wirkung
Azithromycin	+	Acetylsulfamethoxazol	-
Sulfadoxin	-	Sulbactam	-
Sulfathiazol	-	Ceftriaxon	-
Sulfamethazin	-	Cefixim	-
Chloramphenicol	+	Cefaclor	-
Chlortetracyclin	+	Cefuroxim	-

Die Substanzen, die eine Wirkung auf *Bacillus subtilis* zeigten, wurden als mögliche Referenzsubstanzen in Betracht gezogen. Sie sind in Tabelle 7-3 mit zusätzlichen Informationen aufgelistet. Aufgrund von unterschiedlichen Wirkungsweisen unterscheiden sich die Substanzen in ihrer Wirkung auf *Bacillus subtilis*. Triclosan wurde aufgrund seiner unpolaren Eigenschaft und der damit verbundenen leichten Trennung von den polaren Antibiotika hinzugenommen. Es sollte so die Wirkung auf der HPTLC-Platte in zwei verschiedenen Bereichen überprüft werden.

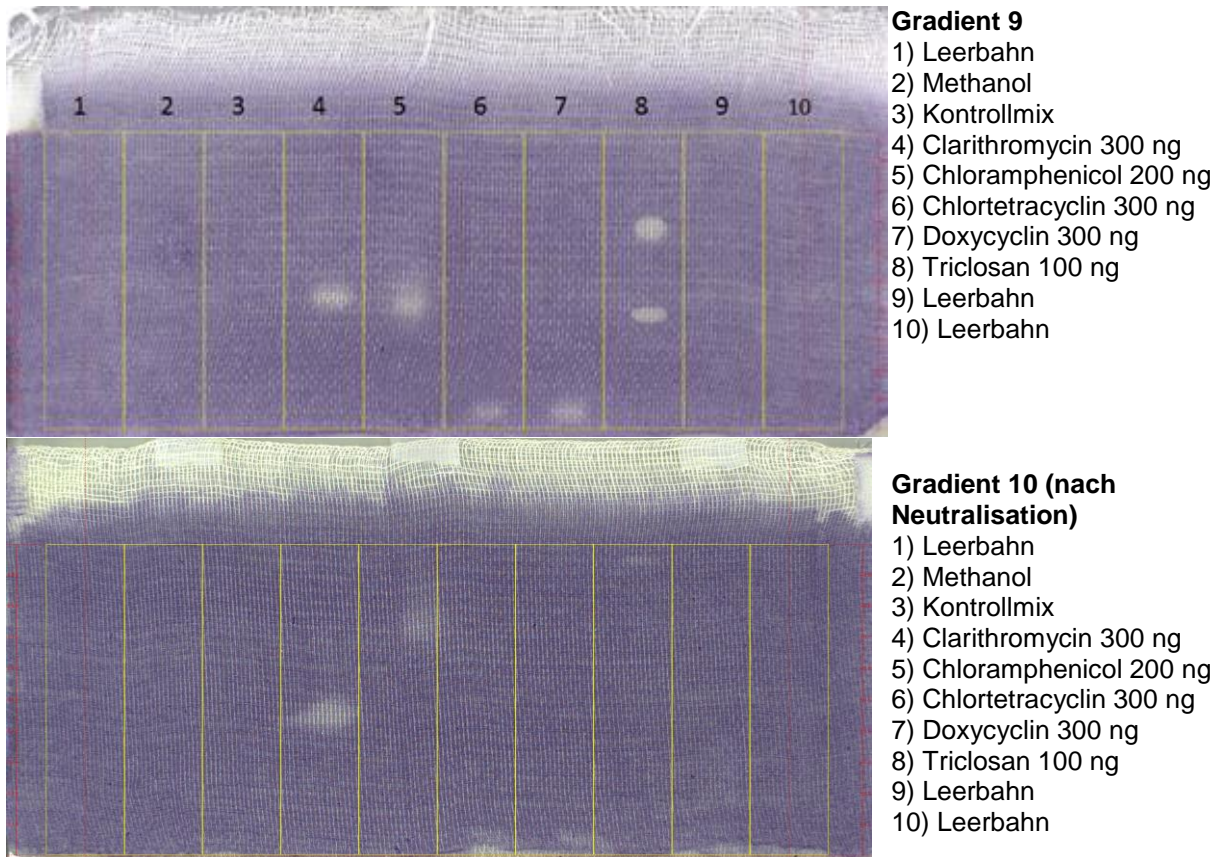
**Tabelle 7-3: Substanzen, die eine deutliche Wirkung auf *Bacillus subtilis* zeigen (mögliche Referenzsubstanzen für den HPTLC-*Bacillus subtilis*-Hemmtest)**

Name	CAS-Nr.	Wirkstoffgruppe	Struktur
Clarithromycin	81103-11-9	Makrolidantibiotika	
Chloramphenicol	56-75-7	Phenicol	
Chlortetracyclin	57-62-5	Tetracyclin	

Name	CAS-Nr.	Wirkstoffgruppe	Struktur
Doxycyclin	564-25-0	Tetracyclin	
Triclosan	3380-34-5	Phenoxyphenol	

Der Test auf Eignung als Referenzverbindung erfolgte mit zwei verschiedenen HPTLC/AMD-Gradienten. Gradient 9 setzt sich aus 16 Stufen zusammen. Er startet mit 3 Stufen ammoniakalischem Methanol (4 %), gefolgt von 8 Stufen ammoniakalischem Methanol (4 %) zu Dichlormethan und anschließend 5 Stufen Dichlormethan zu n-Hexan. Die Laufstrecke beträgt 70 mm. Gradient 10 setzt sich aus 20 Stufen zusammen. Er startet mit 3 Stufen Methanol:Ameisensäure (100:0,05), gefolgt von 8 Stufen Methanol:Ameisensäure (100:0,05) zu Dichlormethan und anschließend 9 Stufen 2-Propanol:Ameisensäure (100:0,05) zu Toluol. Die Laufstrecke beträgt 80 mm. Abb. 7-7 zeigt die Ergebnisse der *Bacillus subtilis*-Tests mit den Substanzen aus Tabelle 7-3 und den zwei verschiedenen Gradienten. Bahn 8 zeigt bei Gradient 9 zwei Banden. Aus vorherigen Versuchen ist der Rf-Wert von Triclosan bekannt. Vermutlich ist die untere Bande ein Transformationsprodukt von Triclosan.

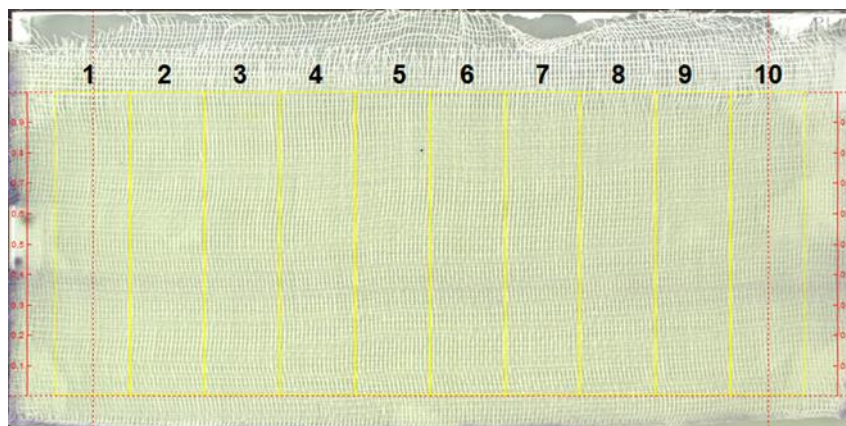




**Abb. 7-7: HPTLC-*Bacillus subtilis*-Test zur chromatographischen Eignung von möglichen Referenzsubstanzen.**

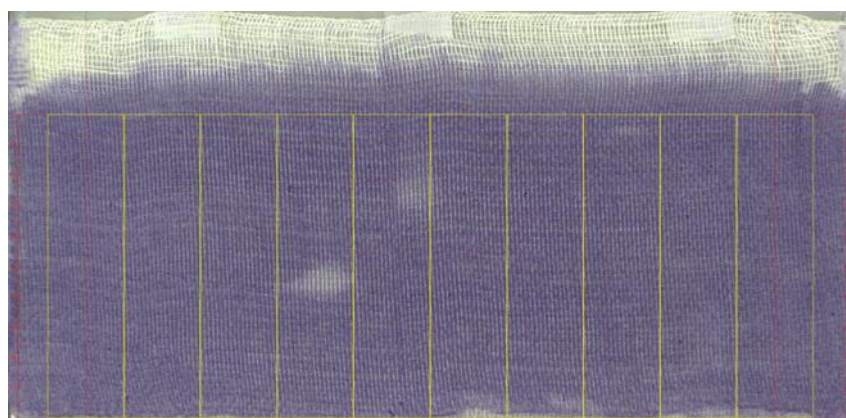
Es wurde sich für die Substanzen Clarithromycin und Doxycyclin entschieden. Mit dieser Auswahl werden ein hoher und ein niedriger Rf-Wert abgedeckt.

Bei den mit Gradient 10 entwickelten Platten vermehrten sich zunächst keine oder teilweise nur wenige Mikroorganismen aufgrund des sauren Milieus (siehe Abb. 7-8, oben). Nachdem die HPTLC-Platten nach der Entwicklung für ca. 10 Sekunden in Ammoniakatmosphäre neutralisiert wurden, konnten wieder Mikroorganismen nachgewiesen werden (siehe Abb. 7-8, unten). Spätere HPTLC-Platten mit Realproben wurden ebenfalls neutralisiert.



**Ohne Neutralisation**

- 1) Leerbahn
- 2) Methanol
- 3) Kontroll-Mix
- 4) Clarithromycin 300 ng
- 5) Chloramphenicol 200 ng
- 6) Chlortetracyclin 300 ng
- 7) Doxycyclin 300 ng
- 8) Triclosan 100 ng
- 9) Leerbahn
- 10) Leerbahn



**Neutralisiert** in Ammoniakatmosphäre (gleiche Auftragung wie oben)

**Abb. 7-8:** Übersicht der Ergebnisse der mit Gradient 10 (s.o.) entwickelten HPTLC-Platten ohne (oben) und mit Neutralisierung (unten) durch Ammoniak und anschließendem *Bacillus subtilis*-Test.

Für die Wiederholbarkeitstests wurde an drei aufeinanderfolgende Tagen jeweils zwei HPTLC-Platten 8x der Antibiotika-Mix, bestehend aus den beiden Referenzsubstanzen Clarithromycin und Doxycyclin aufgetragen und mit Gradient 12 aufgetrennt. Die HPTLC-Platten wurden vor dem Tauchen in die *Bacillus subtilis*-Suspension in zwei unterschiedlichen Entwicklungskammern chromatographiert.

Die Abb. 7-9 zeigt beispielhaft das Ergebnis eines Wiederholbarkeitstests sowie die Auftragepositionen des Antibiotikamixes. Das darauf folgende Balkendiagramm (Abb. 7-10) zeigt die gemittelten Hemmwerte [%] von Doxycyclin und Clarithromycin je Auftrageposition über alle 6 Platten. Die Minima und Maxima sind als Fehlerbalken dargestellt. Die Hemmwerte liegen für Doxycyclin zwischen 24 – 27 % Hemmung. Die Standardabweichung beträgt dabei 2,5 – 4,9 %. Für Clarithromycin wurden Hemmwerte zwischen 18 – 21 % und eine Standardabweichung zwischen 3,1 – 4,4 % ermittelt.

Betrachtet man die Hemmwerte unabhängig von ihrer Auftrageposition, ergibt sich bei einer Anzahl von 48 Versuchen für Doxycyclin ein gemittelter Hemmwert von 26 % ( $\pm 15$  %) und für Clarithromycin ein gemittelter Hemmwert von 20 % ( $\pm 15$  %).

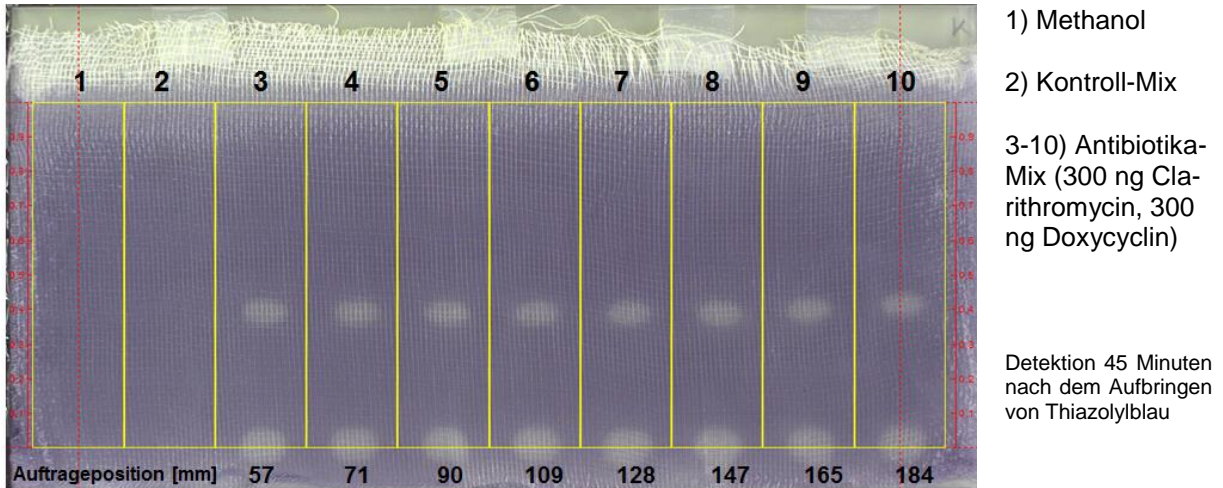


Abb. 7-9: Wiederholbarkeitsversuch zur Betrachtung der Stabilität der Hemmwerte von Doxycyclin und Clarithromycin beim *Bacillus subtilis*-Test.

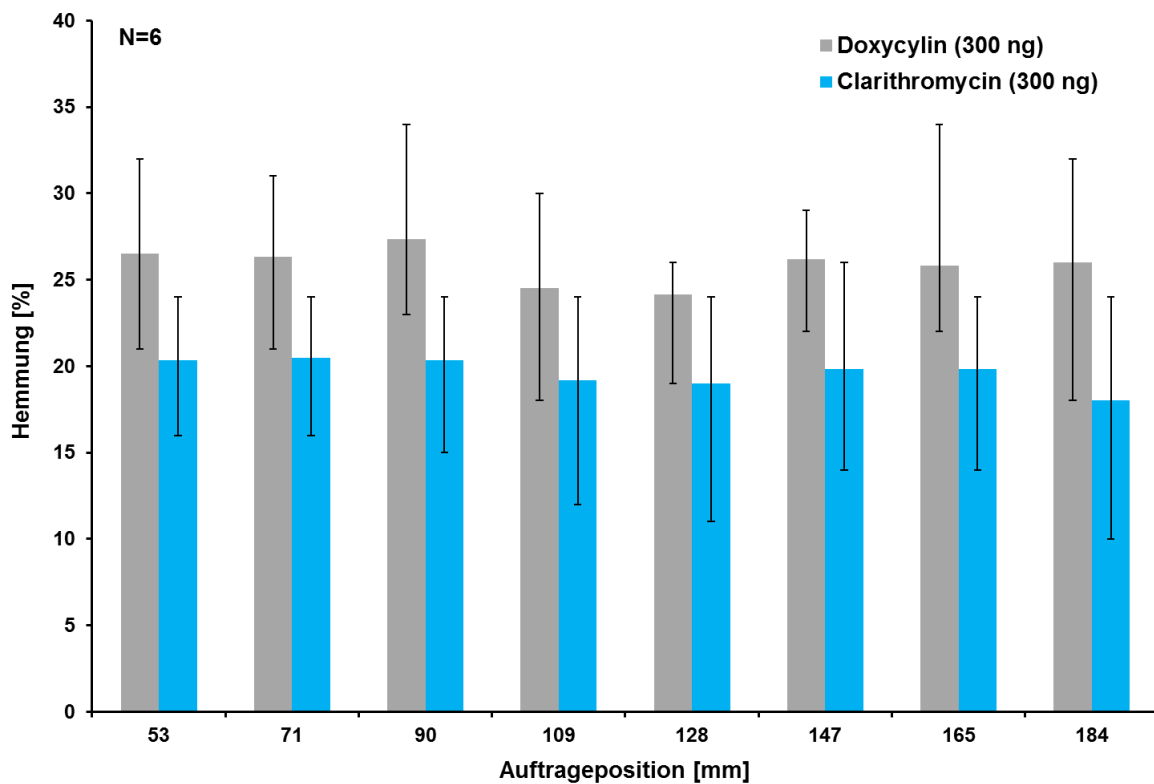


Abb. 7-10: Stabilität des Hemmwertes [%] beim *Bacillus subtilis*-Test für Doxycyclin und Clarithromycin. Die Minima und Maxima sind als Fehlerbalken dargestellt. Die Anzahl der Versuche betrug 6, je 3 HPTLC-Platten wurden in derselben Entwicklungskammer an 3 unterschiedlichen Tagen chromatographiert.

### **7.2.2 Zusammenfassung**

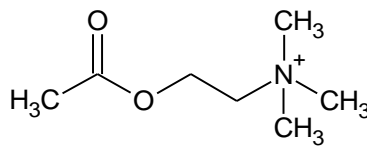
Die Minimierung der Bandendiffusion wurde mit Hilfe der Gaze und der Calciumalginatverfestigung optimiert. Mit Phytigel konnte nochmal die Bandenschärfe verbessert werden. Für die Eignung als Referenzsubstanzen wurden 20 Substanzen untersucht. Von diesen haben sich Doxycyclin und Clarithromycin als die am besten Geeignetsten gezeigt und werden für die spätere Anwendung des HPTLC-*Bacillus subtilis*-Hemmtests eingesetzt. Die Wiederholbarkeitsversuche zeigten für ein biologisches Testsystem, kombiniert mit einer Trennmethode, eine geringe Standardabweichung.

## 8 HPTLC-Acetylcholinesterase-Hemmtest

### 8.1 Grundlagen zur Acetylcholinesterase

#### 8.1.1 Der Neurotransmitter Acetylcholin

Die Übertragung von Reizen zwischen Nerven und den nachgeschalteten Zellen erfolgt an den Synapsen. Bei chemischen Synapsen erfolgt die Übertragung des Impulses durch Ausschüttung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt. Einer der wichtigsten Überträgerstoffe ist Acetylcholin (ACh) (Abb. 8-1).

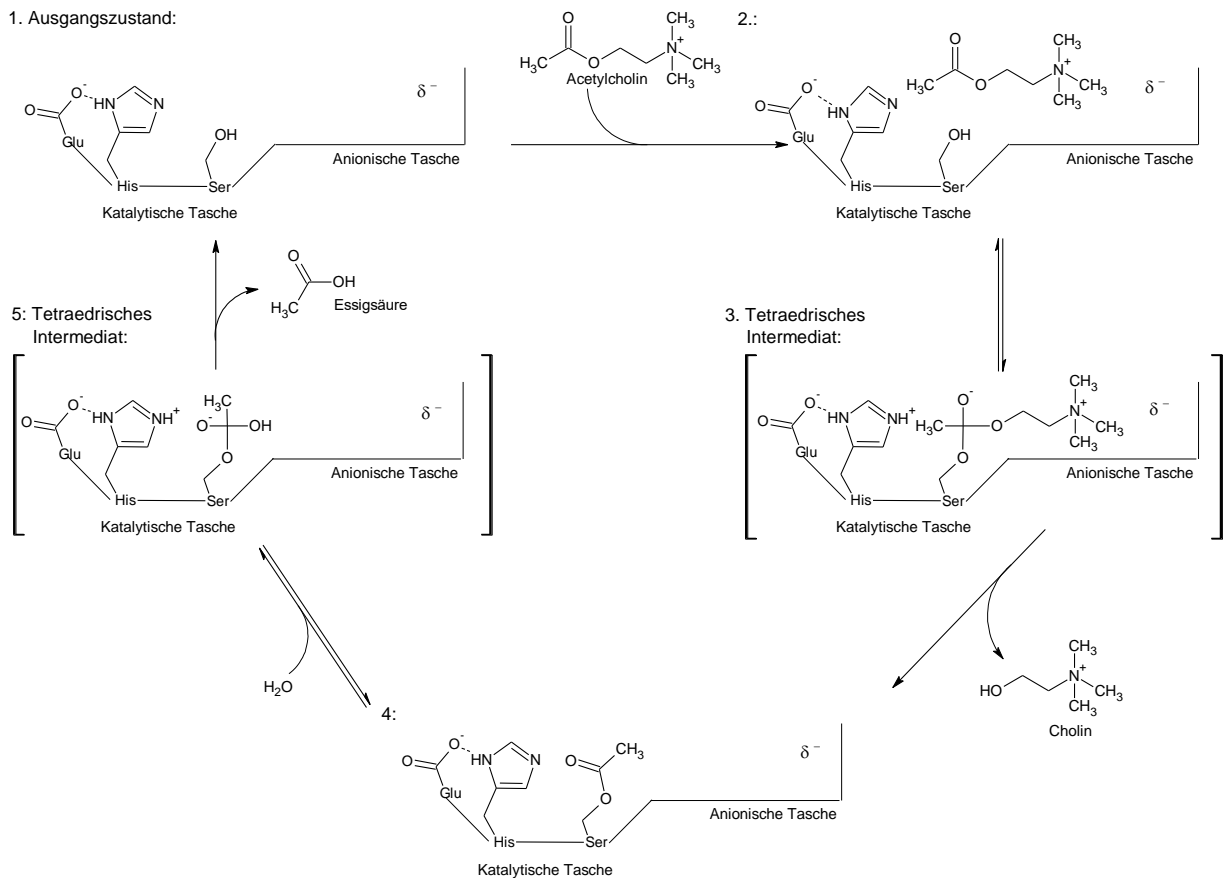


**Abb. 8-1: Struktur von Acetylcholin**

ACh wird in den cholinergen Synapsen aus Acetyl-CoA und Cholin mit Hilfe der Cholinacetyltransferase gebildet und in synaptischen Vesikeln gelagert. Wenn ein Aktionspotenzial das Synapsenendköpfchen erreicht, werden die dort vorhandenen  $\text{Na}^+$ -Kanäle geöffnet. Anschließend führt das Depolarisieren der Membran zur Öffnung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Das einströmende  $\text{Ca}^{2+}$  bewirkt die Exocytose und ACh wird in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Am anderen Ende des synaptischen Spalts wird ACh an nikotinische bzw. muskarinische Acetylcholinrezeptoren gebunden und überträgt dabei das Signal. Um den Reiz wieder zu beenden und die Übertragung des nächsten Signales vorzubereiten, wird ACh durch die Acetylcholinesterase (AChE) im synaptischen Spalt entfernt. Die AChE hydrolysiert ACh in Essigsäure und Cholin. Essigsäure und Cholin werden wieder in das Axon aufgenommen und dort für die ACh-Synthese wiederverwertet [221].

ACh kommt zur Übertragung der Reize an den neuromuskulären Synapsen, im vegetativen Nervensystem und im zentralen Nervensystem vor.

### 8.1.2 Die Acetylcholinesterase



**Abb. 8-2: Reaktionsmechanismus des Abbaus von Acetylcholin durch eine Säure-Base-Katalyse im aktiven Zentrum der Acetylcholinesterase [Verändert nach [222]].**

Die AChE gehört zur Gruppe der Serin-Hydrolasen. Das aktive Zentrum des Enzyms liegt am Ende eines Schlundes. Am Eingang zu diesem Schlund liegt die periphere anionische Bindungsstelle (PAS). Diese Bindungsstelle des Enzyms dient dazu ACh in den Schlund zu leiten [223]. Entlang des Schlundes befinden sich 14 aromatische Aminosäuren, welche 40 % der Oberfläche ausmachen [224]. Durch  $\pi$ -Kationen-Wechselwirkungen wird ACh zum aktiven Zentrum dirigiert, wobei das negative Potential am Ende des Schlundes zunimmt [225, 226, 224]. Im aktiven Zentrum befindet sich die katalytische Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Glutamat, die Hydroxyl-Gruppe des Serins bildet hierbei das esteratische Zentrum [227]. Außerdem befindet sich in der Nähe der Triade eine sogenannte anionische Bindungsstelle, welche mit dem positiv geladenen Stickstoff des Acetylcholins wechselwirkt und das Substrat positioniert (Abb. 8-2, 2) [227]. Durch die Übertragung des Protons von Serin auf den, durch Glutamat stabilisierten, basischen Imidazolring des Histidins wird Serin aktiviert. Das aktivierte Serin greift nun nucleophil den Kohlenstoff der Carbonylgruppe an, wodurch ein tetraedrisches Intermediat entsteht (Abb. 8-2, 3). Die negative Ladung des Carbonylsauerstoffs wird durch Wasserstoffbrückenbindung in einer sogenannten „Oxyanion



hole“ stabilisiert [227, 228]. Im nächsten Schritt wird das Cholin abgespalten und es bleibt ein Essigsäure-Serin-Ester zurück (Abb. 8-2, 4). Durch eine Hydrolyse der acylierten AChE, welche über ein weiteres tetraedrisches Intermediat abläuft, wird Essigsäure freigesetzt und das aktive Zentrum befindet sich wieder im Ausgangszustand (Abb. 8-2, 5 und 1) [229]. Die AChE kann ACh mit einer sehr hohen Geschwindigkeit von  $k_{\text{cat}} = 1,6 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$  hydrolysieren [229].

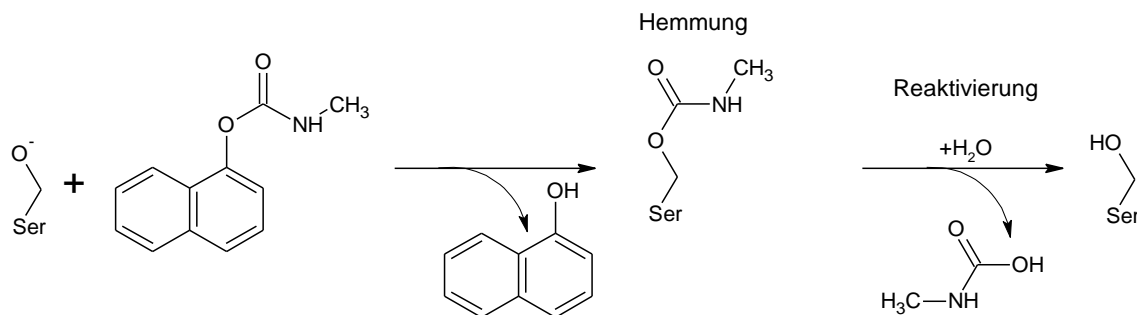
### 8.1.3 Inhibition der AChE

AChE-Inhibitoren blockieren das Enzym und senken damit die Abbaugeschwindigkeit von ACh. Dadurch erhöht sich die ACh-Konzentration im synaptischen Spalt, was zu einem Dauererregungszustand der cholinergen Rezeptoren führt. Anwendung finden AChE-Hemmstoffe als Insektizide oder auch als Nervengase. Andere AChE-Inhibitoren werden in der Medizin bei der Symptombehandlung der Alzheimer-Krankheit angewandt [230]. Neben den anthropogenen AChE-Inhibitoren gibt es auch Hemmstoffe natürlicher Herkunft [231]. So erzeugt das Cyanobakterium *Anabaena flos-aqua* das Alkaloid Anatoxin-a(S), das eine Phosphorsäureester-Gruppe besitzt [232]. Auch der heute synthetisch hergestellte AChE-Hemmer Galantamin kann aus Schneeglöckchen oder Narzissen extrahiert werden [233].

Die AChE-Inhibitoren lassen sich in drei verschiedenen Gruppen einteilen:

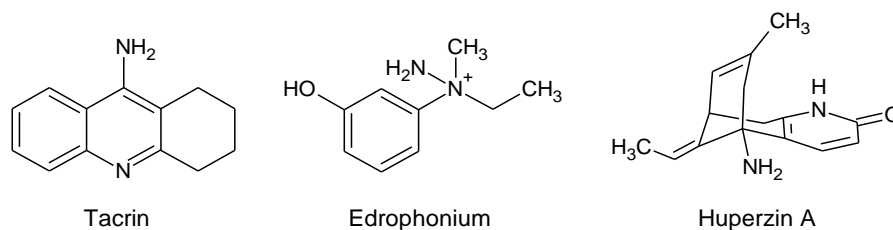
- Reversible Inhibitoren des aktiven Zentrums
- (Quasi) irreversible Inhibitoren des aktiven Zentrums
- Allosterische Inhibitoren der peripheren anionischen Bindungsstelle

Zu den **reversiblen Inhibitoren** des aktiven Zentrums gehören Carbamate (Abb. 8-3). Einige Vertreter dieser Substanzgruppe, wie z. B. Carbaryl oder Methiocarb, werden als Insektizide eingesetzt. Carbamate werden wie ACh umgesetzt. Dabei wird die Hydroxy-Gruppe des Serins im aktiven Zentrum carbamyliert. Die Carbamylierung ist durch eine Hydrolyse innerhalb von Stunden vollständig reversibel [234]. Doch steht das Enzym in diesem Zeitraum dem ACh-Abbau nicht zur Verfügung. Carbamate werden auch als Pseudo-Irreversible Inhibitoren bezeichnet.



**Abb. 8-3: Hemmung der AChE durch Reaktion des Carbamates Cabaryl mit der esteratischen Bindungsstelle (Serin) im aktiven Zentrum und Reaktivierung durch spontane Hydrolyse.**

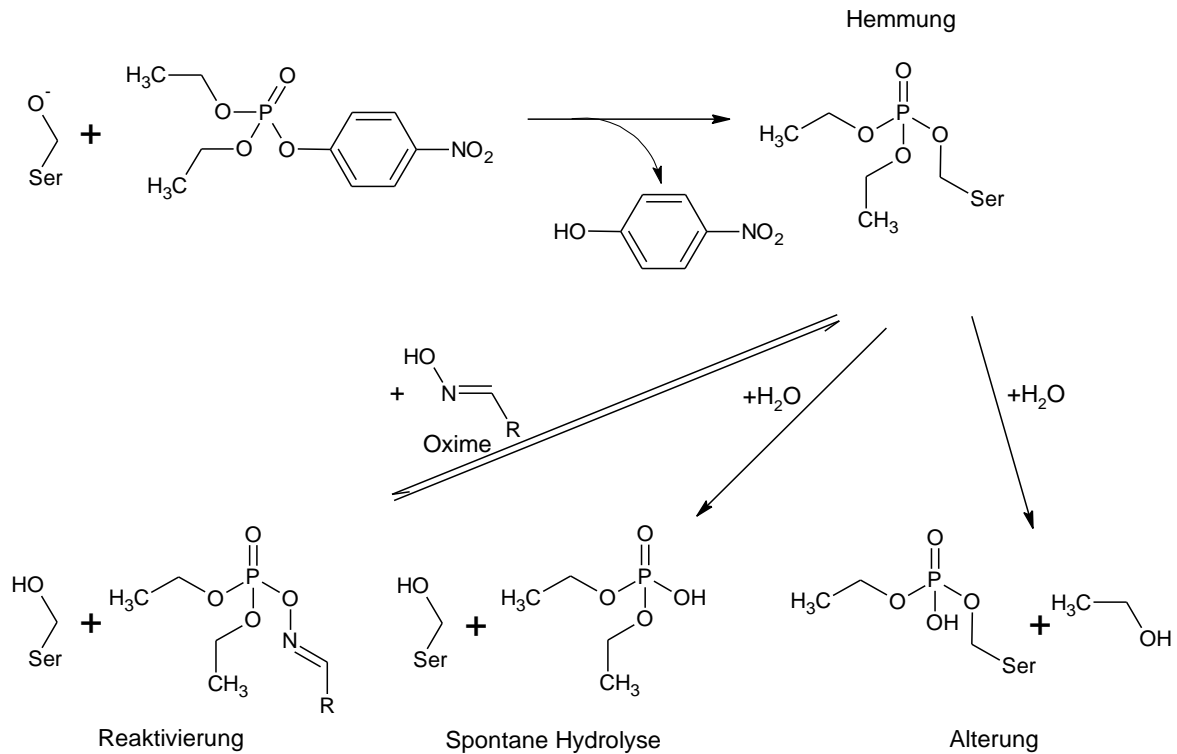
Andere reversible AChE-Inhibitoren blockieren das aktive Zentrum ohne eine kovalente Bindung mit dem esteratischen Zentrum einzugehen. Sie blockieren mit der positiven Ladung am Stickstoff und den aromatischen Ringsystemen das aktive Zentrum für ACh. Zu diesen Stoffen gehören Tacrin, Edrophonium oder Huperzin A (Abb. 8-4), welche zur Therapie der Symptome der Alzheimer Krankheit eingesetzt werden [235].



**Abb. 8-4: Strukturen von weiteren reversiblen AChE-Inhibitoren.**

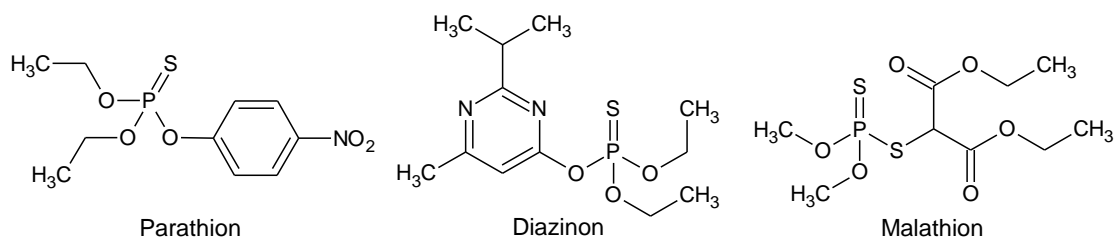
Zu den **quasi irreversiblen AChE-Inhibitoren** gehören Phosphorsäureestern, auch Organophosphate genannt, wie z. B. Paraoxon-ethyl oder Dichlorvos. Diese reagieren zunächst ähnlich wie ACh im aktiven Zentrum des Enzyms. Dort wird das Serin im aktiven Zentrum unter Abspaltung einer Abgangsgruppe phosphoryliert. In diesem Zustand kann das Enzym durch die Zugabe von Oximen reaktiviert werden [236]. Eine spontane Hydrolyse zur Freisetzung des Phosphorsäureesters findet nur sehr langsam bis gar nicht statt [237, 238]. Bei dem sogenannten Alterungsprozess, wird über eine Hydrolyse vom Phosphorsäureester ein weiterer Rest abgespalten und es entsteht ein stabiles Produkt. Eine Reaktivierung mit Oximen ist nun nicht mehr möglich. Eine Hydrolyse des phosphorylierten Serins findet erst nach Tagen, Wochen oder noch später statt [234] womit die AChE quasi irreversibel gehemmt ist.





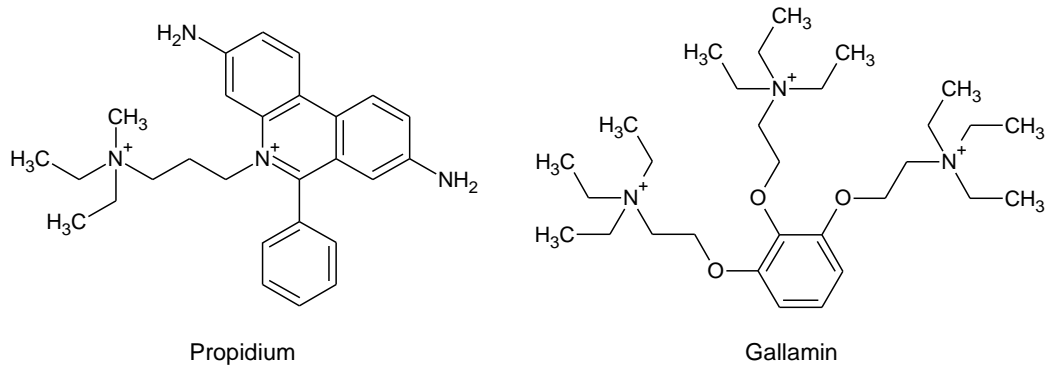
**Abb. 8-5: Hemmung von AChE an der esteratischen Bindungsstelle im aktiven Zentrum durch Phosphorsäureester am Beispiel von Paraoxon-ethyl (Verändert nach [238]).**

Phosphorthionate zeigen eine schwächer hemmende Wirkung auf AChE als die entsprechenden Phosphorsäureester. Durch die geringere Elektronegativität des Schwefels im Vergleich zum Sauerstoff wird die Abgangsgruppe langsamer abgespalten, wodurch sich die Inhibition allgemein verlangsamt. In höheren Organismen werden Organophosphorthionate metabolisch aktiviert und zeigen dann ihre hemmende Wirkung auf AChE [239]. Drei Vertreter sind in Abb. 8-6.



**Abb. 8-6: Strukturen von ausgewählten Organophosphorthionaten.**

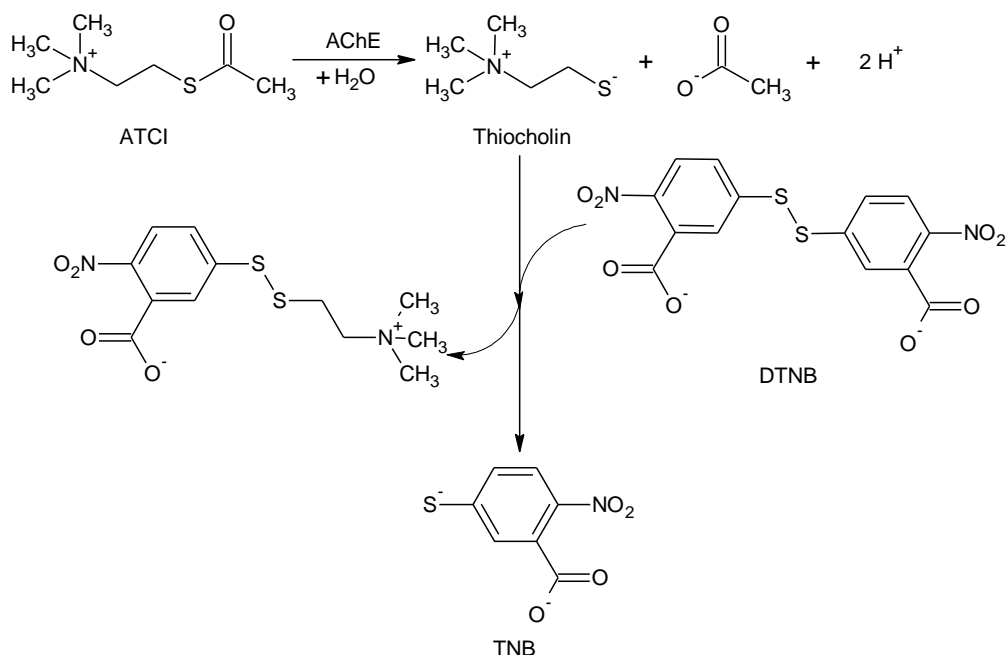
Die dritte Gruppe AChE-Inhibitoren wechselwirkt nicht im aktiven Zentrum, sondern an der **peripheren anionischen Bindungsstelle**. Durch Besetzung dieser Bindungsstelle wird der Zugang zum aktiven Zentrum blockiert, z. B. durch Propidium oder Gallamin [240, 241]. Andere Substanzen besetzen sowohl die periphere anionische Bindungsstelle wie auch den Schlund zum aktiven Zentrum oder auch das aktive Zentrum [240].



**Abb. 8-7: Strukturen von Inhibitoren der peripheren anionischen Bindungsstelle der AChE.**

### 8.1.4 Nachweis von AChE-Inhibitoren

Der Nachweis von AChE-Inhibitoren nach DIN 38415-1:1995-02 [242] beruht auf der von Ellman entwickelten Methode in der Küvette [243]. Dabei wird das Substrat Acetylthiocholinid (ATCI) von AChE hydrolysiert. Das gebildete Thiol wird mit dem nach Ellman benannten Reagenz 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) zum 5-Thio-2-nitrobenzoat (TNB) umgesetzt (Abb. 8-8). Die Aktivität der AChE wird durch die Messung der Absorption bei 412 nm (Absorptionsmaximum TNB) bestimmt.



**Abb. 8-8: Nachweisreaktion der AChE-Aktivität nach Ellman [243].**

Eine andere weitverbreitete Methode ist die Bestimmung der AChE-Hemmung mittels Biosensoren. Dabei wird die AChE-Aktivität meist elektrochemisch bestimmt [244-246]. Doch bei dieser Technik können die verschiedenen Inhibitoren nur unzureichend unterschieden

werden. Somit lässt sich auch hier meist nur die Summe der Toxizität einer Probe gegenüber AChE bestimmen [245, 246].

Mehrere Arbeiten zeigen, wie sich die AChE-Hemmung einer Probe mittels HPLC weiter differenzieren lässt. Dabei wurde die Stärke der Hemmung meist anhand der Absorption bzw. Fluoreszenz der umgesetzten Substrate bestimmt [52, 247, 54]. Der größte Nachteil bei Einsatz der HPLC ist der Einfluss der eingesetzten Lösemittel auf die AChE-Aktivität. Fabel zeigte, dass bereits bei einem Volumenanteil von 50 % Acetonitril in der mobilen Phase die AChE aus dem Zitteraal nach einer Inkubationszeit von 5 min vollständig gehemmt ist [248]. AChE aus dem Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis* besitzt bei diesem Acetonitrilanteil noch eine Restaktivität von 10 % im Vergleich zur acetonitrilfreien Lösung. In 50 % Methanol war die Restaktivität von Zitteraal-AChE kaum noch nachweisbar, während *Nippostrongylus brasiliensis*-AChE immerhin noch eine Aktivität von 40 % zeigte [248].

### 8.1.5 TLC-AChE-Hemmtest

Bereits in den 1960 und 1970er wurden die ersten Versuche zur biochemischen Detektion von Phosphorsäureestern und Carbamaten mittels des Nachweises der Hemmung von Rinderleberesterasen bzw. Schweineleberesterase nach Papierchromatographie bzw. TLC beschreiben [249-256, 117, 257]. Für den Nachweis von Thiophosphorsäureester müssen diese erst in ihre wirksame Oxone oxidiert werden. Häufig wird dazu Brom verwendet [253, 258]. Dabei zeigte sich das die Oxidation mit einer wässrigen Bromlösung effektiver ist als die Exposition der TLC-Platte im Bromdampf [256]. Mittels eines Multi-Enzym-Hemmtests, bestehend aus Cutinase aus *Fusarium solani pizi* und Esterasen aus *Bacillus subtilis* sowie Hasenleber, ist es möglich, neben Organophosphaten und Carbamaten ohne vorherige Oxidation Thiophosphorsäureester nachzuweisen [259]. Wobei sich die Nachweisgrenzen durch die Oxidation mit Brom deutlich verbessern lassen [83]. Durch die Zugabe von 0,1 % Rinderserumalbumin (BSA) kann der Einfluss der stationären Phase, insbesondere bei aktiviertem Kieselgel und Diol-Phasen, auf die Hemmung der Aktivität von AChE zurückdrängt werden [260].

Die erste quantitative Auswertung der Hemmung der Acetylcholinesterase durch Phosphorsäureester mit Hilfe eines Densitometers gelang Štefanac et al. [261]. Auch lassen sich für bekannten AChE-Inhibitoren TLC spezifische Hemmkonstanten berechnen. Um eine Verwechslung mit den Hemmkonstanten aus dem Küvetten bzw. Mikrotiterplattentest vorzubeugen, wurden diese als Hemmfaktoren bezeichnet. Diese Hemmfaktoren korrelieren gut mit den Hemmkonstanten aus dem Mikrotiterplattentest [70].

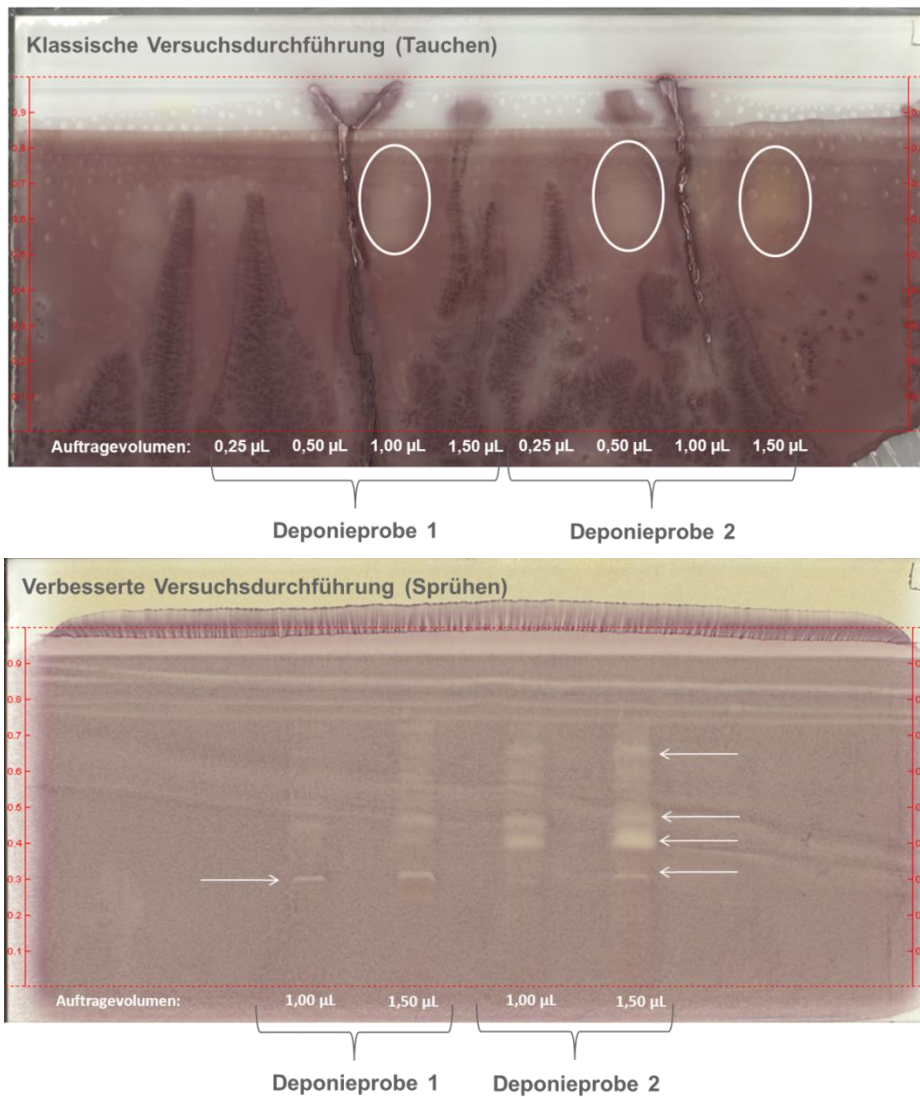
## 8.2 Ergebnisse und Diskussion

### 8.2.1 Vergleich der Substratauftragetechniken

Die Detektion von AChE-Inhibitoren auf der HPTLC-Platte erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird auf die Platte das Enzym aufgebracht. Nach einer definierten Inkubationszeit erfolgt im zweiten Schritt das Aufbringen des Substrates zum Nachweis der Aktivität der AChE. Bei der in der Literatur [115, 259] beschriebenen Durchführung findet die Aufbringung jeweils durch tauchen der Platte in die jeweilige Lösung statt. Durch das Tauchen werden zum einen eine ausreichende Feuchtigkeit und zum anderen eine gleichmäßige Verteilung des Enzyms bzw. des Substrats gewährleistet. Mit Hilfe eines Sprühautomaten kann das gleichmäßige Aufbringen des Substrates ebenso gewährleistet werden. Insbesondere das zweite Tauchen in eine wässrige Lösung ist für Kieselgel-HPTLC-Platten mit sphärischem Material kritisch, da sich dabei das Kieselgel von der Trägermaterial lösen kann. Für den AChE-Hemmtest muss eine ausreichende Feuchtigkeit auf der Platte gewährleistet werden. Nach dem ersten Tauchvorgang sollte diese ausreichen, daher soll überprüft werden ob es ausreicht das Substrat aufzusprühen.

Für den Vergleich wurden zwei Deponiesickerwasserextrakte aus der SPE mittels HPTLC/AMD getrennt (Gradient 1). Aus Vorversuchen ist bekannt, dass diese AChE-Inhibitoren enthalten. Die Trennung fand auf HPTLC-Platten mit sphärischem Kieselgel statt. Für die Bestimmung der Aktivität der AChE wurde das in der Literatur oft beschriebene Substrat 1-Naphthylacetat in Kombination mit Echtblausalz (Anfärbereagenz) eingesetzt [262, 263, 115, 264, 70]. Dieses wird von der AChE zu 1-Naphtol und Essigsäure umgesetzt. Das gebildete 1-Naphtol reagiert mit Echtblausalz zu einem roten Farbstoff. Wenn die AChE noch aktiv ist, bildet sich der rote Farbstoff auf der Platte. Substanzen, die auf die AChE hemmend wirken, erscheinen dann als helle Banden auf rotem Hintergrund (siehe Kreise Abb. 8-9 oben).

Bei der Durchführung nach Weins [260] wird die chromatographierte HPTLC-Platte zunächst in die AChE-Lösung getaucht. Nach einer Inkubationszeit von 30 min erfolgt die Tauchung der Platte in die Substratlösung. Das „Verschmieren“ der Banden ist eine Folge von Diffusionsvorgängen während der beiden Tauchvorgänge. Aus Abb. 8-9 oben ist ferner zu erkennen, dass beim zweiten Tauchvorgang das Bindemittel für das Kieselgel gelöst wird und dies teilweise zum Ablösen der stationären Phase von der HPTLC-Platte führt. Wird das Substrat nach der Inkubationsphase stattdessen mit einem Sprühautomaten aufgetragen, kann kein Ablösen der Kieselgelschicht beobachtet werden und es sind bandenförmige Hemmzonen zu erkennen (Abb. 8-9, unten).



**Abb. 8-9: Vergleich von zwei Substratauftragetechniken beim AChE-Test (Oben: Tauchen, Unten: Aufsprühen). Auf beiden HPTLC-Platten (LiChrospher) wurden die gleichen Proben getrennt.**

### 8.2.2 Auswahl des Substrats

In der Literatur [243, 265, 266, 262, 267-269, 53, 260] werden verschiedene Substrate zur Bestimmung der AChE-Hemmung beschrieben. Diese lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Solche, die durch AChE zu einem Farbstoff umgewandelt werden und solche, deren Umsatzprodukte fluoreszieren. Eine Auswahl der in der Literatur beschriebenen Substrate sind in Tabelle 8-1 zusammengefasst.

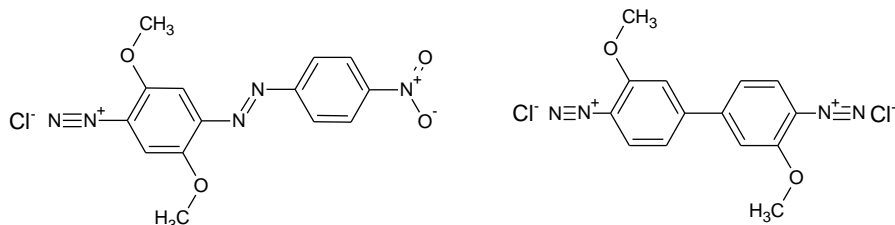
**Tabelle 8-1: Zusammenstellung verschiedener Substrate für den Acetylcholinesterase-Hemmtest**

Substrat	Nachweis umgesetztes Substrat	Bemerkung bzw. $\lambda_{\text{ex}}$ und $\lambda_{\text{em}}$ beim fluorimetrischen Nachweis	Literatur
Acetylthiocholiniodid Anfärben mit DTNB (Ellmann Reagenz)	Absorption (VIS)	Falsch-positive Ergebnisse $\lambda = 405 \text{ nm}$	[243, 269]
1-Naphthylacetat Anfärben mit Echtblausalz („Fast blue b“)	Absorption (VIS)	$\lambda = 533 \text{ nm}$	[260]
Indoxylacetat	Absorption (VIS)/Fluoreszenz	$\lambda_{\text{ex}} = 366 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$ nicht wasserlöslich	[265, 262]
Resorufinacetat	Fluoreszenz	$\lambda_{\text{ex}} = 540 - 570 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$	[265]
Acetylthiocholiniodid Weiterreaktion mit CPM Maleimide	Fluoreszenz	$\lambda_{\text{ex}} = 366 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$ nicht wasserlöslich	[267, 268]
7-Acetoxy-1-methyl-chinoliniumiodid (AMQI)	Fluoreszenz	Autohydrolyse $\lambda_{\text{ex}} = 403 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 502 \text{ nm}$	[266, 53]

Einige der in Tabelle 8-1 genannten Substrate wurde für die Weiterentwicklung des HPTLC-AChE-Hemmtests aus den folgenden Gründen ausgeschlossen. Beim Nachweis der AChE-Aktivität nach Ellman können einige Amine und Aldehyde die Reaktion zwischen Thiocholin und DTNB hemmen und damit falsch-positive Ergebnisse liefern [269]. Resorufinacetat wird von AChE zwar zum fluoreszierenden Resorufin umgesetzt. Doch liegen die Maxima der Anregungs- und der Emmissionswellenlänge nahe beieinander. Ein weiteres Substrat, das ein fluoreszierendes Produkt liefert ist 7-Acetoxy-1-methyl-chinoliniumiodid (AMQI). Doch aufgrund der starke Autohydrolyse von AMQI bei höheren pH-Werten ( $\text{pH} > 5$ ) ist diese Substanz als Substrat ebenso ungeeignet. Auch Acetylthiocholiniodid in Kombination mit N-(4-(7-Diethylamino-4-methylcoumarin-3yl)phenyl)maleimid (CPM Maleimide) wurde als ungeeignet eingestuft, da es wasserunlöslich ist. Dies lässt sich aber durch einen von der AChE noch tolerierten Acetonitril- bzw. Dimethylsulfoxidanteil umgehen. Dieses Substrat ist jedoch sehr teuer.

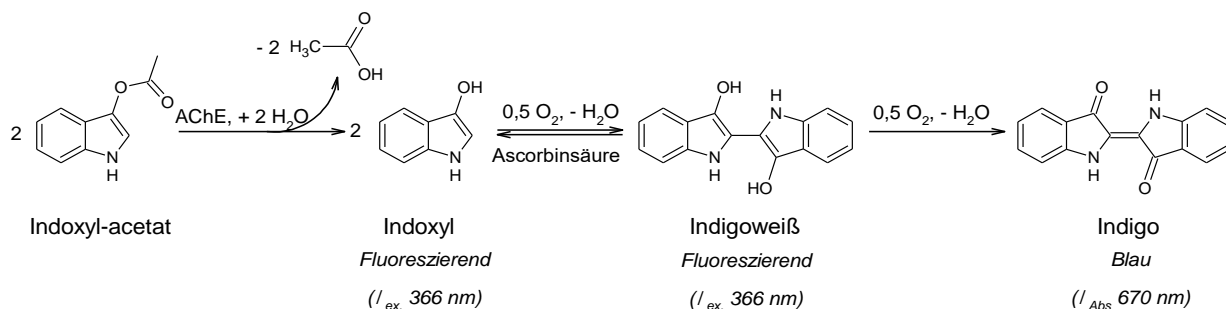
In einem Vorversuch fand ein Vergleich zwischen den Substraten 1-Naphthylacetat (Substrat) mit Echtblausalz (Anfärbereagenz), 1-Naphthylacetat (Substrat) mit Echtschwarzsatz (Anfärbereagenz) und Indoxylacetat (Substrat und Anfärbereagenz) statt.

Das Echtschwarzsatz reagiert in ähnlicher Weise wie Echtblausatz, wobei Echtschwarzsatz nur eine Diazo-Gruppe ( $-N_2^+$ ) besitzt und deshalb nur eine Diazokupplung eingehen kann (siehe Abb. 8-10:).



**Abb. 8-10:** Links die Struktur von Echtschwarzsatz (Fast black k, CAS: 64071-86-9), rechts die Struktur von Echtblausatz (Fast blue k, CAS: 64071-86-9)

Das nicht fluoreszierende Indoxylacetat (Abb. 8-11) wird von der AChE zum stark fluoreszierenden Indoxyl hydrolysiert [265]. Anschließend entsteht zunächst, unter Anwesenheit von Sauerstoff, das farblose ebenfalls stark fluoreszierende Indigoweiß und danach das blaue nicht fluoreszierende Indigo. Die Zugabe von Ascorbinsäure verzögert die Weiterreaktion vom Indigoweiß zu Indigo. Dadurch wird die Fluoreszenz länger aufrechterhalten (Abb. 8-11) [265].



**Abb. 8-11:** Reaktionen beim AChE-Hemmtest mit Indoxyl-acetat unter Ausbildung des Indigoweiß-Indoxyl-Gleichgewichts [265].

Für den Vergleich der Substrate wurde auf der HPTLC-Platte jeweils eine Konzentrationsreihe der bekannten AChE-Hemmer Paraoxon-methyl und Chlorfenvinphos aufgetragen. Als besonders empfindlich erwies sich der Test bei der Verwendung von Indoxylacetat. Mit diesem Substrat konnte als einziges noch 0,5 ng Paraoxon-methyl detektiert werden. Doch ab einer aufgetragenen Substanzmenge von 0,3 ng Chlorfenvinphos ist ein Verlaufen der Banden zu beobachten. Dieses Verlaufen muss minimiert werden, da ansonsten auf einer entwickelten Platte die Zuordnung der Wirkung zu einer Substanz schwer fällt.

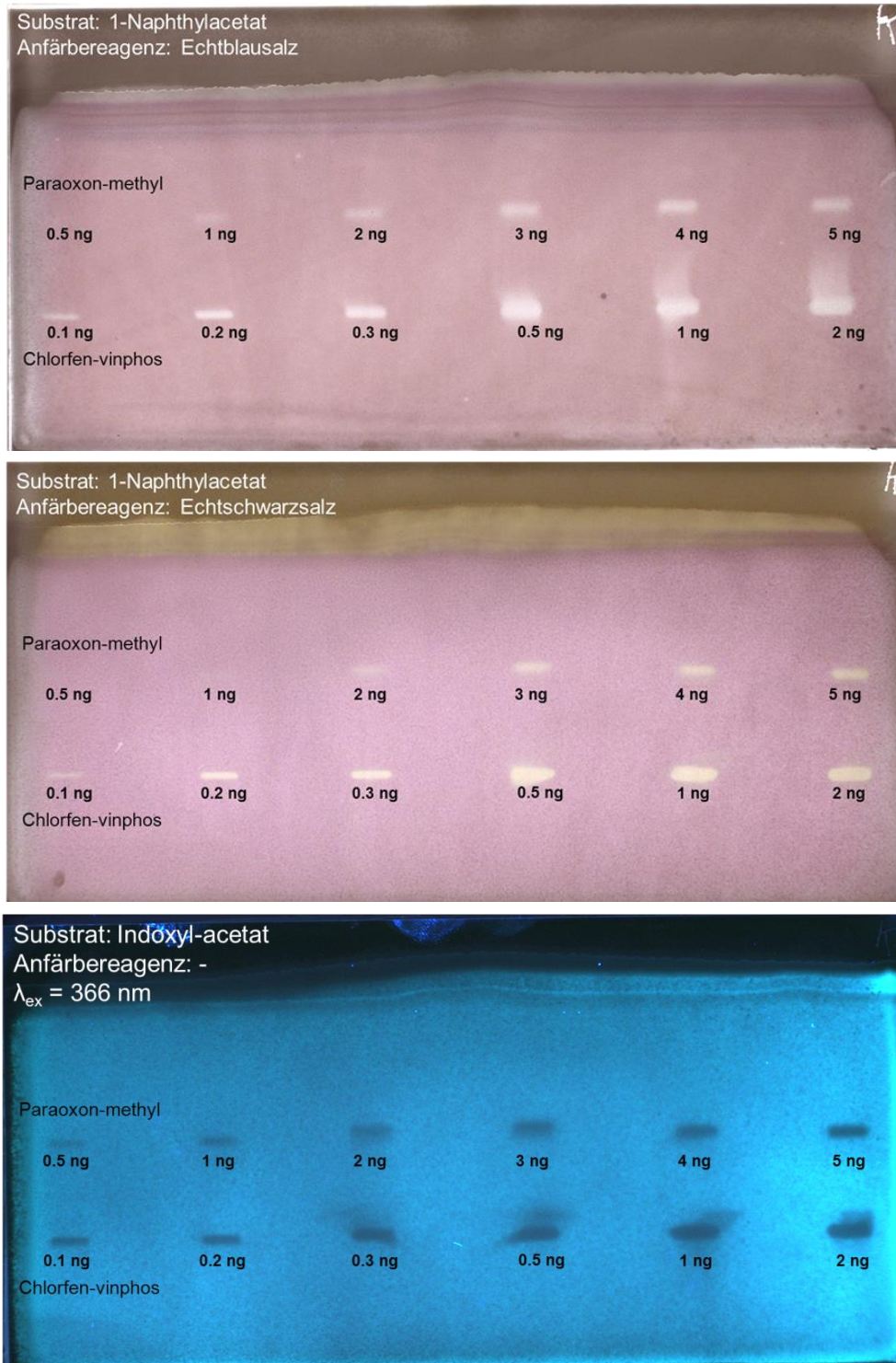


Abb. 8-12: Empfindlichkeitsvergleich der beim AChE-Hemmtest verwendeten Substrate bzw. Anfärbereagenzien (Inkubationszeit: 5 min, Substratumsatzzeit: 5 min).



### **8.2.3 Ermittlung von Einflussgrößen auf den HPTLC-AChE-Hemmtest durch Aufstellung eines statistischen Versuchsplans**

Zur Verbesserung der Nachweisgrenze und Verringerung der Bandenverbreiterung wurden zunächst verschiedene Parameter mittels statistischer Versuchsplanung (Design of Experiments, DOE) untersucht.

#### ***Grundlagen zur statistische Versuchsplanung***

Das Ziel der statistischen Versuchsplanung ist es Kenntnisse über Einflussgrößen auf Zielgrößen für einen Prozess zu gewinnen. Die Einflussgrößen werden auch Faktoren genannt. Im Gegensatz zu einfaktoriellen Versuchsplänen („one-factor at a time“) werden bei einem multifaktoriellen Versuchsplan simultan mehrere Faktoren variiert. Voraussetzungen für einen solchen Versuchsplan sind, dass das Einstellmuster der Faktoren orthogonal ist, die Drehbarkeit gewährleistet ist und die Versuchsabfolge randomisiert durchgeführt wird. Damit ist es möglich mit wenigen Versuchen die signifikanten Faktoren zu erkennen. Zudem lassen sich dadurch auch Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Faktoren erfassen [270].

Die zu untersuchenden Faktoren werden dazu auf unterschiedliche Stufen getestet. Bei den Stufen handelt es sich um einen festgelegten Zustand der Einflussgröße. Die Wahl der Stufenabstände müssen mit Hilfe von vorangegangenen Arbeiten abgeschätzt werden. Zur Untersuchung ob ein Faktor einen signifikanten Einfluss auf ein System hat, ist ein 2-stufiger Versuchsplan, ausreichend. Dazu müssen bei einem vollfaktoriellen Versuchsplan  $2^k$  Versuche durchgeführt werden. Wobei  $k$  für die Anzahl der Faktoren steht. Die Stufenabstände werden zur kompakten Darstellung in der Planmatrix kodiert angeben z. B. als -1 und +1. Daher entsprechen bei einem  $2^3$  Versuchsplan in der Geometrie die Faktoreneinstellungen den Eckpunkten eines Würfels (Abb. 8-13, B). Damit der Versuchsplan orthogonal ist werden die Faktoreneinstellung nach dem Muster, wie in Abb. 8-13, A für einen  $2^3$  Versuchsplan gezeigt, angeordnet. [271].

A) Planmatrix

Versuch	$x_1$	$x_2$	$x_3$
1	1	1	1
2	1	1	-1
3	1	-1	1
4	1	-1	-1
5	-1	1	1
6	-1	1	-1
7	-1	-1	1
8	-1	-1	-1

B) Geometrische Darstellung der Planmatrix

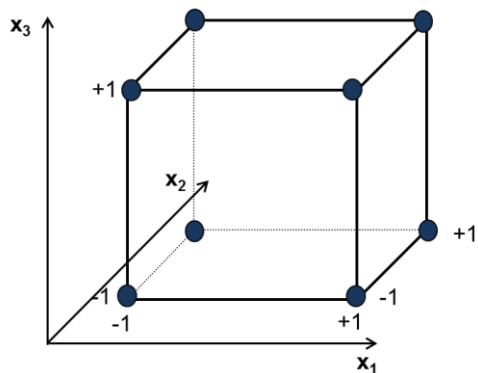


Abb. 8-13: A) Planmatrix eines vollständigen  $2^3$  Versuchsplans B) Geometrische Darstellung zu einem  $2^3$  Versuchsplan.

Das mit einem zweistufigen Versuchsplan untersuchte System wird mit einem linearen Regressionsmodell beschrieben (Gleichung 8-1).

$$\hat{y} = \bar{y} + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{j=1}^{k-1} \sum_{i=j+1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad \text{Gleichung 8-1}$$

Mit  $\hat{y}$  = Wert der Zielgröße,  $\bar{y}$  = Mittelwert der Zielgröße aus den DOE-Versuchen,  $\beta$  = Regressionskoeffizient,  $x$  = Einflussgröße und  $\varepsilon$  = Modellfehler

### Auswertung von vollfaktoriellen Versuchsplänen

Zur Berechnung des Effektes eines Faktors, wird zuerst jeweils der Mittelwert der Zielgröße aus den Versuchen bei niedrigen sowie hohen Stufeneinstellung ermittelt. Aus diesen Mittelwerten wird nach Gleichung 8-2 die Differenz gebildet [272].

$$e_f = \overline{f_{(+1)}} - \overline{f_{(-1)}} \quad \text{Gleichung 8-2}$$

Mit  $e_f$  = Effekt eines Faktors,  $\bar{f}$  = Mittelwert der Zielgröße bei niedriger bzw. hoher Stufeneinstellung

Der Regressionskoeffizient wird aus dem Mittelwert der Effektwerte der beiden Stufen ermittelt (Gleichung 8-3) [271].

$$\beta_f = \frac{e_f}{2} \quad \text{(Gleichung 8-3)}$$

Mit  $\beta_f$  = Regressionskoeffizient eines Faktors und  $e_f$  = Effekt eines Faktors

Die Bewertung, ob ein Faktor einen signifikanten Einfluss auf das System hat oder ob der Effekt innerhalb der Streuung des Systems liegt, erfolgt durch eine Varianzanalyse (ANOVA) über alle Ergebnisse. Sobald ein Wert außerhalb der Normalverteilung mit einem festgeleg-

ten Signifikanzniveau  $\alpha$  liegt, besitzt der untersuchte Faktor einen echten Einfluss auf das System. Meist wird dafür ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  gewählt. Veranschaulicht wird die Prüfung auf Signifikanz häufig mittels Wahrscheinlichkeitsplots oder Pareto-Diagrammen.

Den Abschluss der statischen Versuchsplanung bildet die Durchführung eines Bestätigungsexperimentes. Hier wird das aus den Experimenten hervorgegangene lineare Modell überprüft, indem mit den festgelegten Faktorenniveaus und den dazugehörigen Regressionskoeffizienten ein Erwartungswert für die Zielgröße berechnet wird. Häufig wird für den Bestätigungsversuch die Einstellung der Faktoren so gewählt, dass die Einstellungen in der Mitte der für den vollfaktoriellen Versuchsplan gewählten Niveaus liegen. Das Modell gilt als gesichert, wenn der gemessene Wert für die Zielgröße mit dem Erwartungswert innerhalb der Systemvarianz übereinstimmt.

***Aufstellung eines Versuchsplanes zur Ermittlung von Einflussgrößen auf den HPTLC-AChE-Hemmtest***

In einem vollfaktoriellen Versuchsplan sollten folgende Einflussgrößen auf die Bandenverbreiterung (Minimal) und das Signal-zu-Rauschen (S/R, Maximal) untersucht werden:

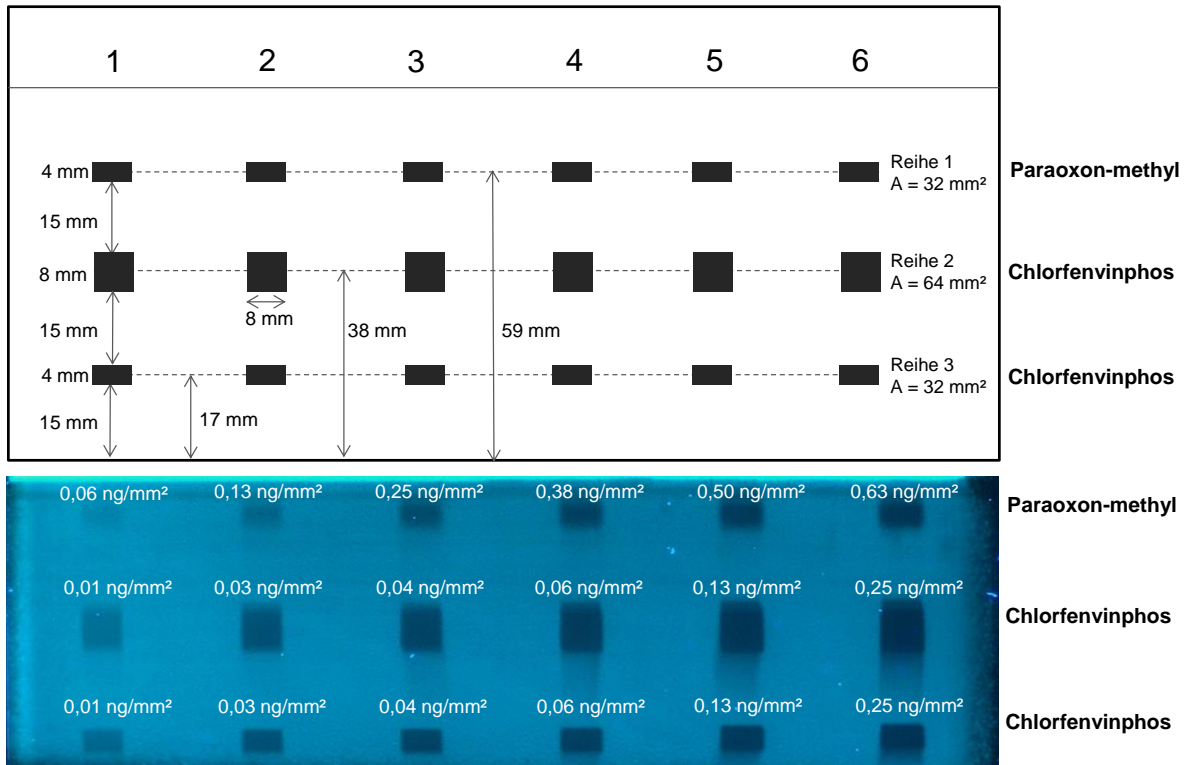
- Substratmenge
- Umsatzzeit des Substrats
- Inkubationszeit
- Aktivität des Enzyms

Die Einstellungen der Einflussgrößen wurden aufgrund von Vorkenntnissen über das vorliegende System gewählt und sind für die geplante Versuchsreihe in Tabelle 8-2 aufgelistet. Um alle Beeinflussungen zu erfassen, sind 16 randomisierte Versuche erforderlich.

**Tabelle 8-2 Mögliche Einflussgrößen und deren Parameterwerte für die statistische Untersuchungen auf die Beeinflussung der Detektion**

<b>Einflussgröße</b>	<b>1. Stufe (-1)</b>	<b>2. Stufe (+1)</b>
Substratmenge [ $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ]	0,012	0,059
Umsatzzeit Substrat [min]	1	5
Inkubationszeit [min]	5	20
Aktivität AChE [U/mL]	1,25	2,5

Als Testsubstanzen kommen die beiden Insektizide Paraoxon-methyl und Chlorfenvinphos zum Einsatz, bei beiden Verbindungen handelt es sich um Phosphorsäureester. Auf 16 HPTLC-Platten wurden jeweils die beiden Substanzen mit gleichbleibender Konzentration aufgetragen (Abb. 8-14), während die Faktoren gemäß des Versuchsplans variierten.

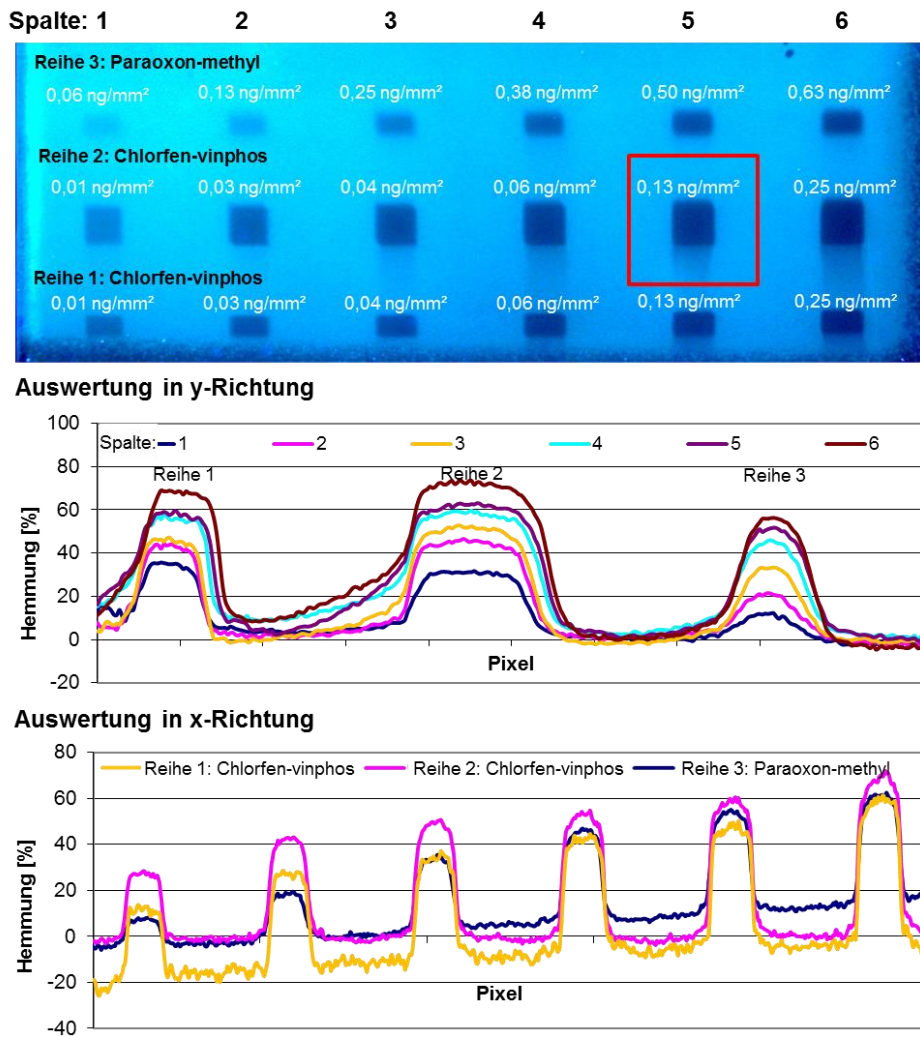


**Abb. 8-14:** Darstellung des Probenauftrageschemas für die DOE-Versuche (Oben: Abmessungen der Auftragen für Insektizide für die DOE-Versuche. Unten: einzelne Flächenmassen der verschiedenen Auftragen).

### 8.2.4 Auswertung der Ergebnisse der vollfaktoriellen-Versuchsreihe

#### **Bandenverbreiterung**

Für die Identifizierung der Faktoren, die für die Bandenverbreiterung verantwortlich sind, wurde bei allen Versuchen die in Abb. 8-15 markierte quadratische Hemmfläche von Chlorfenvinphos mit einer Konzentration von 0,13 ng/mm<sup>2</sup> ausgewertet. Durch die hohe Substanzmenge war der Kontrast dort besonders stark. Die aufgetragene Substanzmenge erlaubt es zudem die Verbreiterung der Fläche an den Rändern gut zu detektieren, da bei einer auftretenden Diffusion hier die Konzentration in den entstehenden Randbereichen hoch genug ist, um diese noch nachzuweisen.



**Abb. 8-15:** Ergebnis der Einstellung der Versuchsparameter nach DOE-Versuch 13. Die rot umrahmte Fläche wurde zur Auswertung herangezogen. Oben: Aufnahme der AChE-Hemmung, Mitte: Hemmwerte der Spalten 1-6, Unten: Hemmwerte der 3 Auftragereihen von links nach rechts.

Die Berechnung der Größe der Hemmfläche erfolgte anhand der Pixelanzahl in horizontaler und vertikaler Richtung. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche für die Zielgröße Bandenverbreiterung sind in Tabelle 8-3 dargestellt. Während die gemessenen Kantenlängen in x-Richtung Werte von 51-104 Pixeln einnehmen, liegen die Werte in y-Richtung bei 53-112 Pixeln. Bei einem reinen Diffusionseffekt müsste sich die Fläche in alle Richtungen gleichmäßig ausbreiten. Der gemessene Unterschied in x- und y-Richtung deutet darauf hin, dass neben der Diffusion noch ein weiterer Faktor das Ergebnis in y-Richtung beeinflusst.

**Tabelle 8-3: Ermittelte Hemmflächen der einzelnen Versuche (Zielgröße Bandenverbreiterung). Bei den Parametern des Versuchs 3 war die Abweichung der Hemmfläche von der quadratischen Auftragfläche (2500 Pixel) am geringsten.**

DOE-Versuch (HPTLC-Platte)	Kantenlänge x-Richtung [Pixel] (Soll: 50 Pixel)	Kantenlänge y-Richtung [Pixel] (Soll: 50 Pixel)	Fläche [Pixel] (Soll: 2500 Pixel)
1	58	67	3886
2	89	79	7031
3	51	53	2703
4	90	82	7380
5	64	91	5824
6	104	121	12584
7	69	100	6900
8	69	96	6624
9	63	69	4347
10	84	85	7140
11	56	67	3752
12	80	88	7040
13	90	112	10080
14	80	94	7520
15	70	109	7630
16	86	98	8428

Zuerst wurde der Einfluss der Einzelparameter ohne ihre gegenseitige Wechselwirkung untersucht. In Abb. 8-16 wird der Einfluss der Einzelfaktoren auf die Flächenvergrößerung gezeigt. Je steiler die Steigung zwischen den Stufen des Parameters ist, desto signifikanter ist der Einfluss. Eine große Steigung und damit einen großen Einfluss auf die Bandenverbreiterung haben die Belegung mit Indoxylacetat und Inkubationszeit.

**Tabelle 8-4: Berechneter Effekt der Einflüsse der Einzelparameter auf die Flächenvergrößerung.**

	Substratmenge	Umsatzzeit	Inkubationszeit	Aktivität der Lösung
<b>Mittelwert 1. Stufe (-1)</b>	5640 Pixel	7302 Pixel	5410 Pixel	6992 Pixel
<b>Mittelwert 2. Stufe (+1)</b>	7968 Pixel	6307 Pixel	8199 Pixel	6617 Pixel
<b>Effekt</b>	2328 Pixel	-994 Pixel	2789 Pixel	-376 Pixel

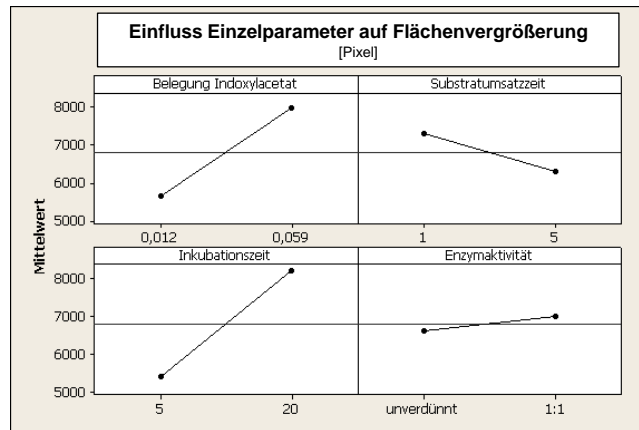


Abb. 8-16: Einfluss der Einzelparameter auf die Flächenvergrößerung.

Bei einer differenzierten Betrachtung der Einflussgrößen auf die Flächenvergrößerung ist zu erkennen, dass der Haupteinfluss auf die Verbreiterung in x-Richtung die Belegung mit Indoxylacetat und in y-Richtung die Inkubationszeit ist (Abb. 8-17). Da nur die Verbreiterung in x-Richtung der Flächenvergrößerung durch Diffusion entspricht, ist die Belegung mit Indoxylacetat der Parameter mit dem Haupteinfluss auf die Diffusion.

Die Signifikanz der Effekte auf die Verbreiterung in x-Richtung wurde mit einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  bestimmt. Wie im Pareto-Diagramm (Abb. 8-18, links) oder im Wahrscheinlichkeitsnetz (Abb. 8-18, rechts) zu sehen, ist die Belegung mit Indoxylacetat der einzige signifikante Parameter.

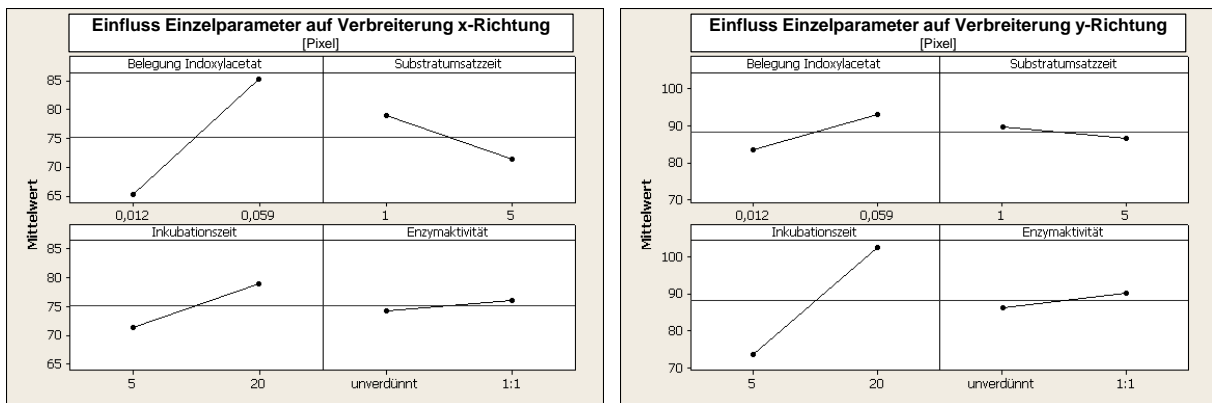


Abb. 8-17: Einfluss der Einzelparameter auf die Vergrößerung der Fläche in x- bzw. y-Richtung.

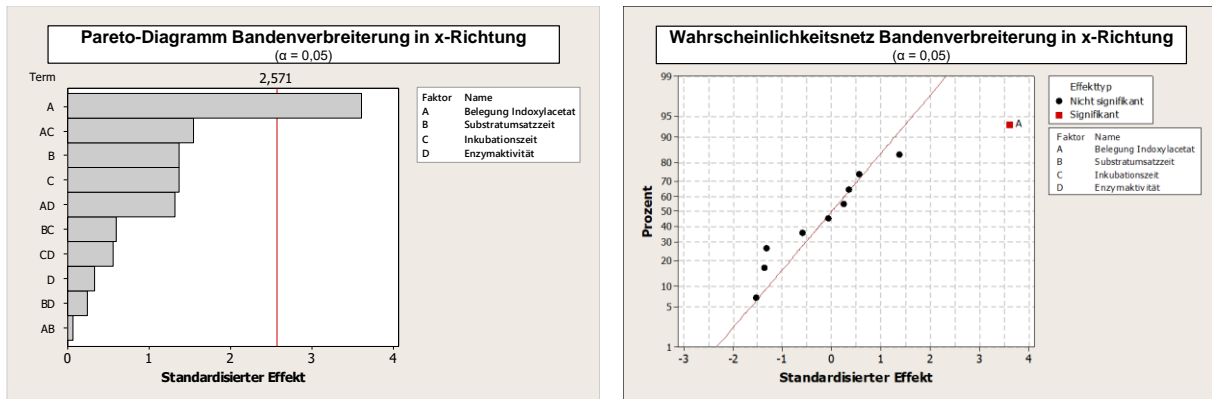


Abb. 8-18: Pareto-Diagramm (links) und Wahrscheinlichkeitsnetz (rechts) zur Ermittlung von signifikanten Einflussfaktoren auf die Bandenverbreiterung in die horizontale Richtung.

### Signal-zu-Rauschen

Für die Zielgröße Signal-zu-Rauschen (S/R) wurden die beiden Flächen mit den geringsten Flächenmassen (0,01 ng/mm<sup>2</sup> und 0,03 ng/mm<sup>2</sup>) ausgewertet. In der Tabelle 8-5 sind S/R ≥ 3 grün markiert. Die Intensität des Grüntones spiegelt die Größe des S/R wieder. Mit den Versuchsbedingungen des Versuchs 13 wird das beste S/R erzielt.

Tabelle 8-5: Ermitteltes S/R der einzelnen Versuche. Das beste S/R wurde bei Versuch 13 erzielt. Ausgewertete Banden: Chlorfenvinphos 64 mm, 1. Bande: 0,01 ng mm<sup>-2</sup>, 2. Bande: 0,03 ng mm<sup>-2</sup>.

Versuch	S/R Mittelwerte	
	1. Bande	2. Bande
01	2,9	6,0
02	0,9	4,5
03	1,3	0,9
04	1,6	2,7
05	12,0	15,8
06	19,5	4,6
07	2,8	7,8
08	10,2	5,4
09	2,5	5,5
10	5,8	10,1
11	2,7	4,4
12	4,1	7,1
13	26,9	30,9
14	11,1	16,0
15	28,1	20,3
16	12,2	9,9

Die Untersuchung der Einzelparameter zeigt, dass ein gegenläufigen Einflüsse auf das S/R haben zwischen den Parameter existiert (Abb. 8-19). Die größte Steigung und damit den größten Einfluss hat die Inkubationszeit auf das S/R der ersten Bande (Chlorfenvinphos 0,01 ng mm<sup>-2</sup>, 64 mm<sup>2</sup>). Bei der zweiten Bande (Chlorfenvinphos 0,03 ng mm<sup>-2</sup>, 64 mm<sup>2</sup>) ist das Ergebnis nicht so eindeutig, hier haben die Inkubationszeit und die Enzymaktivität eine ähnliche Steigung.



Tabelle 8-6: Berechneter Effekt der Einflüsse der Einzelparameter auf das S/R

1. Bande				
(Chlorfenvinphos: Auftragefläche 64 mm <sup>2</sup> , Flächenmasse: 0,01 ng*mm <sup>-2</sup> )				
	Substratmenge	Umsatzzeit	Inkubationszeit	Aktivität der Lösung
Mittelwert 1. Stufe (-1)	9,9	10,2	2,7	11,7
Mittelwert 2. Stufe (+1)	8,2	7,9	15,4	6,4
Effekt	-1,7	-2,3	12,6	-5,3

2. Bande				
(Chlorfenvinphos: Auftragefläche 64 mm <sup>2</sup> , Flächenmasse: 0,03 ng*mm <sup>-2</sup> )				
Parameter	Substratmenge	Umsatzzeit	Inkubationszeit	Aktivität der Lösung
Mittelwert 1. Stufe (-1)	11,4	11,7	5,1	13,0
Mittelwert 2. Stufe (+1)	7,6	7,3	13,8	6,0
Effekt	-3,9	-4,4	8,7	-7,0

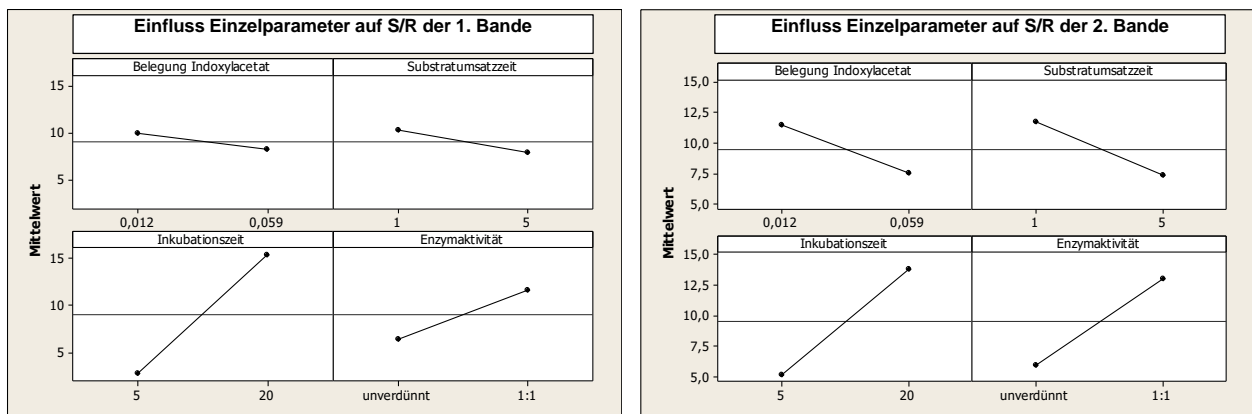


Abb. 8-19: Einfluss der Einzelparameter auf das S/R (Chlorfenvinphos 64 mm, 1. Bande: 0,01 ng mm<sup>-2</sup>, 2. Bande: 0,03 ng mm<sup>-2</sup>).

Die Auswertungen mittels des Pareto-Diagramms und über das Wahrscheinlichkeitsnetz bestätigen das Ergebnis aus der Auswertung über die Steigung (Abb. 8-20 und Abb. 8-21). Während auf die 1. Bande nur die Inkubationszeit einen signifikanten Einfluss besitzt, sind es auf die 2. Bande in abnehmendem Einfluss die *Substratmenge* > *Enzymaktivität* > *Wechselwirkung aus Substratmenge und Inkubationszeit* > *Umsatzzeit Substrat*.

Da die gemessenen Werte der 1. Bande oftmals unter der Grenze eines S/R von 3 liegen und damit unter der Nachweisgrenze wird das Ergebnis der Auswertung der 2. Banden als zuverlässiger eingestuft.

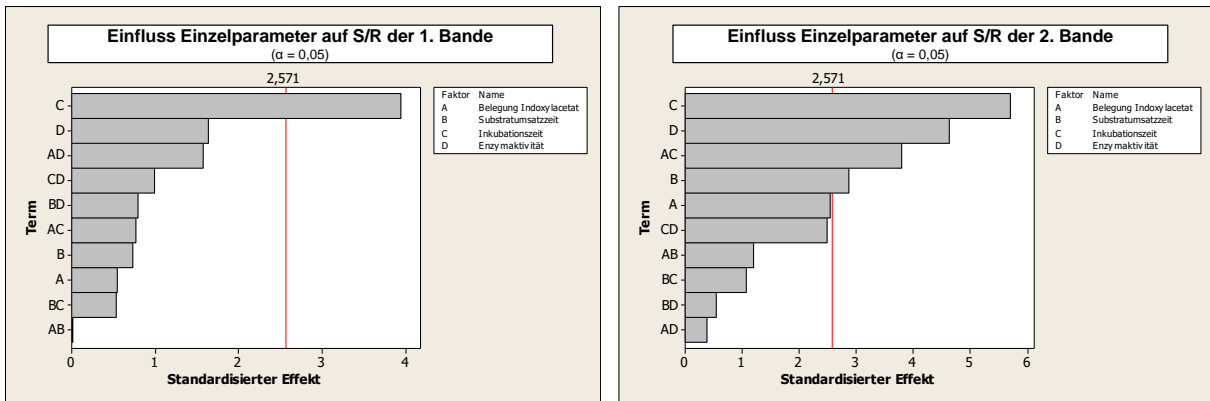


Abb. 8-20: Pareto-Diagramme zur Ermittlung von signifikanten Einflussfaktoren auf das S/R (Chlorfenvinphos 64 mm, 1. Bande:  $0,01 \text{ ng mm}^{-2}$ , 2. Bande:  $0,03 \text{ ng mm}^{-2}$ ).

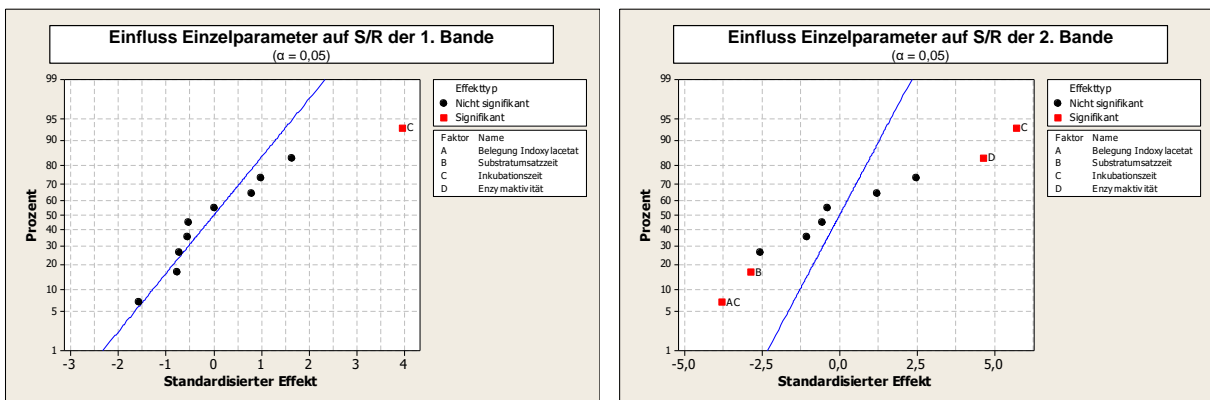


Abb. 8-21: Wahrscheinlichkeitsnetze zur Ermittlung von signifikanten Einflussfaktoren auf das S/R (Chlorfenvinphos 64 mm, 1. Bande:  $0,01 \text{ ng mm}^{-2}$ , 2. Bande:  $0,03 \text{ ng mm}^{-2}$ ).

### Übersicht der Ergebnisse der Versuche und Überprüfung des linearen Modells

In Tabelle 8-7 sind nochmals alle Versuchsergebnisse zusammenfassend mit Gesamtmittelwert und Standardabweichung aller Versuche dargestellt. Rot markiert sind die Versuche 3 und 13, welche mit den jeweiligen eingestellten Parameter die besten Ergebnisse bzgl. der Flächenvergrößerung bzw. dem S/R ergeben. Zusätzlich sind hier nochmals die berechneten Effekte der Parameter auf die entsprechende Zielgröße aufgezeigt, sowie der Effekt der Zweifachkombination der untersuchten Parameter.

Tabelle 8-7: Übersicht der Ergebnisse aus den DOE-Versuchen.

Versuch	Einstellung der Parameter				Zielgrößen			
	x <sub>1</sub> Substratmenge [µg/mm <sup>2</sup> ]	x <sub>2</sub> Umsatzzeit [min]	x <sub>3</sub> Inkubationszeit [min]	x <sub>4</sub> Enzymaktivität [U/mL]	Fläche [Pixel]	Breite [Pixel]	Höhe [Pixel]	S/R
1	0,012	1	5	2,50	3886	58	67	6,0
2	0,059	1	5	2,50	7031	89	79	4,5
3	0,012	5	5	2,50	2703	51	53	0,9
4	0,059	5	5	2,50	7380	90	82	2,7
5	0,012	1	20	2,50	5824	64	91	15,8
6	0,059	1	20	2,50	12584	104	121	4,6
7	0,012	5	20	2,50	6900	69	100	8
8	0,059	5	20	2,50	6624	69	96	5
9	0,012	1	5	1,25	4347	63	69	5
10	0,059	1	5	1,25	7140	84	85	10
11	0,012	5	5	1,25	3752	56	67	4
12	0,059	5	5	1,25	7040	80	88	7
13	0,012	1	20	1,25	10080	90	112	31
14	0,059	1	20	1,25	7520	80	94	16
15	0,012	5	20	1,25	7630	70	109	20
16	0,059	5	20	1,25	8428	86	98	10
<b>Mittelwert</b>					<b>6804</b>	<b>75</b>	<b>88</b>	<b>9</b>
<b>Standardabweichung</b>					<b>2374</b>	<b>14</b>	<b>18</b>	<b>8</b>
<b>Effekt der Parameter</b>	x <sub>1</sub>				2328	20	9	-4
	x <sub>2</sub>				-994	-8	-3	-4
	x <sub>3</sub>				2789	8	29	9
	x <sub>4</sub>				-376	-2	-4	-7
	x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>				-206	0	-1	2
	x <sub>1</sub> x <sub>3</sub>				-1148	-9	-10	-6
	x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>				-612	-3	-1	-2
	x <sub>1</sub> x <sub>4</sub>				1248	7	7	1
x <sub>2</sub> x <sub>4</sub>				-435	-1	-4	1	
x <sub>3</sub> x <sub>4</sub>				-56	-3	3	-4	

Zum Abschluss wurde überprüft, ob das aufgestellte lineare Modell die Einflüsse der Parameter auf die Zielgrößen ausreichend beschreibt. Für den dafür notwendigen Bestätigungsversuch wurden mit Ausnahme der Acetylcholinesterase die Einstellungen der Parameter so gewählt, dass sie zwischen den Stufen aus dem vollfaktoriellen Versuchsplan lagen (Tabelle 8-8). Um keine neue Enzymlösung zu verbrauchen, wurde der Parameter „Aktivität AChE“ in der Einstellung der 1. Stufe gewählt.

<b>Tabelle 8-8: Parametereinstellungen für den Bestätigungsversuch.</b>			
<b>Einflussgröße</b>	<b>1. Stufe (-1)</b>	<b>Bestätigungsversuch</b>	<b>2. Stufe (+1)</b>
Substratmenge [µg/mm <sup>2</sup> ]	0,012	0,030	0,059
Umsatzzeit Substrat [min]	1	3	5
Inkubationszeit [min]	5	10	20
Aktivität AChE [U/mL]	1,25	1,25	2,5

Besteht ein linearer Zusammenhang zwischen den Einflussgrößen können die Werte des Bestätigungsexperiments mithilfe der linearen Regression (Gleichung 8-1) vorhergesagt

werden. Bei der Berechnung der Werte für den Bestätigungsversuch wurden nur zweifach Wechselwirkungen berücksichtigt. Die berechneten Werte und Versuchsergebnisse für die Zielgrößen aus dem Bestätigungsversuch sind in Tabelle 8-9 gegenübergestellt.

**Tabelle 8-9: Werte zur Überprüfung des linearen Modells mittels eines Bestätigungsversuchs. Beide Zielgrößen beziehen sich auf die Chlorfenvinphos-Auftragung auf eine Fläche von 64 mm<sup>2</sup>. Die Größe des Fläche wurde für die Flächenmasse von 0,13 ng\*mm<sup>-2</sup> Chlorfenvinphos ermittelt. Die Auswertung des S/R erfolgte bei einer Flächenmasse von 0,03 ng\*mm<sup>-2</sup>.**

	Fläche [Pixel]	S/R*
<b>Mittelwert über alle Versuche</b>	6804	9
<b>Standardabweichung</b>	2374	8
<b>Berechneter Wert für den Bestätigungsversuch</b>	6992	13
<b>Ergebnis Bestätigungsversuch</b>	5775	7,7

### 8.2.5 Optimierung des HPTLC-AChE-Hemmtests

Das Ergebnis des Bestätigungsversuches (Tabelle 8-9) weist darauf hin, dass das angenommene lineare Modell die Einflüsse der Parameter auf die Zielgrößen ausreichend beschreibt. Im Fall der Zielgröße „Flächenvergrößerung“ näherten sich die erhaltenen Werte aus dem Versuch 3 dem Optimum (Tabelle 8-7) an, daher wurde auf einen aufbauenden Optimierungsversuchsplan verzichtet und mit wenigen aufbauende Experimenten die Einstellung der Parameter optimiert. Die ermittelten optimierten Parameter für die Einflussfaktoren sind in Tabelle 8-10 zusammengestellt.

**Tabelle 8-10: Optimierte Parameterwerte für den AChE-Hemmtest.**

Parameter	Parameterwert
Substratmenge [µg/mm <sup>2</sup> ]	0,030
Umsatz Substrat [min]	5
Inkubationszeit [min]	5
Aktivität AChE [U/mL]	2,5

Abb. 8-22 vergleicht die Startbedingungen mit den optimierten Parametern. Es ist eine deutliche Verringerung der Bandenverbreiterung zu erkennen. So sind bei der verbesserten Detektion selbst die auftragsbedingten feinen Linien zu erkennen (rote Pfeile Abb. 8-22). Die Bandenbreite (gemessen anhand der Basislinie) in y-Richtung konnte von 110 Pixeln auf 55 Pixel reduziert werden. Damit ist die ursprüngliche Bandenbreite nach der Auftragung von 50 Pixeln fast erhalten geblieben.

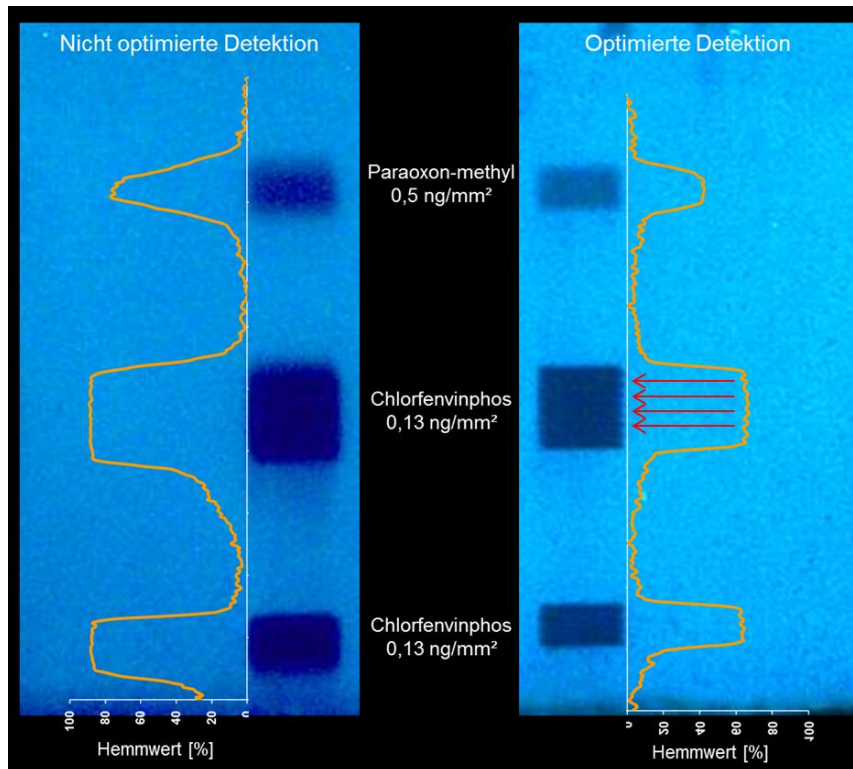


Abb. 8-22: Vergleich der ursprünglichen (links) mit der optimierten (rechts) Detektion. Mit der optimierten Detektion wird die Bandenverbreiterung nahezu eliminiert.

Mit der optimierten Methode lassen sich Dosis-Wirkungsbeziehungen von Substanzen auf die AChE ermitteln und miteinander vergleichen. Für den Vergleich der beiden Insektiziden Chlorfenvinphos und Paraoxon-methyl wurden beide Substanzen als Konzentrationsreihen auf Flächen von 25 mm<sup>2</sup> aufgetragen. In Abb. 8-23 sind beide Dosis-Wirkungsbeziehungen dargestellt. Beiden Beziehungen verlaufen parallel zueinander. Doch muss von Paraoxon-methyl ein Faktor 10 mehr aufgetragen werden um eine Hemmung zu sehen.

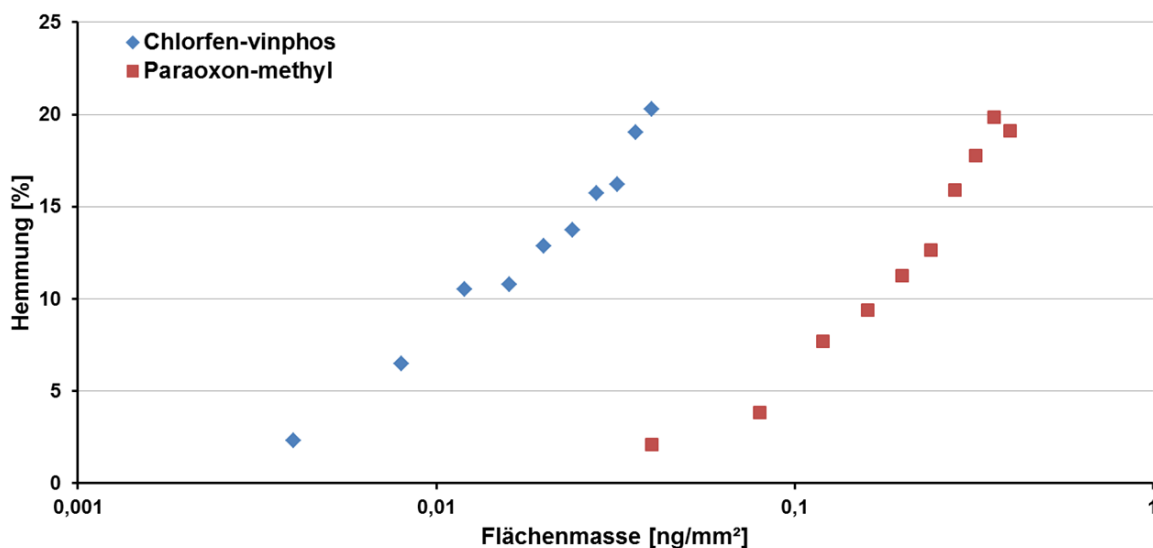


Abb. 8-23: Dosis-Wirkungsbeziehungen von Chlorfenvinphos und Paraoxon-methyl beim HPTLC-AChE-Test.

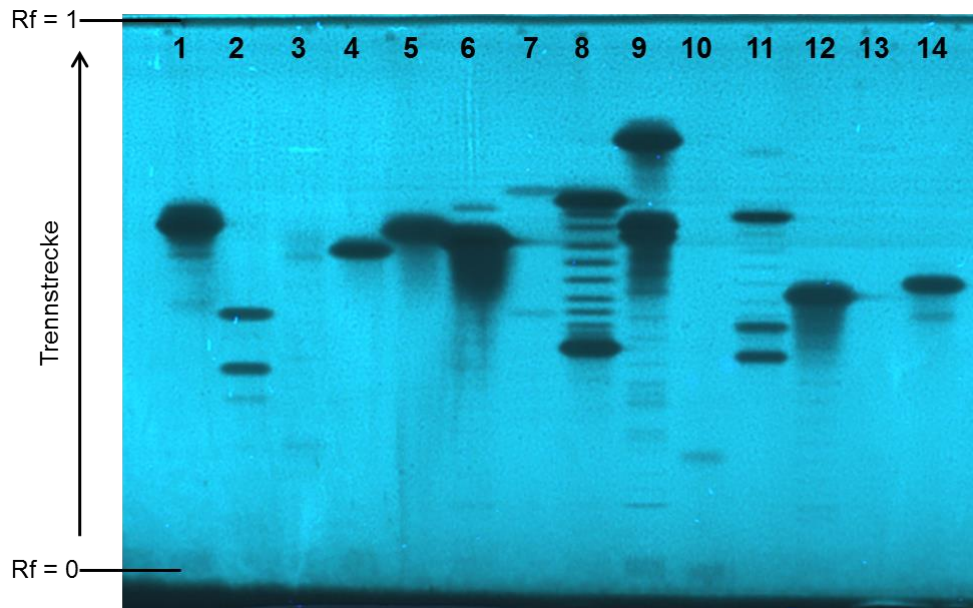
### 8.2.6 Austausch der Acetylcholinesterase

Für weitere Versuche wurde Acetylcholinesterase vom Zitteraal verwendet, da Acetylcholinesterase aus Pferdeserum aus unbekanntem Gründen seit 2012 nicht mehr erhältlich ist. Es zeigte sich, dass die Zitteraal-Acetylcholinesterase das Indoxylacetat-Substrat auf der HPTLC-Platte nicht mehr umsetzen konnte. Zur Ursachenermittlung wurden Versuche in Küvetten mit Zitteraal-AChE und den Substraten 1-Naphtylacetat und Indoxylacetat durchgeführt. Durch Senkung des Dimethylsulfoxid-Anteils beim Küvettentest konnte jeweils eine Reaktion erreicht werden. Dimethylsulfoxid ist als Lösungsmittel für das Substrat erforderlich. In einer Versuchsreihe wurde das Indoxylacetat-Dimethylsulfoxid-Verhältnis so eingestellt, dass möglichst viel Indoxylacetat in Lösung gebracht werden kann, ohne die Zitteraal-Acetylcholinesterase auf der HPTLC-Platte zu stark zu hemmen.

### 8.2.7 Untersuchung von Referenzsubstanzen

Zur Ermittlung der R<sub>f</sub>-Werte von bekannten AChE-Inhibitoren wurden verschiedene Insektizide (Organophosphate und Carbamate) untersucht. Dabei wurde widererwartend festgestellt, dass für die Referenzsubstanzen in vielen Fällen für eine „Reinsubstanz“ mehrere Hemmzonen detektiert werden können (Abb. 8-24). Die Messung der UV-Absorption zeigte keine zusätzlich Banden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Referenzmaterialien nur geringfügig verunreinigt sind. Doch besitzen die Substanzen eine stark hemmende Wirkung auf die AChE. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten Akkad und Schwack mit einem HPTLC-Multi-Enzymtest, bestehend aus verschiedenen Esterasen und Cutinasen [70].

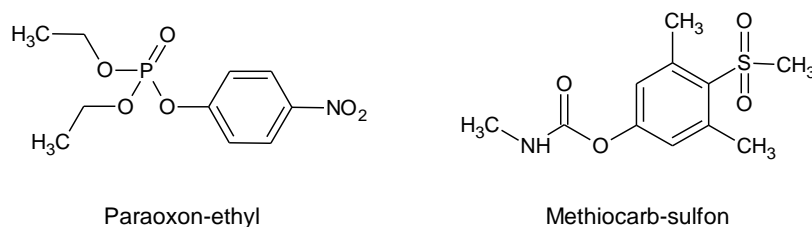
Diese zusätzlichen Hemmbanden konnten nur aufgrund der vor dem Test durchgeführten Trennung erkannt werden. Da es sich wahrscheinlich um sehr geringe Verunreinigungen handelt, konnte den zusätzlichen Hemmbanden bisher keine Struktur zugeordnet werden. Da aber zu erwarten ist, dass die Verunreinigung in technischen Produkten ebenso auftreten, sollte in zukünftigen Forschungsvorhaben deren Struktur aufgeklärt, toxikologisch weitergehend untersucht und ihr Vorkommen in der aquatischen Umwelt geprüft werden. Zudem sollte aufgrund dieses Ergebnisses, die Reinheit von Referenzmaterialien vor dem Einsatz für *in vivo* Studien anhand der Wirkung nach HPTLC-Trennung überprüft werden.



**Abb. 8-24:** Untersuchung der Reinheit von Referenzsubstanzen (0,4 µg auf der Platte) mit dem TLC-AChE-Hemmtest (1: Chlorfenvinphos, 2: Phosphamidon, 3: Fenthion, 4: Paraoxon-methyl, 5: Dichlorphos, 6: Paraoxon-ethyl, 7: Azinphos-methyl, 8: Triazophos, 9: Phoxim, 10: Methamidophos, 11: Piperophos, 12: Azamethiphos, 13: Esfenvalerat, 14: Mephinphos).

### 8.2.8 Wiederholbarkeit innerhalb einer HPTLC-Platte

Für die Ermittlung der Wiederholbarkeit innerhalb einer HPTLC-Platte wurde Acetylcholinesterase (AChE) aus dem Zitteraal und die angepasste Substrat-Lösung (Indoxylacetat mit Dimethylsulfoxid) verwendet. Hierbei wurden, zwei verschiedene Typen von AChE-Inhibitoren zu verwenden. Zum einen Paraoxon-ethyl, ein irreversibler Inhibitor und zum anderen Methiocarb-sulfon, ein reversibler Inhibitor ausgewählt (siehe Abb. 8-25). Paraoxon-ethyl ist der aktive Metabolit von Parathion, ein Thiophosphorsäureester. Methiocarb-sulfon ist ein am Schwefel oxidiertes Metabolit von Methiocarb, ein Insektizid und Akarizid.



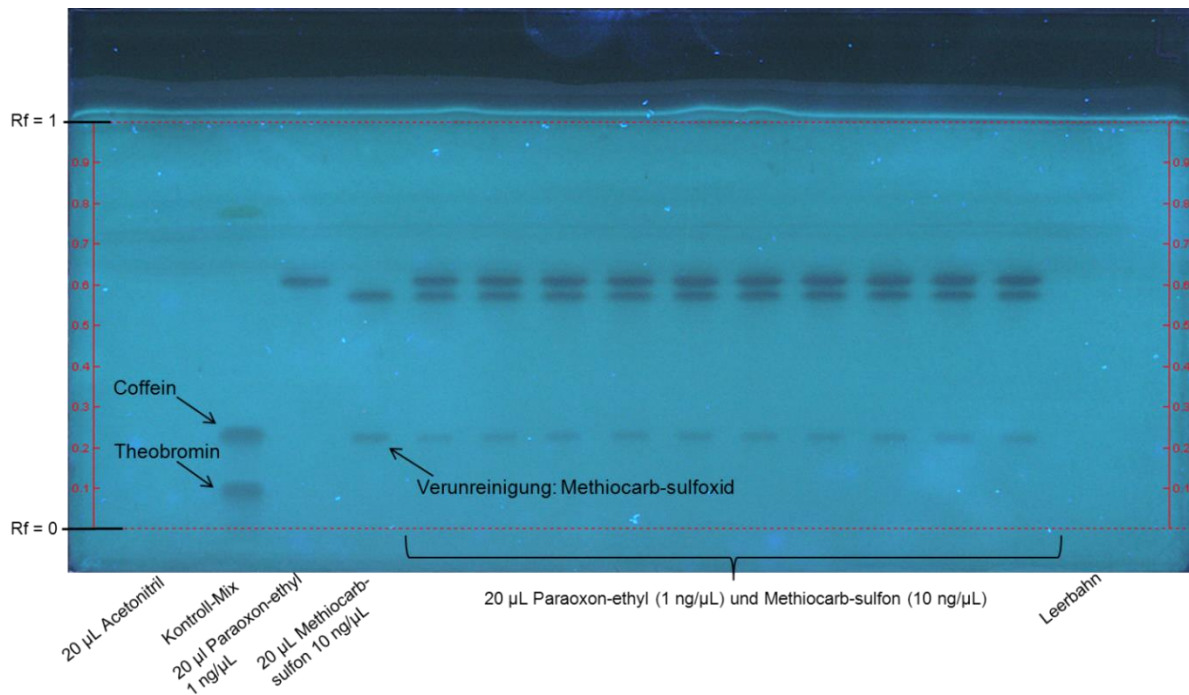
**Abb. 8-25:** Strukturen von Paraoxon-ethyl (Phosphorsäureester) und Methiocarb-sulfon (Carbamat).

Zur Überprüfung der Gleichmäßigkeit der AChE-Hemmung über eine Platte wurde zehnmal eine Acetonitril-Lösung mit Paraoxon-ethyl (1 ng/µL) und Methiocarb-sulfon (10 ng/µL) aufgetragen. Die beiden Substanzen wurden zum Rf-Wert-Vergleich einzeln aufgetragen. Ergän-



zend wurde Acetonitril und ein Chromatographie-Kontroll-Mix aufgetragen. Entwickelt wurde die HPTLC-Platte mittels AMD-Gradienten 8.

In Abb. 8-26 sind die Hemmbanden vor dem fluoreszierenden Hintergrund zu sehen. Neben der Hemmung durch die beiden eingesetzten Substanzen ist bei einem Rf-Wert von 0,22 eine Verunreinigung von Methiocarb-sulfoxid zu sehen. Es handelt sich hierbei um Methiocarb-sulfoxid, eine Zwischenoxidationsstufe von Methiocarb zu Methiocarb-sulfon. Außerdem sind die Banden von Coffein und Theobromin aus dem Kontroll-Mix zu erkennen. Beide Stoffe sind als AChE-Inhibitoren bekannt [273].



**Abb. 8-26: Wiederholpräzision der AChE-Hemmung über eine entwickelte HPTLC-Platte mittels Paraoxon-ethyl und Methiocarb-sulfon.**

Für Paraoxon-ethyl wurde ein mittlerer Hemmwert von  $28 \% \pm 2 \%$  ( $\pm 2 \times$  Standardabweichung) bestimmt (Abb. 8-27). Es lässt sich eine leichte Zunahme der Hemmung von der linken zur rechten Seite der Platte beobachten. Für Methiocarb-sulfon liegt der Mittelwert der AChE-Hemmung bei  $26 \% \pm 4 \%$ . Auch für diese Substanz ist eine leichte Zunahme von der linken zur rechten Plattenposition feststellbar. Trotzdem zeigen diese Ergebnisse für einen Enzymtest auf der HPTLC-Platte eine gute Wiederholbarkeit. Die Ursachen für den leichten Trend innerhalb der HPTLC-Platte sind bisher unbekannt. Als Kontrollsubstanzen könnte ebenso Coffein und Theobromin herangezogen werden. Die Ermittlung der Reproduzierbarkeit wird in Kapitel 10.2.3 bei der Anwendung der optimierten Tests über einen längeren Zeitraum auf verschiedene Wässer gezeigt.



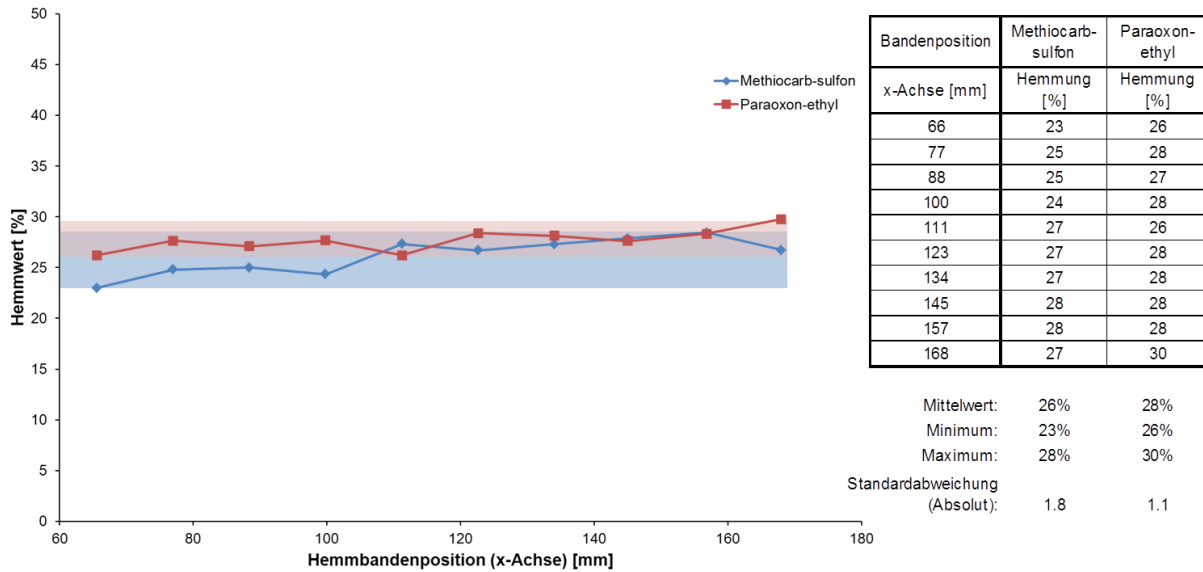
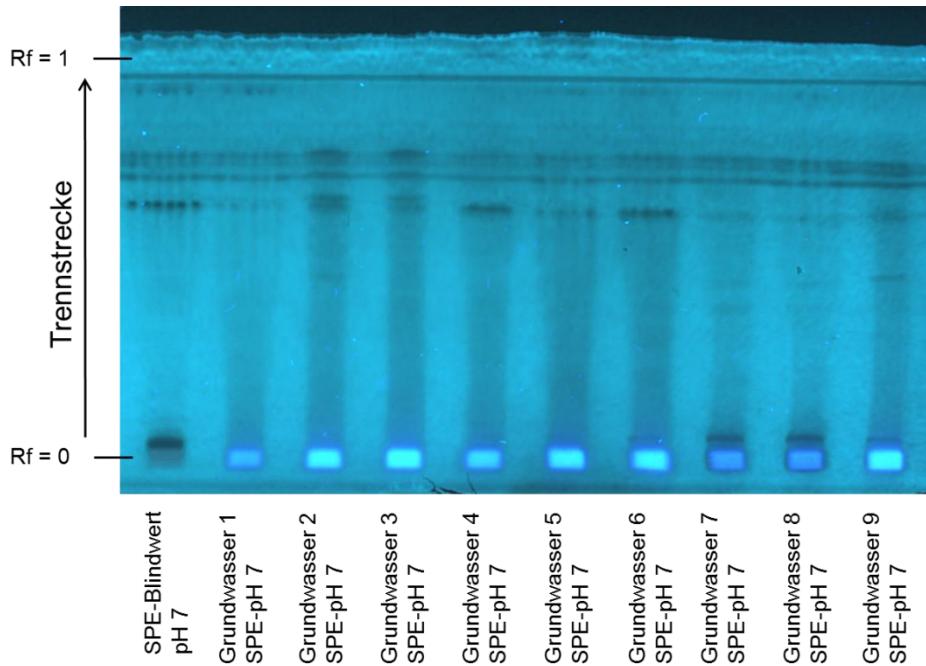


Abb. 8-27: Stabilität der AChE-Hemmwerte innerhalb der HPTLC-Platte aus Abb. 8-26.

### 8.2.9 Anwendung auf Wasserproben

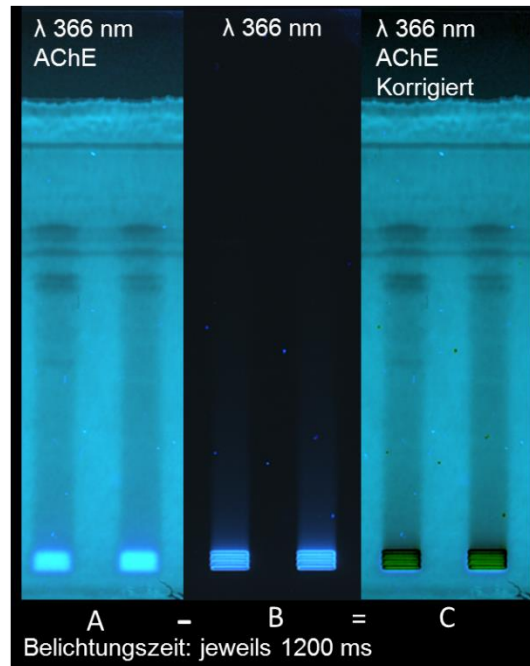
Zur Ermittlung der Anwendbarkeit wurden mit dem optimierten HPTLC-AChE-Hemmtest Grundwässer und Deponiesickerwasserproben untersucht.

Die als gering belastet geltenden Grundwässer wurden mittels SPE (ENV+, Isolute) um den Faktor 5000 angereichert und je 80 µL des Extraktes auf die HPTLC-Platte aufgetragen und entwickelt (Gradient 8). Bei der AChE-Detektion (Abb. 8-28) zeigen sich einige Hemmbanden. In den Grundwässern 7 - 9 ist eine fast nicht mobile Hemmbande nahe  $R_f = 0$  zu erkennen. Diese Hemmbande ist auch im Blindwert zu sehen. Mögliche Kontaminationsquellen sind SPE-Kartuschen, das verwendete Reinstwasser (aus einer Typ 1 Reinstwasseranlage nach ASTM D1193-91 [128]) oder die bei der Probenahme verwendeten Materialien. Weitere Hemmbanden befinden sich im oberen Drittel der Laufstrecke. Auch hier zeigt der Blindwert einige Hemmbanden. Die Proben von Grundwasser 2 und 9 zeigen jeweils im mittleren  $R_f$ -Bereich eine Hemmbande, die nicht in der Blindprobe vorkommt. Um welche Substanz es sich hier handelt, konnte bisher noch nicht geklärt werden.



**Abb. 8-28: Anwendung des AChE-Hemmtests nach HPTLC-Trennung zur Untersuchung von Grundwässern (Anreicherungsfaktor 5000).**

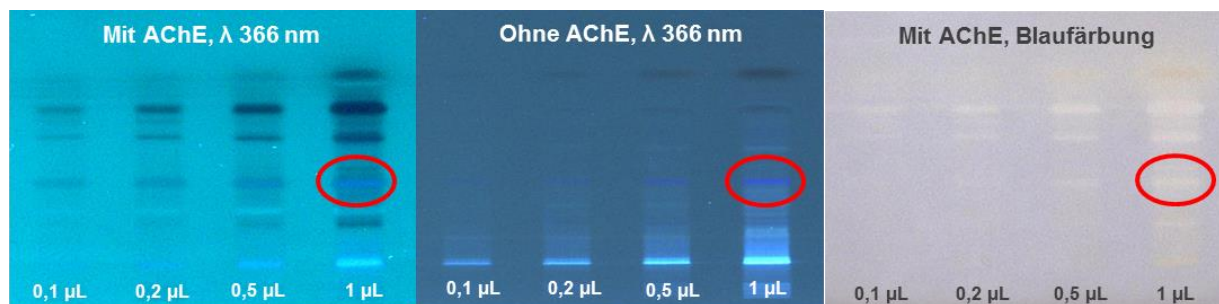
Des Weiteren ist auf der Auftragfläche teilweise eine starke Fluoreszenz zu erkennen. Es ist dabei nicht auszuschließen, dass die Eigenfluoreszenz von Substanzen eine mögliche Hemmung überlagert. Zur deren Eliminierung wurde vor Beginn der AChE-Detektion ein Bild der entwickelten HPTLC-Platte bei  $\lambda$  366 nm mit einer Belichtungszeit von 1,2 s aufgenommen (Abb. 8-29, B). Für die Detektion der AChE-Hemmer wurde die gleiche Belichtungszeit verwendet (Abb. 8-29, A). Danach wurde Bild B von Bild A subtrahiert. Das Resultat ist in Abb. 8-29 links (C) zu sehen. Zwar konnte die Eigenfluoreszenz reduziert werden, aber durch leichte Diffusionsunterschiede der Banden sind die Bilder nicht ganz deckungsgleich. Infolge der an dieser Stelle etwas stärkeren Fluoreszenz in Bild B erscheinen auf der Startfläche feine schwarze Striche. Diese Striche dürfen nicht als Hemmbanden fehlinterpretiert werden. Daher wird die Anwendung der Bildkorrektur als ungeeignet eingestuft und nicht weiterverwendet.



**Abb. 8-29:** Korrektur der Eigenfluoreszenz von Substanzen (Bild B) beim AChE-Hemmtest (Bild A) durch Subtraktion von Bild B von Bild A (A-B). Bild A zeigt eine gleichmäßige Fluoreszenz im Bereich der Auftragsfläche. In Bild B sind feine Linien im Bereich der Auftragsfläche zu erkennen (unterschiedliche Bandenverbreiterung). Die feinen Linien übertragen sich bei der Korrektur auf Bild C (A-B=C). Diese Linien können als falsch-positives Ergebnisse interpretiert werden.

Das SPE-Extrakt von einem Sondermülldeponiesickerwasser wurde bei unterschiedlichen Auftragsvolumina nach der HPTLC/AMD-Trennung untersucht. In **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** ist links die AChE-Hemmungen unter UV-Licht bei  $\lambda$  366 nm als dunkle Banden vor dem bläulich fluoreszierenden Hintergrund zu sehen. Doch ist in dieser Probe eine fluoreszierende Bande zu sehen, welche die Detektion von AChE-hemmenden Substanzen erschwert. Diese Banden sind sowohl bei der Wellenlänge  $\lambda$  366 nm bei der postchromatographischen Behandlung mit AChE als auch ohne Acetylcholinesterase zu erkennen (Abb. 8-30). Die rot umrandete Bande Abb. 8-30 rechts zeigt sowohl eine Hemmung, besonders bei niedrigeren Auftragsvolumina, als auch Fluoreszenz. Durch diese Eigenfluoreszenz von Substanzen sind mögliche dunkle Hemmbanden nicht mehr eindeutig zu erkennen. Daher wurde folgende alternative Vorgehensweise gewählt. Das gebildete Indoxyl bzw. Indigoweiß reagiert, nachdem die zugesetzte Ascorbinsäure verbraucht wurde, zum blauen Indigo weiter (Abb. 8-11). Die Detektion über die Blaufärbung (Indigo) (Abb. 8-30, rechts) eliminiert die Störung durch die Eigenfluoreszenz. Bei der Detektion mit Blaufärbung stellen weiße Banden eine AChE-Hemmung dar. Zu beachten ist, dass die hellblaue Hintergrundfärbung bei  $\lambda$  366 nm der HPTLC-Platte nach der Behandlung mit Acetylcholinesterase durch das fluoreszierende Indoxyl und Indigoweiß verursacht wird. Da die Blaufärbung auch mit der Bestimmung der Absorption bei  $\lambda = 670$  nm nicht die gleiche

Nachweisgrenze erreicht wie die Fluoreszenzdetektion (Abb. 8-30), ist diese ergänzende Auswertemethode nur bei Eigenfluoreszenz-Problemen sinnvoll.



**Abb. 8-30:** Das linke Bild zeigt die Detektion der AChE-Hemmbanden bei einem fluoreszierenden Hintergrund in der Mitte ist die Detektion der Probe ohne Acetylcholinesterase (AChE) bei  $\lambda$  366 nm gezeigt und rechts die AChE-Hemmung bei einem blaufärbten Hintergrund. Während die Hemmung vor einem fluoreszierenden Hintergrund eine bessere Nachweisgrenze zeigt, wird die Detektion mit der Blaufärbung nicht durch Eigenfluoreszenz gestört.

### 8.2.10 Zusammenfassung

Mit Indoxylacetat wurde ein Substrat gefunden, mit welchem sich anhand von dunklen Banden vor einem fluoreszierenden Hintergrund sehr empfindlich Acetylcholinesterase hemmende Substanzen nachweisen lassen. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch Aufsprühen des Substrates sich die Kieselgelschicht nicht mehr von dem Trägermaterial löst. Des Weiteren fällt dabei die Bandenverbreiterung deutlich geringer aus als beim Tauchen der Platte in das Substrat. Unterstützt durch statistische Versuchsplanung wurde der Test soweit optimiert, dass die gute chromatographische Auflösung zwischen den Banden erhalten bleibt. Dies erlaubt eine weitaus bessere Differenzierung der Hemmung innerhalb einer Probe verglichen mit denen, die in der Literatur beschrieben sind. Die Optimierung des Verfahrens erfolgte mit Acetylcholinesterase aus Pferdeserum. Dieses Enzym ist aus unbekanntem Gründen nicht mehr kommerziell erhältlich. Als Ersatz wurde Acetylcholinesterase aus dem Zitteraal ausgewählt. Durch Anpassungen der Substrat-Lösung konnte die Zitteraal-Acetylcholinesterase auf das optimierte Verfahren übertragen werden. Sollten fluoreszierende Substanzen die empfindliche Auswertung verhindern, lässt sich durch eine Detektion des sich bildenden blauen Indigos eine Hemmung der Acetylcholinesterase zumindest qualitativ nachweisen. Die Wiederholbarkeitsversuche zeigten für ein biologisches Testsystem, kombiniert mit einer Trennmethode, eine geringe Standardabweichung.

## 9 HPTLC-umu-Test

### 9.1 Grundlagen zum umu-Test

#### 9.1.1 Gentoxizität und Fremdstoffmetabolismus

Gentoxizität ist die Fähigkeit, schädliche Änderungen im genetischen Material hervorzurufen. Dies kann durch Substanzen oder durch Strahlung verursacht werden. Die Änderungen sind nicht zwingend mutagen oder kanzerogen und sind größtenteils durch DNA-Reparatursysteme wiederherstellbar [274, 275]. Bei schweren DNA-Schäden erfolgt die Reparatur in Prokaryoten durch die sogenannte SOS-Antwort [276]. In Eukaryoten erfolgt diese Reparatur über ein entsprechendes System, welches über das Protein p53 reguliert wird [277-279]. Sind die Schäden irreparabel, spricht man von Mutagenität. Ist dies der Fall haben gentoxische Verbindungen das Potential, als Konsequenz der Wirkungskette, Krebs oder Veränderungen im Erbgut auszulösen [280].

Substanzen können direkt oder indirekt gentoxisch wirken. Bei indirekt gentoxischen Substanzen sind erst die beim Fremdstoffmetabolismus entstehenden Produkte wirksam. Der Fremdstoffmetabolismus ist notwendig damit ein höherer Organismus lipophile Fremdstoffe durch sogenannte Phase-I- oder Phase-II-Prozesse ausscheiden kann und nicht akkumuliert. So entsteht aus dem Polycyclisch Aromatischen Kohlenwasserstoff (PAK) Benz[a]pyren über mehrere Phase-I-Reaktionen der an die DNA-bindende Metabolit 7,8-Dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydro-benz[a]pyren. Dieser Metabolit ist mutagen und kanzerogen [281].

Die gentoxische Wirkung von Substanzen wird mit verschiedenen Tests erfasst. Drei verbreitete Tests sind der Ames-Test, der umu-Test und der Comet-Assay. Der Ames-Test dient der Erfassung von mutagener Wirkung von Substanzen. Als Testorganismus dient das gentechnisch veränderte Bakterium *Salmonella typhimurium*, welches Histidin nicht synthetisieren kann (*his*<sup>-</sup>-Mutant) und sich daher nur auf histidinhaltigen Nährboden vermehrt. Im Test wird das Bakterium auf einem Histidin-Mangelnährboden aufgetragen. Wenn eine Substanz mutagene Wirkung hat, erfolgt eine Rückmutation zum *his*<sup>+</sup>-Mutant und es kann sich auch auf Mangelnährböden vermehren [282]. Auf den umu-Test wird in Kapitel 9.1.2 näher eingegangen. Beim Comet-Assay wird die Schädigung der DNA durch Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche in Zellen durch Elektrophorese erfasst. Nachdem die Zellen einer gentoxischen Substanz ausgesetzt waren, werden diese auf ein Agarosebett gebracht und lysiert. Bei der anschließenden Elektrophorese wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente zur Kathode und werden dabei nach ihrer Größe getrennt. Aufgrund ihrer Größe bleibt die unbeschädigte DNA am Auftragepunkt zurück. Durch anschließendes Anfärben der DNA-Bruchstücke

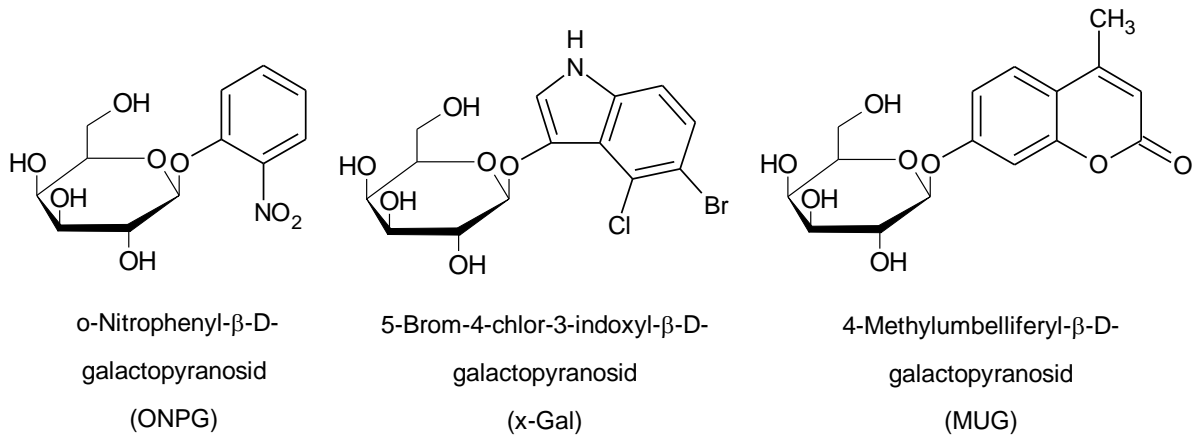
mit einem Fluoreszenzfarbstoff, erscheinen diese als fluoreszierender Schweif vom Startpunkt aus [283, 284].

### 9.1.2 Prinzip des umu-Tests

Mit dem umu-Test wird das genotoxische Potenzial von Substanzen auf Prokaryoten bestimmt. Dies wird indirekt über die Aktivität des Reparaturgens umuC gemessen, das Bestandteil des Reparatursystems (SOS-Antwort) dieser Zellen ist.

Die SOS-Antwort ist eine bakterienspezifische Reaktion auf DNA-Schäden, welche besonders gut an *Escherichia coli* untersucht wurde [285-287]. Unter normalen Bedingungen wird durch das LexA-Protein, welches an den entsprechenden Promotorstellen der DNA gebunden ist, die Transkription der SOS-Gene verhindert. Wenn aufgrund eines DNA-Schadens eine einzelsträngige DNA auftritt, binden sich an diesen Einzelstrang RecA-Proteine, von denen immer einige in den Bakterienzellen vorhanden sind. Der RecA-DNA-Komplex funktioniert als Co-Protease und spaltet die LexA-Proteine. Durch diesen Vorgang wird die Transkription der SOS-Gene gestartet. Neben anderen am Reparaturmechanismus beteiligten Proteinen, wird dabei die Transkription der Gene für die Proteine UmuC und UmuD induziert [288, 287]. Aus dem UmuD-Protein wird mithilfe des RecA, das aktive UmuD'-Protein gebildet. Aus zwei UmuD'- und einem UmuC-Protein entsteht die DNA-Polymerase V, welche die Replikation der DNA über den Schaden hinweg fortsetzt [288, 287]. Wobei diese Kopie der DNA fehlerbehaftet ist [289]. LexA reguliert die Transkription seines Gens und die von RecA. Sobald der Schaden an der DNA behoben ist, sinkt die Konzentration von RecA und die von LexA steigt wieder in der Zelle an und das System befindet sich wieder im Anfangszustand [288].

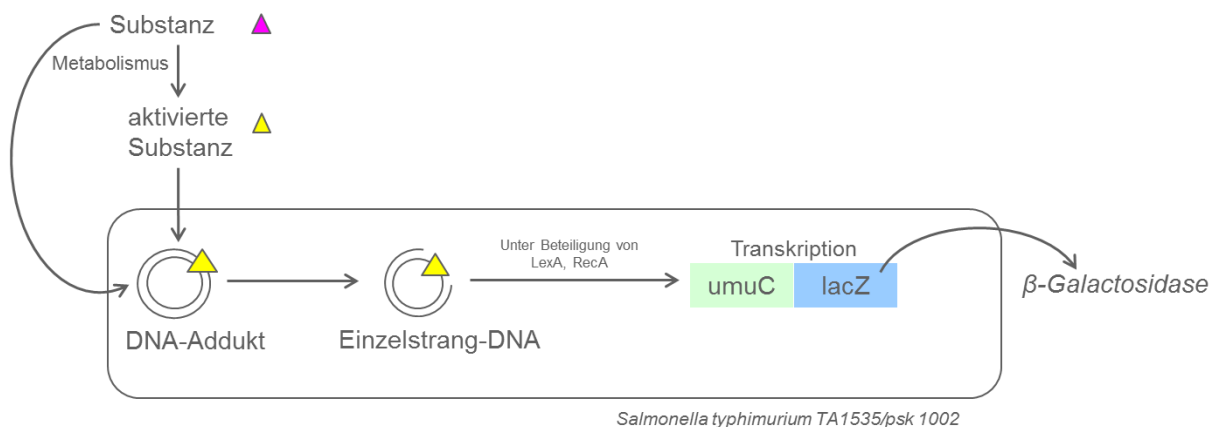
Das Bakterium *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002, welches beim umuC-Test verwendet wird, trägt kein chromosomales lacZ-Gen. Dieses Gen trägt der Testorganismus auf dem Plasmid pSK1002. Dort ist es mit dem umuC-Gen gekoppelt und damit unter der Kontrolle des umuDC-Promoters. Das lacZ-Gen ist für die Expression von  $\beta$ -Galactosidase verantwortlich. Sobald eine genotoxische Verbindung die SOS-Antwort induziert, wird neben der DNA-Polymerase V  $\beta$ -Galactosidase gebildet. Der Nachweis des Enzyms erfolgt durch die Spaltung des farblosen Substrates o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ONPG, Abb. 9-1) in Galactose und dem gelben o-Nitrophenol, welches anschließend photometrisch bestimmt wird. Alternative Substrate (Abb. 9-1) sind 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (x-Gal, Bildung eines blauen Farbstoffes) und 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (MUG, Bildung eines bei  $\lambda_{\text{ex.}} = 366 \text{ nm}$  blau fluoreszierenden Stoffes).



**Abb. 9-1: Strukturen verschiedener Substrate, die beim positiven Nachweis von gentoxischen Verbindungen im umu-Test von der β-Galactosidase gespalten werden.**

Zusätzlich ist der Testorganismus noch Exzisionsreparatur-defizienz (uvrB-Gen) und durch das eingeführte rfa-Gen wird die Zellwand für viele Substanzen durchgängiger gemacht. Außerdem trägt der Plasmid pSK1002 noch ein Gen für die Ampicillin-Resistenz [290].

Da sich die Transformationskompetenz von Zellen in einem Organismus bzw. zwischen den Lebewesen aus verschiedenen taxonomischen Gruppen stark unterscheidet, erfolgt die Nachstellung der Metabolisierungsprozesse oftmals *in vitro*. Zu beachten ist, dass die katalytische Aktivität im Metabolismus Speziesabhängig ist [291]. Um die Biotransformation von Xenobiotika in Säugetieren extern nachzustellen, wird der sogenannte S9-Mix von Ratten eingesetzt. Für die Cytochrom-P<sub>450</sub>-Induktion erhalten die Ratten gleichzeitig eine intraperitoneale Injektion von Phenobarbital und eine orale Applikation von β-Naphthoflavon. Nach Entfernung der Leber unter sterilen Bedingungen findet eine Homogenisierung statt. Dieses Homogenat wird für 10 min bei 9000 g zentrifugiert und abschließend erfolgt die Abnahme des Überstands [291]. Zur Prüfung, ob eine Probe nach externer metabolischer Aktivierung mit dem S9-Mix eine gentoxische Wirkung zeigt, wird die Probe den im S9-Mix enthaltenen Enzymen und den Cofaktoren Glucose-6-phosphat und NADP ausgesetzt. Zeigt eine Substanz nach der metabolischen Aktivierung Gentoxizität, wird diese durch die, auch in dem Reaktionsgefäß befindlichen Testbakterien anhand der Bildung von β-Galactosidase nachgewiesen (Abb. 9-2). Eine Grenze der *in vitro* Aktivierung mittels des S9-Mixes ist, wenn sehr polare Metabolite entstehen. Diese können nicht durch die Zellwand in das Bakterium gelangen [292].



**Abb. 9-2: Schema des Ablaufs des Nachweises von gentoxischen Substanzen über die SOS-Antwort im umuC-Test mittels *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 (verändert nach [293]).**

Der 1985 zunächst von Oda et al. [294] entwickelte umu-Test wurde 1991 von Reifferscheid et al. erstmalig mit Mikrottestplatten angewendet [295]. Später wurde der umu-Test für Wasseruntersuchungen genormt [4].

### 9.1.3 Nachweis Gentoxizität / Mutagenität auf der HPTLC-Platte

Bjørseth et al. [296] sowie Houk und Claxton [122] kombinierten bereits die Dünnschichtchromatographie und den Ames-Test. Sie trugen den beim Ames-Test verwendeten Agar und die Mikroorganismen (*Salmonella* TA100/TA98) direkt auf die entwickelte TLC-Platte auf. Nach einer 3-tägigen Inkubationszeit wurde die Anzahl an gebildeten Kolonien um die Substanzbande detektiert. Da sich die Kolonien nicht direkt auf der Substanzbande bilden, ist keine exakte Zuordnung der Mutagene gewährleistet. Neben diesem Nachteil beschreiben Houk und Claxton [122], dass damals aus chromatographischen Gründen nur eine geringe Probenmenge aufgetragen werden konnte. Dabei bleiben Mutagene in niedriger Konzentration unentdeckt. Einen ersten Vorschlag zum Übertrag des umu-Tests auf die HPTLC-Platte entwickelten Baumann et al. (2003) [3]. Weitere Arbeiten zur Kombination der HPTLC-Trennung mit dem umu-Test sind bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Die Arbeitsschritte zur Durchführung des umu-Tests mit der HPTLC-Platte nach [3] sind in Abb. 9-3 gezeigt. Die Mikroorganismen werden mit den chromatographierten Banden auf der HPTLC-Platte in Kontakt gebracht. Durch die potenziell gentoxischen Substanzen bilden die Bakterien nach einer bestimmten Inkubationszeit das Enzym β-Galactosidase. Das Enzym wird bei der Methode nach Baumann im Laufe des Versuchs von der HPTLC-Platte auf eine Schicht aus Kieselgel, Alginat und medizinischer Gaze (Mullverband) übertragen und dort nachgewiesen.



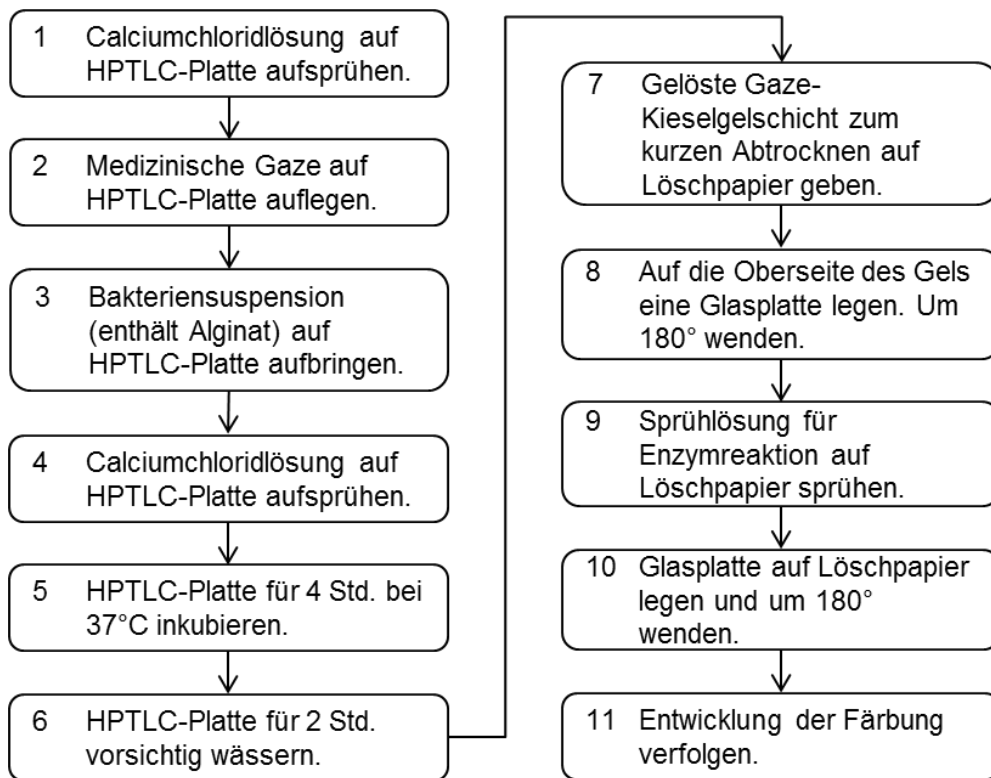


Abb. 9-3: Arbeitsschritte beim umu-Test nach Baumann et al. (2003) [3].

### 9.1.4 Ergebnisse und Diskussion

#### *Direkte gentoxische Wirkung*

Die Durchführung des umu-Tests erfolgte zunächst in Glasröhrchen bzw. später in 2 mL Reaktionsgefäßen anstelle der in der DIN 38415-3 [4] eingesetzten Mikrotiterplatten. Als bekannte potentiell gentoxische Testsubstanz wurde 4-Nitroquinolin-N-oxid (4-NQO, siehe Abb. 9-4, CAS Nr.: 56-57-5) und das Substrat o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactosid (ONPG, siehe Abb. 9-1, CAS Nr.: 369-07-3) verwendet.

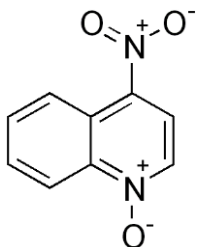
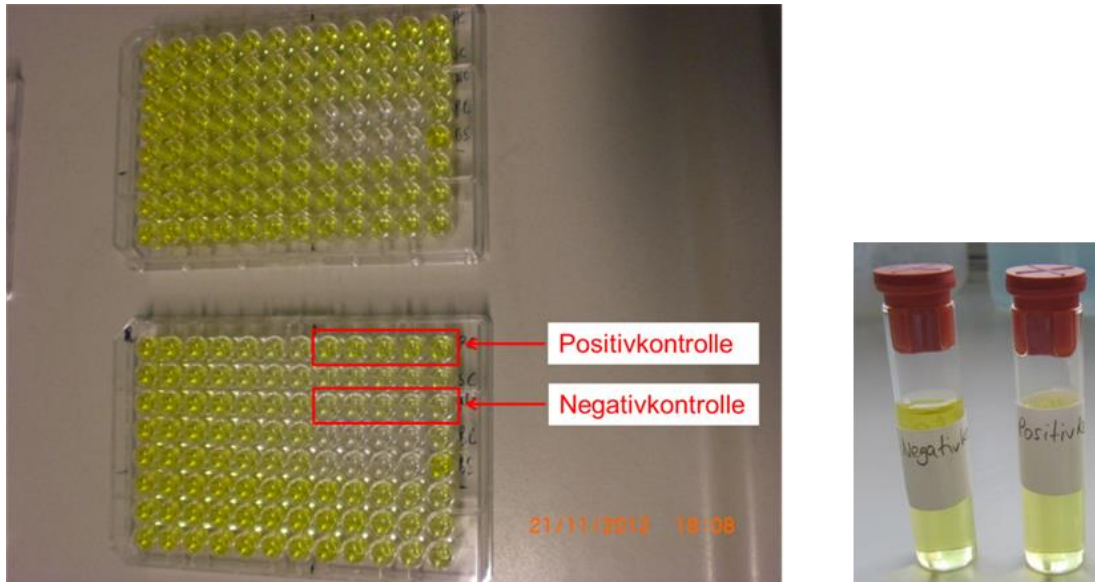


Abb. 9-4: 4-Nitroquinolin-N-oxid (4-NQO)

Die durchgeführten Versuche zeigten, dass die visuelle Unterscheidung der Positiv- und Negativkontrolle unter Verwendung des Substrates ONPG nicht ausreichend ist. Abb. 9-5 zeigt das Ergebnis des umu-Tests [4] mit dem Substrat ONPG in Mikrotiterplatten und in Glas-

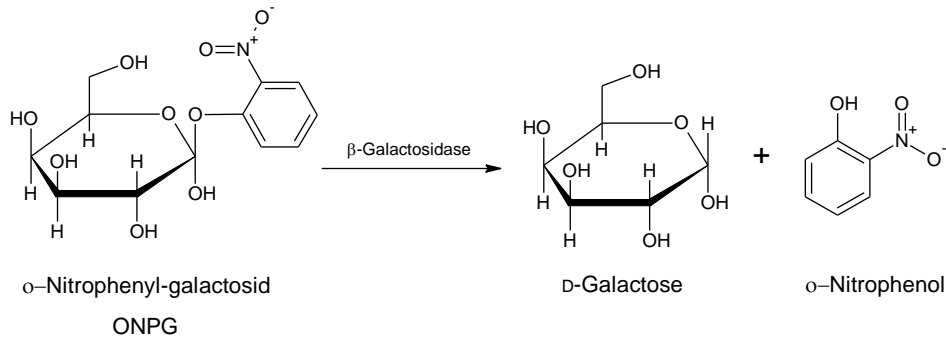
röhrchen. Zwischen der Positiv- und Negativkontrolle ist subjektiv lediglich ein geringer Unterschied in der Farbintensität zu erkennen, weshalb eine Detektion von gentoxischen Verbindungen nur durch Messung der Absorption bei 420 nm möglich ist. Zudem besitzen angereicherte Umweltproben oftmals gelb bis bräunlich gefärbte Probenbestandteile, welche mit dem gelben o-Nitrophenol (Produkt aus ONPG) interferieren.



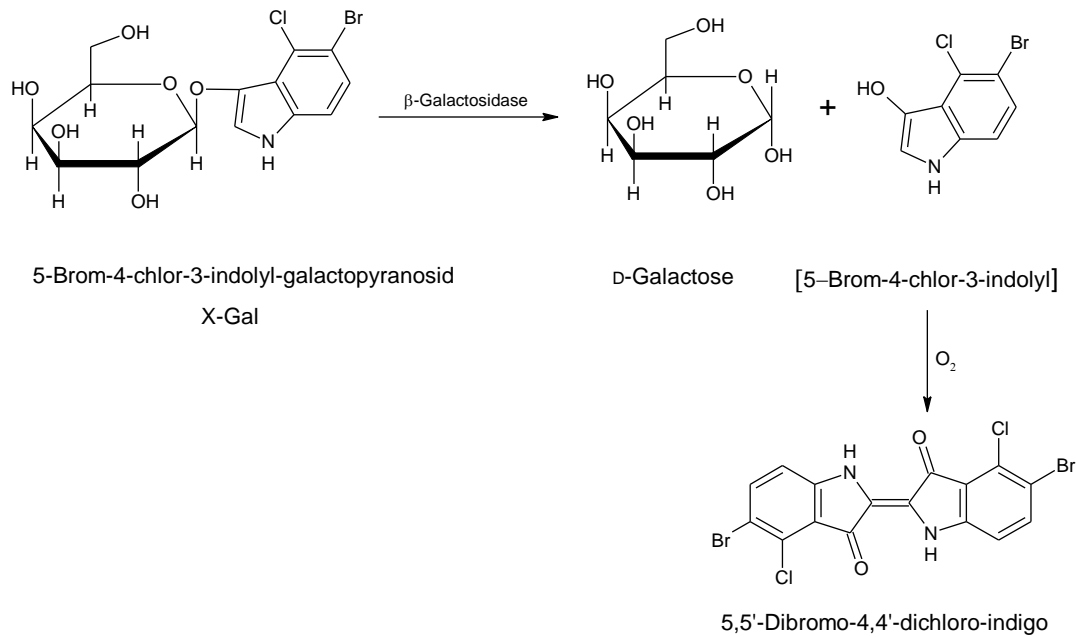
**Abb. 9-5:** Nachweis der  $\beta$ -Galactosidase durch o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactosid (ONPG). Die Positiv- und Negativkontrolle unterscheiden sich anhand der Farbintensität. Links das Ergebnis des umu-Tests in Mikrotiterplatten (nach DIN 38415-3 [4], durchgeführt in der AG Prof. Kümmerer, Universität Lüneburg). Rechts das Ergebnis des an DIN 38415-3 angepassten Tests in Glasröhrchen.

Neben ONPG spaltet die  $\beta$ -Galactosidase auch das Substrat X-Gal. Während bei der Spaltung von ONPG das gelbe o-Nitrophenol entsteht, bildet sich bei der Spaltung von X-Gal ein instabiles Zwischenprodukt, das mit Sauerstoff zu einem blauen Carbonylfarbstoff (5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo) reagiert (siehe Abb. 9-6). MUG eignet sich nicht als Substrat, da das Reaktionsprodukt MU bei derselben Anregungswellenlänge wie der Stoffe der medizinischer Gaze fluoresziert. Daher wird für die weiteren Versuche zum HPTLC-umu-Test mit X-Gal durchgeführt.

A)

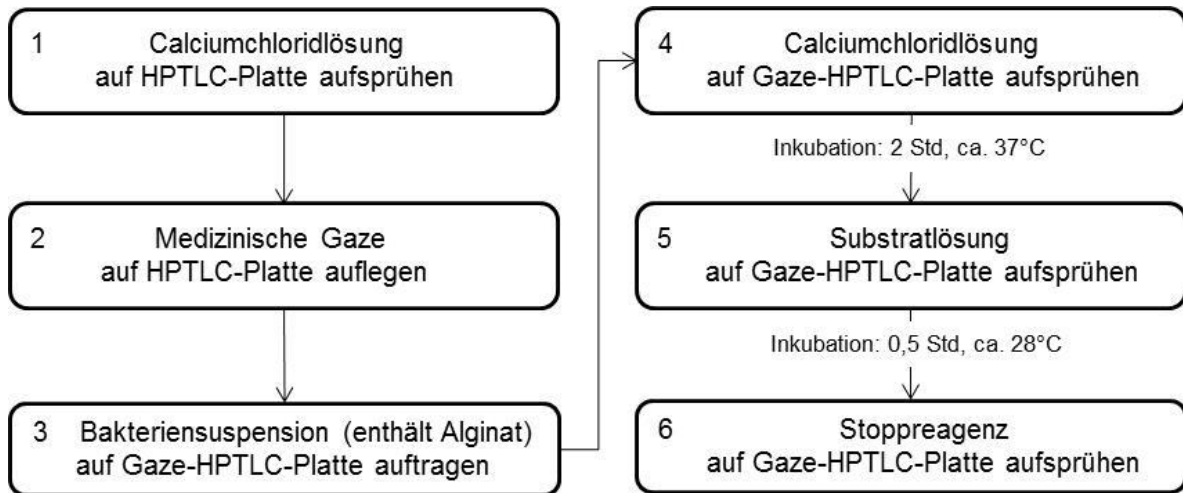


B)



**Abb. 9-6: Reaktion von  $\beta$ -Galactosidase mit A) ONPG und B) X-Gal.**

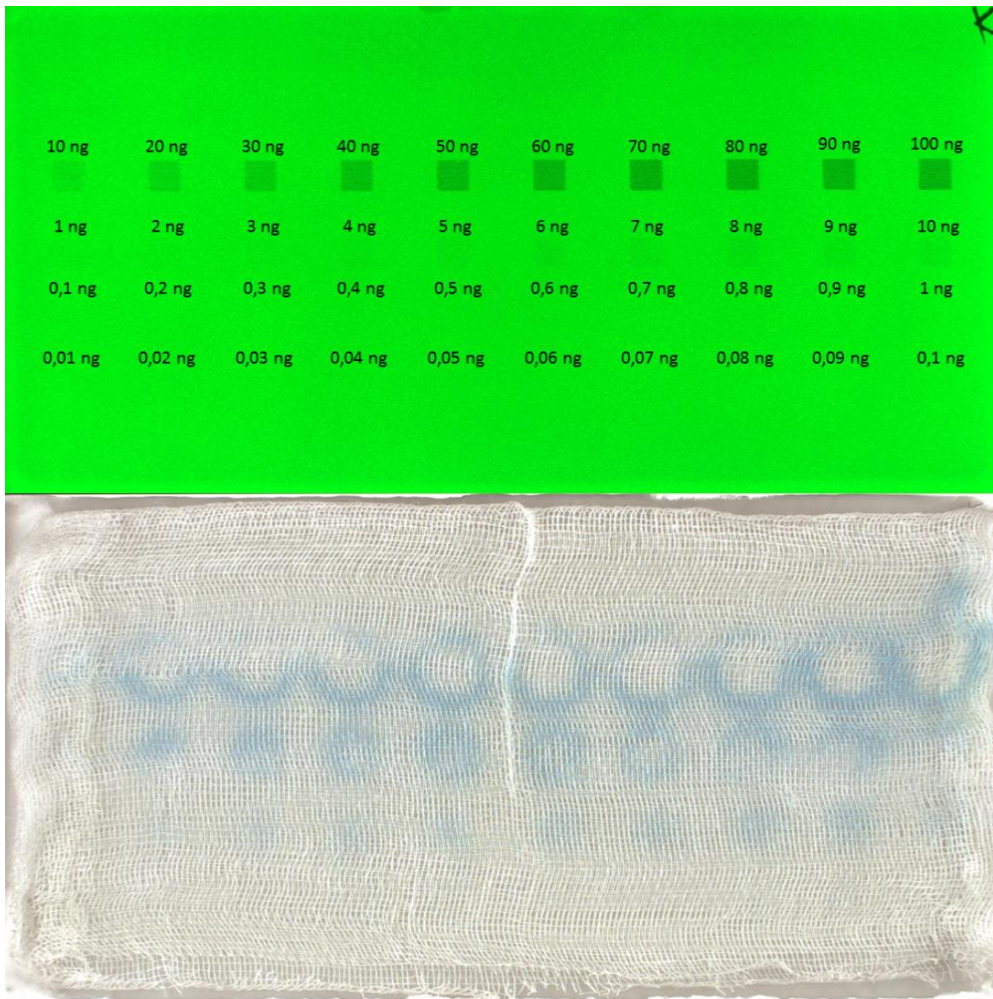
Im Vergleich zum Baumann et al.-Verfahren (siehe Abb. 9-3) sind beim optimierten Test deutliche weniger Arbeitsschritten notwendig (siehe Abb. 9-7). Hier musste die HPTLC-Platte nach vierstündiger Inkubationszeit gewässert werden, um die Schicht bestehend aus Gaze und Bakteriensuspension mit Alginat vom Kieselgel abzulösen. Anschließend wird die Enzymreaktion auf einem Löschpapier verfolgt (Arbeitsschritte 6 - 11, Abb. 9-3). Die im Folgenden beschriebenen Versuche zeigen, dass das Wässern und der Einsatz von Löschpapier nicht notwendig sind. Auch ist eine Inkubationszeit von 2 Stunden, statt 4, ausreichend.



**Abb. 9-7: Optimiertes Ablaufschema des HPTLC-umu-Tests.**

Es werden die Ergebnisse zu den Versuchen auf der HPTLC-Platte, sowie X-Gal nach dem optimierten Ablaufschema gezeigt.

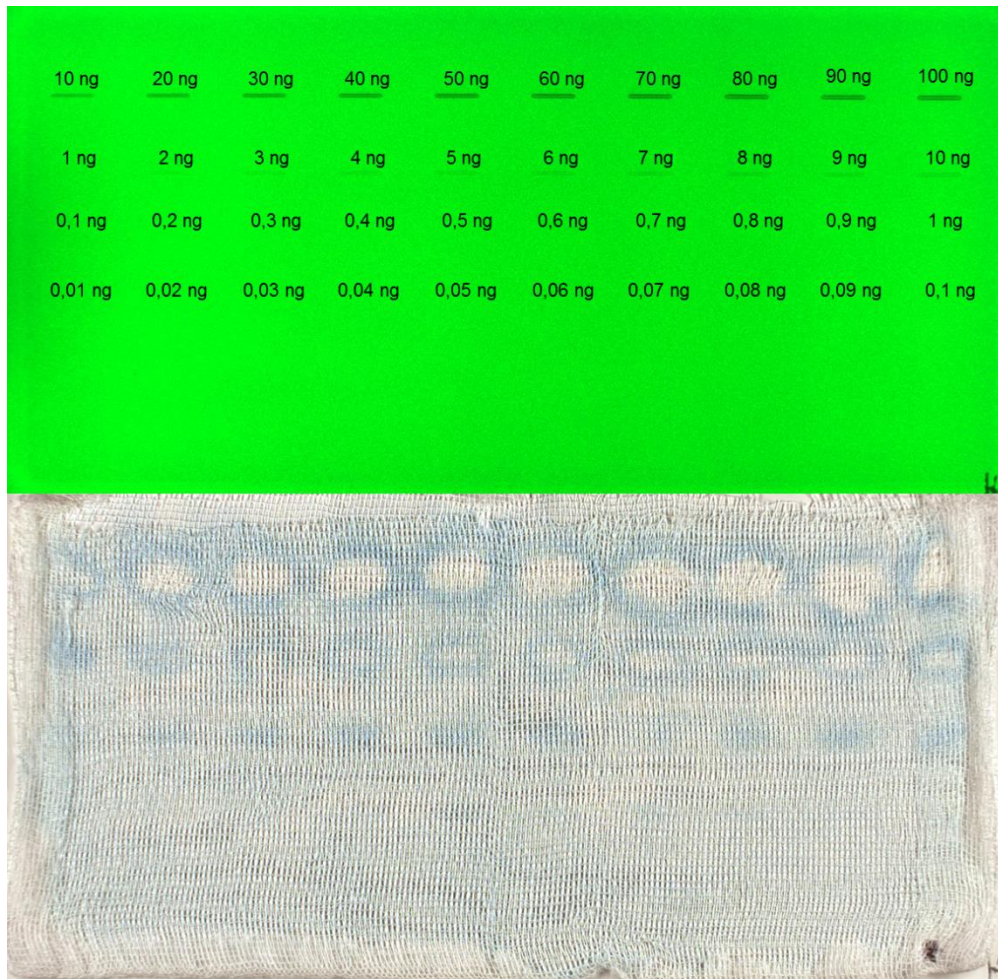
Mit dem optimierten Versuchsablauf (Abb. 9-7) unter Verwendung von 2-lagiger Gaze wurde die Nachweisgrenze der Referenzverbindung von direkt gentoxisch wirkenden Substanzen 4-Nitroquinolin-N-oxid (4-NQO) ermittelt. 4-NQO wurde zunächst quadratisch (6 mm x 6 mm) auf die HPTLC-Platte aufgetragen (Abb. 9-8 oben). Die bei *Salmonella typhimurium* durch 4-NQO verursachte Bildung von  $\beta$ -Galactosidase, und damit verbundene blaue Verfärbung des Reaktionsprodukts von X-Gal, ist deutlich auf der Gaze zu erkennen (siehe Abb. 9-8 unten). Es konnte eine Nachweisgrenze von 0,3 ng erreicht werden. Bis zu einer Auftragemenge von 2,0 ng sind blaue Banden zu erkennen. Ab einer Auftragemenge von 4,0 ng zeigen sich blaue Höfe um den Auftragungspunkt, wobei am Auftragungspunkt selbst keine Verfärbung zu erkennen ist. An diesen Stellen wirkt die Substanz bakterizid und nicht „nur“ gentoxisch, d. h. die Mikroorganismen überleben die Dosis an der Auftragefläche nicht.



**Abb. 9-8:** Oben: Die Substanz 4-Nitroquinolin-N-oxid wurde quadratförmig mit einer Auftragemenge von 0,01 ng bis 100 ng aufgetragen. Unten: umu-Test auf der HPTLC-Platte mit 2-lagiger Gaze und dem Substrat 5-Brom-4-chlor-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal). Blaue Verfärbungen sind ein Hinweis auf  $\beta$ -Galactosidase.

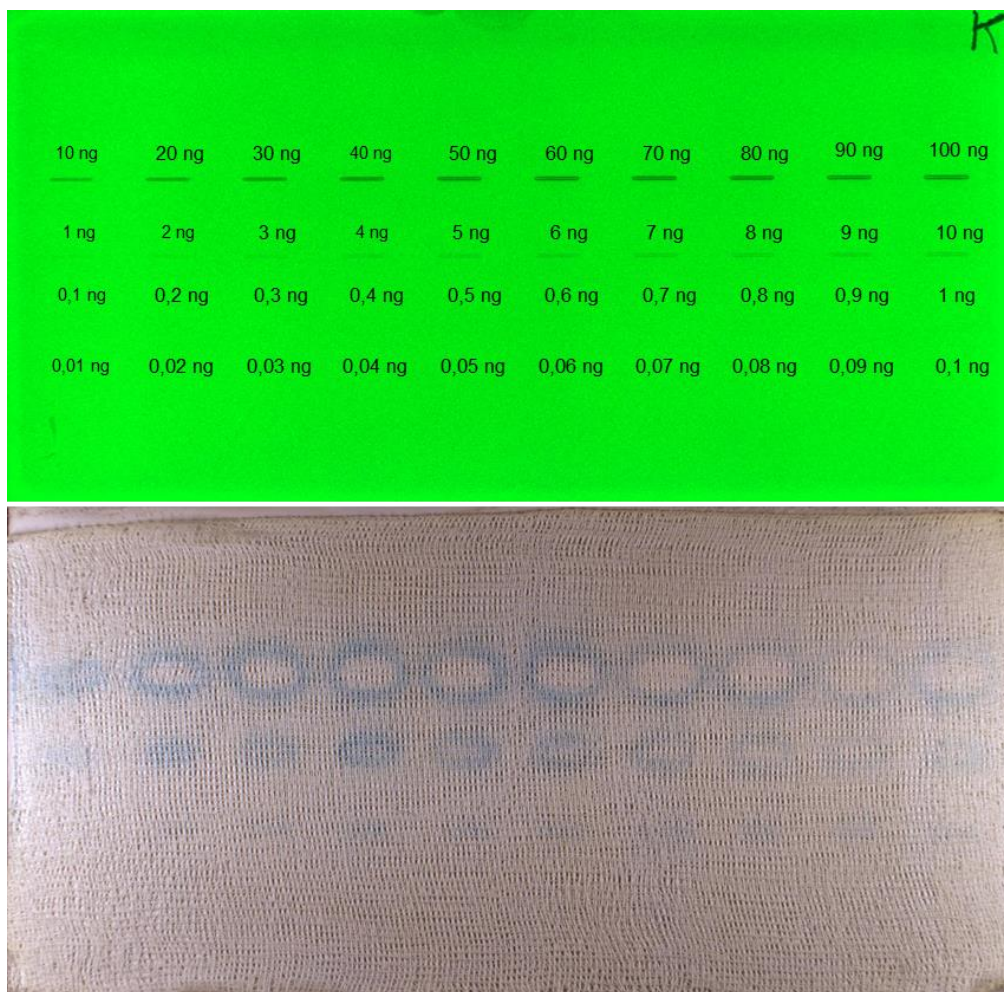
Analog zur quadratförmigen Auftragung wurde 4-NQO bandenförmig (8 mm x 1 mm, Abb. 9-9 oben) auf die HPTLC-Platte aufgetragen, was der üblichen Form der Banden eines Chromatogramms bei Realproben entspricht. Das Ergebnis zeigt Abb. 9-9 unten. Die potentiell gentoxische Wirkung von 4-NQO ist hier ebenfalls im Bereich von 0,3 ng bis 2,0 ng deutlich nachweisbar.





**Abb. 9-9:** Oben: Die Substanz 4-Nitroquinolin-N-oxid wurde bandenförmig mit einer Auftragemenge von 0,01 ng bis 100 ng aufgetragen. Unten: umu-Test auf der HPTLC-Platte mit 2-lagiger Gaze und dem Substrat 5-Brom-4-chlor-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal). Blaue Verfärbungen sind ein Hinweis auf  $\beta$ -Galactosidase.

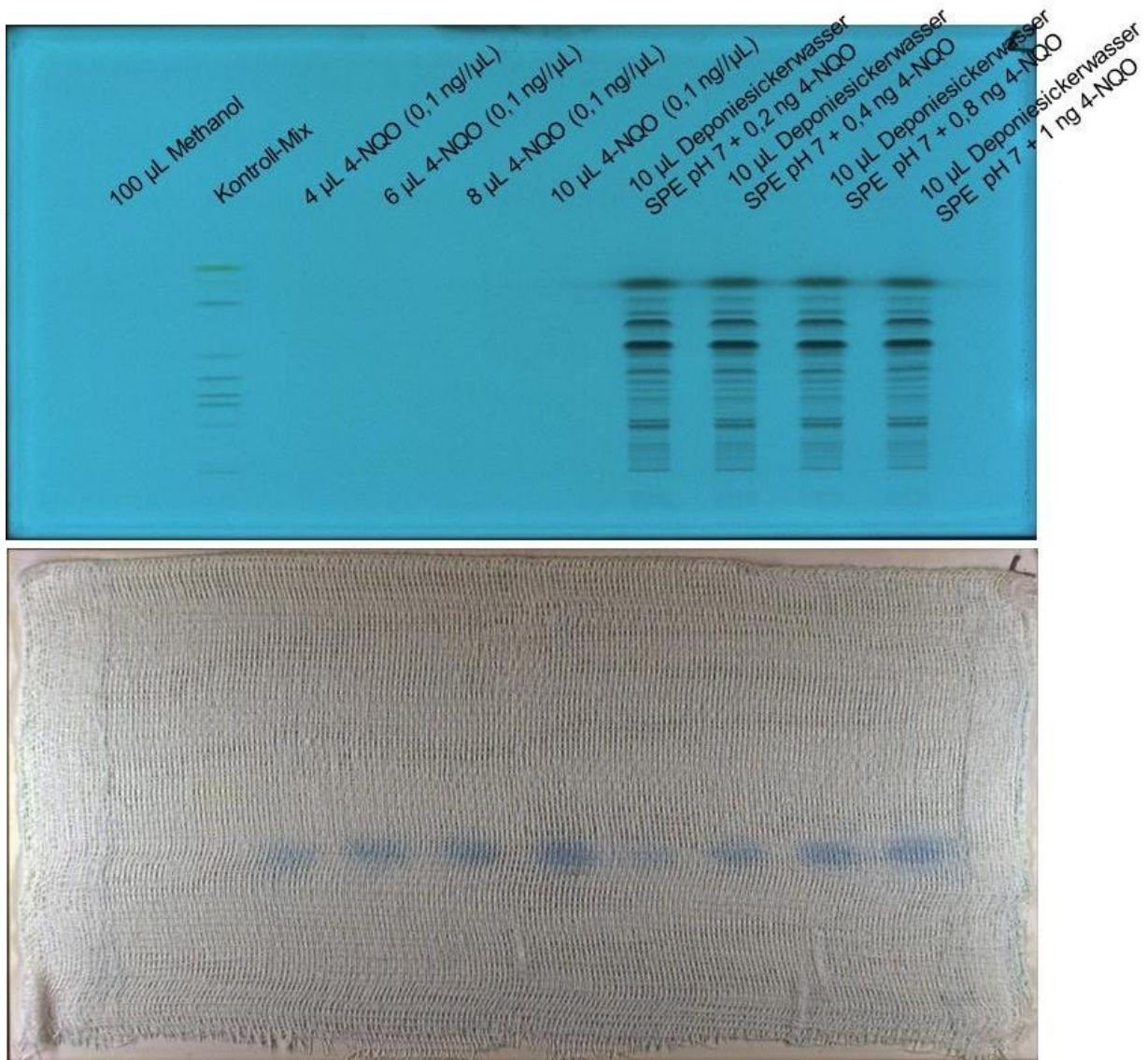
Beim umu-Test nach DIN 38415-3 erfolgt in einer zweiten Inkubationsphase das Überimpfen der Bakterien und eine Verdünnung von 1:10 (Bakterien: 10fach konzentriertes Nährmedium). Hierdurch sollen physiologische Wirkungen der Probe auf die Bakterien, die zu Wachstumsstörungen führen, minimiert bzw. allgemein-toxische Effekte zur besseren Differenzierung zwischen Gentoxizität und Allgemeintoxizität erniedrigt werden [297, 298]. Es wurde deshalb 10fach konzentriertes Nährmedium nach ca. 2 Stunden Inkubationszeit auf die HPTLC-Platte aufgebracht. Jedoch konnte damit keine Verbesserung erreicht werden (siehe Abb. 9-10).



**Abb. 9-10: Oben: Die Substanz 4-Nitroquinolin-N-oxid wurde bandenförmig mit einer Auftragemenge von 0,01 ng bis 100 ng aufgetragen. Unten: umu-Test auf der HPTLC-Platte mit 2-lagiger Gaze und dem Substrat 5-Brom-4-chlor-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal). Blaue Verfärbungen sind ein Hinweis auf  $\beta$ -Galactosidase.**

Weiterhin wurde ein SPE-Extrakt einer Sondermülldeponieprobe vor der Auftrennung mit unterschiedlichen Konzentrationen mit 4-NQO dotiert. Die chromatographierte HPTLC-Platte mit den aufgetragenen Proben zeigt Abb. 9-11 oben. Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt Abb. 9-11 unten. Es ist deutlich ist eine blaue Bande zu erkennen, die das Auftreten von  $\beta$ -Galactosidase anzeigt. Diese Bande ist die dotierte Verbindung 4-NQO. Außer der hinzugefügten Substanz 4-NQO wurden in diesen SPE-Extrakten unter diesen Bedingungen keine potentiell genotoxischen Substanzen erkannt.





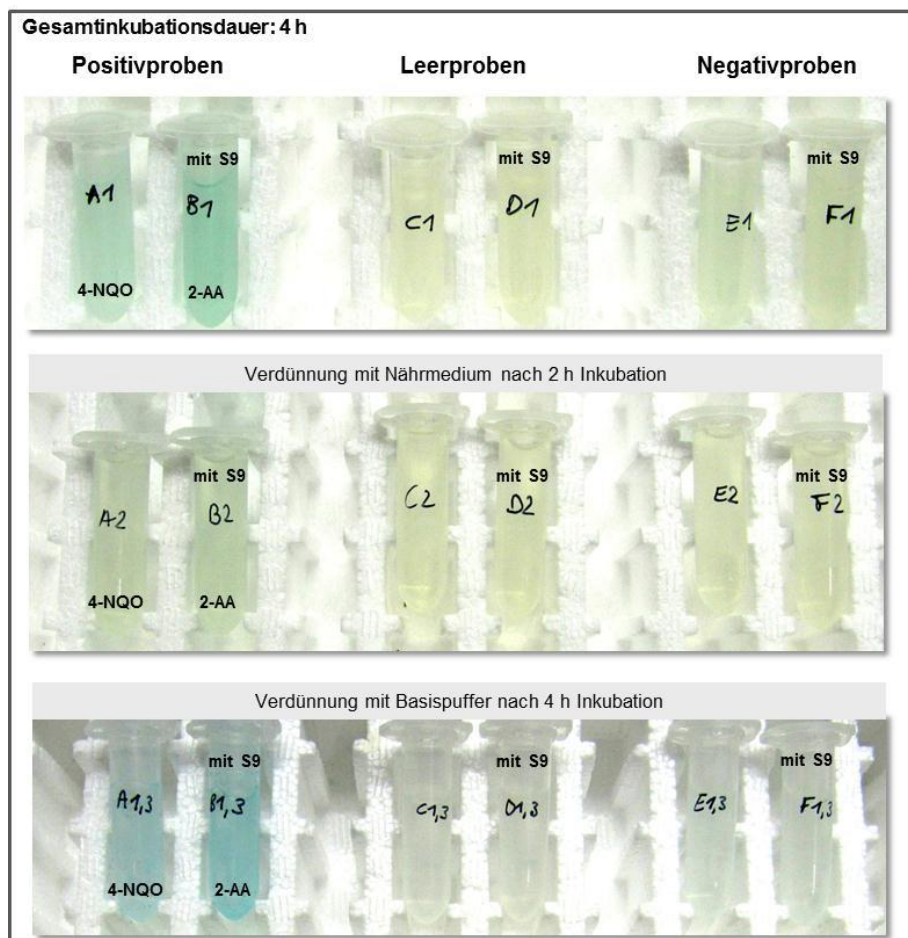
**Abb. 9-11:** Oben: Chromatographierte HPTLC-Platte mit dotierten SPE-Extrakten der Sondermülldeponie D (D1, pH 7) unter  $\lambda=254$  nm. Unten: umu-Test auf der HPTLC-Platte mit 2-lagiger Gaze und dem Substrat 5-Brom-4-chlor-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal). Blaue Verfärbungen sind ein Hinweis auf  $\beta$ -Galactosidase.

### ***Indirekte gentoxische Wirkung***

Der Nachweis von indirekt gentoxisch wirkenden Substanzen erfolgt mit 2-Aminoanthracen (2-AA, CAS Nr.: 613-13-8) erfolgen. Von ihr ist bekannt, dass sie durch Stoffwechsellzyme aktiviert wird. Für die metabolische Umwandlung wird wie in DIN 38415-3 [4] beschrieben ein sogenannter S9-Mix verwendet, der aus Leberenzymen (Cytochrome P450-/CYP-Enzyme) der Ratte besteht. Damit und mit weiteren Cofaktoren (KCl, MgCl<sub>2</sub>, NADP, Glucose-6-Phosphat) wird der Säugetiermetabolismus simuliert.



Vor der Anwendung auf der HPTLC-Platte konnte mit dem S9-Mix der vollständige umu-Test mit 2-AA (Aktivierung durch S9) sowie 4-NQO (ohne Aktivierung) und dem Substrat X-Gal erfolgreich in 2 mL Reaktionsgefäßen durchgeführt werden (siehe Abb. 9-12).



**Abb. 9-12: umu-Test nach DIN 38415-3 in 2 mL Reaktionsgefäßen. Als Positivkontrollen wurden 4-NQO und 2-AA verwendet (linke Seite im Bild). 2-AA wurde mit S9-Leberenzymen aktiviert. Nach 4 h Inkubationszeit ohne Verdünnung (obere Reihe) und mit Verdünnung mit Basispuffer (untere Reihe) wurden die beiden gentoxischen Substanzen nachgewiesen (blaue Verfärbung). Die Leerproben enthalten weder Referenzsubstanz noch Bakterienlösung. Die Negativproben enthalten keine Referenzsubstanz.**

Bei den Versuchen zum Nachweis von indirekt gentoxisch wirkenden Substanzen wurde getestet welcher Zeitpunkt am besten geeignet ist, um den S9-Mix anzuwenden (Tabelle 9-1). Für jeden Versuch wurden zwei HPTLC-Platten verwendet. Auf die erste Platte wurden 2-AA und 4-NQO unter Verwendung von S9 aufgetragen. Auf die zweite Platte wurde nur 4-NQO aufgetragen und kein S9-Mix verwendet. Die Versuche ergaben, dass die durch 4-NQO ausgelöst Blaufärbung, unter Verwendung von S9 schwächer war als auf der Kontrollplatte ohne S9. Die indirekte gentoxische Wirkung von 2-AA war in keinem der beschriebenen Versuche nachweisbar.

**Tabelle 9-1: Versuche des HPTLC-umu-Tests mit S9-Enzymen. Getestete Substanzen: 2-Aminoanthracen (2-AA, indirekt gentoxisch) und 4-Nitrochinolin N-oxid (4-NQO, direkt gentoxisch).**

Zugabe von S9-Mix, Versuchsbeschreibung	Nachweis auf der HPTLC-Platte		Bemerkung
	Äquidistante Auftragung: 0,01 ng – 1,00 ng 2-AA            4-NQO		
In Bakteriensuspension vor dem Bakterienwachstum.	Negativ	Negativ	
In Bakteriensuspension nach mind. 12 h Bakterienwachstum und Aufsprühen von S9 über die gesamte Platte vor dem Auftragen der Bakteriensuspension mit OD*=0,2-0,4.	Negativ	Positiv	Intensität der Blaufärbung, ausgelöst durch 4-NQO, schwächer im Vergleich zur Durchführung ohne S9.
1,5 mL S9-Mix in 200 mL dest. Wasser gelöst. Darin HPTLC-Platte getaucht, anschließend 30 min. inkubiert.	Negativ	Negativ	
1,5 mL S9-Mix und 0,19 g Rinderserumalbumin (BSA) in 200 mL dest. Wasser gelöst. Darin HPTLC-Platte getaucht, anschließend 30 min. inkubiert.	Negativ	Negativ	BSA wird zur Enzymstabilisierung verwendet [13].
Je 1 µL S9 gemischt mit Cofaktoren mittels automatisiertem Auftragegerät nur auf die 2-AA Banden aufgesprüht.	Negativ	Positiv	
In Bakteriensuspension mit OD=0,2-0,4 gemischt mit Cofaktoren. Mengenangaben entsprechend DIN 38415-3.	Negativ	Positiv	Intensität der Blaufärbung, ausgelöst durch 4-NQO, schwächer im Vergleich zur Durchführung ohne S9.

\*OD = Optische Dichte

Anschließend wurden Versuche mit der Substanz Benzo[a]pyren (B[a]P) durchgeführt. B[a]P ist analog der Substanz 2-AA ein polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff und als indirekt gentoxisch wirkende Substanz bekannt [299], die mit den S9-Enzymen aktiviert werden kann. Im Vergleich zu 2-AA ist B[a]P weniger lichtempfindlich und flüchtig. Analog zu 2-AA konnte auch B[a]P nicht auf der HPTLC-Platte nachgewiesen werden, jedoch bei der vorherigen Überprüfung des Testsystems in 2 mL Reaktionsgefäßen. Auch diese Versuche (siehe Tabelle 9-2) wurden zur Kontrolle mit einer zweiten HPTLC-Platte ohne die Anwendung mit S9 überprüft. Bei erhöhter Auftragemenge der Testsubstanzen war die Intensität der Blaufärbung, ausgelöst durch 4-NQO, unter Verwendung von S9 sogar stärker als die Durchführung ohne S9.

**Tabelle 9-2: Versuche des HPTLC-umu-Tests mit S9-Enzymen. Getestete Substanzen: 2-Aminoanthracen (2-AA), Benzo[a]pyren (B[a]P, beide indirekt gentoxisch) und 4-Nitrochinolin N-oxid (4-NQO, direkt gentoxisch).**

Zugabe von S9-Mix, Versuchsbeschreibung	Nachweis auf der HPTLC-Platte			Bemerkung
	Äquidistante Auftragung: 0,1 ng – 10,0 ng 2-AA    B[a]P    4-NQO			
In Bakteriensuspension mit OD*=0,2-0,4 gemischt mit Cofaktoren. Keine Verwendung von Calciumchloridlösung. Mengenangaben entsprechend DIN 38415-3.	Negativ	Negativ	Positiv	Intensität der Blaufärbung, ausgelöst durch 4-NQO, schwächer im Vergleich zur Durchführung ohne S9.
	Äquidistante Auftragung: 10,0 ng – 1,0 mg 2-AA    B[a]P    4-NQO			
Mit Cofaktoren in die Bakteriensuspension mit OD=0,2-0,4. Auftragemengen von 2-AA und B[a]P erhöht.	Negativ	Negativ	Positiv	Intensität der Blaufärbung, ausgelöst durch 4-NQO, stärker im Vergleich zur Durchführung ohne S9.

\*OD = Optische Dichte

Zum weiteren qualitative Nachweis indirekt gentoxisch wirkende Substanzen, wurde Dimethylsulfoxid zur Bakteriensuspension (OD = 0,2 - 0,4) gegeben. Damit wurde versucht, die Löslichkeit der beiden Substanzen 2-AA und B[a]P für die Reaktion mit S9 auf der HPTLC-Platte zu erhöhen. Jedoch konnte damit kein positives Testergebnis erzielt werden. Eine mögliche Ursache für die Schwierigkeiten mit indirekt gentoxisch wirkenden Substanzen könnte sein, dass die Aktivität der erforderlichen Leberenzyme (S9) bzw. das Metabolisierungssystem mit den notwendigen Cofaktoren auf der HPTLC-Platte nicht (ausreichend lang) aufrechterhalten werden kann.

### 9.1.5 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von direkt gentoxisch wirkenden Substanzen mittels des umu-Tests auf der HPTLC-Platte möglich ist. Bei einem Anreicherungsfaktor von 1000 und einem Auftragevolumen von 100 µL liegt die Nachweisgrenze bei 30 ng/L für 4-NQO. Für weitere Tests mit Realproben sollte beachtet werden, dass diese wahrscheinlich angereichert werden müssen, da erbgutverändernde Substanzen in der Umwelt nur in geringen Konzentrationen vorkommen bzw. die Empfindlichkeit des Testverfahrens nicht ausreichen könnte, um die gentoxischen Effekte zu ermitteln. Dies und weitere Versuche mit S9 sollten Gegenstand für folgende Untersuchungen sein.

## 10 Kombinierte Anwendung der entwickelten HPTLC-WBA-Methoden

### 10.1 Untersuchungskonzept

Mit den entwickelten und optimierten HPTLC-WBA-Methoden sollten deponiebeeinflusste Wässer, sowie Wässer von Kläranlagen untersucht werden. Dazu gehörte ebenfalls die Untersuchung der Prozesse zur Behandlung von Deponiewässern, beispielsweise die Anwendung von Aktivkohle. Über die Änderung von Wirkungen in Proben vor und nach Aufbereitungsprozessen wurde eine Beurteilung der Reinigungsleistung einer Anlage angestrebt. Ebenso sollte anhand dieser Proben die Praxistauglichkeit und die Grenzen der entwickelten Methoden ausgelotet werden.

**Tabelle 10-1: Überblick der untersuchte Standorte**

Standort	Klassifizierung	Bemerkung
Deponie A	Sondermülldeponie	Laufende Sanierung. Das Sickerwasser wird über einen mehrstufigen Abwasserreinigungsprozess aufgearbeitet.
Deponie C	Sondermülldeponie	Saniert
Deponie E	Kommunale Deponie	In Betrieb seit 1983, seit 2000 nur noch Schlackenablagerung.
Kläranlage G	Kommunale Kläranlage	Kommunales Abwasser und Sickerwasser von der Deponie G.
Kläranlage H	Industriekläranlage	Abwasser von der Industrie und anliegenden Kommunen.

Die Proben wurden mit der SPE nach dem in Kapitel 5.1 beschriebenen Verfahren aufgearbeitet. Aufgetrennt wurden die Proben mit der entwickelten isokratischen HPTLC-Methode und dem HPTLC/AMD-Gradienten 13 (Kapitel 4.2.2).

Nach der Standardmethode werden die Proben um den Faktor 200 mit der SPE angereichert (200 mL Wasserprobe in ein Extraktvolumen von 1 mL). Doch wenn es sich um gering belastete Wasser handelt, ist es erforderlich die Probe um den Faktor 1000 anzureichern. Dieser hohe Anreicherungsfaktor ermöglicht es, bei 60 µL Auftragevolumen (siehe Kapitel 5.1) noch ausreichend empfindlich ohne Blindwertstörung vorhandene Wirkungen in der Wasserprobe nachzuweisen

Damit die Vergleichbarkeit des RIHV mit den Untersuchungsergebnissen der anderen Depo- nien erhalten bleibt, wurde für die RIHV-Berechnung das Auftragevolumen mit dem Quotien- ten aus dem Anreicherungsfaktor (z. B. für A2:  $AF = 1000$ ) und dem Anreicherungsfaktor der Standardmethode ( $AF = 200$ ) multipliziert. Dieser Faktor berücksichtigt somit das größere Auftragevolumen verglichen mit einer Auftragung bei Standardanreicherung. Diese rechneri- sche Anpassung des Auftragevolumens zur Herstellung der Vergleichbarkeit der RIHV bei unterschiedlichen Anreicherungsfaktoren erfolgt auch bei der Auftragung zur HPTLC- Trennung. Um die Vergleichbarkeit zu erleichtern werden die RIHV- bzw. RIAV-Werte alle in halblogarithmische Polardiagramme mit derselben Skalierung dargestellt (*Aliivibrio fischeri*- und *Bacillus subtilis*-Hemmtest als RIHV von 0,1 – 10.000 [1000/ $\mu$ L] und beim AChE- Hemmtest als RIAV von 0,1–1.000 [1000/ $\mu$ L]).

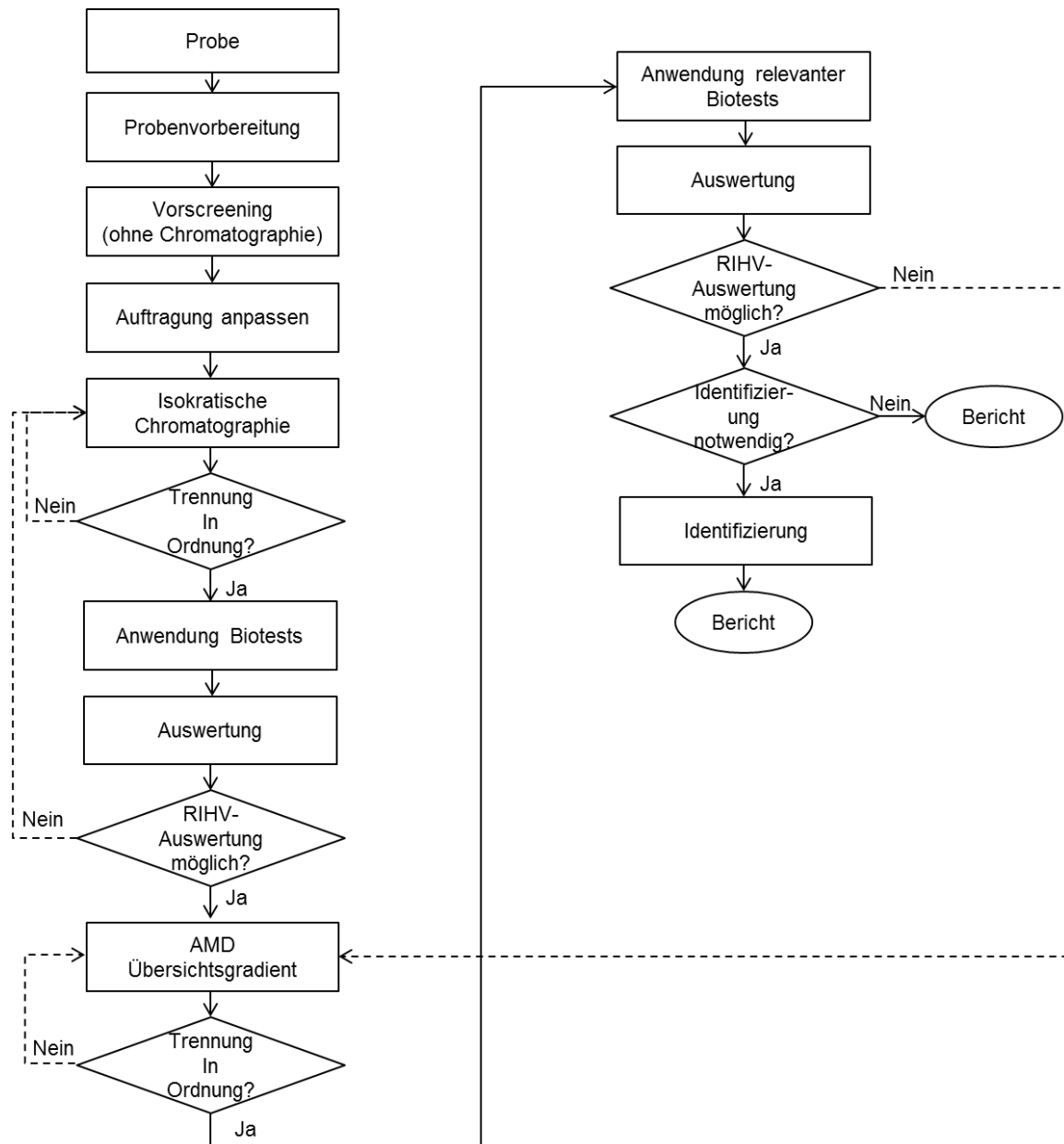
Aufgrund der Vielzahl an Proben und des teilweisen hohen Zeitaufwand für die wirkungsbe- zogen Untersuchung (Probenvorbereitung bis zur Auswertung) wird ein effizienter Arbeitsab- lauf benötigt. Ein Vorschlag wird dazu in Abb. 10-1 gezeigt. In der ersten Phase sollen daher die Proben ein Vorscreening unterzogen werden. Dazu werden die Proben in unterschiedli- chen Volumina als Fläche auf die HPTLC-Platte aufgetragen. Damit soll das erforderliche Mindestvolumen für die Detektion ermittelt werden. Gleichzeitig können hier schon für den Leuchtbakterien-, den *Bacillus subtilis* – und den AChE-Hemmtest die Proben ohne Wirkung für die anschließende HPTLC-Trennung aussortiert werden. Für den AChE-Hemmtest gilt dies nur mit Einschränkung, da Proben die fluoreszierende und gleichzeitig im sichtbaren Licht gefärbte Bestandteile besitzen die Detektion behindern. Auch kann das Enzym auf- grund der hohen Beladung denaturiert werden. Diese vermeintliche Wirkung würde sich dann spätestens bei der Trennung als Falsch-Positiv herausstellen.

Die verbleibenden Proben sollen danach mit den angepassten Auftragevolumina mit einer isokratischen Trennmethode in einer Trogkammer untersucht werden. Es wird hierbei be- wusst auf die AMD verzichtet, da durch das Anlegen von Vakuum zum Trocknen der Platte mittelflüchtige Substanzen entfernt werden könnten. Des Weiteren ist durch die Einfachent- wicklung diese Chromatographie im Vergleich zur AMD wesentlich schneller. Dies geht auf Kosten der Auflösung, erlaubt es aber, das Auftragevolumen zur Ermittlung des reziproken Iso-Hemmvolumens (RIHV) zu variieren. Für die RIHV-Auswertung sollten bei drei verschie- denen Auftragevolumina jeweils die Hemmbanden mit unterschiedlicher Intensität zu sehen sein. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Trennung, wird auf jeder Platte ein Refe- renzmix aufgetragen und anhand der  $R_f$ -Werte die Qualität der Trennung beurteilt.

Für eine bessere chromatographische Auflösung ist die Trennung mit der HPTLC/AMD not- wendig. Es sollen dafür die gleichen Volumina, wie für die isokratische Trennung aufgetra-

gen werden. Nach der Trennung werden für die Probe lediglich die relevanten wirkungsbezogenen Detektionsmethoden angewandt.

Wenn eine Identifizierung der wirkenden Substanzen notwendig ist, so sollte dies nach der HPTLC/AMD-Trennung erfolgen, da sich aufgrund der besseren chromatographischen Auflösung weniger Substanzen in einer wirkenden Bande befinden. So kann die Ursache für die Wirkung besser eingegrenzt werden.



**Abb. 10-1: Konzept eines Arbeitsablauf zur Untersuchung von Proben mit unbekannter Wirkung.**

Während der Anwendung auf die Deponie A und E zeigte sich, dass der Arbeitsablauf immer noch sehr aufwendig ist und nachmals nach bearbeitet werden musste.

Eine flächenhafte Auftragung zur Untersuchung der passenden Auftragevolumina erwies sich vor allem bei der Untersuchung der Biolumineszenzhemmung mit *Aliivibrio fischeri* als sinnvoll. Der *Bacillus subtilis* Hemmtest mit der Verwendung der medizinischen Gaze ist relativ unempfindlich, sodass für die flächenhafte Auftragung schon viel Extrakt verbraucht wird. Beim Acetylcholinesterase Hemmtest fällt bei der flächenhaften Auftragung auf, dass häufig aufgrund fluoreszierender Substanzen in der Probe keine Aussage über die Neurotoxizität getroffen werden kann. Dieses Problem wird durch die Trennung zumindest vermindert, da die wirkenden Substanzen von den fluoreszierenden Substanzen getrennt werden können.

Daher wurde das Konzept angepasst (Abb. 10-2) und an den Proben von den Deponien C, E und der Kläranlage H angewendet. Nach dem modifizierten Arbeitsablauf wird zunächst eine unbekannte Probe flächenhaft aufgetragen und der HPTLC-Leuchtbakterienhemmtest durchgeführt. Anhand der Wirkungen auf die Leuchtbakterien lassen sich die aufzutragenden Volumina abgeschätzt. Im Anschluss daran muss abgeklärt werden, ob eine isokratische Trennung mit einer großen Zeitersparnis, jedoch einer begrenzten Trenneffizienz zur Untersuchung von Proben ausreicht. Eine solche schnelle Trennung würde sich zum Beispiel zur Untersuchung von Sauberwässern eignen, bei denen mit insgesamt wenig Belastung und wenigen Wirkungen zu rechnen wäre. Wenn jedoch stark belastete Wässer untersucht werden sollen, wäre eine AMD-Trennung mit einer hohen Trenneffizienz zu empfehlen.

Anhand der Wirkungen der Probe auf die Leuchtbakterien können auch die Auftragevolumina für die anderen Wirkttests abgeschätzt werden. Der Acetylcholinesterase Hemmtest ist ein sehr sensitive Testsysteme, sodass sich häufig dieselben Auftragevolumina, wie auch für den Leuchtbakterientest eignen. Lediglich beim *Bacillus subtilis* Test muss das aufzutragende Volumen entsprechend erhöht werden. Je nach der Menge des Extrakts, ist eine Erhöhung des Volumens um den Faktor 5 zu empfehlen.

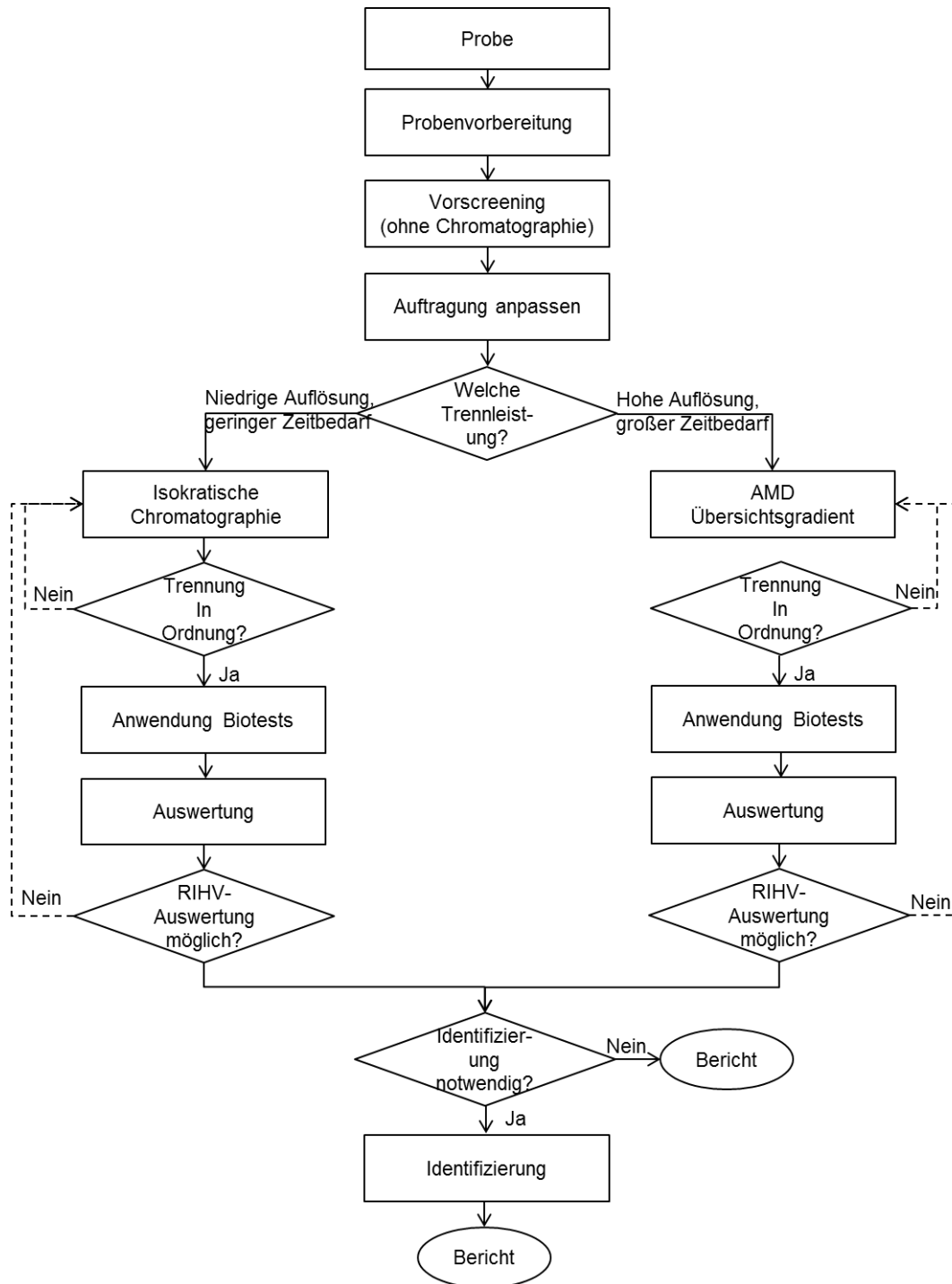


Abb. 10-2: Modifiziertes Konzept eines Arbeitsablauf zur Untersuchung von Proben mit unbekannter Wirkung.

### 10.1.1 Summenwirkung des SPE-Blindwerts und des Laborreinstwassers auf *Aliivibrio fischeri*

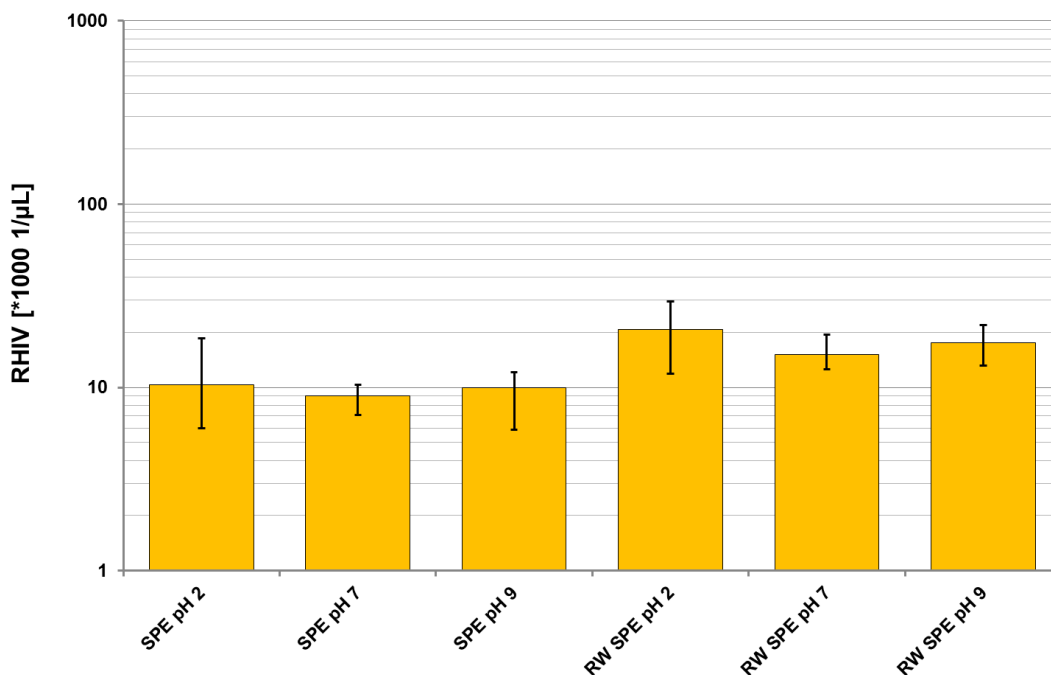
Während des Vorscreenings bei der die SPE-Extrakte als Fläche aufgetragen und anschließend ohne Trennung mit dem Leuchtbakterien-Hemmtest untersucht werden, wurde bei den



Feldblindproben immer eine Hemmung beobachtet. Das RIHV für diese Hemmung betrug dabei ca. 10-20 [1000/ $\mu$ L].

Zur besseren Einschätzung dieses Werts ist ein SPE-Kartuschenblindwert und ein Laborreinstwasserblindwert (aus einer Typ 1 Reinstwasseranlage nach ASTM D1193-91 [128] mit einer Leitfähigkeit (25 °C)  $\leq 0,056 \mu\text{S/cm}$ , einem Widerstand (25 °C)  $> 18,0 \text{ M}\Omega/\text{cm}$  und einem TOC  $\leq 100 \mu\text{g/L}$ ) notwendig. Hierzu wurde die Phase lediglich konditioniert, getrocknet, eluiert und in 1 mL Methanol aufgenommen. Für den Laborreinstwasserblindwert wurden 200 mL Laborreinstwasser angereichert. Die Konditionierung und Anreicherung erfolgte bei allen drei Untersuchungs-pH-Werten 2, 7 und 9. Aufgetragen wurden jeweils drei Volumina 10, 20 und 50  $\mu\text{L}$  auf eine Fläche von 5 \* 5 mm.

Für den SPE-Kartuschenblindwert ergeben sich bei dieser Untersuchung RIHV von 6 - 18 [1000/ $\mu$ L] und für die Laborreinstwasserproben RIHV von 12 - 29 [1000/ $\mu$ L] (siehe Abb. 10-3). Daraus kann geschlossen werden, dass aus Typ 1-Reinstwasser gewonnene Feldblindproben mit ähnlichen RIHV als unbeeinflusst gewertet werden können.

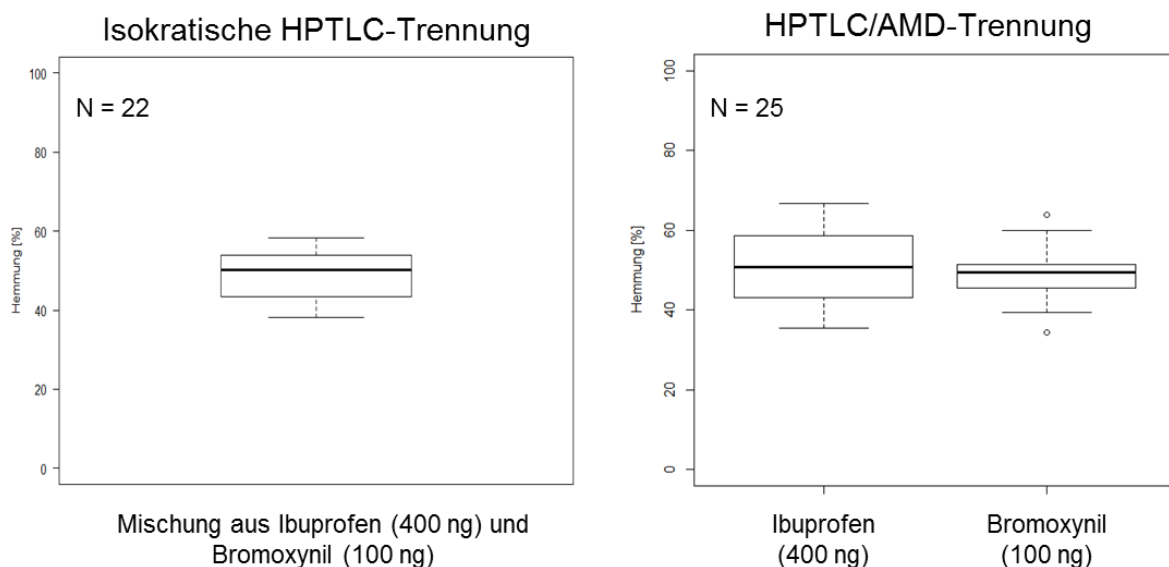


**Abb. 10-3:** RIHV der Biolumineszenz-Hemmung der Flächenauftragung für die SPE-Kartuschenblindwerte und des Laborreinstwassers (RW) bei verschiedenen pH-Werten (N = 3, Fehlerbalken geben Mini- bzw. Maximalwerte an).

## 10.2 Qualitätssicherung

### 10.2.1 Biolumineszenzhemmung (*Aliivibrio fischeri*)

Die Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmung durch hemmende Stoffe erfolgte durch Auftragen einer Positivkontrolle, bestehend aus Bromoxynil und Ibuprofen. Mit dem HPTLC/AMD-Gradienten lassen sich Bromoxynil und Ibuprofen gut trennen, während mit der isokratischen HPTLC-Methode diese beiden Substanzen nicht voneinander trennbar sind. Der Leuchtbakterien-Hemmtest nach isokratischer HPTLC-Trennung wurde 22-mal und nach HPTLC/AMD-Trennung 25-mal über einen Zeitraum von 7 Monaten durchgeführt. Die Hemmwerte werden aus dem Signalmaximum ermittelt. Die Streuungen der Hemmwerte sind als Boxplots in Abb. 10-4 dargestellt.



**Abb. 10-4:** Boxplot-Darstellung der Stabilität der Biolumineszenzhemmung von *Aliivibrio fischeri* durch die Referenzsubstanzen für die isokratische HPTLC-Trennung und HPTLC/AMD-Gradiententrennung.

Auch wenn bei der isokratischen HPTLC-Trennung die beiden Referenzsubstanzen zusammenfallen, ergibt sich kein größerer Hemmwert als für die beiden Einzelsubstanzen. Dies liegt vermutlich daran, dass die Hemmbande für die beiden Substanzen sehr breit ausfällt, während nach der HPTLC/AMD-Gradiententrennung die Banden deutlich schmäler sind. Für die isokratische Trennung ergibt sich ein mittlerer Hemmwert von 43 % Hemmung und einer Standardabweichung von 6 % Hemmung (Tabelle 10-2).

**Tabelle 10-2: Mittelwert, Median, Standardabweichung und Interquartilsabstand für die Biolumineszenzhemmung nach isokratischer HPTLC-Trennung (N = 22, Zeitraum 3 Monate).**

Substanz	R <sub>f</sub>	Mittelwert Hemmung	Median Hemmung	Standard- abweichung (absolut)	Interquartils- abstand (IQR)
Mischung aus Ibuprofen (400 ng) und Bromoxynil (100 ng)	0,78	43 %	43 %	5,9 %	16,5 %

Die Biolumineszenzhemmung nach der HPTLC/AMD-Trennung für Ibuprofen liegt bei 51±18 % Hemmung (±2 \* Standardabweichung). Für Bromoxynil fällt die Streuung der Hemmung etwas geringer aus. Die mittlere Hemmung liegt hier bei 49±13 % Hemmung (± 2 \* Standardabweichung) (Tabelle 10-3).

**Tabelle 10-3: Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen und Interquartilsabstände für die Biolumineszenzhemmung nach HPTLC/AMD-Trennung (N = 25, Zeitraum 7 Monate).**

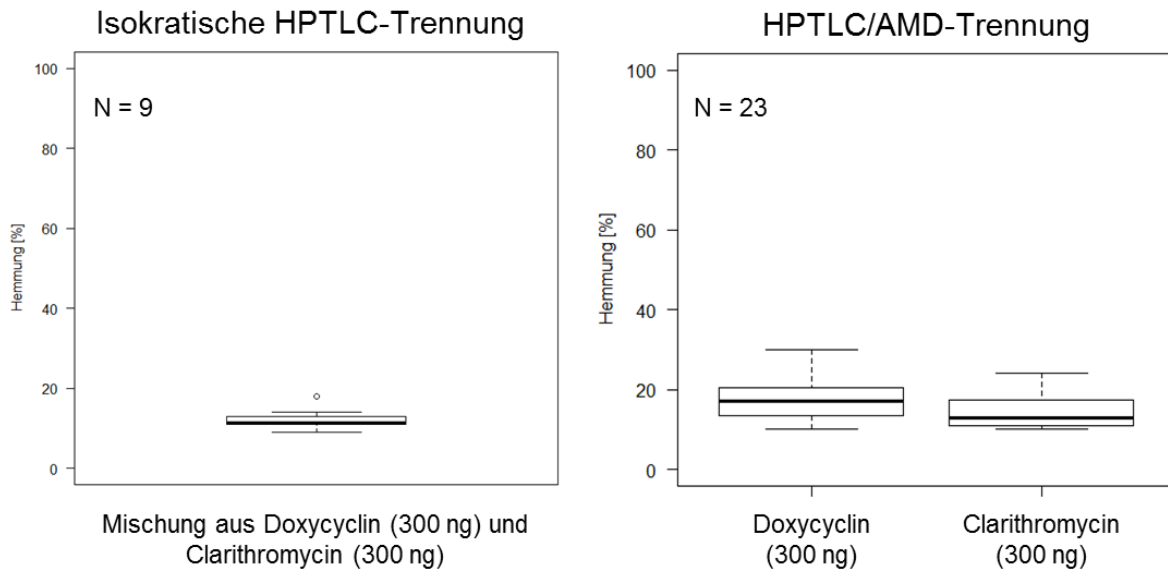
Substanz	R <sub>f</sub>	Mittelwert Hemmung	Median Hemmung	Standard- abweichung (absolut)	Interquartils- abstand (IQR)
Ibuprofen (400 ng)	0,49	51 %	51 %	8,9 %	15,5 %
Bromoxynil (100 ng)	0,73	49 %	49 %	6,5 %	5,9 %

Für ein biologisches Testsystem sind diese Werte für die Reproduzierbarkeit gut. Während der Messkampagne wurde der Test von vier Personen durchgeführt. In einer anderen Messkampagne über 4 Jahre und 117 Platten wurde der Test nur von zwei Personen durchgeführt und eine Standardabweichung von 5 bzw. 6 %Hemmung erreicht (Kapitel 0).

### 10.2.2 *Bacillus subtilis*-Hemmtest

Die Positivkontrolle für den *Bacillus subtilis*-Hemmtest beinhaltet Doxycyclin und Clarithromycin. Diese Lösung wurde für die isokratische sowie für die HPTLC/AMD-Trennung verwendet. Doch werden Doxycyclin und Clarithromycin bei der isokratischen HPTLC-Trennung nicht getrennt. Daher wird hier, analog zum Leuchtbakterientest, die Hemmung der Mischung ermittelt. Die Mischung besitzt einen mittleren Hemmwert von 12 % Hemmung und eine Standardabweichung 2,4 % Hemmung (N = 9) (Tabelle 10-4). Nach HPTLC/AMD-Trennung liegt die Hemmung für Doxycyclin bei 17 % Hemmung mit einer Standardabweichung 5 % Hemmung bzw. für Clarithromycin bei 15 % Hemmung mit ebenfalls einer Standardab-

weichung von 5 % Hemmung (N = 23, Zeitraum 7 Monate) (Tabelle 10-5). Die ermittelte Standardabweichung von 5 % Hemmung ist für biologische Testsysteme ein sehr guter Wert.



**Abb. 10-5:** Boxplot-Darstellung der Stabilität der Hemmung von *Bacillus subtilis* durch die Referenzsubstanzen für die isokratische HPTLC-Trennung und HPTLC/AMD-Gradiententrennung.

**Tabelle 10-4:** Mittelwert, Median, Standardabweichung und Interquartilsabstand für den *Bacillus subtilis* Hemmtest nach isokratischer HPTLC-Trennung (N = 9, Zeitraum 3 Monate).

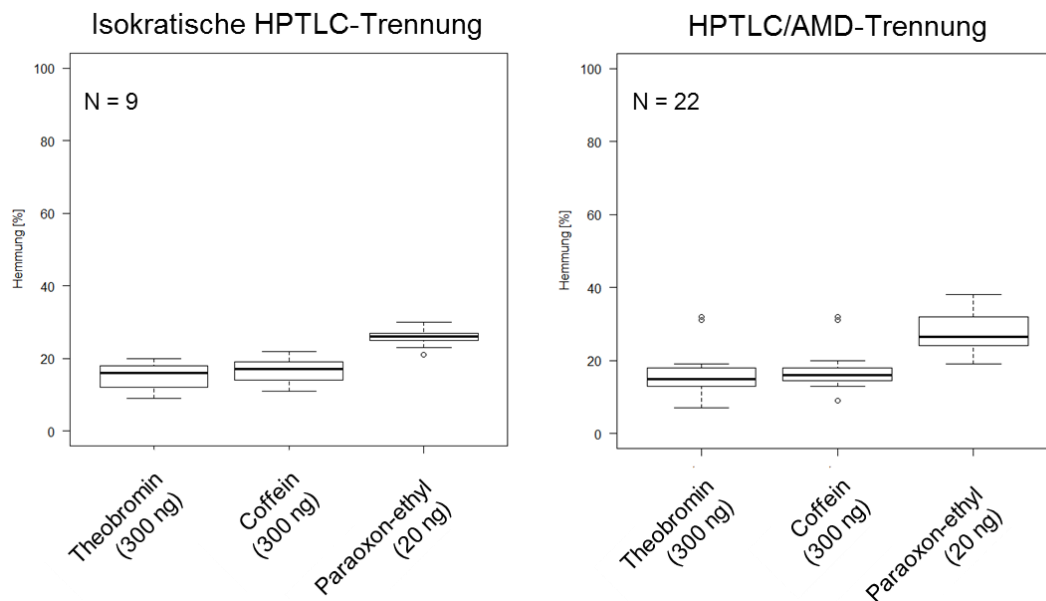
Substanz	R <sub>f</sub>	Mittelwert Hemmung	Median Hemmung	Standardabweichung (absolut)	Interquartilsabstand (IQR)
Mischung aus Doxycyclin und Clarithromycin (je 300 ng)	0,00	12 %	11 %	2,4 %	1,8 %

**Tabelle 10-5:** Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen und Interquartilsabstände für den *Bacillus subtilis*-Hemmtest nach HPTLC/AMD-Trennung (N = 23, Zeitraum 7 Monate).

Substanz	R <sub>f</sub>	Mittelwert Hemmung	Median Hemmung	Standardabweichung	Interquartilsabstand (IQR)
Doxycyclin (300 ng)	0,00	17 %	17 %	5,1 %	7,0 %
Clarithromycin (300 ng)	0,10	15 %	13 %	4,7 %	6,5 %

### 10.2.3 Acetylcholinesterase-Hemmtest

Die Reproduzierbarkeit des Acetylcholinesterase-Hemmtests wurde einerseits mittels Paraoxon-ethyl, einer irreversibel hemmenden Substanz, und andererseits mit den reversibel hemmenden Substanzen Theobromin und Coffein ermittelt. Der Test wurde 9-mal mit isokratischer und 22-mal mit HPTLC/AMD-Trennung durchgeführt. Die Verteilung der ermittelten Hemmwerte sind in den Boxplots in Abb. 10-6 gezeigt. Bei Anwendung der HPTLC/AMD-Trennung lassen sich für Theobromin und Coffein mittlere Hemmwerte von 16 bzw. 17 % Hemmung ermitteln. Für die aufgetragenen 20 ng Paraoxon-ethyl liegt der mittlere Hemmwert bei 28 % Hemmung. Für alle drei Substanzen ergibt sich eine Standardabweichungen von fast 6 % Hemmung (Tabelle 10-7). Diese Werte sind für ein biologisches Testsystem gut. Doch sind für die beiden reversibel hemmenden Substanzen zwei bzw. drei Werte als Ausreißer deklariert. Dies liegt daran, dass die meisten Hemmwerte von Theobromin und Coffein im Vergleich zu Paraoxon-ethyl viel näher beieinander liegen. Trotzdem ist dies ein Hinweis darauf, dass auch bei diesem Wirkungstest das Testprotokoll noch weiter präzisiert werden muss.



**Abb. 10-6: Boxplot-Darstellung der Stabilität der Acetylcholinesterase-Hemmung durch die Referenzsubstanzen für die isokratische HPTLC-Trennung und HPTLC/AMD-Gradiententrennung.**

**Tabelle 10-6: Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen und Interquartilsabstände für den Acetylcholinesterase-Hemmtest nach isokratischer HPTLC-Trennung (N = 9, Zeitraum 3 Monate).**

Substanz	R <sub>f</sub>	Mittelwert Hemmung	Median Hemmung	Standardabweichung (absolut)	Interquartilsabstand (IQR)
Theobromin (300 ng)	0,13	15 %	16 %	3,7 %	6 %
Coffein (300 ng)	0,26	16 %	17 %	3,8 %	5 %
Paraoxon-ethyl (20 ng)	0,79	26 %	26 %	2,5 %	2 %

**Tabelle 10-7: Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen und Interquartilsabstände für den Acetylcholinesterase-Hemmtest nach HPTLC/AMD-Trennung (N = 22, Zeitraum 7 Monate).**

Substanz	R <sub>f</sub>	Mittelwert Hemmung	Median Hemmung	Standardabweichung (absolut)	Interquartilsabstand (IQR)
Theobromin (300 ng)	0,31	16 %	15 %	5,9 %	4,5 %
Coffein (300 ng)	0,42	17 %	16 %	5,4 %	2,8 %
Paraoxon-ethyl (20 ng)	0,70	28 %	27 %	5,7 %	8 %

#### 10.2.4 R<sub>f</sub>-Stabilität der isokratischen HPTLC-Trennung

Zur Kontrolle der Stabilität der Trennung mit der isokratischen HPTLC-Methode wurde ein Mix bestehend aus neun Substanzen mit unterschiedlichen log K<sub>OW</sub>-Werten eingesetzt (siehe Kapitel 4.2). Mit der entwickelten isokratischen Trennmethode lassen sich sieben der neun Verbindungen trennen. Die beiden sehr polaren Verbindungen 1,3,6-Naphthalintrisulfonsäure und 1,5-Naphthalindisulfonsäure verbleiben an der Auftragezone und werden daher für die Qualitätskontrollkarte nicht berücksichtigt. Es wurden 50 HPTLC-Platten in einem Zeitraum von drei Monaten mit der isokratischen Trennmethode entwickelt. Die Boxplots in Abb. 10-7 und die Werte in Tabelle 10-8 zeigen, dass es sich hierbei um eine sehr stabile Trennmethode handelt. Bei der Interpretation der Boxplots ist aber zu beachten, dass die Breite der Boxen nichts über die Trennleistung der Methode aussagt, da zur Ermittlung des R<sub>f</sub>-Wertes nur

die Signalspitze herangezogen wird. Die Breite der Banden ist bei Anwendung der isokratischen Entwicklung höher als bei Verwendung der HPTLC/AMD-Trennung.

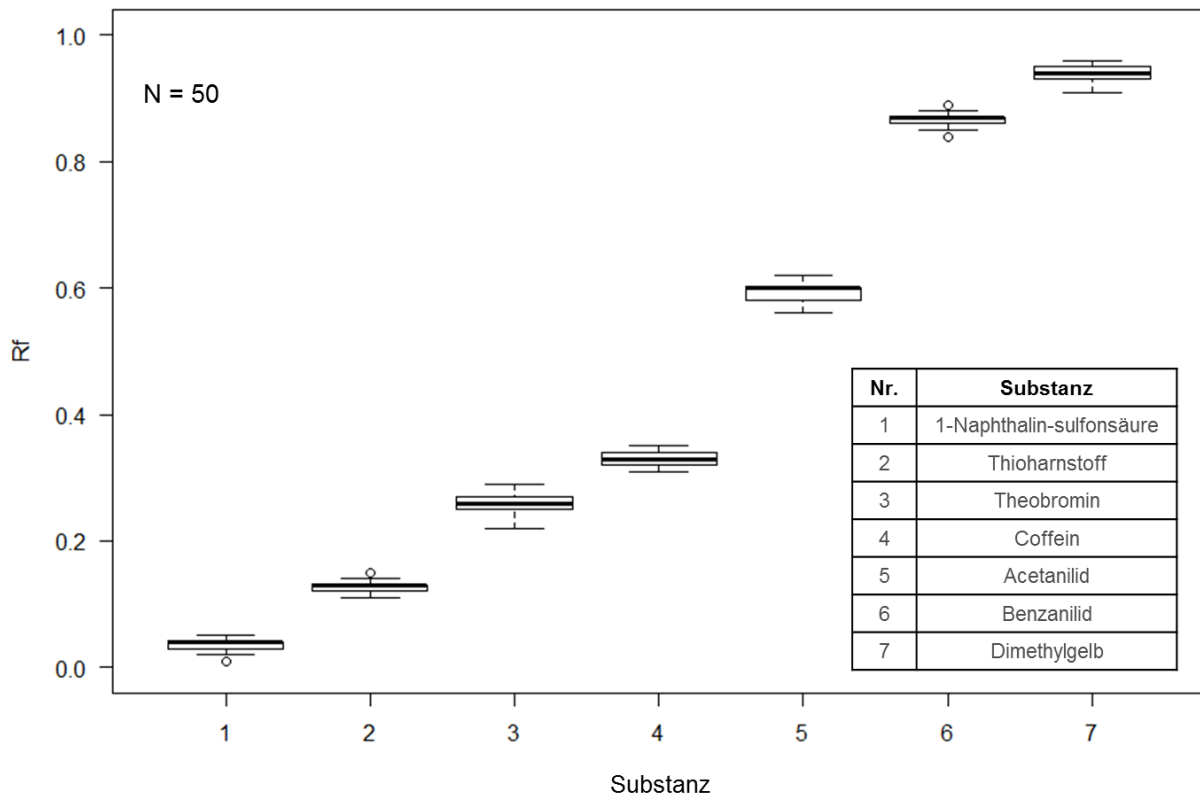


Abb. 10-7: Boxplot-Darstellung der Stabilität der isokratischen HPTLC-Trennung anhand der R<sub>f</sub>-Werte von Referenzsubstanzen.

Tabelle 10-8: Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen und Interquartilsabstände für die Referenzsubstanzen nach isokratischer HPTLC-Trennung (N = 50, Zeitraum 3 Monate).

Nr.	Substanz	R <sub>f</sub> (Mittelwert)	R <sub>f</sub> (Median)	Standard- abweichung	Interquartilsabstand (IQR)
1	1-Naphthalinsulfonsäure	0,03	0,04	0,01	0,01
2	Thioharnstoff	0,13	0,13	0,01	0,01
3	Theobromin	0,26	0,26	0,01	0,02
4	Coffein	0,33	0,33	0,01	0,02
5	Acetanilid	0,60	0,60	0,01	0,02
6	Benzanilid	0,86	0,87	0,01	0,01
7	Dimethylgelb	0,94	0,94	0,01	0,01

### 10.2.5 $R_f$ -Stabilität der Gradientenelution mit HPTLC/AMD

Mit der HPTLC/AMD-Trennmethode lassen sich alle neun Verbindungen voneinander trennen. Es wurden über einen Zeitraum von 7 Monaten 86 HPTLC-Platten mit dieser Methode entwickelt. In Abb. 10-8 ist die  $R_f$ -Stabilität als Boxplots dargestellt. Zwar fällt die Verteilung der  $R_f$ -Werte für Coffein und Acetanilid vergleichsweise breit aus, liegt aber innerhalb des 1,5-fachen des Interquartilsabstands. Des Weiteren sind in dieser Darstellung einige Messwerte als Ausreißer markiert, wie beispielsweise für 1-Naphthalinsulfonsäure (Substanz 3). Doch handelt es sich hierbei um sehr enge Verteilungen des  $R_f$ -Werts, sodass diese, absolut gesehen, kleine Abweichung sich nicht negativ auf das Ergebnis auswirkt.

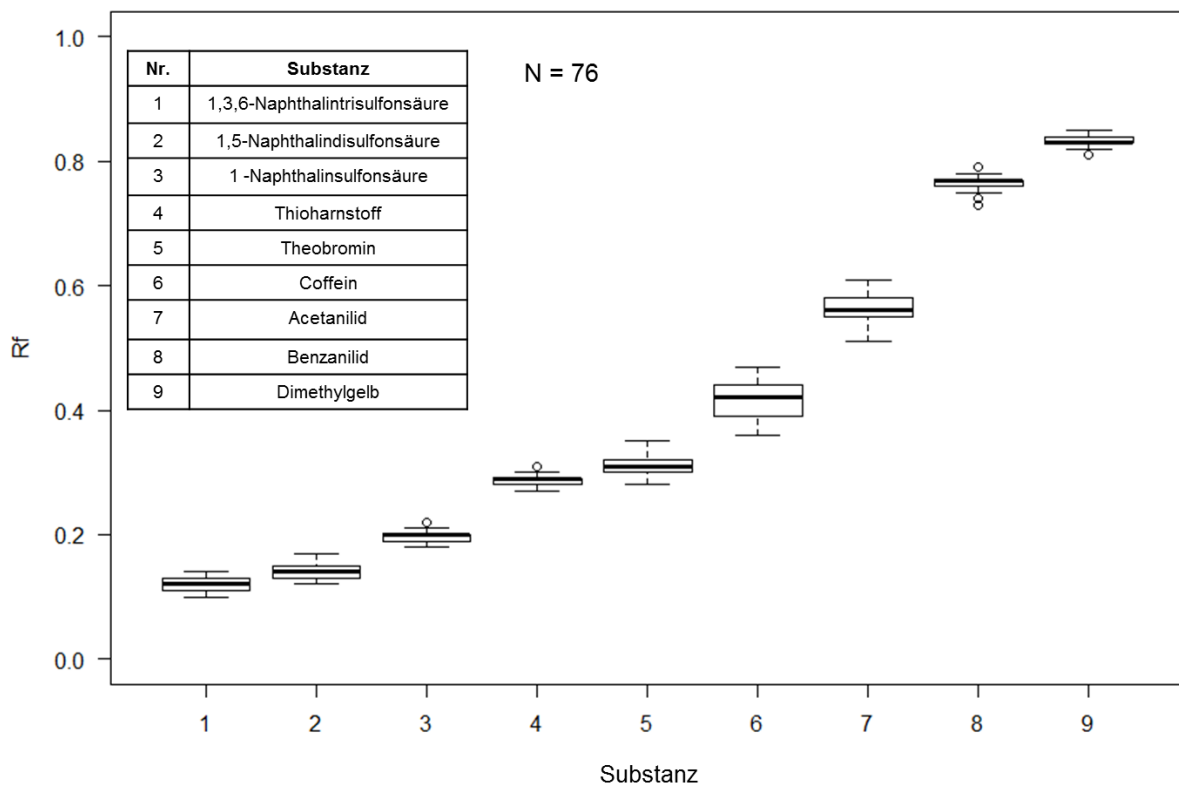


Abb. 10-8: Boxplot-Darstellung der Stabilität der Gradientenelution mit HPTLC/AMD anhand der  $R_f$ -Werte von Referenzsubstanzen.

Tabelle 10-9: Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen und Interquartilsabstände für die Referenzsubstanzen nach HPTLC/AMD-Trennung (N = 76, Zeitraum 7 Monate).

Nr.	Substanz	$R_f$ (Mittelwert)	$R_f$ (Median)	Standard- abweichung	Interquartilsabstand (IQR)
1	1,3,6-Naphthalintrisulfonsäure	0,12	0,12	0,01	0,02
2	1,5-Naphthalindisulfonsäure	0,14	0,14	0,01	0,02
3	1-Naphthalinsulfonsäure	0,20	0,20	0,01	0,01



Nr.	Substanz	R <sub>f</sub> (Mittelwert)	R <sub>f</sub> (Median)	Standard- abweichung	Interquartilsabstand (IQR)
4	Thioharnstoff	0,29	0,29	0,01	0,01
5	Theobromin	0,31	0,31	0,02	0,02
6	Coffein	0,42	0,42	0,03	0,05
7	Acetanilid	0,56	0,56	0,03	0,03
8	Benzanilid	0,77	0,77	0,01	0,01
9	Dimethylgelb	0,83	0,83	0,01	0,01

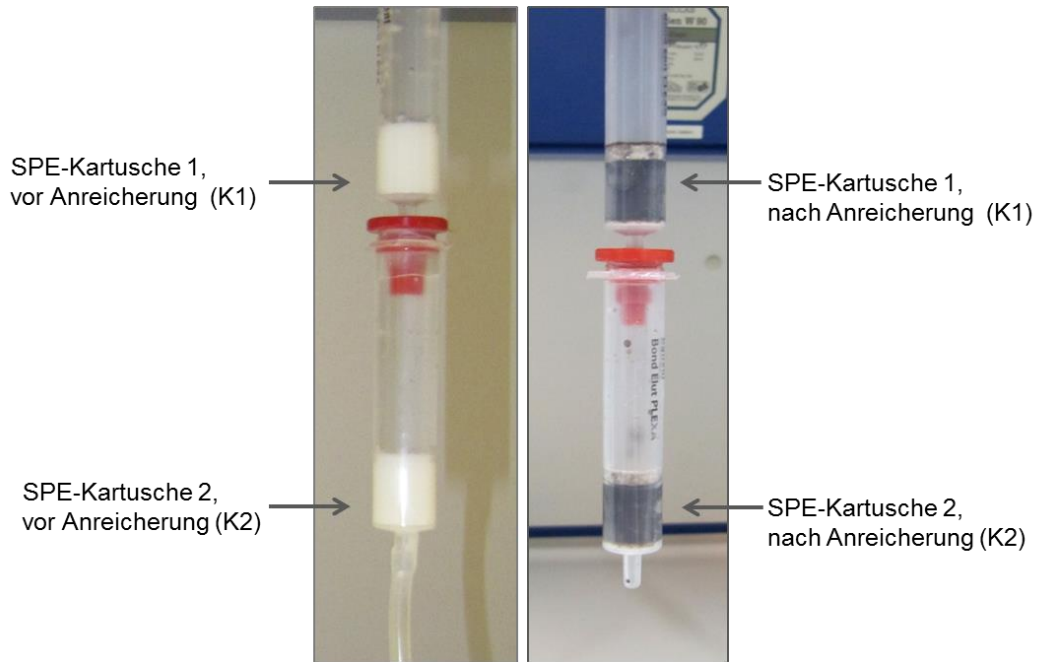
## 10.3 Deponie A

### 10.3.1 Übersicht zu den Proben

Bei der Deponie A handelt es sich um eine Tongrube, welche in den 1960er Jahren mit Abfällen aus der Industrie aufgefüllt und mit einem Tondeckel verschlossen wurde. Zurzeit befindet sich die Deponie in der Sanierung. Das anfallende Sickerwasser wird hierbei über ein mehrstufiges Aufbereitungsverfahren vorgereinigt, bevor es einer kommunalen Kläranlage zugeführt wird.

Die in Tabelle 10-10 aufgelisteten Proben wurden mit der Festphasenextraktion bei pH 2, 7 und 9 angereichert. Es ist bekannt, dass es sich bei den Proben A2 und A4 um gering belastete Wässer handelt. Daher war es erforderlich die Wasserprobe um den Faktor 1000 anzureichern. Zur Kontrolle eines möglichen Durchbruchs von Substanzen bei der Anreicherung, wurden 2 SPE-Kartuschen (K1 und K2) in Reihe geschaltet (Abb. 10-9) und getrennt eluiert.

Die Probe A1 ist stark belastet, so dass bei der Anreicherung die zweite SPE-Kartusche ebenso schwarz von der Probe eingefärbt wurde, wie die erste Kartusche (Abb. 10-9). Zudem war das aufgefangene Eluat noch getrübt. Daher muss auch von einem Durchbruch der zweiten Kartusche ausgegangen werden. Deshalb erfolgte die Untersuchung dieser Probe direkt, ohne Anreicherung und musste teilweise sogar noch verdünnt werden.



**Abb. 10-9: SPE-Extraktion der Probe A1 mit zwei hintereinander geschalteten SPE-Kartuschen, links: vor der Anreicherung, rechts: nach der Anreicherung von A1.**

**Tabelle 10-10: Übersicht der Proben von der Deponie A.**

	Probe	Anreicherungsfaktor	Durchgeführte Analysen
A1	Sickerwasser	Keine Anreicherung	AChe, LB, BS,
A2	Grundwasser	1000	AChe, LB, BS,
A3	Mischwasser vor ARA	200	AChe, LB, BS, NTS
A4	nach ARA	1000	AChe, LB, BS, NTS
FB A2		300	AChe, LB, BS,
FB A3		300	AChe, LB, BS,
FB A4		300	AChe, LB, BS,
TB		300	AChe, LB, BS,

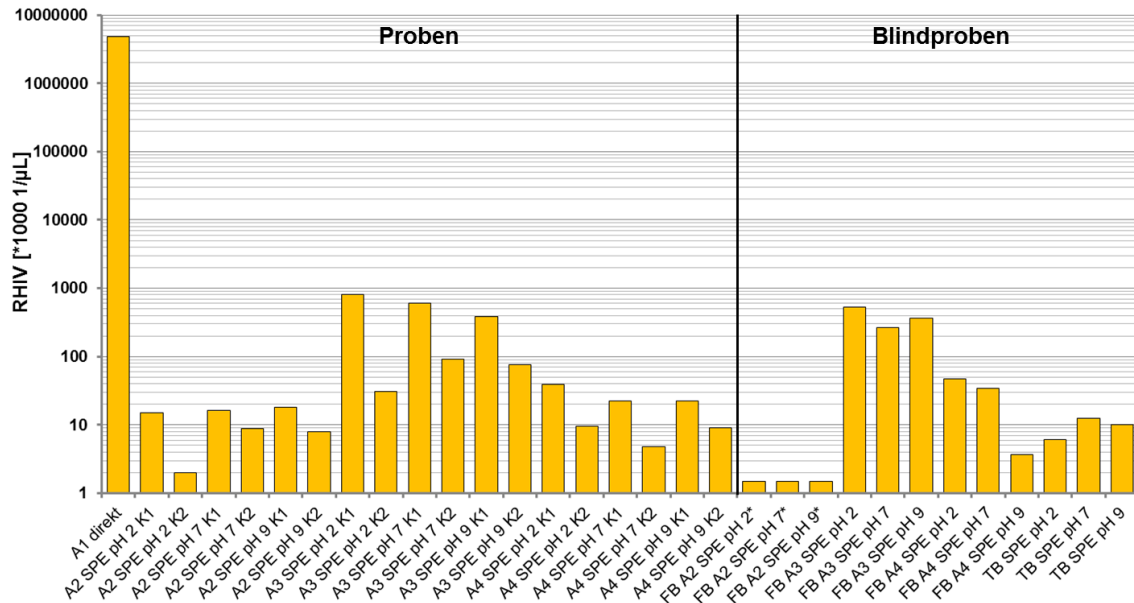
AChe: Acetylcholinesterase, LB: *Aliivibrio fischeri* (Leuchtbakterien), BS: *Bacillus subtilis*,  
 NTS: Non-Target Screening  
 ARA: Abwasserreinigungsanlage, FB: Feldblindprobe, TB: Transportblindprobe

### 10.3.2 Vorscreening

Die erzeugten Extrakte werden zunächst in einem Vorscreening mit dem Leuchtbakterien- und dem *Bacillus subtilis* Hemmtest untersucht. Dazu werden die Extrakte auf eine Fläche von 5 \* 5 mm auf die HPTLC-Platte mit drei unterschiedlichen Volumina aufgetragen.

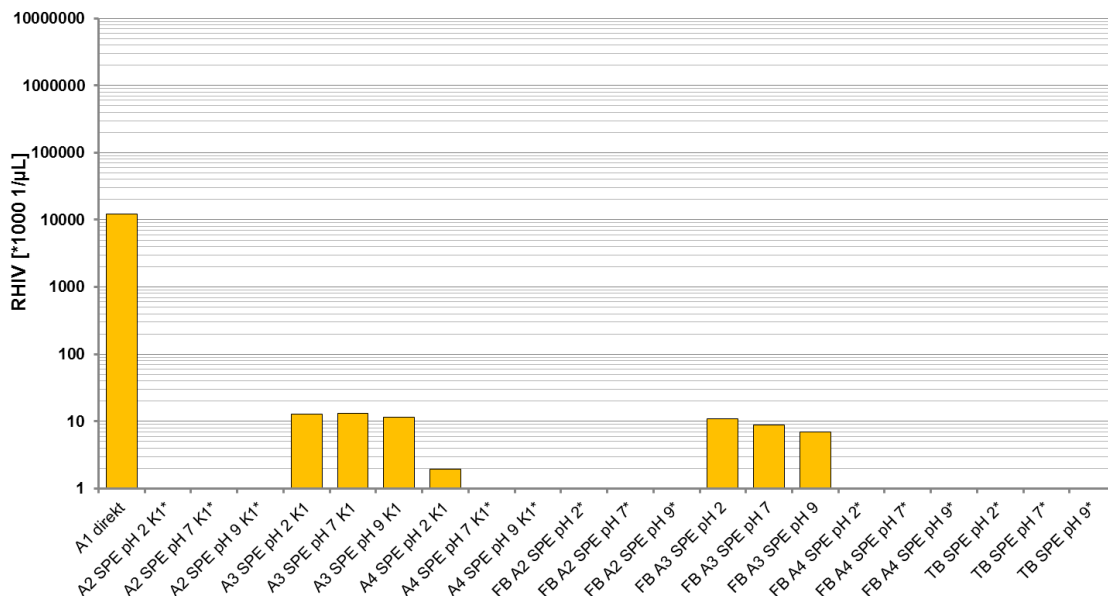
In Abb. 10-10 sind die berechneten RIHV der Biolumineszenz-Hemmung von *Aliivibrio fischeri* als Säulen dargestellt. Das ohne Anreicherung aufgetragene Deponiesickerwasser A1 besitzt auch für belastetes Wasser ein sehr hohes RIHV, wohingegen bei den Extrakten von A2 keine auffällig hohen RIHV zu erkennen sind. Für die Extrakte aus den ersten SPE-Kartuschen (K1) von A3 lassen sich mit RIHV von 400-800 [1000/ $\mu$ L] deutliche Hemmungen detektieren. Für die Extrakte aus den zweiten SPE-Kartuschen (K2) können auch deutliche Wirkungen detektiert werden, welche allerdings um den Faktor 5-30 schwächer ausfallen. Es wird daher von einem Durchbruch der ersten Kartusche ausgegangen. Aufgrund der deutlichen Abschwächung der Hemmung ist es unwahrscheinlich, dass die zweite Kartusche überladen wurde. Zur Erfassung der gesamten Wirkungen in der Probe wurden die Extrakte beider Kartuschen miteinander vereint.

Die Extrakte der ersten SPE-Kartusche der Probe A4 besitzen im Vergleich zu den Extrakten von A3 einen deutlich geringeren RIHV-Wert. Für die Extrakte aus den zweiten SPE-Kartuschen lässt sich nur eine schwache Hemmung (im Bereich der Transportblindproben) detektieren. Es wird daher davon ausgegangen, dass kein Durchbruch der ersten Kartusche stattgefunden hat. Alle SPE-Extrakte der Feldblindprobe FB A3 besitzen eine starke hemmende Wirkung auf die Leuchtbakterien. Eine leicht erhöhte Wirkung lässt sich auch für die pH 2- und pH 7-Extrakte der Feldblindprobe FB A4 feststellen. Bereits das Wasser der auffälligen Feldblindproben ist gelblich eingefärbt. Es sollte daher überprüft werden, wie die Feldblindproben erzeugt wurden und die Quellen der Kontaminationen identifiziert werden. Die Transportblindprobe TB und FB A2 zeigen keine auffällig hohen RIHV bzw. die Hemmung war zu schwach für eine Auswertung. Für die Transportblindprobe wurde Laborreinstwasser verwendet.



**Abb. 10-10: RIHV der Biolumineszenzhemmung von *Aliivibrio fischeri* als Summenwirkung für die untersuchten SPE-Extrakte (\*detektierte Hemmung ist zu schwach für eine RIHV-Auswertung).**

Die Abb. 10-11 zeigt die RIHV-Werte der Hemmung von *Bacillus subtilis* durch die auf Flächen von 25 mm<sup>2</sup> aufgetragenen Proben. Für das Sickerwasser A1 ist eine starke Hemmung mit ca. 10000 [1000/ $\mu\text{L}$ ] zu beobachten. Des Weiteren wird für die Extrakte von A3 eine Hemmung von ca. 10 [1000/ $\mu\text{L}$ ] detektiert und leicht abgeschwächt in der dazugehörigen Feldblindprobe FB A3. Eine sehr schwache Hemmung ist im pH 2-Extrakt der Probe A4 zu sehen.



**Abb. 10-11: RIHV der Hemmung von *Bacillus subtilis* als Summenwirkung für die untersuchten SPE-Extrakte (\* keine Hemmung detektiert).**

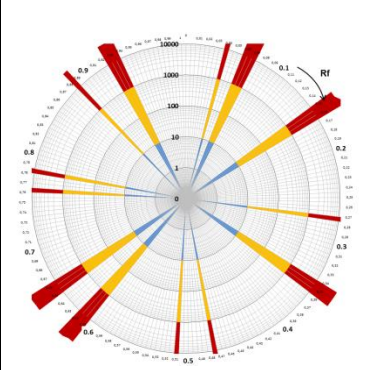
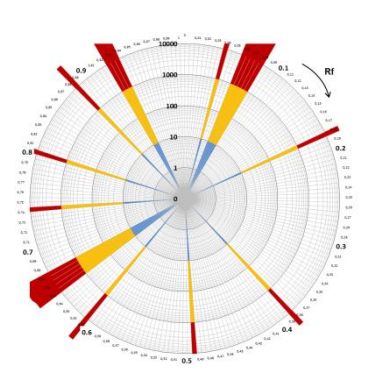
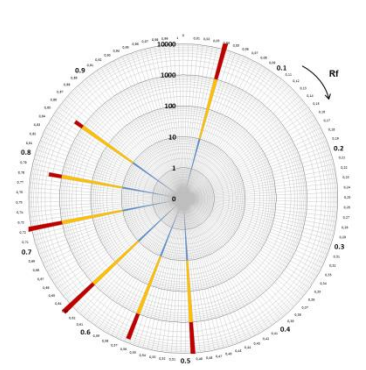
### 10.3.3 Deponiesickerwasser (A1)

#### Isokratische Trennung

Zur Überprüfung, welche Fraktionen bei der SPE durchbrechen, fand ein Vergleich der Biolumineszenz-Hemmung nach der isokratischen Trennung zwischen der Direktauftragung und der SPE Anreicherung (pH 2, AF = 20) des Sickerwassers statt.

Die entsprechenden RIHV-Polardiagramme sind in Tabelle 10-11 gegenübergestellt. Bei der Direktauftragung konnte für 13 Fraktionen sehr hohe RIHV-Werte ermittelt werden. Die Banden sind dabei über die komplette Laufstrecke verteilt. Anhand der RIHV-Werte lassen sich alle wirkenden Fraktionen als sehr stark belastet eingestufen. Bei der Auswertung des Sickerwasser-Extrakts der Kartusche 1 konnten nur noch 11 Fraktionen nachgewiesen werden. Die Banden bei  $R_f = 0,27$  und  $R_f = 0,51$  fehlen im Vergleich zur Direktauftragung. Im Extrakt der zweiten Kartusche konnte nur für 7 Substanzbanden eine Hemmung ermittelt werden. Die Banden bei  $R_f = 0,06$ ,  $R_f = 0,18$ ,  $R_f = 0,38$  und  $R_f = 0,93$  treten hier nicht mehr auf. Dies bedeutet zum einen, dass in Kartusche 1 sieben Fraktionen durchgebrochen sind und zum anderen, dass bei der SPE-Anreicherung zwei Banden nicht angereichert wurden. Dieses Ergebnis zeigt, dass wenn möglich eine Direktauftragung der Wasserprobe zur Vermeidung von Verlusten erfolgen sollte. Zusätzlich zu den 13 biolumineszenzhemmenden Fraktionen lässt sich nach der isokratischen Trennung an der Auftragszone noch eine starke Hemmung der Biolumineszenz beobachten.

**Tabelle 10-11: Übersicht der RIHV-Polardiagramme für die Direktauftragung und den SPE-Kartuschen 1 und 2 der Sickerwasserprobe A1. Dargestellt sind die Wirkungen auf *Aliivibrio fischeri*.**

	Direktauftragung	SPE pH 2 Kartusche 1	SPE pH 2 Kartusche 2
Direkte Auftragung			

In Tabelle 10-12 sind die Ergebnisse der WBA-Untersuchung mit isokratischer Trennung für die Probe A1 bei direkter Auftragung gegenübergestellt. Die starke Eigenfluoreszenz über weite Bereiche der Trennstrecke stört die Detektion der Acetylcholinesterase-Hemmung, sodass eine Wirkung nicht eindeutig nachzuweisen ist.

Tabelle 10-12: Übersicht der RIHV-Polardiagramme bzw. RIAV-Polardiagramme für die Probe A1 mit isokratischer Entwicklung.

	Biolumineszenzhemmung	<i>Bacillus subtilis</i> -Hemmtest	Acetylcholinesterase-Hemmung
Direkte Auftragung			Kein Nachweis aufgrund von Störungen durch Eigenfluoreszenz

HPTLC/AMD-Trennung

Mit der HPTLC/AMD-Methode lässt sich die Sickerwasserprobe auf 15 Leuchtbakterienhemmende-Fractionen auftrennen (siehe Tabelle 10-13). Auch hier verteilen sich die Fraktionen über die gesamte Trennstrecke. Eine Aussage über die Verschiebung der Banden durch die Gradientenentwicklung verglichen mit der isokratischen Entwicklung kann nicht getroffen werden. Auch nach der HPTLC/AMD-Trennung ist eine *Bacillus subtilis* hemmende Bande bei  $R_f = 0,2$  zu erkennen. Genauso ist wieder eine starke Eigenfluoreszenz über weite Bereiche der Trennstrecke zu beobachten und stört die Detektion der Acetylcholinesterase-Hemmung. Bei der qualitativen Untersuchung im Weißlicht anhand von weißen Banden vor einem blauen Hintergrund sind auch keine Hemmbanden zu erkennen.

Tabelle 10-13: Übersicht der RIHV- bzw. RIAV-Polardiagramme für die Probe A1 mit HPTLC/AMD-Trennung.

	Biolumineszenzhemmung	<i>Bacillus subtilis</i> -Hemmtest	Acetylcholinesterase-Hemmung
Direkte Auftragung			Kein Nachweis aufgrund von Störungen durch Eigenfluoreszenz

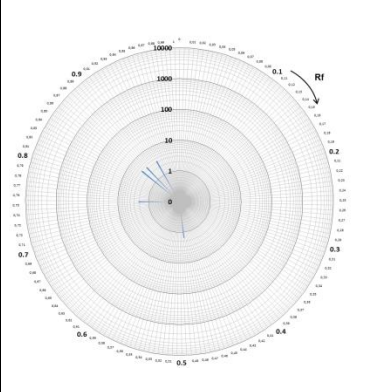
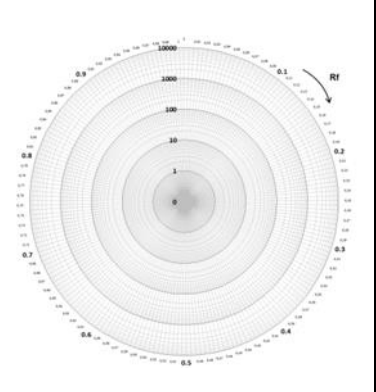
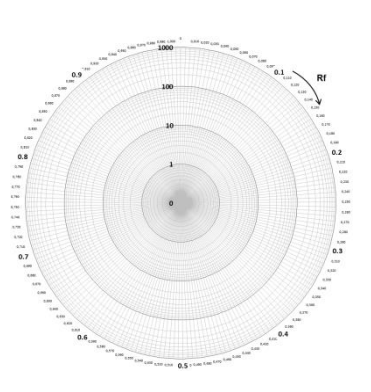
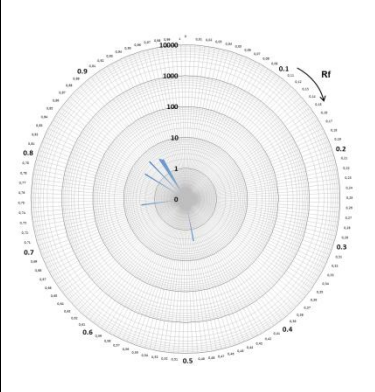
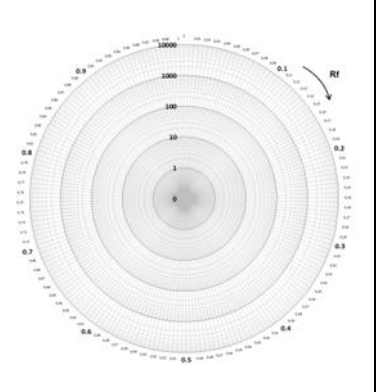
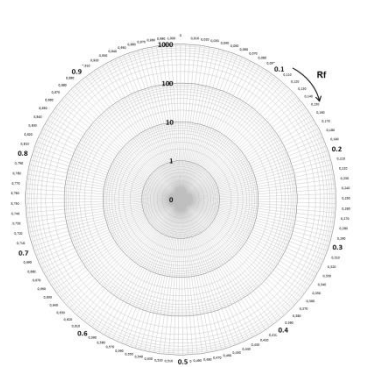
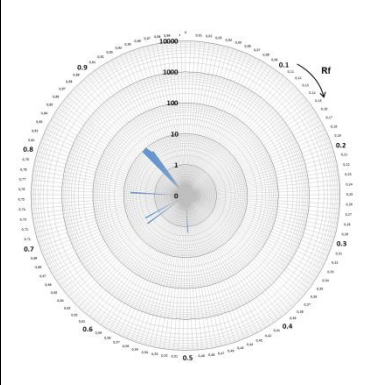
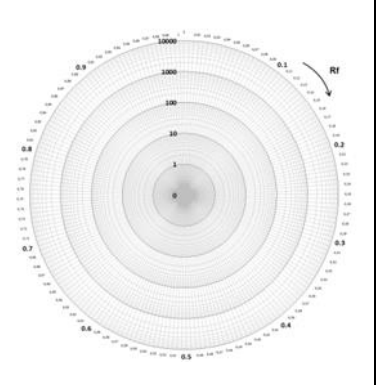
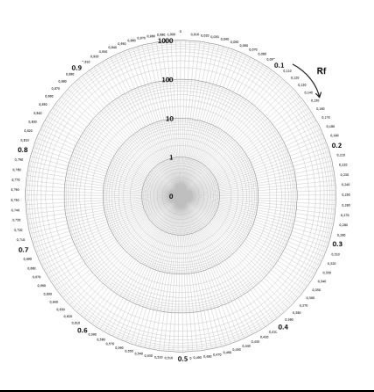


### 10.3.4 Vorfeldmessstelle (A2)

#### Isokratische Trennung

In der Grundwasserprobe A2 tritt nur eine geringe Biolumineszenzhemmung (RIHV-Werte < 10 [1000/ $\mu$ L]) auf. Weder beim *Bacillus subtilis*-Hemmtest noch bei der Acetylcholinesterase wird eine Wirkung beobachtet.

Tabelle 10-14: Übersicht der RIHV- bzw. RIAV-Polardiagramme für die Probe A2.

pH	Biolumineszenzhemmung	<i>Bacillus subtilis</i> -Hemmtest	Acetylcholinesterase-Hemmung
2			
7			
9			

HPTLC/AMD-Trennung

Die HPTLC/AMD-Methode trennt die wenigen Biolumineszenzhemmenden noch etwas weiter auf. Wie bei der isokratischen Trennung ist die Wirkung mit RIHV < 10 [1000/μL] für alle Hemmbanden gering. Beim *Bacillus subtilis*-Hemmtest können keine Hemmbanden beobachtet werden.

Da beim Acetylcholinesterase-Hemmtest nach der isokratischen Trennung keine Wirkungen detektiert werden konnten, erfolgte keine Untersuchung nach der HPTLC/AMD-Trennung.

**Tabelle 10-15: Übersicht der RIHV- bzw. RIAV-Polardiagramme für die Probe A2.**

pH	Biolumineszenzhemmung	<i>Bacillus subtilis</i> -Hemmtest	Acetylcholinesterase-Hemmung
2			keine zusätzliche Untersuchung, da negativ bei isokratischer Trennung
7			keine zusätzliche Untersuchung, da negativ bei isokratischer Trennung
9			keine zusätzliche Untersuchung, da negativ bei isokratischer Trennung



**10.3.5 Proben A3 (vor Abwassereinigung) und A4 (nach Abwasserreinigung)**

Isokratische Trennung

Mit dem Leuchtbakterien-Hemmtest sind einige Hemmbanden in der Probe vor der ARA (A3) zu erkennen. Die meisten von ihnen liegen im  $R_f$ -Bereich von  $R_f = 0,75-1,00$ . Mit einem RIHV von ca. 100 [1000/ $\mu$ L] sind diese typisch für belastetes Abwasser. Durch die ARA wird deren Wirkung um den Faktor 10 reduziert bzw. sie sind nicht mehr nachweisbar (A4). In der Probe vor der ARA ist zudem an der Auftragezone eine schwache Hemmung von *Bacillus subtilis* zu erkennen. Nach der ARA ist diese Hemmung nicht mehr zu beobachten. Die Probe A3 zeigt zudem eine deutliche Hemmbande beim Acetylcholinesterase-Hemmtest, die nach der ARA ebenfalls nicht mehr detektierbar ist.

**Tabelle 10-16: Vergleich der RIHV-Polardiagramme bzw. RIAV-Polardiagramme für das Extrakt SPE pH 2 vor und nach der Abwassereinigungsanlage (ARA) der Deponie.**

	<b>Biolumineszenzhemmung</b>	<b><i>Bacillus subtilis</i>-Hemmtest</b>	<b>Acetylcholinesterase-Hemmung</b>
<b>VARA</b>			
<b>NARA</b>			

HPTLC/AMD-Trennung

Die Leuchtbakterien hemmenden Fraktionen nach der isokratischen Trennung für das pH 2 SPE-Extrakt der Probe vor der ARA (A3) werden durch die HPTLC/AMD über die gesamte Trennstrecke von 7 auf 16 Banden verteilt. Auch nach der HPTLC/AMD-Trennung besitzen diese einen RIHV-Wert von ca. 100 [1000/ $\mu$ L]. Die Abschwächung der Wirkung um den Fak-

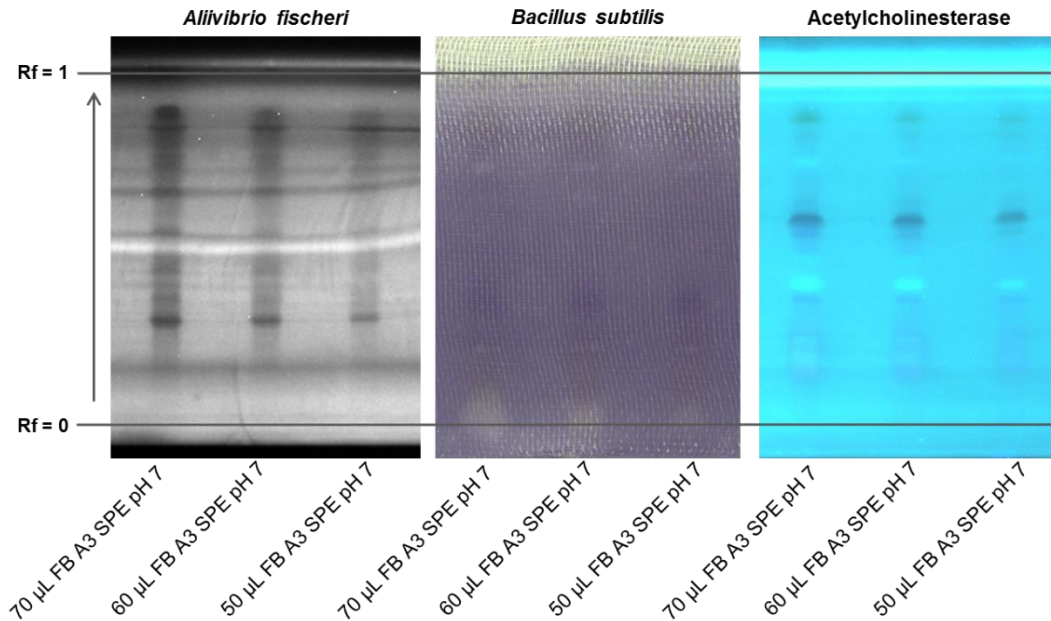
tor 10 (A4) wird ebenfalls bestätigt. Die Fraktion bei  $R_f = 0,1$  besitzt zusätzlich eine hemmende Wirkung auf *Bacillus subtilis*. Sehr schwach findet sich diese Wirkung auch in der Probe nach der ARA (A4). Im pH 2 SPE-Extrakt lassen sich zwei Acetylcholinesterase hemmende Fraktionen detektieren. Beide Banden besitzen ein RIAV von 11 bzw. 12 [1000/ $\mu$ L]. Die Hemmung wird durch die ARA vollständig eliminiert.

Tabelle 10-17: Vergleich der RIHV-Polardiagramme bzw. RIAV-Polardiagramme für das Extrakt SPE pH 2 vor und nach der Abwassereinigungsanlage (ARA) der Deponie.

	Biolumineszenzhemmung	<i>Bacillus subtilis</i> -Hemmtest	Acetylcholinesterase-Hemmung
<b>VARA</b>			
<b>nARA</b>			keine zusätzliche Untersuchung, da negativ bei isokratischer Trennung

### 10.3.6 Proben FB A2 und TB

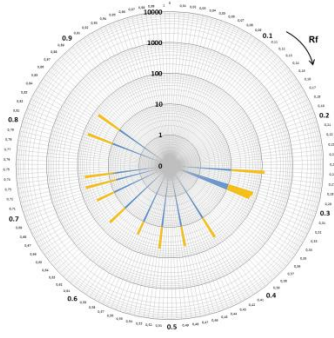
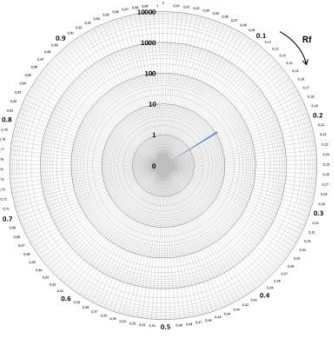
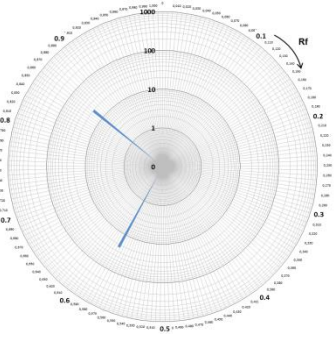
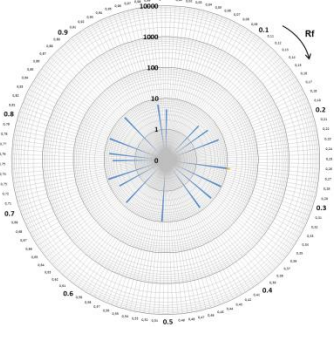
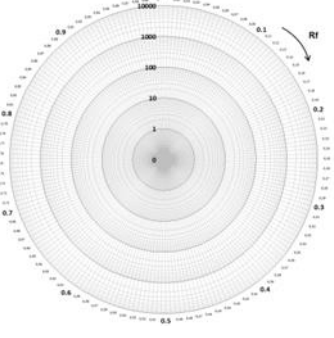
Für die Feldblindprobe FB A2 und die Transportblindprobe TB konnten keine Auffälligkeiten in allen Wirkungstest gefunden werden. Dagegen zeigte die Feldblindprobe FB A3 beim Leuchtbakterien, *Bacillus subtilis* und Acetylcholinesterase-Hemmtest mehrere Hemmbanden (Abb. 10-12).



**Abb. 10-12: Untersuchung des SPE pH 7-Extrakts der Feldblindprobe FB A3 mit den HPTLC-WBA-Methoden.**

Die Auswertung von FB A3 zeigt eine große Ähnlichkeit des Wirkungsmusters mit der Probe A3. Eine Verschleppung bei der Probenahme ist daher nicht auszuschließen. In den SPE-Extrakten der Feldblindprobe A4 sind im Leuchtbakterientest einige Hemmbanden (RIHV < 10 [1000/µL]) zu erkennen. Für die anderen Wirkungstests werden keine Hemmbanden detektiert. In der Tabelle 10-18 sind die RIHV bzw. RIAV von FB A3 und FB A4 gegenübergestellt.

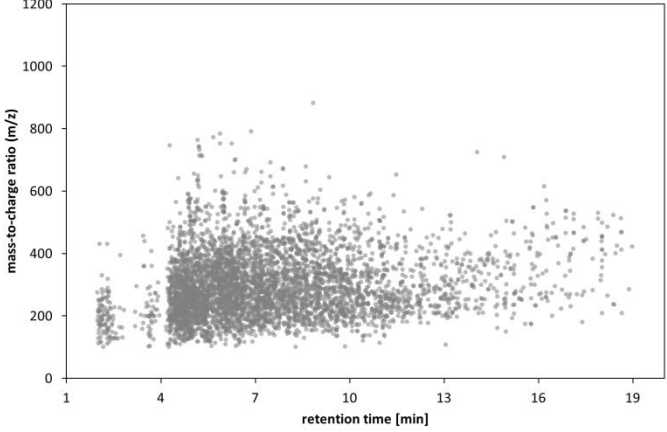
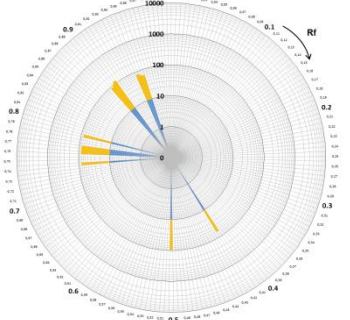
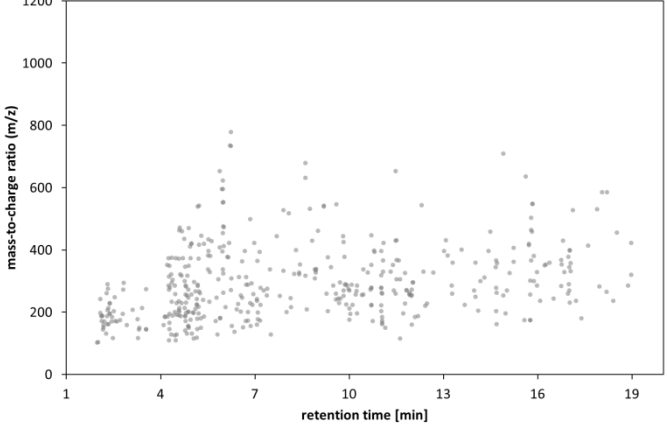
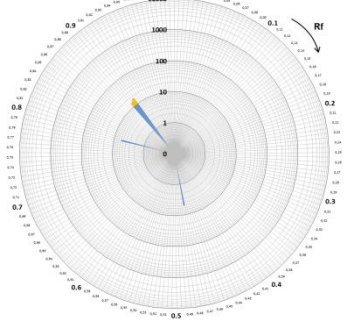
Tabelle 10-18: Vergleich der RIHV-Polardiagramme bzw. RIAV-Polardiagramme nach HPTLC/AMD-Trennung für die SPE pH 2 Extrakt der Feldblindproben vor (FB A3) und nach der Abwassereinigungsanlage (FB A4).

	Biolumineszenzhemmung	<i>Bacillus subtilis</i> -Hemmtest	Acetylcholinesterase-Hemmung
<b>FB A3</b>			
<b>FB A4</b>			keine zusätzliche Untersuchung, da negativ bei isokratischer Trennung

### 10.3.7 Non-Target Screening

Die Wasserproben A3 und A4 wurden direkt mittels HPLC-HRMS untersucht und die erhaltenen Masse-Retentionszeit Diagramme den Ergebnissen der Biolumineszenzhemmung in Tabelle 10-19 gegenübergestellt. Zu beachten ist, dass für die Bestimmung der Biolumineszenzhemmung der SPE-Extrakt verwendet worden ist.

**Tabelle 10-19: Gegenüberstellung der Ergebnisse des Non-Target Screenings mit denen der Biolumineszenzhemmung vor und nach Abwasserbehandlung**

	Masse-Retentionszeit-Diagramm	Biolumineszenzhemmung
<b>VARA</b>		
<b>NARA</b>		

Anhand dieser Gegenüberstellung ist der Effekt der Abwasserbehandlung deutlich zu erkennen. Die Anzahl der Komponenten wird deutlich reduziert und damit auch die Wirkung gegenüber Leuchtbakterien. Aus diesem Vergleich wird die komplementäre Information durch die WBA ersichtlich. Die Einzelstoff- bzw. Non-Target Analytik liefert eine Vielzahl an Einzelinformationen (Komponenten) über die Probe, während die WBA diese anhand ihrer Wirkung gewichtet und damit priorisiert.

### 10.3.8 Zusammenfassung und Fazit Deponie A

Das Deponiesickerwasser der Probe A1 ist so stark belastet, dass es direkt bzw. teilweise sogar verdünnt aufgetragen werden musste. Beim HPTLC-Biolumineszenz-Hemmtest konnte eine Vielzahl an Hemmbanden mit einer sehr starken Wirkung detektiert werden. Auch beim *Bacillus subtilis*-Hemmtest ist eine sehr stark wirkende Fraktion zu beobachten. Aufgrund der Eigenfluoreszenz wurde die Detektion der Acetylcholinesterase-Hemmung gestört und konnte mit der bisherigen Auswertemethode nicht ausgewertet werden.



Eine deutliche Abnahme der Biolumineszenz-Hemmung ist nach der Behandlung durch die Abwasserreinigungsanlage zu sehen. Mit RIHV-Werten um 100 [1000/ $\mu$ L] liegen die Werte erfahrungsgemäß im Bereich von kommunalen Abwässern. Bei einem Vergleich der Hemmbanden mit denen aus dem Deponiesickerwasser ist zu beachten, dass das Sickerwasser nicht angereichert wurde und daher keine Diskriminierung aufgrund der Wiederfindung, insbesondere im Rf-Bereich 0 - 0,3, erfolgt. Auch wurde eine schwach wirkende Fraktion auf *Bacillus subtilis* gefunden. Zudem werden zwei Acetylcholinesterase hemmende Fraktionen mit einem RIAV von 11 bzw. 12 [1000/ $\mu$ L] detektiert. Diese Werte sind als mittelstark einzustufen.

Nach der Aktivkohlfiltration wird die Anzahl der Hemmbanden nochmals deutlich reduziert auf RIHV-Werte, welche im typischen Bereich von Oberflächengewässer liegen. Eine Hemmung von *Bacillus subtilis* oder der Acetylcholinesterase wurde nicht gefunden. Anhand dieser Ergebnisse kann von einer funktionierenden Aufarbeitung des Sickerwassers ausgegangen werden.

Die Probe aus dem Überwachungsbrunnen A2 zeigt keine Auffälligkeit bei allen drei eingesetzten Biotestsystemen. Anhand dieser Daten kann davon ausgegangen werden, dass dieser Brunnen nicht von der Deponie beeinflusst wird.

Da nach der Abwasserreinigungsanlage die Belastung immer noch hoch ist und sogar zwei Banden mit potentiell neurotoxischer Wirkung detektiert wurden, ist die Elimination dieser Wirkung über den Aktivkohlfilter entscheidend. Daher sollte möglichst frühzeitig ein Durchbruch von neurotoxischen Substanzen aufgrund einer hohen Beladung der Aktivkohle erkannt werden. Bei der Untersuchung der Abwasserreinigungsanlage mit der WBA könnte sichergestellt werden, dass der Aktivkohlefilter noch seine Eliminationsleistung für relevante, aber bislang unbekannte Verbindung besitzt.

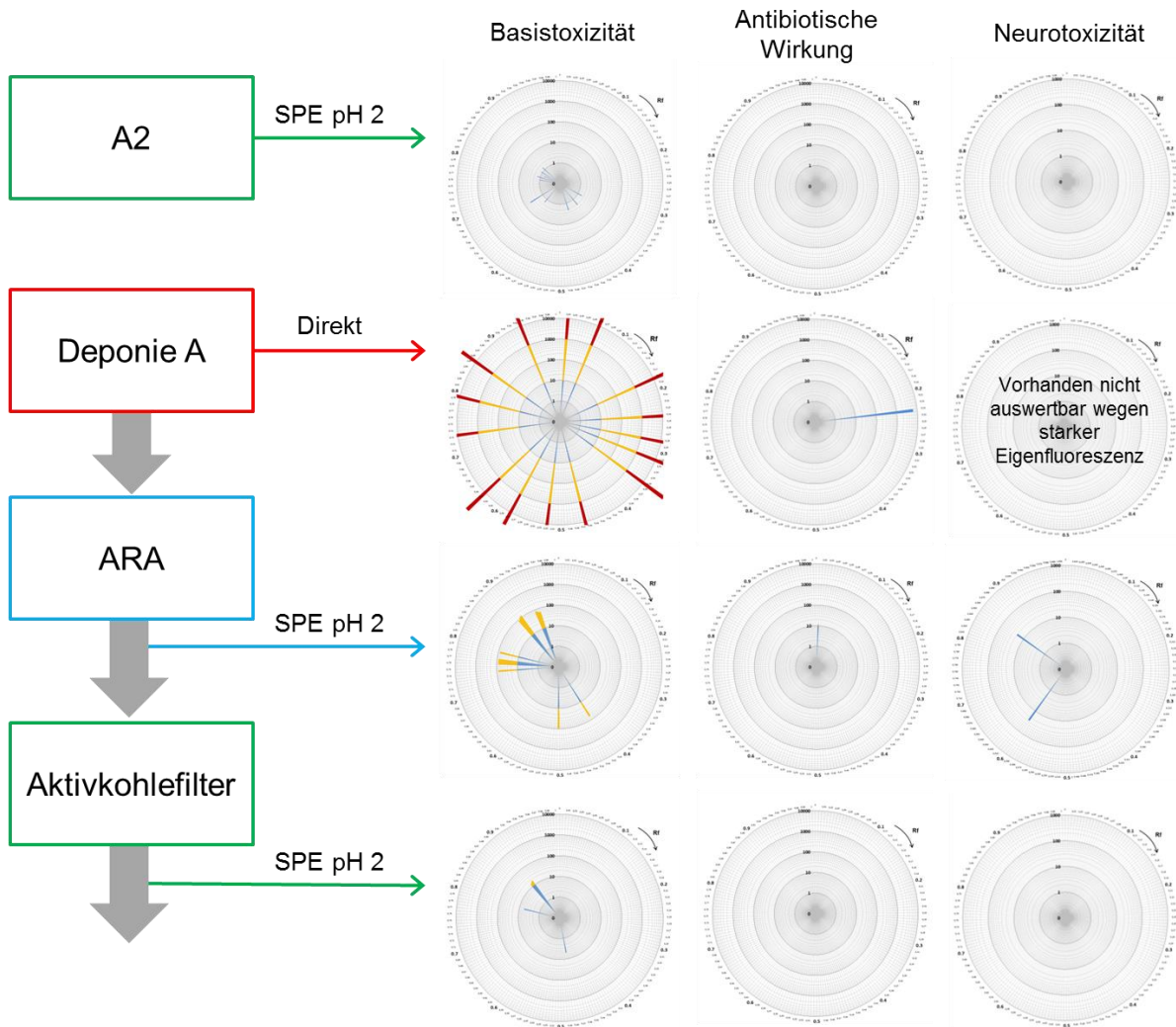


Abb. 10-13: Zusammenfassung der Ergebnisse für die Proben von der Deponie B anhand der SPE-pH 2-Extrakte nach HPTLC/AMD-Trennung.

## 10.4 Deponie C

### 10.4.1 Übersicht zu den Proben

Die Deponie C wurde in den 1950er zur Ablagerung von kommunalen sowie industriellen Abfällen genutzt. Inzwischen wurde die Deponie durch Auskoffern der abgelagerten Abfälle saniert. Untersucht wurde das Grundwasser aus dem Zustrom in die Deponie und aus dem Abstrom.

Die in Tabelle 10-20 aufgelisteten Proben wurden mit der Festphasenextraktion bei pH 2, 7 und 9 angereichert. Da es sich bei der Probe C1 aus dem Zustrom der sanierten Deponie um gering belastetes Wasser handelt, war es erforderlich die Wasserproben C1 um den Faktor 1000 anzureichern. Zur Kontrolle eines möglichen Durchbruchs von Substanzen bei der Anreicherung der Proben C1 und C2 wurden 2 SPE-Kartuschen (K1 und K2) in Reihe geschaltet und getrennt eluiert.

**Tabelle 10-20: Übersicht der Proben von der Deponie C**

	Probe	Anreicherungsfaktor	Durchgeführte Analysen
C1	Sauberwasser	1000	AChE, LB, BS, NTS
FB C1		200	AChE, LB, BS, NTS
FS C1		200	AChE, LB, BS
C2	Sickerwasser	200	AChE, LB, BS
FB C2		200	AChE, LB, BS
FS C2		200	AChE, LB, BS

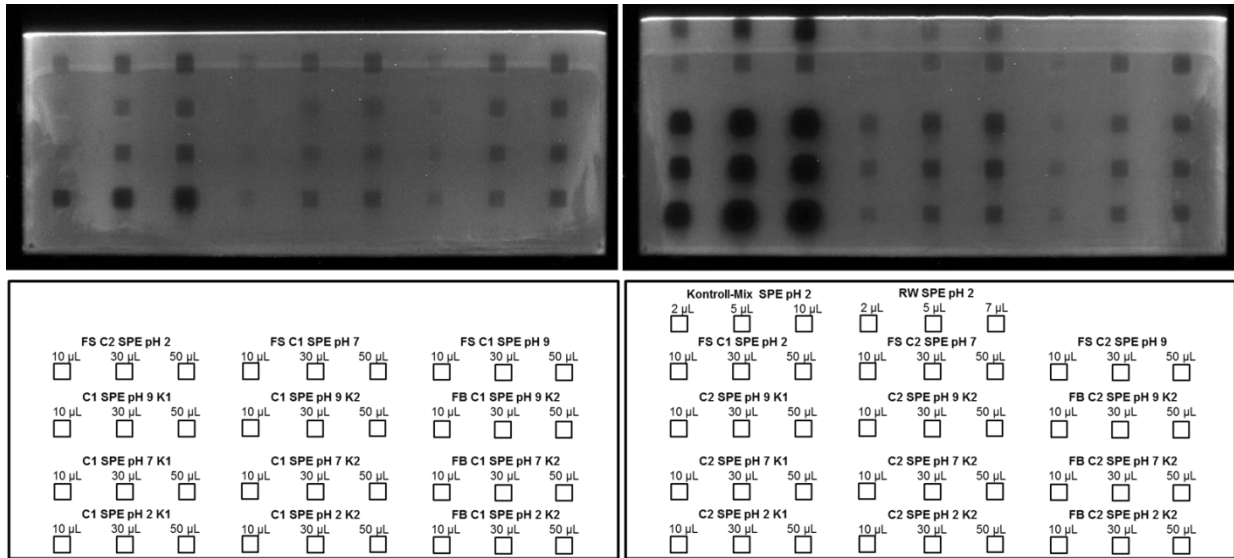
AChE: Acetylcholinesterase, LB: *Aliivibrio fischeri* (Leuchtbakterien), BS: *Bacillus subtilis*,  
 NTS: Non-Target Screening  
 AF: SPE Anreicherungsfaktor, FB: Feldblindprobe, FS: Spülblindprobe

### 10.4.2 Vorscreening

Die erzeugten Extrakte wurden zunächst in einem Vorscreening mit dem Leuchtbakterien-Hemmtest untersucht. Dazu wurden die Extrakte auf eine Fläche von 5 \* 5 mm auf die HPTLC-Platte mit drei unterschiedlichen Volumina aufgetragen. Die Abb. 10-14 zeigt die Plattenaufnahme der Hemmung (oben) und das Schema der Probenauftragung (unten) für die Proben C1, FB C1, FS C1, C2, FB C2 und FS C2. Dabei erfolgte die Auftragung der drei

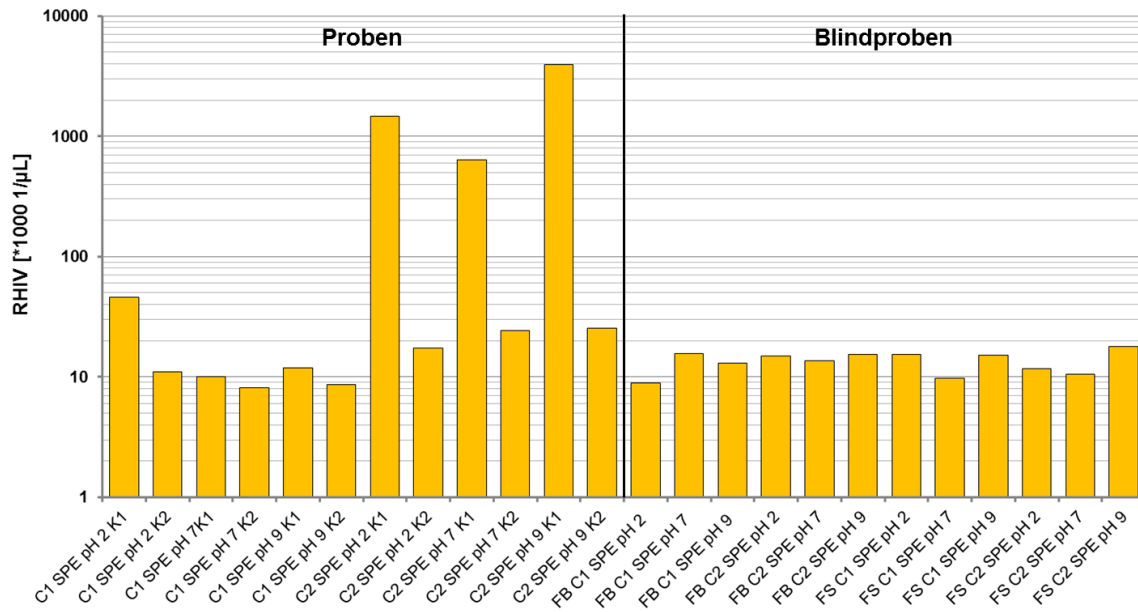


Extraktvolumina in Blöcken für die Proben und Kartuschen zeilenförmig von links unten nach rechts oben. Für jeden pH-Wert 2, 7 und 9 der Anreicherung ist die Reihenfolge K1 und K2.



**Abb. 10-14: Summenwirkung der SPE-Extrakte auf *Aliivibrio fischeri* (K1: SPE-Kartusche 1, K2: SPE-Kartusche 2).**

In Abb. 10-15 sind die Ergebnisse der RIHV-Werte für alle Proben der Tabelle 16 als Säulendiagramm graphisch dargestellt. Deutlich ist die stärkere Belastung der Probe C2, verglichen mit der Probe C1, zu erkennen. Für die Anreicherung der Probe C2 zeigt sich zudem ein Durchbruch der Anreicherungskartusche K1 bei allen pH-Werten. Deshalb wurden für diese Probe die Extrakte von K1 und K2 für die weiteren Untersuchungen zusammengefasst. Bei der Probe C1 zeigt sich zudem ein Unterschied in der Hemmung für die drei pH-Werte. Die Summenwirkung des pH 2 Extraktes ist deutlich größer als die von pH 7 und pH 9. Die Wirkung für die pH 7 bzw. pH 9 Extrakte liegt im Bereich der Feldblindproben.



**Abb. 10-15: RIHV der Biolumineszenz-Hemmung bei Flächenauftragung (ohne Trennung, Summenwirkung) für untersuchte SPE-Extrakte.**

#### 10.4.3 Probe von der Vorfeldmesstelle C1

Beim HPTLC-Biolumineszenz-Hemmtest zeigen sich für das SPE pH 2 Extrakt einige deutliche Hemmbanden, die nicht oder nur sehr schwach in den beiden anderen Extrakten auftreten. Damit eine Vergleichbarkeit der RIHV, trotz des größeren Anreicherungsfaktors erhalten bleibt, muss bei der Berechnung der RIHV für die Probe C1 die Auftragevolumina mit dem Faktor 5 multipliziert werden. Der Faktor ergibt sich aus dem Quotient der beiden Anreicherungsfaktoren. Daher ergeben sich auch für die deutlichen Hemmbanden kleine RIHV. Für alle Extrakte der Probe C1 sind die ermittelten RIHV < 10 [1000/μL], ein typischer Wert für saubere Wässer. Das ermittelte Hemmmuster stimmt mit der Probe C2 nicht überein.

Mit dem *Bacillus subtilis*-Hemmtest konnten keine auffälligen Banden detektiert werden. Ebenso konnte mit dem Acetylcholinesterase-Hemmtest in den pH 7 und pH 9 SPE-Extrakten keine Hemmung nachgewiesen werden. Die wenigen Hemmbanden aus dem pH 2 Extrakt waren zu schwach, um aus diesen die RIAV zu ermitteln.

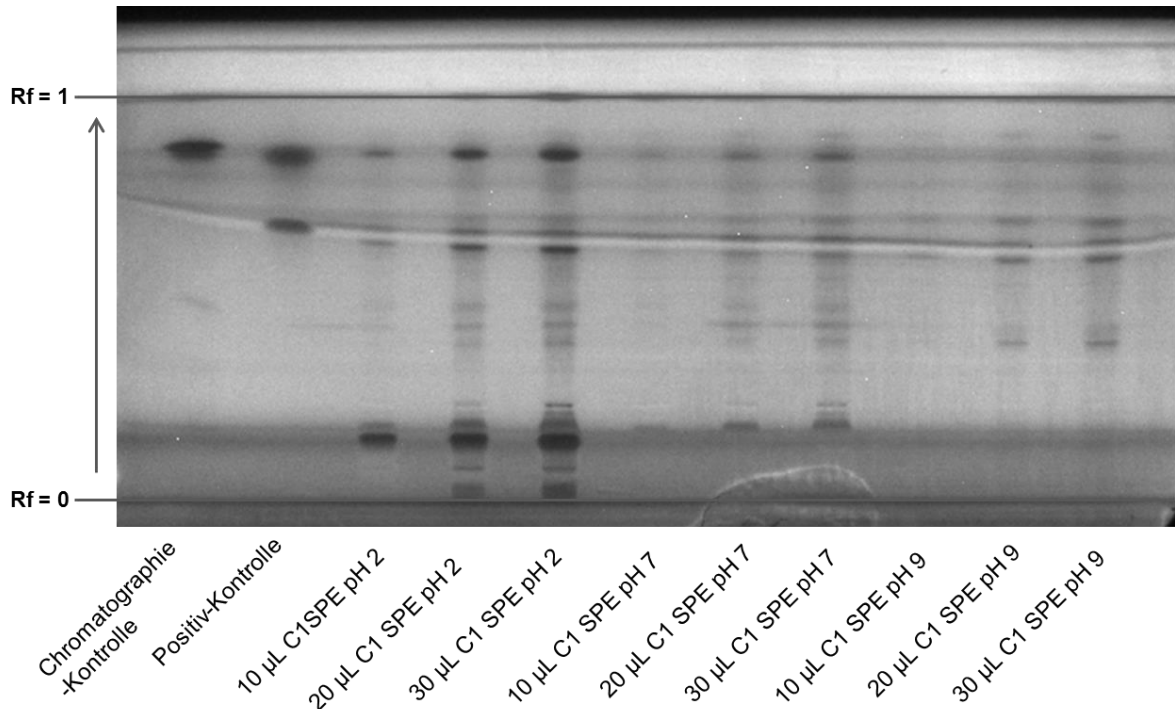


Abb. 10-16: Detektion der Biolumineszenz-Hemmung von *Aliivibrio fischeri* für die Probe C1 nach HPTLC/AMD-Trennung.

Tabelle 10-21: Übersicht der RIHV- bzw. RIAV-Polardiagramme für Probe C1 nach HPTLC/AMD-Trennung.

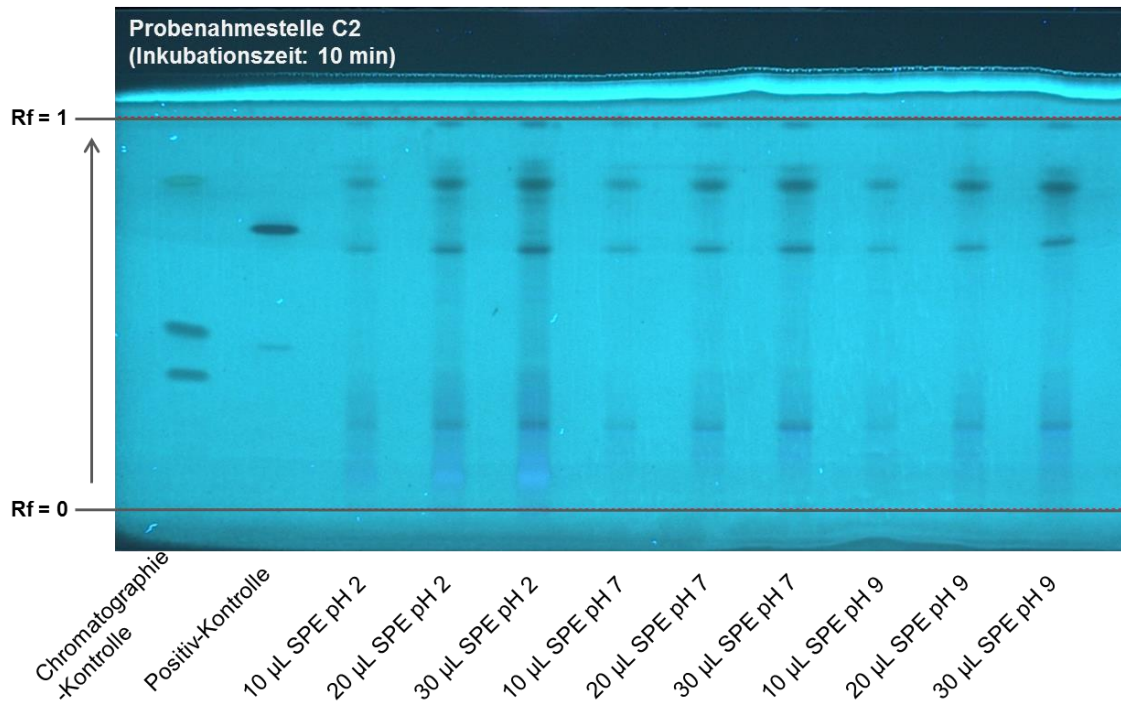
pH	Biolumineszenzhemmung	<i>Bacillus subtilis</i> -Hemmtest	Acetylcholinesterase-Hemmung
2			

pH	Biolumineszenzhemmung	<i>Bacillus subtilis</i> -Hemmtest	Acetylcholinesterase-Hemmung
7			
9			

#### 10.4.4 Abstrom der Deponie (Probe C2)

Der HPTLC-Biolumineszenzhemmtest zeigt für alle Extrakte eine Vielzahl von Hemmbanden im  $R_f$ -Bereich von 0,3 - 0,9. Die meisten dieser Hemmbanden besitzen ein RIHV von 50 - 200 [1000/ $\mu$ L]. Diese Werte finden sich oft in Wässern, die als mittel belastet eingestuft werden. Im pH 2 Extrakt besitzt die Hemmbande bei  $R_f = 0,80$  ein RIHV von 1000 [1000/ $\mu$ L]. RIHV > 1000 [1000/ $\mu$ L] gelten als sehr groß und sind typisch für Sondermülldeponien. Aufgrund des hohen  $R_f$ -Werts kann davon ausgegangen werden, dass die verantwortliche Substanz bzw. Substanzen als eher unpolar eingestuft werden können. Zur Einschätzung der Polarität der hemmenden Fraktionen können die Substanzen aus dem Chromatographiekontrollmix herangezogen werden. Die beiden nächstgelegenen Verbindungen sind Benzanilid ( $R_f = 0,76$ ,  $\log K_{OW} = 3,07$ ) und Dimethylgelb ( $R_f = 0,83$ ,  $\log K_{OW} = 4,14$ ).

Zusätzlich lassen sich noch einige Acetylcholinesterase hemmende Verbindungen in allen Extrakten detektieren (Abb. 10-17). Eine Hemmbande besitzt einen  $R_f$ -Wert von 0,21 und wird somit von einer polaren Verbindung hervorgerufen. Da diese bei allen drei pH-Werten eine ähnlich große Wirkung hervorruft (Tabelle 10-22), kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei wahrscheinlich um eine neutrale Verbindung handelt. Die anderen Hemmzonen besitzen  $R_f$ -Werte von 0,65 bis 0,95 und eine RIAV zwischen 20 und 50 [1000/ $\mu$ L].



**Abb. 10-17: Detektion der Acetylcholinesterase-Hemmung (HPTLC/AMD-Trennung) der Probe C2. Theobromin und Coffein aus der Chromatographie-Kontrolle erzeugen ebenso wie Paraoxon-ethyl aus der eigentlichen Positivkontrolle eine Hemmung und werden daher ebenso zur Qualitätssicherung herangezogen.**

Der HPTLC-*Bacillus subtilis*-Hemmtest weist zwei Bereiche auf, in denen eine leichte Verstärkung der Vitalität der Bakterien zu beobachten ist (Abb. 10-18). Diese lassen sich nicht im Polardiagramm darstellen. Zudem ist beim höchsten Auftragevolumen der Extrakte eine schmale Hemmbande mit einer sehr schwachen Hemmung zu beobachten. Aufgrund der schwachen Wirkung ist es nicht möglich für diese Bande ein RIHV zu bestimmen.



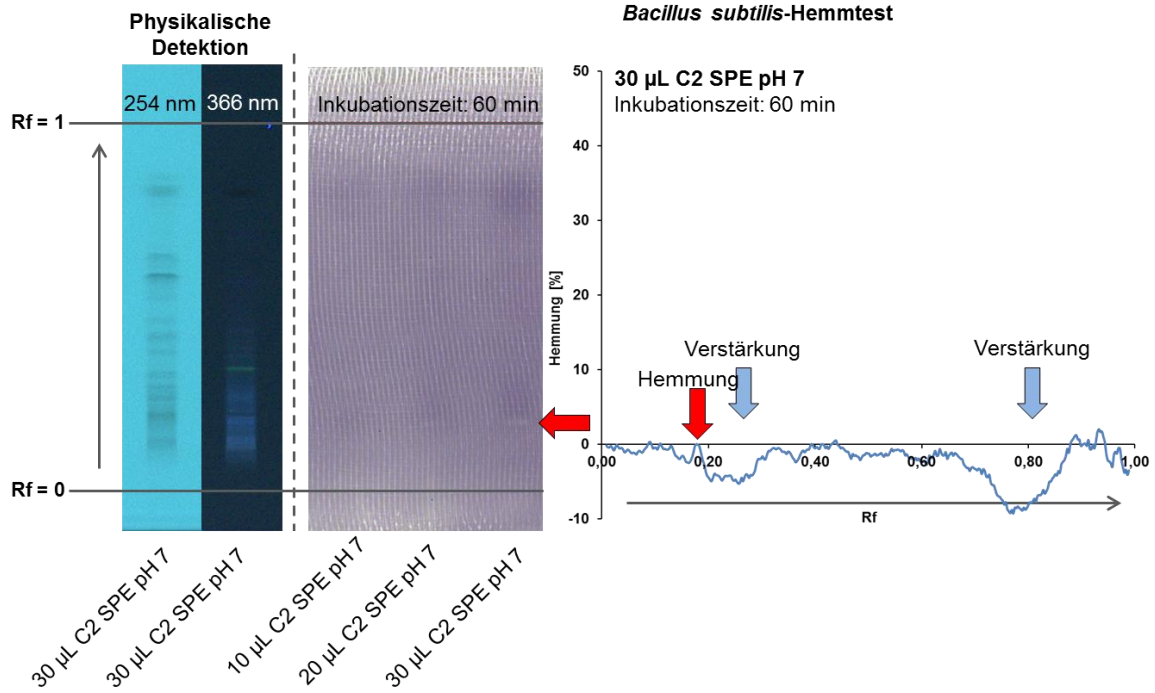


Abb. 10-18: Hemmwert-Chromatogramm der *Bacillus subtilis*-Hemmung für die Auftrennung (HPTLC/AMD) von 30 µL C2 SPE pH 2-Extrakts.

Tabelle 10-22: Übersicht der RIHV- bzw. RIAV-Polardiagramme für Probe C2 nach HPTLC/AMD-Trennung.

pH	Biolumineszenzhemmung	<i>Bacillus subtilis</i> -Hemmtest	Acetylcholinesterase-Hemmung
2			
7			

pH	Biolumineszenzhemmung	<i>Bacillus subtilis</i> -Hemmtest	Acetylcholinesterase-Hemmung
9			

### 10.4.5 Feld- und Spülblindproben

Die Feldblind- und Spülblindprobe von der Probenahmestelle C1 zeigt bei allen angewandten Tests keine auffälligen Banden. Auch in der Feldblindprobe von C2 konnten keine Auffälligkeiten detektiert werden. Doch in der Spülblindprobe wurde bei allen Extraktions-pH-Werten eine Hemmbande beim Leuchtbakterientest und eine sehr schwache Hemmbande beim *Bacillus subtilis*-Hemmtest detektiert.

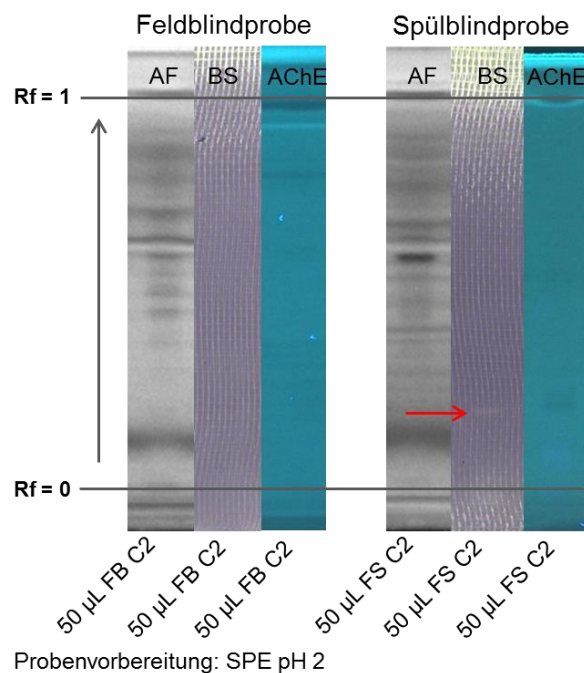
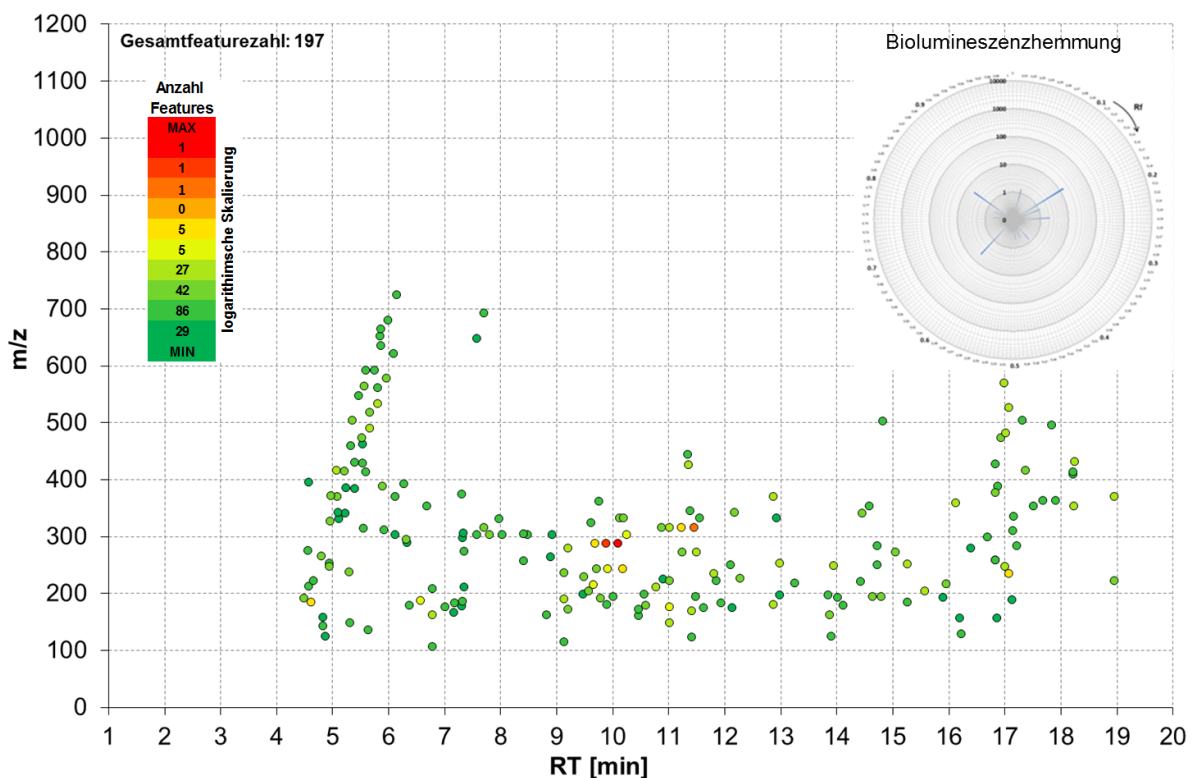


Abb. 10-19: Untersuchung der Feldblindprobe FB C2 und Spülblindprobe FS C2 mit den HPTLC-WBA-Methoden für das SPE pH 2 Extrakt nach HPTLC/AMD-Trennung. Der rote Pfeil deutet auf eine sehr schwache Hemmbande beim BS-Test hin.

### 10.4.6 Non-Target Screening

Das Ergebnis der Untersuchung der Probe C1 mittels HPLC-HRMS ist als Masse-Retentionszeit Diagramm in Abb. 10-20 dargestellt. Zu erkennen sind 197 Komponenten von denen zwei eine relativ hohe Signalintensität (rote Punkte) aufweisen. Zu beachten ist, dass die Farbcodierung der Intensität logarithmisch skaliert zwischen Minimum und Maximum ist. Das Polardiagramm der Biolumineszenzhemmung ist zum Vergleich in das Masse-Retentionszeit Diagramm mit eingezeichnet.



**Abb. 10-20: Masse-Retentionszeit Diagramm für die Probe C1 mit Polardiagramm der Leucht-bakterienhemmung.**

Zum Vergleich sind in Abb. 10-21 zusätzlich die ermittelten Komponenten der entsprechenden Feldblindprobe (191) eingetragen. Da es sich bei der Feldblindprobe um vor Ort abgefülltes Laborreinstwasser handelt, findet die HPLC-HRMS Analytik auch Komponenten, die aber nicht unbedingt in der Probe vorliegen müssen. Daher ist ein Einfaches „abziehen“ von Komponenten nicht erlaubt. Durch den Vergleich mit der Feldblindprobe kann die Anzahl der detektierten Komponenten besser eingeschätzt werden. Diese ist für die Probe C1 praktisch identisch und entspricht den Werten für die Belastung von Grundwässern.

Doch erlaubt die HPLC-HRMS-Daten nur eine Aussage zur Anwesenheit von Komponenten in einer Probe, aber nicht zu deren Relevanz. Erst die Kombination des HPLC-HRMS-Screenings mit der WBA lässt eine erste Einschätzung zur Relevanz getroffen werden.



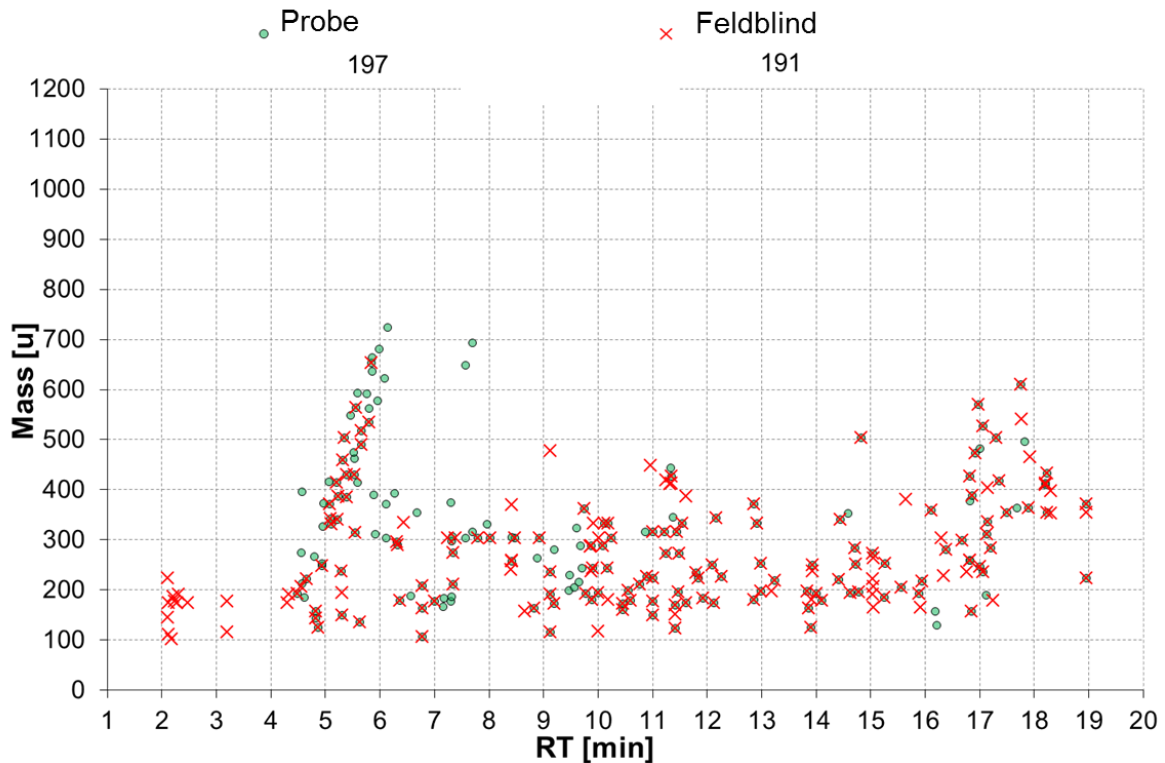


Abb. 10-21: Masse-Retentionszeit Diagramm für die Probe C1 mit den Komponenten der entsprechenden Feldblindprobe.

#### 10.4.7 Zusammenfassung und Fazit Deponie C

Zur Erfassung der Vorbelastung des deponiedurchströmenden Grundwassers wurde die Probenahmestelle C1 untersucht. Weder beim *Bacillus subtilis* noch beim Acetylcholinesterase-Hemmtest konnte eine Wirkung festgestellt werden. Die detektierte Hemmungen mit dem Leuchtbakterientest wird als nicht auffällig bewertet (Abb. 10-22, oben).

Die Probe aus dem Abstrom der Deponie (C2) zeigt beim *Bacillus subtilis*-Hemmtest keine auffällige Hemmbande. Die mit dem Leuchtbakterientest der detektierten Biolumineszenz-Hemmbanden werden als mittel bis sehr stark bewertet. Auch mit dem Acetylcholinesterase-Hemmtest werden einige Hemmbanden detektiert. Mit den ermittelten RIAV-Werten von 10 - 50 [1000/µL] wird die Wirkung für diese Hemmbanden anhand der bisherigen Erfahrungswerte als mittelstark eingeordnet.

Da die Acetylcholinesterase-Hemmung auf potentiell neurotoxische Verbindung hinweist, wird empfohlen, die Entwicklung der Wirkung für die Probenahmestelle C2 über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Zur besseren Einschätzung des Einflusses der Deponie auf die Umgebung sollten zudem weitere Probenahmestellen aus dem Deponieabstrom untersucht werden. Durch eine Identifizierung der Acetylcholinesterase hemmenden Substanzen kann

die Einzelstoffanalytik auf die relevante Verbindungen angepasst werden. Aufgrund der teilweise sehr hohen Empfindlichkeit des Acetylcholinesterase-Hemmtest und damit sehr geringen Konzentration der hemmenden Substanz, ist eine Identifizierung sehr aufwändig.

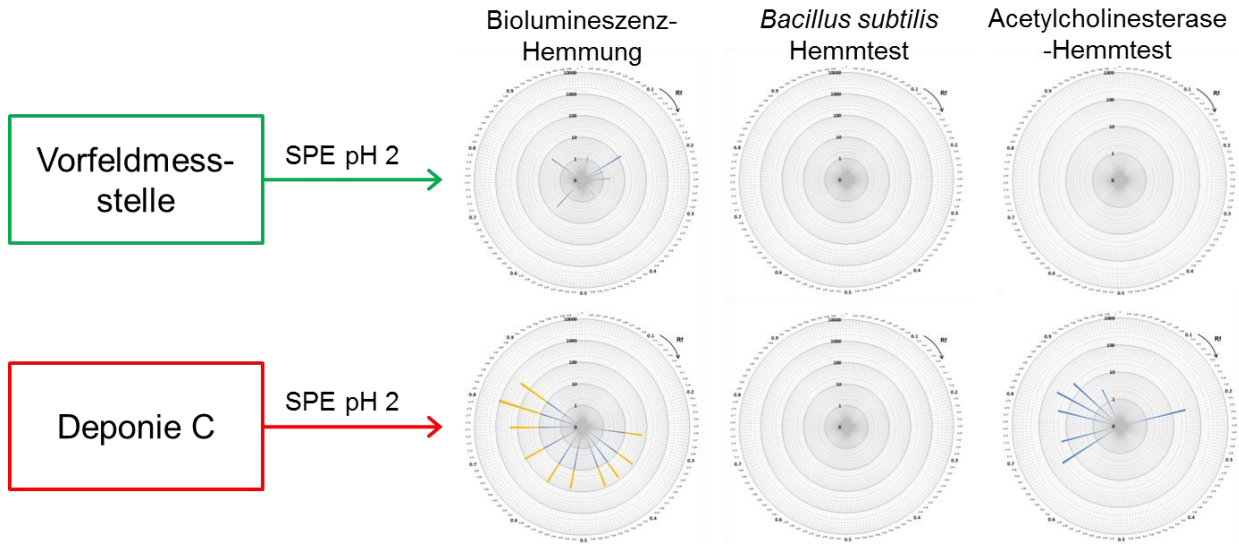


Abb. 10-22: Zusammenfassung der Ergebnisse für die Proben von der Deponie C anhand der SPE pH 2 Extrakte nach HPTLC/AMD-Trennung.

## 10.5 Kommunale Deponie E und kommunale Kläranlage G

### 10.5.1 Übersicht zu den Proben

Bei der Deponie E handelt es sich um eine kommunale Deponie. Das anfallende Sickerwasser E1 der Deponie wird in die kommunale Kläranlage G eingeleitet und zusammen mit dem kommunalen Abwasser gereinigt. Über ein Drainagesystem unterhalb des Deponiekörpers wird einströmende Sauberwasser gefasst und aus der Deponie geleitet. Anhand dieses Wassers wird die Dichtigkeit der Basisabdichtung kontrolliert.

Die in Tabelle 10-23 gezeigten Proben wurden mit der Festphasenextraktion bei pH 2, 7 und 9 angereichert. Es war bekannt, dass es sich bei den Proben E2 und G1 um unbelastete bzw. gering belastete Wässer handelt. Deshalb war es erforderlich die Wasserprobe um den Faktor 1000 anzureichern.

Tabelle 10-23: Übersicht der Proben von der Deponie E und der Kläranlage G

Probe	Anreicherungsfaktor	Durchgeführte Analysen
E1 Sickerwasser	200	AChE, LB, BS
E2 Drainagenwasser	1000	AChE, LB, BS

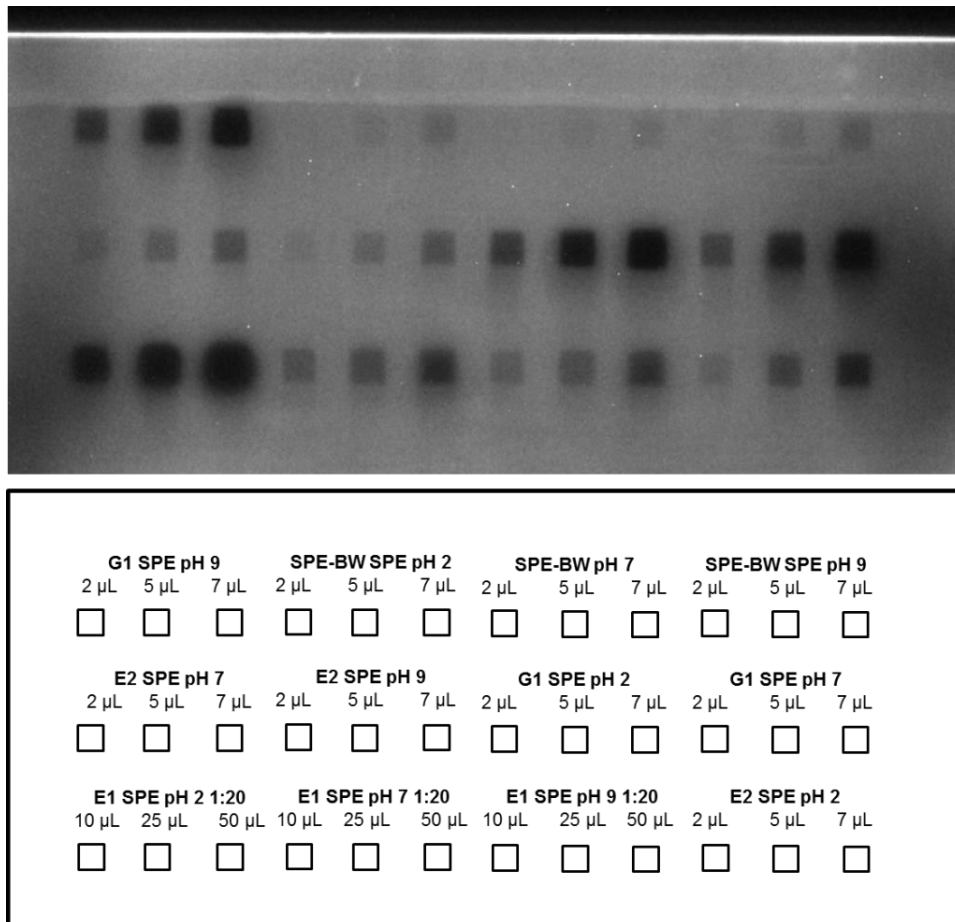
	<b>Probe</b>	<b>Anreicherungsfaktor</b>	<b>Durchgeführte Analysen</b>
G1	ARA Ablauf	1000	AChE, LB, BS
	FB E1	300	AChE, LB, BS
	FB E2	300	AChE, LB, BS
	FB G1	300	AChE, LB, BS,

AChE: Acetylcholinesterase, LB: *Aliivibrio fischeri* (Leuchtbakterien), BS: *Bacillus subtilis*,  
 AF: SPE Anreicherungsfaktor, ARA: Abwasserreinigungsanlage, FB: Feldblindprobe

### 10.5.2 Vorscreening

Die erzeugten Extrakte werden zunächst in einem Vorscreening mit dem Leuchtbakterien und dem *Bacillus subtilis* Hemmtest untersucht. Dazu werden die Extrakte auf eine Fläche von 5 \* 5 mm auf die HPTLC-Platte mit drei unterschiedlichen Volumina aufgetragen.

Die ersten Versuche zeigten, dass die SPE-Extrakte von E1 eine nicht auswertbare starke Biolumineszenz-Hemmung auslösen und verdünnt werden mussten. Die Abb. 10-23 zeigt die Plattenaufnahme der Hemmung (oben) und das Schema der Probenauftragung (unten). Dabei erfolgte die Auftragung der drei Extraktvolumina in Blöcken für die Proben zeilenförmig von links unten nach rechts oben.



**Abb. 10-23: Flächenauftragung der SPE-Extrakte und Untersuchung der Wirkung auf *Aliivibrio fischeri*.**

Die SPE-Extrakte von der Probe E1 sind mit einem RIHV  $\gg 1000$  [1000/ $\mu$ L] als stark belastet einzustufen (Abb. 10-24). Im Vergleich der drei Extrakte zeigt sich, dass der pH 2-Extrakt die Leuchtbakterien mit einem RIHV von 6700 [1000/ $\mu$ L] deutlich stärker hemmt als die pH 7- (2800 [1000/ $\mu$ L]) und pH 9-Extrakte (2200 [1000/ $\mu$ L]). Von den Extrakten des Drainagewassers E2 zeigt nur der SPE pH 2 Extrakt eine etwas größere Hemmung. Die RIHV für die Extrakte vom Ablauf der kommunalen Kläranlage G liegen bei 50-90 [1000/ $\mu$ L].

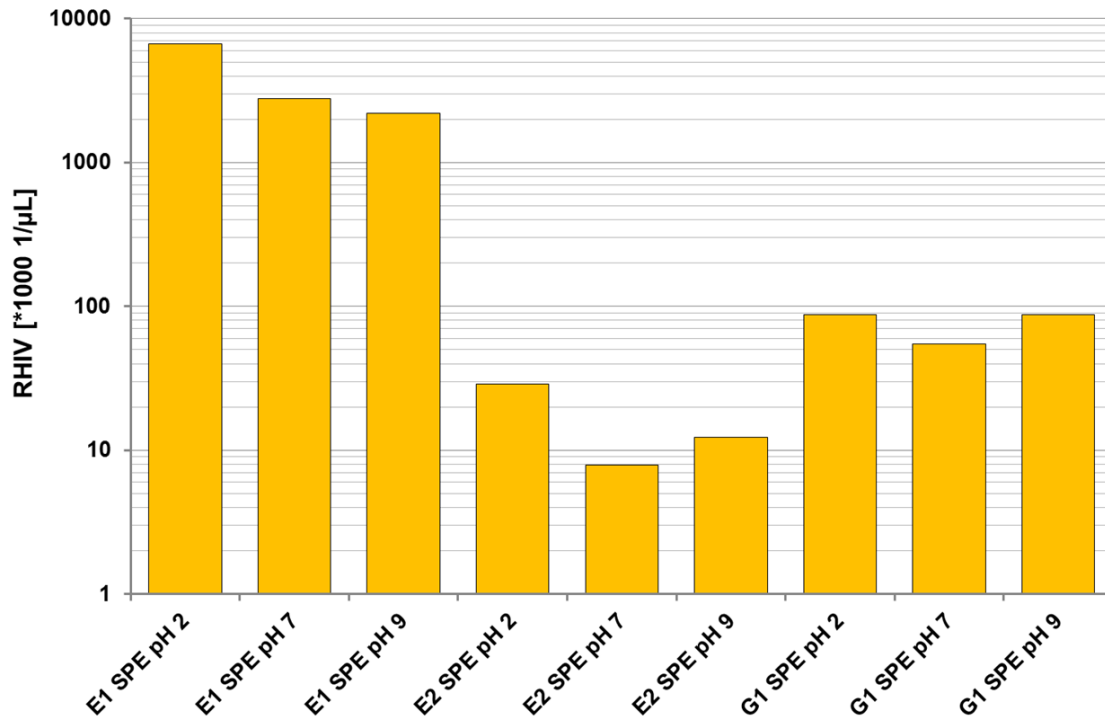
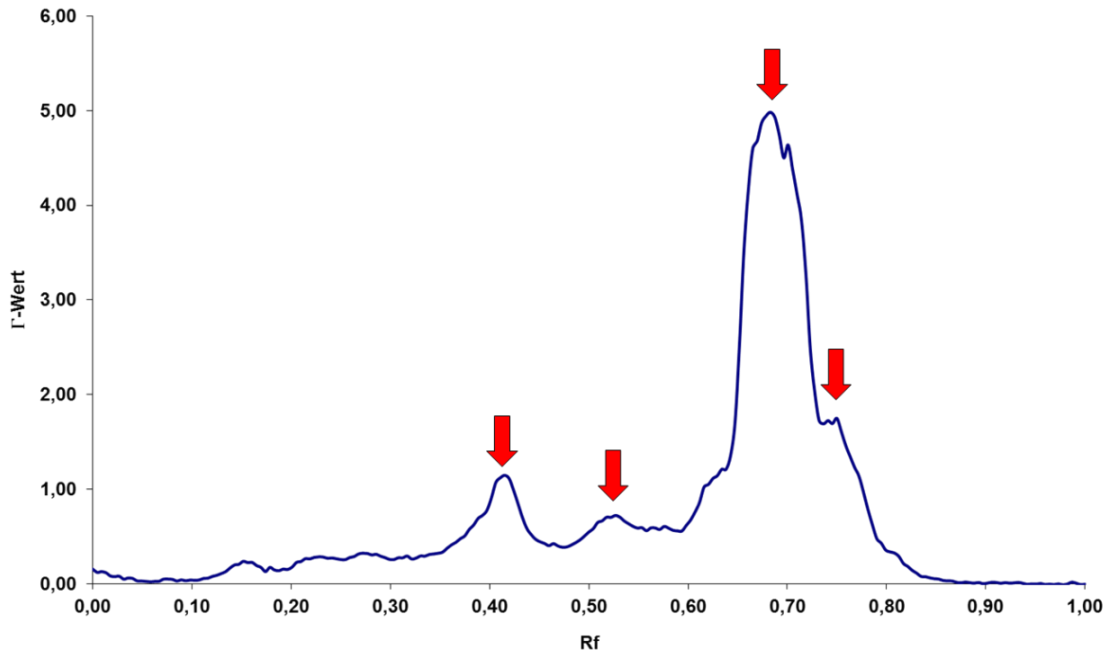


Abb. 10-24: RIHV der Biolumineszenz-Hemmung der Flächenauftragung für die untersuchten SPE-Extrakte.

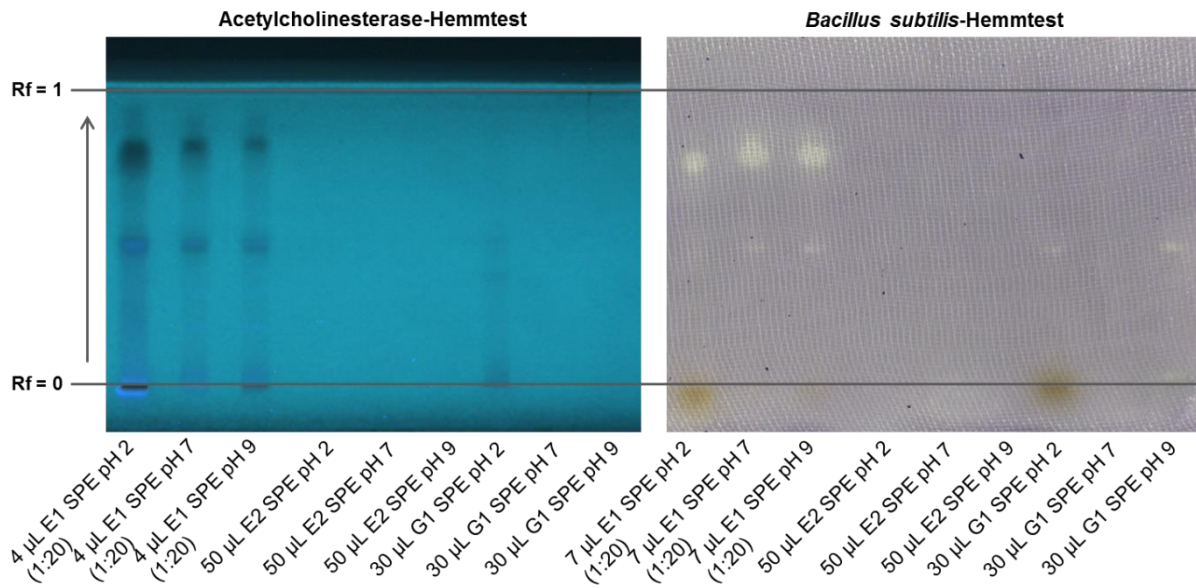
#### Isokratische Trennung

Für ein weiteres Screening zur Abschätzung des Auftragevolumens der getrennten Probe wurde die isokratische Trennmethode eingesetzt. Zur Detektion der Hemmung der Leucht-bakterien und der Acetylcholinesterase von den verdünnten SPE-Extrakten ist ein Auftragevolumen von 4 µL ausreichend. Um eine Wirkung auf *Bacillus subtilis* zu erfassen ist ein Auftragevolumen von 7 µL notwendig. Im Biolumineszenz-Hemmtest sind für das Sickerwasser vier Hemmfractionen im Chromatogramm erfassbar (Abb. 10-25). Trotz eines Auftragevolumens von 30 µL sind in den Extrakten des Drainagewassers nur sehr schwache Hemmbanden zu erkennen.



**Abb. 10-25:**  $\Gamma$ -Wert-Chromatogramm für den Biolumineszenz-Hemmtest mit *Aliivibrio fischeri* vom 1:20 verdünnten SPE pH 7 Extrakt der Probe E1 bei einem Auftragevolumen von 4  $\mu$ L. Mit roten Pfeilen sind die Hemmfractionen markiert.

In den verdünnten Extrakten des Sickerwassers E1 können zudem zwei Fraktionen detektiert werden, die die Acetylcholinesterase hemmen. Im *Bacillus subtilis*-Hemmtest können in den Extrakten ebenso zwei wirkende Fraktionen nachgewiesen werden. Für das Drainagenwasser E2 fällt für beide Wirkungstests das Ergebnis negativ aus. Im SPE pH 2-Extrakt vom Kläranlagenablauf ist eine sehr schwache Hemmung der Acetylcholinesterase detektierbar. Zusätzlich lassen sich bei den Extraktions-pH-Werten 2 und 9 jeweils eine schwach wirkende Fraktion auf *Bacillus subtilis* beobachten. Beide Fraktionen besitzen den gleichen  $R_f$ -Wert (Abb. 10-26).



**Abb. 10-26: Untersuchung der Wirkung auf die Acetylcholinesterase und *Bacillus subtilis* für die SPE Extrakte von E1, E2 und G1 nach isokratischer HPTLC-Trennung.**

### 10.5.3 Sickerwasser der Deponie (Probe E1)

#### HPTLC/AMD-Trennung

Das Sickerwasser weist im HPTLC/AMD-Biolumineszenz-Hemmtest stark bis sehr stark wirkende Fraktionen auf (RIHV von 100-3000 [1000/ $\mu$ L]). Besonders stark wirkt die Fraktion bei  $R_f = 0,53$  mit einem RIHV von 3000 [1000/ $\mu$ L]. Die Stärke der Wirkung für die Hemmbanden fällt für alle Extraktions-pH-Werte ähnlich aus. Die Anzahl der Hemmbanden betragen bei den pH-Werten 2, 7 und 9 entsprechend 11, 6 bzw. 7. Dies erklärt die deutlich größere Summenwirkung des pH 2-Extrakts. Zusätzlich treten in den SPE-Extrakten pH 2 und 7 (pH 9 wegen zu geringen Extraktvolumens nicht nachweisbar) zwei Hemmbanden von *Bacillus subtilis* auf. Mit dem Acetylcholinesterase-Hemmtest lassen sich wie schon bei der isokratischen Trennung zwei Hemmfractionen in allen Extrakten detektieren. Diese besitzen einen  $R_f$  von 0,48 und 0,52.



Tabelle 10-24: Übersicht der RIHV-Polardiagramme bzw. RIAV-Polardiagramme für die Probe E1

pH	Biolumineszenzhemmung	Bacillus subtilis-Hemmtest	Acetylcholinesterase-Hemmung
2			
7			
9		Extraktmenge nicht ausreichend	

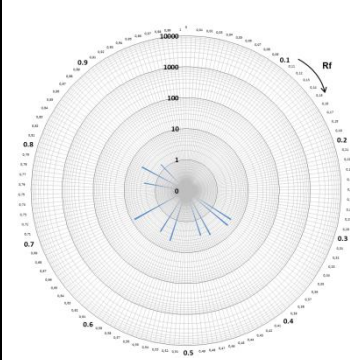
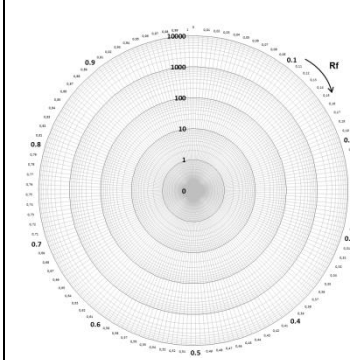
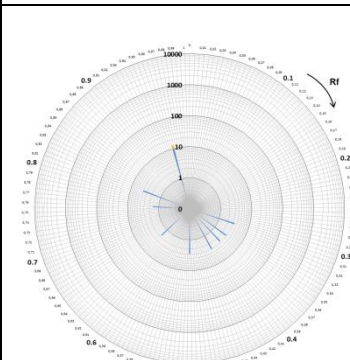
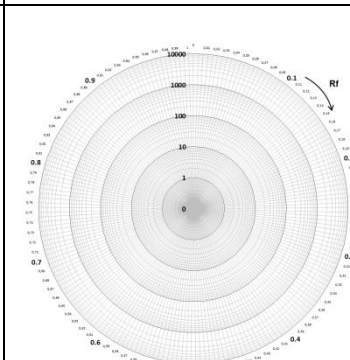
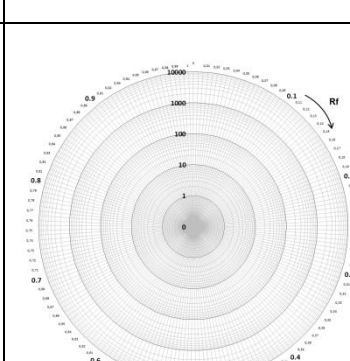
### 10.5.4 Gefasstes Sauberwasser der Deponie (Probe E2)

#### HPTLC/AMD-Trennung

Für die Probe E2 kann keine Wirkung auf *Bacillus subtilis* und die Acetylcholinesterase detektiert werden. Bei der Biolumineszenz-Hemmung treten einige Banden mit geringer Hemmung (RIHV < 10 [1000/μL]) auf.



Tabelle 10-25: Übersicht der RIHV-Polardiagramme bzw. RIAV-Polardiagramme für die Probe E2 nach HPTLC/AMD-Trennung.

pH	Biolumineszenzhemmung	<i>Bacillus subtilis</i> -Hemmtest	Acetylcholinesterase-Hemmung
2			keine zusätzliche Untersuchung, da negativ bei isokratischer Trennung
7			keine zusätzliche Untersuchung, da negativ bei isokratischer Trennung
9	Extraktmenge nicht ausreichend		keine zusätzliche Untersuchung, da negativ bei isokratischer Trennung

### 10.5.5 Ablauf der kommunalen Kläranlage G (Probe G1)

#### HPTLC/AMD-Trennung

Mit dem Biolumineszenz-Hemmtest konnten eine Vielzahl an Hemmbanden, verteilt über fast den gesamten  $R_f$ -Bereich detektiert werden. Die meisten Hemmfraktionen besitzen einen RIHV von 10-20 [1000/ $\mu$ L]. Diese Werte sind typisch für gering belastetes Wasser. Nur im SPE pH 2-Extrakt tritt bei  $R_f = 0,98$  eine Bande mit einem RIHV von 150 [1000/ $\mu$ L] auf. Zusätzlich lässt sich im pH 2-Extrakt eine schwach wirkende Zone auf *Bacillus subtilis* detektieren. Eine zusätzliche Hemmbande lässt sich mit dem *Bacillus subtilis*-Test im pH 9 Extrakt

nachweisen. Wie schon bei der isokratische Trennung angedeutet, ist im pH 2-Extrakt eine auf die Acetylcholinesterase wirkende Fraktion mit einem RIAV von ca. 10 [1000/ $\mu$ L] detektierbar.

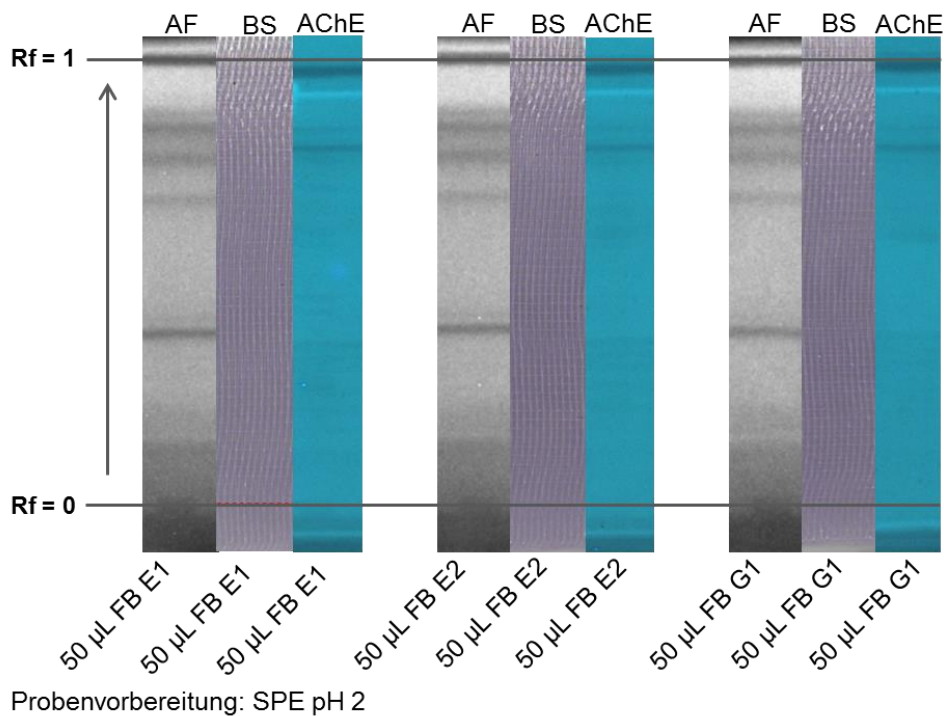
**Tabelle 10-26: Übersicht der RIHV-Polardiagramme bzw. RIAV-Polardiagramme für die Probe G1**

pH	Biolumineszenzhemmung	<i>Bacillus subtilis</i> -Hemmtest	Acetylcholinesterase-Hemmung
2			
7			keine zusätzliche Untersuchung, da negativ bei isokratischer Trennung
9	Extraktmenge nicht ausreichend		Keine zusätzliche Untersuchung, da negativ bei isokratischer Trennung

### 10.5.6 Feldblindproben

Die HPTLC/AMD-Trennung mit anschließender Biolumineszenz-Detektion zeigte, dass in den Feldblindproben kaum eine Hemmung nachweisbar ist. Lediglich an den Auftragezonen kann eine minimale Hemmung detektiert werden. Im *Bacillus subtilis*-Hemmtest sind

keinerlei Wirkungen nachweisbar. Ebenso tritt in den Blindwerten auch keine Acetylcholinesterase-Hemmung auf (Abb. 10-27).



**Abb. 10-27: Untersuchung des SPE pH 2 Extrakts der Feldblindproben FB E1, FB E2 und FB E3 mit dem Biolumineszenz-, Bacillus subtilis und dem Acetylcholinesterase-Hemmtest nach HPTLC/AMD-Trennung.**

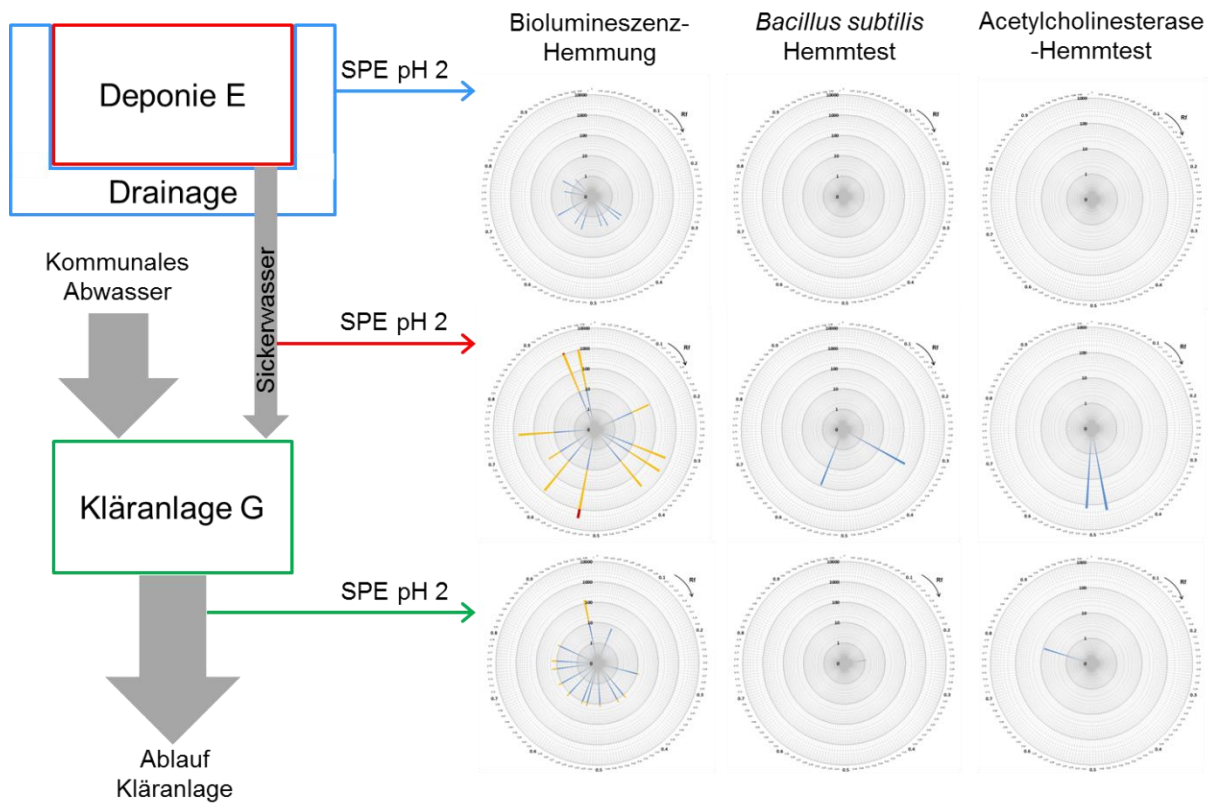
### 10.5.7 Zusammenfassung und Fazit Deponie E und Abwasserreinigungsanlage G

Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abb. 10-28 anhand der SPE-pH 2-Extrakte nach HTPLC/AMD-Trennung gezeigt.

Im Drainagenwasser der Deponie lässt sich mit keiner der angewandten Tests eine auffällige Wirkung nachweisen (Abb. 10-28). In den Deponiesickerwasserextrakten werden mit Leuchtbakterien-Hemmtest stark hemmende Fraktionen detektiert. So sind im pH 2-Extrakt einige stark und zwei sehr stark wirkende Fraktionen ( $R_f = 0,53$  und  $0,94$ ) detektierbar. Mit dem *Bacillus subtilis* und dem Acetylcholinesterase-Hemmtest sind jeweils zwei vergleichsweise stark hemmende Banden zu erkennen, deren Lage aber nicht übereinstimmen.

Dieses Sickerwasser wird einer Kläranlage zugeführt und dort zusammen mit kommunalem Abwasser aufbereitet. Die Biolumineszenz-Hemmungen im Ablauf der Kläranlage fallen für die meisten Hemmbanden, mit Ausnahme einer Bande ( $R_f = 0,97$ ) gering aus. Mit einem RIHV von 150 [1000/ $\mu$ L] liegt der Wert über den Werten beispielsweise der Donau (2 – 8 [1000/ $\mu$ L]) bei Leipheim. Diese Bande tritt auch im Sickerwasser auf. Zusätzlich ist eine Hemmbande, welche die Acetylcholinesterase hemmt, zu sehen. Die Hemmung der Enzym-

aktivität ist mit einem RIAV von ca. 10 [1000/ $\mu$ L] als mittelstark einzustufen. Mit einem Monitoringprogramm könnte abgeklärt werden, ob es sich hierbei um einen einmaligen Effekt handelt. Bei wiederholtem Auftreten der Wirkungen sollte die Ursache und deren Quelle identifiziert werden.



**Abb. 10-28: Zusammenfassung der Ergebnisse für die Proben von der Deponie E und Kläranlage G anhand der SPE pH 2 Extrakte nach HPTLC/AMD-Trennung.**

## 10.6 Industriekläranlage H

### 10.6.1 Beschreibung des Probenahmestandorts

Bei der untersuchten Industriekläranlage wird neben Abwässern von der Industrie (u. a. der chemischen Industrie) auch das Abwasser der umliegenden Gemeinden aufgereinigt. Bei dieser Kläranlage handelt es sich um eine konventionelle Abwasserreinigungsanlage. Vor der biologischen Reinigungsstufe wird das Industrieabwasser zunächst neutralisiert. Untersucht wurde eine 24-h-Mischprobe aus dem Ablauf der Kläranlage.

### 10.6.2 Vorscreening

Die erhaltenen SPE Extrakte werden zunächst in einem Vorscreening mit dem *Bacillus subtilis* und dem Leuchtbakterien-Hemmtest untersucht. Dazu werden die Extrakte auf eine Fläche von 5 \* 5 mm auf die HPTLC-Platte mit drei verschiedenen Volumina aufgetragen.

Abb. 10-29 zeigt die Biolumineszenzhemmung von *Aliivibrio fischeri* für die aufgetragenen Extrakte. Für die Blindwerte lässt sich nur eine sehr schwache Hemmung detektieren. Doch die SPE-Extrakte für den Gesamtablauf (H1) zeigen für alle drei Extraktions-pH-Werte sehr deutliche Hemmungen. Des Weiteren ist zu sehen, dass ein Durchbruch der Anreicherungskartusche stattgefunden hat. Mit dem *Bacillus subtilis*-Hemmtest lässt sich beim Vorscreening keine Wirkung detektieren.

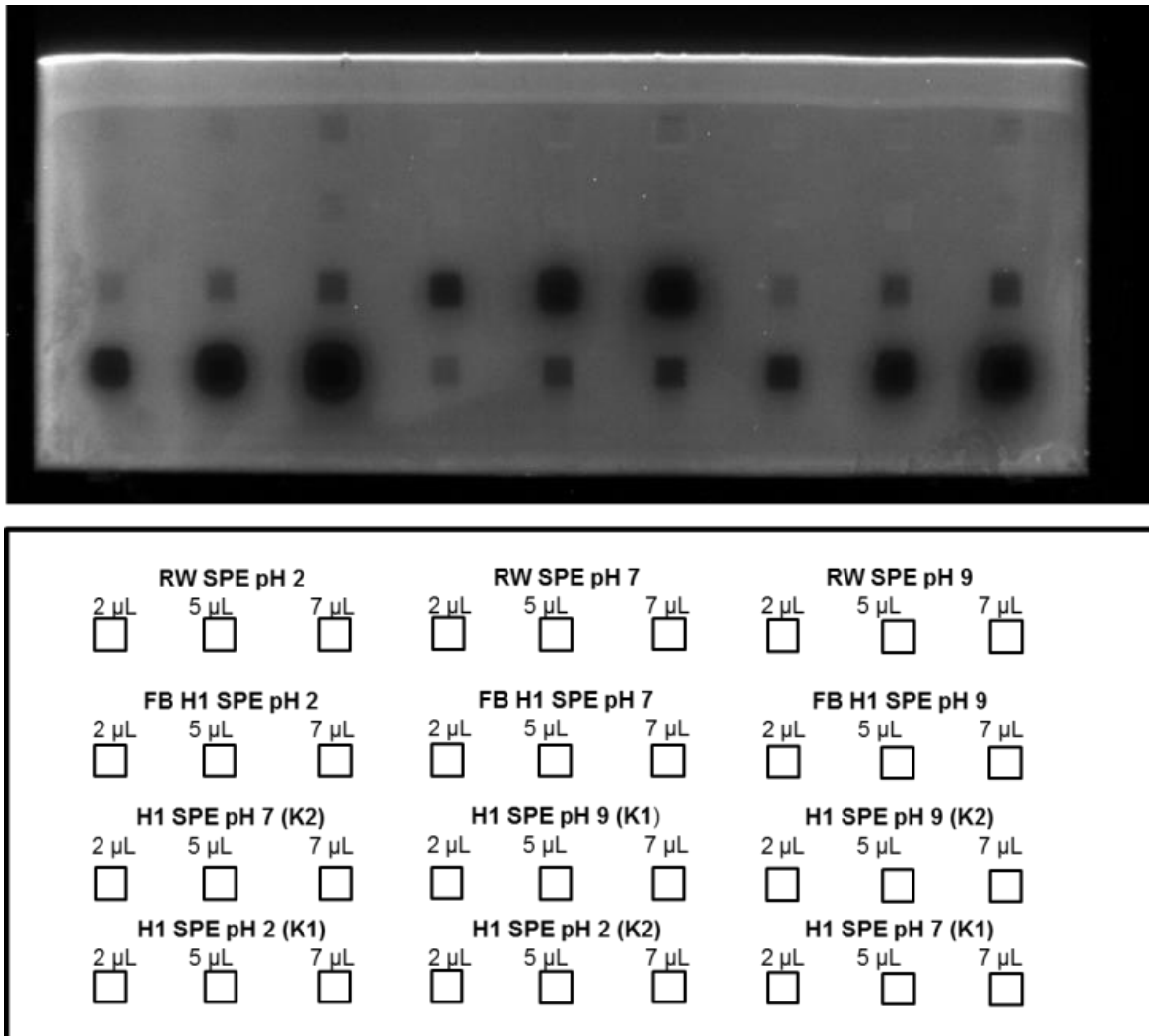
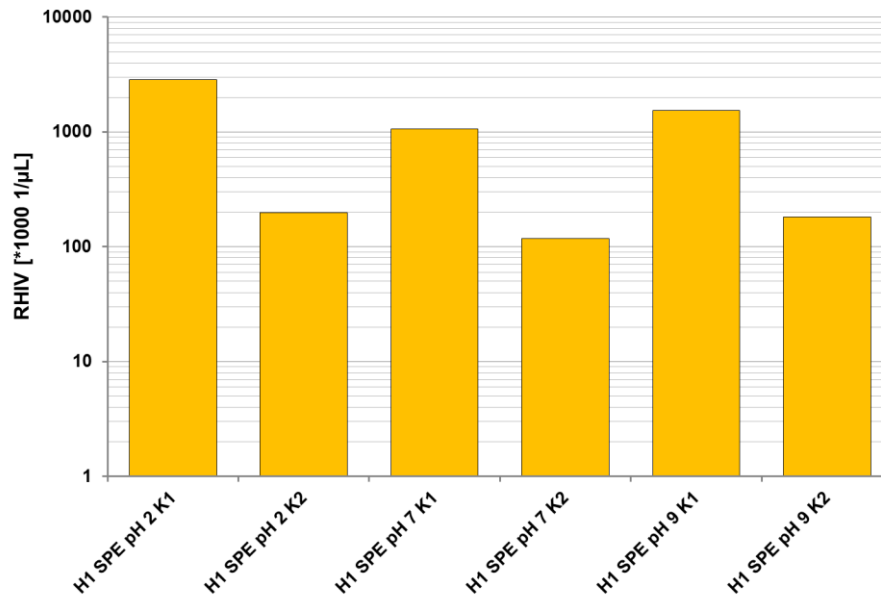


Abb. 10-29: Summenwirkung der SPE-Extrakte auf *Aliivibrio fischeri* (K1: SPE-Kartusche 1, K2: SPE-Kartusche 2).

Mithilfe der drei Volumina, die von jedem Extrakt aufgetragen wurden ist es möglich, die RIHV für die Extrakte vom Gesamtablauf zu bestimmen (Abb. 10-30). Der RIHV erlaubt es,



das Ausmaß des Durchbruches von der ersten SPE-Kartusche abzuschätzen. Der Leucht-bakterien-Hemmtest ist für diese Abschätzung besonders gut geeignet, da er unspezifisch ist und damit auf eine Vielzahl von Substanzen anspricht. Für die aufgetragenen Blindwert-Proben ist die Hemmung nicht auffällig, doch für eine RIHV-Auswertung ist das aufgetragene Volumen zu gering.



**Abb. 10-30: RIHV der Biolumineszenz-Hemmung als Summenwirkung für untersuchte SPE-Extrakte**

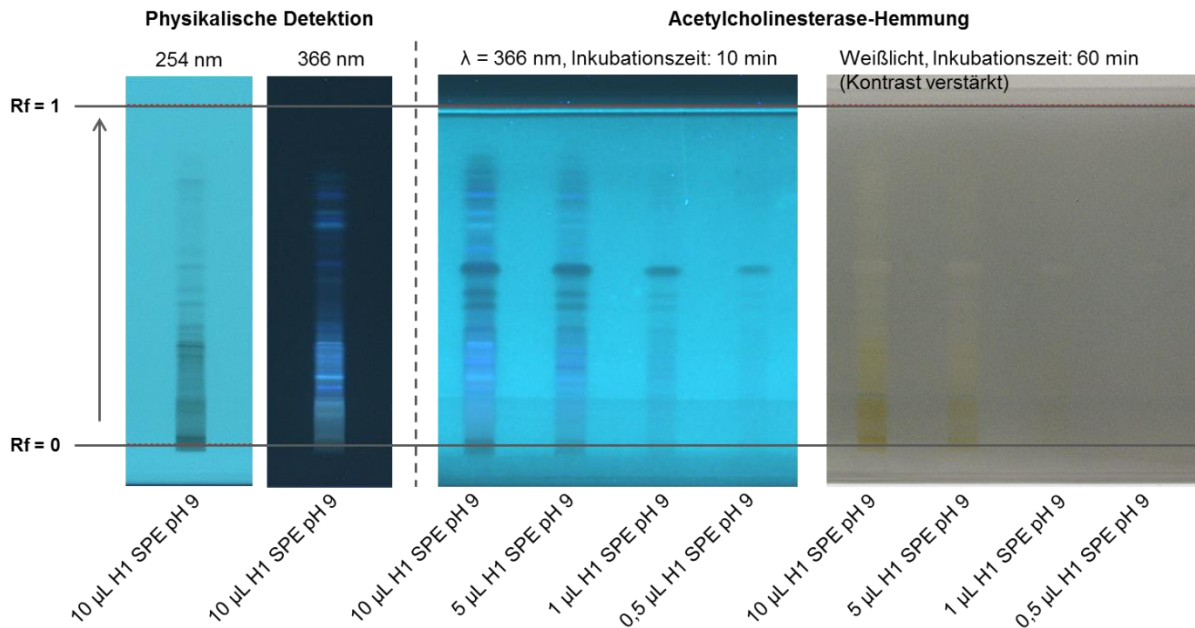
Die Summenwirkung für die zweiten SPE-Kartuschen ist zwar deutlich geringer als für die ersten SPE-Kartuschen, jedoch nicht zu vernachlässigen. Da sich die RIHV um eine Zehnerpotenz unterscheiden ist davon auszugehen, dass kein weiterer Durchbruch in den zweiten Kartuschen stattgefunden hat. Daher werden für die weiteren Untersuchungen die Extrakte der beiden hintereinander gehängten SPE-Kartuschen ohne Verdünnung vereint. Für die Vereinigung werden Aliquote von beiden Extrakten in ein Gläschen pipettiert, das Lösemittel unter einem warmen Stickstoffstrom entfernt und die zurückgebliebenen Substanzen im gleichen Volumen wieder aufgenommen, das zuvor den einzelnen Extrakten entnommen wurde.

### 10.6.3 WBA mit HPTLC/AMD vom Gesamtablauf der Industriekläranlage (H1)

Die Extrakte der Proben H1 wurden mit dem entwickelten HPTLC/AMD-Übersichtsgradienten aufgetrennt, mit dem Biolumineszenz-, *Bacillus subtilis*- und dem Acetylcholinesterase-Hemmtest untersucht.

Mit dem *Bacillus subtilis*-Hemmtest konnte, wie schon bei der Erfassung der Summenwirkung keine Auffälligkeit detektiert werden, während beim Acetylcholinesterase-Hemmtest einige deutliche Hemmbanden detektiert wurden (Abb. 10-31). Da sich besonderes im unte-

ren  $R_f$ -Bereich fluoreszierende Substanzen befinden, die die Detektion der Hemmung bei  $\lambda = 366 \text{ nm}$  stören, muss zusätzlich noch die Detektion im Weißlicht herangezogen werden. Hier erscheinen Hemmsubstanzen als weiße Substanzen vor einem bläulichen Hintergrund. Diese Detektion ist unempfindlicher und kann nur für die qualitative Untersuchung herangezogen werden. Es lassen sich keine weiteren Hemmbanden detektieren. Doch stören hier auch im unteren  $R_f$ -Bereich liegende gelbe Substanzen die Detektion.



**Abb. 10-31: Detektion von Acetylcholinesterase hemmenden Fraktionen von dem pH 9 SPE-Extrakt des Gesamtablaufs der Kläranlage (H1) nach HPTLC/AMD-Trennung.**

Für eine semi-quantitative Bestimmung der Wirkung auf die Acetylcholinesterase wurde für die detektierten Hemmbanden das RIAV berechnet und zur Veranschaulichung in ein Polar-diagramm abgetragen (Tabelle 10-27). Für alle Hemmbanden wird ein RIAV  $> 100$  [1000/ $\mu\text{L}$ ] bestimmt. Für die Zone aus dem SPE pH 2 Extrakt mit  $R_f = 0,44$  liegt das RIAV bei 1100 [1000/ $\mu\text{L}$ ]. Die Anzahl der detektierten Hemmbanden nimmt mit zunehmendem Extraktions-pH-Wert ab. Auch fällt die Stärke der Wirkung für die meisten Hemmbanden für SPE-Extrakte bei pH 7 und 9 etwas schwächer aus.

Mit dem HPTLC-Biolumineszenz-Hemmtest wird im Gesamtablauf eine Vielzahl an Hemmbanden über fast die gesamte Trennung detektiert. Besonders stark ist die detektierte Wirkung für die Extraktion bei pH 2. Hier werden RIHV-Werte von 400-600 [1000/ $\mu\text{L}$ ] und für die Zone bei  $R_f = 0,23$  ein RIHV von 1200 [1000/ $\mu\text{L}$ ] bestimmt. RIHV-Werte über 1000 [1000/ $\mu\text{L}$ ] werden in stark belasteten Wässern gefunden.

Tabelle 10-27: Übersicht der RIHV-Polardiagramme bzw. RIAV-Polardiagramme nach HPTLC/AMD-Trennung.

pH	Biolumineszenzhemmung	<i>Bacillus subtilis</i> -Hemmtest	Acetylcholinesterase-Hemmung
2			
7			
9			

#### 10.6.4 Feldblindprobe (FB H1)

Bereits im Vorscreening wurde gezeigt, dass beim Leuchtbakterientest und beim *Bacillus subtilis*-Hemmtest keine Wirkung in der Feldblindprobe auftritt. Dieses Ergebnis wurde nochmals mit der HPTLC/AMD-Trennung bestätigt (Abb. 10-32). Zusätzlich wurde nach der HPTLC/AMD noch die Wirkung auf die Acetylcholinesterase für die Feldblindprobe untersucht. Auch hier lässt sich keine Wirkung detektieren.



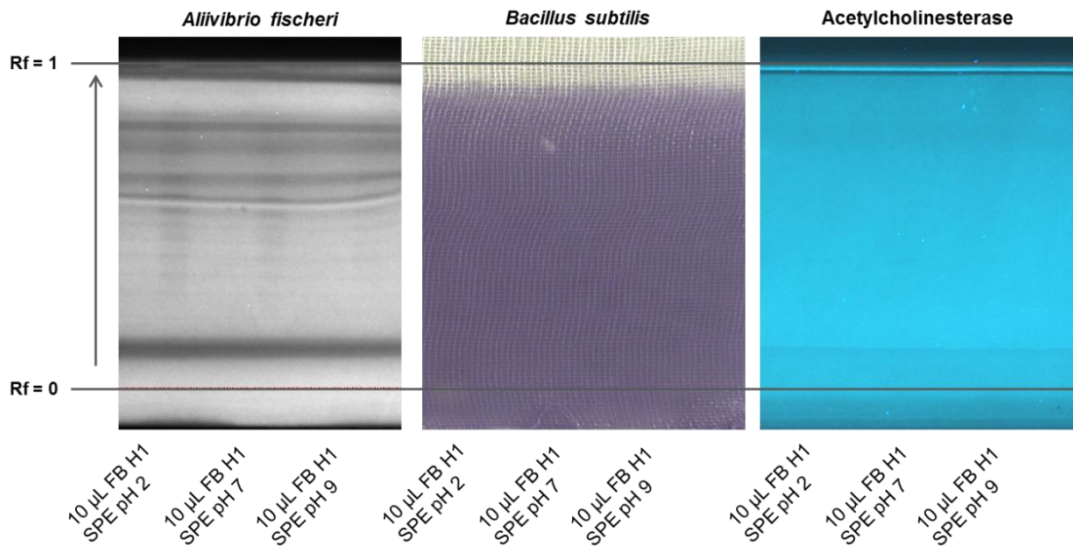


Abb. 10-32: Untersuchung der Feldblindprobe FB H1 mit den HPTLC/AMD-WBA-Methoden.

### 10.6.5 Non-Target Screening

Das Ergebnis der Untersuchung der Probe H1 mittels HPLC-HRMS ist als Masse-Retentionszeit Diagramm in Abb. 10-33: Masse-Retentionszeit Diagramm für die Probe H1 mit Polardiagramm der Leuchtbakterienhemmung dargestellt.

Zu erkennen sind 4017 Komponenten von denen 18 eine relativ hohe Signalintensität (rote Punkte) aufweisen. Zu beachten ist, dass die Farbcodierung der Intensität logarithmisch skaliert zwischen Minimum und Maximum ist. Das Polardiagramm der Biolumineszenzhemmung ist zum Vergleich in das Masse-Retentionszeit Diagramm eingezeichnet.

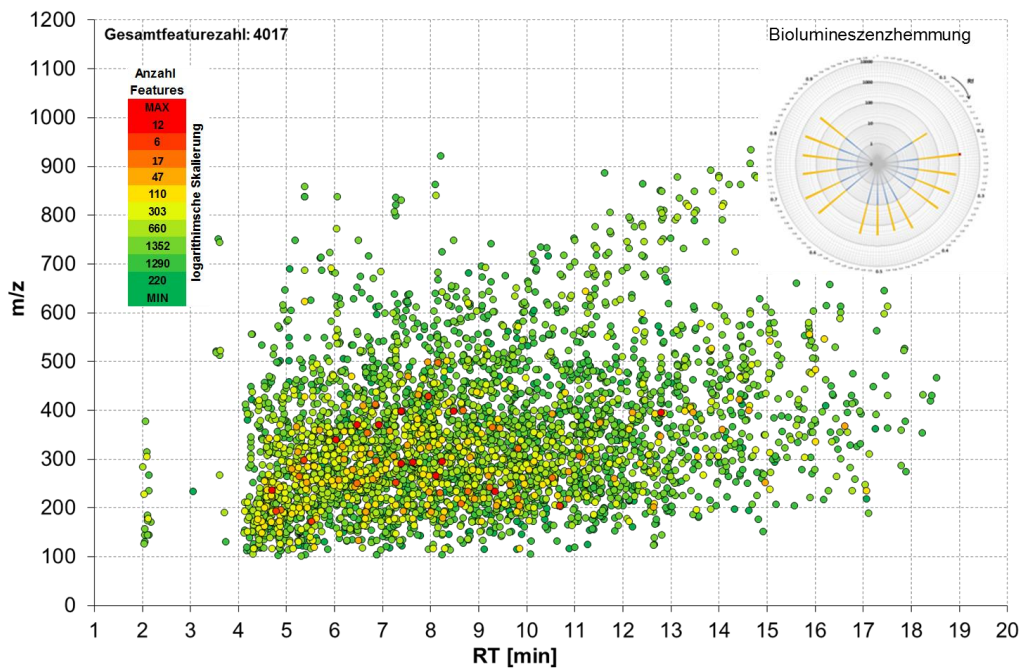
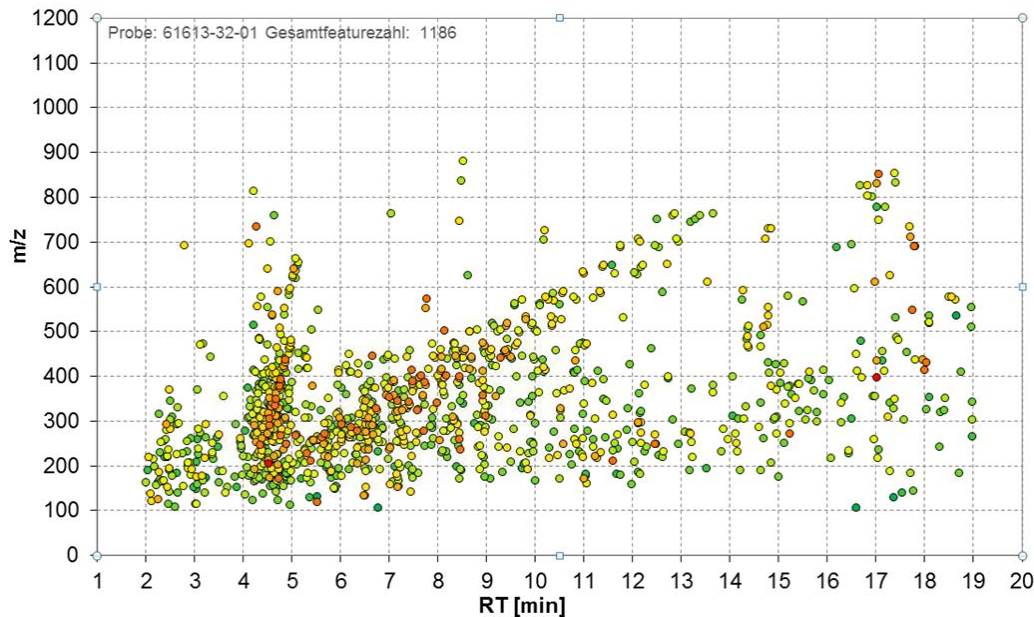


Abb. 10-33: Masse-Retentionszeit Diagramm für die Probe H1 mit Polardiagramm der Leuchtbakterienhemmung.

Zur besseren Beurteilung des Masse-Retentionszeit Diagramms der Probe H1 ist in Abb. 10-34 das Masse-Retentionszeit Diagramm einer kommunalen Kläranlage dargestellt. Deutlich ist der Unterschied in der Anzahl der Komponenten und deren Verteilung zu erkennen.



**Abb. 10-34: Beispiel eines Masse-Retentionszeit Diagramms des Ablaufs einer kommunalen Kläranlage.**

### 10.6.6 Zusammenfassung und Fazit Abwasserreinigungsanlage H

Für den Gesamtablauf der Kläranlage H konnte keine Wirkung auf *Bacillus subtilis* festgestellt werden. Doch sind die ermittelten RIHV-Werte aus dem HPTLC-Biolumineszenz-Hemmtest für einen Kläranlagenablauf als sehr hoch einzustufen. Die RIHV-Werte von der kommunalen Kläranlage G fallen deutlich geringer aus. Zusätzlich werden 11 stark auf die Acetylcholinesterase hemmende Fraktionen detektiert.

Die Ergebnisse der Wirkungsbezogenen Analytik und des Non-Target-Screenings zeigen eine Belastung des Kläranlagenablaufs, der qualitativ deutlich über dem einer kommunalen Kläranlage liegt. Auffällig sind die Banden der starken Acetylcholinesterase-Hemmung. Hier sollte der Ursache nachgegangen werden: handelt es sich um eine kurzzeitige oder Dauerbelastung der Kläranlage? Im zweiten Fall sollte der Versuch unternommen werden, die dafür relevanten Verbindungen zu identifizieren.

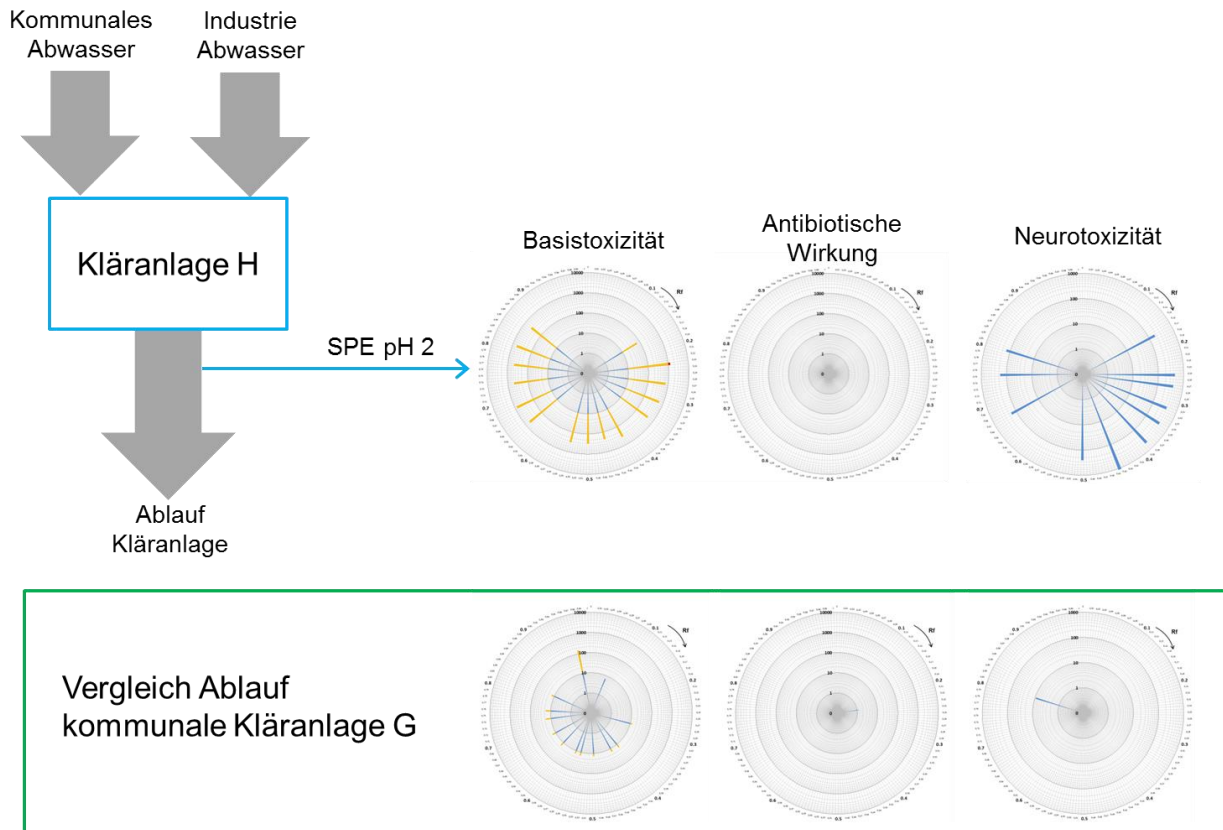


Abb. 10-35: Zusammenfassung der Ergebnisse für die Probe von der Kläranlage H anhand des SPE pH 2 Extraktes nach HPTLC/AMD-Trennung.

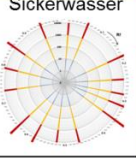





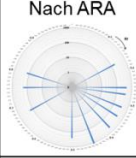


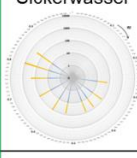
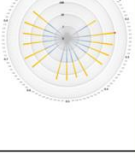
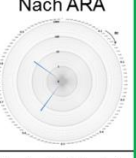




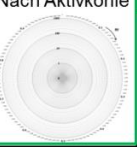
## **10.7 Zusammenfassung der kombinierten Anwendung der entwickelten HPTLC-WBA-Methoden**

Anhand der Referenzverbindungen konnte gezeigt werden, dass mit den weiterentwickelten WBA-Methoden über einen längeren Zeitraum reproduzierbare Ergebnisse erzielen lassen. Erst dadurch ist es möglich die Wirkung für eine Probenahmeestelle über die Zeit oder im Verlauf eines Prozess zu verfolgen.

Bei der SPE-Anreicherung von stark verschmutzten Wässern ist die Kontrolle auf einen möglichen Durchbruch mit einer zweiten Kartuschen unumgänglich. Zur Einschätzung der Belastung von unbekanntem Proben hat sich das Vorscreening durch Detektion der Wirkung mit dem Leuchtbakterientest ohne vorherige Trennung als sinnvolle erwiesen. Anhand dieses Ergebnisses kann das notwendige Auftragevolumen für die anschließende Trennung besser eingeschätzt werden.

Anhand der Vielzahl an unterschiedlichen Proben lassen sich die detektierten Wirkungen für eine erste Einschätzung in drei grobe Klassen einteilen (Tabelle 10-28). Erwartungsgemäß zeigt das Sickerwasser von der Sondermülldeponie die stärkste Wirkung. Welche aber im Verlauf des Aufreinigungsprozesses auf ein Niveau gebracht werden kann, welches einer kommunalen Kläranlage zugeführt werden kann. Die Wirkung des Sickerwassers einer kommunalen Deponie zeigt deutlich schwächere Wirkungen auf die Leuchtbakterien. Doch auch in diesem Wasser finden sich zwei Band mit einer stärkeren Hemmwirkung auf die AChE. Auffällig ist die Belastung des Ablaufes der Industriekläranlage. Im Vergleich zum Ablauf der kommunalen Deponie sind eine Vielzahl an mittelstark hemmenden Banden zu erkennen. Zudem sind in der Kläranlagenablaufprobe einige Banden detektierbar, welche die AChE-Aktivität sehr stark hemmen. Auch in der sanierten Deponie sind Verbindungen, mit einer mittelstarken Hemmung der AChE, zu erkennen.

**Tabelle 10-28: Vergleich der untersuchten Standorte anhand der SPE pH 2 Extrakte nach dem HPTLC-Leuchtbakterienhemmtest und HPTLC-AChE-Hemmtest. (ARA: Abwasserreinigungsanlage)**

	HPTLC-Leuchtbakterien-Hemmtest				HPTLC-AChE-Hemmtest			
	Deponie A	Deponie E	Deponie C	Kläranlage H	Deponie A	Deponie E	Deponie C	Kläranlage H
	Sondermüll-deponie	Kommunale Deponie	Sanierte Deponie	Industrie Kläranlage	Sondermüll-deponie	Kommunale Deponie	Sanierte Deponie	Industrie Kläranlage
Sehr starke Belastung	Sickerwasser 	Sickerwasser 		Nach ARA 	Sickerwasser Vorhanden, nicht auswertbar wegen stärkerer Eigenfluoreszenz 	Sickerwasser 	Sickerwasser 	Nach ARA 
Starke Belastung	Nach ARA 	Nach kommunaler. ARA 	Sickerwasser 		Nach ARA 	Nach kom. ARA 		
Normale Belastung	Nach Aktivkohle 				Nach Aktivkohle 			

Die Untersuchungsergebnisse zeigen zudem, dass auch bei der WBA Feldblindproben entscheidend sind, um Proben sicher beurteilen zu können. Auch die Grenzen der WBA-Methoden wurden erkannt. So stören fluoreszierende Substanzen die Auswertung der AChE. Zwar kann durch eine alternative Detektionsmethode die Wirkung qualitativ erkannt werden, aber eine Auswertung mit dem RIAV ist nicht möglich. Diese Problematik tritt bisher nur bei stark belasteten Proben auf und stört die Bewertung von Sauberwässern nicht. Zudem hat sich gezeigt dass der *Bacillus subtilis*-Hemmtest mit der Gaze zur Eindämmung der Diffusion nicht ausreichend empfindlich ist. Außerdem konnte bei diesem Test zum einige verstärkende wirkende Verbindungen detektiert werden. Diese lassen sich aber nicht im RIHV-Polardiagramm darstellen. Zudem zeigt sich, dass bei der Betrachtung von drei Endpunkten eine zusammenfassende Gesamtbewertung der Probe schwer fällt. Doch ist dies eine Voraussetzung für eine regulatorische Akzeptanz der Ergebnisse der WBA.

# 11 Entwicklung von Hilfswerkzeugen zur Identifizierung von Substanzen

## 11.1 Grundlagen

Umweltproben bestehen aus einer Vielzahl von Substanzen unterschiedlicher Herkunft. Da die Identifizierung dieser Vielzahl nur mit sehr großem Arbeitsaufwand möglich ist, muss eine Fokussierung auf relevanten Substanzen stattfinden. Als relevant werden in dieser Arbeit diejenigen Substanzen bezeichnet, die eine Wirkung in den Biotests zeigen. Für diese soll eine Identifizierungsstrategie entwickelt werden.

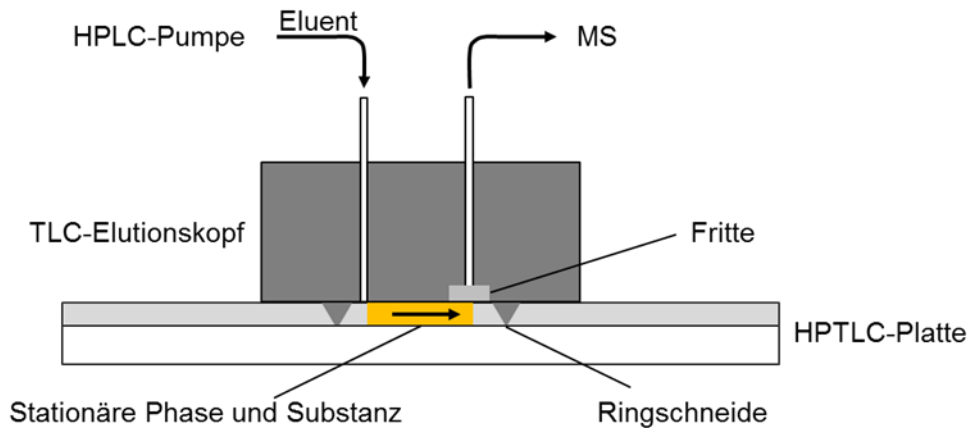
### 11.1.1 TLC-MS

Die Identifizierung von Substanzen erfolgt oftmals über ein Massenspektrum (MS). Zur Überführung der Analyten von der TLC-Platte in das MS stehen vielzähligen Techniken zur Verfügung. Diese Techniken lassen sich in Desorptionsverfahren und in Elutionsverfahren einteilen [300]. Zu einem weit verbreiteten Vertreter der Desorptionstechnik gehört die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (eng. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) [301, 302, 94] oder die „Direct Analysis in Real Time“ (DART) [303-305]. Bei der Letzt genannten Technik wird die zu analysierende Zone einem erhitzten Gasstrom bestehend aus angeregtem Helium ausgesetzt. Dabei werden die Analyten desorbiert und protoniert. Neben einer qualitativen erlaubt die DART-Technik auch eine quantitative Bestimmung von Substanzen auf der HPTLC-Platte [306]. Mit beiden vorgestellten Desorptionstechniken ist es möglich die entwickelte HPTLC-Platte vollständig mit Massenspektren abzubilden.

Das weit verbreitetste Elutionsverfahren ist die von Luftmann 2004 vorgestellte Technik mit einem Elutionskopf [307]. Zur Überführung der Probenmoleküle in das MS wird der Elutionskopf auf die Substanzbande gepresst, so dass eine Ringschneide die Zone vom der restlichen Teil der Platte abtrennt. Im Extraktionsmodus des Interfaces wird ein Lösemittelgemisch durch den auf die HPTLC-Platte aufgedrückten Elutionskopf gepumpt. Mit einer Fritte erfolgt das Zurückhalten von Partikel, die sich von der stationären Phase während des Extraktionsvorganges lösen können. Anschließend findet die Überführung des Extraktes direkt in die Ionenquelle eines MS statt (Abb. 11-1). Es lassen sich hierbei alle Ionenquellen verwenden, die auch bei der HPLC-MS-Kopplung angewandt werden. Der Extrakt kann auch in einem Gläschen aufgefangen werden und erst später einem MS zugeführt werden. Das Auffangen des Extraktes hat zudem den Vorteil, dass dieses verschiedene MS/MS-Experimente, z. B. bei verschiedenen Kollisionsenergien, durchgeführt werden können. Au-



ßerdem kann dieses Extrakt auch mit anderen spektrometrischen Methoden beispielsweise NMR untersucht werden [308].



**Abb. 11-1: Aufbau des Elutionskopfes zur Extraktion von Substanzen von einer HPTLC-Platte.**

Inzwischen hat sich das TLC-MS-Interface als Werkzeug zur Identifizierung von unbekannt Verbindungen etabliert [309, 201, 207]. Neben dem qualitativen Einsatz, ist auch eine Quantifizierung mit dem TLC-MS-Interface möglich [310]. Noch ist aufgrund der fehlenden Automatisierung die Güte der Kalibrierung stark vom Anwender abhängig. Diese Streuung lässt sich durch den Einsatz von internen Standards wesentlich verbessern [311]. Doch gibt es auch schon erste erfolgreiche Versuche die Elution vollständig zu automatisieren [312].

Bei der WBA ist es für die TLC-ESI-MS-Kopplung empfehlenswert eine zweite Platte unter den gleichen Bedingungen zu entwickeln und von dieser dann die interessierenden Substanzen zu eluieren. Zwar kann auch die Platte, auf der der Biotest stattgefunden hat verwendet werden, doch muss das Massenspektrometer aufgrund der hohen Salzfracht aus dem Nährmedium, besonders beim Leuchtbakterien-Assay, öfters gereinigt werden. Zudem können auf der Platte neue Metabolite entstehen, wodurch eine Zuordnung der Wirkung auf eine Substanz erschwert wird. Auch eine irreversible Bindung des Moleküls an zellulären Strukturen ist denkbar. Bei der MS-Analyse von deuteriertem Bisphenol-A direkt von der HPTLC-YES-Platte (Östrogene Wirkung) zeigte, dass die Wiederfindung nur noch 9 % beträgt [109].

### 11.1.2 Derivatisierung

Inzwischen sind hochauflösende Massenspektrometer (HRMS) wie Flugzeit- (TOFMS) oder Orbitrapmassenspektrometer weit verbreitet. Anhand der exakten Masse und des Isotopenmusters lässt sich eine Summenformel generieren. Doch ist eine Zuordnung zu einer Struktur, auch mithilfe von MS/MS-Experimenten, ein schwieriger Identifizierungsprozess. Eine Hilfe können Derivatisierungsreaktionen darstellen. Anhand von spezifischen Reaktionen ist es möglich funktionelle Gruppen in Molekülen zu erkennen. Eine Vielzahl von Reagenzien

für die qualitative und quantitative HPTLC-Analyse sind in verschiedenen Monographien beschrieben [313, 133, 314-316]. Doch sind die wenigsten Reagenzien spezifisch für eine funktionelle Gruppe.

**Tabelle 11-1: Ausgewählte Derivatisierungsreagenzien für die HPTLC.**

Substanzklasse	Reagenz	Beispiel (NWG)	Lit.
Primäre Amine	Bratton-Marshall	Amitrol (1 ng)	[317, 313, 318]
Primäre und sekundäre Amine, Phenole, Thiole	NBD Chlorid	Prolin (5 ng)	[313]
Aldehyde und Ketone	2,4-Dinitrophenylhydrazine	Dehydroascorbinsäure (10 ng)	[313]
Aldehyde	Purpald	Hexadecanal (1 µg)	[319]

Die Umsetzungen mit den Derivatisierungsreagenzien erfolgen entweder vor oder nach der Trennung. Durch die prächromatographische Derivatisierung lassen sich einige Substanzen besser trennen und flüchtige Verbindungen werden in schwer flüchtige Derivate überführt [313]. Die Identifizierung von unbekanntem Substanzen mit Hilfe der prächromatographischen Derivatisierung wird durch das veränderte Trennverhalten der Derivate erschwert. Da die Auftrennung der Substanzen auf der HPTLC-Platte erhalten bleibt, ist auch eine postchromatographische Derivatisierung möglich. Dabei lassen sich die Reaktionsprodukte anhand der gleichen Position direkt ihrer Ausgangsverbindung zuordnen.

## 11.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Voraussetzung der Zuordnung einer Wirkung zu einer Struktur ist eine gute Trennung der Substanzen. Jedoch ist aufgrund der komplex zusammengesetzten Proben davon auszugehen, dass die Trennleistung der HPTLC/AMD nicht ausreicht, die Substanzen vollständig zu trennen. Eine Bande beinhaltet unter Umständen mehrere Substanzen. Dies erschwert die Zuordnung von Substanz und Wirkung bei den eingesetzten Testsystemen. Zur Identifizierung von Substanzen ist es deshalb erforderlich, vor der massenspektrometrischen Detektion noch eine weitere chromatographische Trennung voranzustellen. Bewährt hat sich die Kopplung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit einer Umkehrphasen-Trennsäule an ein HRMS.

Zur Untersuchung der Anzahl an Substanzen, die sich in einer Bande befinden, wurde 75 µL des Sickerwassers ohne Probenvorbereitung von der Deponie D aus der Serie 1 auf eine HPTLC-Platte aufgetragen und mit dem HPTLC/AMD-Gradienten 9 aufgetrennt. Die Untersuchung mit dem Leuchtbakterienhemmtest zeigte erwartungsgemäß eine Vielzahl von Hemmbanden (Abb. 11-2, A).



Auf einer parallel entwickelten Platte wurde die Wasserprobe zweimal aufgetragen. Von dieser wurden die in Abb. 11-2 farblich markierten Bereiche mit einem Methanol-Wasser-Gemisch (1:1) abwechselnd von beiden Probehahnen extrahiert. Zum Einsatz kam dabei ein 2 mm breiter Extraktionskopf. Mit einem HPLC-QTOFMS-System wurden die HPTLC-Extrakte sowie die Original-Sickerwasserprobe (ohne Anreicherung und HPTLC) im negativen sowie im positiven ESI-Modus gemessen. Als Blindwert für die HPTLC-Extrakte diente hier ein Bereich auf der Platte, der nicht mit der Probe in Berührung kam (HPTLC-Plattenblindwert).

Die Vielzahl an Substanzen (Komponenten) in einer Umweltprobe wird anhand der Original-Sickerwasserprobe in Abb. 11-2 verdeutlicht. Alle ermittelten 4645 Komponenten in der Original-Sickerwasserprobe werden in Abb. 11-2 als graue Punkte in einem Masse-Retentionszeit-Diagramm (Punktwolke) dargestellt. Von den ermittelten Komponenten aus den HPTLC-Extrakten wurde jeweils der HPTLC-Plattenblindwert subtrahiert und mit denen der Original-Sickerwasserprobe abgeglichen. Entsprechend der farblichen Kennzeichnung aus Abb. 11-2 A sind in diese in die Punktwolke (Abb. 11-2 B) eingezeichnet. Alle farblich markierten Punkte sind Komponenten, die in der Original-Sickerwasserprobe und in einem der HPTLC-Extrakte zu finden sind. Zu erkennen ist, dass sich in einem Extrakt eine Vielzahl an Komponenten befinden und diese über den gesamten Retentionszeit- und Massenbereich verteilt sind (Tabelle 11-2). Dieses Ergebnis bestätigt die Strategie das HPTLC-Extrakt vor der MS-Detektion nochmals aufzutrennen.

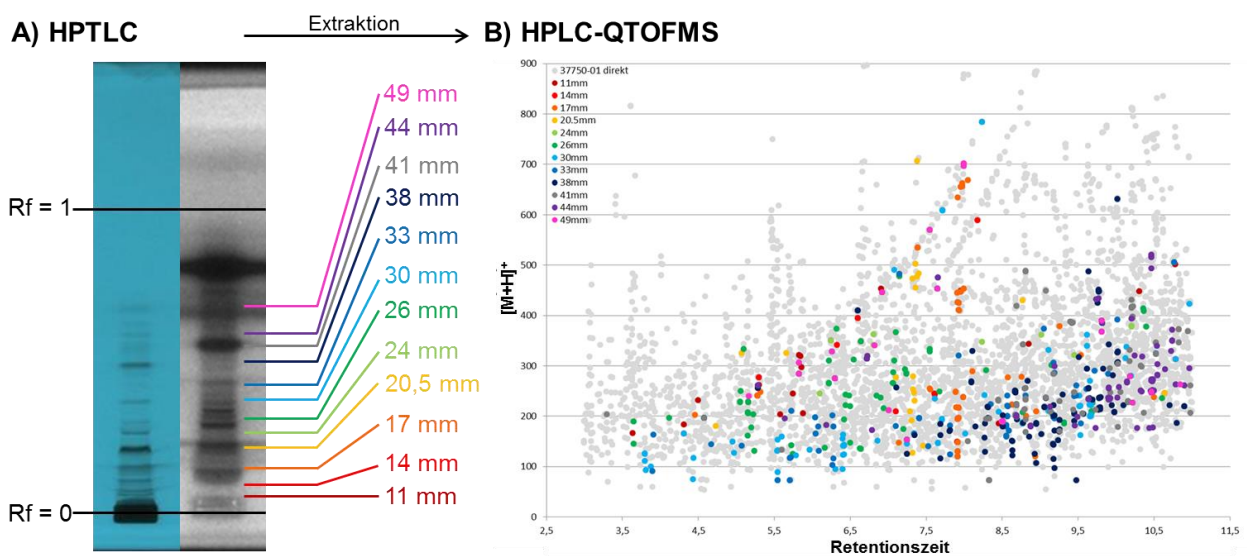


Abb. 11-2: A) Die Trennung der unbehandelten Wasserprobe aus dem kontaminierten Bereich mittels HPTLC/AMD und Detektion der Biolumineszenz-Hemmung. Farblich markiert sind die extrahierten Zonen. B) Das Masse-Retentionszeit-Diagramm für die detektierten Komponenten. Grau sind die Komponenten aus der unbehandelten Wasserprobe eingezeichnet und passend farblich markiert diejenigen Komponenten, die mit den Komponenten der HPTLC-Extrakte übereinstimmen.

**Tabelle 11-2: Komponentenanzahl für die gewonnenen HPTLC-Extrakte und deren Retentionszeitverteilung.**

<b>Extrakt bzw. Probe</b>	<b>Komponentenanzahl</b>	<b>Rt-Bereich</b>
Original-Sickerwasserprobe	4645	3,00-11,00 min (gesamter Auswertebereich)
Extrakt 11 mm	66	3,64-10,9 min
Extrakt 14 mm	28	5,28-10,79 min
Extrakt 17 mm	52	4,46-10,9 min
Extrakt 20,5 mm	26	4,73-10,9 min
Extrakt 24 mm	29	3,65-10,21 min
Extrakt 26 mm	82	3,65-10,79 min
Extrakt 30 mm	86	3,80-10,97 min
Extrakt 33 mm	77	3,90-10,90 min
Extrakt 38 mm	140	4,58-10,90 min
Extrakt 41 mm	87	3,30-10,98 min
Extrakt 44 mm	82	5,29-10,97 min
Extrakt 49 mm	23	5,17-10,85 min

Für den schwierigen Identifizierungsprozess wird die in Abb. 11-3 gezeigte Strategie vorgeschlagen. Hierbei werden Substanzen für die Identifizierung anhand der Wirkung priorisiert. Die Identifizierung der priorisierten Substanzen findet von weiteren, unter gleichen Bedingungen entwickelten, Platten statt. Von einer dieser Platten werden die priorisierten Bereiche extrahiert und mit einem HPLC-HRMS-System analysiert. Die anderen Platten werden mit spezifischen Derivatisierungsreagenzien behandelt und die eventuell entstehenden farbigen Reaktionsprodukte detektiert. Anhand der entstehenden Derivatisierungsprodukte kann auf das Vorhandensein von entsprechenden funktionellen Gruppen in mindestens einer der Substanzen aus den Banden geschlossen werden. Für eine weitere Verifizierung, welche Komponente mit dem eingesetzten Derivatisierungsreagenz umgesetzt wurde, erfolgt eine Extraktion der Reaktionsprodukte von der Platte und eine Untersuchung mit der HPLC-HRMS. Anhand eines Abgleiches der erwarteten Differenzen (Tabelle 11-3) zwischen der Masse der direkt extrahierten Substanz und der Masse des bei einer Umsetzung entstehenden Derivatisierungsprodukts kann die nachgewiesene funktionelle Gruppe einer Komponente zugeordnet werden. Mit zusätzlichen Information wie z. B. archivierte MS/MS-Spektren aus Datenbanken wird die Chance die Wirkung einer Struktur zuzuordnen nochmals erhöht.

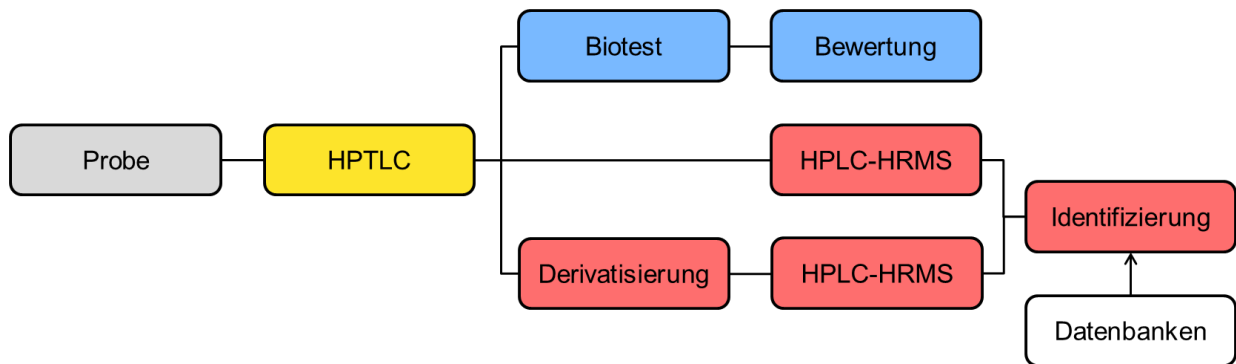


Abb. 11-3: Strategie zur Identifizierung von Substanzen bei der HPTLC-WBA.

Tabelle 11-3: Massendifferenzen der Derivatisierungsprodukte zur Ausgangsverbindung.

Derivatisierungsreagenz	Substanzklasse	Massendifferenz zur Ausgangsverbindung
2,4-DNPH	Aldehyde/Ketone	180,0283
Purpald	Aldehyde	123,9956
Bratton-Marshall	Primäre Amine	197,0953
H/D-Austausch	Austauschbare Protonen	1,0063

### Nachweis von primären Aminen

Der spezifische Nachweis von primären, aromatischen Aminen auf der HPTLC-Platte erfolgt mit dem Bratton-Marshall-Reagenz (N-[1Naphthyl]-ethylen-di-amin-di-hydrochlorid) [317]. Für die Überprüfung der in der Literatur beschriebenen Methode [313, 318] wurden Lamotrigin, Amisulprid und ihre N-Oxide als quadratische Flächen (25 mm<sup>2</sup>) auf die HPTLC aufgetragen. Die Strukturen der Verbindungen sind in Abb. 11-4 gezeigt. Dabei erfolgte die Auftragung der einzelnen Substanzen als Konzentrationsreihe. Dies diente der Abschätzung der Empfindlichkeit.

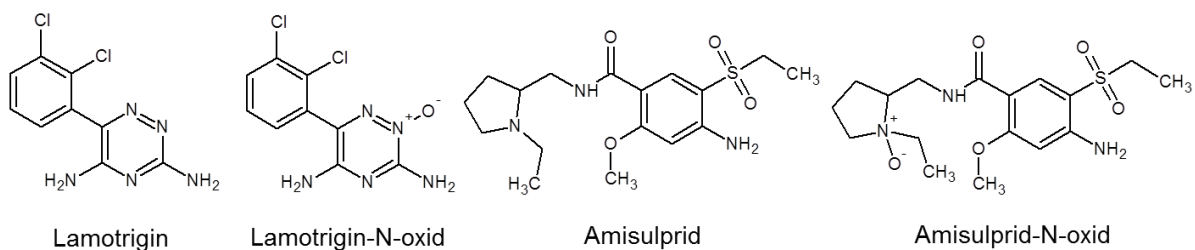
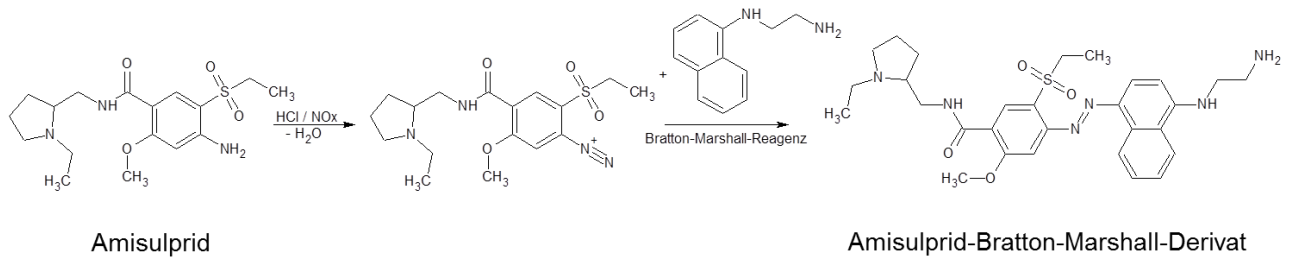
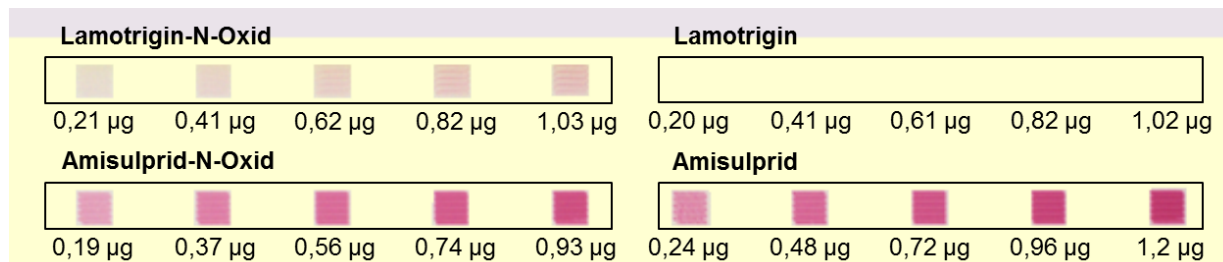


Abb. 11-4: Strukturen von Lamotrigin, Amisulprid und ihren N-Oxiden.



**Abb. 11-5: Nachweisreaktion des primären Amins in Amisulprid mittels des Bratton-Marshall-Reagens.**

Abb. 11-6 zeigt das Ergebnis der Derivatisierung nach Literaturbedingungen. Auffallend ist, dass bei diesen Versuchsbedingungen ein intensiver gelber Hintergrund auftritt. Dieser könnte den Nachweis von geringen Konzentrationen eines primären Amins stören. Trotz dieses Hintergrundes ist es möglich 0,20 µg von Lamotrigin-N-Oxid, Amisulprid und Amisulprid-N-Oxid als violette Derivate gut nachzuweisen. Dahingegen liefert Lamotrigin als primäres Amin kein farbiges Produkt.



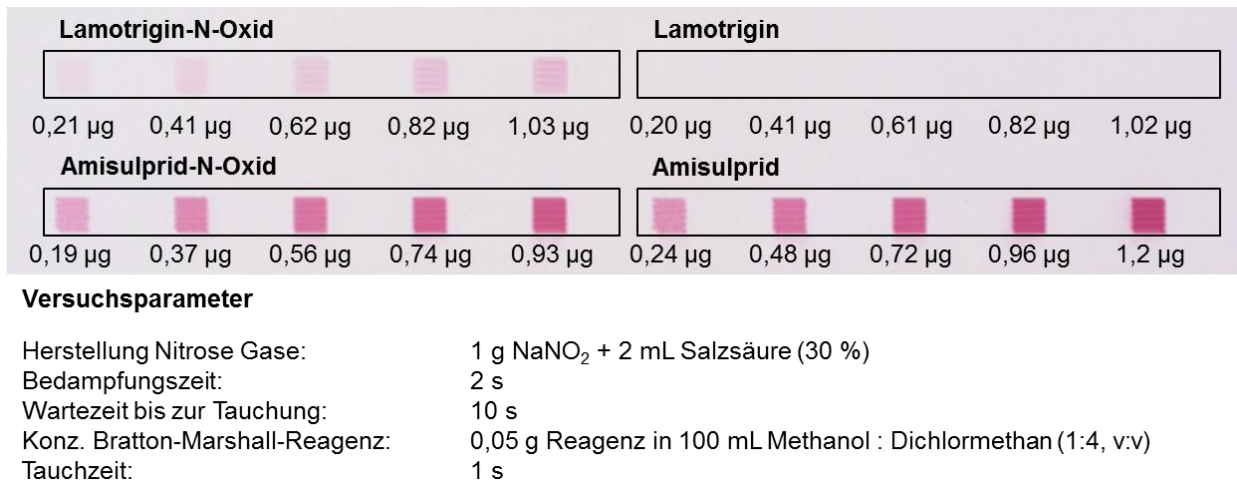
**Versuchsparameter**

Herstellung Nitrose Gase:	12 g NaNO <sub>2</sub> + 10 mL Salzsäure (30 %)
Bedampfungszeit:	10 s
Wartezeit bis zur Tauchung:	keine
Konz. Bratton-Marshall-Reagenz:	0,2 g Reagenz in 100 mL Methanol : Dichlormethan (1:4, v:v)
Tauchzeit:	2 s

**Abb. 11-6: Derivatisierung von primären Aminen mit dem Bratton-Marshall-Reagenz nach Literaturbedingungen.**

In der darauf folgenden Optimierung zur Vermeidung des gelben Hintergrundes zeigte sich, dass mehrere Parameter dessen Intensität beeinflussen. In der 0,2 %igen Literaturreagenz-lösung liegt N-[1Naphthyl]ethylen-diamindihydrochlorid im Überschuss vor und wurde auf eine 0,05 %ige Lösung umgestellt. Identisches wurde für die Erzeugung der nitrosen Gase festgestellt. Die zuvor eingesetzten 12 g NaNO<sub>2</sub> und 10 mL HCl (30 %) wurden auf 1 g und 2 mL reduziert. Beim optimierten Nachweis werden die nitrosen Gase in einer Doppeltrogkammer hergestellt und diese für 2 min verschlossen gehalten. Erst dann ist sichergestellt, dass die Kammer mit dem notwendigen HCl-Dampf gesättigt ist. Nach Ablauf der 2 min erfolgt das Bedampfen der Platte mit den nitrosen Gasen und der HCl für 2 s. Die Angabe von 10 s war deutlich zu lange. Zur Entfernung überschüssiger nitrosen Gase von der Plattenoberfläche, wird die Platte für 10 min unter einem Abzug positioniert und anschließend für 1 s in die

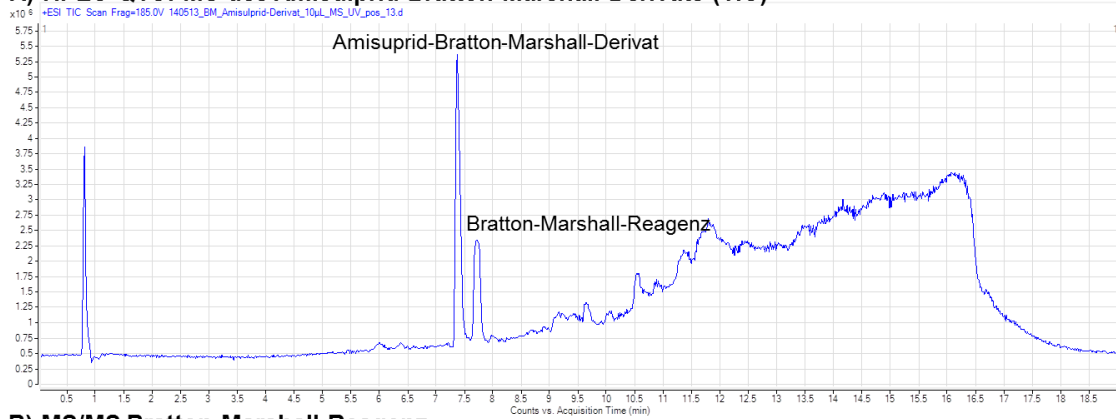
0,05 %ige N-[1Naphthyl]-ethylen-diamin-di-hydrochlorid-Lösung getaucht. Mit diesen optimierten Bedingungen ist kein gelber Hintergrund mehr vorhanden (Abb. 11-7). Auch hier ist keine Verfärbung auf den Lamotrigin-Auftrageflächen zu sehen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der 1,2,4-Triazinring zu stark deaktiviert ist. Bei einer Versuchsreihe mit den Atrazin-Metaboliten Desethyl-atrazin, Desethyl-2-hydroxy-atrazin, Desethyl-desisopropyl-atrazin, Desethyl-desisopropyl-2-hydroxy-atrazin und Desethyl-desisopropyl-atrazin (alles 1,3,5-Triazine mit mindestens einem primären Amin) konnte ebenso keine Verfärbung festgestellt werden.



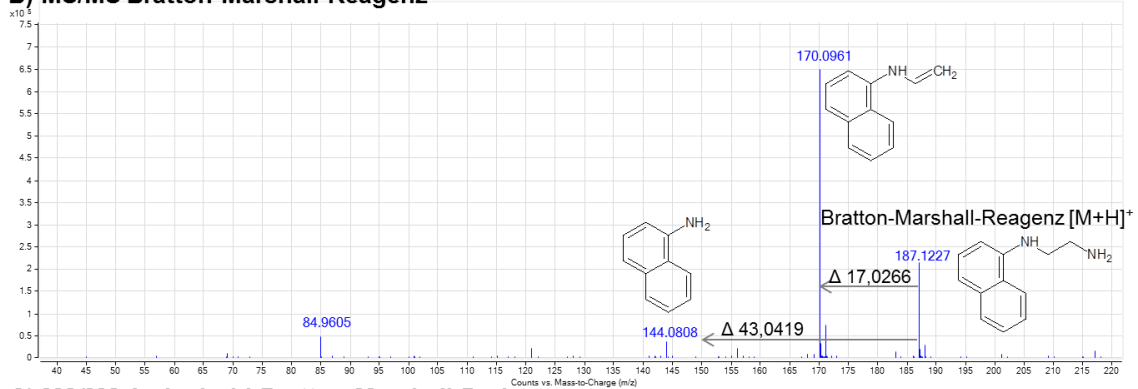
**Abb. 11-7: Nachweis von primären Aminen mit dem Bratton-Marshall-Reagenz mit optimierten Versuchsbedingungen.**

Für weitere Untersuchungen wurden die Derivate von der Platte extrahiert und mit einem HPLC-QTOFMS untersucht. Gesucht wurde nach den Massen der nicht umgesetzten Substanzen und den angenommenen Derivaten ( $\Delta m/z$  197,0953). Die bei der Reaktion nicht umgesetzten Substanzen konnten in jedem Extrakt nachgewiesen werden. Bei Amisulprid und Amisulprid-N-Oxid lassen sich die angenommenen Derivate anhand ihrer Masse identifizieren. Dies ist in Abb. 11-8 am Beispiel von Amisulprid gezeigt. Neben der vorhergesagten Masse lässt sich die Derivatisierung zusätzlich anhand der spezifischen Fragmentierung des Bratton-Marshall-Reagenz bestätigen (Abb. 11-8, B und C). Das farbige Derivat von Lamotrigin-N-Oxid konnte nicht gefunden werden. Es könnte sein, dass das Derivat nur auf der Platte stabil war und während der Extraktion bzw. im Extraktionslösemittel instabil wurde.

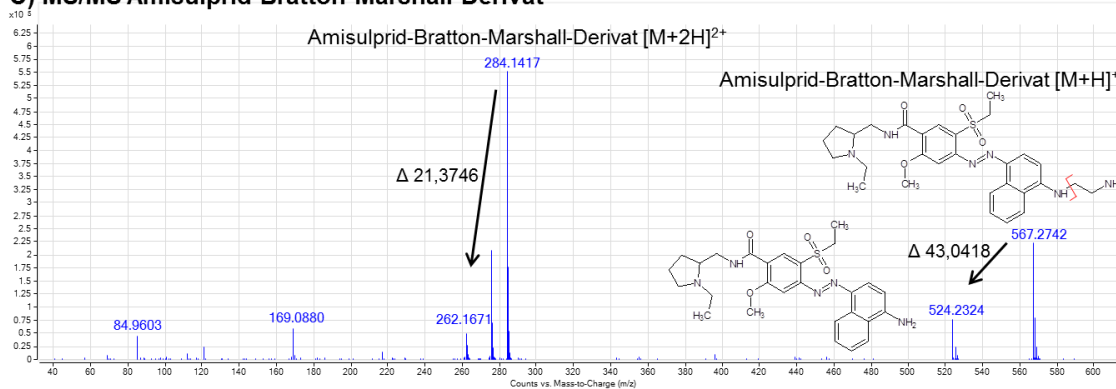
**A) HPLC-QTOFMS des Amisulprid-Bratton-Marshall-Derivats (TIC)**



**B) MS/MS Bratton-Marshall-Reagenz**



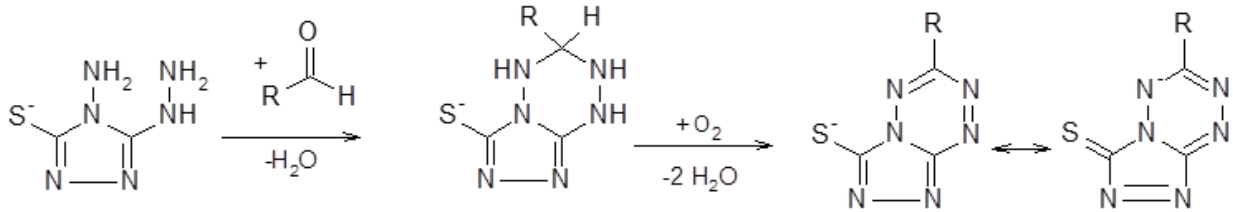
**C) MS/MS Amisulprid-Bratton-Marshall-Derivat**



**Abb. 11-8: HPLC-QTOFMS-Messung des Amisulprid-Bratton-Marshall-Derivats.**

**Nachweis von Aldehyden und Ketonen**

Der Nachweis von Aldehyden und Ketonen mit 2,4-Dinitrophenyl-hydrazon (2,4-DNPH) ist eine bekannte Nachweisreaktion und hat sich auch in der HPTLC bewährt. Nicht so bekannt ist der spezifische Nachweis von Aldehyden mit Purpald (4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole, CAS: 1750-12-5) [319, 320]. Purpald bildet mit Aldehyden in einer Kondensationsreaktion ein Aminal, welches mit dem Luftsauerstoff zu einem 6-mercapto-3-substituierten-s-triazolo(4,3-b)-s-tetrazine reagiert (Abb. 11-6). Dieses Produkt bildet im Basischen einen violetten Farbstoff. Zwar reagieren Ketone auch mit Purpald, doch die gebildeten Ketale können nicht zu einem Farbstoff oxidiert werden. Die Produkte der beiden vorgestellten Derivatisierungen lassen sich ebenso mit der HPLC-HRMS detektieren



**Abb. 11-9: Reaktion von Purpald mit einem Aldehyd zu einem violetten Farbstoff (nach [319]).**

Im Folgenden soll gezeigt werden wie diese beiden Reaktionen helfen können, postulierte Ozonungsprodukte von 4-Methyl-1H-benzotriazol bzw. 5-Methyl-1H-benzotriazol zu bestätigen. Dazu wurden aus einem Ozonungsbatch-Versuch die Proben zuerst mit der HPLC ereignisorientiert fraktioniert. Die gesammelten Fraktionen wurden mit der in der Abb. 11-3 gezeigten Strategie weiteruntersucht. Da die eigentliche Zielsetzung die Identifizierung der Ozonungsprodukte war und nur eine sehr geringe Probemenge vorlag, wurde auf die Untersuchung der Wirkung verzichtet. Nach dem Auftragen der einzelnen Fraktionen und der HPTLC/AMD-Trennung fand ein Transfer der detektierten Substanz von der HPTLC-Platte in ein HPLC-QTOFMS statt. Zudem erfolgte die Entwicklung von zwei weiteren Platten mit denselben Fraktionen und dem gleichen Gradienten. Die Behandlung einer dieser Platten mit 2,4-DNPH diente dem Nachweis von Carbonylverbindungen. Die Bestätigung der postulierten Aldehyde geschah mit dem Purpald-Reagenz auf der anderen Platte. In Abb. 11-10 und Abb. 11-11 ist exemplarisch der Nachweis der Aldehyd-Gruppe im Ozonungsprodukt aus 4-Methyl-1H-benzotriazol mit  $m/z$  147,0432 (M147) gezeigt.

Auf der underivatisierten Platte war eine Bande unter dem UV-Licht bei  $\lambda = 300$  nm zu erkennen. Die gemessene Masse von der Bande der extrahierten Substanz stimmte gut mit dem postulierten Produkt 1H-Benzotriazol-4-carbaldehyd überein (Abb. 11-10 a). Des Weiteren reagierte diese Substanz bei der Derivatisierung nach der HPTLC/AMD-Entwicklung mit 2,4-DNPH. Auch stimmten die Masse und das Isotopenverhältnis gut mit der vorhergesagten Werten des entsprechenden Hydrazons überein (Abb. 11-10 b). Aufgrund der Struktur zeigt das Derivat auf der HPLC-Säule eine höhere Retention. Der Aldehydnachweis mit Purpald auf der HPTLC-Platte zeigte eine violette Verfärbung der Bande und war somit positiv. Das entsprechenden Reaktionsprodukts konnte ebenso mittels HPLC-QTOFMS im HPTLC-Extrakt nachgewiesen werden (Abb. 11-11). Mit dieser Methode konnte ebenso die Ringöffnung durch Reaktion mit Ozon unter Bildung von Bialdehyden nachgewiesen werden. Anhand der gemessenen Masse der Derivate zeigte sich, dass das Ozonungsprodukte zweimal mit 2,4-DNPH reagiert [321].



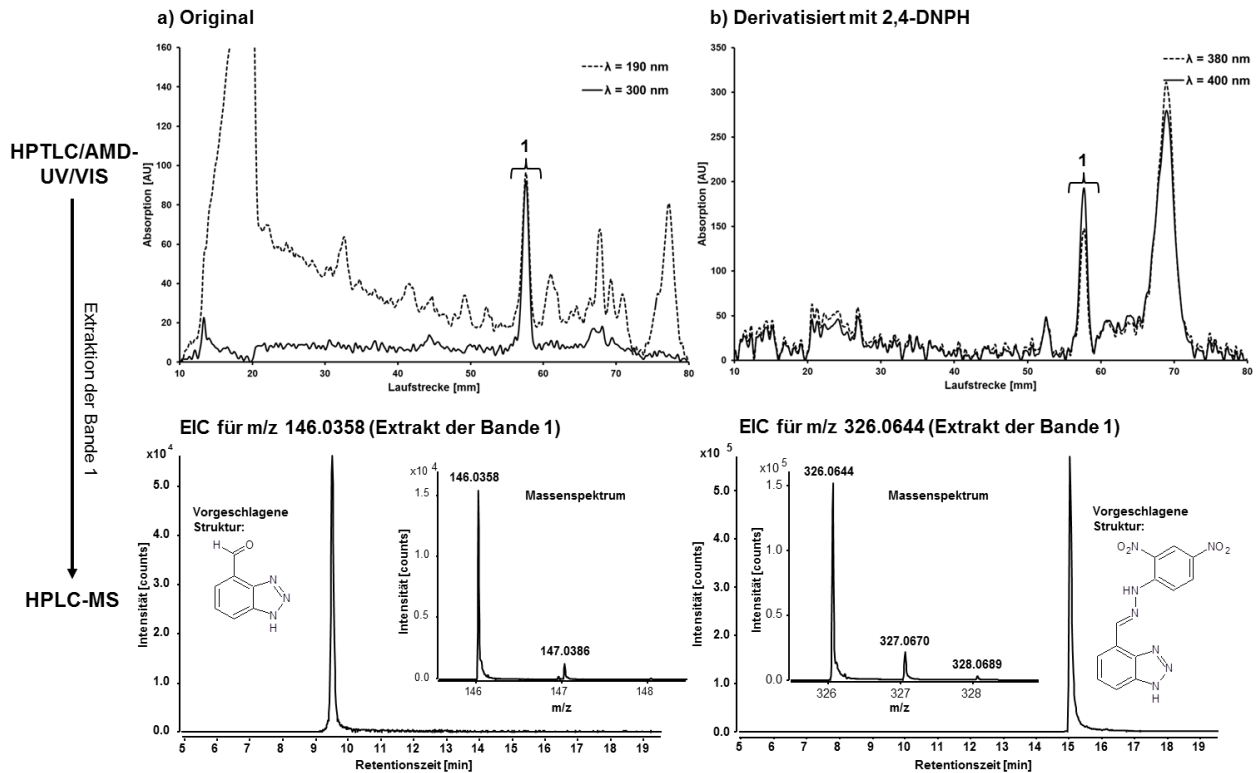


Abb. 11-10: Nachweis einer Aldehydgruppe im Ozonungsprodukte M147 von 4-Methyl-1H-benzotriazol auf der HPTLC-Platte anhand der Derivatisierung mit 2,4-DNPH und anschließender HPLC-MS-Kopplung (ESI(-)).

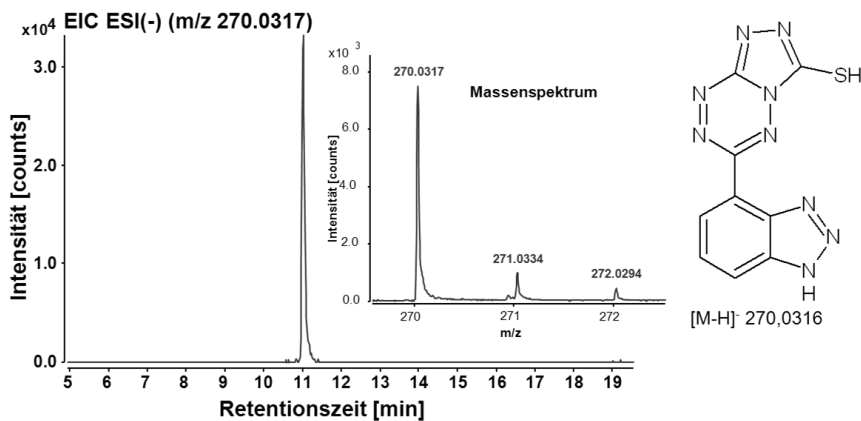


Abb. 11-11: Nachweis einer Aldehydgruppe im Ozonungsprodukte M147 von 4-Methyl-1H-benzotriazol auf der HPTLC-Platte anhand der Derivatisierung mit Purpald und anschließender HPLC-MS-Kopplung (ESI(-)).

### H/D-Austausch

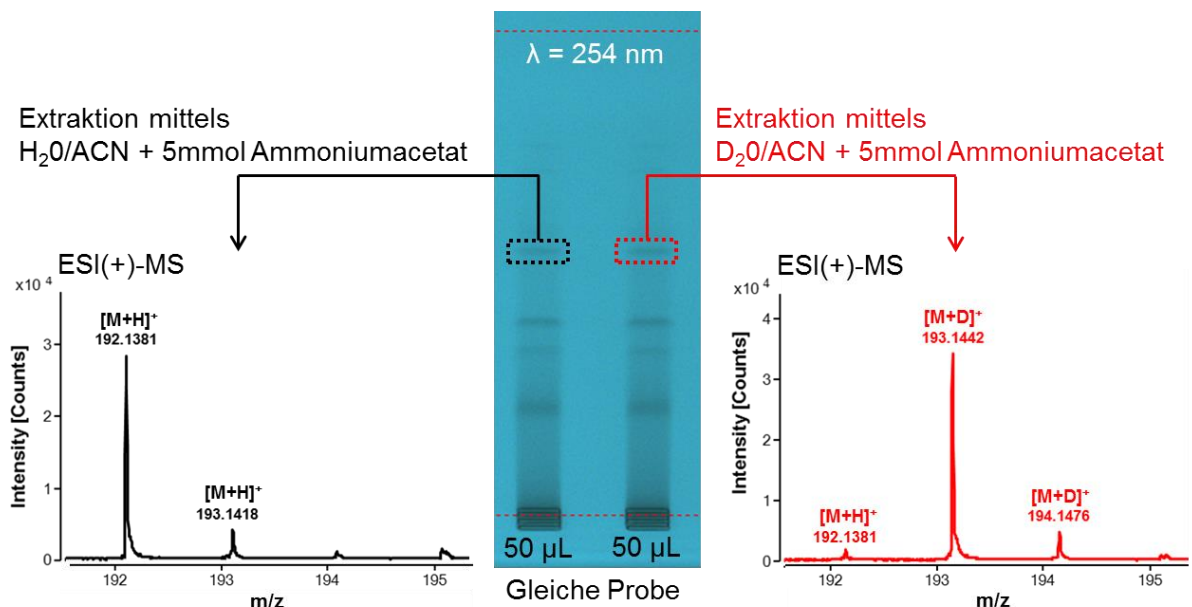
Eine besondere Art der Derivatisierung stellt der H/D-Austausch dar. Hier werden austauschbaren Protonen gegen Deuterium ersetzt. Dies passiert wenn sich der Analyt in  $D_2O$  oder  $CH_3OD$  befindet. Im Massenspektrum kann für jedes ersetztes Proton im Moleküllion eine Massenverschiebung von 1.0063 beobachtet werden. Durch diese Massenverschie-



bung lässt sich die Anzahl der möglichen Strukturvorschläge für eine Summenformel einschränken.

Damit bei der HPLC ein vollständiger H/D-Austausch gewährleistet wird, muss die Chromatographie in deuterierten Lösemitteln stattfinden [322]. Hierbei wird vergleichsweise viel Lösemittel verbraucht, was die Chromatographie für ein H/D-Austausch-Experiment teuer macht. Eine Alternative stellt der H/D-Austausch, der erst nach der HPLC-Trennung im Elektro-Spray stattfindet („on the fly“) [323]. Jedoch kann hier kein vollständiger Austausch gewährleistet werden.

Da nach der HPTLC-Trennung die Substanzen lösemittelfrei auf der Platte vorliegen, kann diese Problematik hier umgangen werden. Hier findet bei der Überführung der Substanzen ins MS mit dem Extraktionskopfes ein Losemittelwechsel statt. Wird bei der Extraktion ein deuterierter „Protonendonator“, z. B. D<sub>2</sub>O, eingesetzt, kann bei einem geringen Losemittelverbrauch ein nahezu vollständiger Austausch gewährleistet. Um die Anzahl an austauschbaren Protonen zu erkennen, muss die Probe zweimal mit dem gleichem Volumen auf die HPTLC Platte aufgetragen werden. Nach der Trennung erfolgte die Extraktion der Substanzzonen auf der ersten Bahn mit H<sub>2</sub>O/Acetonitril mit 5 mmol Ammoniumacetat. Die gleichen Substanzzonen wurden auf der zweiten Bahn mit D<sub>2</sub>O/Acetonitril mit 5 mmol Ammoniumacetat extrahiert (Abb. 11-12).

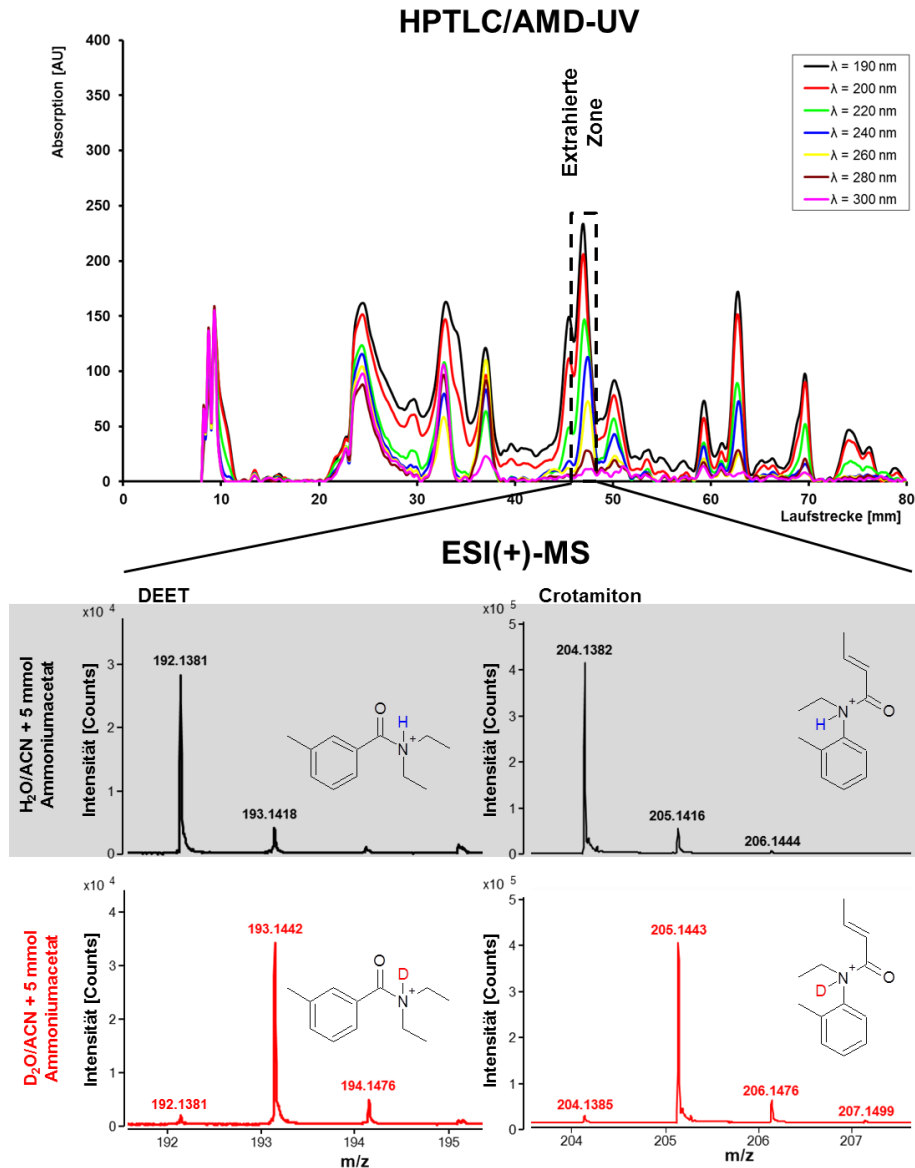


**Abb. 11-12: Vorgehensweise der Untersuchung auf austauschbare Protonen in Substanzen mittels TLC-MS.**

In Abb. 11-13 ist der Mehrwellenlängen-Scan der Deponiesickerwasserprobe nach HPTLC/AMD-Trennung (Gradient 8) zu sehen. Die markierte Zone bei 47 mm wurde von beiden Bahnen wie oben beschreiben extrahiert.

In dem Wasser/Acetonitril-Extrakt war es im positiven Elektrospray-Modus möglich zwei Komponenten mit  $m/z$  192,1381 und  $m/z$  204,1382 zu detektieren. Zusammen mit dem Isotopenmuster kann diesen Komponenten die Summenformeln  $C_{12}H_{17}NO$  bzw.  $C_{13}H_{17}NO$  zugeordnet werden. Nach der Extraktion mit Deuteriumoxid/Acetonitril fand für beide Komponenten eine Zunahme des  $m/z$ -Verhältnis um 1,0063 statt. Wenn von einem  $[M+H]^+$  bzw.  $[M+D]^+$  Quasimoleküllion ausgegangen wird, bedeutet dies, dass es sich in beiden Fällen um Substanzen handelt, die keine austauschbaren Protonen besitzen.

Die Datenbankabfrage für  $C_{12}H_{17}NO$  auf Chemspider [324] ergab 2652 mögliche Strukturen. Durch Einschränkung der Strukturen durch weitere Metadaten (Patente, Spektren usw.), wurde die Trefferzahl auf 58 reduziert. Mithilfe der Information aus dem H/D-Austausch-Experiment konnte diese Trefferzahl auf 22 eingeschränkt werden. Zu den verbleibenden Treffern gehören z. B. Phendimetrazin und DEET (N,N-Diethyl-*m*-toluamid). Mit Hilfe von Referenzsubstanzen erfolgte die Zuordnung der Summenformel  $C_{12}H_{17}NO$  zum Insektenabwehrmittel DEET (Diethyltoluamid). Mit der gleichen Vorgehensweise konnte die Summenformel  $C_{13}H_{17}NO$  dem Arzneimittel Crotamiton zugeordnet werden.



**Abb. 11-13: Identifizierung von DEET und Crotamiton aus einem Deponiesickerwasser mithilfe der Untersuchung auf austauschbare Protonen.**

In einer Grundwasserprobe ließ sich ebenso eine auffällige Bande detektieren. Zur Identifizierung wurde diese Zone wie oben beschrieben einmal mit H<sub>2</sub>O/Acetonitril und einmal mit D<sub>2</sub>O/Acetonitril extrahiert. In der MS-Analyse zeigte sich, dass die Substanz mit der Summenformel C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O ein austauschbares Proton besitzt. Eine Datenbankabfrage ergab als Verdachtskandidat 3-Cyclohexyl-1,1-dimethylurea. Für die Strukturaufklärung wurde mit beiden Extrakten ein MS/MS-Experiment durchgeführt (Abb. 11-14). Der Intensitätsunterschied im MS-Spektrum lässt sich mit einem Verdünnungseffekt erklären. Die Literaturrecherche ergab, dass diese Substanz bereits 2004 in der Maas bis zu 5 µg/L gefunden wurde [325]. Der Abgleich des gemessenen mit dem veröffentlichten MS/MS-Spektrums ergab eine gute Übereinstimmung. Durch die Massenverschiebung einzelner Fragmente aufgrund des H/D-Austausches können die postulierten Fragmente bestätigt werden. Damit konnte 3-

Cyclohexyl-1,1-dimethylurea als die auffällige Komponente in dieser Probe tendenziell identifiziert werden.

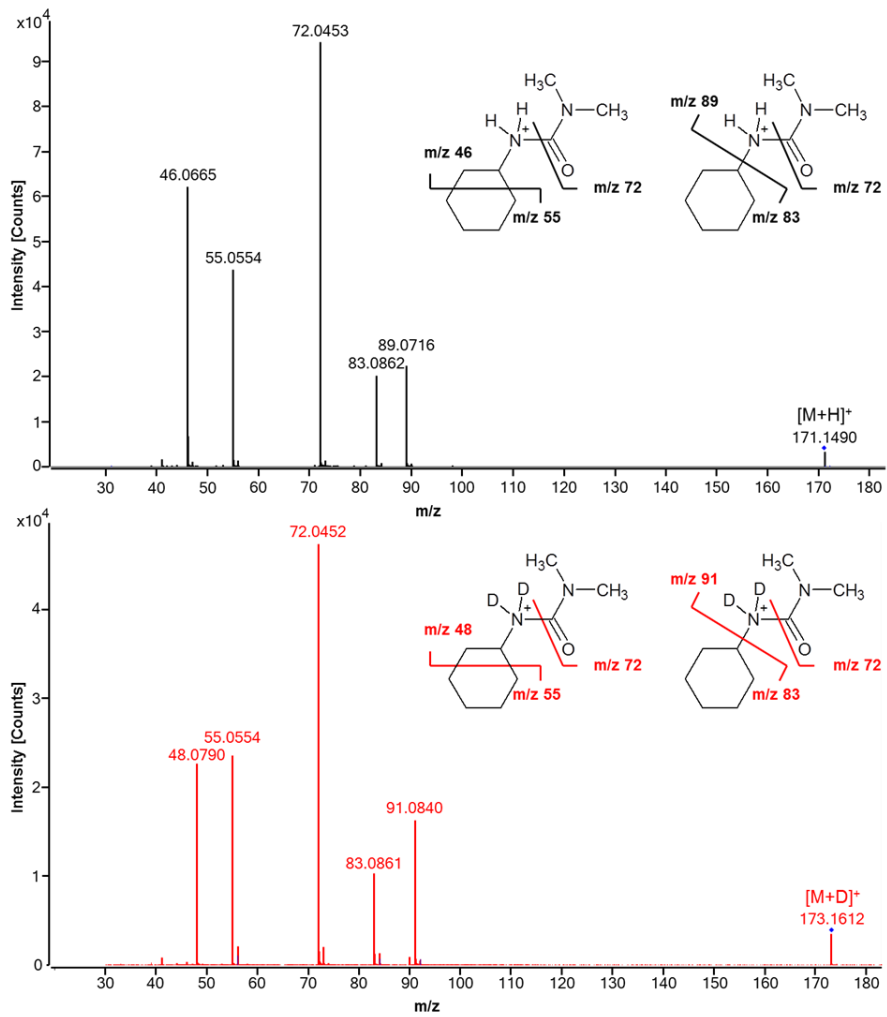
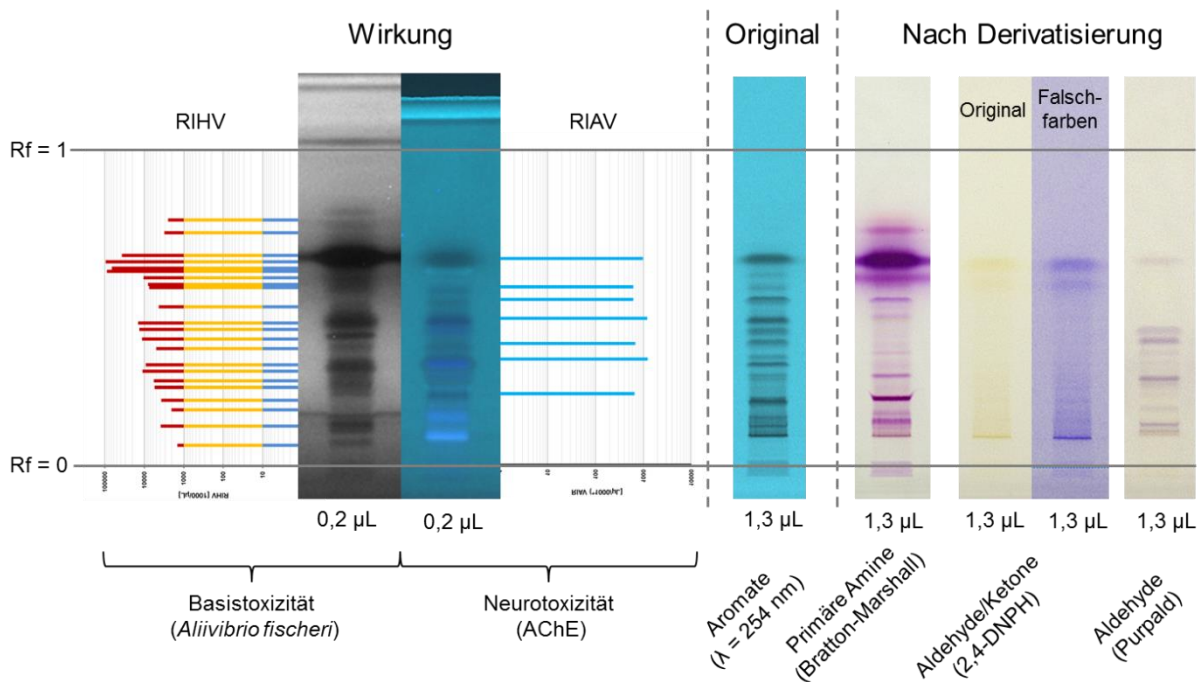


Abb. 11-14: Vergleich der MS/MS-Spektren von 3-Cyclohexyl-1,1-dimethylurea [M+H]<sup>+</sup> und deuterierten 3-Cyclohexyl-1,1-dimethylurea [M+D]<sup>+</sup>

**Identifizierung von wirkenden Verbindungen in der Sondermülldeponie D**

Die Anwendung der in Abb. 11-3 gezeigten Strategie soll anhand einer Sickerwasserprobe von der Deponie D (Serie 6) aufgezeigt werden. Diese Probe beinhaltet neben stark die Biolumineszenz von *Aliivibrio fischeri* hemmenden Substanzen (RIHV 1400 – 95000 [1000/ $\mu$ L]), auch einige auf die AChE wirkende Verbindungen (RIAV 600 – 1300 [1000/ $\mu$ L]) (Abb. 11-15). Zur Einschränkung der möglichen Strukturen, wurde auf parallel entwickelten Platten, die aufgetrennte Proben auf das Vorhandensein von primären Aminen, Aldehyden und Ketone untersucht.



**Abb. 11-15: Gegenüberstellung der ermittelten RIHV-Wert für die Biolumineszenzhemmung, der RIAV-Werte der AChE-Hemmung und die Nachweise von funktionellen Gruppen für das aufgetrennte SPE pH 2 Extrakt der Probe aus D1.**

Zur Identifizierung wurden diejenigen Banden priorisiert, welche die AChE hemmen. Mit Hilfe des TLC-MS-Interfaces wurden diese Zonen von einer weiteren entwickelten Platte extrahiert. Das Extrakt wurde in einem Vial aufgefangen bevor es mit einem HPTLC-QTOFMS-System (HPLC: Shimadzu LC20, QTOFMS: Sciex TripleTOF 5600) weiteruntersucht wurde. Anhand der exakten Massen und MS/MS-Experimente konnten mittels eines internen Datenbankabgleiches (Suspect Screening) 6 Phenylharnstoff-Herbizide für die AChE-Hemmbande mit Rf = 0,47 tendenziell identifiziert werden (Tabelle 11-4). Anhand von Referenzsubstanzen erfolgte die Bestätigung durch die Rf-Werte, Retentionszeiten und MS/MS-Spektren. Zudem fielen die Nachweise auf primäre Amine sowie auf Ketone und Aldehyde für diese Bande negativ aus.

Die quantitative Bestimmung der identifizierten Substanzen erfolgte mittels eines HPLC-Triple-Quadrupol-MS-Systems. Dabei konnten im Sickerwasser von D1 Konzentration bis zu 2600 µg/L nachgewiesen werden. Wohingegen diese Substanz in der Probe aus der Sauerwasserentwässerung (D2) nicht oder nur in Konzentrationen von 0,015 – 0,047 µg/L nachweisbar waren.

**Tabelle 11-4: Identifizierte Substanzen für die AChE-Hemmband bei Rf = 0,47 der Probe aus D1 und deren Konzentrationen in D1 und D2.**

Substanz	Substanzklasse	Rf*	Rt**	Konz D1 [µg/L]	Konz. D2 [µg/L]
Chlortoluron	Phenylharnstoff-Herbizid	0,47	9,28	2600	0,047
Diuron	Phenylharnstoff-Herbizid	0,48	9,78	2300	Nicht nachweisbar
Fenuron	Phenylharnstoff-Herbizid	0,46	6,44	4	Nicht nachweisbar
Isoproturon	Phenylharnstoff-Herbizid	0,48	8,24	4	Nicht nachweisbar
Metoxuron	Phenylharnstoff-Herbizid	0,45	7,75	6	Nicht nachweisbar
Monuron	Phenylharnstoff-Herbizid	0,47	8,21	1400	0,015

\*HPTLC/AMD Gradient 9 \*\*HPLC-QTOFMS

Zur Verifizierung der Wirkung für die Band bei Rf = 0,47 wurde eine künstliche Probe mit den identifizierten Phenylharnstoff-Herbizid erzeugt und ebenso mit der SPE bei pH 2 aufgearbeitet. Die Konzentrationen der künstlichen Probe entsprachen denen der ermittelten Werte aus D1. Nach HPTLC/AMD-Trennung konnte für den Leuchtbakterien-Hemmtest ein RIHV-Wert von 12600 [1000/µL] für die erzeugte Hemmbande ermittelt werden. Damit kann 88 % der Wirkung auf die Leuchtbakterien mit den identifizierten Substanzen erklärt werden (Hemmbande pH 2 Extrakt D1: 14300 [1000/µL]). Beim AChE-Hemmtest wurde eine RIAV von 700 [1000/µL] für den Mix ermittelt. Das entspricht 58 % der Wirkung für die Hemmbande der D1-Probe (1200 [1000/µL]). Es ist bekannt, dass die Phenylharnstoff-Herbizide eine schwache Wirkung auf die AChE haben [326, 327].

Das heißt, mit den identifizierten Phenylharnstoff-Herbiziden lässt sich die Biolumineszenzhemmung bei Rf = 0,47 nahezu vollständig erklären. Doch befinden sich in dieser Bande noch unbekannte Substanzen, die einen signifikanten Beitrag zur AChE-Hemmung leisten.

Damit konnte aufgezeigt werden, dass eine Verifizierung der Wirkung von den erkannten Substanzen ein wichtiger Bestandteil des Identifizierungsprozesses bei der WBA ist. Erst dieser Arbeitsschritt erlaubt es abzuklären, ob der Identifizierungsprozess der für die Wirkung verantwortlichen Substanzen abgeschlossen ist. Für die anderen untersuchten AChE-Hemmstoffen konnte bislang keine Substanz zugeordnet werden. Anhand der Befunde sollte das Sickerwasser aus der Deponie und die Wässer aus dem Umfeld zusätzlich noch mit einem HPTLC-Photosystem-II-Hemmtest [328] untersucht werden. Damit liessen sich weitere Herbizide und deren wirkenden Transformationsprodukte detektieren.

### **Zusammenfassung**

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass selbst nach der HPTLC/AMD-Trennung sich unter einer Bande mehrere Substanzen befinden. Daher ist es bei der Identifizierung sinnvoll vor der Überführung in ein hochauflösendes Massenspektrometer (HRMS), die extrahierten Substanzen mit einer HPLC noch weiter aufzutrennen. Durch den Einsatz von spezifischen Derivatisierungsreagenzien kann der Identifizierungsprozess unterstützt werden. Besonders wenn die entstandenen Derivatisierungsprodukte ebenso mit einem HPLC-HRMS untersucht wird. Eine spezielle Form der Derivatisierung ist der H/D-Austausch. Damit lässt sich die Anzahl an austauschbaren Protonen in einer Verbindung mittels eines MS erkennen. Es konnte aufgezeigt werden, dass durch den Einsatz der Extraktionstechnik bei der HPTLC nur wenige Milliliter an D<sub>2</sub>O benötigt wird, um einen vollständigen Austausch zu gewährleisten. In einem Anwendungsbeispiel zur Identifizierung von wirkenden Verbindungen wurde deutlich gemacht, dass es notwendig ist abzuklären, wieviel der Wirkung mit den identifizierten Substanzen erklärt werden kann.

## 12 Ausblick

Die Stärke der HPTLC für die WBA ist, dass Substanzen nach der Trennung lösemittelfrei vorliegen. Damit ist eine direkte Kopplung mit verschiedenen biologischen Systemen möglich. Durch die Weiterentwicklung der WBA in Kombination mit der HPTLC ergibt sich die Möglichkeit, diese als ergänzende Untersuchungsstrategie in der organischen Spurenstoffanalytik einzusetzen. So lassen sich nun anhand des Wirkungsmusters zeitlich wie räumliche Veränderung betrachten. Es können damit technische Prozesse wie bspw. eine Abwasseranfertigungsanlage, aber auch Prozesse in der Umwelt, wie z. B. die Transformation von Substanzen in Abstromfahnen von Altlasten, untersucht werden.

In künftigen Untersuchungen könnten Prozesse anhand eines dreigliedrigen Monitoringprogramms, bestehend aus WBA, Einzelstoff- und Non-Target-Analytik, beurteilt werden. Ein solches Monitoringprogramm ist in Abb. 12-1 skizziert. Bei der Non-Target-Analytik können mittels einer HPLC gekoppelt mit einem hochauflösenden Massenspektrometer (HRMS) eine Vielzahl an Verbindungen detektieren werden, ohne im ersten Schritt deren Struktur zu kennen. Diese zunächst unbekannt Substanzen lassen sich anhand der Retentionszeit und des Masse-zu-Ladungsverhältnis charakterisieren und über einen Prozess verfolgen. Dargestellt werden diese Substanzen als Punkte in einem Masse-Retentionszeitdiagramm. Bei der WBA lassen sich ebenso Substanzen erfassen, die bei der Einzelstoffanalytik nicht berücksichtigt werden. Durch das Monitoring der Wirkung liefert die WBA das komplementäre Ergebnis zum Non-Target-Screening. Mittels HPTLC in Kombination mit einem Biotest, lässt sich die Veränderung der Wirkung einer Bande und die Veränderung des Wirkungsmusters über die aufgetrennten Proben für unterschiedliche Endpunkte beobachten. Damit ist eine erste orientierende Beurteilung von Proben anhand der Wirkung möglich.

Die Ergebnisse aus WBA und Non-Target-Analytik können nach den ersten Messungen unabhängig voneinander beurteilt werden. In einem anschließenden Identifizierungsschritt sollte der Fokus auf die wirkenden Verbindungen gelegt werden. Ergänzend sollte noch versucht werden, einzelnen markanten Komponenten aus dem Non-Target-Screening eine Struktur zuzuordnen. Diese dienen der Prozessbeschreibung und müssen dementsprechend ausgewählt werden.

Mit diesen identifizierten Substanzen könnte ein auf den Untersuchungsstandort zugeschnittenes effektives Einzelstoffmonitoring aufgesetzt werden. Weiterhin sollte in regelmäßigen Zeitabständen die Untersuchung des Standortes mit der WBA und dem Non-Target-Screening erfolgen. Wobei die Zeitabstände für diese Methoden größer ausfallen können als für das Einzelstoffscreening. Dies ermöglicht ein Fingerprinting über die Exposition (HPLC-



HRMS) und der Wirkung (WBA) von den Probenahmestandorten. Bei Veränderungen des Musters muss deren Ursache identifiziert werden und eine Aktualisierung der Substanzliste für das Einzelstoffmonitoring erfolgen.

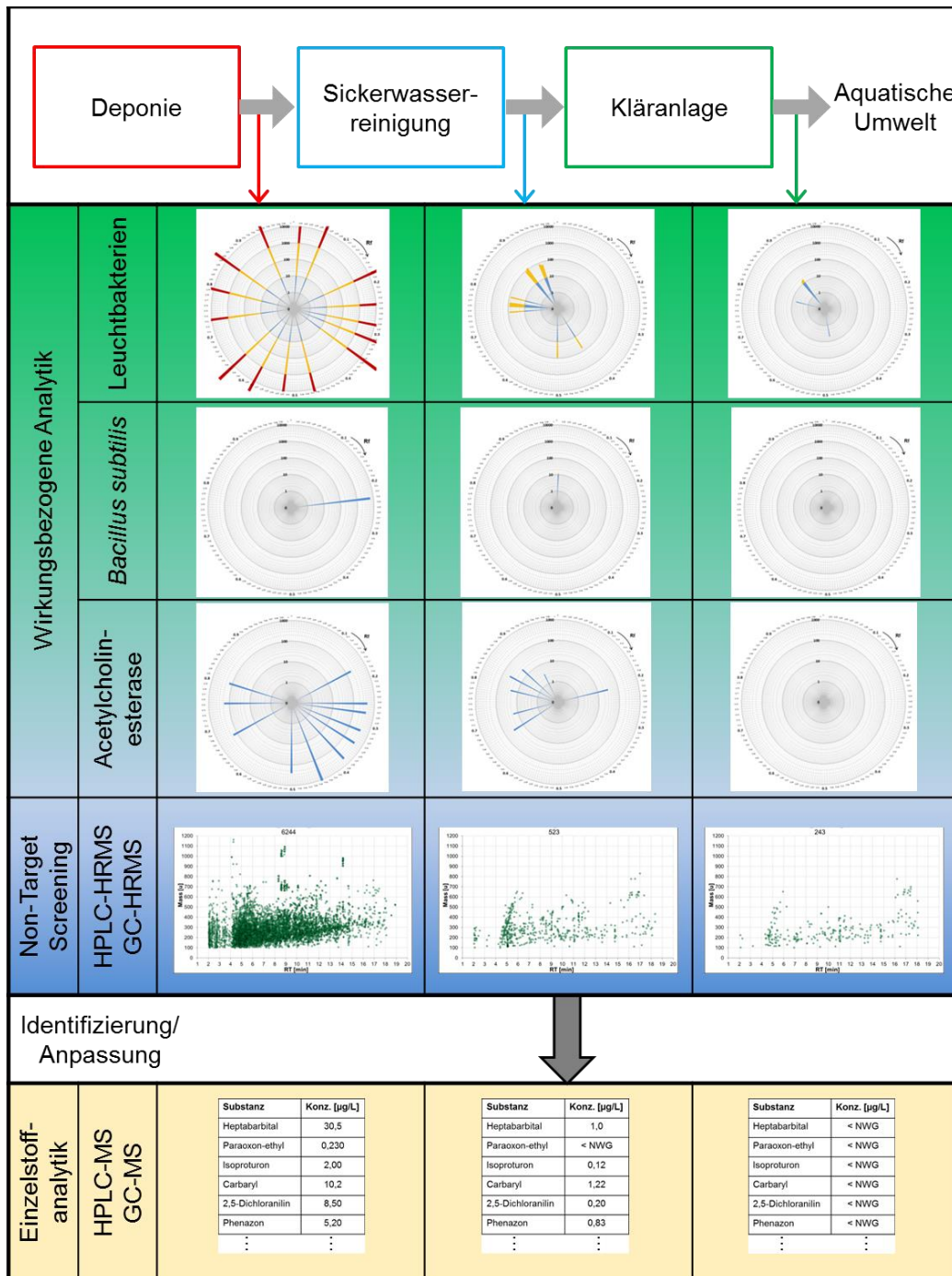


Abb. 12-1: Schematische Darstellung der Beziehungen von Wirkungsbezogener, Einzelstoff- und Non-Target-Analytik im Umweltmonitoring. Die wirkenden Banden sind mit ihrem RIHV bzw. RIAV als Polardiagramm und die erfassten Substanzen im Non-Target-Screening als Masse-Retentionszeit-Diagramm dargestellt.

In künftigen Forschungsvorhaben sollte zudem nach Möglichkeiten zur gemeinsamen Bewertung der WBA Ergebnisse bei unterschiedlichen Endpunkten gesucht werden. Dabei wird die Erfassung der Gentoxizität, die beim Konzept des Gesundheitlichen Orientierungswerts

(GOW) für Trinkwasser entscheidend ist, eine wichtige Rolle spielen. Daher sollte noch weiter am Nachweis von Verbindungen, die erst nach metabolischer Aktivierung genotoxisch wirken gearbeitet werden. Auch beim HPTLC-AChE-Hemmtest sollte die metabolische Aktivierung nachgestellt werden. Erst damit lassen sich z. B. Thiophosphorsäureester anhand ihrer Wirkung nachweisen. Damit die Bedeutung der Ergebnisse der WBA für höhere Lebewesen abgeschätzt werden kann, ist es entscheidend, Vergleichsstudien mit *in vivo*-Tests durchzuführen.

Die WBA in Kombination mit der HPTLC ist ein Analysenverfahren mit vielen Freiheitsgraden. Diese ermöglichen eine hohe Flexibilität in der Auswahl an Bioassays und zum anderen hinsichtlich der Techniken zur Identifizierung. Dies erfordert aber auch detaillierte Arbeitsvorschriften. Damit die Hürden für Neueinsteiger möglichst gering ausfallen, sollten daher Leitfäden von Expertengruppen veröffentlicht werden. Das langfristige Ziel sollte sein, einzelne WBA/HPTLC-Methoden zu normen.

## 13 Materialien und Methoden

### 13.1 Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Abdampfapparatur	Vapotherm basis mobil II	Barkey, Leopoldshöhe, Deutschland
Automatische Entwicklungskammer	ADC	Camag, Muttenz, Schweiz
Automatisierte Mehrfachentwicklungskammer	AMD2	Camag, Muttenz, Schweiz
Biolumineszenz-Fotodokumentationsgerät	BioLuminizer	Camag, Muttenz, Schweiz
Entwicklungskammer	Doppeltrog	Camag, Muttenz, Schweiz
Fusingofen	Fusing 230	Rohde, Prutting, Deutschland
GC-MS	Varian 450-GC/ Varian 240-MS	Agilent, Waldbronn, Deutschland
GPC-Anlage	Basix	LC-Tech, Dorfen, Deutschland
Graugläser		Hellma, Müllheim, Deutschland
HPLC-Anlage	Dionex RSLC	Thermo, Waltham, MS, USA
HPLC-Anlage	LC20	Shimadzu, Kyoto, Japan
HPLC-Anlage	1100 Series	Agilent, Waldbronn, Deutschland
HPLC-Anlage	1200 Series	Agilent, Waldbronn, Deutschland
HPLC-Pumpe	P580A	Gynkotek, Germering, Deutschland
Luminometer	Luministox	Hach-Lange, Belin, Deutschland
Plattenheizer	DC Plattenheizer II	Camag, Muttenz, Schweiz
QTOFMS	Triple TOF 5600	Sciex, Darmstadt, Deutschland
QTOFMS	6520 Q-TOF	Agilent, Waldbronn, Deutschland
Reinstwasseranlage	PureLab Ultra System	ELGA LabWater, Frankreich
Rotationverdampfer	Laborota 4003	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sprühautomat	ChromaJet DS 20	Desaga, Wiesloch, Deutschland
TLC Probenauftragegerät	ATS4	Camag, Muttenz, Schweiz
TLC-Extraktor	TLC-MS Interface	Camag, Muttenz, Schweiz
TLC-Fotodokumentationsgerät	Visualizer	Camag, Muttenz, Schweiz
Triple-Quadrupol-MS	API 5000	Sciex, Darmstadt, Deutschland

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Triple-Quadrupol-MS	API 4000	Sciex, Darmstadt, Deutschland
Triple-Quadrupol-MS	QTrap 5500	Sciex, Darmstadt, Deutschland
UV/VIS-TLC-Scanner	TLC Scanner 3	Camag, Muttenz, Schweiz
Vortex Apparatur	VF2	Janke&Kunke, Staufen im Breisgau, Deutschland

## 13.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Bezugsquelle
GC-Säule	Restek RXi 5Sil MS w. Integra Guard, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke	Restek, Bad Homburg, Deutschland
GPC-Gel	Sephadex LH-20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
GPC-Gel	SX-3 Bio Beads	LC-Tech, Dorfen, Deutschland
HPLC-Säule	Zorbax Eclipse (XDB C-18), 50 mm x 4.6 mm; 1.8 µm	Agilent, Waldbronn, Deutschland
HPLC-Säule	Ultra Aqueous C18, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm	Restek, Bad Homburg, Deutschland
HPTLC-Platte	HPTLC Kieselgel 60 F254 AMD	Merck, Darmstadt, Deutschland
HPTLC-Platte	LiChrospher® Si 60 F254s	Merck, Darmstadt, Deutschland
SPE-Kartusche	Baker SDB 1 (200 mg)	Avantor Performance Materials, Phillipsburg NJ, USA
SPE-Kartusche	Strata SDB-L (200 mg)	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
SPE-Kartusche	Bekolult C18 (200 mg)	Bekolult, Hauptstuhl, Deutschland
SPE-Kartusche	Plexa (200 & 500 mg)	Agilent, Waldbronn, Deutschland
SPE-Kartusche	PPL (200 mg)	Agilent, Waldbronn, Deutschland
SPE-Kartusche	Isolute ENV+ (200 mg)	Biotage, Uppsala, Sweden
SPE-Kartusche	LiChrolut (200 mg)	Merck, Darmstadt, Deutschland
SPE-Kartusche	Oasis MCX (500 mg)	Waters, Eschborn, Deutschland
SPE-Kartusche	Oasis MAX (500 mg)	Waters, Eschborn, Deutschland

## 13.3 Chemikalien

### *Lösemittel*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Acetonitril LC-MS grade	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dichlormethan (Ultra resi-analyzed, JT Baker)	Avantor Performance Materials, Phillipsburg NJ, USA
2-Propanol (Pestilyse)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol AMD-Grade	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol LC-MS grade	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
7 mol/L NH <sub>3</sub> in Methanol	Alfa Aesar,
n-Hexan (Ultra resi-analyzed, JT Baker)	Avantor Performance Materials, Phillipsburg NJ, USA
tert.-Butyl-methyl-ether (HPLC Plus, for HPLC, GC, and residue analysi)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

### *Referenzsubstanzen*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
2-(Methylthio)benzothiazole	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
2-(Thiocyanomethylthio)benzothiazole	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
2,4-D	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
2,4-Dichloranilin	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
2,6-Dimethylanilin	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
2-Aminoanthracen	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2-Aminobenzothiazole	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
2-Chloranilin	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
2-Hydroxybenzothiazole	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
3-Chlor-2-methylanilin	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
4-Nitroquinolin-N-oxid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Acetanilid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Acetylsulfamethoxazol	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Anilin-d5	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Asulam	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Atenolol	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Atrazin	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Azamethiphos	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Azinphos-methyl	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Azithromycin	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Azoxystrobin	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Benzanilid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Benzo[a]pyren	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Benzothiazol	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Benzothiazol-6-carbonsäure	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Bezafribat	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Bromoxynil	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Carbamazepin	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Carbendazim	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cefaclor	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cefixim	Molekula, Garching, Deutschland
Ceftriaxon	Molekula, Garching, Deutschland
Cefuroxim	Molekula, Garching, Deutschland
Chloramphenico	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Chlorfenvinphos	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Chloridazon	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Chlortetracyclin	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Chlortoluron	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Clarithromycin	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Coffein	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cyprodinil	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Diazinon	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Dichlorphos	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Diclofenac	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Diflufenican	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Dimethylgelb	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Diuron	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Doxycyclin	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Epoxiconazole	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Erythromycin	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Esfenvalerat	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Fenthion	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Fenuron	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Fluazinam	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Ibuprofen	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Isoproturon	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Mecoprop	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Mefenaminsäure	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Mephinphos	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Metamitron	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Methamidophos	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Methiocarb-sulfon	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Methoxuron	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Metolachlor	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Metribuzin	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Monuron	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Paraoxon-ethyl	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Paraoxon-methyl	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Phosphamidon	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Phoxim	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Piperophos	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Propiconazole	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Roxithromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sulbactam	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sulfadimidin	European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Straßburg, Frankreich
Sulfadoxin	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Sulfamethazin	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Sulfamethoxazol	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Sulfathiazol	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Terbutryn	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Tetracyclin	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland
Theobromin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Thioharnstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Triazophos	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland
Triclosan	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trimethoprim	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Deutschland

**Materialien für Biotests**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Acetylcholinesterase vom Pferd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acetylcholinesterase vom Zitteraal	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Aliivibrio fischeri</i> (gefriergetrocknet)	Hach-Lange, Berlin, Deutschland
Ampicilin	VWR, Darmstadt, Deutschland
<i>Bacillus subtilis</i> -Sporen DSM 618	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Caseinpepton-Sojamehl-Pepton I	Merck, Darmstadt, Deutschland
Diammoniumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Gaze	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Glucose-6-phosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin 87%	Bernd Kraft, Duisburg, Deutschland
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumalginat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	VWR, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nicotinamidadenindinukleotid (NADP)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pepton aus Casein	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phytigel	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
S9 mix	Trinova, Giessen, Deutschland
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535/pSK 1002 (DSM Nr.: 9274)	Deutsche Gesellschaft für Mikroorganismen, Leipzig, Deutschland
Sodium dodecyl sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tryptose	VWR, Darmstadt, Deutschland
$\alpha$ -D-Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland



### **Derivatisierungsreagenzien und Substrate**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
2,4-Dinitrophenyl-hydrazine (DNPH)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-Gal)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
D <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Echtblausalz (Fast blue K)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Echtschwarzsatz (Fast black K)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Indoxylacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
N-[1Naphthyl]ethylendiamindihydrochlorid (Bratton-Marshall-Reagenz)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumnitrit	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Purpald	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Thiazolylblau	Merck, Darmstadt, Deutschland

## **13.4 Methoden**

### **13.4.1 Festphasenextraktion**

#### **Optimierte Festphasenextraktion**

pH-Wert:	2, 7 und 9
SPE-Material:	Agilent Plexa (500 mg)
Säulenkonditionierung:	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.) 5 mL n-Hexan</li> <li>2.) 5 mL Dichlormethan</li> <li>3.) 5 mL Aceton</li> <li>4.) 6 mL Methanol</li> <li>5.) 5 mL Laborreinstwasser (pH-Wert angepasst)</li> </ol>
Pumpengeschwindigkeit:	4 mL/min
Trocknung:	30 - 45 min unter Luftstrom
Elution:	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.) 3 mL Methanol + 0,4 % NH<sub>3</sub></li> <li>2.) 4 mL Methanol+ 0,4 % NH<sub>3</sub> / Ethylacetat (1/1 Vol.-%/Vol.-%)</li> <li>3.) 3 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></li> </ol>
Extraktvolumen:	1 mL in Methanol

### ***Festphasenextraktion für die Deponie D***

Probenvolumen:	200 mL
pH-Wert:	2 und 7
SPE-Material:	Isolute ENV+ (200 mg)
Säulenkonditionierung:	1.) 6 mL n-Hexan 2.) 6 mL Aceton 3.) 6 mL Methanol 4.) 6 mL Laborreinstwasser (pH = 2 bzw. pH = 7)
Pumpengeschwindigkeit:	4 mL/min
Elution:	6 mL Methanol (Einengen mit Stickstoffstrom 40 °C)
Extraktvolumen:	1 mL in Methanol

### **13.4.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion**

#### ***MikroLLE mit Acetonitril***

pH-Wert:	2, 7 und 9
Probenvolumen:	4 mL
Lösemittel:	Acetonitril
Lösemittelvolumen:	1200 µL
Salz:	1,2 g NaCl ausgeheizt 1 h bei 450 °C
Schüttelzeit:	1 min
Spritze:	Glasspritze (Luer lock) 5 mL
Extraktionszeit:	1 min auf der Vortex- Apparatur

#### ***LLE mit tert.-Butyl-methyl-Ether***

Probenvolumen:	100 mL
pH-Wert:	2 und 7
NaCl (ausgeglüht bei 450 °C):	12 g
TBME Volumen:	6 mL
Extraktionszeit:	1 h

### 13.4.3 HPTLC-Trennmethode

#### Isokratische HPTLC

Schicht: LiChrospher® Si 60 F254s

Parameter	Einstellung
Platte	LiChrospher
Probeauftragung	10 mm
Laufstrecke Fließmittel	70 mm
Fließmittel	49 Vol.-% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / 50 Vol.-% Acetonitril / 1 Vol.-% Ameisensäure
Dauer Feuchtigkeitseinstellung (Luftstrom getrocknet durch ein Molekulasieb)	1 min (Rel. Luftfeuchtigkeit: 35 %)
Kammersättigung	15 min
Vorkonditionierung	30 s
Trocknungszeit im Kaltluftstrom	15 min

#### HPTLC/AMD-Gradient 1

Schicht: LiChrospher® Si 60 F254s

Methanol:Ameisensäure 100:0,05 (Vol.-%/Vol.-%)	Dichlormethan	n-Hexan	Laufstrecke	Trocknungszeit
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	5,0 min
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	5,0 min
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	5,0 min
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	5,0 min
47,5 Vol %	52,5 Vol %	0,0 Vol %	13,3 mm	4,0 min
45,0 Vol %	55,0 Vol %	0,0 Vol %	16,5 mm	4,0 min
42,5 Vol %	57,5 Vol %	0,0 Vol %	19,8 mm	4,0 min
40,0 Vol %	60,0 Vol %	0,0 Vol %	23,0 mm	4,0 min
37,5 Vol %	62,5 Vol %	0,0 Vol %	26,3 mm	4,0 min
35,0 Vol %	65,0 Vol %	0,0 Vol %	29,6 mm	4,0 min
32,5 Vol %	67,5 Vol %	0,0 Vol %	32,8 mm	4,0 min
30,0 Vol %	70,0 Vol %	0,0 Vol %	36,1 mm	4,0 min
27,5 Vol %	72,5 Vol %	0,0 Vol %	39,3 mm	4,0 min
25,0 Vol %	75,0 Vol %	0,0 Vol %	42,6 mm	4,0 min
22,5 Vol %	77,5 Vol %	0,0 Vol %	45,9 mm	4,0 min
20,0 Vol %	80,0 Vol %	0,0 Vol %	49,1 mm	4,0 min
17,5 Vol %	82,5 Vol %	0,0 Vol %	52,4 mm	4,0 min

<b>Methanol:Ameisensäure 100:0,05 (Vol.-%/Vol.-%)</b>	<b>Dichlormethan</b>	<b>n-Hexan</b>	<b>Laufstrecke</b>	<b>Trocknungszeit</b>
15,0 Vol %	85,0 Vol %	0,0 Vol %	55,7 mm	4,0 min
12,5 Vol %	87,5 Vol %	0,0 Vol %	58,9 mm	4,0 min
10,0 Vol %	90,0 Vol %	0,0 Vol %	62,2 mm	4,0 min
7,5 Vol %	92,5 Vol %	0,0 Vol %	65,4 mm	4,0 min
5,0 Vol %	95,0 Vol %	0,0 Vol %	68,7 mm	4,0 min
2,5 Vol %	97,5 Vol %	0,0 Vol %	72,0 mm	4,0 min
0,0 Vol %	100,0 Vol %	0,0 Vol %	75,2 mm	4,0 min
0,0 Vol %	66,7 Vol %	33,3 Vol %	78,5 mm	4,0 min
0,0 Vol %	33,4 Vol %	66,6 Vol %	81,7 mm	4,0 min
0,0 Vol %	0,0 Vol %	100,0 Vol %	85,0 mm	10,0 min

**HPTLC/AMD-Gradient 2**

Schicht: LiChrospher® Si 60 F254s

<b>Methanol:Ameisensäure 100:0,05 (Vol.-%/Vol.-%)</b>	<b>Dichlormethan</b>	<b>n-Hexan</b>	<b>Laufstrecke</b>	<b>Trocknungszeit</b>
30,0 Vol %	70,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
30,0 Vol %	70,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
30,0 Vol %	70,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
30,0 Vol %	70,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
27,9 Vol %	72,1 Vol %	0,0 Vol %	14,7 mm	4,0 min
25,7 Vol %	74,3 Vol %	0,0 Vol %	19,4 mm	4,0 min
23,6 Vol %	76,4 Vol %	0,0 Vol %	24,1 mm	4,0 min
21,4 Vol %	78,6 Vol %	0,0 Vol %	28,8 mm	4,0 min
19,3 Vol %	80,7 Vol %	0,0 Vol %	33,4 mm	4,0 min
17,1 Vol %	82,9 Vol %	0,0 Vol %	38,1 mm	4,0 min
15,0 Vol %	85,0 Vol %	0,0 Vol %	42,8 mm	4,0 min
12,9 Vol %	87,1 Vol %	0,0 Vol %	47,5 mm	4,0 min
10,7 Vol %	89,3 Vol %	0,0 Vol %	52,2 mm	4,0 min
8,6 Vol %	91,4 Vol %	0,0 Vol %	56,9 mm	3,0 min
6,4 Vol %	93,6 Vol %	0,0 Vol %	61,6 mm	3,0 min
4,3 Vol %	95,7 Vol %	0,0 Vol %	66,3 mm	3,0 min
2,1 Vol %	97,9 Vol %	0,0 Vol %	70,9 mm	3,0 min
0,0 Vol %	100,0 Vol %	0,0 Vol %	75,6 mm	3,0 min
0,0 Vol %	50,0 Vol %	50,0 Vol %	80,3 mm	3,0 min
0,0 Vol %	0,0 Vol %	100,0 Vol %	85,0 mm	3,0 min

**HPTLC/AMD-Gradient 3**

Schicht: LiChrospher® Si 60 F254s

<b>Acetonitril:Ameisensäure 100:0,05 (Vol.-%/Vol.-%)</b>	<b>Dichlormethan</b>	<b>n-Hexan</b>	<b>Laufstrecke</b>	<b>Trocknungszeit</b>
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
47,5 Vol %	52,5 Vol %	0,0 Vol %	13,3 mm	4,0 min
45,0 Vol %	55,0 Vol %	0,0 Vol %	16,5 mm	4,0 min
42,5 Vol %	57,5 Vol %	0,0 Vol %	19,8 mm	4,0 min
40,0 Vol %	60,0 Vol %	0,0 Vol %	23,0 mm	4,0 min
37,5 Vol %	62,5 Vol %	0,0 Vol %	26,3 mm	4,0 min
35,0 Vol %	65,0 Vol %	0,0 Vol %	29,6 mm	4,0 min
32,5 Vol %	67,5 Vol %	0,0 Vol %	32,8 mm	4,0 min
30,0 Vol %	70,0 Vol %	0,0 Vol %	36,1 mm	4,0 min
27,5 Vol %	72,5 Vol %	0,0 Vol %	39,3 mm	4,0 min
25,0 Vol %	75,0 Vol %	0,0 Vol %	42,6 mm	4,0 min
22,5 Vol %	77,5 Vol %	0,0 Vol %	45,9 mm	4,0 min
20,0 Vol %	80,0 Vol %	0,0 Vol %	49,1 mm	4,0 min
17,5 Vol %	82,5 Vol %	0,0 Vol %	52,4 mm	4,0 min
15,0 Vol %	85,0 Vol %	0,0 Vol %	55,7 mm	4,0 min
12,5 Vol %	87,5 Vol %	0,0 Vol %	58,9 mm	4,0 min
10,0 Vol %	90,0 Vol %	0,0 Vol %	62,2 mm	4,0 min
7,5 Vol %	92,5 Vol %	0,0 Vol %	65,4 mm	4,0 min
5,0 Vol %	95,0 Vol %	0,0 Vol %	68,7 mm	4,0 min
2,5 Vol %	97,5 Vol %	0,0 Vol %	72,0 mm	4,0 min
0,0 Vol %	100,0 Vol %	0,0 Vol %	75,2 mm	4,0 min
0,0 Vol %	66,7 Vol %	33,3 Vol %	78,5 mm	4,0 min
0,0 Vol %	33,4 Vol %	66,6 Vol %	81,7 mm	4,0 min
0,0 Vol %	0,0 Vol %	100,0 Vol %	85,0 mm	10,0 min

**HPTLC/AMD-Gradient 4**

Schicht: LiChrospher® Si 60 F254s

<b>Acetonitril:Ameisensäure 100:0,1 (Vol.-%/Vol.-%)</b>	<b>Dichlormethan</b>	<b>n-Hexan</b>	<b>Laufstrecke</b>	<b>Trocknungszeit</b>
70,0 Vol %	30,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
70,0 Vol %	30,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
70,0 Vol %	30,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
66,7 Vol %	33,3 Vol %	0,0 Vol %	13,3 mm	4,0 min
63,3 Vol %	36,7 Vol %	0,0 Vol %	16,5 mm	4,0 min
60,0 Vol %	40,0 Vol %	0,0 Vol %	19,8 mm	4,0 min
56,7 Vol %	43,3 Vol %	0,0 Vol %	23,0 mm	4,0 min
53,3 Vol %	46,7 Vol %	0,0 Vol %	26,3 mm	4,0 min
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	29,6 mm	4,0 min
46,7 Vol %	53,3 Vol %	0,0 Vol %	32,8 mm	4,0 min
43,3 Vol %	56,7 Vol %	0,0 Vol %	36,1 mm	4,0 min
40,0 Vol %	60,0 Vol %	0,0 Vol %	39,3 mm	4,0 min
36,7 Vol %	63,3 Vol %	0,0 Vol %	42,6 mm	4,0 min
33,3 Vol %	66,7 Vol %	0,0 Vol %	45,9 mm	4,0 min
30,0 Vol %	70,0 Vol %	0,0 Vol %	49,1 mm	4,0 min
26,7 Vol %	73,3 Vol %	0,0 Vol %	52,4 mm	4,0 min
23,3 Vol %	76,7 Vol %	0,0 Vol %	55,7 mm	4,0 min
20,0 Vol %	80,0 Vol %	0,0 Vol %	58,9 mm	4,0 min
16,7 Vol %	83,3 Vol %	0,0 Vol %	62,2 mm	4,0 min
13,3 Vol %	86,7 Vol %	0,0 Vol %	65,4 mm	4,0 min
10,0 Vol %	90,0 Vol %	0,0 Vol %	68,7 mm	4,0 min
6,7 Vol %	93,3 Vol %	0,0 Vol %	72,0 mm	4,0 min
3,3 Vol %	96,7 Vol %	0,0 Vol %	75,2 mm	4,0 min
0,0 Vol %	100,0 Vol %	0,0 Vol %	78,5 mm	4,0 min
0,0 Vol %	50,0 Vol %	50,0 Vol %	81,7 mm	4,0 min
0,0 Vol %	0,0 Vol %	100,0 Vol %	85,0 mm	10,0 min

**HPTLC/AMD-Gradient 5**

Schicht: LiChrospher® Si 60 F254s

<b>Acetonitril:Ameisensäure 100:0,1 (Vol.-%/Vol.-%)</b>	<b>Dichlormethan</b>	<b>n-Hexan</b>	<b>Laufstrecke</b>	<b>Trocknungszeit</b>
80,0 Vol %	20,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
80,0 Vol %	20,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
76,9 Vol %	23,1 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
73,8 Vol %	26,2 Vol %	0,0 Vol %	12,8 mm	4,0 min
70,8 Vol %	29,2 Vol %	0,0 Vol %	15,6 mm	4,0 min
67,7 Vol %	32,3 Vol %	0,0 Vol %	18,3 mm	4,0 min
64,6 Vol %	35,4 Vol %	0,0 Vol %	21,1 mm	4,0 min
61,5 Vol %	38,5 Vol %	0,0 Vol %	23,9 mm	4,0 min
58,5 Vol %	41,5 Vol %	0,0 Vol %	26,7 mm	4,0 min
55,4 Vol %	44,6 Vol %	0,0 Vol %	29,4 mm	4,0 min
52,3 Vol %	47,7 Vol %	0,0 Vol %	32,2 mm	4,0 min
49,2 Vol %	50,8 Vol %	0,0 Vol %	35,0 mm	4,0 min
46,2 Vol %	53,8 Vol %	0,0 Vol %	37,8 mm	4,0 min
43,1 Vol %	56,9 Vol %	0,0 Vol %	40,6 mm	4,0 min
40,0 Vol %	60,0 Vol %	0,0 Vol %	43,3 mm	4,0 min
36,9 Vol %	63,1 Vol %	0,0 Vol %	46,1 mm	4,0 min
33,8 Vol %	66,2 Vol %	0,0 Vol %	48,9 mm	4,0 min
30,8 Vol %	69,2 Vol %	0,0 Vol %	51,7 mm	4,0 min
27,7 Vol %	72,3 Vol %	0,0 Vol %	54,4 mm	4,0 min
24,6 Vol %	75,4 Vol %	0,0 Vol %	57,2 mm	4,0 min
21,5 Vol %	78,5 Vol %	0,0 Vol %	60,0 mm	4,0 min
18,5 Vol %	81,5 Vol %	0,0 Vol %	62,8 mm	4,0 min
15,4 Vol %	84,6 Vol %	0,0 Vol %	65,6 mm	4,0 min
12,3 Vol %	87,7 Vol %	0,0 Vol %	68,3 mm	4,0 min
9,2 Vol %	90,8 Vol %	0,0 Vol %	71,1 mm	4,0 min
6,2 Vol %	93,8 Vol %	0,0 Vol %	73,9 mm	4,0 min
3,1 Vol %	96,9 Vol %	0,0 Vol %	76,7 mm	4,0 min
0,0 Vol %	100,0 Vol %	0,0 Vol %	79,4 mm	4,0 min
0,0 Vol %	50,0 Vol %	50,0 Vol %	82,2 mm	4,0 min
0,0 Vol %	0,0 Vol %	100,0 Vol %	85,0 mm	10,0 min

**HPTLC/AMD-Gradient 6**

Schicht: LiChrospher® Si 60 F254s

<b>Methanol + 4 % NH<sub>3</sub></b>	<b>Dichlormethan</b>	<b>n-Hexan</b>	<b>Laufstrecke</b>	<b>Trocknungszeit</b>
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
47,5 Vol %	52,5 Vol %	0,0 Vol %	13,3 mm	4,0 min
45,0 Vol %	55,0 Vol %	0,0 Vol %	16,5 mm	4,0 min
42,5 Vol %	57,5 Vol %	0,0 Vol %	19,8 mm	4,0 min
40,0 Vol %	60,0 Vol %	0,0 Vol %	23,0 mm	4,0 min
37,5 Vol %	62,5 Vol %	0,0 Vol %	26,3 mm	4,0 min
35,0 Vol %	65,0 Vol %	0,0 Vol %	29,6 mm	4,0 min
32,5 Vol %	67,5 Vol %	0,0 Vol %	32,8 mm	4,0 min
30,0 Vol %	70,0 Vol %	0,0 Vol %	36,1 mm	4,0 min
27,5 Vol %	72,5 Vol %	0,0 Vol %	39,3 mm	4,0 min
25,0 Vol %	75,0 Vol %	0,0 Vol %	42,6 mm	4,0 min
22,5 Vol %	77,5 Vol %	0,0 Vol %	45,9 mm	4,0 min
20,0 Vol %	80,0 Vol %	0,0 Vol %	49,1 mm	4,0 min
17,5 Vol %	82,5 Vol %	0,0 Vol %	52,4 mm	4,0 min
15,0 Vol %	85,0 Vol %	0,0 Vol %	55,7 mm	4,0 min
12,5 Vol %	87,5 Vol %	0,0 Vol %	58,9 mm	4,0 min
10,0 Vol %	90,0 Vol %	0,0 Vol %	62,2 mm	4,0 min
7,5 Vol %	92,5 Vol %	0,0 Vol %	65,4 mm	4,0 min
5,0 Vol %	95,0 Vol %	0,0 Vol %	68,7 mm	4,0 min
2,5 Vol %	97,5 Vol %	0,0 Vol %	72,0 mm	4,0 min
0,0 Vol %	100,0 Vol %	0,0 Vol %	75,2 mm	4,0 min
0,0 Vol %	66,7 Vol %	33,3 Vol %	78,5 mm	4,0 min
0,0 Vol %	33,4 Vol %	66,6 Vol %	81,7 mm	4,0 min
0,0 Vol %	0,0 Vol %	100,0 Vol %	85,0 mm	10,0 min



**HPTLC/AMD-Gradient 7**

Schicht: LiChrospher® Si 60 F254s

<b>Methanol</b>	<b>Dichlormethan</b>	<b>n-Hexan</b>	<b>Laufstrecke</b>	<b>Trocknungszeit</b>
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
47,5 Vol %	52,5 Vol %	0,0 Vol %	13,3 mm	4,0 min
45,0 Vol %	55,0 Vol %	0,0 Vol %	16,5 mm	4,0 min
42,5 Vol %	57,5 Vol %	0,0 Vol %	19,8 mm	4,0 min
40,0 Vol %	60,0 Vol %	0,0 Vol %	23,0 mm	4,0 min
37,5 Vol %	62,5 Vol %	0,0 Vol %	26,3 mm	4,0 min
35,0 Vol %	65,0 Vol %	0,0 Vol %	29,6 mm	4,0 min
32,5 Vol %	67,5 Vol %	0,0 Vol %	32,8 mm	4,0 min
30,0 Vol %	70,0 Vol %	0,0 Vol %	36,1 mm	4,0 min
27,5 Vol %	72,5 Vol %	0,0 Vol %	39,3 mm	4,0 min
25,0 Vol %	75,0 Vol %	0,0 Vol %	42,6 mm	4,0 min
22,5 Vol %	77,5 Vol %	0,0 Vol %	45,9 mm	4,0 min
20,0 Vol %	80,0 Vol %	0,0 Vol %	49,1 mm	4,0 min
17,5 Vol %	82,5 Vol %	0,0 Vol %	52,4 mm	4,0 min
15,0 Vol %	85,0 Vol %	0,0 Vol %	55,7 mm	4,0 min
12,5 Vol %	87,5 Vol %	0,0 Vol %	58,9 mm	4,0 min
10,0 Vol %	90,0 Vol %	0,0 Vol %	62,2 mm	4,0 min
7,5 Vol %	92,5 Vol %	0,0 Vol %	65,4 mm	4,0 min
5,0 Vol %	95,0 Vol %	0,0 Vol %	68,7 mm	4,0 min
2,5 Vol %	97,5 Vol %	0,0 Vol %	72,0 mm	4,0 min
0,0 Vol %	100,0 Vol %	0,0 Vol %	75,2 mm	4,0 min
0,0 Vol %	66,7 Vol %	33,3 Vol %	78,5 mm	4,0 min
0,0 Vol %	33,4 Vol %	66,6 Vol %	81,7 mm	4,0 min
0,0 Vol %	0,0 Vol %	100,0 Vol %	85,0 mm	10,0 min

**HPTLC/AMD-Gradient 8**

Schicht: LiChrospher® Si 60 F254s

<b>Acetonitril:Ameisensäure 100:0,1 (Vol.-%/Vol.-%)</b>	<b>Dichlormethan</b>	<b>n-Hexan</b>	<b>Laufstrecke</b>	<b>Trocknungszeit</b>
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	12,0 mm	5,0 min
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	12,0 mm	5,0 min
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	12,0 mm	5,0 min
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	12,0 mm	5,0 min
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	12,0 mm	5,0 min
46,7 Vol %	53,3 Vol %	0,0 Vol %	15,0 mm	4,0 min
43,3 Vol %	56,7 Vol %	0,0 Vol %	18,0 mm	4,0 min
40,0 Vol %	60,0 Vol %	0,0 Vol %	22,0 mm	4,0 min
36,7 Vol %	63,3 Vol %	0,0 Vol %	25,0 mm	4,0 min
33,3 Vol %	66,7 Vol %	0,0 Vol %	29,0 mm	4,0 min
30,0 Vol %	70,0 Vol %	0,0 Vol %	32,0 mm	4,0 min
26,7 Vol %	73,3 Vol %	0,0 Vol %	35,0 mm	4,0 min
23,3 Vol %	76,7 Vol %	0,0 Vol %	39,0 mm	4,0 min
20,0 Vol %	80,0 Vol %	0,0 Vol %	42,0 mm	4,0 min
16,7 Vol %	83,3 Vol %	0,0 Vol %	46,0 mm	4,0 min
13,3 Vol %	86,7 Vol %	0,0 Vol %	49,0 mm	4,0 min
10,0 Vol %	90,0 Vol %	0,0 Vol %	52,0 mm	4,0 min
6,7 Vol %	93,3 Vol %	0,0 Vol %	56,0 mm	4,0 min
3,3 Vol %	96,7 Vol %	0,0 Vol %	59,0 mm	4,0 min
0,0 Vol %	100,0 Vol %	0,0 Vol %	63,0 mm	4,0 min
0,0 Vol %	80,0 Vol %	20,0 Vol %	66,0 mm	4,0 min
0,0 Vol %	60,0 Vol %	40,0 Vol %	69,0 mm	4,0 min
0,0 Vol %	40,0 Vol %	60,0 Vol %	73,0 mm	4,0 min
0,0 Vol %	20,0 Vol %	80,0 Vol %	76,0 mm	4,0 min
0,0 Vol %	0,0 Vol %	100,0 Vol %	80,0 mm	15,0 min

**HPTLC/AMD-Gradient 9**

Schicht: LiChrospher® Si 60 F254s

Methanol + 4 % NH <sub>3</sub>	Dichlormethan	n-Hexan	Laufstrecke	Trocknungszeit
100,0 Vol %	0,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
100,0 Vol %	0,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
100,0 Vol %	0,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
25,0 Vol %	75,0 Vol %	0,0 Vol %	18,3 mm	4,0 min
21,4 Vol %	78,6 Vol %	0,0 Vol %	22,6 mm	4,0 min
17,9 Vol %	82,1 Vol %	0,0 Vol %	26,9 mm	4,0 min
14,3 Vol %	85,7 Vol %	0,0 Vol %	31,2 mm	4,0 min
10,7 Vol %	89,3 Vol %	0,0 Vol %	35,5 mm	4,0 min
7,1 Vol %	92,9 Vol %	0,0 Vol %	39,8 mm	4,0 min
3,6 Vol %	96,4 Vol %	0,0 Vol %	44,2 mm	4,0 min
0,0 Vol %	100,0 Vol %	0,0 Vol %	48,5 mm	4,0 min
0,0 Vol %	77,0 Vol %	23,0 Vol %	52,8 mm	4,0 min
0,0 Vol %	64,7 Vol %	35,3 Vol %	57,1 mm	4,0 min
0,0 Vol %	52,3 Vol %	47,7 Vol %	61,4 mm	4,0 min
0,0 Vol %	40,0 Vol %	60,0 Vol %	65,7 mm	4,0 min
0,0 Vol %	0,0 Vol %	100,0 Vol %	70,0 mm	10,0 min

**HPTLC/AMD-Gradient 10**

Schicht: LiChrospher® Si 60 F254s

Methanol:Ameisensäure 100:0,05 (Vol.-%/Vol.-%)	2-Propanol	Dichlormethan	n-Hexan	Laufstrecke	Trocknungszeit	Vorkonditionierung
100,0 Vol %	0,0 Vol %	0,0 Vol %	0,0 Vol %	12,0 mm	4,0 min	x
100,0 Vol %	0,0 Vol %	0,0 Vol %	0,0 Vol %	12,0 mm	4,0 min	x
100,0 Vol %	0,0 Vol %	0,0 Vol %	0,0 Vol %	12,0 mm	4,0 min	x
90,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 Vol %	0,0 Vol %	15,2 mm	4,0 min	x
80,0 Vol %	0,0 Vol %	20,0 Vol %	0,0 Vol %	18,4 mm	4,0 min	x
70,0 Vol %	0,0 Vol %	30,0 Vol %	0,0 Vol %	21,7 mm	4,0 min	x
60,0 Vol %	0,0 Vol %	40,0 Vol %	0,0 Vol %	24,9 mm	4,0 min	x
50,0 Vol %	0,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	28,2 mm	4,0 min	x
45,8 Vol %	0,0 Vol %	54,2 Vol %	0,0 Vol %	31,4 mm	4,0 min	
41,6 Vol %	0,0 Vol %	58,4 Vol %	0,0 Vol %	34,7 mm	4,0 min	

<b>Methanol:Ameisensäure 100:0,05 (Vol.-%/Vol.-%)</b>	<b>2-Propanol</b>	<b>Dichlormethan</b>	<b>n-Hexan</b>	<b>Laufstrecke</b>	<b>Trocknungszeit</b>	<b>Vorkonditionierung</b>
37,4 Vol %	0,0 Vol %	62,6 Vol %	0,0 Vol %	37,9 mm	4,0 min	
0,0 Vol %	30,0 Vol %	0,0 Vol %	70,0 Vol %	43,9 mm	4,0 min	
0,0 Vol %	28,2 Vol %	0,0 Vol %	71,8 Vol %	48,4 mm	4,0 min	
0,0 Vol %	26,4 Vol %	0,0 Vol %	73,6 Vol %	52,9 mm	4,0 min	
0,0 Vol %	24,6 Vol %	0,0 Vol %	75,4 Vol %	57,4 mm	4,0 min	
0,0 Vol %	22,9 Vol %	0,0 Vol %	77,1 Vol %	62,0 mm	4,0 min	

### **HPTLC/AMD-Gradient 11**

Schicht: LiChrospher® Si 60 F254s

<b>Methanol:Ameisensäure 100:0,05 (Vol.-%/Vol.-%)</b>	<b>Dichlormethan</b>	<b>n-Hexan</b>	<b>Laufstrecke</b>	<b>Trocknungszeit</b>	<b>Vorkonditionierung</b>
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min	x
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min	x
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min	x
47,5 Vol %	52,5 Vol %	0,0 Vol %	13,0 mm	4,0 min	x
45,0 Vol %	55,0 Vol %	0,0 Vol %	16,1 mm	4,0 min	x
42,5 Vol %	57,5 Vol %	0,0 Vol %	19,1 mm	4,0 min	x
40,0 Vol %	60,0 Vol %	0,0 Vol %	22,2 mm	4,0 min	x
37,5 Vol %	62,5 Vol %	0,0 Vol %	25,2 mm	4,0 min	x
35,0 Vol %	65,0 Vol %	0,0 Vol %	28,3 mm	4,0 min	x
32,5 Vol %	67,5 Vol %	0,0 Vol %	31,3 mm	4,0 min	x
30,0 Vol %	70,0 Vol %	0,0 Vol %	34,3 mm	4,0 min	x
27,5 Vol %	72,5 Vol %	0,0 Vol %	37,4 mm	4,0 min	x
25,0 Vol %	75,0 Vol %	0,0 Vol %	40,4 mm	4,0 min	x
22,5 Vol %	77,5 Vol %	0,0 Vol %	43,5 mm	4,0 min	
20,0 Vol %	80,0 Vol %	0,0 Vol %	46,5 mm	4,0 min	
17,5 Vol %	82,5 Vol %	0,0 Vol %	49,6 mm	4,0 min	
15,0 Vol %	85,0 Vol %	0,0 Vol %	52,6 mm	4,0 min	
12,5 Vol %	87,5 Vol %	0,0 Vol %	55,7 mm	4,0 min	
10,0 Vol %	90,0 Vol %	0,0 Vol %	58,7 mm	4,0 min	
7,5 Vol %	92,5 Vol %	0,0 Vol %	61,7 mm	4,0 min	
5,0 Vol %	95,0 Vol %	0,0 Vol %	64,8 mm	4,0 min	

**HPTLC/AMD-Gradient 12**

Schicht: LiChrospher® Si 60 F254s

<b>Methanol:Ameisensäure 100:0,05 (Vol.-%/Vol.-%)</b>	<b>Dichlormethan</b>	<b>n-Hexan</b>	<b>Laufstrecke</b>	<b>Trocknungszeit</b>
100,0 Vol %	0,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
100,0 Vol %	0,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
100,0 Vol %	0,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
70,0 Vol %	30,0 Vol %	0,0 Vol %	16,3 mm	4,0 min
40,0 Vol %	60,0 Vol %	0,0 Vol %	21,6 mm	4,0 min
35,6 Vol %	64,4 Vol %	0,0 Vol %	26,9 mm	4,0 min
31,1 Vol %	68,9 Vol %	0,0 Vol %	32,2 mm	4,0 min
26,7 Vol %	73,3 Vol %	0,0 Vol %	37,5 mm	4,0 min
22,2 Vol %	77,8 Vol %	0,0 Vol %	42,8 mm	4,0 min
17,8 Vol %	82,2 Vol %	0,0 Vol %	48,2 mm	4,0 min
13,3 Vol %	86,7 Vol %	0,0 Vol %	53,5 mm	4,0 min
8,9 Vol %	91,1 Vol %	0,0 Vol %	58,8 mm	4,0 min
4,4 Vol %	95,6 Vol %	0,0 Vol %	64,1 mm	4,0 min
0,0 Vol %	100,0 Vol %	0,0 Vol %	69,4 mm	4,0 min
0,0 Vol %	50,0 Vol %	50,0 Vol %	74,7 mm	4,0 min
0,0 Vol %	0,0 Vol %	100,0 Vol %	80,0 mm	10,0 min

**HPTLC/AMD-Gradient 13**

Schicht: LiChrospher® Si 60 F254s

<b>Methanol:Ameisensäure 100:0,05 (Vol.-%/Vol.-%)</b>	<b>Dichlormethan</b>	<b>n-Hexan</b>	<b>Laufstrecke</b>	<b>Trocknungszeit</b>
100,0 Vol %	0,0 Vol %	0,0 Vol %	11,0 mm	4,0 min
100,0 Vol %	0,0 Vol %	0,0 Vol %	11,0 mm	4,0 min
100,0 Vol %	0,0 Vol %	0,0 Vol %	11,0 mm	4,0 min
70,0 Vol %	30,0 Vol %	0,0 Vol %	16,3 mm	4,0 min
30,0 Vol %	70,0 Vol %	0,0 Vol %	21,6 mm	4,0 min
20,0 Vol %	80,0 Vol %	0,0 Vol %	26,9 mm	4,0 min
15,0 Vol %	85,0 Vol %	0,0 Vol %	32,2 mm	4,0 min
11,0 Vol %	89,0 Vol %	0,0 Vol %	37,5 mm	4,0 min
8,5 Vol %	91,5 Vol %	0,0 Vol %	42,8 mm	4,0 min
6,5 Vol %	93,5 Vol %	0,0 Vol %	48,2 mm	4,0 min

<b>Methanol:Ameisensäure 100:0,05 (Vol.-%/Vol.-%)</b>	<b>Dichlormethan</b>	<b>n-Hexan</b>	<b>Laufstrecke</b>	<b>Trocknungszeit</b>
5,0 Vol %	95,0 Vol %	0,0 Vol %	53,5 mm	4,0 min
4,0 Vol %	96,0 Vol %	0,0 Vol %	58,8 mm	4,0 min
3,5 Vol %	96,5 Vol %	0,0 Vol %	64,1 mm	4,0 min
0,0 Vol %	100,0 Vol %	0,0 Vol %	69,4 mm	4,0 min
0,0 Vol %	50,0 Vol %	50,0 Vol %	74,7 mm	4,0 min
0,0 Vol %	0,0 Vol %	100,0 Vol %	80,0 mm	10,0 min

#### **13.4.4 HPTLC-*Aliivibrio fischeri* Hemmtest**

##### ***Herstellung des Nährmediums***

Für 2 L Nährmedium werden:

- 60,0 g Natriumchlorid
- 12,2 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
- 4,2 g Dikaliumhydrogenphosphat
- 0,4 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat
- 1,0 g Diammoniumhydrogenphosphat
- 3,4 mL Glycerollösung, 87 %
- 10,0 g Pepton aus Casein
- 1,0 g Hefeextrakt

benötigt. Die genannten Substanzen werden in einen 2 L Messkolben gegeben und bis zur Markierung mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Der pH-Wert wird mit NaOH-Plättchen auf  $7,0 \pm 0,2$  eingestellt. Die Zusammensetzung des Nährmediums entspricht der Zusammensetzung nach DIN EN ISO 11348-3.

Das Nährmedium wird auf 9 Erlenmeyerkolben zu a 220 mL aufgeteilt. In die Erlenmeyerkolben wird ein Magnetrührstab gegeben, anschließend werden die Kolben mit Aluminiumfolie verschlossen. Im Anschluss wird die Nährlösung für 20 min bei 120 °C autoklaviert. Das autoklavierte Nährmedium wird bis zur Benutzung bei 4 - 7 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

##### ***Anzucht der Bakterien***

Es werden die gefriergetrockneten Bakterien in einen 300 mL Erlenmeyerkolben mit Nährmedium gegeben. Unter Rühren (100 U/min) bei Raumtemperatur erreicht *Aliivibrio fischeri*

nach ca. 24 h eine ausreichende Leuchtkraft. Die Bakteriensuspension kann für ca. 6 h eingesetzt werden.

### ***Tauchen der HPTLC-Platte***

Die Tauchkammer wird nahezu vollständig mit Leuchtbakteriensuspension befüllt. Für den Tauchvorgang muss die Tauchdauer des automatischen Tauchgeräts auf 1 s und die Tauchgeschwindigkeit auf 4 cm/s eingestellt sein. Nach dem Tauchvorgang wird die überstehende Lösung mit einem Fensterwischer abgezogen. Die auf der Rückseite verbleibende Suspension wird mit einem Papiertuch abgewischt. Zuletzt wird die HPTLC-Platte auf den Objektträger des Biolumineszenz-Fotodokumentationsgerät gelegt, der Objektträger mit einer Glasplatte abgedeckt und die Platte in die Dunkelkammer geschoben.

### ***Aufnahme der Biolumineszenz***

Die Aufnahme der Biolumineszenz erfolgt in einem Biolumineszenz-Fotodokumentationsgerät. Für die Aufnahme der Biolumineszenz werden folgende Einstellungen vorgenommen:

- Belichtungszeit: 55 s
- Zahl der aufzunehmenden Bilder: 30
- Intervall: 1 min

Mit dem Einlegen der HPTLC-Platte in die Dunkelkammer startet die Aufnahme der Bilder. Hemmbanden sind als dunkle Banden vor einem hellgrauen Hintergrund zu erkennen. Zur Auswertung der Hemmung wird jeweils das Bild nach 10 min verwendet.

## **13.4.5 HPTLC-Bacillus subtilis Hemmtest**

### ***Herstellung des Nährmediums***

Für 0,5 L Nährmedium werden:

- 5,0 g Caseinpepton-Sojamehl-Pepton I
- 2,5 g Hefeextrakt
- 2,2 g Phytigel

benötigt. Die genannten Substanzen werden in ein 800 mL Becherglas gegeben und mit 500 g deionisiertem Wasser aufgefüllt. Der pH-Wert wird mit NaOH-Plätzchen und verdünnter Schwefelsäure (25 %) auf  $7,0 \pm 0,2$  eingestellt.

Das Nährmedium wird auf 2 Erlenmeyerkolben zu a 250 mL aufgeteilt. In die Erlenmeyerkolben wird ein Magnetrührstab geben, anschließend werden die Kolben mit Aluminiumfolie verschlossen. Im Anschluss wird die Nährlösung für 20 min bei 120 °C autoklaviert. Das autoklavierte Nährmedium wird bis zur Benutzung bei 4 - 7 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

### **Anzucht der Bakterien**

Am Tag vor der Durchführung des Wirkungstests wird eine Ampulle mit *Bacillus subtilis*-Sporen in einen 300 mL Erlenmeyerkolben mit Nährlösung gegeben. Die Suspension wird über Nacht bei 30 °C für ca. 20 h gerührt.

Am folgenden Tag wird die optische Dichte der getrübbten Lösung mithilfe des UV/Vis-Spektrometers mit einer Wellenlänge von 620 nm gemessen. Sobald eine optische Dichte zwischen 0,2 und 0,5 erreicht wurde, kann die Bakteriensuspension verwendet werden.

### **Herstellung der Substratlösung**

Es werden 0,25 g Thiazolylblau in einen 100 mL Messkolben gegeben und bis zur Markierung mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Die Thiazolylblaulösung wird bei 4 - 7 °C im Kühlschrank aufbewahrt wird. Vor dem Gebrauch ist die Lösung für ca. 1 h auf Raumtemperatur zu erwärmen.

### **Durchführung des HPTLC-*Bacillus subtilis* Hemmtests**

#### Aufgabe von CaCl<sub>2</sub>-Lösung

Vor dem Tauchen wird die HPTLC-Platte mit CaCl<sub>2</sub>-Lösung (30 g/L) besprüht. Dafür werden im Sprühgerät die folgenden Einstellungen gewählt:

**Tabelle 13-1: Einstellungen des Sprühgeräts zum Besprühen der Platte mit CaCl<sub>2</sub>-Lösung bzw. Thiazolylblaulösung**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>
Sprühfeldbreite	100 mm
Sprühfeldlänge	200 mm
Steuerung Sprühraster	30 1/10 mm
Düsenvorschub	110 mm/s
Luftdurchsatz	70 %
Reagenzdurchsatz	50 s/mL
Füllgeschwindigkeit	7 s/mL



Parameter	Einstellung
Spülgeschwindigkeit	7 s/mL
Sprühvorgänge	1
Belegung	0,059 $\mu\text{L}/\text{mm}^2$

Nach dem ersten Besprühen der Platte, wird diese mit zwei Schichten der medizinischen Gaze beklebt. Dazu wird die Gaze in ca. 22 x 44 cm große Stücke geschnitten und einmal in der Mitte gefaltet. Die zwei Schichten der Gaze werden über die Platte gelegt, sodass die stationäre Phase komplett bedeckt ist. An der Rückseite der Platte wird die Gaze mit Klebestreifen befestigt. Dabei muss die Gaze straff gespannt werden, sodass keine Falten auftreten. An der unteren Seite der Platte sollte die gefaltete Seite der Gaze über den Plattenrand gespannt werden, die fransigen Enden zeigen nach oben.

#### Tauchen der HPTLC-Platte

Die Tauchkammer wird nahezu vollständig mit der *Bacillus subtilis*-Suspension befüllt. Für den Tauchvorgang muss die Tauchdauer im automatischen Tauchgerät auf 2 s und die Tauchgeschwindigkeit auf 2 cm/s eingestellt sein. Die auf der Rückseite verbleibende Suspension wird mit einem Papiertuch abgewischt. Nach dem Tauchen wird die HPTLC-Platte nochmals mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösung besprüht.

#### Inkubation

Im Anschluss an das Tauchen der Platte wird diese für 2 h bei 30 °C inkubiert. Während dieser Inkubationszeit kommen die Bakterien mit den organischen Spurenstoffen in Kontakt und werden gegebenenfalls gehemmt. Für die Inkubation der HPTLC-Platte wird ein luftdichtes Behältnis benötigt. Für den Erhalt der Luftfeuchtigkeit ist der Boden des Behälters mit wenigen mL Wasser bedeckt. Die Platte liegt auf einem Gitter über dem Wasser und sollte nicht mit diesem in Kontakt kommen. Es ist darauf zu achten, dass die Platte nach dem Tauchen nur noch waagrecht transportiert wird.

#### Aufgabe des Substrates

Nach der Inkubationsphase wird die Platte im Sprühgerät mit einer wässrigen Thiazolyblaulösung (2,5 g/L) besprüht. Dazu werden im Sprühgerät dieselben Einstellungen, wie zum Aufbringen von  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gewählt (siehe Tabelle 13-1). Vor dem Gebrauch ist die Lösung für ca. 1 h auf Raumtemperatur zu erwärmen.

#### Detektion der Hemmung von *Bacillus subtilis*

Die Detektion der *Bacillus subtilis*-Hemmung erfolgt in einem Foto-Dokumentationsgerät. Es werden unter Weißlicht in einem Intervall von 15 min insgesamt 6 Bilder aufgenommen. Lebende Mikroorganismen auf der Platte verfärben sich blau/violett. Bereiche, in welchen sich bakterizide Substanzen befinden, verfärben sich demnach nicht und werden als weiß/gelbliche Banden detektiert. Zur Auswertung wird für Vergleiche von Proben immer die Aufnahme nach 60 min verwendet.

#### **13.4.6 HPTLC-Acetylcholinesterase Hemmtest**

##### ***Herstellung der 0,5 M TRIS/HCl-Pufferlösung (pH 7,8)***

12,1 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) werden in einem Becherglas in ca. 120 mL deionisiertem Wasser gelöst. Durch Zugabe von Salzsäure  $c(\text{HCl}) = 32 \%$  wird der pH-Wert auf 7,8 eingestellt (ca. 2 mL). Anschließend wird die Lösung in einen 200 mL Messkolben überführt und mit deionisiertem Wasser bis zur Markierung auf 200 mL aufgefüllt (pH-Wert nochmals überprüfen und wenn nötig nochmals korrigieren). Die Lösung wird zur Bereitung der Acetylcholinesterase-Lösung frisch hergestellt.

##### ***Herstellung der Acetylcholinesteraselösung***

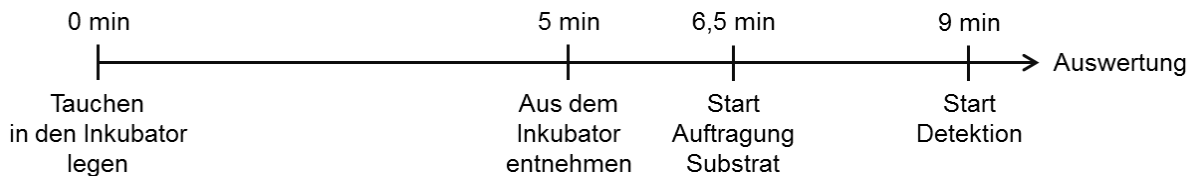
Das Gläschen mit der Acetylcholinesterase aus Zitteraal (2000 U/Gläschen) wird komplett in einem 200 mL Messkolben in TRIS/HCl-Puffer (pH 7,8) gelöst. Danach werden zur Stabilisierung der Enzymaktivität auf der stationären Phase der jeweiligen HPTLC-Platte 0,19 g Rinderserumalbumin (BSA) zugefügt. Diese Lösung ist 6 Monate stabil, und wird im Kühlschrank bei 4 - 7 °C gelagert.

##### ***Herstellung der Substratlösung***

17,5 mg Indoxylacetat und 35 mg Ascorbinsäure in einen 25 mL Messkolben überführen. Mit 1000 µL DMSO lösen und mit dest. H<sub>2</sub>O auffüllen. Das ergibt eine Konzentration für Indoxylacetat von 0,7 g/L ( $4 \cdot 10^{-3}$  mol/L) und für Ascorbinsäure 1,4 g/L ( $8 \cdot 10^{-3}$  mol/L).

##### ***Durchführung des HPTLC-Acetylcholinesterase Hemmtests***

Die Voraussetzung für ein reproduzierbares Ergebnis des Acetylcholinesterase Hemmtests ist die exakte Einhaltung der zeitlichen Abfolge der einzelnen Schritte bis zur Aufnahme der Acetylcholinesterase-Hemmung (siehe Abb. 13-1).



**Abb. 13-1: Zeitvorgaben für den HPTLC-Acetylcholinesterasehemmtest**

In obiger Abbildung (Abb. 13-1) ist eine Übersicht der einzelnen Schritte mit dem Zeitpunkt ihrer Durchführung gegeben. Die Detektion startet mit dem Tauchen der Platte in die Acetylcholinesteraselösung. Danach erfolgt eine Inkubationsphase von 5 min, bevor die Platte zum Sprühgerät transportiert wird. Das Auftragen des Substrates startet zum Zeitpunkt 6:30 min nach dem Tauchen der Platte. Die Aufnahme der Acetylcholinesterase-Hemmung erfolgt zum Zeitpunkt 9:00 min nach dem Tauchen der Platte.

#### Tauchen der HPTLC-Platte

Die Acetylcholinesteraselösung wird kurz vor dem Tauchen aus dem Kühlschrank (4 - 7 °C) genommen. Die Tauchkammer wird nahezu vollständig mit Acetylcholinesteraselösung befüllt. Für den Tauchvorgang muss die Tauchdauer im automatischen Tauchgerät auf 1 s und die Tauchgeschwindigkeit auf 2 cm/s eingestellt sein. Mit dem Tauchen der Platte startet die Zeiterfassung. Nach dem Tauchvorgang wird von der HPTLC-Platte die überstehende Lösung mit einem Fensterwischer abgezogen. Die auf der Rückseite verbleibende Lösung wird mit einem weiteren Papiertuch abgewischt. Zur Inkubation bei 37 °C wird die HPTLC-Platte in ein luftdichtes Behältnis gegeben. Für den Erhalt der Luftfeuchtigkeit ist der Boden des Behälters mit wenigen mL Wasser bedeckt. Die Platte liegt auf einem Gitter über dem Wasser, sollte jedoch nicht mit dem Wasser in Kontakt kommen. Es ist darauf zu achten, dass die Platte nach dem Tauchen nur noch waagrecht transportiert wird. Die Platte wird nach fünfminütiger Inkubationszeit aus dem Inkubationsschrank entnommen.

#### Auftragung des Substrates

Nach der Inkubationsphase bei 37 °C wird die Platte zum Sprühgerät transportiert und mit der Indoxylacetatlösung besprüht. Dabei werden folgende Einstellungen für den Sprühvorgang gewählt:

**Tabelle 13-2: Einstellungen des Sprühgeräts zum Besprühen der HPTLC-Platte mit Indoxylacetatlösung**

Parameter	Einstellung
Sprühfeldbreite	90 mm
Sprühfeldlänge	190 mm
Steuerung Sprühraster	30 1/10 mm
Düsenvorschub	110 mm/s
Luftdurchsatz	100 %
Reagenzdurchsatz	100 %
Füllgeschwindigkeit	7 s/mL
Spülgeschwindigkeit	7 s/mL
Sprühvorgänge	1
Belegung	0,030 $\mu\text{L}/\text{mm}^2$

#### Aufnahme der Acetylcholinesterase-Hemmung

Nach dem Auftragen des Substrates wird die Platte zu einem Foto-Dokumentationsgerät transportiert und 9 min nach dem Tauchen der Lösung in die Acetylcholinesteraselösung wird die Aufnahme der Bildsequenz gestartet. Wichtig ist die manuelle Einstellung der Belichtungszeit. Bei einer frisch hergestellten Acetylcholinesteraselösung wird mit einer Belichtungszeit von 2000 ms begonnen. Die Belichtungszeit muss mit dem Alter der Lösung sukzessive erhöht werden. Sobald eine Belichtungszeit von 2800 ms benötigt wird, wird eine neue Acetylcholinesteraselösung hergestellt. Es werden über einen Zeitraum von 10 min jeweils minütlich Bilder mit der Wellenlänge 366 nm genommen. Aktive Acetylcholinesterase setzt das Substrat zu einem blau fluoreszierenden Stoff um, d.h. Stellen, an denen die Acetylcholinesterase gehemmt ist, erscheinen dunkel. Zur Bestimmung der Hemmung der Referenzsubstanzen wird immer das nach 2 min aufgenommene Bild verwendet (Inkubationszeit von 10 min).

### 13.4.7 HPLC-MS-Methoden

#### *TLC-Extraktor*

Parameter	Einstellung
TLC-Extraktor	TLC-MS-Interface, Camag
Ringschneide Extraktionskopf	2 * 4 mm
Eluent	50 Vol.-% Reinstwasser / 50 Vol.-% Methanol
Fluss HPLC-Pumpe	200 µL/min

#### *HPLC-QTOFMS (Agilent 1100 und Agilent6510)*

**Tabelle 13-3: Parametereinstellung der HPLC Agilent 1100**

Parameter	Einstellung
Säule	Zorbax Eclipse XDB-C18, 1.8 µm, 50 * 4.6 mm
Eluent A (ESI+)	MilliQ + 0,1 Vol.-% Ameisensäure
Eluent B (ESI+)	Methanol + 0,1 Vol.-% Ameisensäure
Eluent A (ESI-)	MilliQ + 5 mM Ammoniumacetat
Eluent B (ESI-)	Methanol + 5 mM Ammoniumacetat
Flussrate	0.6 mL/min
Dauer	19,0 min
Injektionsvolumen	10,0 µL
Temperatur Säulenofen	25 °C

**Tabelle 13-4: Gradient der HPLC Agilent 1100**

Zeit [min]	Anteil A [%]	Anteil B [%]
0,0	90	10
1,0	90	10
9,0	10	90
14,0	10	90
14,2	90	10
19,0	90	10

**Tabelle 13-5: Parametereinstellung des QTOFMS Agilent 6520**

Parameter	Einstellung
Ionquelle	ESI
Trocknungsgas (Flussrate)	Stickstoff (10 l/min)
Gastemperatur	350 °C
Nebulizer	45 psi
VCap	+ 3650 V bzw. -3650 V
Fragmentor	185 V
Skimmer	65 V
Massenbereich	30,0 – 1050,0 Da

**HPLC-QTOFMS (Shimadzu LC20 und Sciex TripleTOF 5600)**

**Tabelle 13-6: Parametereinstellung der HPLC Shimadzu LC20**

Parameter	Einstellung
Säule	Zorbax Eclipse Plus C18 Narrow Bore RR 2,1 x 150 mm, 3,5 µm
Vorsäule	Phenomenex Security Guard Cartridges AQ C18 4 x 2,0 mm
Eluent A	Reinswasser + 0,1 Vol.-% Ameisensäure
Eluent B	Acetonitril + 0,1 Vol.-% Ameisensäure
Flussrate	0.3 mL/min
Dauer	39,9 min
Injektionsvolumen	10,0 µL
Temperatur Säulenofen	40 °C

**Tabelle 13-7: Gradient der HPLC Shimadzu LC20**

Zeit [min]	Anteil A [%]	Anteil B [%]
0,0	98	2
1,0	98	2
2,0	80	20
16,5	0	100
27,0	0	100
27,1	98	2
36,5	98	2

**Tabelle 13-8: Parametereinstellung des QTOFMS Sciex TripleTOF 5600**

Parameter	Einstellung
Ionenquelle	ESI
Accumulation Time	250,0 ms
Curtain Gas (CUR)	40,0 psi
Ionenquelle Gas 1 (GS1)	35,0 psi
Ionenquelle Gas 2 (GS2)	45,0 psi
IonSpray Voltage Floating (ISVF)	5500,0 V (ESI +) / - 4500,0 V (ESI -)
Temperatur (TEM)	550,0 °C
Collisionenergy (CE)	10,0 eV (ESI +) / -10,0 eV (ESI -)
Declustering Potential (DP)	60,0 V (ESI +) / -60,0 V (ESI -)
Massenbereich	40,0 - 1000,0 Da

**HPLC-MS-Parameter für die Quantifizierung der Substanzen zur Optimierung der Probenvorbereitung**

**Tabelle 13-9: Parametereinstellung der HPLC Dionex RSLC**

Parameter	Einstellung
System	Dionex RSLC
Säule	Restek Ultra Aqueous C18 5 µm, 250 x 4.6 mm
Eluent A	Reinswasser + 0,1 Vol.-% Ameisensäure

Parameter	Einstellung
Eluent B	Acetonitril, 5 Vol-% + 0,1 Vol.-% Ameisensäure
Flussrate	0.8 mL/min
Injektionsvolumen	60,0 µL
Temperatur Säulenofen	25 °C

**Tabelle 13-10: Gradient der HPLC Shimadzu LC20**

Zeit [min]	Anteil A [%]	Anteil B [%]
0,0	90	10
8,0	20	80
15,0	20	80
15,1	90	10
21,5	90	10

**Tabelle 13-11: Parametereinstellung des Sciex Qtrap 5500**

Parameter	Einstellung
Ionenquelle	ESI
Mode	Polarity Switching
Modus	MRM
Curtain Gas (CUR)	35 psi
Ionenquelle Gas 1 (GS1)	60,0 psi
Ionenquelle Gas 2 (GS2)	60,0 psi
IonSpray Voltage	5000,0 V (ESI +) / - 4200,0 V (ESI -)
Temperatur (TEM)	600 °C
Collisionally Activated Dissociation (CAD)	7

**Tabelle 13-12: Spezifische Messparameter für die bestimmten Substanzen.**

Substanz	Q1	Q3	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
Azoxystrobin	404,13	372,1	71	19	6
	404,1	329	76	50	16
Diazinon	305,04	169,2	71	27	4
	305,04	153,3	71	27	4
Propiconazole	342,01	159	76	33	4
	342,01	69,1	76	31	4
Epoconazole	330,03	121	66	29	4
	330,03	101,1	66	63	4
Terbutryn	242,19	186,1	76	23	4
	242,19	68,1	76	57	4
Metolachlor	284,2	252,2	76	21	4
	284,2	176,2	76	33	4
Cyprodinil	226,09	93,1	91	45	4
	226,09	108,2	91	35	4
Isoproturon	207,1	165,2	86	19	6,5
	207,2	72,1	86	29	4

Materialien und Methoden

---

<b>Substanz</b>	<b>Q1</b>	<b>Q3</b>	<b>DP [V]</b>	<b>CE [V]</b>	<b>CXP [V]</b>
Diuron	233	72	76	33	4
	233	160,2	76	33	4
Atrazine	216,1	174	86	23	4
	216,1	104,1	86	39	4
Carbendazim	192,18	160,2	76	27	4
	192,18	132,1	76	41	4
Metribuzin	215,14	187,2	81	21	4
	215,14	84,1	81	29	4
Metamitron	203,18	175,1	76	23	4
	203,18	104,1	76	33	4
Chloridazon	222	92,2	79	35	6,5
	222	104	101	31	6
Diclofenac	296,1	249,8	51	21	14
	296,1	214	51	45	10
Bezafibrat	362	316	71	21	18
	362	139	71	37	8
Sulfamethoxazol	254	156	41	21	15
	254	108	20	30	15
Trimethoprim	291,3	230,1	91	35	12
	291,3	261,1	91	37	14
Atenolol	267,2	225	60	20	15
	267,2	190	60	20	15
Diflufenican	395	266	91	33	14
	395	246	91	49	14
Mefenaminsäure	242,1	224,1	56	23	12
	242,1	209,1	56	41	12
Carbamazepine	237,2	194,2	61	29	10
	194,2	179	136	45	8
2,6-Dimethylanilin	122,1	105	51	25	18
	122,1	77	51	39	12
Fluazinam	462,92	416	-65	-24	-4
	464,93	418	-65	-24	-4
Bromoxynil	277,9	78,9	-85	-52	-6
	277,9	81	-85	-52	-6
Asulam	228,9	197	-70	-22	-12
2,4-D	218,9	161	-65	-20	-14
	220,9	163	-65	-20	-14
Mecoprop	213	141	-75	-20	-10
	215	143	-75	-20	-10



**HPLC-MS-Parameter zur Quantifizierung von Benzothiazole**

**Parametereinstellung der HPLC Agilent 1100**

Parameter	Einstellung
System	Agilent 1100
Säule	Agilent Zorbax Exclipse, 50 x 4,6 mm, 1,8 µm
Eluent A	Reinswasser + 5 mM Ammoniumacetat
Eluent B	Methanol + 5 mM Ammoniumacetat
Flussrate	0.6 mL/min
Injektionsvolumen	100,0 µL
Temperatur Säulenofen	25 °C

**Tabelle 13-13: Gradient der HPLC Shimadzu LC20**

Zeit [min]	Anteil A [%]	Anteil B [%]
0,0	60	40
5,0	60	40
7,0	20	80
10,0	20	80
10,1	60	40
14,0	60	40

**Tabelle 13-14: Parametereinstellung des Sciex Qtrap 5500**

Parameter	Einstellung
Ionenquelle	ESI
Modus	MRM
Curtain Gas (CUR)	20 psi
Ionenquelle Gas 1 (GS1)	65,0 psi
Ionenquelle Gas 2 (GS2)	45,0 psi
IonSpray Voltage	5000,0 V
Temperatur (TEM)	600 °C
Eingangspotential (EP)	10 V
Collisionally Activated Dissociation (CAD)	10

**Tabelle 13-15: Spezifische Messparameter für die bestimmten Substanzen.**

Substanz	Q1	Q2	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
Benzothiazol	120.1	65.000	66	33	10
	120.1	39.200	66	53	6
Benzothiazol-6-carbonsäure	180.086	109.100	81	39	16
		136.100	81	33	8
2-Aminobenzothiazole	151.082	109.000	71	37	16
		124.000	71	31	6
2-(methylthio)benzothiazole	182.050	166.900	76	33	8
		109.100	76	51	16

Substanz	Q1	Q2	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
2-Hydroxybenzothiazole	152.049	124.000	66	29	20
		80.100	66	41	12
2-(Thiocyanomethylthio)benzothiazole	239.100	180.000	41	19	10
		136.100	41	39	6

**HPLC-MS-Parameter der Phenylharnstoffherbizide-Bestimmung**

**Parametereinstellung der HPLC Agilent 1200**

Parameter	Einstellung
System	Agilent 1200
Säule	Phenomenex Kinetex 2,6u C 18 100 A 50 x 4,6 mm
Eluent A	Reinswasser + 5 mM Ammoniumacetat
Eluent B	Methanol + 5 mM Ammoniumacetat
Flussrate	0.6 mL/min
Injektionsvolumen	100,0 µL
Temperatur Säulenofen	25 °C

**Tabelle 13-16: Gradient der HPLC Agilent 1200**

Zeit [min]	Anteil A [%]	Anteil B [%]
0,0	80	20
13,0	20	80
15,0	20	80
15,1	80	20
20	80	20

**Tabelle 13-17: Parametereinstellung des Sciex API 5000**

Parameter	Einstellung
Ionenquelle	ESI
Curtain Gas (CUR)	20 psi
Ionenquelle Gas 1 (GS1)	50,0 psi
Ionenquelle Gas 2 (GS2)	40,0 psi
IonSpray Voltage	5000,0 V
Temperatur (TEM)	500 °C
Eingangspotential (EP)	10 V
Collisionally Activated Dissociation (CAD)	5

**Tabelle 13-18: Spezifische Messparameter für die bestimmten Substanzen.**

Substanz	Q1	Q2	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
Chlortoluron	213,0	72,0	28	37	5
	213,0	140,0	28	37	5
Diuron	233,0	72,0	86	31	10
	235,0	72,0	80	27	10

Substanz	Q1	Q2	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
Fenuron	165,0	72,0	60	35	10
	165,0	120,0	60	35	10
Isoproturon	207,1	72,0	66	33	10
	207,1	165,0	60	25	10
Metoxuron	229,0	72,0	25	42	6
	229,0	156,0	25	42	6
Monuron	199,1	72,0	60	35	10
	199,1	126,0	60	35	10

### ***GC-MS Parameter der Anilinbestimmung***

#### **Parametereinstellung der GC (Varian 450-GC) und des MS (Varian 240-MS)**

Parameter	Einstellung
GC-Anlage	Varian 450-GC
Säule	Restek RXi 5Sil MS w. Integra Guard, 30m x 0,25mm, 0,25µm Filmdicke
Gas	Helium
Flussrate	1 mL/min
Injektionsvolumen	4 µL
Injektor	77°C für 5min, mit 200°C/min auf 290°C für 5min halten
Massenspektrometer	Varian 240-MS
Ionisierung	EI Auto
Scantype	Full

**Tabelle 13-19: Temperaturprogramm der GC (Varian 450-GC)**

Zeit [min]	Temperatur
0,0	40
5	40
25,83	290
35,8	290

### 13.4.8 Derivatisierung

#### **2,4-DNPH (Aldehyde und Ketone)**

Reagenzmenge: 20 mg 2,4-Dinitrophenyl-hydrazon

Lösung: 18 mL Ethanol und 2 mL Salzsäure (30 %)

**Tabelle 13-20: Einstellungen des Sprühgeräts zum Besprühen der Platte mit 2,4-DNPH-Lösung.**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>
Sprühfeldbreite	100 mm
Sprühfeldlänge	200 mm
Steuerung Sprühraster	30 1/10 mm
Düsenvorschub	110 mm/s
Luftdurchsatz	70 %
Reagenzdurchsatz	50 s/mL
Füllgeschwindigkeit	7 s/mL
Spülgeschwindigkeit	7 s/mL
Sprühvorgänge	3
Belegung	0,177 $\mu\text{L}/\text{mm}^2$

#### **Purpald (Aldehyde)**

Reagenzmenge: 300 mg Purpald

Lösung: 15 mL wässrige NaOH-Lösung (1 mol/L)

**Tabelle 13-21: Einstellungen des Sprühgeräts zum Besprühen der Platte mit Purpald-Lösung.**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>
Sprühfeldbreite	100 mm
Sprühfeldlänge	200 mm
Steuerung Sprühraster	30 1/10 mm
Düsenvorschub	110 mm/s
Luftdurchsatz	70 %
Reagenzdurchsatz	50 s/mL
Füllgeschwindigkeit	7 s/mL
Spülgeschwindigkeit	7 s/mL
Sprühvorgänge	1
Belegung	0,059 $\mu\text{L}/\text{mm}^2$

**Bratton-Marshall (primäre aromatische Amine)**

**Tabelle 13-22: Einstellungen des Sprühgeräts zum Besprühen der Platte mit der 2,4-DNPH-Lösung.**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>
Herstellung Nitrose Gase	1 g NaNO <sub>2</sub> + 2 mL Salzsäure (30 %)
Bedampfungszeit	2 s
Wartezeit bis zur Tauchung	10 min
Bratton-Marshall-Reagenzlösung	0,05 g N-[1Naphthyl]-ethylen-di-amin-di-hydrochlorid
Tauchgeschwindigkeit	Stufe 2
Tauchzeit	1 s

## VI. Publikationsverzeichnis

### Referierte internationale Fachzeitschriften

1. Schulz, W., Seitz, W., Weiss, S.C., Weber, W.H., Böhm, M., Flottmann, D. (2008): Use of *Vibrio fischeri* for screening for bioactivity in water analysis, *Journal of Planar Chromatography*, 21 (6), 427 – 430, DOI 10.1556/JPC.21.2008.6.00
2. Müller, A., Weiss, S.C., Schulz, W., Seitz, W., Albert, R., Ruck, W.K.L., Weber, W.H. (2010): Combination of different liquid chromatography/mass spectrometry technologies for the identification of transformation products of rhodamine B in groundwater, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24, 659 – 666, DOI 10.1002/rcm.4430
3. Müller, A., Weiss, S.C., Beißwenger, J., Leukhardt, H.G., Schulz, W., Seitz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H. (2012): Identification of ozonation by-products of 4- and 5-methyl-1H-benzotriazole during the treatment of surface water to drinking water, *Water Research*, 46, 679 – 690, DOI 10.1016/j.watres.2011.11.033
4. Fleischer, S., Weiss, S.C., Lucke, T., Seitz, W., Schulz, W., Weber, W.H. (2015): Formation of oxamic acid during drinking water treatment, *Ozone: Science & Engineering*, 37(5), 441 – 449, DOI:10.1080/01919512.2015.1040911
5. Weiss, S.C., Egetenmeyer, N. Schulz, W. (2016): Coupling of In Vitro Bioassays with Planar Chromatography in Effect-Directed Analysis, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, DOI: 10.1007/10\_2016\_16
6. Egetenmeyer, N., Weiss, S.C. (2017): Investigations for the detection of genotoxic substances on TLC plates, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, DOI: 10.1080/10826076.2017.1284674

### Referierte nationale Fachzeitschriften

1. Weber, W.H., Müller, A., Weiß, S.C., Seitz, W., Schulz, W. (2009): 1H-Benzotriazol und Tolyltriazole in der aquatischen Umwelt – Vorkommen in Grund-, Oberflächen- und Abwasser im Gebiet Donauried-Hürbe, *Vom Wasser*, 107 (4), 16 – 24
2. Seitz, W., Fleischer, S., Weiß, S.C., Lucke, T., Schulz, W., Weber, W.H., Winzenbacher, R. (2014): Nachweis des Ozonierungsprodukts Oxamidsäure bei der Wasseraufbereitung, *Vom Wasser*, 112 (2), 55 - 58

### Nicht-referierte Fachzeitschriften

1. Weiß, S.C., Schulz, W., Weber, W.H. (2010): Kombination der verschiedenen Detektionsmöglichkeiten bei der HPTLC, *ChromChat, Sonderpublikation von labor&more*, 50-53
2. Weiß, S.C., Schulz, W., Ruck, W. K. L., Weber, W.H., (2010) Untersuchung einer potenziellen Grundwasserkontamination durch Auswaschung von organischen Spurenstoffen aus Kunstrasen mittels HPTLC/AMD in Kombination mit LC-MS, Vortrag und Tagungsbeitrag, *Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft*, Bayreuth, 10. – 12. Mai, ISBN 978-3-936028-63-8

3. Weber, W.H., Müller, A., Weiß, S.C., Seitz, W., Schulz, W. (2010): Benzotriazole in der aquatischen Umwelt – Multidimensionales Screening mittels HPTLC/AMD und Nano-HPLC/QTOF-MS, *GIT Spezial – Separation* 1, 26-28
4. Weber, W.H., Seitz, W., Weiß, S.C., Müller, A., Schulz, W. (2010): 1H-Benzotriazole and tolyltriazole in the aquatic environment, *CBS Camag Bibliography Service* 105, 7-9
5. Weiß, S.C., Seitz, W., Schulz, W., Weber, W.H. (2011): Exposition und Wirkung organischer Spurenstoffe in der aquatischen Umwelt - HPTLC/AMD in Kombination mit Biolumineszenz-Detektion, *GIT Labor-Fachzeitschrift* 2, 107-110 und *GIT Spezial Separation* 1, 18-21
6. Weiss, S.C, Müller, A., Schulz, W., Weber, W.H. (2012): Drinking water treatment - Identification of reaction by-products of 4- and 5-methyl-1H-benzotriazole formed during ozonation, *CBS Camag Bibliography Service* 109, 13-15
7. Weiss, S.C., Müller, A., Schulz, W., Weber, W. H., (2014): Application of the H/D exchange in TLC-MS for the identification of substances in environmental analysis, *CBS Camag Bibliography Service* 113, 5-7
8. Weiß, S.C., Egetenmeyer, N. Schulz, W. (2015): Kombination von Wirkungstest und HPLC-HRMS, *Labor&More* 0915

**Vorträge (Referent ist unterstrichen)**

1. Weiß, S.C., Uhl, A., Seitz, W., Weber, W.H. (2006): Abbauverhalten von Röntgenkontrastmitteln bei der Ozonung, *72. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft*, Celle, 22. - 24. Mai
2. Weiß, S.C., Schulz, W., Ruck, W. K. L., Weber, W.H. (2010): Untersuchung einer potenziellen Grundwasserkontamination durch Auswaschung von organischen Spurenstoffen aus Kunstrasen mittels HPTLC/AMD in Kombination mit LC-MS, *20. Doktorandenseminar des AK Separation Science der GDCh*, Hohenroda, 9. – 12. Januar
3. Weiß, S.C., Müller, A., Seitz, W., Schulz, W., Weber, W.H. (2010) Anwendung moderner Analysenmethoden zur Ermittlung des Verhaltens organischer Spurenstoffe bei der Trinkwasseraufbereitung, *Analytica 2010*, München, 23. März
4. Weiß, S.C., Schulz, W., Ruck, W. K. L., Weber, W.H. (2010) Untersuchung einer potenziellen Grundwasserkontamination durch Auswaschung von organischen Spurenstoffen aus Kunstrasen mittels HPTLC/AMD in Kombination mit LC-MS, Vortrag und Tagungsbandbeitrag, *Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft*, Bayreuth, 10. – 12. Mai, ISBN 978-3-936028-63-8
5. Weiss, S.C., Schulz, W., Müller A., Albert, R., Seitz, W and Weber, W.H. (2010) Application of HPTLC-MS for the identification of organic trace substances in raw and drinking water, *HET Instruments*, Amsterdam, Niederlande, 29. September
6. Weiss, S.C., Schulz, W. and Weber, W.H. (2010): Use of effect-directed analysis with vibrio fischeri after HPTLC/AMD-separation, *Specialist Workshop: Toxicity measurements in concentrated water samples*, Hank, Niederlande, 14. Oktober

7. Weiss, S.C., Schulz, W. and Weber, W.H. (2010): Anwendung der wirkungsbezogenen Analytik mit *Vibrio fischeri* nach HPTLC/AMD-Trennung, 7. Langenauer Wasserforum, Langenau, 8. November
8. Weiss, S.C., Seitz, W., Schulz, W., Weber, W.H. (2011): Application of TLC-MS in water analysis, 21<sup>nd</sup> International Symposium for High Performance Thin-Layer Chromatography, Basel, Schweiz, 06. – 08. Juli
9. Weiss, S.C., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H. (2011): Effect-directed analysis of landfill leachates using HPTLC/AMD with bioluminescence detection, 21<sup>nd</sup> International Symposium for High Performance Thin-Layer Chromatography, Basel, Schweiz, 06. – 08. Juli
10. Weiß, S.C., Müller, A. Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H. (2012): Identifizierung der Reaktionsprodukte von 4- und 5-Methyl-1H-benzotriazol mit Ozon bei der Aufbereitung von Oberflächenwasser zu Trinkwasser, Vortrag und Tagungsbandbeitrag, 78. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Neu-Ulm, 14. - 16. Mai ISBN 978-3-936028-71-3
11. Weiß, S.C., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H. (2012): HPTLC/AMD in Kombination mit der wirkungsbezogenen Detektion mittels *Vibrio fischeri*, TLC-Seminar, Muttenz, Schweiz, 29. August
12. Weiß, S.C., Schulz, W., Weber, W.H. (2013): HPTLC-AMD-EDA-nanoLC-QTOFMS in water and environmental analysis, Club de CCM, Paris, 5. - 6. Juni
13. Schulz, W., Weiss, S. C., Lucke, T., Winzenbacher, R. (2014): The new Challenge in Water Analysis: Transformation Products and Non-Target Analysis in Combination with Effect-Directed Analysis, Analytica Conference, München, 1. April
14. Weiß, S.C., Jung, N., Schulz, W., Weber, W. H. (2014): Enhanced tests and evaluation procedures for the effect-directed analysis using HPTLC applied for aqueous environmental samples, 22<sup>nd</sup> International Symposium for High Performance Thin-Layer Chromatography, Lyon, 2. - 5. Juli
15. Schulz, W., Weiß, S.C., Lucke, T., Winzenbacher, R. (2014): Non-Target-Analytik mittels LC-HRMS von Roh- und Trinkwasser in Kombination mit wirkungsbezogener Analytik, Kolloquium LC-MS in der Umweltanalytik, Leipzig, 16. - 18. Juni
16. Weiß, S.C., Jung, N., Schulz W., Winzenbacher, R. (2014). Entwicklung und Anwendung verschiedener wirkungsbezogener Analysenmethoden in Kombination mit der Dünnschichtchromatographie, Vortrag und Tagungsbandbeitrag, 6. Gemeinsame Jahrestagung von SETAC GLB und der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der GDCh, Gießen, 7.-10, September
17. Schulz, W., Weiß, S.C., Jung, N., Winzenbacher, R. (2015): Anwendung der HPTLC-MS in Kombination mit der Wirkungsbezogenen Analytik zur Roh- und Trinkwasserüberwachung, TLC-MS Anwendertreffen, Darmstadt, 6. Mai



18. Schulz, W., Weiss S.C., Gossmann, R., Stütz, L., Bader, T., Egetenmeyer, N., Winzenbacher, R. (2015): Effect-directed analysis with TLC in combination with non-target screening using HPLC-HRMS - A promising concept in environmental analysis to prioritize and identify contaminants, *15<sup>th</sup> EuCheMS International Conference on Chemistry and the Environment (ICCE)*, Leipzig, 20. September
19. Weiss, S.C., Schulz, W., Winzenbacher, R. (2015): Effect-directed analysis using acetylcholinesterase assay with thin-layer chromatography for the selective detection of traces of neurotoxic substances in raw- and drinking water, *4<sup>th</sup> International Symposium: Effect-related evaluation of anthropogenic trace substances - concepts for genotoxicity, neurotoxicity and endocrine effects*, Aachen, 22. - 23. Oktober
20. Weiß, S.C., Goßmann, R., Egetenmeyer, N., Stütz, L., Schulz, W., Winzenbacher, R. (2015): Dünnschichtchromatographie mit wirkungsbezogener Detektion - Anwendung verschiedener Endpunkte am Beispiel von Deponiesickerwasserproben. *11. Langenauer Wasserforum*, Langenau, 9. November
21. Weiß, S.C., Schulz, W., Winzenbacher, R. (2015): Kombination von *in vitro* Biotests mit der Dünnschichtchromatographie in der Wirkungsbezogenen Analytik zur Untersuchung von Wasserproben. *Eawag Seminar*, Dübendorf, Schweiz, 16. Dezember
22. Weiss, S.C., Schulz, W., Winzenbacher, R. (2016): Effect-directed analysis with thin-layer chromatography - A complementary screening method for the investigation of waste water, *Analytica Conference*, München, 11. Mai
23. Schulz, W., Weiss, S.C., Stütz, L., Bader, T., Lucke, T., Winzenbacher, R. (2016): Non-target screening using HPLC-HRMS in combination with Effect-Directed Analysis to prioritize contaminants in the aquatic environment, *Non-Target*, Ascona, 2. Juni
24. Weiss, S.C., Stütz, L., Egetenmeyer, N., Schulz, W., Winzenbacher, R. (2016) Effect-directed analysis with thin-layer chromatography - A complementary screening method for the investigation of water samples, *Club de CCM*, Toulouse, 5. - 6. Oktober

#### Poster

1. Seitz, W., Weiß, S.C., Weber, W.H. (2006): Anreicherungsfreie Bestimmung organischer Iodverbindungen mittels LC-MS in Abwasser am Beispiel der Röntgenkontrastmittel, *Posterbeitrag auf der 72. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft*, Celle, 22. - 24. Mai
2. Weiß, S.C., Müller, A., Albert, A., Schulz, W., Weber, W.H. (2008): Identifizierung von Farbstoff-Tracern und deren Metaboliten nach HPTLC/AMD und Nano-Chip-LC/QTOF-MS, *Posterbeitrag auf dem Langenauer Wasserforum*, Langenau, 3. - 4. November
3. Weiß, S.C., Schulz, W., Weber, W.H. (2009): Neue Auswertemethode der Biolumineszenzhemmung von *Vibrio fischeri* in der Kombination mit der Planarchromatographie, *Poster und Tagungsbandbeitrag auf der ANAKON*, Berlin, 17. - 20. März
4. Weiß, S.C., Schulz, W., Weber, W.H. (2009): Anwendung der Kombination von verschiedenen Detektionsmöglichkeiten zum Screening in der Planarchromatographie, *Poster*

- und Tagungsbandbeitrag, 75. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Stralsund, 18. – 20. Mai, ISBN 978-3-936028-56-0*
5. Müller, A., Weiß, S.C., Schulz, W., Weber (2009): Identifizierung von Markierungsfarbstoffen und deren Metaboliten in Grundwasser mittels Nano-Chip-LC/QTOF-MS nach HPTLC-AMD, *Poster mit Kurzvortrag und Tagungsbandbeitrag, 75. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Stralsund, 18. – 20. Mai, ISBN 978-3-936028-56-0*
  6. Weiß, S.C., Müller, A., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H. (2009): Anwendung der HPTLC/AMD in Kombination mit der LC-MS zur Identifizierung von organischen Spurenstoffen in Kunstrasen-Eluaten, *Posterbeitrag auf dem Langenauer Wasserforum, Langenau, 9. – 10. November*
  7. Jung, N., Weiß, S.C., Müller, A., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H. (2009): Einsatz von Datenbanken zur Auswertung des HPTLC/AMD-Fingerprints und zur Substanzidentifikation mittels Massenspektrometrie, *Posterbeitrag auf dem Langenauer Wasserforum, Langenau, 9. – 10. November*
  8. Weiß, S.C., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H. (2010): Wirkungsbezogenes Monitoring eines Deponiestandortes mittels HPTLC/AMD in Kombination mit der Biolumineszenz-Detektion, *Posterbeitrag auf dem 7. Langenauer Wasserforum, Langenau, 8. – 9. November*
  9. Weiß, S.C., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H. (2011): Wirkungsbezogene Untersuchung von Sickerwässern einer Deponie mittels HPTLC/AMD und Biolumineszenz-Detektion, *Poster und Tagungsbandbeitrag auf der ANAKON, Zürich, 22. – 25. März*
  10. Weiß, S.C., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H. (2011): Wirkungsbezogene Analytik von Deponie-Sickerwässern mittels Biolumineszenz-Detektion nach HPTLC/AMD-Trennung, *Poster und Tagungsbandbeitrag, 76. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Norderney, 30. Mai – 01. Juni, ISBN 978-3-936028-66-9 (Posterpreis)*
  11. Weber, W.H., Weiß, S.C., Lucke, T., Mößle, H., Ruhland, B., Künzel, S., Seitz, W., Schulz, W. (2011): HPTLC/AMD in Kombination mit HPLC-QTOF/MS zum Nachweis von Desphenyl-Chloridazon-Oxidationsprodukten, *Poster, 8. Langenauer Wasserforum, Langenau, 07. – 08. November*
  12. Weber, W.H., Seitz, W., Weiß, S.C., Lucke, T., Schulz, W. (2012): Effektive Verfahrenskombination zur Bestimmung unbekannter Oxidationsprodukte - dargestellt am Beispiel von Desphenyl-chloridazon, *Poster, Kurzvortrag und Tagungsbandbeitrag, 77. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Neu-Ulm, 14. – 16. Mai, ISBN 978-3-936028-71-3*
  13. Weber, W.H., Seitz, W., Weiß, S.C., Lucke, T., Schulz, W. (2012): Effektive Verfahrenskombination zur Bestimmung unbekannter Oxidationsprodukte - dargestellt am Beispiel von Desphenyl-chloridazon, *Poster, Kolloquium „LC-MS in der Umweltanalytik 2012“, Leipzig, 11. – 13. Juni*
  14. Weiß, S. C., Baudisch, M., Schulz, W., Ruck, W. K. L., Weber, W. H. (2013): Anwendung der HPTLC/AMD mit Acetylcholinesterase zur Detektion von potenziell neurotoxischen

- Substanzen in Wasser, *Poster und Tagungsbandbeitrag, 78. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft*, Goslar, 6. – 8. Mai, ISBN 978-3-936028-76-8
15. Weiß, S.C., Baudisch, M., Schulz, W., Ruck, W. K. L., Weber, W. H. (2013): Anwendung der HPTLC/AMD mit Acetylcholinesterase zur Detektion von potenziell neurotoxischen Substanzen in Wasser, *Poster und Tagungsbandbeitrag, 6. Gemeinsame Jahrestagung von SETAC GLB und der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der GDCh*, Gießen, 7.-10, September
16. Seitz, W., Fleischer, S., Weiß, S.C., Lucke, T., Schulz, W., Weber, W.H., Winzenbacher, R. (2014): Nachweis des Ozonierungsprodukts Oxamidsäure bei der Wasseraufbereitung, *Poster, Kurzvortrag und Tagungsbandbeitrag, 79. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft*, Haltern am See, 26. – 28. Mai, ISBN 978-3-936028-83-6
17. Weiß, S.C., Jung, N., Stütz, L., Schulz, W., Winzenbacher, R. (2015): Entwicklung und Anwendung verschiedener wirkungsbezogener Analysemethoden in Kombination mit der Dünnschichtchromatographie, *Poster, Kurzvortrag und Tagungsbandbeitrag, 80. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft*, Schwerin, 11. - 13. Mai, ISBN 978-3-936028-83-6
18. Stütz, L., Weiss, S.C., Egetenmeyer, N., Goßmann, R., Schulz, W., Winzenbacher, R. (2015): Use of effect-directed analysis with thin-layer chromatography for prioritization of organic micropollutants in raw and drinking water, *Poster und Kurzvortrag, 4<sup>th</sup> International Symposium: Effect-related evaluation of anthropogenic trace substances - concepts for genotoxicity, neurotoxicity and endocrine effects*, Aachen, 22. - 23. Oktober
19. Stütz, L., Weiß, S.C., Schulz, W., Winzenbacher, R. (2016): Der planar-Yeast Estrogen Screen (pYES) zur Überwachung des Verhaltens östrogenwirksamer Substanzen während Wasseraufbereitungsprozessen, *Poster und Tagungsbandbeitrag, 81. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft*, Bamberg, 2. - 4. Mai

## VII. Akkredierung von WBA/HPTLC-Methoden

Das Betriebs- und Forschungslaboratorium des Zweckverbandes Landeswasserversorgung hat den Antrag auf Aufnahme der optimierten WBA-Methoden in die Akkreditierungsurkunde bei der deutschen Akkreditierungsstelle (DAkKS) Ende 2014 gestellt. Mit dem Bescheid der DAkKS vom 24.03.2015, wurde die Akkreditierungsurkunde D-PL-18961-01-00 des Betriebs- und Forschungslaboratorium um den Punkt 3.3 „Wirkungsbezogene Analytik organischer Spurenstoffe in Trink-, Grund- und Oberflächenwässern mittels Kombination von HPTLC/AMD mit verschiedenen biologischen und biochemischen Detektionsverfahren“ erweitert.

Ausschnitt aus der Anlage zur Akkreditierungsurkunde D-PL-18961-01-00



Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH

Anlage zur Akkreditierungsurkunde D-PL-18961-01-00  
nach DIN EN ISO/IEC 17025:2005

Gültigkeitsdauer: 17.12.2015 bis 15.09.2018      Ausstellungsdatum: 17.12.2015

Urkundeninhaber:

**Zweckverband Landeswasserversorgung  
Betriebs- und Forschungslaboratorium  
in der Laborgemeinschaft SüdWest  
Am Spitzigen Berg 1, 89129 Langenau**

Prüfungen in den Bereichen:

**Probenahme von Roh- und Trinkwasser, Wasser, Grundwasser, aus Grundwasserleitern, Fließgewässern, von Schwimm- und Badebeckenwasser; ausgewählte physikalische, physikalisch-chemische, chemische und mikrobiologische Untersuchungen von Wasser, Grundwasser, Schwimm- und Badebeckenwasser, Wasser aus Badegewässern sowie von Oberflächenwasser; Bestimmung organischer Spurenstoffe in Trink-, Grund- und Oberflächenwasser; Untersuchungen gemäß Trinkwasserverordnung mit Ausnahme der radiologischen Parameter**

[...]

**3.3 Wirkungsbezogene Analytik organischer Spurenstoffe in Trink-, Grund- und Oberflächenwässern mittels Kombination von HPTLC-AMD mit verschiedenen biologischen und biochemischen Detektionsverfahren \*\***

LW-PV C 180 2014-12	Wirkungsbezogene Analytik organischer Spurenstoffe mittels Kombination von HPTLC-AMD und <i>Aliivibrio fischeri</i> – Detektion (Basistoxizität)
LW-PV C 181 2014-12	Wirkungsbezogene Analytik organischer Spurenstoffe mittels Kombination von HPTLC-AMD und <i>Bacillus subtilis</i> – Detektion (antibakterielle Wirkung)
LW-PV C 182 2014-12	Wirkungsbezogene Analytik organischer Spurenstoffe mittels Kombination von HPTLC-AMD und AChE – Detektion (Neurotoxizität)

## VIII. Literaturverzeichnis

- [1] **Choma IM, Grzelak EM.** Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A.* **2011**; 1218(19): 2684-2691.
- [2] **Marston A.** Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A.* **2011**; 1218(19): 2676-2683.
- [3] **Baumann U, Brunner C, Pletscher E, Tobler N.** Biologische Detektionsverfahren in der Dünnschichtchromatographie. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung.* **2003**; 15(3): 163-167.
- [4] **DIN 38415-3:1996-12,** German standard methods for the examination of water, waste water and sludge - Sub-animal testing (group T) - Part 3: Determination of the genotype potential of water and waste water components with the umu-test (T 3) (in german), (**1996**).
- [5] **Schwarzenbach RP, Escher BI, Fenner K, Hofstetter TB, Johnson CA, von Gunten U et al.** The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. *Science.* **2006**; 313(5790): 1072-1077.
- [6] **Farré MI, Pérez S, Kantiani L, Barceló D.** Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* **2008**; 27(11): 991-1007.
- [7] **Kümmerer K.** The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management.* **2009**; 90: 2354-2366.
- [8] **Pal A, Gin KY-H, Lin AY-C, Reinhard M.** Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of The Total Environment.* **2010**; 408(24): 6062-6069.
- [9] **Li WC.** Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution.* **2014**; 187(0): 193-201.
- [10] **Andreu V, Picó Y.** Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* **2004**; 23(10-11): 772-789.
- [11] **Fenner K, Canonica S, Wackett LP, Elsner M.** Evaluating Pesticide Degradation in the Environment: Blind Spots and Emerging Opportunities. *Science.* **2013**; 341(6147): 752-758.
- [12] **Hübner U, von Gunten U, Jekel M.** Evaluation of the persistence of transformation products from ozonation of trace organic compounds – A critical review. *Water Research.* **2015**; 68: 150-170.
- [13] **Escher BI, Fenner K.** Recent Advances in Environmental Risk Assessment of Transformation Products. *Environmental Science & Technology.* **2011**; 45(9): 3835-3847.
- [14] **Farré M, Barceló D.** Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trends in Analytical Chemistry.* **2003**; 22(5): 299 - 310.
- [15] **Tuikka AI, Schmitt C, Höss S, Bandow N, von der Ohe PC, de Zwart D et al.** Toxicity assessment of sediments from three European river basins using a sediment contact test battery. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **2011**; 74(1): 123-131.
- [16] **Kokkali V, van Delft W.** Overview of commercially available bioassays for assessing chemical toxicity in aqueous samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* **2014**; 61: 133-155.
- [17] **Trenholm RA, Vanderford BJ, Drewes JE, Snyder SA.** Determination of household chemicals using gas chromatography and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* **2008**; 1190(1-2): 253-262.
- [18] **Kuster M, López de Alda M, Barceló D.** Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis and regulatory issues of polar pesticides in natural and treated waters. *Journal of Chromatography A.* **2009**; 11216(3): 520-529.

- [19] **Huntscha S, Singer HP, McArdell CS, Frank CE, Hollender J.** Multiresidue analysis of 88 polar organic micropollutants in ground, surface and wastewater using online mixed-bed multilayer solid-phase extraction coupled to high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2012**; 1268(0): 74-83.
- [20] **Reemtsma T, Alder L, Banasiak U.** A multimethod for the determination of 150 pesticide metabolites in surface water and groundwater using direct injection liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2013**; 1271(1): 95-104.
- [21] **Petrie B, Barden R, Kasprzyk-Hordern B.** A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research*. **2015**; 72(0): 3-27.
- [22] **Martínez Vidal JL, Plaza-Bolaños P, Romero-González R, Garrido Frenich A.** Determination of pesticide transformation products: A review of extraction and detection methods. *Journal of Chromatography A*. **2009**; 1216(40): 6767-6788.
- [23] **Müller A, Schulz W, Ruck WKL, Weber WH.** A new approach to data evaluation in the non-target screening of organic trace substances in water analysis. *Chemosphere*. **2011**; 85: 1211-1219.
- [24] **Hug C, Ulrich N, Schulze T, Brack W, Krauss M.** Identification of novel micropollutants in wastewater by a combination of suspect and nontarget screening. *Environmental Pollution*. **2014**; 184: 25-32.
- [25] **Bletsou AA, Jeon J, Hollender J, Archontaki E, Thomaidis NS.** Targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometric workflows for identification of transformation products of emerging pollutants in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry*. **2015**; 66: 32-44.
- [26] **Leendert V, Van Langenhove H, Demeestere K.** Trends in liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry for multi-residue analysis of organic micropollutants in aquatic environments. *TRAC Trends in Analytical Chemistry*. **2015**; 67(0): 192-208.
- [27] **Schymanski EL, Singer HP, Slobodnik J, Ipolyi I, Oswald P, Krauss M et al.** Non-target screening with high-resolution mass spectrometry: critical review using a collaborative trial on water analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2015**; 407: 6237-6255.
- [28] **Mount DI.** Methodes for aquatic toxicity identification evaluations. Phase III toxicity confirmation procedures. *US Environmental Protection Agency*. **1989**; EPA/600/3-88/036.
- [29] **Mount DI, Anderson-Carnahan L.** Phase II toxicity identification procedures. *US Environmental Protection Agency*. **1989**; EPA/600/3-88/035.
- [30] **Norbert-King TJ, Mount DI, Durhan EJ, Ankley GT, Burkhard LP, Amato JR et al.** Methods for aquatic toxicity identification evaluation. Phase I toxicity characterization procedures. *US Environmental Protection Agency*. **1991**; EPA/600/6-91/003.
- [31] **Ankley GT, Hockett JR, Mount DI, Mount DR.** Early Evolution of the Toxicity Identification Evaluation Process: Contributions from the United States Environmental Protection Agency Effluent Testing Program. In: Brack W, (editor). *Effect-Directed Analysis of Complex Environmental Contamination. The Handbook of Environmental Chemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer; **2011**: p. 1-18.
- [32] **Ankley GT, Schubauer-Berigan MK.** Comparison of techniques for the isolation of sediment pore water for toxicity testing. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **1994**; 27(4): 507-512.
- [33] **Ho KT, Burgess RM, Mount DR, Norberg-King TJ, Hockett JR.** Sediment Toxicity Identification Evaluation (TIE) - Phases I, II, and III Guidance Document. Development OoRa. *US Environmental Protection Agency*. **2007**; EPA/600/R-07/080.
- [34] **Bakker JF, Belzunce-Segarra MJ, Castro R, Heuvel-Greve Mvd, Klamer HJC, Brack W et al.** Effect Directed Analysis and Toxicity Identification Evaluation. In: Barcelo D, Petrovic M, (editors). *Sustainable management of sediment resources. Sediment Quality and Impact Assessment of Pollutants*. Amsterdam, Oxford: Elsevier; **2007**: p. 163-214.
- [35] **Schubauer-Berigan MK, Dierkes JR, Monson PD, Ankley GT.** pH-Dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **1993**; 12(7): 1261-1266.

- [36] **Burgess RM, Perron MM, Cantwell MG, Ho KT, Serbst JR, Pelletier MC.** Use of Zeolite for Removing Ammonia and Ammonia-Caused Toxicity in Marine Toxicity Identification Evaluations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **2004**; 47(4): 440-447.
- [37] **Burgess RM, Ho KT, Brack W, Lamoree M.** Effects-directed analysis (EDA) and toxicity identification evaluation (TIE): Complementary but different approaches for diagnosing causes of environmental toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **2013**; 32(9): 1935-1945.
- [38] **Jacobs MW, Delfino JJ, Bitton G.** The toxicity of sulfur to microtox® from acetonitrile extracts of contaminated sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **1992**; 11(8): 1137-1143.
- [39] **Weller MG.** A Unifying Review of Bioassay-Guided Fractionation, Effect-Directed Analysis and Related Techniques. *Sensors*. **2012**; 12: 9181-9209.
- [40] **Brack W.** Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2003**; 377(3): 397-407.
- [41] **Salizzato M, Rigoni M, Pavoni B, Ghirardini AV, Ghetti PF.** Separation and quantification of organic micropollutants (PAH, PCB) in sediments. Toxicity of extracts towards vibrio fisheri. *Toxicological & Environmental Chemistry*. **1997**; 60(1-4): 183-200.
- [42] **Salizzato M, Pavoni B, Volpi Ghirardini A, Ghetti PF.** Sediment toxicity measured using Vibrio fischeri as related to the concentrations of organic (PCBs, PAHs) and inorganic (metals, sulphur) pollutants. *Chemosphere*. **1998**; 36(14): 2949-2968.
- [43] **Weiss J, Simon E, Stroomborg G, de Boer R, de Boer J, van der Linden S et al.** Identification strategy for unknown pollutants using high-resolution mass spectrometry: Androgen-disrupting compounds identified through effect-directed analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2011**; 400(9): 3141-3149.
- [44] **Lukasewycz M, Durhan E.** Strategies for the identification of non-polar toxicants in aqueous environmental samples using toxicity-based fractionation and gas chromatography—mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **1992**; 580(1–2): 215-228.
- [45] **Thomas KV, Thain JE, Waldock MJ.** Identification of toxic substances in United Kingdom estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **1999**; 18(3): 401-411.
- [46] **Thomas KV, Hurst MR, Matthiessen P, Sheahan D, Williams RJ.** Toxicity characterisation of organic contaminants in stormwaters from an agricultural headwater stream in South East England. *Water Research*. **2001**; 35(10): 2411-2416.
- [47] **Fiehn O, Jekel M.** Comparison of Sorbents Using Semipolar to Highly Hydrophilic Compounds for a Sequential Solid-Phase Extraction Procedure of Industrial Wastewaters. *Analytical Chemistry*. **1996**; 68(18): 3083-3089.
- [48] **Fiehn O, Vigelahn L, Kalnowski G, Reemtsma T, Jekel M.** Toxicity-directed Fractionation of Tannery Wastewater Using Solid-phase Extraction and Luminescence Inhibition in Microtiter Plates. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*. **1997**; 25(1): 11-16.
- [49] **Reemtsma T, Fiehn O, Jekel M.** A modified method for the analysis of organics in industrial wastewater as directed by their toxicity to Vibrio fischeri. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. **1999**; 363(8): 771-776.
- [50] **Castillo M, Barcelo D.** Identification of Polar Toxicants in Industrial Wastewaters Using Toxicity-Based Fractionation with Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. **1999**; 71(17): 3769-3776.
- [51] **Faber P, Bierl R.** Influence of different flow conditions on the occurrence and behavior of potentially hazardous organic xenobiotics in the influent and effluent of a municipal sewage treatment plant in Germany: an effect-directed approach. *Environmental Sciences Europe*. **2012**; 24(1): 1-13.
- [52] **Ingkaninan K, de Best CM, van der Heijden R, Hofte AJP, Karabatak B, Irth H et al.** High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. *Journal of Chromatography A*. **2000**; 872(1–2): 61-73.



- [53] **Rhee IK, Appels N, Hofte B, Karabatak B, Erkelens C, Stark LM et al.** Isolation of the Acetylcholinesterase Inhibitor Ungeremine from *Nerine bowdenii* by Preparative HPLC Coupled On-Line to a Flow Assay System. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **2004**; 27(11): 1804-1809.
- [54] **Fabel S, Niessner R, Weller MG.** Effect-directed analysis by high-performance liquid chromatography with gas-segmented enzyme inhibition. *Journal of Chromatography A*. **2005**; 1099(1-2): 103-110.
- [55] **de Boer AR, Bruyneel B, Krabbe JG, Lingeman H, Niessen WMA, Irth H.** A microfluidic-based enzymatic assay for bioactivity screening combined with capillary liquid chromatography and mass spectrometry. *Lab on a Chip*. **2005**; 5(11): 1286-1292.
- [56] **Stolper P, Fabel S, Weller M, Knopp D, Niessner R.** Whole-cell luminescence-based flow-through biodetector for toxicity testing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2008**; 390(4): 1181-1187.
- [57] **Fernandez P, Bayona JM.** Use of off-line gel permeation chromatography · normal-phase liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic compounds in environmental samples and standard reference materials (air particulate matter and marine sediment). *Journal of Chromatography A*. **1992**; 625(2): 141-149.
- [58] **Zhang H, Chang C-H, Lü F, Lee D-J, He P-J, Shao L-M et al.** Estrogenic activity of fractionate landfill leachate. *Science of The Total Environment*. **2009**; 407(2).
- [59] **Klinkow N, Oleksy-Frenzel J, Jekel M.** Toxicity-directed fractionation of organic compounds in tannery wastewater with regard to their molecular weight and polarity. *Water Research*. **1998**; 32(9): 2583-2592.
- [60] **Morlock GE, Prabha S.** Analysis and Stability of Sucralose in a Milk-Based Confection by a Simple Planar Chromatographic Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**; 55(18): 7217-7223.
- [61] **Morlock G, Schwack W.** Planar Chromatography - Back to the Future? *LC-GC Europe*. **2008**; 21: 366-371.
- [62] **Aranda M, Morlock G.** Simultaneous determination of riboflavin, pyridoxine, nicotinamide, caffeine and taurine in energy drinks by planar chromatography-multiple detection with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2006**; 1131(1-2): 253-260.
- [63] **Weber WH, Seitz W, Schulz W, Aichinger A.** Evidence of the metabolites desphenyl-chloridazon and methyl-desphenyl chloridazon in surface, ground and drinking water. *Camag Bibliography Service*. **2007**; 98: 12-15.
- [64] **Goodall RR, Levi AA.** A micro-chromatographic method for the detection and approximate determination of the different penicillins in a mixture. *Analyst*. **1947**; 72(856): 277-290.
- [65] **Meyers E, Smith DA.** Bioautography of antibiotic spread-layer chromatograms. *Journal of Chromatography A*. **1964**; 14(0): 129-132.
- [66] **Rahalison L, Hamburger M, Hostettmann K, Monod M, Frenk E.** A Bioautographic Agar Overlay Method for Detection of Antifungal Compounds from Higher Plants. *Phytochemical Analysis*. **1991**; 2: 199 - 203.
- [67] **Baumann U, Indermaur H, Pletscher E.** Untersuchungskonzept zur Charakterisierung toxischer Stoffe in belastetem Wasser. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*. **2000**; 12(2): 63-67.
- [68] **Eberz G, Rast H, Burger K, Kreiss W, Weisemann C.** Bioactivity screening by chromatography-bioluminescence coupling. *Chromatographia*. **1996**; 43(1): 5-9.
- [69] **Choma I, Choma A, Staszczuk K.** Direct bioautography-thin-layer chromatography of flumequine and doxycycline in milk. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*. **2002**; 15(3): 187-191.
- [70] **Akkad R, Schwack W.** Multi-enzyme inhibition assay for the detection of insecticidal organophosphates and carbamates by high-performance thin-layer chromatography applied to determine enzyme inhibition factors and residues in juice and water samples. *Journal of Chromatography B*. **2010**; 878(17-18): 1337-1345.
- [71] **Schwappe CH, Hoffmann P, Nofer J-R, Pohlentz G, Mormann M, Karch H et al.** Neutral glycosphingolipids in human blood: a precise mass spectrometry analysis with special reference to lipoprotein-associated Shiga toxin receptors. *Journal of Lipid Research*. **2010**; 51(8): 2282-2294.

- [72] Cieśła Ł, Kryszewski J, Stochmal A, Oleszek W, Waksmundzka-Hajnos M. Approach to develop a standardized TLC-DPPH test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2012**; 70(0): 126-135.
- [73] Rios JL, Recio MC, Villar A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*. **1988**; 23(2-3): 127-149.
- [74] Choma I, Jesionek W. Effects-directed biological detection: Bioautography. In: Poole CFe, (editor). *Instrumental Thin-Layer Chromatography*. Amsterdam: Elsevier; **2015**: p. 279-312.
- [75] Goodall RR, Levi AA. A microchromatographic method for the detection and approximate determination of the different penicillins in a mixture. *Nature*. **1946**; 158: 675-676.
- [76] Wagman GH, Bailey JV. Use of silicic acid—glass fiber sheets for bioautography of antimicrobial substances. *Journal of Chromatography A*. **1969**; 41(0): 263-264.
- [77] Betina V. Bioautography in paper and thin-layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *Journal of Chromatography A*. **1973**; 78(0): 41-51.
- [78] Nagy S, Kocsis B, Kőszegi T, Botz L. Optimization of conditions for culture of the test bacteria used for direct bioautographic detection. 1. The gram-positive test bacterium *Bacillus subtilis*. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*. **2002**; 15(2): 132-137.
- [79] Nagy S, Kőszegi T, Botz L, Kocsis B. Optimization of conditions for culture of test bacteria used for direct bioautographic TLC detection. 2. Gram-negative test bacterium: *Escherichia coli*. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*. **2003**; 16(2): 121-126.
- [80] Nagy S, Kocsis B, Kőszegi T, Botz L. Optimization of growth conditions for test fungus cultures used in direct bioautographic TLC detection. 3. Test fungus: *Candida albicans*. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*. **2007**; 20(5): 385-389.
- [81] Grzelak EM, Majer-Dziedzic B, Choma IM. Development of a Novel Direct Bioautography-Thin-Layer Chromatography Test: Optimization of Growth Conditions for Gram-Negative Bacteria, *Escherichia coli*. *Journal Of AOAC International*. **2011**; 94(5): 1567-1572.
- [82] Grzelak EM, Majer-Dziedzic B, Choma IM, Pilorz KM. Development of a Novel Direct Bioautography-Thin-Layer Chromatography Test: Optimization of Growth Conditions for Gram-Positive Bacteria, *Bacillus subtilis*. *Journal Of AOAC International*. **2013**; 96(2): 386-391.
- [83] Akkad R, Schwack W. Effect of bromine oxidation on high-performance thin-layer chromatography multi-enzyme inhibition assay detection of organophosphates and carbamate insecticides. *Journal of Chromatography A*. **2011**; 1218(19): 2775-2784.
- [84] Magnani JL, Smith DF, Ginsburg V. Detection of gangliosides that bind cholera toxin: Direct binding of <sup>125</sup>I-labeled toxin to thin-layer chromatograms. *Analytical Biochemistry*. **1980**; 109(2): 399-402.
- [85] Tanaka H, Putalun W, Tsuzaki C, Shoyama Y. A simple determination of steroidal alkaloid glycosides by thin-layer chromatography immunostaining using monoclonal antibody against solamargine. *FEBS Letters*. **1997**; 404(2-3): 279-282.
- [86] Kushi Y, Ogura K, Rokukawa C, Handa S. Blood Group A-Active Glycosphingolipids Analysis by the Combination of TLC-Immunostaining Assay and TLC/SIMS Mass Spectrometry. *Journal of Biochemistry*. **1990**; 107(5): 685-688.
- [87] Muthing J, Cacic M. Glycosphingolipid expression in human skeletal and heart muscle assessed by immunostaining thin-layer chromatography. *Glycoconjugate Journal*. **1997**; 14(1): 19-28.
- [88] Portoukalian J, Bouchon B. Hydrolysis of all gangliosides, including GM1 and GM2, on thin-layer plates by *Vibrio cholerae* neuraminidase. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **1986**; 380(0): 386-392.
- [89] Yu RK, Ariga T. Ganglioside Analysis by High-Performance Thin-Layer Chromatography. In: Alfred HM, Yusuf AH, (editors). *Methods in Enzymology*. Academic Press; **2000**: p. 115-134.

- [90] **Sorice M, Griggi T, Circella A, Garofalo T, d'Agostino F, Pittoni V et al.** Detection of antiphospholipid antibodies by immunostaining on thin layer chromatography plates. *Journal of Immunological Methods*. **1994**; 173(1): 49-54.
- [91] **Sorice M, Circella A, Misasi R, Pittoni V, Garofalo T, Cirelli A et al.** Cardiolipin on the surface of apoptotic cells as a possible trigger for antiphospholipid antibodies. *Clinical & Experimental Immunology*. **2000**; 122(2): 277-284.
- [92] **Alessandri C, Sorice M, Bombardieri M, Conigliaro P, Longo A, Garofalo T et al.** Antiphospholipid reactivity against cardiolipin metabolites occurring during endothelial cell apoptosis. *Arthritis Research & Therapy*. **2006**; 8(6): R180.
- [93] **Conti F, Alessandri C, Sorice M, Capozzi A, Longo A, Garofalo T et al.** Thin-layer chromatography immunostaining in detecting anti-phospholipid antibodies in seronegative anti-phospholipid syndrome. *Clinical & Experimental Immunology*. **2012**; 167(3): 429-437.
- [94] **Meisen I, Mormann M, Müthing J.** Thin-layer chromatography, overlay technique and mass spectrometry: A versatile triad advancing glycosphingolipidomics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. **2011**; 1811(11): 875-896.
- [95] **Conti F, Alessandri C, Spinelli F, Capozzi A, Martinelli F, Recalchi S et al.** TLC Immunostaining for Detection of "Antiphospholipid" Antibodies. In: Eggleton P, Ward FJ, (editors). *Systemic Lupus Erythematosus. Methods in Molecular Biology*: Springer New York; **2014**: p. 95-101.
- [96] **Pratt DE, Miller EE.** A flavonoid antioxidant in Spanish peanuts(*Arachia hypogoea*). *Journal of the American Oil Chemists Society*. **1984**; 61(6): 1064-1067.
- [97] **Whittern C, Miller E, Pratt D.** Cottonseed flavonoids as lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **1984**; 61(6): 1075-1078.
- [98] **Sánchez-Medina A, García-Sosa K, May-Pat F, Peña-Rodríguez LM.** Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in Yucatecan Traditional Medicine Part I. Antioxidant, antimicrobial and  $\beta$ -glucosidase inhibition activities. *Phytomedicine*. **2001**; 8(2): 144-151.
- [99] **Glavind J, Holmer G.** Thin-layer chromatographic determination of antioxidants by the stable free radical  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1967**; 44(9): 539-542.
- [100] **Soler-Rivas C, Espín JC, Wichers HJ.** An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*. **2000**; 11(5): 330-338.
- [101] **Zampini I, Ordoñez R, Isla M.** Autographic Assay for the Rapid Detection of Antioxidant Capacity of Liquid and Semi-solid Pharmaceutical Formulations Using ABTS•+ Immobilized by Gel Entrapment. *AAPS PharmSciTech*. **2010**; 11(3): 1159-1163.
- [102] **Reich E, Schibli A, Debatt A.** Validation of High-Performance Thin-Layer Chromatographic Methods for the Identification of Botanicals in a cGMP Environment. *Journal Of AOAC International*. **2008**; 91(1): 13-20.
- [103] **Meier B, Spriano D.** Modern HPTLC - A Perfect Tool for Quality Control of Herbals and Their Preparations. *Journal Of AOAC International*. **2010**; 93(5): 1399-1409.
- [104] **Hostettmann K, Terreux C, Marston A, Potterat O.** The Role of Planar Chromatography in the Rapid Screening and Isolation of Bioactive Compounds from Medicinal Plants. *Journal of Planar Chromatography*. **1997**; 10: 251 - 257.
- [105] **Reemtsma T, Putschew A, Jekel M.** Industrial wastewater analysis: a toxicity-directed approach. *Waste Management*. **1999**; 19(2): 181-188.
- [106] **Reemtsma T.** Prospects of toxicity - directed wastewater analysis. *Analytical Chimica Acta*. **2001**; 426: 279 - 287.
- [107] **Weins C.** Overview of bioactivity-based analysis by HPTLC. Bridging the gap between cause and effect — HPTLC detection of bioactive compounds in the environment and in food. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*. **2008**; 21(6): 405-410.

- [108] **Morlock GE, Schuele L, Grashorn S.** Development of a quantitative high-performance thin-layer chromatographic method for sucralose in sewage effluent, surface water, and drinking water. *Journal of Chromatography A.* **2011**; 1218(19): 2745-2753.
- [109] **Buchinger S, Spira D, Bröder K, Schlüsener M, Ternes T, Reifferscheid G.** Direct Coupling of Thin-Layer Chromatography with a Bioassay for the Detection of Estrogenic Compounds: Applications for Effect-Directed Analysis. *Analytical Chemistry.* **2013**; 85(15): 7248-7256.
- [110] **Schönborn A, Grimmer A.** Coupling sample preparation with effect-directed analysis of estrogenic activity - Proposal for a new rapid screening concept for water samples. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC.* **2013**; 26(5): 402-408.
- [111] **Schulz W, Seitz W, Weiss SC, Weber WH, Böhm M, Flottmann D.** Use of *Vibrio fischeri* for screening for bioactivity in water analysis. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC.* **2008**; 21(6): 427-430.
- [112] **Spira D, Reifferscheid G, Buchinger S.** Combination of high-performance thin-layer chromatography with a specific bioassay - A tool for effect-directed analysis. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC.* **2013**; 26(5): 395-401.
- [113] **Lawrence JF.** Simple, sensitive and selective thin layer chromatographic technique for detecting some photosynthesis inhibiting herbicides. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists.* **1980**; 63(4): 758-761.
- [114] **Bailey AM, Coffey MD.** A Sensitive Bioassay for Quantification of Metalaxyl in Soils. *Phytopathology.* **1984**; 74(6): 667-669.
- [115] **Weins C, Jork H.** Toxicological evaluation of harmful substances by in situ enzymatic and biological detection in high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A.* **1996**; 750(1-2): 403-407.
- [116] **Choma I.** Screening of enrofloxacin and ciprofloxacin residues in milk by HPLC and by TLC with direct bioautography. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC.* **2006**; 19(108): 104-108.
- [117] **Geike F.** Dünnschichtchromatographisch--enzymatischer Nachweis von Carbamaten: I. Nachweis insektizider Carbamate mit Rinderleber-Esterase. *Journal of Chromatography A.* **1970**; 53(2): 269-277.
- [118] **Mendoza CE.** Thin-layer chromatography and enzyme inhibition techniques : Introduction. *Journal of Chromatography.* **1973**; 78: 29-40.
- [119] **Rhee IK, van de Meent M, Ingkaninan K, Verpoorte R.** Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A.* **2001**; 915(1-2): 217-223.
- [120] **Müller MB, Dausend C, Weins C, Frimmel FH.** A New Bioautographic Screening Method for the Detection of Estrogenic Compounds. *Chromatographia.* **2004**; 60(3): 207-211.
- [121] **Geike F, Schuphan L.** Dünnschichtchromatographischer Nachweis von organoquecksilber-Verbindungen. *Journal of Chromatography A.* **1972**; 72(1): 153-163.
- [122] **Houk VS, Claxton LD.** Screening complex hazardous wastes for mutagenic activity using a modified version of the TLC/Salmonella assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology.* **1986**; 169(3): 81-92.
- [123] **Kováč J, Henselová M.** Detection of triazine herbicides in soil by a Hill-reaction inhibition technique after thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A.* **1977**; 133(2): 420-422.
- [124] **Umweltbundesamt.** Bewertung der Anwesenheit teil- oder nicht bewertbarer Stoffe im Trinkwasser aus gesundheitlicher Sicht. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.* **2003**; 46(3): 249-251.
- [125] **Madill REA, Brownlee BG, Josephy PD, Bunce NJ.** Comparison of the Ames Salmonella Assay and Mutatox Genotoxicity Assay for Assessing the Mutagenicity of Polycyclic Aromatic Compounds in Porewater from Athabasca Oil Sands Mature Fine Tailings. *Environmental Science & Technology.* **1999**; 33(15): 2510-2516.

- [126] **DIN EN ISO 11348-3:2009-05**, Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) - Part 3: Method using freeze-dried bacteria (German version of ISO 11348-3:2007), (2009).
- [127] **Inouye S.** NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri* ATCC 7744, is a flavoprotein. *FEBS Letters*. 1994; 347(2-3): 163-168.
- [128] **ASTM D1193 - 06**, Standard Specification for Reagent Water, (2011).
- [129] **DIN EN 61966-2-1:2003-09**, Multimediasysteme und -geräte - Farbmessung und Farbmanagement - Teil 2-1: Farbmanagement; Vorgabe-RGB-Farbraum, sRGB (IEC 61966-2-1:1999 + A1:2003), German Version of EN 61966-2-1:2000 + A1:2003 (2003).
- [130] **Herzsprung P, Weil L, Quentin K-E.** Bestimmung von Phosphorpestiziden und insektiziden Carbamaten mittels Cholinesterasehemmung - Mittlung 1: Hemmwirkung von Phosphorpestiziden und insektiziden Carbamaten auf immobilisierte Cholinesterase. *Zeitschrift für Wasser und Abwasser-Forschung*. 1989; 22(2): 67-72.
- [131] **Walz I, Schwack W.** Cutinase inhibition by means of insecticidal organophosphates and carbamates - Part 1: Basics in development of a new enzyme assay. *European Food Research and Technology*. 2007; 225(3): 593-601.
- [132] **Boublik Y, Saint-Aguet P, Lougarre A, Arnaud M, Villatte F, Estrada-Mondaca S et al.** Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues. *Protein Engineering*. 2002; 15(1): 43-50.
- [133] **Frey H-P, Zieloff K.** Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie: Grundlagen und Praxis. Weinheim: VCH; 1992.
- [134] **Geiss F.** Fundamentals of Thin Layer Chromatography (Planar Chromatography). *Chromatographic Methods*. Heidelberg: Dr. A. Hüthig Verlag; 1987.
- [135] **Perry JA, Haag KW, Glunz LJ.** Programmed Multiple Development in Thin Layer Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 1973; 11(9): 447-453.
- [136] **Burger K.** DC-PMD, Dünnschicht-Chromatographie mit Gradienten-Elution im Vergleich zur Säulenflüssigkeits-Chromatographie. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 1984; 318(3): 228-233.
- [137] **Burger K.** Thin Layer Chromatography with Automated Multiple Development (AMD-TLC). *Chemistry of Plant Protection*. 1995; 12: 181 - 195.
- [138] **Cebolla VL, Jarne C, Domingo P, Domínguez A, Delgado-Camón A, Garriga R et al.** Fluorescence detection by intensity changes for high-performance thin-layer chromatography separation of lipids using automated multiple development. *Journal of Chromatography A*. 2011; 1218(19): 2668-2675.
- [139] **Fuchs B, Süß R, Teuber K, Eibisch M, Schiller J.** Lipid analysis by thin-layer chromatography--A review of the current state. *Journal of Chromatography A*. 2011; 1218(19): 2754-2774.
- [140] **Sherma J.** Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis. *Journal of Chromatography A*. 2000; 880(1-2): 129-147.
- [141] **Galand N, Pothier J, Viel C.** Plant Drug Analysis by Planar Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 2002; 40(10): 585-597.
- [142] **De La Vigne U, Jänchen DE, Weber WH.** Application of high-performance thin-layer chromatography and automated multiple development for the identification and determination of pesticides in water. *Journal of Chromatography A*. 1991; 553: 489-496.
- [143] **Burger K, Jork H, Köhler J.** Application of AMD to the Determination of Crop Protection Agents in Drinking Water. Part IV: Fundamentals of a Confirmatory Test. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*. 1996; 24(1): 6 - 15.
- [144] **Reich E, Georg T.** Method development in HPTLC. *Journal of Planar Chromatography*. 1997; 10: 273-280.

- [145] **DIN 38407-16:1999-06**, German standard methods for the examination of water, waste water and sludge - Jointly determinable substances (group F) - Part 16: Determination of aniline derivatives by gas chromatography (F 16), (1999).
- [146] **Welsch T, Spiegel K.** Multiple flüssig-flüssig-Mikroextraktion für die Altlastenanalytik. <http://www.laborpraxis.vogel.de/labortechnik/probenvorbereitung/extraktionsgeraete/articles/106272/>. 2005. Accessed 02.12.2011 2012.
- [147] **Liu J, Jiang M, Li G, Xu L, Xie M.** Miniaturized salting-out liquid-liquid extraction of sulfonamides from different matrices. *Analytica Chimica Acta*. 2010; 679(1-2): 74-80.
- [148] **Henke H.** Präparative Gelchromatographie an Sephadex LH-20. Obernburg: 1994.
- [149] **Rodriguez CF, MCMahon WA, Thomas RE.** Method development for determination of polychlorinated hydrocarbons in municipal sludge U.S. Environmental Protection Agency: Southwest Research Institute 1980. Report No.: EPA-600/2-80-029.
- [150] Sampling and Analytical Methods of the National Status and Trends Program National Benthic Surveillance and Mussel Watch Projects 1984-1992. National oceanic and atmospheric administration 1993.
- [151] **Guerriero E, Rotatori M, Mosca S, Rossetti G, Pomponio S.** Comparison of different methods of purification of environmental samples for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Organohalogen Compounds*. 2009; 71.
- [152] **US EPA Methode 3640A**, Gel-Permeation Cleanup, (1994).
- [153] **Schlegel HG, Zaborosch C.** Allgemeine Mikrobiologie. 7. ed. Georg Thieme Verlag; 1992.
- [154] **Robertson LA, Figge MJ, Dunlap PV.** Beijerinck and the bioluminescent bacteria: microbiological experiments in the late 19th and early 20th centuries. *FEMS Microbiology Ecology*. 2011; 75(2): 185-194.
- [155] **Urbanczyk H, Ast JC, Higgins MJ, Carson J, Dunlap PV.** Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007; 57(12): 2823-2829.
- [156] **Dunlap PV.** Bioluminescence, Microbial. In: Schaechter M, (editor). *The desk encyclopedia of microbiology*. 2. ed. Oxford: Elsevier; 2009: p. 45-61.
- [157] **Widder EA.** Bioluminescence in the Ocean: Origins of Biological, Chemical, and Ecological Diversity. *Science*. 2010; 328(5979): 704-708.
- [158] **Hastings JW.** Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems. *Journal of Molecular Evolution*. 1983; 19(5): 309-321.
- [159] **Hastings JW, Wood KV.** Luciferases did not all evolve from precursors having similar enzymatic properties. In: Valenzano D, Coohill T, (editors). *Photobiology 2002*. Overland Park, Kansas, USA: Valdenmar Publ. Co.; 2001: p. 199-210.
- [160] **Meighen EA.** Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiological Reviews*. 1991; 55(1): 123-142.
- [161] **Belas R, Mileham A, Cohn D, Hilman M, Simon M, Silverman M.** Bacterial bioluminescence: isolation and expression of the luciferase genes from *Vibrio harveyi*. *Science*. 1982; 218(4574): 791-793.
- [162] **Ziegler MM, Baldwin TO.** Biochemistry of Bacterial Bioluminescence. In: D. Rao S, (editor). *Current Topics in Bioenergetics*. Elsevier; 1981: p. 65-113.
- [163] **Hastings JW.** Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. *Gene*. 1996; 173(1): 5-11.
- [164] **Nealson KH, Hastings JW.** Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological Reviews*. 1979; 43(4): 496-518.

- [165] **Timmins GS, Robb FJ, Wilmot CM, Jackson SK, Swartz HM.** Firefly Flashing is Controlled by Gating to Light-Emitting Cells *The Journal of Experimental Biology*. **2001**; 204(16): 2795-2801.
- [166] **Miller MB, Bassler BL.** Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*. **2001**; 55(1): 165-199.
- [167] **Fuqua C, Greenberg EP.** Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2002**; 3(9): 685-695.
- [168] **Engebrecht J, Nealson K, Silverman M.** Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell*. **1983**; 32(3): 773-781.
- [169] **Bassler BL.** Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Cell*. **2002**; 109: 421-424.
- [170] **Meighen EA.** Genetics of Bacterial Bioluminescence. *Annual Review of Genetics*. **1994**; 28(1): 117-139.
- [171] **Schaefer AL, Val DL, Hanzelka BL, Cronan JE, Greenberg EP.** Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: Acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **1996**; 93(18): 9505-9509.
- [172] **Stabb EV.** Shedding light on the bioluminescence 'paradox'. *ASM News*. **2005**; 71: 223-229.
- [173] **Teuscher E, Lindequist U.** Biogene Gifte. 2 ed. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; **1994**.
- [174] **Bourgois JJ, Sluse FE, Baguet F, Mallefet J.** Kinetics of Light Emission and Oxygen Consumption by Bioluminescent Bacteria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. **2001**; 33(4): 353-363.
- [175] **Kurfürst M, Hastings JW, Ghisla S, Macheroux P.** Identification of the Luciferase-Bound Flavin-4A-Hydroxide as the Primary Emitter in the Bacterial Bioluminescence Reaction. In: Mayhew SG, (editor). *Flavins and flavoproteins*. Berlin: de Gruyter; **1984**: p. 657-667.
- [176] **Ghisla S, Eckstein J, Macheroux P.** On the chemical mechanisms of bacterial luciferase, an updating. *Flavins and flavoproteins : International Symposium on Flavins and Flavoproteins*; 07.-12.06.1987; Atlanta, Georgia, USA **1987**. p. 601-612.
- [177] **Massey V.** Activation of Molecular Oxyge by Flavins and Flavoproteins. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. **1994**; 269(36): 22459-22462.
- [178] **Boylan M, Miyamoto C, Wall L, Graham A, Meighen E.** Lux C, D and E genes of the *Vibrio fischeri* luminescence operon code for the reductase, transferase, and synthetase enzymes involved in aldehyde biosynthesis. *Photochemistry and Photobiology*. **1989**; 49(5): 681-688.
- [179] **Sixt S.** Methoden zur Abschätzung umweltrelevanter physikalisch-chemischer und ökotoxikologischer Eigenschaften organischer Substanzen aus der Molekülstruktur [Dissertation]: *Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg*; **1998**.
- [180] **Makemson JC.** Luciferase-dependent oxygen consumption by bioluminescent vibrios. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. **1986**; 165(2): 461-466.
- [181] **Reineke N.** Biotestgeleitete Analytik von ökotoxikologisch relevanten organischen Substanzen in Sedimentextrakten von Nord- und Ostsee [Dissertation]. Hamburg: *Universität Hamburg*; **2003**.
- [182] **Yagi T.** The bacterial energy-transducing NADH-quinone oxidoreductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. **1993**; 1141(1): 1-17.
- [183] **Kaiser KLE.** Correlations of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms. *Environmental Health Perspectives*. **1998**; 106 (Suppl. 2): 583-591.
- [184] **Jennings VLK, Rayner-Brandes MH, Bird DJ.** Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium (*vibrio fischeri*): a comparison of three commercial systems. *Water Research*. **2001**; 35(14): 3448-3456.
- [185] **Sixt S, Altschuh J, Brüggemann R.** Quantitative structure-toxicity relationships for 80 chlorinated compounds using quantum chemical descriptors. *Chemosphere*. **1995**; 30(12): 2397-2414.

- [186] **Escher B.** Molecular Mechanisms in Aquatic Ecotoxicology: Specific and Non-specific Membrane Toxicity [Habilitation]: *ETH Zürich*; **2001**.
- [187] **Segner H, Braunbeck T.** Cellular response profile to chemical stress,. In: Schüürmann G, Markert B, (editors). *Ecotoxicology*. Wiley, J. & Sons, Inc. and Spektrum Akademischer Verlag; **1998**: p. 521-569.
- [188] **Wezel APv, Opperhuizen A.** Narcosis Due to Environmental Pollutants in Aquatic Organisms: Residue-Based Toxicity, Mechanisms, and Membrane Burdens. *Critical Reviews in Toxicology*. **1995**; 25(3): 255-279.
- [189] **Nendza M, Wenzel A, Wienen G.** Classification of Contaminants by Mode of Action Based on in vitro Assays. *SAR and QSAR in Environmental Research*. **1995**; 4(1): 39-50.
- [190] **Van Loon WMGM, Verwoerd ME, Wijnker FG, van Leeuwen CJ, van Duyn P, van deGuchte C et al.** Estimating total body residues and baseline toxicity of complex organic mixtures in effluents and surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **1997**; 16(7): 1358-1365.
- [191] **Escher BI, Eggen RIL, Schreiber U, Schreiber Z, Vye E, Wisner B et al.** Baseline Toxicity (Narcosis) of Organic Chemicals Determined by In Vitro Membrane Potential Measurements in Energy-Transducing Membranes. *Environmental Science & Technology*. **2002**; 36(9): 1971-1979.
- [192] **Nendza M, Wenzel A.** Discriminating Toxicant Classes by Mode of Action - 1. (Eco)toxicity Profiles. *Environmental Science and Pollution Research*. **2005**; 13(3): 192-203.
- [193] **Bulich AA, L. ID.** Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity. *ISA Transactions*. **1981**; 20(1): 29-33.
- [194] **Nagata S, Zhou X.** Analyses of Factors to Affect the Bioassay System Using Luminescent Bacterium *Vibrio fischeri*. *Journal of Health Science*. **2006**; 52(1): 9-16.
- [195] **Farré MI, Ferrer I, Ginebreda A, Figueras M, Olivella L, Tirapu L et al.** Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *Journal of Chromatography A*. **2001**; 938(1-2): 187-197.
- [196] **Reineke N, Bester K, Hühnerfuss H, Jastorff B, Weigel S.** Bioassay-directed chemical analysis of River Elbe surface water including large volume extractions and high performance fractionation. *Chemosphere*. **2002**; 47: 717 - 723.
- [197] **Hernando MD, Fernández-Alba AR, Tauler R, Barceló D.** Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta*. **2005**; 65: 258 - 366.
- [198] **Parvez S, Venkataraman C, Mukherji S.** A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International*. **2006**; 32(2): 265-268.
- [199] **Macova M, Escher BI, Reungoat J, Carswell S, Chue KL, Keller J et al.** Monitoring the biological activity of micropollutants during advanced wastewater treatment with ozonation and activated carbon filtration. *Water Research*. **2010**; 44(2): 477-492.
- [200] **Farré M, Martínez E, Hernando M-D, Fernández-Alba A, Fritz J, Unruh E et al.** European ring exercise on water toxicity using different bioluminescence inhibition tests based on *Vibrio fischeri*, in support to the implementation of the water framework directive. *Talanta*. **2006**; 69: 323 - 333.
- [201] **Klöppel A, Grasse W, Brümmer F, Morlock G.** HPTLC coupled with bioluminescence and mass spectrometry for bioactivity-based analysis of secondary metabolites in marine sponges. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*. **2008**; 21(6): 431-436.
- [202] **Verbitski SM, Gourdin GT, Ikenouye LM, McChesnex JD, Hildreth J.** Detection of *Actaea racemosa* Adulteration by Thin-Layer Chromatography and Combined Thin-Layer Chromatography-Bioluminescence. *Journal Of AOAC International*. **2008**; 91(2): 268-275.
- [203] **Okusa P, Stévigny C, Devleeschouwer M, Duez P.** Optimization of the culture medium used for direct TLC-bioautography. Application to the detection of antimicrobial compounds from *Cordia gilletii* De Wild (Boraginaceae). *JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*. **2010**; 23(4): 245-249.



- [204] **Baumgartner V, Hohl C, Hauri U.** Bioactivity-based analysis of sunscreens using the luminescent bacteria *Vibrio fischeri*. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*. **2009**; 22(1): 19-23.
- [205] **Baumgartner V, Hohl C, Schwack W.** Screening for Antimicrobials in Mouthwashes Using HPTLC-Bioluminescence Detection. *Chromatographia*. **2013**; 76(19-20): 1315-1325.
- [206] **Weber WH, Seitz W, Aichinger A, Albert R.** Luminographic detection of toxicity with *Vibrio fischeri*. *Camag Bibliography Service*. **2005**; 94: 2-4.
- [207] **Müller A, Weiss SC, Schulz W, Seitz W, Albert R, Ruck WKL et al.** Combination of different liquid chromatography/mass spectrometry technologies for the identification of transformation products of rhodamine B in groundwater. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2010**; 24(5): 659-666.
- [208] **Prasse C, Wagner M, Schulz R, Ternes TA.** Oxidation of the Antiviral Drug Acyclovir and Its Biodegradation Product Carboxy-acyclovir with Ozone: Kinetics and Identification of Oxidation Products. *Environmental Science & Technology*. **2012**; 46(4): 2169-2178.
- [209] **Anonymous.** Merckmillipore. **2015**. [http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/3,4-Dichloroaniline,MDA\\_CHEM-820431](http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/3,4-Dichloroaniline,MDA_CHEM-820431). Accessed 11.06.2015 2015.
- [210] **Anonymous.** Review report for the active substance bromoxynil. Directorate E – Food Safety: plant health ahaw, international questions. *European Commission*. **2004**; SANCO/4347/2000 - final.
- [211] **Ertel KD, Heasley RA, Koegel C, Chakrabarti A, Carstensen JT.** Determination of Ibuprofen Vapor Pressure at Temperatures of Pharmaceutical Interest. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **1990**; 79(6): 552.
- [212] **DIN 18035-7:2014-10**, Sport grounds - Part 7: Synthetic turf areas (in german), (**2014**).
- [213] **Copra I, Roberts M.** Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **2001**; 65(2): 232-260.
- [214] **Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ.** How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature reviews Microbiology*. **2010**; 8(6): 423-435.
- [215] **Peach KC, Bray WM, Winslow D, Linington PF, Linington RG.** Mechanism of action-based classification of antibiotics using high-content bacterial image analysis. *Molecular Biosystems*. **2013**; 9: 1837-1848.
- [216] **Kümmerer K.** Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. *Chemosphere*. **2009**; 75(4): 417-434.
- [217] **Hannappel S, Groeneweg J, Zühlke S.** Antibiotika und Antiparasitika im Grundwasser unter Standorten mit hoher Viehbesatzdichte. Dessau-Roßlau**2014** March 2014 Contract No.: ISSN 1862-4804.
- [218] **Küster A, Lehmann S, Hein A, Schönfeld J.** Antibiotika in der Umwelt – Wirkung mit Nebenwirkung. *UMID: Umwelt und Mensch – Informationsdienst*. **2013**; 1: 18-28.
- [219] **Berridge MV, Herst PM, Tan AS.** Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In: El-Gewely MR, (editor). *Biotechnology Annual Review*. Elsevier; **2005**: p. 127-152.
- [220] **Dimenna GP, Walker BE, Turnbull LB, Wright GJ.** Thin-Layer Bioautographic Assay for Salinomycin in Chicken Liver. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1986**; 34(3): 472 - 474.
- [221] **Soreq H, Seidman S.** Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci*. **2001**; 2(4): 294-302.
- [222] **Quinn DM.** Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*. **1987**; 87(5): 955-979.
- [223] **Mallender WD, Szegletes T, Rosenberry TL.** Acetylthiocholine Binds to Asp74 at the Peripheral Site of Human Acetylcholinesterase as the First Step in the Catalytic Pathway. *Biochemistry*. **2000**; 39(26): 7753-7763.

- [224] **Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL.** Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions.* **2010**; 187(1–3): 10-22.
- [225] **Ripoll DR, Faerman CH, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL.** An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **1993**; 90(11): 5128-5132.
- [226] **Botti SA, Felder CE, Lifson S, Sussman JL, Silman I.** A Modular Treatment of Molecular Traffic Through the Active Site of Cholinesterase. *Biophysical Journal.* **1999**; 77(5): 2430-2450.
- [227] **Sussman J, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L et al.** Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science.* **1991**; 253(5022): 872-879.
- [228] **Silman I, Millard CB, Ordentlich A, Greenblatt HM, Harel M, Barak D et al.** A preliminary comparison of structural models for catalytic intermediates of acetylcholinesterase. *Chemico-Biological Interactions.* **1999**; 119–120(0): 43-52.
- [229] **Rosenberry TL.** Catalysis by acetylcholinesterase: evidence that the rate-limiting step for acylation with certain substrates precedes general acid-base catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **1975**; 72(10): 3834-3838.
- [230] **Muñoz-Ruiz P, Rubio L, García-Palomero E, Dorronsoro I, del Monte-Millán M, Valenzuela R et al.** Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors: New Disease-Modifying Agents for Alzheimer's Disease. *Journal of Medicinal Chemistry.* **2005**; 48(23): 7223-7233.
- [231] **Adewusi EA, Moodley N, Steenkamp V.** Medicinal plants with cholinesterase inhibitory activity: A Review. *African Journal of Biotechnology.* **2010**; 9(49): 8257-8276.
- [232] **Hyde EG, Carmichael WW.** Anatoxin-A(S), a naturally occurring organophosphate, is an irreversible active site-directed inhibitor of acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7). *Journal of Biochemical Toxicology.* **1991**; 6(3): 195-201.
- [233] **Heinrich M, Lee Teoh H.** Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology.* **2004**; 92(2–3): 147-162.
- [234] **Roberts TR, Hutson DH.** Metabolic Pathways of Agrochemicals : Part 2: Insecticides and Fungicides. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; **1999**.
- [235] **Pohanka M.** Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers.* **2011**; 155(3): 219-223.
- [236] **Patočka J, Cabal J, Kuča K, Jun D.** Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics. *Journal of Applied Biomedicine.* **2005**; 3: 91-99.
- [237] **Millard CB, Kryger G, Ordentlich A, Greenblatt HM, Harel M, Raves ML et al.** Crystal Structures of Aged Phosphorylated Acetylcholinesterase: Nerve Agent Reaction Products at the Atomic Level. *Biochemistry.* **1999**; 38(22): 7032-7039.
- [238] **Worek F, Thiermann H, Szinicz L, Eyer P.** Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochemical Pharmacology.* **2004**; 68(11): 2237-2248.
- [239] **Sultatos LG.** Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health.* **1994**; 43(3): 271-289.
- [240] **Bourne Y, Taylor P, Radić Z, Marchot P.** Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. *The EMBO Journal.* **2003**; 22(1): 1-12.
- [241] **Johnson G, Moore SW.** The Peripheral Anionic Site of Acetylcholinesterase: Structure, Functions and Potential Role in Rational Drug Design *Current Pharmaceutical Design.* **2006**; 12(2): 217-225.

- [242] **DIN 38415-1:1995-02**, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) - Teil 1: Bestimmung von Cholinesterase-hemmenden Organophosphat- und Carbamat-Pestiziden (Cholinesterase-Hemmtest) (T 1), (1995).
- [243] **Ellman GL, Courtney KD, Andres jr V, Featherstone RM**. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 1961; 7(2): 88-95.
- [244] **Mulchandani A, Chen W, Mulchandani P, Wang J, Rogers KR**. Biosensors for direct determination of organophosphate pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*. 2001; 16(4-5): 225-230.
- [245] **Schulze H, Vorlová S, Villatte F, Bachmann TT, Schmid RD**. Design of acetylcholinesterases for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*. 2003; 18(2-3): 201-209.
- [246] **Andreescu S, Marty J-L**. Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications. *Biomolecular Engineering*. 2006; 23(1): 1-15.
- [247] **Rhee IK, Appels N, Luijendijk T, Irth H, Verpoorte R**. Determining acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts using a fluorimetric flow assay. *Phytochemical Analysis*. 2003; 14(3): 145-149.
- [248] **Fabel S**. Online-Enzyminhibitionsdetektor für die Wirkungsbezogene Analyse von Toxinen. München: *Technischen Universität München*; 2007.
- [249] **McKinley WP, Read SI**. Esterase Inhibition Technique for the Detection of Organophosphorus Pesticides. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*. 1962; 45: 467-474.
- [250] **McKinley WP, Johal PS**. Esterase Inhibition Technique for Detection of Organophosphorus Pesticides - II. Simplified Version for Routine Checking. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*. 1963; 46: 840-842.
- [251] **Bunyan PJ**. The detection of organo-phosphorus pesticides on thin-layer chromatograms. *Analyst*. 1964; 89(1062): 615-618.
- [252] **Menn JJ, McBain JB, Dennis MJ**. Detection of Naturally Occurring Cholinesterase Inhibitors in Several Crops by Paper Chromatography. *Nature*. 1964; 202(4933): 697-698.
- [253] **Ei-Refai A, Hopkins TL**. Insecticide Metabolism, Thin-Layer Chromatography and Cholinesterase Detection of Several Phosphorothiono Insecticides and Their Oxygen Analogs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1965; 13(5): 477-481.
- [254] **Ortloff R, Franz P**. Zwei neue Methoden der biochemischen Lokalisierung von phosphorhaltigen Insektiziden auf Dünnschicht-chromatogrammen. *Zeitschrift für Chemie*. 1965; 5(10): 388-389.
- [255] **Menn JJ, McBain JB**. Detection of Cholinesterase-inhibiting Insecticide Chemicals and Pharmaceutical Alkaloids on Thin-layer Chromatograms. *Nature*. 1966; 209(5030): 1351-1352.
- [256] **Ackermann H**. Dünnschichtchromatographisch-enzymatischer Nachweis phosphororganischer Insektizide: Aktivierung schwacher Esterasehemmer. *Journal of Chromatography A*. 1968; 36: 309-317.
- [257] **Mendoza CE, Shields JB**. Sensitivity of pig liver esterase in detecting twelve carbamate pesticides on thin-layer chromatograms. *Journal of Chromatography A*. 1970; 50: 92-102.
- [258] **Winterlin W, Walker G, Frank H**. Detection of cholinesterase-inhibiting pesticides following separation on thin-layer chromatograms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1968; 16(5): 808-812.
- [259] **Akkad R, Schwack W**. Multi-enzyme inhibition assay for detection of insecticidal organophosphates and carbamates by high-performance thin-layer chromatography. 1. Basics of method development. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*. 2008; 21(6): 411-415.
- [260] **Weins C**. Möglichkeiten und Grenzen der wirkungsbezogenen Analytik mit der Hochleistungs - Dünnschichtchromatographie [Dissertation]. Basel: *Universität Basel*; 2006.
- [261] **Štefanac Z, Štengl B, Vasilić Ž**. Quantitative determination of organophosphorus pesticides by thin-layer densitometry. *Journal of Chromatography A*. 1976; 124(1): 127-133.

- [262] **Mendoza CE, Wales PJ, McLeod HA, McKinley WP.** Enzymatic detection of ten organophosphorus pesticides and carbaryl on thin-layer chromatograms: an evaluation of indoxyl, substituted indoxyl and 1-naphthyl acetates as substrates of esterases. *Analyst.* **1968**; 93: 34-38.
- [263] **Zoun PEF, Spiereburg TJ.** Determination of cholinesterase-inhibiting pesticides and some of their metabolites in cases of animal poisoning using thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A.* **1989**; 462(0): 448-453.
- [264] **Mroczek T.** Highly efficient, selective and sensitive molecular screening of acetylcholinesterase inhibitors of natural origin by solid-phase extraction-liquid chromatography/electrospray ionisation-octopole-orthogonal acceleration time-of-flight-mass spectrometry and novel thin-layer chromatography-based bioautography. *Journal of Chromatography A.* **2009**; 1216(12): 2519-2528.
- [265] **Guilbault GG, Kramer DN.** Resorufin Butyrate and Indoxyl Acetate as Fluorogenic Substrates for Cholinesterase. *Analytical Chemistry.* **1965**; 37(1): 120-123.
- [266] **Prince AK.** Spectrophotometric study of the acetylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of 1-methyl-acetoxyquinolinium iodides. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **1966**; 113(1): 195-204.
- [267] **Hadd AG, Jacobson SC, Ramsey JM.** Microfluidic Assays of Acetylcholinesterase Inhibitors. *Analytical Chemistry.* **1999**; 71(22): 5206-5212.
- [268] **Hamada M, Wintersteiger R.** Fluorescence screening of organophosphorus pesticides in water by an enzyme inhibition procedure on TLC plates. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC.* **2003**; 16(1): 4-10.
- [269] **Rhee IK, van Rijn RM, Verpoorte R.** Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. *Phytochemical Analysis.* **2003**; 14(3): 127-131.
- [270] **Danzer K, Hobert H, Fischbacher C, Jagemann K-U.** Chemometrik. Berlin, Heidelberg: Springer **2001**.
- [271] **Siebertz K, van Bebber D, Hochkirchen T.** Statistische Versuchsplanung. Berlin, Heidelberg: Springer; **2010**.
- [272] **Antony J.** Design of Experiments for Engineers and Scientists. Second Edition ed. Amsterdam: Elsevier; **2014**.
- [273] **Karadsheh N, Kussie P, Linthicum DS.** Inhibition of acetylcholinesterase by caffeine, anabasine, methyl pyrrolidine and their derivatives. *Toxicology Letters.* **1991**; 55(3): 335-342.
- [274] **Friedberg EC.** DNA damage and repair. *Nature.* **2003**; 421(6921): 436-440.
- [275] **Hanawalt PC, Spivak G.** Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2008**; 9(12): 958-970.
- [276] **Michel B.** After 30 Years of Study, the Bacterial SOS Response Still Surprises Us. *PLoS Biol.* **2005**; 3(7): 1174-1176.
- [277] **Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S.** Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry.* **2004**; 73(1): 39-85.
- [278] **Lavin MF, Gueven N.** The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death and Differentiation.* **2006**; 13(6): 941-950.
- [279] **Ciccio A, Elledge SJ.** The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell.* **2010**; 40(2): 179-204.
- [280] **Grummt T, Rettberg P, Waldmann P, Zipperle J, Hansen P-D.** Adverse Effects in Aquatic Ecosystems: Genotoxicity as a Priority Measurement. In: Barceló D, Hansen P-D, (editors). *Biosensors for Environmental Monitoring of Aquatic Systems. The Handbook of Environmental Chemistry.* Springer Berlin Heidelberg; **2009**: p. 187-201.

- [281] **Jiang H, Gelhaus SL, Mangal D, Harvey RG, Blair IA, Penning TM.** Metabolism of Benzo[a]pyrene in Human Bronchoalveolar H358 Cells Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*. **2007**; 20(9): 1331-1341.
- [282] **Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD.** Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1973**; 70(8): 2281-2285.
- [283] **Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H et al.** Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **2000**; 35: 206-221.
- [284] **Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M et al.** The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. **2008**; 23(3): 143-151.
- [285] **Radman M.** SOS Repair Hypothesis: Phenomenology of an Inducible DNA Repair Which is Accompanied by Mutagenesis. In: Hanawalt P, Setlow R, (editors). *Molecular Mechanisms for Repair of DNA. Basic Life Sciences*: Springer US; **1975**: p. 355-367.
- [286] **Janion C.** Inducible SOS Response System of DNA Repair and Mutagenesis in Escherichia coli *International Journal of Biological Sciences*. **2008**; 4(6): 338-344.
- [287] **Simmons LA, Foti JJ, Cohen SE, Walker GC.** The SOS Regulatory Network. *EcoSal Plus*. **2008**; 2008: 10.1128/ecosalplus.1125.1124.1123.
- [288] **Sutton MD, Smith BT, Godoy VG, Walker GC.** The SOS Response: Recent Insights into umuDC-Dependent Mutagenesis and DNA Damage Tolerance. *Annual Review of Genetics*. **2000**; 34(1): 479-497.
- [289] **Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, Ellenberger T.** DNA Repair and Mutagenesis. Second Edition ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press; **2005**.
- [290] **Biran A, Yagur-Kroll S, Pedahzur R, Buchinger S, Reifferscheid G, Ben-Yoav H et al.** Bacterial genotoxicity bioreporters. *Microbial biotechnology*. **2010**; 3(4): 412-427.
- [291] **Reifferscheid G, Buchinger S.** Cell-Based Genotoxicity Testing - Genetically Modified and Genetically Engineered Bacteria in Environmental Genotoxicology. In: Belkin S, Gu MB, (editors). *Whole Cell Sensing System II. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*: Springer Berlin Heidelberg; **2010**: p. 85-111.
- [292] **Glatt H.** Sulfation and sulfotransferases 4: bioactivation of mutagens via sulfation. *The FASEB Journal*. **1997**; 11(5): 314-321.
- [293] **Liebler DC, Guengerich FP.** Elucidating mechanisms of drug-induced toxicity. *Nat Rev Drug Discov*. **2005**; 4(5): 410-420.
- [294] **Oda Y, Nakamura S-i, Oki I, Kato T, Shinagawa H.** Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. **1985**; 147(5): 219-229.
- [295] **Reifferscheid G, Heil J, Oda Y, Zahn RK.** A microplate version of the SOS/umu-test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. **1991**; 253(3): 215-222.
- [296] **Bjørseth A, Eidsa G, Gether J, Landmark L, Møller M.** Detection of mutagens in complex samples by the Salmonella assay applied directly on thin-layer chromatography plates. *Science*. **1982**; 215(4528): 87-89.
- [297] **Pickl C.** Ökotoxikologische Untersuchungen von Tagebaurestseen in der Niederlausitz [Dissertation]: *Universität Hohenheim*; **1999**.
- [298] **Fomin A, Oehlmann J, Markert B.** Praktikum zur Ökotoxikologie. 1. ed. Landsberg: ecomed Medizin; **2003**.
- [299] **Tarantini A, Maitre A, Lefebvre E, Marques M, Marie C, Ravanat J-L et al.** Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo[a]pyrene as a pure compound and in

- complex mixtures. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **2009**; 671(1-2): 67-75.
- [300] **Morlock G, Schwack W**. Coupling of planar chromatography to mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2010**; 29(10): 1157-1171.
- [301] **Wilson ID**. The state of the art in thin-layer chromatography-mass spectrometry: a critical appraisal. *Journal of Chromatography A*. **1999**; 856(1-2): 429-442.
- [302] **Fuchs B, Schiller J, Süß R, Zscharnack M, Bader A, Müller P et al**. Analysis of stem cell lipids by offline HPTLC-MALDI-TOF MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2008**; 392(5): 849-860.
- [303] **Cody RB, Laramée JA, Durst HD**. Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions. *Analytical Chemistry*. **2005**; 77(8): 2297-2302.
- [304] **Morlock G, Ueda Y**. New coupling of planar chromatography with direct analysis in real time mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2007**; 1143(1-2): 243-251.
- [305] **Kim H, Jee E, Ahn K, Choi H, Jang Y**. Identification of marker compounds in herbal drugs on TLC with DART-MS. *Archives of Pharmacal Research*. **2010**; 33(9): 1355-1359.
- [306] **Häbe TT, Morlock GE**. Quantitative surface scanning by Direct Analysis in Real Time mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2015**; 29(6): 474-484.
- [307] **Luftmann H**. A simple device for the extraction of TLC spots: direct coupling with an electrospray mass spectrometer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2004**; 378(4): 964-968.
- [308] **Gössi A, Gaugler S, Scherer U, Schlotterbeck G, Wyss S, Büttler A et al**. Rapid structure confirmation and quantitation by HPTLC-NMR. *Camag Bibliography Service*. **2013**; 110: 2-4.
- [309] **Weber WH, Seitz W, Schulz W, Wagener H-A**. Nachweis der Metaboliten Desphenyl-chloridazon und Methyl-desphenyl-chloridazon in Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser. *Vom Wasser*. **2007**; 105(1): 7-14.
- [310] **Jautz U, Morlock G**. Efficacy of planar chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry for employment in trace analysis. *Journal of Chromatography A*. **2006**; 1128(1-2): 244-250.
- [311] **Aranda M, Morlock G**. New method for caffeine quantification by planar chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry using stable isotope dilution analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2007**; 21(7): 1297-1303.
- [312] **Luftmann H, Aranda M, Morlock GE**. Automated interface for hyphenation of planar chromatography with mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2007**; 21(23): 3772-3776.
- [313] **Jork H, Funk W, Fischer W, Wimmer H**. Volume 1a: Physical and Chemical Detection Methods: Fundamentals, Reagents I. *Thin-Layer Chromatography - Reagents and Detection Methods*. Weinheim: VCH; **1990**.
- [314] **Jork H, Funk W, Fischer W, Wimmer H**. Volume 1b: Physical and Chemical Detection Methods: Activation Reactions, Reagent Sequences, Reagents II. *Thin-Layer Chromatography - Reagents and Detection Methods*. Weinheim: VCH; **1994**.
- [315] Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography. Merck AG. **2007**. [http://www.clubdeccm.com/PDF/Dyeing\\_Reagents\\_TLC.pdf](http://www.clubdeccm.com/PDF/Dyeing_Reagents_TLC.pdf). Accessed 30.06.2009 2009.
- [316] **Spangenberg B, Poole CF, Weins C**. Quantitative Thin-Layer Chromatography: A Practical Survey. 1 ed. Springer Berlin Heidelberg; **2011**.
- [317] **Bratton AC, Marshall EK**. A new coupling component for sulfanilamide determination. *Journal of Biological Chemistry*. **1939**; 128(2): 537-550.
- [318] **Kinast A**. Determination of Amitrol in water by AMD. *Camag Bibliography Service*. **2006**; 96: 2-5.
- [319] **Rahn C, Schlenk H**. Detection of aldehydes with 4-amino-5-hydrazino-1,2,4-triazole-3-thiol as spray reagent. *Lipids*. **1973**; 8(11): 612-616.

- [320] **Jacobsen NW, Dickinson RG.** Spectrometric assay of aldehydes as 6-mercapto-3-substituted-s-triazolo(4,3-b)-tetrazines. *Analytical Chemistry*. **1974**; 46(2): 298-299.
- [321] **Müller A, Weiss SC, Beißwenger J, Leukhardt HG, Schulz W, Seitz W et al.** Identification of ozonation by-products of 4- and 5-methyl-1H-benzotriazole during the treatment of surface water to drinking water. *Water Research*. **2012**; 46(3): 679-690.
- [322] **Liu DQ, Hop CECA, Beconi MG, Mao A, Chiu S-HL.** Use of on-line hydrogen/deuterium exchange to facilitate metabolite identification. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2001**; 15(19): 1832-1839.
- [323] **Wolff J-C, Laures A, M. F.** "On-the-fly" hydrogen/deuterium exchange liquid chromatography/mass spectrometry using a dual-sprayer atmospheric pressure ionisation source. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2006**; 20(24): 3769-3779.
- [324] **Chemistry RSo.** ChemSpider. **2012**. [www.chemspider.com](http://www.chemspider.com). Accessed 11.04.2012.
- [325] **de Hoogh CJ, Wagenvoort AJ, Jonker F, van Leerdam JA, Hogenboom AC.** HPLC-DAD and Q-TOF MS Techniques Identify Cause of Daphnia Biomonitor Alarms in the River Meuse. *Environmental Science & Technology*. **2006**; 40(8): 2678-2685.
- [326] **Bretau S, Toutant JP, Saglio P.** Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **2000**; 47(2): 117-124.
- [327] **Ahmed M, Latif N, Khan RA, Ahmad A.** Toxicological Effect of Herbicides (Diuron and Bentazon) on Snake Venom and Electric Eel Acetylcholinesterase. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **2012**; 89(2): 229-233.
- [328] **Broszat M, Ernst H, Spangenberg B.** Quantification of triazine herbicides using chloroplasts in conjunction with thin-layer chromatography. *Environmental Biotechnology*. **2011**; 7(2): 47-52.