

**Möglichkeiten und Grenzen
der wirkungsbezogenen Analytik mit der
Hochleistungs - Dünnschichtchromatographie**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Christel Weins

aus Saarbrücken (Deutschland)

Basel 2006

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag von

Prof. Dr. Michael Oehme

Prof. Dr. Fritz Frimmel

Basel, den 2. Mai 2006

Prof. Dr. Hans-Jakob Wirz

Danksagung:

Ich danke Prof. Dr. Hellmut Jork†, ehemaliger Professor an der Universität des Saarlandes, für die Einführung in die Dünnschichtchromatographie, die Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit und die Überlassung seiner gesamten Literatur auf dem Gebiet der biochemischen und biologischen Testverfahren über fünf Jahrzehnte sowie für die Möglichkeit an seinem Institut meine Forschung auf diesem Gebiet zu beginnen.

Im Landesamt für Umweltschutz in Saarbrücken gilt mein Dank Dr. Kirn, der das Vertrauen in die Aussagekraft der wirkungsbezogenen Analytik auf dem Dünnschichtchromatogramm mit Interesse teilte.

Mein Dank gilt auch den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Desaga (Heidelberg) und Camag (MuttENZ und Berlin), die reges Interesse an dieser Arbeit genommen haben und den Impuls der wirkungsbezogenen Analytik aufgenommen und in die Praxis weitergetragen haben. Stellvertretend möchte ich hier vor allem Herrn Dr. Emil Hauck und Herrn Dr. Eike Reich danken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich geworden wäre.

Für die Möglichkeit nach dem Tod von Prof. Jork meine Doktorarbeit abzuschließen gilt ein besonderer Dank Prof. Dr. Dr. habil. Fritz H. Frimmel (Universität Karlsruhe) und Prof. Dr. Michael Oehme (Universität Basel). Prof. Dr. Oehme begleitete die Fertigstellung dieser Arbeit mit Geduld und zahlreichen Anregungen, so dass die Arbeit schließlich mit Erfolg abgeschlossen werden konnte.

Nicht zuletzt gilt mein innigster Dank meinem Mann, Dr. Detlef Weins, der mich immer wieder dazu anhielt weiterzumachen und mir die Zeit zur Fertigstellung ließ, sowie unseren drei Söhnen Felix, Clemens und Christian, die auf ihre Mutter so manche Stunde verzichten mussten.

Publikationsliste

Diese Doktorarbeit basiert auf den folgenden vier Publikationen, auf die nach den römischen Zahlen I bis IV im Text verwiesen wird.

- I. Toxicological Evaluation of Harmful Substances by in situ Enzymatic and Biological Detection in High Performance Thin - Layer Chromatography
Ch. Weins and H. Jork, Journal of Chromatography A, 750 (1996), 403-407
- II. Detection of bioeffective environmental compounds by high-performance thin layer chromatography
Ch. Weins in - Bioresponse - linked - instrumental analysis -, Prof. Dr. Berthold Hock (editor) BG Teubner Verlag Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden, 39 - 56 (2001)
- III. Risk analysis - Risk assessment, Aspects of a rational environmental and food management. Detection of bio-effective environmental compounds by bio-activity based analysis in HPTLC,
C. Weins, A. Schmitt, R. Kirn, in: Sz. Nyiredy, A. Kakuk (editors) Planar Chromatography 2001, pp 55-66, 2001
- IV. A New Bioautographic Screening Method for Detection of Estrogenic Compounds,
M. B. Mueller, C. Dausend, C. Weins, and F. H. Frimmel Chromatographia, 60, pp 207- 211, 2004

INHALTSANGABE

| | |
|---|----|
| Zusammenfassung | 1 |
| 1 Einleitung | 3 |
| 1.1 Die Rolle der Dünnschichtchromatographie in der Schadstoffanalytik | 3 |
| 1.1.1 Der Einsatz der Dünnschichtchromatographie in der Lebensmittel- und Umweltanalytik..... | 4 |
| 1.1.2 Technischer Stand der instrumentellen Dünnschichtchromatographie | 5 |
| 1.1.2.1 stationäre Phasen..... | 5 |
| 1.1.2.2 Entwicklungsverfahren der Chromatogramme | 8 |
| 1.1.3.3 Physikalische Detektionsverfahren in der Dünnschichtchromatographie | 11 |
| 1.2 Physiologische und biochemische Detektionsverfahren..... | 13 |
| 1.2.1 organismische Testverfahren in situ..... | 13 |
| 1.2.2 suborganismische Testverfahren in situ..... | 15 |
| 1.2.2.1 Photosynthesehemmung mit Chloroplastensuspension..... | 15 |
| 1.2.2.2 Detektion von Antigenen mit Antikörpern in situ..... | 16 |
| 1.2.2.3 Enzymteste auf der Dünnschichtplatte..... | 16 |
| 1.3 Bewertung und Nachweis von Schadstoffmetaboliten mit der Dünnschichtchromatographie..... | 20 |
| 1.3.1 Anwendungsgebiete der wirkungsbezogenen Analytik in der Dünnschichtchromatographie...21 | |
| 1.3.1.1 Risikobewertung von Chemikalien und Wirkstoffen | 21 |
| 1.3.1.2 Risikoanalytik im Umweltbereich..... | 23 |
| 1.3.1.2 Risikoanalytik von Lebensmitteln..... | 23 |
| 2 Ziel der Arbeit | 25 |
| 3 Allgemeine Diskussion | 27 |
| 3.1 Quantitative Bestimmung von Enzyminhibitoren auf der HPTLC-Platte..... | 27 |
| 3.1.1 Quantitative Bestimmung von Enzyminhibitoren auf der HPTLC-Platte..... | 27 |
| 3.1.2 Der Cholinesterasehemmtest als Detektionsverfahren in der Dünnschichtchromatographie | 29 |
| 3.1.3 Quantifizierung von biochemisch detektierten Schadstoffen auf dem Chromatogramm | 31 |
| 3.1.3.1 Optimierung enzymatischer Detektionsverfahren auf der stationären Phasen..... | 32 |
| 3.1.3.2 Quantifizierung und Bestimmung der Nachweisgrenze von Cholinesterase-Inhibitoren..... | 38 |
| 3.1.4 Validierung des Cholinesterasehemmtestes..... | 45 |
| 3.1.5 Reinheitskontrolle von Standardsubstanzen mit dem Cholinesterasehemmtest..... | 48 |
| 3.1.5.1 Parathion..... | 49 |
| 3.1.5.2 Carbamate- Insektizide | 51 |
| 3.1.6 Vorteile der wirkungsbezogenen Analytik bei der Chemikalienüberprüfung..... | 54 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.2 | Toxikologische Schadstoffbestimmungen mit zellulären Detektionsverfahren | 57 |
| 3.2.1 | Optimierung der biologischen Detektionsverfahren auf der stationären Phase | 59 |
| 3.2.1.1 | Detektion bakterientoxischer Substanzen mit <i>Bazillus subtilis</i> | 60 |
| 3.2.1.2 | Detektion fungizider Substanzen mit Hefe bzw. Penicilliumstämmen..... | 62 |
| 3.2.1.3 | Hemmung der Biolumineszenz von <i>Photobakterium phosphoreum</i> | 66 |
| 3.2.1.4 | Bestimmung von östrogenen Verbindungen mit transgenen Hefen auf der HPTLC-Platte..... | 68 |
| 3.3 | Einsatz der wirkungsbezogenen Analytik bei Umwelt- und Lebensmittelproben..... | 74 |
| 3.3.1 | Bestimmung bakterientoxischer Wirkung in Gewässerproben..... | 74 |
| 3.3.2 | Nachweis fungizider bzw. antimykotischer Wirkstoffe in Gewässerproben..... | 79 |
| 3.3.3 | Charakterisierung von Biolumineszenz-Inhibitoren in Ultrafiltraten von Gewässerproben.... | 84 |
| 3.3.4 | Nachweis von Cholinesterasehemmstoffen im Flussprofil der Alb..... | 86 |
| 3.3.5 | Bestimmung von toxisch relevanten Rückständen in Lebensmitteln..... | 89 |
| 3.3.6 | Möglichkeiten der wirkungsbezogenen Analytik im Umwelt- und Lebensmittelbereich..... | 93 |
| 3.4 | Einsatz der wirkungsbezogenen Analytik in der Metabolismusforschung organischer Verbindungen.. | 95 |
| 3.4.1 | Photochemischer Abbau von Organochlorverbindungen auf der HPTLC-Platte..... | 95 |
| 4 | Schlussfolgerungen und Ausblick..... | 106 |
| | Referenzen..... | 111 |

| | |
|----------------------|--|
| Veröffentlichung I | Toxicological Evaluation of Harmful Substances by in situ Enzymatic and Biological Detection in High Performance Thin - Layer Chromatography |
| Veröffentlichung II | Detection of bioeffective environmental compounds by high-performance thin layer chromatography |
| Veröffentlichung III | Risk analysis - Risk assessment, Aspects of a rational environmental and food management, Detection of bio-effective environmental compounds by bio-activity based analysis in HPTLC |
| Veröffentlichung IV | A New Bioautographic Screening Method for Detection of Estrogenic Compounds |

Abkürzungen

| | |
|---------------|--|
| AMD | Automated Multiple Development (deutsch: automatische Mehrfachentwicklung) |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BChe/H | Butyrylcholinesterase aus Pferdeserum |
| BSA | Rinderserumalbumin (engl. Bovine serum albumine) |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DIN | Deutsches Institut für Normung |
| FAB MS | Fast-Atom-Bombardement Mass Spectrometry |
| FTIR | Fourier - Transformation Infrarot (FTIR) Spektrometer |
| GC | Gaschromatographie |
| GDCH | Gesellschaft Deutscher Chemiker |
| GLP | Übereinkünfte für Gute Laborpraxis |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography deutsch: Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie |
| HPPLC | High Pressure Planar Liquid Chromatography |
| HPTLC | High Performance Thin - Layer Chromatography deutsch: Hochleistungs- Dünnschichtchromatographie |
| KG 60 | Kieselgel 60 |
| MALDI | Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation |
| MUG | 4-Methylumbelliferyl β -D-Galaktopyranosid |
| 4MU | 4-Methylumbelliferon |
| OPLC | Over Pressure Layer Chromatography |
| PAK | polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe |
| PCP | Pentachlorphenol |
| PSM | Pflanzenschutzmittel |
| RP | Reversed Phase (deutsch Umkehrphase) |
| RPC | Rotational Planar Chromatography |
| SIMS | Secondary Ion Mass Spektrometer |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TLC | Thin Layer Chromatography – Dünnschichtchromatographie |
| UTLC | Ultra Thin Layer Chromatography |

Zusammenfassung

Die Dünnschichtchromatographie gehört zu den robustesten chromatographischen Verfahren, das seit über 40 Jahren zuverlässige Ergebnisse in der Analytik von Stoffen liefert. In der Dünnschichtchromatographie lassen sich die getrennten Komponenten direkt auf dem Chromatogramm physikalisch-chemisch detektieren und quantifizieren. Durch die Kopplung von biochemischen (z.B. enzymatischen Hemmtesten) oder biologischen Testverfahren ist es möglich, toxikologisch wirksame Substanzen in situ nachzuweisen.

Diese sogenannte wirkungsbezogene Analytik mit der Hochleistungs – Dünnschichtchromatographie stellt ein Verfahren dar, mit der angezeigte Schadwirkungen schnell und selektiv bestimmten chemischen Substanzen oder Substanzgruppen zugeordnet werden können. Biochemische und biologische Detektionsverfahren auf dem Dünnschichtchromatogramm sind sehr selektiv und sensitiv und schließen damit die Lücke zwischen biologischen in vitro-Testverfahren und instrumenteller Analytik.

Definierte Bedingungen für den Cholinesterasehemmtest auf dem Chromatogramm ergeben reproduzierbare Ergebnisse bei der Bestimmung von Nachweisgrenzen bei ausgewählten Inhibitoren.

Biologische Testsysteme auf dem Chromatogramm erlauben die Detektion von Fungiziden, Antibiotika, Lumineszenzhemmstoffen auf der Dünnschichtplatte; ein neues molekularbiologisches Testverfahren ermöglicht die Detektion von Hormonen qualitativ und quantitativ.

Biochemische und biologische Detektionsverfahren können Wirkstoffe in Umwelt- und Lebensmittelproben sowie bei der Reinheitskontrolle und in der Metabolismusforschung von Chemikalien nachweisen. Ergänzend können die detektierten Wirkstoffe durch ihre Migrationsstrecke und ihr UV-Spektrum charakterisiert werden.

Die Grenzen der wirkungsbezogenen Analytik mit der HPTLC liegen in der Auswahl stationärer Phasen und dem fehlenden Bezug der biologischen Testverfahren zur Humantoxikologie. (Dennoch können toxikologische Aussagen in höheren Organismen gemacht werden durch Übertragungen der Wirkstoffe in einen in vivo Testorganismus).

Ein Konzept zur Risikoanalyse und Risikobewertung, bei der die wirkungsbezogene Analytik als Bindeglied zwischen Biotests und chemisch/physikalischen Analytik- und Identifizierungsverfahren fungiert, wird vorgestellt.

1. Einleitung

1.1 Die Rolle der Dünnschichtchromatographie in der Schadstoffanalytik

Als die Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln in den fünfziger Jahren an Bedeutung gewann, standen den Analytikern lediglich die Spektralphotometrie und die Papierchromatographie als Analysemethoden zur Verfügung (Müller et al. 1957). Mit der Papierchromatographie wurde es möglich, mehrere Substanzen, die als Gemisch vorlagen, auf einfache Art zu trennen und anschließend zu identifizieren. Die Methode wurde bald durch die Dünnschichtchromatographie (DC, engl. TLC¹) verdrängt, die gegenüber den herkömmlichen Verfahren zahlreiche Vorteile besaß, wie z.B. eine schnellere Auftrennung, eine bessere Nachweisempfindlichkeit und eine größere Variabilität bei den Trennsystemen. Der Einsatz der Dünnschichtchromatographie machte es möglich, eine Vielzahl von Pflanzenbehandlungsmitteln zu trennen und mit verschiedenen Reagenzien nachzuweisen und zu identifizieren (Walker und Beroza 1963).

Die stürmische Entwicklung der instrumentellen Analytik im Verlauf der sechziger Jahre hatte zur Folge, dass die Gaschromatographie (GC) mit ihren selektiven Detektoren zum gängigen Verfahren in der Rückstandsanalytik wurde. Später kam die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) hinzu, die besonders für die Bestimmung thermisch instabiler und nicht verdampfbarer Stoffe eingesetzt wird. In der Dünnschichtchromatographie erfolgte parallel der Übergang zu kleineren Sorptionsmittelteilchen, so dass 1975 erstmalig unter der Bezeichnung der sog. High Performance Thin Layer Chromatographie (HPTLC) eine neue Hochleistungsschicht vorgestellt werden konnte.

Bis heute hat die Dünnschichtchromatographie ihren Platz neben anderen chromatographischen Methoden behaupten können. Dies ist auf den Umstand zurückzuführen, dass diese Methode einerseits durch ihre einfache Handhabung sehr schnell zu Ergebnissen führen kann, andererseits aber auch durch eine zunehmende Instrumentalisierung einen hohen Probendurchsatz in kurzer Zeit erlaubt. Zahlreiche modifizierte stationäre Phasen und selektive Detektionsverfahren erlauben Analyseergebnisse für die unterschiedlichsten analytischen Fragestellungen.

¹ Thin-Layer Chromatography = TLC

1.1.1 Der Einsatz der Dünnschichtchromatographie in der Lebensmittel- und Umweltanalytik

Die Dünnschichtchromatographie ist eine leistungsfähige, schnelle und preiswerte Analysenmethode. Sie hat sich in der Arzneimittel-, Lebensmittel- und Umweltanalytik bewährt. Gerade in der Lebensmittelanalytik mit ihrer stofflichen Vielfalt und einer Menge unterschiedlichster Matrices erweist sich die Dünnschichtchromatographie und insbesondere die instrumentelle Dünnschichtchromatographie bis heute als eine geeignete Methode, diese Vielfalt an analytischen Fragestellungen zu beantworten. Die Methode wird insbesondere dann bevorzugt eingesetzt, wenn große Probenmengen in kurzer Zeit aufgearbeitet werden müssen. Auch fungiert die HPTLC als Bestätigungsmethode für die Gaschromatographie, bei der ein computergesteuertes Densitometer die direkte quantitative Bestimmung der Schadstoffe auf dem Chromatogramm erlaubt (Gardyan und Thier 1991). Gerade bei der Bestimmung von polaren Pestiziden in der Rückstandsanalytik stellt die HPTLC Analytik eine geeignete Referenzmethode für die Absicherung von Analyseergebnissen dar (Mouratidis und Thier 1995).

Technische Fortschritte und Applikationen in der TLC und HPTLC in Bezug auf Trennleistungen, qualitative und quantitative Bestimmungen von Pestiziden bzw. anderer Agrochemikalien werden ausführlich in einem Übersichtsartikel von Sherma (2005) beschrieben, der die publizierten Verfahren über einen Zeitraum von 1996-2004 zusammenfasst. Hauptschwerpunkte liegen bei der Analytik von Fungiziden und Insektiziden.

Gerade bei der Analytik von Substanzen in komplexen Matrices erweist sich die Dünnschichtchromatographie als ein geeignetes Verfahren, wie z.B. bei der Bestimmung von Pestiziden oder polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) aus Bodenproben oder von Explosivstoffen in Rüstungsaltslasten.

Galt die Dünnschichtchromatographie in der Umweltanalytik in den letzten Jahren neben der HPLC und GC als "nur"-Screeningmethode, bewährt sich die HPTLC zunehmend in der Spurenanalytik. In der Trinkwasseranalytik liegt bereits ein dünnschichtchromatographisches Normverfahren zur Bestimmung von Pflanzenbehandlungsmitteln im Trinkwasser im Hinblick auf den geforderten Grenzwert der Trinkwasserverordnung vor. Weiterhin wurde von einem Arbeitsaus-

schuss (UA 5 AK 1) im Rahmen des Hauptausschusses I der Fachgruppe Wasserchemie in der GDCH im Auftrag des Normenausschusses Wasserwesen im DIN 1999 ein Normenentwurf über die dünnschichtchromatographische Bestimmung von PAK im Trinkwasser (DIN 38407 Teil 7) ausgearbeitet und verabschiedet.

Die Bestimmung organischer Pflanzenbehandlungsmittel aus Trinkwasser mit der AMD²-Technik nach DIN 38407, Teil 11, beschreibt ein dünnschichtchromatographisches mehrstufiges Verfahren nach einer Anreicherung der Schadstoffe durch eine Festphasenextraktion (siehe 1.1.2.2). Besonders vorteilhaft ist bei der Dünnschichtchromatographie die Möglichkeit der Parallelentwicklung von bis zu dreißig Standardsubstanzen und Proben.

Durch die Entwicklung der Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie am Anfang der siebziger Jahre wurde die Reproduzierbarkeit wesentlich verbessert, so dass heute ein preisgünstiges und reproduzierbares chromatographisches System zur Verfügung steht.

1.1.2 Technischer Stand der instrumentellen Dünnschichtchromatographie

Wie in anderen Bereichen der instrumentellen Analytik ist auch in der Dünnschichtchromatographie eine fortschreitende Automatisierung zu verzeichnen. Auf den Gebieten der Auftragungstechniken, Chromatographieentwicklung und Detektion ist eine zunehmende Miniaturisierung der Methode bis hin zur Weiterentwicklung der Dünnschichtchromatographie auf ultradünnen Platten zu beobachten (UTLC) (Hauck et al. 2001).

1.1.2.1 stationäre Phasen

Der Fortschritt der modernen Dünnschichtchromatographie ist eng verknüpft mit der Entwicklung geeigneter stationärer Phasen. Tabelle 1 zeigt einen historischen Überblick der wichtigsten stationären Phasen in der Dünnschichtchromatographie.

² AMD – Automated Multiple Development

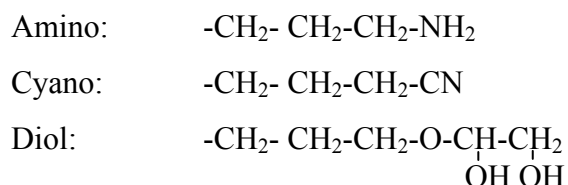
Tab. 1: Höhepunkte der Entwicklung wichtiger stationärer Phasen in der Dünnschichtchromatographie (Hauck et al. 2001)

| Jahr | Stationäre Phasen in der Dünnschichtchromatographie |
|-------------|---|
| 1938 | Al ₂ O ₃ Schichten von (Izmailov und Shraiber 1938) |
| 1951 | Kieselgelschichten mit Calcium Sulfat (Kirchner et al. 1951) |
| 1958 | Standardisierte Kieselgele (Stahl 1958) |
| 1966 | TLC - Fertigplatten |
| 1975 | HPTLC Fertigplatten |
| 1978 | Oberflächenmodifizierte Kieselgele für die TLC und HPTLC |
| 1995 | Sphärische Sorbentien für die HPTLC |
| 2001 | Ultradünne Kieselgelschichten für die UPTLC |

Kieselgel ist das meistbenutzte Sorbens in der DC. Der Übergang von der Normalphasenchromatographie an polaren stationären Phasen zur Umkehrphasenchromatographie (engl. **Reversed-Phase-Chromatography**, RPC) wurde durch die Einführung hydrophob modifizierter, unpolarer Phasen möglich. Ausgangsmaterial für die Herstellung dieser hydrophoben Schichten ist standardisiertes Kieselgel (KG 60). Durch Silylierung werden Alkylsilane kovalent an die Silanolgruppen des Kieselgels gebunden. Als Alkylsubstituenten kommen in den meisten Fällen Octadecylgruppen (RP 18) zur Anwendung. Aus sterischen Gründen liegt der maximal erreichbare Umsetzungsgrad vom verwendeten Silan ab. Die verbleibenden Rest-Silanolgruppen (sog. Silanol-Effekt) sind für Probenmoleküle zugänglich und beeinflussen neben der Selektivität und der chromatographischen Retention auch die Wasserbenetzbarkeit der Schicht. Bei Verwendung polarer Lösemittelgemische mit unterschiedlichem Wassergehalt ist die Wasserbenetzbarkeit der hoch umgesetzten, hydrophoben Phasen gering. Dies hat den Effekt, dass die Kapillarkräfte der Schicht nicht mehr ausreichen, um die hydrophoben Abstoßungskräfte zu kompensieren und ein Aufsteigen der mobilen Phase zu bewirken. Um diese Limitierung aufzuheben, wurden RP-18 Phasen mit niedrigem Umsatzgrad entwickelt, die bis zu 100 % benetzbar sind, weil die nicht umgesetzten Silanolgruppen die Rest-hydrophilie bewirken (HPTLC RP-18w).

Um die Selektivitätslücke zwischen den polaren Kieselgel-Phasen und den unpolaren RP-Phasen zu schließen, wurden 1978 mittelpolare, hydrophil modifizierte Schichten für die Dünnschichtchromatographie entwickelt. Hierzu zählen Amino-, Cyano- und Diol-Phasen. Eine Besonderheit dieser mittelpolaren stationären Phasen ist die Möglichkeit, sie erfolgreich sowohl in der Normal-

phasen- als auch in der Umkehrphasen-Chromatographie einsetzen zu können. Die mittelpolaren Sorbentien haben folgende Strukturen:



Als funktionelle Gruppe ist bei der **Amino-Phase** ein γ -Propylaminrest kovalent an die Kieselgelmatrix gebunden. Bedingt durch den basischen Charakter der primären Amin-Funktion ($\text{pK}_A = 9,5 - 11$, H_2O) treten schwach basische Ionenaustauschereigenschaften auf.

Als funktionelle Gruppe ist bei den **Cyano-Phasen** eine γ -Cyanopropylgruppe an das Kieselgel gebunden. Im Gegensatz zur Amino-Phase zeigt die Cyano-Phase in wässrigen Fließmitteln eine neutrale Reaktion. Es besteht bei der Cyano-Phase keine Einschränkung in der Wahl des Fließmittels. Somit kann diese Phase sowohl als Normalphase als auch Umkehrphase eingesetzt werden.

Die jüngste Entwicklung auf dem Gebiet der mittelpolaren Schichten stellt die **Diol-Phase** dar. Über einen sogenannten Spacer wird die Diol-Gruppe an das Kieselgelgerüst gebunden. Mit ihren oberflächenständigen $\text{R}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{OH}$ -Gruppen ist sie mit nicht modifiziertem Kieselgel vergleichbar. Beim Kieselgel sind es die Silanolgruppen und bei der Diol-Phase die alkoholischen OH-Gruppen, die als aktive Zentren die Retention der zu trennenden Stoffe beeinflussen. Allerdings ist die Polarität der Diol-Oberfläche weniger stark ausgeprägt. Dies erklärt, warum die Diol-Phase im Vergleich zu Kieselgel eine geringere Neigung hat, Wassermoleküle aus der sie umgebenden Atmosphäre aufzunehmen und sich dadurch in ihren Sorptionseigenschaften zu verändern. In wässrigen Fließmitteln weist die Diol-Phase einen sauren pH auf.

Zur Detektion farbloser, UV-absorbierender Substanzen werden den Sorbentien und Fertigschichten häufig bis zu 2% Fluoreszenz- oder Phosphoreszenzindikatoren zugesetzt. Es handelt sich hierbei um Substanzen, die bei Bestrahlung mit UV-Licht längerwelliges Fluoreszenz- oder Phosphoreszenzlicht emittieren. Absorbiert eine Probensubstanz auf dem Sorbens ebenfalls UV-Licht, so wird der Indikator an dieser Stelle schwächer oder gar nicht angeregt. Es resultieren dunkle Substanzzonen auf einem fluoreszierenden Untergrund. Als anorganische Phosphoreszenzindikatoren sind die bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ anregbaren, gelb-grün emittierenden, mit Mangan aktivierten Zinksilikate

oder die säurestabilen, blau phosphoreszierenden Erdalkaliwolframate (F_{254S}) im Einsatz.

1.1.2.2 Entwicklungsverfahren der Chromatogramme

Aus der manuellen Auftragung mittels Kapillaren entwickelte sich ein hochtechnisiertes, mikroprozeßgesteuertes Verfahren. Mit einem computergesteuerten Autosampler können unterschiedliche Proben sequentiell mit einer Spritze aufgesprüht werden. Dennoch hängen zahlreiche Probleme der Dünnschichtchromatographie mit der kapillaren Fließmittelbewegung der mobilen Phase zusammen:

- mit zunehmender Laufhöhe des Fließmittels vermindert sich die Wanderungsgeschwindigkeit und somit die Trennschärfe zweier Komponenten auf der stationären Phase,
- zahlreiche Fließmittel und –kombinationen scheiden wegen zu hoher Viskosität als mobile Phase aus (z.B. wasserhaltige Fließmittelgemische bei hydrophoberen Schichten).

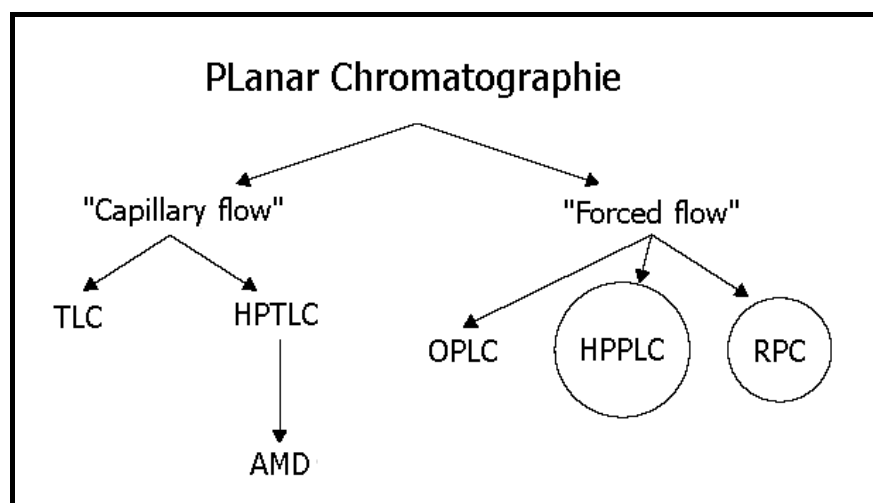


Abb. 1: Entwicklung der Techniken in der Planar-Chromatographie: TLC (Thin Layer Chromatography), HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography), AMD (Automated Multiple Development), OPLC (Over Pressure Layer Chromatography), HPPLC (High Pressure Planar Liquid Chromatography, RPC (Rotational Planar Chromatography) (Vaccari 2003)

Diese Nachteile lassen sich umgehen, wenn die Entwicklung der Chromatogramme durch Überdruck mit konstanter Geschwindigkeit der mobilen Phase erfolgt, mit der sog. *forced flow* – Technik (Mincsovic et al. 1988). Der Überdruck kann erzeugt werden entweder mit Hilfe einer Förderpumpe (OPLC) oder durch den Einsatz der Zentrifugalkraft (RPC) (Frey 1993). Kaiser und Rieder

entwickelten 1987 die Zirkularversion der OPLC weiter zur High Pressure Planar Liquid Chromatography (HPPLC), wobei der größte Gewinn der „*forced flow*“-Techniken in dem konstanten Fluss der mobilen Phase in der planaren stationären Phase besteht (Nyiredy 2003).

Prinzip der AMD-Technik

Die traditionell in der Dünnschichtchromatographie verwendete Trogkammer erhielt Konkurrenz durch die Herstellung automatischer Entwicklungskammern und das AMD – Gerät (Automated Multiple Development) (Burger 1984), in denen automatische Entwicklungen und Trocknungen möglich sind. Weiterhin kann in der AMD – Kammer eine Gradientenentwicklung unter verschiedenen Bedingungen in der Dünnschichtchromatographie durchgeführt werden.

Die Trennung der einzelnen Komponenten erfolgt bei diesem universellen Verfahren durch eine Stufen- und Mehrfachentwicklung mit Normalphasenchromatographie, wobei die Elutionskraft der mobilen Phase polar beginnt und unpolar endet. Somit können Komponenten mit unterschiedlicher Polarität voneinander getrennt werden.

Die AMD ist die einzige Methode, mit der eine reproduzierbare Gradientenelution an Kieselgel (Normalphase) möglich ist. Das Prinzip der AMD ist in Abbildung 2 dargestellt. Die AMD ist eine vollautomatisierte Entwicklungsmethode, bei der die Entwicklung in 10 bis 30 Teilschritten abläuft. Dabei ist die Laufstrecke jedes Teilschrittes um ein konstantes Inkrement länger als die des vorhergehenden Teilschrittes (siehe Abbildung 2). Die Inkrementlänge liegt dabei zwischen einem und drei Millimetern.

Die Entwicklung beginnt mit einem Trocknungsschritt, dabei wird in der Entwicklungskammer ein Vakuum angelegt. Dadurch werden Reste des Lösemittels der aufgetragenen Substanzen von der stationären Phase entfernt. Anschließend wird die Kammer mit sauberer, inerter Atmosphäre, in der Regel Stickstoffgas, gefüllt. Dann wird das Fließmittel in die Kammer gefüllt und der erste Entwicklungsteilschritt beginnt. Nachdem die vorgesehene Entwicklungsstrecke erreicht ist, wird das Fließmittel durch Absaugen entfernt und die Platte erneut getrocknet. Danach wird die Kammer wieder begast, mit Fließmittel gefüllt und bis zur im nächsten Teilschritt vorgesehenen Entwicklungsstrecke entwickelt. Dies wird so lange fortgesetzt, bis das gesamte Entwicklungsprogramm durchlaufen ist.

Der erste Entwicklungsschritt beträgt nur wenige Millimeter. Neben der Verwendung von HPTLC-Platten ist besonders der Fokussierungseffekt für die außerordentliche Trennschärfe der AMD-Technik verantwortlich. Dieser Fokussierungseffekt erlaubt auch die Auftragung großer Probenmengen, da die anfangs breite Startbande nach wenigen Entwicklungsschritten wieder zu einem schmalen Band fokussiert wird.

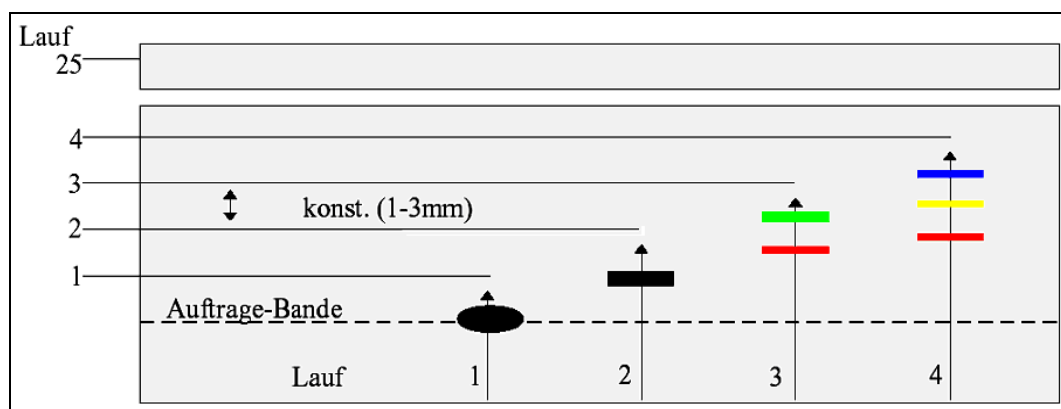


Abb. 2: Prinzip der AMD-Entwicklung (nach Burger 1984, Wippo 2003)

Dieses Trennverfahren eignet sich besonders für Stoffgemische aus genuine Wirkstoffen und ihren entsprechenden Metaboliten. In einem Chromatogramm können z.B. 10 Proben mit unbekanntem Schadstoffgehalt gleichzeitig mit 10 Testgemischen, die jeweils 8-10 Einzelsubstanzen enthalten, (d.h. mit insgesamt 80-100 Referenzsubstanzen) parallel untersucht werden (Butz und Stan 1995).

Die Identifizierung der unbekanntem Schadstoffe erfolgt zum einen durch den Vergleich des Retentionsfaktors der unbekanntem Substanz mit denen von Referenzsubstanzen, zum anderen erfolgt eine Absicherung der Ergebnisse durch UV-Spektren, bzw. durch Vermessen des Chromatogramms mit einem Mehrwellenlängenscan. Die Substanz kann anschließend durch Umsetzung mit chemischen Reagenzien auf dem gleichen Chromatogramm näher charakterisiert werden. Besondere Bedeutung haben die Publikationen, die die weiteren Möglichkeiten des Pestizidscreenings mit Hilfe der Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC) aufzeigen und Reagenzien beschreiben, mit denen mikrochemisch Pestizide charakterisiert und identifiziert werden können (Patil und Shingare 1993).

1.1.2.3 Physikalische Detektionsverfahren in der Dünnschichtchromatographie

Zu Beginn der Entwicklungsgeschichte der Dünnschichtchromatographie wurden die Substanzflecken nach der Trennung zur quantitativen Erfassung von der Platte abgekratzt, die Substanzen aus der stationären Phase mit einem geeigneten Lösemittel eluiert und anschließend photometrisch vermessen. Bei diesen *indirekten* Methoden der Quantifizierung wurden nach der Extraktion sowohl die Photometrie (im präparativen Bereich 1-10 mg Substanz pro Fleck) als auch gravimetrische, titrimetrische und polarimetrische Detektionsverfahren eingesetzt. Es ist weiterhin bis heute möglich, nach der Dünnschichtchromatographie extrahierte Proben mit weiteren physikalischen bzw. chromatographischen Verfahren zu koppeln, wie z.B. der HPLC, Gaschromatographie. Die Identifizierung und Quantifizierung kann im Extrakt z.B. mit UV/Vis -, IR - oder Massen - oder Atomabsorptions - Spektroskopie erfolgen (Jork und Wimmer 1986).

Heute werden bei den physikalischen Nachweis- und auch Dokumentationsverfahren substanzcharakterisierende Eigenschaften *direkt* auf der HPTLC - Platte erkannt. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Absorptions- bzw. Fluoreszenzmessverfahren. Detektionen mit Hilfe der FTIR und Raman - Spektroskopie, radiometrische Messungen oder die Massenspektrometrie können als direkte Detektionsverfahren auf der HPTLC-Platte eingesetzt werden.

Mitte der sechziger Jahre begann die Entwicklung kommerzieller Geräte für die photometrische Direktauswertung auf dem Dünnschichtchromatogramm, die sogenannten Densitometer. Das klassische Densitometer weist einen typischen Spektrometereaufbau auf. Als Lichtquelle stehen in der Regel drei Lampen (Deuterium-, Wolfram- und Quecksilberdampfampe) zur Auswahl. Spangenberg entwickelte im Jahr 2000 einen neuen HPTLC Scanner, der in der Lage ist, eine HPTLC – Platte simultan bei verschiedenen Wellenlängen zu messen, indem er glasfasergeleitetes Laserlicht mit einem Dioden-Array Detektor verwendet (Spangenberg und Klein 2000).

Bei den quantitativen Auswerteverfahren von Chromatogrammen werden in der Literatur immer häufiger der Einsatz von Video-Densitometern oder der Einsatz von Flachbettscannern beschrieben, die mit einer entsprechenden Auswerte-Software ausgestattet sind (Veröff. I). Bei diesen Ver-

fahren wird heute ein besonderes Augenmerk auf eine nach GLP³-Richtlinien ausgerichtete Dokumentation gelegt. Auch in diesem Bereich wird eine videodensitometrische Auswertung diskutiert, die die Möglichkeit bietet, die eigentliche Dokumentation des Chromatogramms mit der quantitativen Auswertung und einer entsprechenden Software zu verbinden (Mall 1995).

Neben den zerstörungsfreien Detektionsverfahren können mit der Kopplung von HPTLC und "Fast-Atom-Bombardement Mass Spectrometry" (HPTLC-FAB MS) die Substanzen massenspektroskopisch identifiziert und quantifiziert werden. Eine direkte massenspektroskopische Analyse der getrennten Substanzen vom Dünnschicht - Trägermaterial gelingt auch durch Secondary Ion Mass Spektrometer (SIMS) oder der Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Technik (MALDI) (Bush 1995).

³ GLP – Gute Laborpraxis

1.2 Physiologische und biochemische Detektionsverfahren

Neben den zerstörungsfreien physikalischen Detektionsverfahren können auf dem gleichen Chromatogramm noch physiologische und biochemische Detektionsverfahren eingesetzt werden. Diese Verfahren selektieren aus einem vorliegenden Komponentengemisch die Stoffe mit einer physiologischen bzw. toxikologischen Wirkung. Diese Nachweisverfahren können indirekt nach manuellem Transfer in ein Biotestverfahren oder auch direkt auf der Dünnschichtplatte durchgeführt werden. Indirekte biologisch physiologische Detektionsverfahren finden insbesondere Anwendung für den Nachweis von pflanzlichen und tierischen Wuchsstoffen in sensiblen biologischen Testsystemen, wie z.B. *in vitro* in tierischen Zellkulturen oder *in vivo* in Pflanzenteilen (Kaldewey und Ginkel 1964, Jork 1986).

Bedingt durch den hohen Arbeitsaufwand und dem großen Zeitbedarf der indirekten physiologischen Detektionsverfahren wurden seit Anfang der sechziger Jahre biologische und biochemische Testverfahren entwickelt, die Aussagen über bioaktive Komponenten *direkt* auf dem Chromatogramm erlauben (*in situ*). Bei diesen direkten Detektionsverfahren können organismische und suborganismische Testverfahren unterschieden werden.

1.2.1 Organismische Testverfahren *in situ*

Unter dem Begriff „Bioautographie“ veröffentlichte Stahl 1967 eine genaue Arbeitsanweisung für den direkten Nachweis von Antibiotika auf dem Dünnschichtchromatogramm mit Hilfe geeigneter Bakterienstämme (Stahl 1967). Bei diesen bioautographischen Nachweisverfahren wurde die „agar-overlay - Technik“ eingesetzt (siehe Abb. 3).

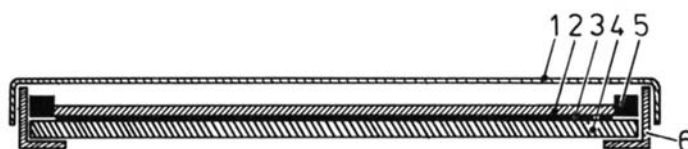


Abb. 3: Anleitung für die Herstellung eines Bioautogramms auf der Dünnschichtplatte mit der „agar - overlay - Technik, 1 Aluminium-Deckel; 2 Agar - Schicht; 3 stationäre Phase; 4 Glassplatte; 5 Stahlrahmen; 6 Einrahmung aus Aluminium (Wallhäuser 1969)

In der Regel erfolgten zu dieser Zeit die bioautographischen Nachweise biologisch aktiver Komponenten direkt auf dem Chromatogramm auf Kieselgel 60 Platten als stationäre Phase. Faupel et al. (1980) übertrugen eine Trennung von Cephalosporinen von der Säulenchromatographie (RP-HPLC)⁴ auf ein planares Trennverfahren (RP-DC) mit dem Ziel, postchromatographisch in situ die antibiotische Wirkung dieser Substanzen mit einem geeigneten Bakterienstamm nachzuweisen.

Bei dem Nachweis von Fungiziden stand Peterson (1969) lediglich das von Stahl beschriebene „bioautographische“ Verfahren zur Verfügung, indem er eine Suspension von Pilzsporen auf das Chromatogramm sprühte. Neben dem visuellen qualitativen Nachweis des Fungizids Benomyl, einem in der Landwirtschaft häufig eingesetztem Fungizids, und des Zerfallproduktes Carbendazim gelang Peterson auch die quantitative Bestimmung dieses Fungizids. Der Durchmesser eines Hemmhofes im Verhältnis zum Logarithmus der applizierten Menge an Benomyl zwischen 30 - 400 ng/Fleck führte zu einem linearen Zusammenhang. Die Nachweisgrenze lag bei dieser Versuchsanordnung bei 50 ng/Fleck (Peterson und Edington 1969).

Saponine sind bekannt für ihre hämolytischen Eigenschaften und können mit Hilfe einer Erythrozyten - Suspension mit einer „Gelatine - overlay“ Technik nachgewiesen werden (Jork 1986), wobei Citratblut für die Detektion von Triterpensaponinen verwendet wird.

Basierend auf der Technik von Wallhäuser (1969), dem Agar-Overlay Verfahren, übertrugen Baumann und seine Mitarbeiter eine Reihe biologischer Toxizitätsteste auf die Dünnschichtplatte (Baumann et al. 2000). Durch die Anwendung der *Calciumalginatverfestigung* können auf der Dünnschichtplatte Organismen leicht erzeugt werden. Dadurch wird die qualitative Bestimmung von bakterien-, pilz-, algen-, pollen- und gentoxischen Substanzen (umu-Test⁵ nach DIN 38415-3) in Abwasserproben möglich (Baumann et al. 2001).

⁴ RP- engl. reversed phase

⁵ Der umu-Test ist ein bakterielles Testverfahren, mit dem die gentoxische Wirkung von chemischen Substanzen und komplexen Stoffgemischen erfasst werden kann.

1.2.2 Suborganismische Testverfahren in situ

Klassische biologische Methoden basieren auf der Wechselwirkung der untersuchten Organismen mit einem Agonisten (organismische Testverfahren). Die Molekularbiologie beschäftigt sich in der heutigen Zeit damit, biologische Wirkungen auf molekularer und biochemischer Ebene zu erfassen. Im Einzelfall können dabei in einem biochemischen Testverfahren z.B. enzyminduzierende bzw. enzymhemmende, entgiftende, neurotoxische, zytotoxische, immuntoxische oder aber auch gentoxische Effekte ermittelt werden. Diese Verfahren, in denen Enzyme und subzelluläre Organellen eingesetzt werden, werden als suborganismische Testverfahren bezeichnet (Obst 1999).

1.2.2.1 Photosynthesehemmung mit einer Chloroplastensuspension

1978 beschrieben Sackmauerová und Kováč eine dünnschichtchromatographische Bestimmung von Triazinen und Harnstoff-Herbiziden durch eine Hemmung des Photosynthese II Systems (der Hill-Reaktion) bei einer Chloroplastensuspension direkt auf dem Chromatogramm (Sackmauerová und Kováč 1978). Da dieses Verfahren mit sehr viel Zeitaufwand verbunden war und sich somit für die Routine nur begrenzt einsatzfähig erwies, modifizierte Herrmanns 1995 dieses Verfahren in Zusammenarbeit mit der Firma Bayer AG, Dormagen. Durch den Einsatz einer Thylakoidsuspension aus Spinatsaft wurde das Verfahren dahingehend optimiert und standardisiert, dass es für den routinemäßigen Laborbetrieb anwendbar gemacht wurde und eine Quantifizierung der Hemmstoffe möglich wurde (Herrmanns 1995).

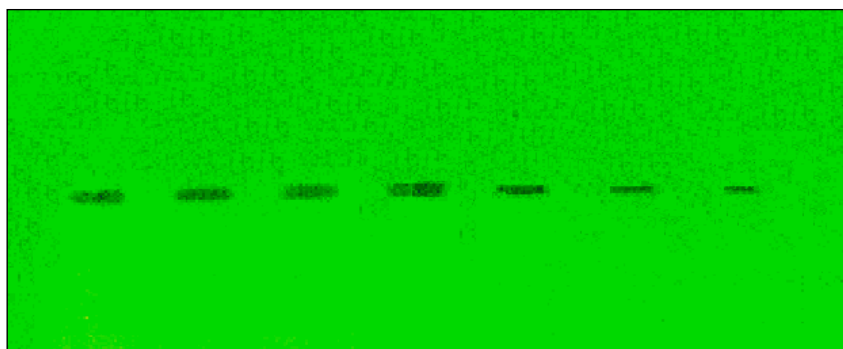


Abb. 4: Detektion von Atrazin (0,1 – 0,02 ng/3 mm Band), Stationäre Phase HPTLC KG 60 F₂₅₄ (10x20), Testsystem: Hemmung der Photosynthese (Bild Weins nach Methode von Herrmanns 1995)

1.2.2.2 Detektion von Antigenen mit Antikörpern in situ

1981 beschrieben Magnani et al. in Science eine Methode, Glykolipidantigene auf der Dünnschichtplatte mit monoklonalen Antikörpern selektiv zu detektieren (Magnani et al. 1981). Diese Verfahren „TLC – Immunostaining“ werden erfolgreich weltweit bei dem Nachweis von zuckerhaltigen Antigenen eingesetzt. Bei dieser Methode bedarf es postchromatographisch zunächst einer „Inaktivierung“ der Kieselgeloberfläche mit einem Polyisobutylmethacrylat, um unspezifische Bindungen der Antikörper an den Silanolgruppen auszuschließen.

1.2.2.3 Enzymteste auf der Dünnschichtplatte

Die am längsten erprobten suborganismischen Testverfahren auf der Dünnschichtplatte sind enzymatische Nachweismethoden. Unterschieden werden vom Grundsatz her zwei verschiedene Nachweisprinzipien, die in situ an eine dünnschichtchromatographische Trennung gekoppelt werden können:

- Modellhafte Toxizitätsteste, d.h. die Hemmeigenschaft einer toxikologisch relevanten Substanz auf ein definiertes Enzymsystem wird sichtbar gemacht und kann quantifiziert werden (Wirkungsspezifität).
- Durch den Stoffumsatz physiologischer Substanzen mit Hilfe substratspezifischer Enzyme werden selektiv Substrate sichtbar gemacht und können quantifiziert werden (Substratspezifität).

Enzymhemmteste auf der Dünnschichtplatte

Als Haupteinsatzgebiet wurden Enzymteste für die Nachweise von lipophilen Enzymhemmstoffen verwendet. Schon 1962 gelang McKinley der qualitative Nachweis von Organophosphor-Pestiziden in Lebensmitteln mit der Papierchromatographie, gekoppelt an eine Hemmung der Cholinesterase (McKinley und Read 1962). 1965 übertrugen Orloff und Franz die Methode der Enzymhemmteste von der Papierchromatographie auf das Dünnschichtchromatogramm zum Nachweis phosphorhaltiger Insektizide (Orloff und Franz 1965).

In einem Forschungsprojekt untersuchte das Institut für Pflanzenschutzmittelforschung der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft in Berlin von 1969 bis 1975 den Zusammen-

hang zwischen der Wirkung eines Pestizids und seiner Struktur. Hier stand die Frage, welche inhibitorische Wirkung Pestizide auf Enzyme haben, im Mittelpunkt der Forschungsarbeiten. Diese Enzymhemmtests wurden ausnahmslos auf der Dünnschichtplatte durchgeführt, um die Bestimmung mit einem lipophilen und in Wasser schwer löslichen Pestizid und einem wasserlöslichen Enzym überhaupt möglich machen zu können. Neben dem Nachweis von Carbamaten oder Organophosphor-Insektiziden mit Rinderleberesterase (Geike 1970) wurde die inhibitorische Wirkung zahlreicher organischer, metallorganischer und anorganischer Pestizide auf verschiedene Enzymsysteme untersucht wie z. B. Lactoperoxidase (Geike 1970), Amylase (Geike 1971), α -Amylase und β -Amylase (Geike 1973), Trypsin (Geike 1970, Geike 1973), Chymotrypsin (Geike 1972, Geike 1973), Pepsin (Geike 1973), alkalische Phosphatase und saure Phosphatase (Geike 1973), δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase (Geike 1974), Peroxidase (Geike 1974, Geike 1975) und Urease (Geike 1972).

Tab. 2 Mögliche Enzymsysteme zur Detektion von Schadstoffen (siehe Tab. 2.2 Veröff. II, S. 49)

| Enzymsysteme | Inhibitorische Schadstoffe und Schadstoffklassen |
|---|---|
| Chymotrypsin, Trypsin, Elastase, Cholinesterase, alkalische und saure Phosphatase | insektizide Carbamate, insektizide Organophosphate, Organochlorverbindungen und ihre Metabolite (F. Geike 1969), Phenylharnstoff-Herbizide nach UV-Bestrahlung (Geike 1973) |
| Urease, Amylase, δ -Aminolävulinsäure Dehydratase | Schwermetalle und metallorganische Fungizide (Mendoza und Schields 1973, Geike 1972, Geike 1974) |
| Pflanzliche und Säugetier-Peroxidase | Quinone (Mendoza and Schields 1973), aromatische Amine (Geike 1970, Geike 1975)) |
| Katalase | 2,4-Dichlorophenol, Hydroxylamine, Monochloramine, Nitrite (Mendoza and Schields 1973) |

Geike wählte für seine Untersuchung Enzymsysteme mit ähnlichen Aminosäuresequenzen um das aktive Zentrum – wie Esterasen und Phosphatasen – , um möglicherweise eine Vorhersage auf mögliche Schadwirkungen machen zu können, die von den eingesetzten Pflanzenbehandlungsmitteln ausgehen könnten. Besonders bei Organochlorverbindungen konnte er zeigen, dass die inhibitorische Wirkung der Substanzen auf verschiedene Enzymsysteme nach UV- Bestrahlung durch die photochemische Metabolisierung sich stark veränderte. Sowohl eine Abnahme der Toxizität bei den ursprünglichen Substanzen als auch eine Zunahme der inhibitorischen Wirkung durch die Ent-

stehung von aktiven Metaboliten konnten beobachtet werden (Geike 1969, Geike 1970, Geike 1973).

1973 erstellte Mendoza eine Zusammenfassung über die Anwendung von Enzyminhibitionstechniken in Kombination mit der DC. Die Anwendungen umfassen die Bestimmung und Identifizierung von Insektizidwirkstoffen, Rückstandsanalysen in Pflanzen-, Boden- und Wasserproben sowie in der forensischen Toxikologie. In dem Bericht sind Nachweisgrenzen von über 100 Phosphorsäureester und Carbamate und ihre möglichen Metabolite zusammengetragen (Mendoza und Shields 1973). 1981 verglichen Ambrus et al. sechs DC-Methoden zur Detektion von 188 Pestizidwirkstoffen (Ambrus et al. 1981).

Quantitative Bestimmung von Inhibitoren der Acetylcholinesterase

Bereits 1976 gelang Štefanac die quantitative Bestimmung von Organophosphaten auf der Dünnschichtplatte durch die Hemmung der Acetylcholinesterase mit einem Densitometer (Štefanac et al. 1976). 1991 verwendete Mazurek die zweidimensionale OPLC (Over Pressure Layer Chromatography) in Kombination mit dem Cholinesterasehemmtest, um 5 verschiedene Phosphorsäureester (Nervengase wie Tabun, Sarin, Soman u.ä) in Gegenwart von 22 Pestiziden zu trennen und quantitativ zu bestimmen (Mazurek und Witkiewicz 1991).

Selektiver Nachweis von Substanzen mit Hilfe substratspezifischer Enzyme

1980 beschrieb Yamaguchi eine enzymkatalysierte Reaktion auf der Dünnschichtplatte zum spezifischen Nachweis von 3α -Hydroxysteroid mit 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (Yamaguchi et al. 1980).

Mit einer substratspezifischen Enzymreaktion gelang es Krüger 1991 bei der dünnschichtchromatographischen Zuckertrennung, bei der sich Glucose und Galaktose auf dem Chromatogramm überlagerten, die jeweiligen Einzelzucker mit einem spezifischen Enzym selektiv⁶ nachzuweisen (siehe Abb. 5).

⁶ β -Galaktose wird in Gegenwart von NAD durch die β -Galaktose-Dehydrogenase in D-Galactono- β -Lacton und NADH+H⁺ oxidiert. Phosphorylierte D-Glukose (Glukose-6-Phosphat) wird in Gegenwart von NADP durch die Glucose-6-P-Dehydrogenase in Gluconat-6-Phosphat und NADPH+H⁺ oxidiert.

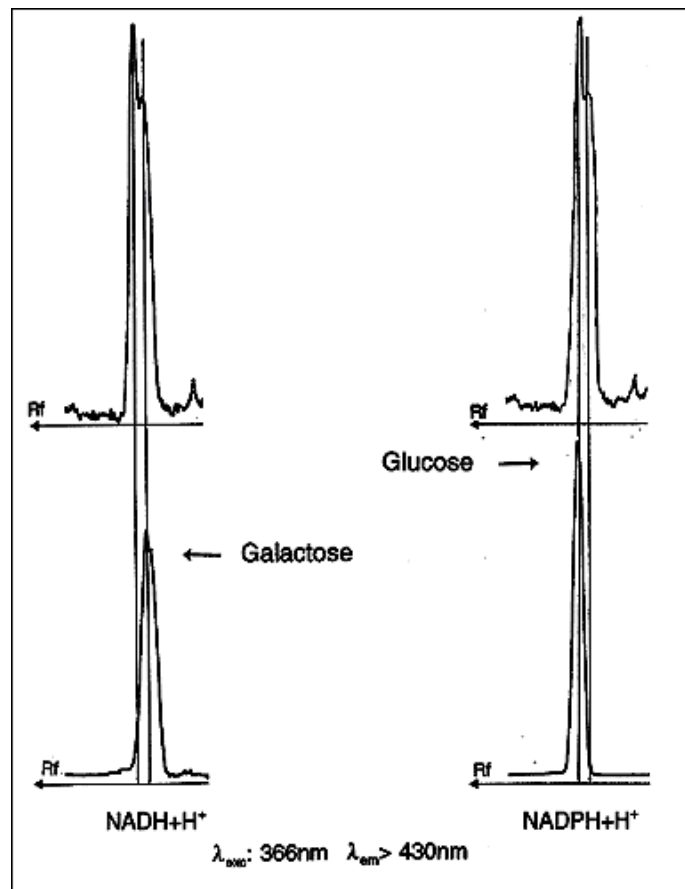


Abb. 5: Enzymselektiver Nachweis von β -Galaktose und D-Glucose durch die Bildung von $NADH+H^+$ bzw. $NADPH+H^+$ (Krüger 1991).

Definition von wirkungsbezogener Analytik

Biochemische bzw. biologische Testverfahren, die an chemisch/physikalische oder chromatographische Verfahren gekoppelt werden, werden in dieser Arbeit als wirkungsbezogene Analytik bezeichnet.

1.3 Bewertung und Nachweis von Schadstoffmetaboliten mit der Dünnschichtchromatographie

Die sog. „Normalphasenchromatographie“⁷ ist das meist eingesetzte Chromatographieverfahren in der Dünnschichtchromatographie. In der Normalphasenchromatographie werden Substanzgemische auf polaren hydrophilen Schichten (z.B. Kieselgel) als stationäre Phasen mit unpolaren Lösungsmitteln als mobile Phasen aufgrund ihrer Polaritätsunterschiede getrennt. Insbesondere sind mit diesem Verfahren unpolare Substanzen von ihren polaren Metaboliten aufgrund der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten gut voneinander zu trennen.

Die Normalphasenchromatographie in der Dünnschichtchromatographie hat sich als besonders robust erwiesen. Mit diesem Chromatographiemodus, der auf den adsorptiven Wechselwirkungen zwischen Substanz, stationärer Phase und mobiler Phase beruht, ist man in der Lage, aufgrund der unterschiedlichen Retentionsfaktoren (Rf-Werte), d.h. der Lage im Chromatogramm, eine Aussage über die Polarität einer Substanz zu machen. Die Polarität einer Substanz ist ein Maß dafür, wie hoch der Löslichkeitskoeffizient in einer biologischen Membran ist und wie schnell eine Substanz eine biologische Membran passieren kann. Die Löslichkeit in einer biologischen Membran ist für die Toxikologie ein wichtiges Attribut einer Substanz, das wiederum Schlüsse über die Bioverfügbarkeit zulässt.

Wirkstoffe sind in der Regel lipophiler als ihre Metaboliten, da der Wirkstoff dadurch leichter im Körper resorbiert und verteilt werden kann. Der Abbau der Wirkstoffe kann durch biologische enzymatisch gesteuerte Entgiftungsreaktionen des Organismus (Biotransformation) erfolgen, aber auch bereits in der Umwelt durch Mikroorganismen (biotischer Abbau) oder abiotisch z. B. durch das Sonnenlicht. Die dabei gebildeten Abbauprodukte der Wirkstoffe sind z.B. durch Esterspaltungen, Oxidationsreaktionen hydrophiler bzw. polarer als ihre Ausgangsprodukte.

Bei der Bewertung eines Schadstoffes muss berücksichtigt werden, dass die Wirkung eines Stoffes abhängig ist von der Konzentration des freien, unveränderten (genuinen) Wirkstoffes (mit oder

⁷ Der Begriff Normalphasenchromatographie oder Adsorptionschromatographie ist ein historisch entstandener Begriff. Er beschreibt ein chromatographisches Verfahren, bei dem die stationäre Phase polar und die Fließmittel unpolar sind. Er dient zur Unterscheidung der Umkehrphasenchromatographie oder Verteilungschromatographie (reversed phase), bei der die stationäre Phase in der Regel unpolar und die mobile Phase polar ist.

ohne aktiven Metaboliten) am Wirkort eines Organismus.

1.3.1 Anwendungsgebiete der wirkungsbezogenen Analytik in der Dünnschichtchromatographie

Die wirkungsbezogene Analytik in der Dünnschichtchromatographie ist für die unterschiedlichsten Anwendungsgebiete ein Werkzeug, um Wirkstoffe **selektiv** in verschiedenen und komplexen Matrices ausfindig zu machen. Im Gegensatz zu der Einzelstoffanalytik erlaubt die Dünnschichtchromatographie eine Probenvorbereitung, die darauf abzielt, möglichst alle organischen Bestandteile einer Probe zu erfassen. Sie ermöglicht sogar die Probenvorbereitung aus Rohextrakten oder nativen Proben während der Chromatographie auf der Platte mit dem Ziel, möglichst alle organischen Inhaltsstoffe einer Probe zu erfassen.

Die wirkungsbezogene Analytik ist ein besonderes leistungsfähiges Instrument für die Risikobewertung von Chemikalien und Wirkstoffen sowie von Umwelt- und Lebensmittelproben.

1.3.1.1 Risikobewertung von Chemikalien und Wirkstoffen

Die moderne Gesellschaft hängt - z. B. bei der Herstellung von Lebensmitteln, Arzneimitteln, Textilien und Kraftfahrzeugen - vollständig von Chemikalien ab. Diese tragen wesentlich zum wirtschaftlichen und gesellschaftlichen Wohlstand der Bürger in Bezug auf Handel und Beschäftigung bei. Die weltweite Chemieproduktion ist von 1 Million Tonnen im Jahr 1930 auf gegenwärtig 400 Millionen Tonnen gestiegen. Am EU-Markt sind ungefähr 100.000 unterschiedliche Stoffe registriert; davon werden 10.000 in Mengen von über 10 Tonnen und weitere 20.000 in Mengen zwischen 1 Tonne und 10 Tonnen vertrieben. Der Wert der weltweiten Chemieproduktion im Jahr 1998 wurde auf € 1.244 Mrd. geschätzt, wovon 31% auf die chemische Industrie der EU entfallen, die einen Außenhandelsüberschuss von 41 Mrd. Euro erzielte. 1998 war sie damit die größte Chemieindustrie der Welt, gefolgt von der chemischen Industrie der USA mit 28% des Produktionswertes und einem Außenhandelsüberschuss von € 12 Mrd. Die chemische Industrie ist außerdem der drittgrößte verarbeitende Industriezweig in Europa. Sie beschäftigt unmittelbar 1,7 Millionen Menschen, und bis zu 3 Millionen Arbeitsplätze hängen von ihr ab. Neben einigen führenden multinationalen Unternehmen umfasst sie ungefähr 36.000 kleine und mittlere Unternehmen (KMU).

Diese stellen zahlenmäßig 96% der Unternehmen und erzeugen 28% der gesamten Chemieproduktion. Allerdings verursachen bestimmte Chemikalien schwere Gesundheitsschäden, die zu Leiden und vorzeitigem Tod führen, und sind zudem für Umweltschäden verantwortlich (Weissbuch der EU 2001).

Nach Aussagen des Wissenschaftlichen Ausschusses für Toxikologie, Ökotoxikologie und Umwelt der Kommission (CSTEE) liegen Berichte vor über Zusammenhänge zwischen Stoffen mit endokriner Wirkung und Störungen bei der Fortpflanzung und Entwicklung wildlebender Populationen. Der CSTEE kam zu dem Ergebnis, dass hier ein potentiell globales Problem vorliegt. Diese Besorgnis basiert auf der Tatsache, dass in den letzten Jahren große Mengen persistente Chemikalien mit potentiellen endokrinen Wirkungen in mehreren marinen Säugetierarten, die sich in den Ozeanen aufhalten, festgestellt wurden⁸.

Die Chemikalienpolitik der EU muss gemäß dem EU-Vertrag sowohl für die gegenwärtige als auch für zukünftige Generationen ein hohes Schutzniveau für menschliche Gesundheit und Umwelt gewährleisten und dabei zudem die Funktionsfähigkeit des Binnenmarkts sowie die Wettbewerbsfähigkeit der chemischen Industrie sichern. Eine grundlegende Voraussetzung für die Verwirklichung dieser Ziele ist das Vorsorgeprinzip⁹.

Das gegenwärtige System für allgemeine Industriechemikalien unterscheidet zwischen den „chemischen Altstoffen“, d. h. allen chemischen Stoffen, die im September 1981 erklärtermaßen bereits auf dem Markt waren, und „neuen Stoffen“, d. h. den nach diesem Datum in Verkehr gebrachten Stoffen. Es gibt ungefähr 2.700 neue Stoffe. Diese müssen gemäß der Richtlinie 67/548 geprüft und hinsichtlich ihrer Gefährlichkeit für die menschliche Gesundheit und die Umwelt bewertet werden, bevor sie in Mengen über 10 kg in Verkehr gebracht werden. Für größere Mengen ist eine gründlichere Prüfung gefordert, die sich speziell auf langfristige und chronische Auswirkungen konzentriert.

Altstoffe sind gegenüber den neuen Stoffen im Verhältnis 15:1 auf dem Markt vertreten. Die bisherige Altstoffbewertung war in den letzten 10 Jahren nicht effizient: von 2600 großvolumigen Stoffen (>1000 t/a) sind bisher nur 140 in Prioritätenlisten erfasst, nur 45 Risikobewertungen erarbeitet

⁸ Stellungnahme des CSTEE über die Auswirkungen von Chemikalien mit endokrinen Wirkungen auf den Menschen und wildlebende Pflanzen und Tiere (März 1999).

⁹ Entschließung des Europäischen Rates von Nizza vom Dezember 2000 über das Vorsorgeprinzip, in der die Mitteilung der Kommission über das Vorsorgeprinzip begrüßt wird (KOM (2000) 1, 2.2.2000).

und nur 4 Stoffe endgültig geregelt worden. Das bedeutet einen durchschnittlichen Zeitbedarf von sechs Jahren für eine Risikobewertung. Von den 45 bearbeiteten Stoffen endeten 35 Stoffe mit der Erkenntnis, dass ein Bedarf zur Risikominderung besteht. Weiterhin stehen etwa 30 000 Stoffe mit einer Produktionsmenge über 1 t/a zur Bewertung an (Steinhäuser 2001).

1.3.1.2 Risikoanalytik im Umweltbereich

Chemikalien gelangen zum Teil entweder direkt oder auf Umwegen in die Umwelt und können in vielfältiger Weise auf Pflanzen, Tiere und nicht zuletzt auf den Menschen einwirken. Wenig erforscht ist die Art und Weise, wie sich Chemikalien in der Umwelt ausbreiten, wo sie akkumulieren oder abgebaut werden und wie sie letztendlich auf die verschiedenen Organismen wirken. Mit den konventionellen analytischen Verfahren und experimentellen Untersuchungen, die eine umfassende Beurteilung des Risikopotentials einer Chemikalie zuließen, sind diese Untersuchungen zeitaufwendig und teuer. Dazu kommt, dass viele Substanzen in der Natur durch die Einwirkung von Sonnenlicht oder Mikroorganismen abgebaut werden. Die Wahrscheinlichkeit, für die dadurch entstehenden, potentiell gefährlichen Substanzen geeignete Daten zu finden, ist äußerst gering.

1.3.1.3 Risikoanalytik von Lebensmitteln

Für die Europäische Union soll der höchste Standard der Lebensmittelsicherheit gelten. Dies zu gewährleisten, ist eines der vorrangigen politischen Anliegen der Kommission. Die Kommission hält die Einrichtung einer unabhängigen Europäischen Lebensmittelbehörde für das geeignete Mittel, ein hohes Maß an Lebensmittelsicherheit zu garantieren.

Die wirtschaftliche Bedeutung wie auch die Tatsache, dass wir in unserem Alltag praktisch ständig mit Lebensmitteln zu tun haben, belegen, dass die Lebensmittelsicherheit sowohl für die Gesellschaft insgesamt als auch und vor allem für Behörden und Erzeuger von höchstem Interesse sein muss. Ein wirkungsvolles Risikomanagement kann nur erfolgen, wenn die Überwachung die gesamte Lebensmittelherstellungskette einschließlich der Futtermittelherstellung abdeckt. Die Risikoanalyse ist das Fundament, auf dem die Politik der Lebensmittelsicherheit aufbauen muss. Die Gemeinschaft hat bei ihrer Lebensmittelpolitik von den drei Einzelschritten der Risikoanalyse auszugehen: Risikobewertung (wissenschaftliche Beratung und Informationsanalyse), Risikomanagement (Rechtsetzung und Überwachung) und Risikokommunikation.

Nach dem Weissbuch der EU für Lebensmittelsicherheit (2000) ist dabei für eine angemessene amtliche Überwachung auf nationaler und europäischer Ebene zu sorgen, deren wichtigster Punkt die Rückverfolgbarkeit von Lebensmitteln durch die gesamte Herstellungskette sein muss. Die Anforderungen, die an die Lebensmittelkontrollen gestellt werden, sind neben der Erarbeitung gerichtsfester Analysenverfahren auch die Gewährleistung eines hohen schnellen und preisgünstigen Probendurchsatzes.

2 Ziel der Arbeit

2.1 Probleme des derzeitigen Analytikkonzeptes

Der Einsatz biologischer Toxizitätsteste sowie enzymatischer Hemmteste (z.B. der Agardiffusionstest für Antibiotika) als Screening-Verfahren in der Grund-, Trink-, Oberflächen-, Abwasseranalytik und bei Lebensmitteluntersuchungen bringt den ersten Hinweis für das Vorhandensein toxischer Schadstoffe in einer Umwelt- bzw. Lebensmittelprobe. Die Ergebnisse dieses "Biomonitorings" zeigen in der Regel die Summeneffekte von Schadwirkungen in einem definierten Testsystem auf, wobei eine Einzelstoffidentifizierung zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich ist.

Der Beweis für die Anwesenheit eines oder mehrerer Schadstoffe, die für den toxischen Effekt im oben eingesetzten Testsystem verantwortlich sind, muss anschließend durch die instrumentelle Analytik, wie die Gaschromatographie oder Flüssigkeitschromatographie (HPLC, HPTLC) erbracht werden, mit der die Einzelstoffe mittlerweile in geringsten Spuren (im ng- bzw. pg-Bereich) identifiziert und quantifiziert werden können.

Die instrumentelle Analytik bedarf ihrerseits einer selektiven Anreicherung des Wirkstoffes aus der entsprechenden Matrix: Nach einer anschließenden selektiven Trennung erfolgt die Identifizierung mit Hilfe ausgewählter Referenzsubstanzen, an die sich die Quantifizierung des Wirkstoffes anschließt. Hier ergeben sich Schwierigkeiten bei der Verwendung relevanter Referenzsubstanzen. Nur die Substanzen, nach denen der Analytiker sucht, können gefunden werden, so dass bei der routinemäßigen Überwachung von Lebensmittel- und Umweltproben eine Erfassung unbekannter Substanzen oder Metabolite mit einer biologisch/toxikologischen Schadwirkung in der Einzelstoffanalytik nicht erfolgt.

Von den heute rund 5 Mio. bekannten chemischen Verbindungen sind etwa 80 000 Chemikalien in Gebrauch, davon 600 Pestizide. Jährlich kommen etwa 500 - 1000 neue Chemikalien dazu. Durch die zivilisatorische Entwicklung sind zudem Materialkreisläufe stark beschleunigt worden (Fent 1998). Bei einer Schadstoffpalette von über 30 000 relevanten Chemikalien und deren Abbauprodukten ist die Überwachung durch eine Einzelstoffanalytik überfordert.

Die Geschichte der Umweltanalytik zeigt, dass die Einzelstoffanalytik prioritärer Schadstoffe das Risikopotential nur unzureichend abbildet und daher kein geeignetes Instrument des Risikomanagements im Sinne eines vorsorgenden Umweltschutzes darstellt.

Chemikalien gelangen zum Teil entweder direkt oder auf Umwegen in die Umwelt und können in vielfältiger Weise auf Pflanzen, Tiere und nicht zuletzt auf den Menschen einwirken. Wenig erforscht ist die Art und Weise, wie sich Chemikalien in der Umwelt ausbreiten, wo sie akkumulieren oder abgebaut werden und wie sie letztendlich auf die verschiedenen Organismen wirken. Mit den konventionellen analytischen Verfahren und experimentellen Untersuchungen, die eine umfassende Beurteilung des Risikopotentials einer Chemikalie zuließen, sind diese Untersuchungen zeitaufwendig und teuer. Dazu kommt, dass viele Substanzen in der Natur durch die Einwirkung von Sonnenlicht oder Mikroorganismen abgebaut werden. Die Wahrscheinlichkeit, für die dadurch entstehenden, potentiell gefährlichen Substanzen geeignete Daten mit den herkömmlichen Instrumenten zu finden, ist derzeit äußerst gering.

Zu Beginn der Geschichte der chromatographischen Trennung konnten physiologische und biochemische Detektionsverfahren im Zusammenhang mit der Dünnschichtchromatographie in der Regel zur qualitativen Identifizierung physiologisch aktiver Substanzen genutzt werden. Durch die Weiterentwicklung physikalischer Detektionsverfahren wie der Massenspektroskopie und deren Kopplungen an die leistungsfähigen chromatographischen Verfahren wie die Flüssigkeitschromatographie bzw. Gaschromatographie konnten auch nicht UV-aktive Substanzen im Spurenbereich detektiert, identifiziert und quantifiziert werden. So nahm die Anzahl der Veröffentlichungen und somit das wissenschaftliche Interesse, die eine Kopplung eines chromatographischen Verfahrens mit einer physiologisch biochemischen Detektion beschreiben, signifikant ab. Diese sog. wirkungsbezogene Analytik mit der Dünnschichtchromatographie erlebte vor ca. 40 Jahren international eine stürmische Entwicklung und geriet jedoch durch die Weiterentwicklung der instrumentellen Analytikverfahren wieder in Vergessenheit.

Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Möglichkeiten und Grenzen der wirkungsbezogenen Analytik in der Dünnschichtchromatographie als ein geeignetes Instrument in der Schadstoffanalytik darzustellen.

Dazu sollen im ersten Teil der Arbeit biologische und biochemische Testverfahren auf der Dünnschichtplatte auf ihre Robustheit geprüft und validiert werden, mit dem Ziel Nachweisgrenzen ausgewählter Schadstoffe und quantitativ exakte Wirkungsäquivalente bestimmen zu können, die vergleichbar sind.

Als zweite Aufgabe sollen biologische Testsysteme auf der Dünnschichtplatte optimiert sowie neue molekularbiologische Testverfahren entwickelt werden, um die Gegenwart von Wirkstoffen (z.B. Hormone) in Substanzgemischen aufzuzeigen. Anschließend soll die Aussagekraft dieser Verfahren durch ihren Einsatz bei der Suche nach Schadstoffen in Umwelt- und Lebensmittelproben, bei der Reinheitskontrolle und in der der Metabolismusforschung von Chemikalien geprüft werden.

Ferner soll aufgezeigt werden, inwieweit die wirkungsbezogene Analytik mit der Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie in ein Konzept für eine Risikobewertung im Verbraucher- und Umweltschutz einzugliedern ist.

3 Allgemeine Diskussion

3.1 Quantitative Bestimmung von Enzyminhibitoren auf der HPTLC-Platte

Auf dem Gebiet der aquatischen Ökotoxikologie sind in den letzten Jahren eine Vielzahl biologischer und biochemischer Analysenverfahren standardisiert bzw. genormt worden. Ziel biochemischer Untersuchungen ist es, lebende Strukturen und Funktionen auf der molekularen Ebene aufzuklären bzw. Reaktionen von biologischen Makromolekülen für analytische Zwecke zu nutzen. Chemische Inhibitoren können die Enzyme reversibel und irreversibel hemmen. Irreversible Inhibitoren binden an die funktionellen Gruppen des Enzyms und blockieren sie. Da viele Enzyme aufgrund der spezifischen Bindungen nur von ganz bestimmten Inhibitoren gehemmt werden, können auf diese Weise etliche Umweltschadstoffe enzymatisch nachgewiesen werden (Beutler 1993). Grundlagen solcher Bestimmungen sind käufliche Enzympräparate, bei denen eine Hemmung durch bestimmte Stoffe oder Stoffgruppen hervorgerufen werden kann.

Bekanntestes Beispiel für einen irreversiblen Hemmtest ist der Acetylcholinesterase – Hemmtest, der als genormtes Verfahren zur Wasseruntersuchung veröffentlicht ist (Beutler 1993). In dem Deutschen Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung DIN 38 415 Teil 1, Ausgabe 1995-02, wird ein in vitro Screeningtest als Farbttest zur Bestimmung von cholinesterasehemmender Organophosphat- und Carbamat- Pestiziden im Wasser beschrieben.

Diese Wirkstoffe sind als Schädlingsbekämpfungsmittel weit verbreitet und haben teilweise die persistenteren Insektizide vom Typ der chlorierten Kohlenwasserstoffe ersetzt. Phosphorsäureester und Carbamate sind im Gegensatz zu den Organochlorverbindungen durch eine in vielen Fällen hohe akute Toxizität, eine geringe hydrolytische Stabilität, eine gute biologische Abbaubarkeit sowie eine relativ höhere Wasserlöslichkeit und somit eine größere Mobilität gekennzeichnet.

Die Hemmung der Cholinesterase beruht auf einer irreversiblen Phosphorylierung oder Carbamylierung der Serin-OH-Gruppe im aktiven Zentrum des Enzyms (Abb. 6). Die überwiegende Zahl an Organophosphor- und Carbamatinsektiziden sind gegenüber der Cholinesterase irreversible Hemmstoffe. Die Carbamate werden hier unter dem Aspekt des Reaktionsmechanismus zu den irreversiblen Hemmstoffen gerechnet, auch wenn sie wegen einer spontan hydrolytischen Reakti-

vierung der carbamylierten Cholinesterase relativ zu den Organophosphorsäureestern bisweilen als reversible Hemmstoffe eingestuft werden (Herzprung 1991).

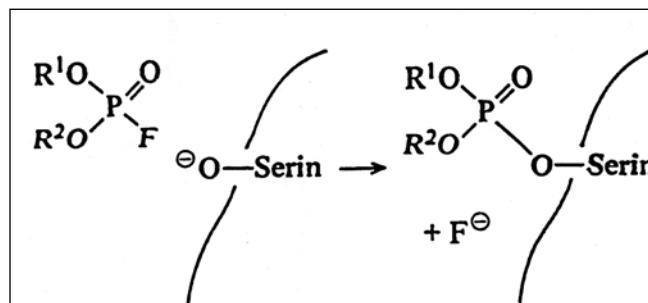


Abb. 6: Der molekulare Mechanismus der irreversiblen Cholinesterasehemmung (Stark 1984)

Man kann eine Reaktion als irreversibel ansehen, wenn sich während der Messzeit kein Gleichgewicht einstellt. Die meisten irreversiblen Inhibitoren hemmen die enzymatische Reaktion vollständig z. T. durch Ausbildung einer kovalenten Bindung, wenn ihre Konzentration die der reaktionsfähigen Gruppen im Enzym übersteigt.

Die irreversible Hemmung wird mathematisch ausgedrückt mit folgenden Gleichungen, wobei k_i die Bildungskonstante des Enzym-Inhibitor-Konjugates darstellt (Herzprung 1991).



$$k_i = \frac{\ln 2}{t_{1/2} \cdot I} \quad (\text{Gl.2})$$

Aus Gl. 2 ergibt sich die Bezeichnung für $k_i = [\text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{min}^{-1}]$

Bei der irreversiblen Enzymhemmung besteht eine umgekehrte Proportionalität der Reaktionsgeschwindigkeit $v[IE]$ zur Inhibitorkonzentration $[I]$. Aus der Steigung der Gerade ist k_i zu ermitteln, eine Stoffkonstante, die ein Maß darstellt für die Bindungsstärke zwischen Inhibitor und Enzym. Die Größe der Hemmkonstanten k_i drückt die Stärke der Hemmwirkung des Inhibitors aus. Einige Pestizide und ihre Metaboliten zeigen Unterschiede der Hemmkonstanten gegenüber den Cholinesterasen bis zu einem Verhältnis von 1:500. Viele Phosphorsäure-Derivate, insbesondere die Thio- und Dithiophosphorsäure-Derivate zeigen gegenüber der Cholinesterase nur eine sehr geringe Inhibitionswirkung. Sie können aber durch eine Oxidation zu Phosphorsäure-Analogen in ihrer inhibitorischen Wirkung bis um den Faktor 1000 gesteigert werden (Herzprung 1991).

3.1.2 Der Cholinesterasehemmtest als Detektionsverfahren in der Dünnschichtchromatographie

In dieser Arbeit werden die Testbedingungen und die Aussagemöglichkeiten von Enzymhemmtesten auf der Dünnschichtplatte exemplarisch mit dem Cholinesterasehemmtest untersucht. Diese Untersuchungen stellen die Grundlage dar für allgemeine Bedingungen der Enzymhemmteste, um Schadstoffe auch quantitativ mit einem validierten Verfahren auf einer Dünnschichtplatte bestimmen zu können.

Der Cholinesterasehemmtest ist ein sensitives und selektives biochemisches Verfahren, um phosphororganische Insektizide und insektizide Carbamate qualitativ zu bestimmen. Thio- bzw. Dithiophosphorsäureester können durch die Umsetzung mit dem Oxidationsmittel Br_2 in ihre analogen toxikologisch wirksameren Phosphonate überführt werden. Auf der Dünnschichtplatte wird die Hemmwirkung durch die verminderte enzymatische Hydrolyse von 1-Naphthyl-acetat zu 1-Naphthol und Essigsäure und anschließender Kupplung des 1-Naphthols zu einem violettblauen Farbstoff (Diazoniumsalz Echtblau B) nachgewiesen (siehe Abb. 7 und 8).

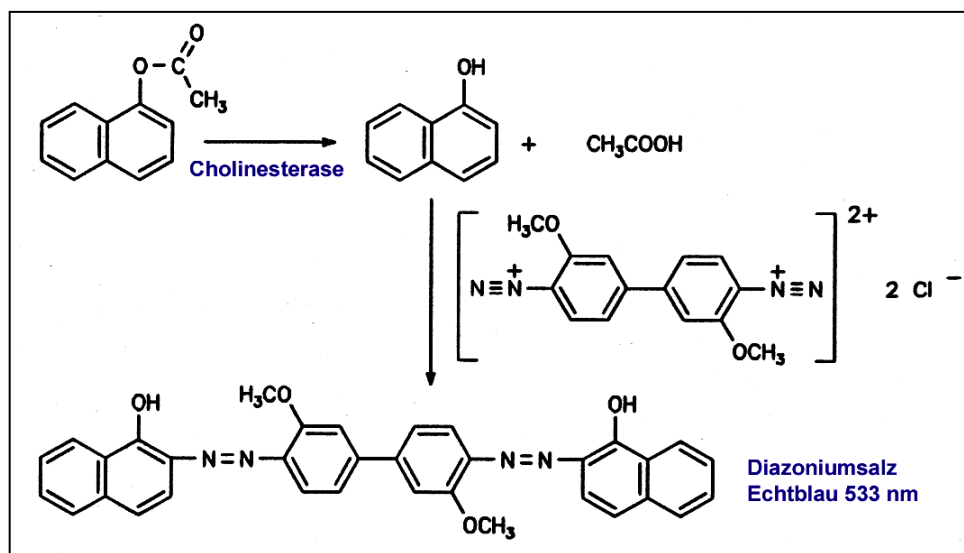


Abb. 7: Enzymatische Hydrolyse von 1-Naphthylacetat und anschließende Diazotierung durch Cholinesterase auf der DC Platte (siehe Abb. 1, Veröff. I)

Beim Kontakt des Enzyms mit den Inhibitoren auf der Dünnschichtplatte entstehen weiße Hemmzonen auf farbigem Untergrund (Geike 1969).

Die Platte wird 2 Sekunden in die Enzymlösung getaucht, 30 min bei 30 °C inkubiert und anschließend 2 Sekunden in die Substratlösung getaucht, um die Enzymreaktion zu starten (Weins und Jork 1994).

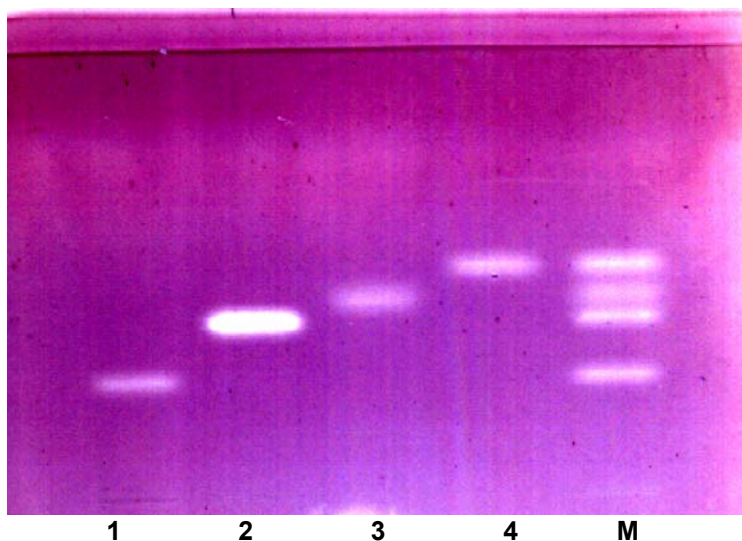


Abb. 8: Postchromatographische Detektion von 1 Paraoxon-Methyl 0.4 ng/Fleck, 2 Paraoxon-Ethyl 2 ng/Fleck, 3 Naled 0.4 ng/Fleck, 4 Dichlorvos 2 ng/Fleck, Mischung aus 1-4 mit dem Cholinesterase Inhibitionstest, Stationäre Phase HPTLC KG 60 F254 (10X10), mobile Phase THF-n-Hexan: 7:25 v/v, Migrationsstrecke 5 cm, Migrationszeit 15 min, Dokumentation Flachbett-Scanner von Hewlett Packard

Diese Farbreaktion ermöglicht es, verschiedene cholinesterasehemmende Insektizide aus der Gruppe der Carbamate und der Organophosphate aufgrund ihrer toxikologischen Wirksamkeit nach der chromatographischen Trennung auf der HPTLC-Platte nachzuweisen.

3.1.3 Quantifizierung von biochemisch detektierten Schadstoffen auf dem Chromatogramm

Voraussetzung für die quantitative Auswertung von Chromatogrammen, deren Detektion über eine Enzym-Inhibitor-Reaktion erfolgt, ist eine störungsfreie Basislinie, d.h. eine gleichmäßige enzymatische Umsetzung auf der stationären Phase. Abb. 9 zeigt die Registrierung bei $\lambda=533$ nm der Bahn M von Abb. 8. Die höchste Aktivität entfalten Enzyme auch immobilisiert auf einer Sorbensschicht nur unter optimalen Bedingungen. Dazu gehören nicht nur eine Sättigung mit Substrat, sondern auch eine optimale Temperatur und ein definierter pH-Bereich. Die optimalen Bedingungen für die

in diesem Modell eingesetzte Cholinesterase aus Pferdeserum liegen bei einem pH von 7,8 und bei einer Temperatur von 25 °C.

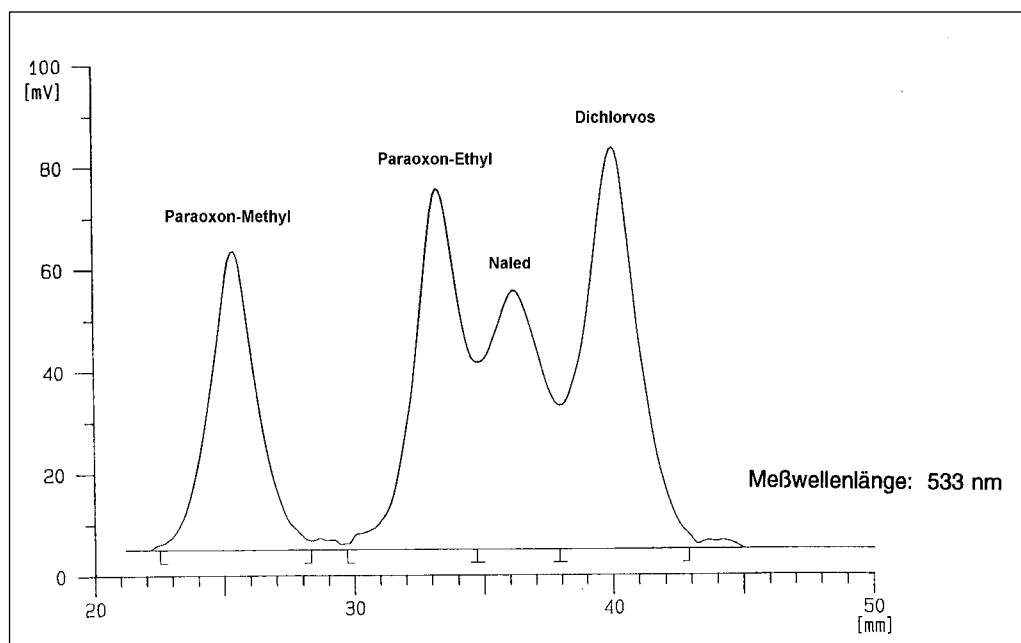


Abb. 9: Chromatogramm von Organophosphat-Insektiziden. Detektion: Cholinesterase- Hemmtest auf der HPTLC Platte, Dokumentation TLC-Scanner 3 (Originalchromatogramm CAMAG, Muttenz, Schweiz) Chromatographische Bedingungen: siehe Abb. 4 (Weins 1996) (Original Scannerausdruck, TLC Scanner 3, Camag, Muttenz, Schweiz) (siehe Abb. 2, Veröff. I)

3.1.3.1 Optimierung enzymatischer Detektionsverfahren auf stationären Phasen

Biologische bzw. biochemische Detektionsverfahren werden in der Dünnschichtchromatographie postchromatographisch nach dem vollständigen Entfernen der organischen Lösemittel von der stationären Phase in situ auf dem Chromatogramm im gepufferten wässrigen Milieu durchgeführt.

pH – Einstellung des Sorbens

Je nach eingesetztem Sorbens bedarf es für die biologisch/biochemischen Detektionsmethoden eine Pufferung des Plattenmaterials das ausgerichtet ist auf das pH-Optimum des jeweiligen Biotestsystems. Für den Cholinesterasehemmtest wurde für die eingesetzten Dünnschichtplatten die optimale Pufferstärke bestimmt (siehe Tab. 3, Abb. 10).

Tab.3 Einfluss der Ionenstärke des Puffers auf den pH des Sorbens¹⁰

| Schichttyp | Firma und Artikel-Nr. | Sorbens+ Wasser | 0,05M- Tris-HCl pH= 7,6 | 0,2M- Tris-HCl pH= 7,6 | 0,5M- Tris-HCl pH= 7,6 | 1,0M- Tris-HCl pH= 7,6 | 1,5M- Tris-HCl pH= 7,6 |
|---|-----------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| HPTLC KG 60 F ₂₅₄ 10x20 cm | Merck 5642 | 8,0 | 7,7 | 7,6 | 7,6 | 7,6 | 7,6 |
| HPTLC KG 60 F ₂₅₄ 10x10 cm | Merck 5628 | 8,1 | 7,7 | 7,6 | 7,6 | 7,6 | 7,6 |
| HPTLC KG 60 F ₂₅₄ S extra dünn | Merck 12363 | 8,0 | 7,7 | 7,6 | 7,6 | 7,6 | 7,6 |
| HPTLC KG 60 F ₂₅₄ WR extra dünn | Merck 11764 | 8,1 | 7,7 | 7,6 | 7,6 | 7,6 | 7,6 |
| HPTLC Diol F ₂₅₄ S | Merck 12668 | 3,5* | 4,8* | 4,8* | 5,2 | 7,3 | 7,6 |
| HPTLC NH ₂ F ₂₅₄ S | Merck 15647 | 10,2 | 9,4 | 8,4 | 8,0 | 7,9 | 7,9 |
| HPTLC CN F ₂₅₄ S | Merck 16464 | 5,2** | 6,4* | 6,5* | 6,0 | 7,2 | 7,6 |
| HPTLC RP18W F ₂₅₄ S ¹¹ | Merck 13124 | siehe Fuß- note 11 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,8 | 7,7* |

Gerade für biologische und biochemische Testverfahren auf einer Kieselgelträgerschicht ist der pH des Sorbens zu berücksichtigen und mit einem Puffer auf die entsprechenden Testbedingungen einzustellen.

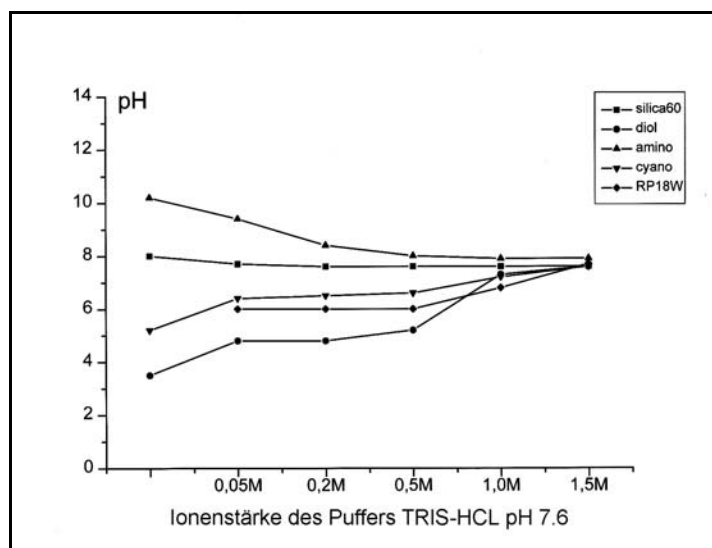


Abb. 10: Einfluss der Ionenstärke des Puffers auf den pH des Sorbens

¹⁰ 0,35g Sorbens, auf der Glasplatte in die entsprechende Pufferlösung 3 sec getaucht und getrocknet, werden in 20 mL Aqua dest. suspendiert, im Ultraschallbad 1 min homogenisiert und im Überstand mit einer Glaselektrode der pH gemessen.

¹¹ Aufgrund der schlechten Wasserbenetzbarkeit wurde dem Puffer 0,1% Rinderserumalbumin (BSA) zugesetzt.

Einflüsse der verschiedenen Sorbentien als Trägerschicht auf die Enzymaktivität

Die hydrophilen funktionellen Gruppen der verschiedenen in der Dünnschichtchromatographie verwendeten Sorbentien erfüllen zum einen die Funktion einer Trägerschicht für die eingesetzten Enzyme, zum anderen bewirken sie bei einem direkten Kontakt mit dem Enzym seine Hemmung oder sogar Denaturierung.

Durch Tauchen der Dünnschichtplatte in eine Enzymlösung adsorbiert eine bestimmte Menge an Enzym auf dem Sorbens, dessen Gehalt durch die entsprechende Umsetzung eines Substrates in ein farbiges Endprodukt sichtbar gemacht werden kann. Die Adsorption auf Kieselgel erfolgt durch elektrostatische Wechselwirkungen (z.B. mit SiO⁻/NH⁺-Gruppen) durch den Kontakt Sorbens/Protein. Ferner kann die Adsorption der Enzymproteine auf der Schicht durch Wasserstoffbrückenbindung oder auch hydrophobe Wechselwirkungen zustande kommen (Doerr 1983). Diese Wechselwirkungen bedingen aber auch eine teilweise Deaktivierung der adsorbierten Enzymmoleküle.

Wird loses Sorbensmaterial in eine definierte Enzymlösung gegeben, so kann man bei der Betrachtung der enzymatischen Restaktivität im Überstand feststellen, dass die größte Adsorptionskraft die Amino- und die Diol-Phase auf die Enzymproteine ausüben, gefolgt von der Cyano-Phase und dem unmodifizierte Kieselgel. Die geringste Absorption beobachtet man bei der RP-18-Phase (Abb. 11).

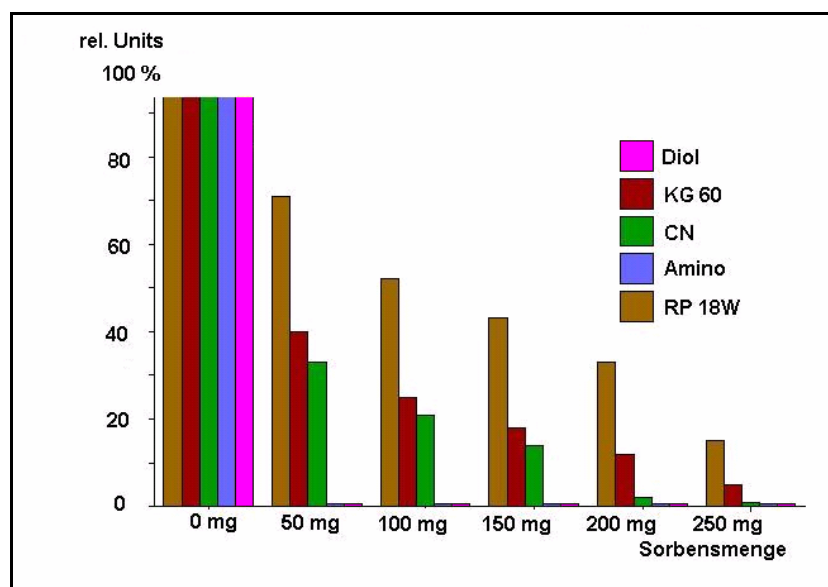


Abb. 11: Adsorptionsverhalten einer definierten Aktivität der Cholinesterase (2,5 U im mL 0.5M Tris-HCl-Puffer pH 7.6) in Abhängigkeit von der Menge und der chemischen Struktur des Sorbens. Gemessen wurde die Restaktivität im Überstand der Suspension durch Spaltung von S-Butyrylthiocholiniodid bei pH 7,8 in vitro (Whittaker 1984)

Diese Untersuchungen machen deutlich, dass in der wirkungsbezogenen Analytik die Sorbentien sehr gut als Trägermaterialien für Enzymtests geeignet sind, die wasserbenetzbar sind. Hydrophobe nicht wasserbenetzbare Schichten, wie RP 18 –Material¹², sind hingegen nicht als Trägermaterial für Enzymhemmtest einsetzbar.

Enzymaktivitätsnachweis adsorbierter Cholinesterase auf verschiedenen Sorbentien

Bei der Bestimmung der adsorbierten Cholinesteraseaktivität auf der Dünnschichtplatte wird die enzymkatalysierte Umsetzung von Naphthylacetat (S) mit Hilfe der Bildung des Produktes (P) von Echtblausalz bei $\lambda=533$ nm gemessen (Veröff. I).

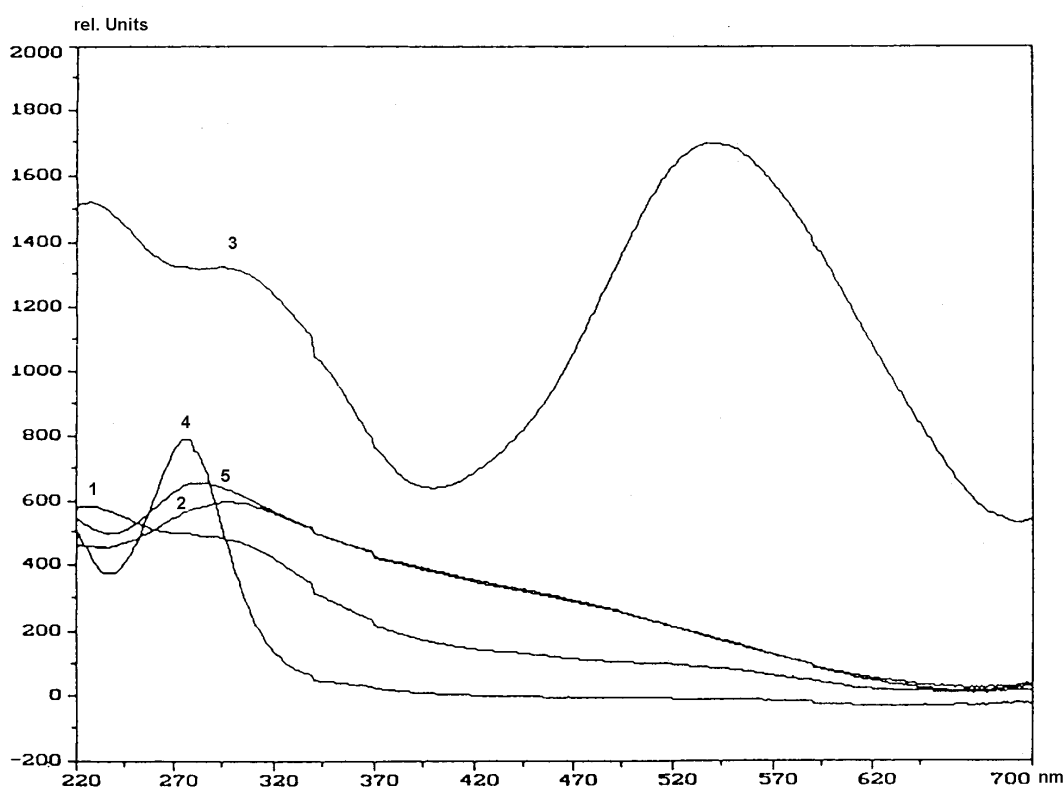


Abb. 12: Absorptionsspektren der Ausgangsprodukte des gebildeten Azofarbstoffes, aufgenommen auf einer HPTLC-Platte KG 60 F254 mit einem TLC-Scanner (Scanner CD 60, Desaga, Heidelberg, Deutschland). 1-Naphthol (1), Echtblau B (2), Diazoniumsalz (3), 1-Naphthylacetat (4), 1-Naphthylacetat mit Echtblau B (5), (Original Scannerausdruck CD 60, Desaga, Heidelberg, Deutschland)

¹² Nicht wasserbenetzbare Schichten sind jedoch für organismische Testverfahren z.B. bei Verwendung der mit Agar Overlay-Technik für die wirkungsbezogene Analytik einsetzbar

Es ist möglich, die Bildung des enzymatisch gebildeten Farbstoffes bei $\lambda=533$ nm auf der Kieselschicht zu verfolgen. Abb. 13 zeigt die Kinetik der Cholinesteraseaktivität in einem Zeitraum 0.8 - 6 min. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist abhängig von der Menge an aktivem Enzym auf der Sorbenschicht. Das Gleichgewicht der Reaktion wurde unter den in Abb. 13 beschriebenen Bedingungen nach 8 min erreicht.

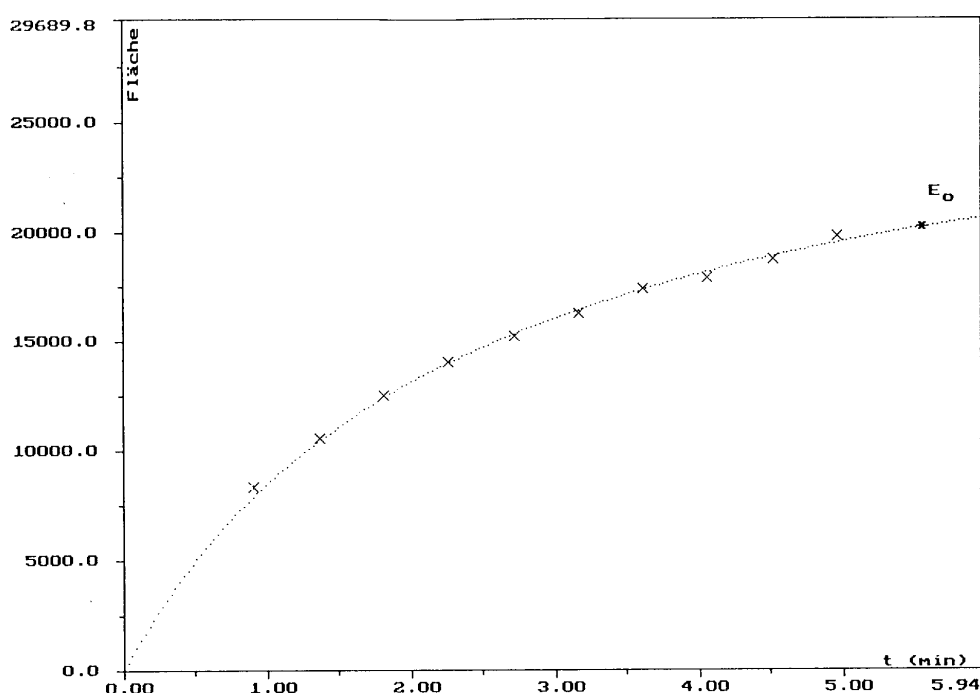


Abb. 13: Kinetik der Bildung von 1-Naphthol aus Naphthylacetat bei $\lambda=533$ nm auf einer HPTLC-Fertigplatte KG 60 F254, Enzymaktivität der Tauchlösung 100 U/mL, Proteinkonzentration 0.061 mg/mL, spezifische Aktivität 1639,34 U/mg Protein (Original Scannerausdruck CD 60, Desaga, Heidelberg, Deutschland)

Durch die Zugabe von enzymatisch inertem Rinderserumalbumin (BSA) und Senkung der spezifischen Aktivität in der Enzymlösung, wurde die Menge an aktivem Enzym auf dem Sorbens jedoch signifikant und somit die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich erhöht. Bei einer spezifischen Aktivität des Cholinesterase von 2 U/mg (100U/mL Cholinesterase und 0.05 % BSA Konzentration) wurde das Reaktionsgleichgewicht auf einer KG60 F HPTLC-Platte bereits nach 2 min erreicht. Die definierte Zugabe von Rinderserumalbumin (BSA) in die Tauchlösung des Enzyms schafft für die enzymatische Umsetzung auf einem Sorbens standardisierte Bedingungen. Nur eine definierte und gleichmäßige enzymatische Umsetzung auf der stationären Phase ergibt eine störungsfreie Basislinie, die wiederum eine quantitative Auswertung von Enzyminhibitoren erlaubt (Veröff. I). Abb. 14 zeigt den Einfluss des BSA-Anteils in der Tauchlösung auf die Cholinesteraseaktivität bei

verschiedenen Sorbentien.

Die höchste Aktivität ist auf der KG60 Phase zu beobachten. Das hohe Denaturierungspotential aktivierter Silanolgruppen bei KG60 Platten kann durch die Zugabe von BSA signifikant vermindert werden (KG 60F₂ in Abb. 14). Bei RP18 Phasen ist der Einfluss der Restsilanolgruppen im Sorbens auf das Enzym vernachlässigbar, die Enzymaktivität kann jedoch durch die Zugabe von BSA nicht mehr gesteigert werden. Auf Amino-Phasen ist eine Spontanhydrolyse von 1-Naphthylacetat zu beobachten. Werden die Silanolgruppen bereits durch eine MeOH-Konditionierung inaktiviert, fällt die Aktivitätssteigerung durch das zugesetzte Rinderserumalbumin nur sehr gering aus (KG 60F₁ in Abb. 14).

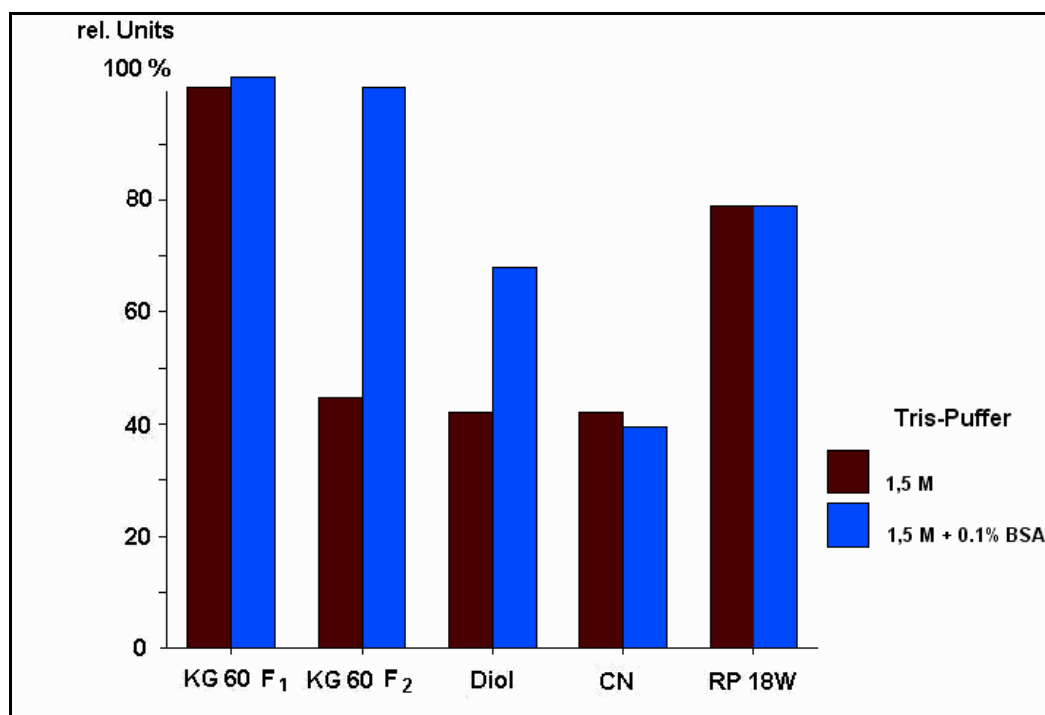


Abb. 14: Einfluss des Proteingehalts im Puffer auf die Enzymaktivität auf verschiedenen stationären Phasen, KG 60 F₁ (die Silanolgruppen der KG 60 F Platte wurden durch MeOH Konditionierung inaktiviert). KG 60 F₂ (die Silanolgruppen wurden durch Vorbehandlung des Sorbens 30 min bei 110°C aktiviert)

Bei diesen Untersuchungen wird deutlich, dass die Amino-Phase sich nicht als inerte Trägerschicht bei dem Cholinesterasetest verhält. Es gilt daher bei jedem Enzymtest auf einer Sorbensschicht die Reaktivität des Plattenmaterials zu bestimmen und gegebenenfalls auszuschalten.

3.1.3.2 Quantifizierung und Bestimmung der Nachweisgrenze von Cholinesterase-Inhibitoren

Bei der Quantifizierung enzymatisch detektierter Inhibitoren besteht zunächst eine lineare Korrelation zwischen dem Hemmsignal und der eingesetzten Inhibitorkonzentration bei konstanter Enzymkonzentration und konstanter Inkubationszeit.

Bei höheren Inhibitorkonzentrationen verläuft die Kalibrierkurve nach einer Funktion höherer Ordnung. Bei dem *in vitro* Messverfahren nach DIN 38415 Teil 1 wird bei der Cholinesterase die Umsatzgeschwindigkeit photometrisch verfolgt (Abb. 15).

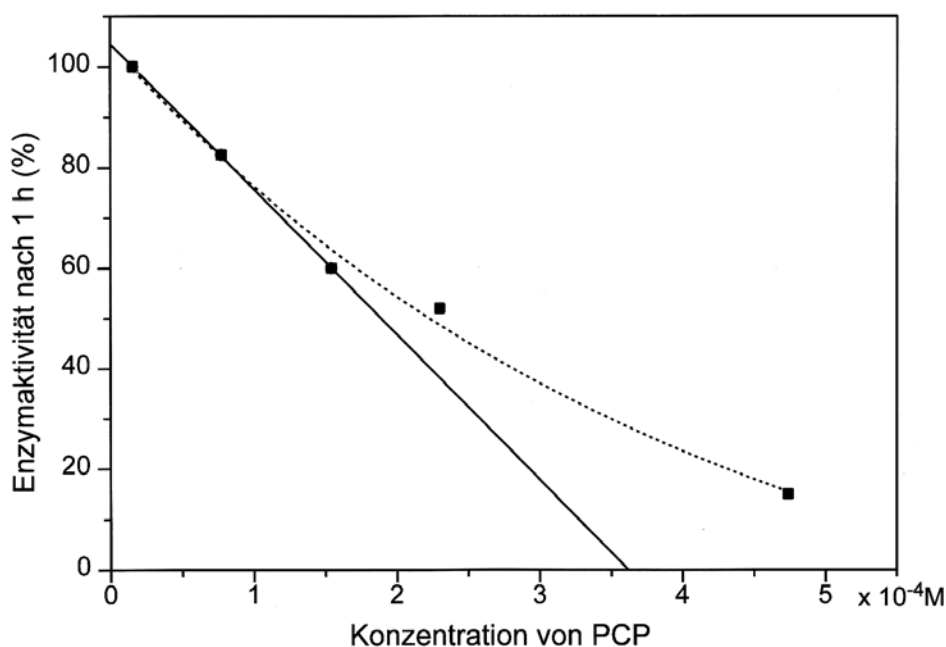


Abb. 15: Abhängigkeit der Cholinesteraseaktivität von der Inhibitorkonzentration Pentachlorphenol (PCP) *in vitro* (nach DIN 38 415 Teil 1 Ausgabe 1995-02)

Auf der Dünnschichtplatte ist die Höhe oder die Fläche des Messsignals des Chromatogramms das Maß für die Enzyminhibition (Abb. 16). Sowohl das *in vitro* Verfahren als die Messung auf der HPTLC-Platte (*in situ*) zeigen einen analogen Verlauf.

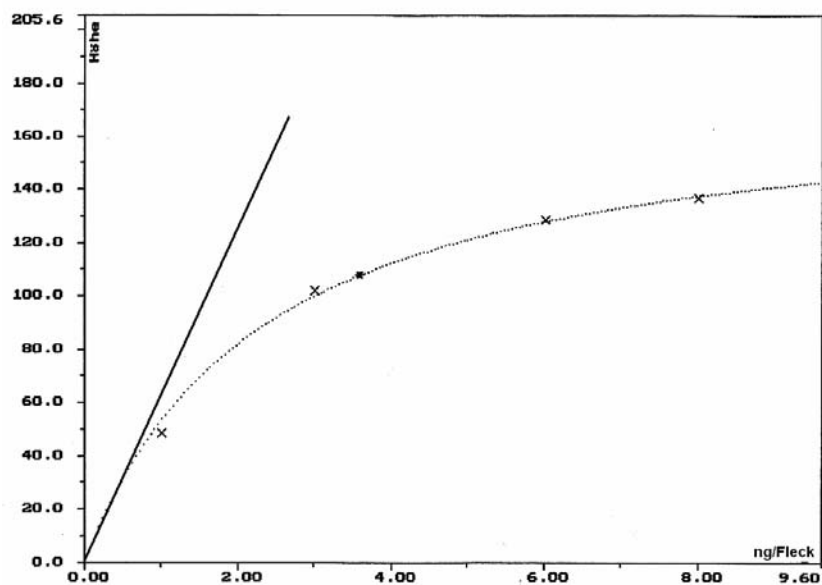


Abb. 16: Abhängigkeit der Cholinesteraseaktivität von der InhibitorKonzentration Paraoxon-Methyl in situ auf HPTLC KG 60 F (Original Scannerausdruck CD 60, Desaga, Heidelberg, Deutschland)

Im linearen Bereich lassen sich nach der chromatographischen Trennung, Cholinesteraseinhibitoren quantitativ bestimmen, sowie die Nachweisgrenze ermitteln (Abb. 17).

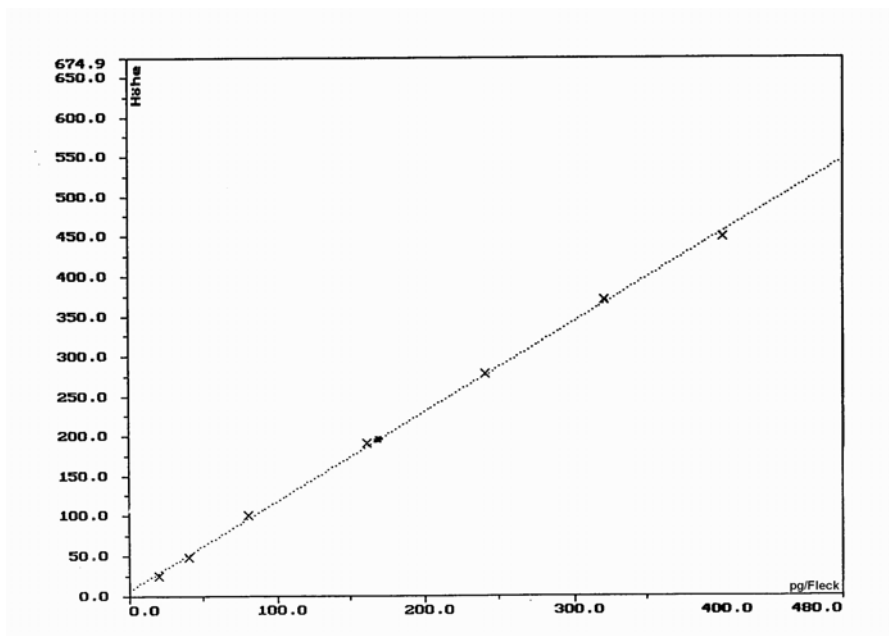


Abb. 17: Kalibriergerade von Paraoxon (20-400 pg/5 mm Band) auf einer KG 60 F HPTLC-Platte, Detektion mit Cholinesterasehemmtest $\lambda = 533$ nm, (Original Scannerausdruck CD 60, Desaga, Heidelberg, Deutschland)

Die Nachweisgrenze von Paraoxon wurde in Abb. 17 mit dem postchromatographischen Cholinesterasehemmtest bei 20 pg/ 5mm Band ermittelt. Bei einer konstanten Enzymkonzentration und

einer konstanten Reaktionszeit ist die Höhe (bzw. die Fläche) des Hemmsignals der Konzentration des Inhibitors (bei Paraoxon zwischen 20-400 pg/5mm Band) proportional. Bei höheren Inhibitor-konzentrationen zeigt die Kalibrierkurve einen polynomen Kurvenverlauf 2. Ordnung (Veröff. I).

Bei der Messung des Höhen bzw. Flächensignals bei der Enzyminhibitionsmessung auf der Dünnschichtplatte entspricht die Basislinie der Menge an ungehemmtem Enzym E_0 , wobei in Gegenwart von Enzyminhibitoren in den weißen Hemmflecken die Enzymkinetik von E_1 zu messen ist. Das gemessene Hemmsignal (die Höhe oder Fläche) ist somit das Resultat von $E_0 - E_1$ (siehe Abb. 18).

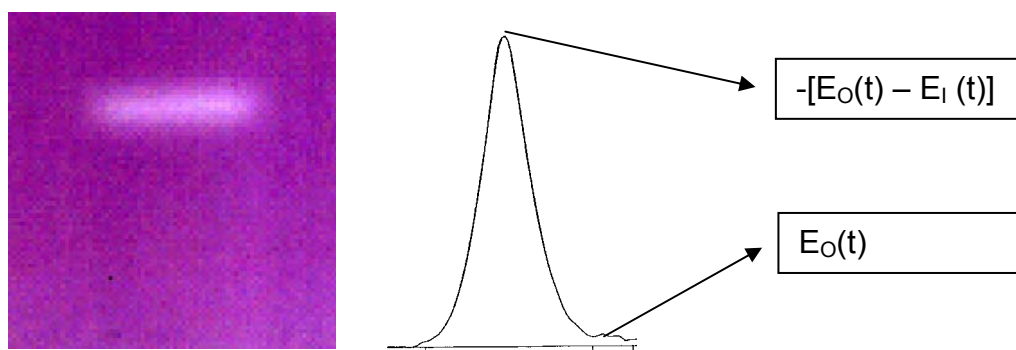


Abb. 18 Postchromatographische enzymatische Detektion von Paraoxon-Methyl (0.4 ng)

Die Höhe des Signals ist abhängig von der Reaktionszeit, da in der „steady state“ Phase des ungehemmten Enzyms E_0 die Gleichgewichtsphase bereits erreicht wurde, E_1 zu diesem Zeitpunkt sich noch nicht im Gleichgewichtszustand befindet und stattdessen, wenn auch mit geringerer Geschwindigkeit, noch Substrat umsetzen kann.

Somit muss man von einer Veränderung des Resultats der Gleichung $E_0 - E_1$ in Abhängigkeit von der Zeit ausgehen. Dies bedeutet, dass in Gegenwart eines Inhibitors die Höhe des Messsignals kleiner wird in Abhängigkeit von der Dauer der Umsatzreaktion. Abb. 19 zeigt das Messsignal von Paraoxon, detektiert durch die Cholinesterasehemmung auf der Platte in Abhängigkeit von der Zeit.

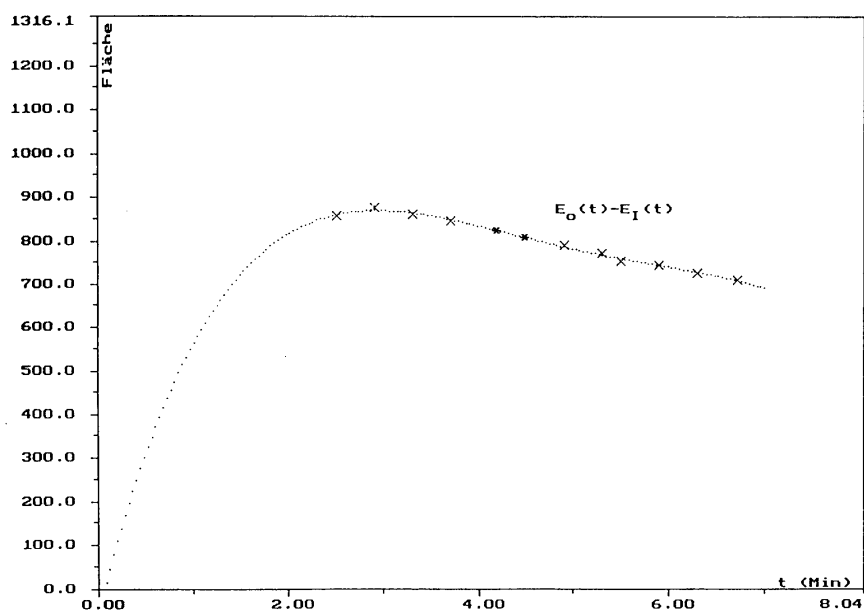


Abb. 19: Abhängigkeit der Fläche des Paraoxon - Hemmsignals von der Zeit, (0.1 ng/5 mm Band auf einer KG 60 F HPTLC-Platte, Detektion mit dem Cholinesterasehemmtest, $\lambda = 533$ nm, (Original Scannerausdruck CD 60, Desaga, Heidelberg, Deutschland)

Einflussfaktoren auf die Detektionsgrenzen von Enzyminhibitoren auf der HPTLC-Platte

Die Detektionsgrenze ist der Messwert y_{\min} , der sich vom Blindwert y_b um dessen dreifache Standardabweichung σ_B unterscheidet (Frey 1993).

$$y_{\min} = y_b + 3\sigma_B \quad (\text{Gl.3})$$

Die Höhe des Messsignals bei enzymatischen Detektionen von Schadstoffen auf der Dünnschichtplatte hängt von folgenden Faktoren ab:

- der Menge an aktivem Enzym in der Tauchlösung
Die Lagerungsbedingungen und die Lagerungszeit einer Tauchlösung haben einen Einfluss auf die Enzymaktivität der Lösung.
- der Menge an aktivem Enzym auf dem Sorbens
Hier bestimmt die Zusatzmenge an inertem Protein, wie z.B. BSA, die Menge an aktivem Enzym auf dem Sorbens und somit die Umsatzgeschwindigkeit.
- die Reaktionszeit auf der Platte
Da das Messsignal ($E_0 - E_1$) auf der Dünnschichtplatte auf der Basis von E_0 berechnet wird, bestimmt die Reaktionszeit des Enzyms das Messsignal.

Aufgrund dieser Einflussfaktoren des Testsystems auf die Detektionsgrenze einer Substanz können statistisch nur dann gesicherte Aussagen gemacht werden, wenn die Kalibrierung und Probenbestimmung gemeinsam auf einer Dünnschichtplatte erfolgen. Bei einer HPTLC-Platte mit dem Format 10 x 20 cm stehen z.B. bei einer Bandbreite von 5 mm und einem Bahnabstand von 5 mm 18 Auftragemöglichkeiten zur Verfügung. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, müssen Enzymlösungen mit einem bekannten Gehalt an spezifischer Aktivität verwendet sowie die Inkubationszeiten und die Reaktionszeiten genau definiert werden.

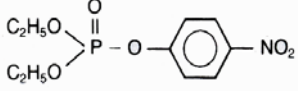
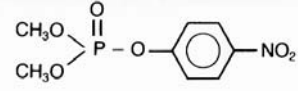
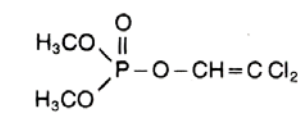
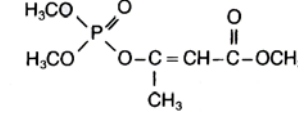
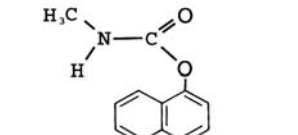
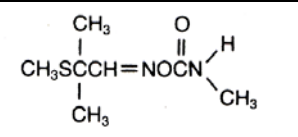
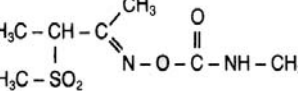
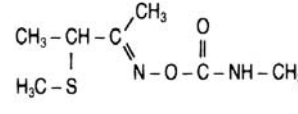
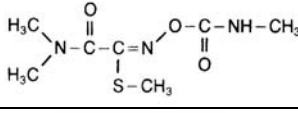
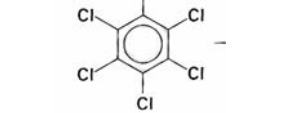
Abhängigkeit der Detektionsgrenze von der Hemmkonstante des Inhibitors

Neben den Testbedingungen auf der Platte ist die Detektionsgrenze abhängig von der jeweiligen Hemmkonstante k_i des Wirkstoffes: k_i ist die Geschwindigkeitskonstante für die Bildung des Inhibitor – Enzymkomplexes. Sie ist eine Stoffkonstante und hängt von der chemischen Struktur des Inhibitors ab. Je größer k_i ist, umso schneller bildet sich der Inhibitor– Enzym-komplex, umso niedriger liegt die Detektionsgrenze bei der postchromatographischen Detektion auf der Dünnschichtplatte und umso selektiver ist das enzymatische Detektionsverfahren. Die Hemmkonstante stellt somit bei Schadstoffen ein Maß für die Toxizität gegenüber einem Ziel-Enzym dar.

Ebenso können die *in vitro* gemessenen Hemmkonstanten eines Inhibitors in Abhängigkeit von dem eingesetzten Enzym und seiner biologischen Herkunft große Unterschiede aufweisen. Die Hemmwirkung eines Insektizids auf verschiedenen Cholinesterasen kann zum Teil um Größenordnungen variieren (Herzprung 1991). Aus diesem Grund wurde bei allen Untersuchungen Butyrylcholinesterase aus Pferdeserum (BChe/H) eingesetzt, um einen Vergleich mit den Literaturdaten aus *in vitro* Untersuchungen möglich zu machen.

Trotz der unterschiedlichen Versuchsanordnungen können die *in vitro* ermittelten Hemmkonstanten und die Detektionsgrenzen als ein wichtiger Anhaltspunkt für die toxische Potenz eines Inhibitors angesehen werden.

Tab. 4 Detektionsgrenzen cholinesterasehemmender Insektizide auf der Kieselgelplatte (Veröff. I)

| Formel | Insektizide | Detektionsgrenze [ng / 5mm Band] | Hemmkonstante $k_i = [L / \text{mol}^{-1} \times \text{min}^{-1}]$ (Herzprung 1991) |
|---|------------------|-------------------------------------|---|
|  | Paraoxon-ethyl | 0,013 ng | $4,9 \times 10^5$ |
|  | Paraoxon-methyl | 0,400 ng | $2,2 \times 10^4$ |
|  | Dichlorvos | 0,100 ng | $5,2 \times 10^4$ |
|  | Mevinphos | 0,200 ng | $1,4 \times 10^4$ |
|  | Cabaryl | 0,200 ng | $2,7 \times 10^4$ |
|  | Aldicarb | 0,400 ng | $1,6 \times 10^4$ |
|  | Butoxycarboxim | 0,100 ng | $3,2 \times 10^3$ |
|  | Butocarboxim | 0,800 ng | $1,6 \times 10^3$ |
|  | Oxamyl | 0,800 ng | $1,4 \times 10^5$ |
|  | Pentachlorphenol | 20,00 ng | $1,0 \times 10$ |

Aus Tabelle 5 wird sichtbar, dass Paraoxon-ethyl stärker hemmt als Paraoxon-methyl und somit auch analog in der HPTLC eine geringere Nachweisgrenze aufweist. Pla und Johnson (1989) stellen eine Abhängigkeit der Hemmkonstanten von der Größe des Acylrestes fest.

Tab. 5 Hemmkonstanten für Paraoxonderivate (Pla und Johnson 1989)

| Paraoxon | - methyl | - ethyl | - di-n-propyl | - di-n-butyl |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| ki [Lxmol ⁻¹ xmin ⁻¹] | 2,2x10 ⁴ | 4,9x10 ⁵ | 1,3x10 ⁵ | 4,7x10 ⁷ |

Die von Herzsprung (1991) ermittelten Hemmkonstantem ki korrelieren bis auf Butoxycarboxim und Oxamyl mit den auf der Dünnschichtplatte bestimmten Detektionsgrenzen von Organophosphor-Insektiziden und insektiziden Carbamaten.

Basierend auf der Arbeit von Geike (1972) wurde die Hemmkonstante von Pentachlorphenol (PCP) in vitro nach DIN 38 415 Teil 1 Ausgabe 1995-02 und die Detektionsgrenze postchromatographisch mit dem Cholinesterasehemmtest auf einer HPTLC KG60F-Platte ermittelt. Geike untersuchte in seiner Arbeit die inhibitorischen Eigenschaften von PCP gegenüber verschiedenen Enzymen, wie Leberesterase, alkalische Phosphatase, saure Phosphatase, α -Amylase und β -Amylase. Auf einer DC Platte konnte er 1971 eine Detektionsgrenze von 20 μ g PCP/ Auftragefleck im Leberesterasehemmtest ermitteln.

PCP ist eine schwache Säure (pKa = 4.96). Bei pH 7.6, im optimalen pH-Bereich für den Cholinesterasehemmtest, ist PCP praktisch vollständig in das Phenolat dissoziiert. PCP entkoppelt die oxidative Phosphorylierung. Es bindet bevorzugt an mitochondriale Proteine und kann dadurch Enzyme der oxydativen Phosphorylierung beeinträchtigen, so dass die Bildung von ATP und der zelluläre Energiefluss gestört werden. Als Folge der zu geringen ATP-Bildung steigt die Stoffwechselaktivität an, die wiederum einen erhöhten Sauerstoffbedarf zur Folge hat (Sagunski und Perger 1997).

Die nach Herzsprung (1991) ermittelte Hemmkonstante von PCP ergibt einen Wert von 1,0 x 10 kann bei einer Hemmkonstante von 10 L / mol⁻¹ x min⁻¹ [L x mol⁻¹ x min⁻¹]. Sie ist damit um das 3000-fache kleiner als die Hemmkonstante von Butoxycarboxim. PCP kann somit nicht als selektiver Inhibitor der Cholinesterase bezeichnet werden. Die Detektionsgrenze auf einer HPTLC-Platte liegt bei 20 ng/5 mm Band und liegt im Vergleich zu den Detektionsgrenzen von Carbamaten und

Organophosphorsäuren relativ hoch und korreliert auch mit der in vitro bestimmten Hemmkonstanten. (Tab. 4)

Ein direkter Vergleich der beiden Methoden kann aufgrund der oben beschriebenen Einflussfaktoren des enzymatischen Verfahrens auf der Dünnschichtplatte nicht gezogen werden. Die Hemmkonstanten und die Detektionsgrenzen auf der Platte geben aber einen ersten Hinweis auf die Toxizitätsstärke eines Inhibitors.

3.1.4 Validierung des Cholinesterasehemmtestes

Um die Qualität der Analysenergebnisse mit den verschiedenen Detektionsverfahren abzusichern, wurden die Nachweis- Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen von Paraoxon als Inhibitor des Cholinesterasehemmtestes nach DIN 32 645 ermittelt.

Definition der Nachweisgrenze (NG):

Die Nachweisgrenze stellt den kleinsten Messwert dar, der mit einer vorgegebenen Sicherheit vom Blindwert zu unterscheiden ist. Besitzt eine Probe genau diesen Gehalt des Analyten, so wird in 50% der Fälle der konkrete Messwert kleiner als die Nachweisgrenze sein (β -Fehler = 50%) (Abb. 20).

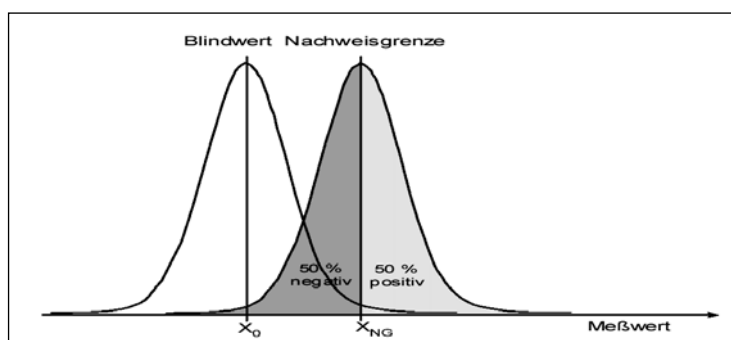


Abb. 20: Definition der Nachweisgrenze (DIN 32 645)

Erhält man bei einer Analyse Messwerte im Bereich der Nachweisgrenze, kann mit der vorgegebenen Sicherheit (Signifikanz) von z.B. 99% entsprechend einer Unsicherheit von 1% (α -Fehler) davon ausgegangen werden, dass der Analyt vorhanden ist.

Definition der Erfassungsgrenze (EG):

Um den β -Fehler der Nachweisgrenze zu verringern, wurde die Erfassungsgrenze eingeführt. Sie stellt den Messwert dar, bei dem der β -Fehler gleich dem α -Fehler ist. Damit entspricht die Erfassungsgrenze dem 2-fachen der Nachweisgrenze.

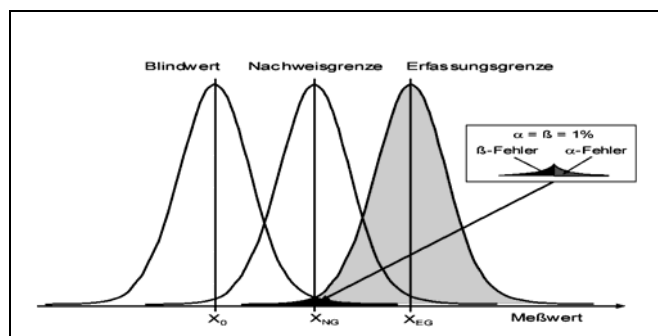


Abb. 21: Definition der Erfassungsgrenze (DIN 32 645)

Unter Zugrundelegung eines α -Fehlers von 1% ist der Analyt auch hier, wie bei der Nachweisgrenze, mit einer Sicherheit von 99% nachgewiesen (Abb. 21).

Definition der Bestimmungsgrenze (BG):

Im Konzentrationsbereich der Bestimmungsgrenze wird die Anwesenheit des Analyten vorausgesetzt. Über das die Kalibrationsgerade umschließenden Vertrauensband (VB) errechnet sich der Bestimmungsfehler \pm VB. VB ist in der Arbeitsbereichsmittle am kleinsten und steigt mit zunehmender Entfernung von der Mitte (Abb. 22).

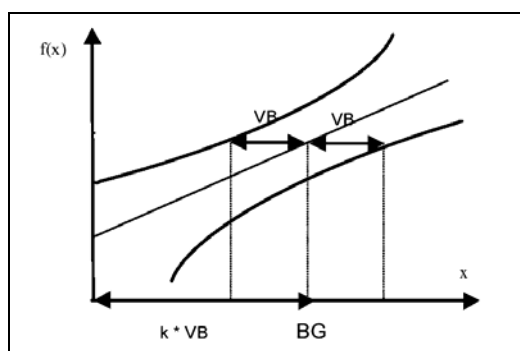


Abb. 22: Definition der Bestimmungsgrenze (DIN 32 645)

Es gilt $BG = k \times VB$, näherungsweise auch $BG = k \times NG$. Die Bestimmungsgrenze bezeichnet den Konzentrationswert, bei dem der relative Fehler erstmals die vorgegebene Schranke der Ergebnis-

unsicherheit unterschreitet z.B. $k=3$ entsprechend 33,3.

Nach der Festlegung des Arbeitsbereichs erfolgt die Wahl der Kalibrationspunkte, die äquidistant über den Arbeitsbereich verteilt liegen sollten. Die Konzentrationen der Kalibratoren werden dann gegen die mit der Analysenmethode gemessenen Informationssignale, meist Peakfläche oder Peakhöhe, aufgetragen. Aus der die Streuung der Kalibrationspunkte um die Ausgleichsgerade ergeben sich die analytischen Grenzwerte nach DIN 32645 und der Vertrauensbereich nach DIN 38402. Aus den Kalibrierfunktionen werden die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen von Parathion und Paraoxon mit verschiedenen Detektionsverfahren: der UV - Detektion, mit Palladiumchlorid bzw. Gibb`s Reagenz und dem Cholinesterasehemmtest berechnet (Tab. 6).

Tab. 6 Vergleich der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen von Parathion und Paraoxon mit verschiedenen Detektionsverfahren (DIN 32645)

| Organo-phosphat | Pd-Chlorid [ng/Fleck] | Gibb`s Reagenz [ng/Fleck] | $\lambda= 270 \text{ nm}$ [ng/Fleck] | Cholinesterasen-Inhibition [ng/Fleck] ¹³ | |
|-----------------|------------------------------------|---------------------------|--|---|---------------------|
| | | | | ohne Ox. | mit Ox. |
| Parathion | NG ¹⁴ : $7.52 \pm 1,2$ | NG: 9.23 ± 1.6 | NG: 6.04 ± 0.4 | --- | NG: 0.20 ± 0.09 |
| | EG ¹⁵ : 15.19 ± 3.2 | EG: 18.45 ± 2.8 | EG: 12.09 ± 0.6 | | EG: 0.38 ± 0.20 |
| | BG ¹⁶ : 24.00 ± 4.7 | BG: 28.82 ± 3.2 | BG: 19.30 ± 1.8 | | BG: 0.62 ± 0.29 |
| Paraoxon | --- | --- | NG: 6.38 ± 0.4 EG: 12.76 ± 0.7 BG: 19.17 ± 1.6 | NG: 0.013 ± 0.007 EG: 0.026 ± 0.013 BG: 0.052 ± 0.022 | --- |

Es wurden die Werte von drei Platten mit je drei Parallelbestimmungen auf einer Platte unter den gleichen chromatographischen Bedingungen und dem Cholinesterasehemmtest als Detektionsverfahren für die statistische Auswertung herangezogen.

Um quantitative Aussagen von Schadstoffwirkungen unbekannter Substanzen machen zu können, kann als Maß die Wirkungsstärke einer bekannten Substanz als Vergleich herangezogen werden. Für die Cholinesterasehemmung ist Paraoxon als eine Referenzsubstanz für derartige Wirkungsäquivalente bekannter Toxine ein gutes Beispiel.

¹³ Mit Ox: Parathion wurde durch Bromoxidation in das entsprechende Phosphonat umgesetzt.

¹⁴ NG: Nachweisgrenze,

¹⁵ EG: Erfassungsgrenze

¹⁶ BG: Bestimmungsgrenze

Bedingungen für den Cholinesterasehemmtest (Veröff. I):

| | |
|---|---|
| Applikation der Proben: | Inhibitoren als Bänder mit 5mm Breite aufgetragen, |
| Chromatographische Methode: | Einfachentwicklung in einer HPTLC-Entwicklungskammer ohne Kammersättigung bei Raumtemperatur |
| Stationäre Phase: | KG 60 F 254s (MERCK, Art. Nr. 5365), vorgewaschen durch einmalige Entwicklung der Platte in 2-Propanol, getrocknet 30 Minuten bei 110 °C |
| Mobile Phase: | THF/n-Hexan 7+25 (v/v) |
| Entwicklungszeit: | 15 min |
| Wanderungstrecke der mobilen Phase: | 5 cm |
| Entfernen der organischen Lösemittel: | 20 min im Luftstrom bei Raumtemperatur |
| Enzymlösung und Umsatzaktivität: | 11mg Cholinesterase aus Pferdeserum (50U/mg) gelöst in 180 mL 0.05M Tris-HCL Puffer pH 7.8 mit 0.1 % BSA; Volumenaktivität des Enzyms 2.8 U/mL |
| Tauchzeit der Platte in die Enzymlösung: | 2 Sekunden |
| Inkubationszeit: | 30 Minuten bei 37 °C in einer Kammer mit 90% Luftfeuchtigkeit |
| Substratlösung | 1 Teil Lösung 1 (250 mg 1-Naphthylactat gelöst in 100 mL absolutem Ethanol) und 4 Teile Lösung 2 (400 mg Echtblausalz gelöst in 160 mL Aqua dest.) werden vor Gebrauch gemischt |
| Tauchzeit in die Substratlösung: | 2 Sekunden |
| Reaktionszeit der Cholinesterase: | exakt 3 Minuten, Reaktion wird mit warmen Luftstrom gestoppt |

3.1.5 Reinheitskontrolle von Standardsubstanzen mit dem Cholinesterasehemmtest

Ein Standard ist ein Präparat einer chemischen Substanz, das als Referenzprobe verwendet werden kann, um z.B. die Richtigkeit eines Analysenverfahrens zu beurteilen. Standardproben sind Proben,

deren Konzentration der interessierenden Substanz hinreichend genau bekannt ist und die somit als „Standards“ verwendet werden. Wichtig ist, dass diese kommerziell erhältlichen Materialien „eine“ definierte Matrix (z.B. reines Lösemittel) und „eine“ Konzentration enthalten (z.B. eine Oxidationsstufe eines Elements etc.) (Funk et al. 1985).

Die High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) stellt ein robustes Verfahren dar für die Überprüfung und Reinheitskontrolle von Standardsubstanzen. Besonders bei hohen Untersuchungszahlen z.B. bei Prozesskontrollen in der chemischen Industrie oder bei der Reinheitskontrolle von Pharmazeutika gilt die HPTLC als eine zuverlässige und schnelle Methode. So gibt ein Verteilungschromatographisches Trennsystem mit Reversed Phase (RP)-Material als stationäre Phase Auskunft über die unterschiedliche Lipophilie einzelner Komponenten eines Stoffgemisches. Adsorptionchromatographische Trennsysteme, die z.B. aus Kieselgel oder Aluminiumoxid als stationärer Phase bestehen, ermöglichen über die Retentionszeit oder die Migrationsstrecke im Chromatogramm eine Aussage über Polaritätsunterschiede innerhalb eines Schadstoffgemisches. Der Einsatz dieser Chromatographieverfahren ist besonders dann von Vorteil, wenn von Schadstoffen die entsprechenden oxidativen Abbauprodukte erfasst werden sollen, die polarer sind als ihre Ausgangsprodukte.

3.1.5.1 Parathion

Parathion (O,O-Diethyl-O-4-nitro-phenylthiophosphat) wird vom menschlichen Organismus oral, inhalativ und dermal gut resorbiert. Bei der oxidativen Desulfurierung der P=S - Bindung entstehen aktive P=O - Metaboliten.

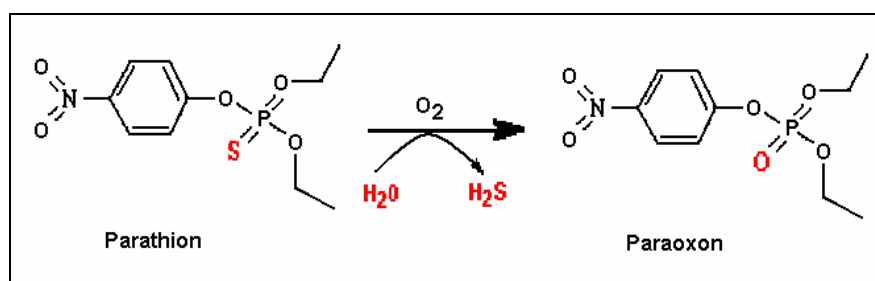


Abb.23: Oxidative Desulfurierung von Parathion zu Paraoxon

Diese Metabolisierung kann mit Hilfe der Biotransformation aber auch abiotisch erfolgen. Das entstandene Paraoxon besitzt eine 1000- fach höhere Toxizität gegenüber der Cholinesterase als

Parathion.

Bei der Überprüfung von Parathion als Standardsubstanz wird mit Hilfe der HPTLC im Chromatogramm bei einer Messwellenlänge von $\lambda=280$ nm ein Substanzpeak nachgewiesen. (Das Adsorptionsmaximum von Parathion liegt bei einer Messwellenlänge von $\lambda=280$ nm (siehe Abb. 24 a).

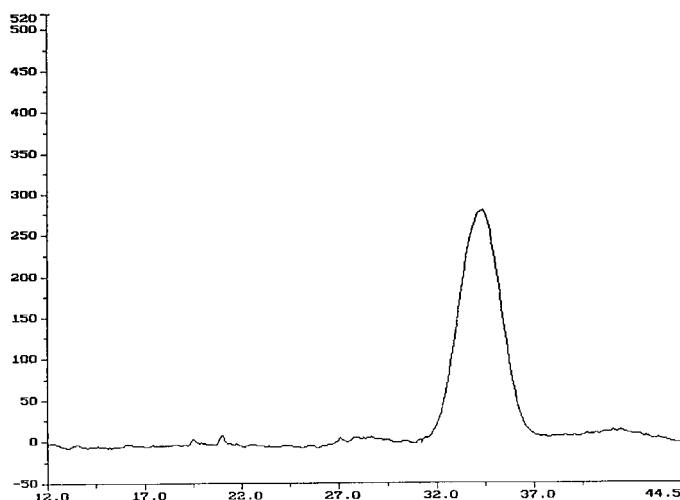


Abb. 24 a
Chromatogramm in mm von 500 ng Parathion, KG 60 F (Merck), Mobile Phase THF/n-Hexan 7+25 (v/v), Messwellenlänge $\lambda=280$ nm, Original Scannerausdruck CD 60, Desaga, Heidelberg, Deutschland

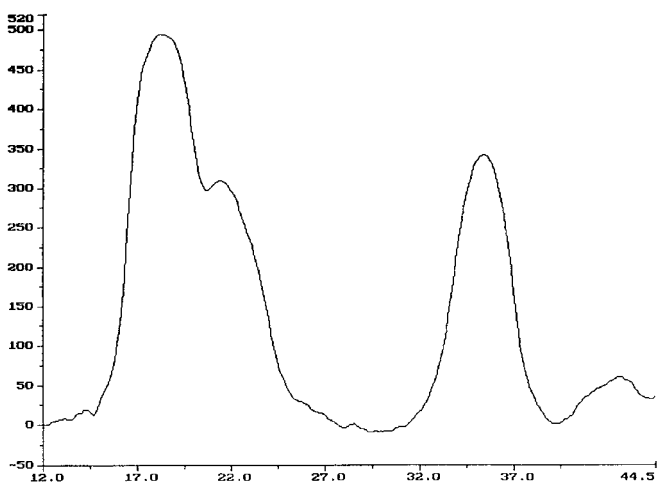


Abb. 24 b
Chromatogramm in mm von 500 ng Parathion, KG 60 F (Merck), Mobile Phase THF/n-Hexan 7+25 (v/v) postchromatographischer Cholinesterasehemmtest, Messwellenlänge $\lambda=533$ nm, Original Scannerausdruck CD 60, Desaga, Heidelberg, Deutschland

Die anschließende Hemmung der Cholinesterase auf dem gleichen Chromatogramm weist Paraoxon - eine bisher nicht erkannte Verunreinigung des Parathions - als toxikologisch relevanten Hauptpeak (bei 17 mm Migrationsstrecke) nach, sowie eine weitere bisher nicht identifizierte Komponente, die aufgrund der Migrationsstrecke etwas unpolarer ist als Paraoxon (siehe Abb. 24 b). Nach der quantitativen Bestimmung des Paraoxons beträgt die Verunreinigung von 500 ng Pa-

rathion mit Paraoxon 0.350 ng; das entspricht einer Verunreinigung von 0,07 % (Weins und Jork 1994).

3.1.5.2 Carbamat-Insektizide

Die Carbamate leiten sich von der Carbaminsäure ($H_2N-COOH$) ab. Die Grundstruktur lässt sich ebenfalls darstellen als: $R_2N-(CX)-Y-R'$. Dabei handelt es sich bei "R" entweder um einen aliphatischen- oder aromatischen Rest. Zudem kann es sich bei "R" auch um ein Wasserstoff-Atom handeln. "X" steht entweder für ein Sauerstoffatom oder für ein Schwefelatom. "Y" kann einerseits für ein O-Atom gelten, aber auch für ein S-Atom oder ein N-Atom. "R'" steht ebenfalls für einen aromatischen oder aliphatischen Rest.

Das Umweltverhalten der Carbamate ist abhängig vom pH-Wert des Mediums, der Lichteinwirkung, der Anwesenheit von Mikroorganismen und dem Mineralstoffgehalt des Bodens. Insektizide und herbizide Carbamate werden im Boden innerhalb weniger Tage bis Wochen durch Hydrolyse abgebaut. Aldicarb wird im Boden innerhalb von 7 Tagen zu etwa 50% zum Aldicarbsulfoxid oxidiert. Der weitere Abbau zum Sulfon erfolgt langsamer (Abb. 25). Neben Aldicarb selbst sind die Oxidationsprodukte Aldicarbsulfoxid und Aldicarbsulfon ebenfalls hochwirksame Inhibitoren der Cholinesterase (Sagunski und Perger 1997). Aufgrund der Hemmkonstanten zeigt das Aldicarbsulfoxid eine 10-mal höhere Hemmwirkung als die Ausgangssubstanz Aldicarb. Die Hemmkonstante von Aldicarb gegenüber der Cholinesterase (BChe/H) ist $k_i=1.0 \times 10^4 [L \times mol^{-1} \times min^{-1}]$ und bei Aldicarbsulfoxid beträgt $k_i=2.5 \times 10^5 [L \times mol^{-1} \times min^{-1}]$ (Herzprung 1991).

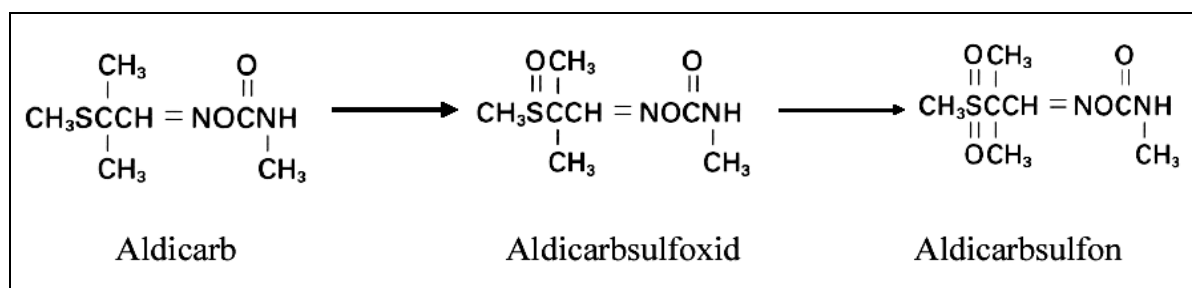


Abb. 25: Oxidativer Abbau von Aldicarb zu Aldicarbsulfoxid und Aldicarbsulfon (Sagunski 1997)

Instrumentelle Analytik von Carbamaten als Standardsubstanzen

In der instrumentellen Analytik erweist sich die Bestimmung von Carbamaten als ein aufwendiges Verfahren. Carbamate sind thermisch instabil, sie zerfallen bei höheren Temperaturen leicht zu einem Isocyanat und dem entsprechenden Phenol. Diese Wirkstoffe können gaschromatographisch in der Regel nur nach einer Derivatisierung detektiert werden (Löbering et al. 1978). Methyl-Carbamate können lediglich mittels Dünnschichtchromatographie, Flüssigchromatographie oder gaschromatographisch nach Derivatisierung zu einem stabilen Derivat nachgewiesen werden (Dressler 1986). S-haltige aliphatische Carbamate wie z.B. Aldicarb, Butocarboxim oder Butoxycarboxim können in der HPTLC nach erfolgter postchromatographischer Derivatisierung quantitativ bestimmt werden. Mit Palladiumchlorid bzw. Gibb's Reagenz werden selektiv nur S-haltige Insektizide nachgewiesen (Funk et al. 1989). Bei der Überprüfung von Aldicarb, Butocarboxim und Butoxycarboxim (jeweils 2 µg/Auftragefleck) wurden die S-haltigen Carbamate mit dem Gibb's Reagenz detektiert. Die Nachweisgrenze lag bei diesem Verfahren bei 20 ng/Auftragefleck (Weins und Jork 1994).

Überprüfung von Methiocarb als Standardsubstanz mit dem Cholinesterasehemmtest

Methiocarb (3,5-dimethyl-4-methyl-thiophenyl N-methylcarbamate) gehört zu der Gruppe der Methyl-Carbamate und wurde 1965 als Insektizid eingeführt. Methiocarb wird heute hauptsächlich als Pflanzenschutzmittel gegen Insekten (Insektizid), Milben (Akarizid) und Schnecken (Molluskizid) in zahlreichen Kulturen und Saatgutbehandlungsmittel gegen Vogelfraß verwendet (Hassall 1990). Der abiotische Abbau von Methiocarb (1) durch Photooxidation verläuft, analog wie bei Aldicarb, von der Ausgangssubstanz über das Methiocarbsulfoxid (2) zu Methiocarbsulfoxid (3) oder zu Methiocarbphenolsulfon (4) (siehe Abb. 26a und 26b).

Neben Methiocarb selbst sind die Oxidationsprodukte Methiocarbsulfoxid und Methiocarbsulfon ebenfalls hochwirksame Inhibitoren der Cholinesterase. Aufgrund der Hemmkonstanten zeigt das Methiocarbsulfoxid eine 3-mal höhere Hemmwirkung als das Methiocarb. Die Hemmkonstante von Methiocarb gegenüber der Cholinesterase (BChe/H) ist $k_i=1.3 \times 10^4$ [L x mol⁻¹ x min⁻¹] und bei Methiocarbsulfoxid beträgt $k_i=4.3 \times 10^4$ [L x mol⁻¹ x min⁻¹] (Herzprung 1991).

Nach der Chromatographie von Methiocarb macht der Cholinesterasehemmtest die Gegenwart von drei Abbauprodukten sichtbar. Mit Hilfe der wirkungsbezogenen Analytik wird in Abb. 24b der

Metabolismus von Methiocarb (1) in das 3-fach wirksamere und polarere Methiocarbsulfoxid (2) deutlich. Methiocarbphenolsulfoxid (3) und Methiocarbphenolsulfon (4) liegen als Phenolderivate klar abgetrennt im unteren Teil des Chromatogramms.

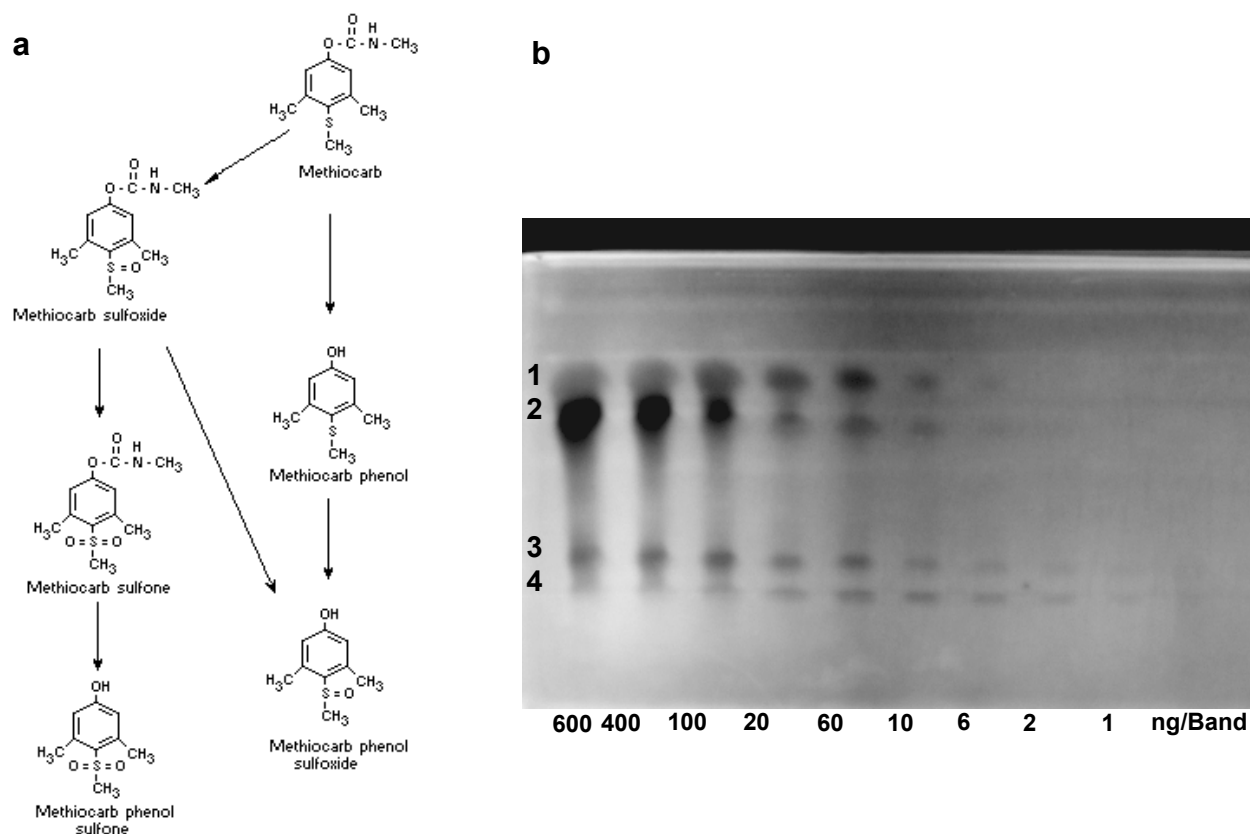


Abb. 26 a.: Abiotische Abbauwege von Methiocarb (Marrs 1998)

Abb. 26 b.: Postchromatographische Detektion der Abbauprodukte von Methiocarb mit dem Cholinesteraseinhibitionstest, stationäre Phase: KG 60 F 254s (MERCK, Art. Nr. 5365) Format: 10x20 cm; Schichtdicke 200 µm, chromatographische Entwicklung: automatische Mehrfachentwicklung nach DIN 38407, Teil 11 mit dem AMD2 Gerät von Camag (Muttenez, Schweiz), Dokumentation mit Peltier Cooled CCD Kamera SensiCam® (AVT Horn, Aalen, BRD), (1) Methiocarb, (2) Methiocarbsulfoxid, (3) Methiocarbphenolsulfoxid, (4) Methiocarbphenolsulfon

Überprüfung von Aldicarb als Standardsubstanz mit dem Cholinesterasehemmtest

Bei der Überprüfung von 2 µg Aldicarb und 2 µg Aldicarbsulfoxid als Referenzsubstanzen wurden nach einer 20 -minütigen Trennzeit auf KG 60 F₂₅₄ als stationäre Phase und THF/n-Hexan 7+25 (v/v) als mobile Phase die Substanzen mit jeweils einem Substanzpeak bei einer Messwellenlänge von λ=370 nm als Einzelsubstanzen nachgewiesen. Die Detektion erfolgte nach einer postchromatographischen Derivatisierung mit Palladiumchlorid (siehe Abb. 27 a).

Der Cholinesterasehemmtest weist auf einem Chromatogramm mit 1,6 ng Aldicarb als Standardsubstanz pro Auftragefleck unter den gleichen chromatographischen Bedingungen sowohl Aldicarb (1) als auch Aldicarb-sulfoxid (2) nach (Abb. 27 b).

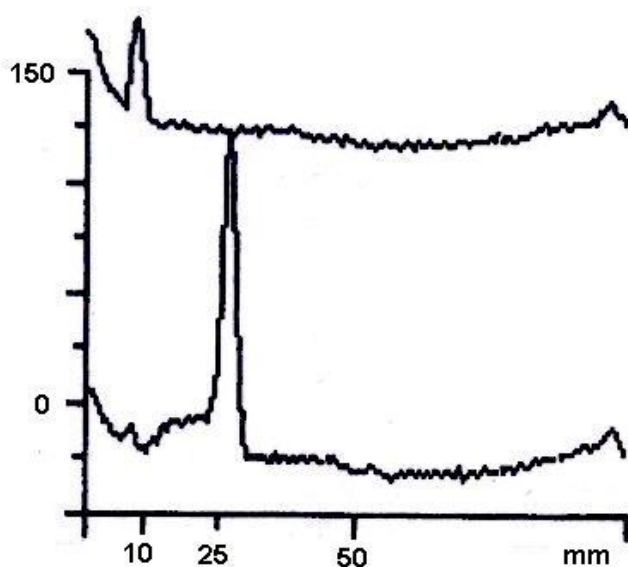


Abb. 27 a
Chromatogramm in mm von 2 µg Aldicarb (1) und 2 µg Aldicarb-sulfoxid (2), KG 60 F254 (Merck), Mobile Phase THF/n-Hexan 7+25 (v/v), Detektion: Pd-Chlorid (Funk 1989), Messwellenlänge $\lambda=370$ nm, (Scannerausdruck CD 60, Desaga, Heidelberg, Deutschland)

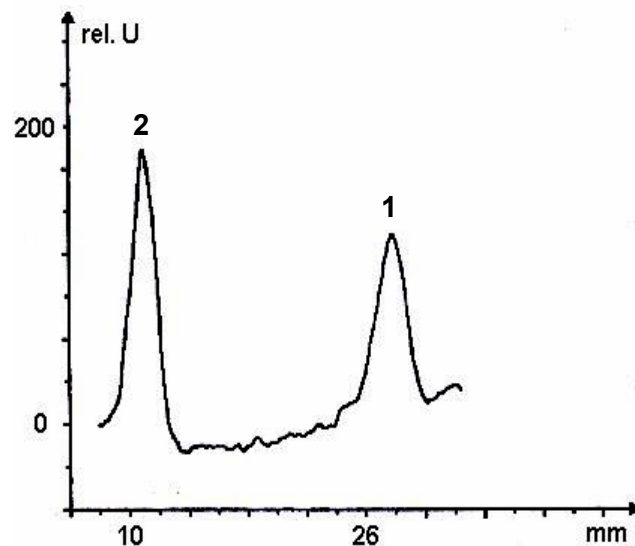


Abb. 27 b
Chromatogramm in mm von 1.6 ng Aldicarb (1), KG 60 F₂₅₄ (Merck), Mobile Phase THF/n-Hexan 7+25 (v/v), Detektion: postchromatographischer Cholinesterasehemmtest, Messwellenlänge $\lambda=533$ nm, (1) Aldicarb, (2) Aldicarb-sulfoxid, (Scannerausdruck CD 60, Desaga, Heidelberg, Deutschland)

Nach der quantitativen Bestimmung des Aldicarb-sulfoxids beträgt die Verunreinigung 0.220 ng. Damit wurden bereits 14 % der angebenen Standardsubstanz oxidativ zu Aldicarb-sulfoxids metabolisiert.

3.1.6 Vorteile der wirkungsbezogenen Analytik bei der Chemikalienüberprüfung

In der Dünnschicht-Chromatographie lassen sich die getrennten Komponenten direkt auf dem Chromatogramm physikalisch-chemisch detektieren und quantifizieren. Durch Kopplung von biochemischen (enzymatischen Hemmteste) oder biologischen Testverfahren ist es möglich, toxikologisch wirksame Substanzen in situ nachzuweisen. Die Testverfahren wurden durch Modifikationen, definierte Versuchsbedingungen und durch den Einsatz instrumenteller Methoden reprodu-

zierbarer und standardisierbar. Somit erlaubt die moderne instrumentelle Dünnschichtchromatographie, aufgrund toxikologischer Wirksignale den Schadstoffgehalt von Einzelstoffen auch quantitativ zu bestimmen und die Methode zu validieren. Die Nachweisgrenze einzelner Wirkstoffe ist abhängig der Hemmkonstanten der jeweiligen Substanz und kann im unteren Pikogrammbe- reich liegen. Eine Quantifizierung der Wirkung ist sowohl mit biochemischen als auch mit biologischen Testverfahren möglich. Hier gilt der Satz, dass je toxischer eine Substanz auf ein bestimmtes Testsystem wirkt, umso niedriger liegt die Nachweisgrenze. Schadstoffwirkungen unbekannter Substanzen können in Wirkungsäquivalenten von bekannten Toxinen ausgedrückt werden. Aufgrund des Retentionsfaktors (hRF-Wert) einer Substanz im Chromatogramm und der Kombination mit den enzymatischen Reaktionen lassen sich Aussagen über die Polarität bzw. Lipophilie dieser Substanz machen, die wiederum gegebenenfalls toxikokinetische und toxikodynamische Aussagen über die detektierten Schadstoffe zulassen.

Während beim Cholinesterasehemmtest in situ auf der Dünnschichtplatte eine exakte Einzelstoffanalytik mit Wirkstoffäquivalenten möglich ist, gelingt der Nachweis von Insektiziden von enzyminhibitorischen Pestiziden nicht in befriedigendem Ausmaß mit der direkten Bestimmung der Enzymaktivität aus einer nativen Wasserprobe in vitro.

Das bereits genormte Verfahren DIN 38 415, Teil I zur Bestimmung von cholinesterasehemmenden Organophosphat- und Carbamat-Pestiziden weist im Gegensatz zur wirkungsbezogenen Analytik auf dem Dünnschichtchromatogramm Nachteile auf, die dazu führen, dass dieser Test den Weg bis heute nicht in die routinemäßige Überprüfung von Wasserproben der meisten Überwachungs-laboratorien gefunden hat. Das Verfahren, das in vitro durchgeführt wird, ist ein Screeningtest, der als Farbttest zur Bestimmung von cholinesterasehemmenden Organophosphat- und Carbamat-Pestiziden im Wasser beschrieben wird. Die Konzentration der Pestizide in der Wasserprobe wird als ein Summenparameter in Paraoxon-Äquivalenten (POÄ) in µg/L angegeben. Bei der Messung der Paraoxon-Äquivalente können Störungen auftreten. Sie sind jeweils bei der Angabe der Ergebnisse zu berücksichtigen. Querempfindlichkeiten durch Huminstoffe, durch einige ionische Detergenzien oder durch Schwermetalle können auftreten, wenn diese in höheren Konzentrationen vorliegen. Falsch negative Ergebnisse treten auf, wenn aus der Wasserprobe reduzierbare Substanzen in höheren Konzentrationen extrahiert werden, die die Oxidationskapazität des Oxidationsmittels (Bromsuccinimid) belasten. Hierdurch werden die Pestizide unvollständig oxidiert. Die Voraussetzung

für die Bestimmung einer toxikologischen Summenwirkung besteht in einem Anreicherungsverfahren, das die Wirkstoffe aus dem Eluat (organische Lösungsmittel) im Gegensatz zu klassischen analytischen Verfahren wie GC oder HPLC in eine wässrige Phase rücküberführt, um die Umsetzung mit Enzymen zu ermöglichen.

Es liegen sehr viele Daten über Unterschiede in der Toxizität von cholinesterasehemmenden Insektiziden vor. Versuche *in vitro* haben bestätigt, dass Unterschiede in der Hemmwirkung, d.h. in der Größe ihrer Hemmkonstanten dafür verantwortlich sind, wobei die Querempfindlichkeiten dieser Tests und die chromatographischen Reinheitskriterien verwendeter Standardsubstanzen jedoch unberücksichtigt bleiben.

Der Vorteil der wirkungsbezogenen Analytik auf der Dünnschichtplatte besteht darin, dass diese Störungen durch einen direkten enzymatischen Test postchromatographisch auf dem Dünnschichtchromatogramm beseitigt werden.

3.2 Optimierung zellulären Detektionsverfahren auf der HPTLC-Platte

Gesundheitsgefährdende Chemikalien und ihre Metaboliten üben ihre Wirkung auf der Molekülebene in biologischen Systemen aus. Die Wirkung beginnt auf der subzellulären Ebene einer Zelle und kann Schädigungen von der Zelle bis hin zum einem ganzen Organismus zur Folge haben. Im zellulären Bereich können Wirkungen auftreten von toxikologisch relevanten Stoffen wie z.B. Enzymhemmungen verbunden mit Wachstumshemmungen oder Zelltod, Enzyminduktionen oder vermehrtes Wachstum mit Tumorbildung (Abb.28).

Als biomolekulare Erkennungsprinzipien sind vor allem molekulare oder subzelluläre biologische Strukturen geeignet, welche eine Schlüsselrolle in der Funktionsfähigkeit von Organismen einnehmen und deren Beeinträchtigung Konsequenzen für die grundlegenden Lebensvorgänge wie Wachstum, Entwicklung oder Vermehrung zur Folge hat.

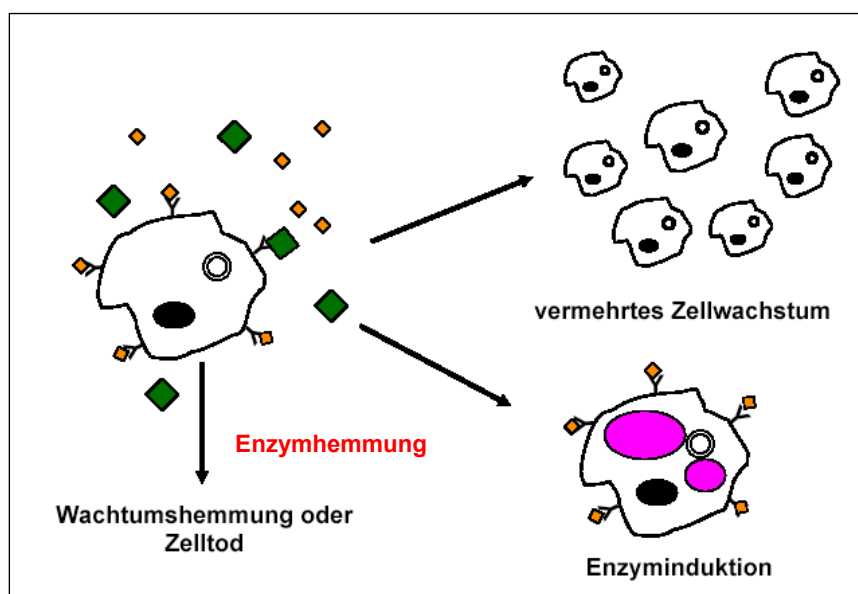


Abb. 28: Prinzip biologischer Indikatoren und Antworten auf biologisch wirksame Stoffe
 ◆ biologisch inerte Stoff, keine Bindung an einen Rezeptor,
 ◆ biologisch wirksamer Stoff durch Bindung an einen Rezeptor

Die eigentliche Bedeutung biologischer Detektionsverfahren in der HPTLC liegt nicht nur darin, das Vorhandensein von Einzelstoffen empfindlich zu detektieren, sondern diese Detektionsverfahren sollen aufgrund spezifischer Schädigungen auf biologische Systeme ganze Stoffgruppen mit toxikologischem Potential aufzeigen. Obwohl die Aussagekraft und damit die toxikologische Relevanz eines Messergebnisses mit steigender Organisationshöhe der Testorganismen zunimmt (im

Hinblick auf die toxikologisch relevanten Parameter Resorption, Verteilung, Metabolisierung, Exkretion), geschieht dies in der Regel auf Kosten der Schnelligkeit und der Empfindlichkeit. Aus diesem Grund wurden in den letzten zehn Jahren eine Vielzahl neuer *in vitro* Testverfahren, insbesondere auf zellulärer und molekularer (d.h. subzellulärer) Ebene entwickelt und standardisiert, wie z.B. Zytotoxizitätsteste, Leuchtbakterienhemmtest, Photosynthesehemmung, Gentoxizitätsteste, Immunoassays etc. (Kanne 1993).

Bei der Anwendung zellulärer und subzellulärer Testverfahren als Detektionsverfahren in der HPTLC - postchromatographisch auf der stationären Phase - muss die Fragestellung nach der Wirkungsspezifität ausreichend gut definiert werden, um eine Schadstofferkennung auf dem Chromatogramm vornehmen zu können. Folgende Wirkmechanismen wurden als HPTLC-Detektionsverfahren eingesetzt, um entsprechende Schadstoffe auf dem Chromatogramm zu lokalisieren und zu bewerten:

Zelluläre Detektionsverfahren in der HPTLC:

- Zytotoxizität bei *Bazillus subtilis*:
Hinweis auf die Gegenwart bakterientoxischer Substanzen, Antibiotika bzw. Zytostatika (Hamburger 1987, Dimenna 1986)
- Zytotoxizität bei Hefe- oder *Penicillium*stämmen
Hinweis auf die Gegenwart fungizider Substanzen bzw. Antimykotika (Hostettmann 1997)
- Hemmung der Biolumineszenz von *Photobakterium phosphoreum*
Hinweis auf die Gegenwart umweltrelevanter Schadstoffe (Kaiser und Palabricia 1991)
- Induktion von Enzymen bei transgenen Hefen¹⁷
Hinweis auf die Gegenwart hormonähnlicher Stoffe

¹⁷ Durch molekularbiologische Methoden ist es möglich, fremde Gene in Bakterien, Hefezellen oder Säugetierzellen einzuschleusen (Transfektion). Dadurch können östrogensensitive Zellen hergestellt werden (Routledge und Sumpter 1997)

3.2.1 Optimierung der biologischen Detektionsverfahren auf der stationären Phase

Bei den zellulären bzw. subzellulären Detektionsverfahren in der HPTLC wird das Chromatogramm vom Fließmittel befreit und nach der physikalischen Auswertung können bioaktive Schadstoffe mit Hilfe zellulären und subzellulären Testverfahren postchromatographisch auf dem Chromatogramm detektiert werden.

In der Regel wird das Chromatogramm 3 sec. in die wässrige zelluläre Suspensionslösung bzw. Enzymlösung getaucht und die überschüssige Lösung wird am Boden der Platte z.B. mit Löschpapier abgezogen. Je nach Testverfahren kann die Platte direkt vermessen werden (z.B. beim Biolumineszenztest) oder wird in einer Umgebung mit einer hohen Luftfeuchte inkubiert, je nach Testverfahren von 20 min (z.B. Enzymhemmtest) bis 46 h (z.B. beim Enzyminduktionstest bei transgenen Hefen).

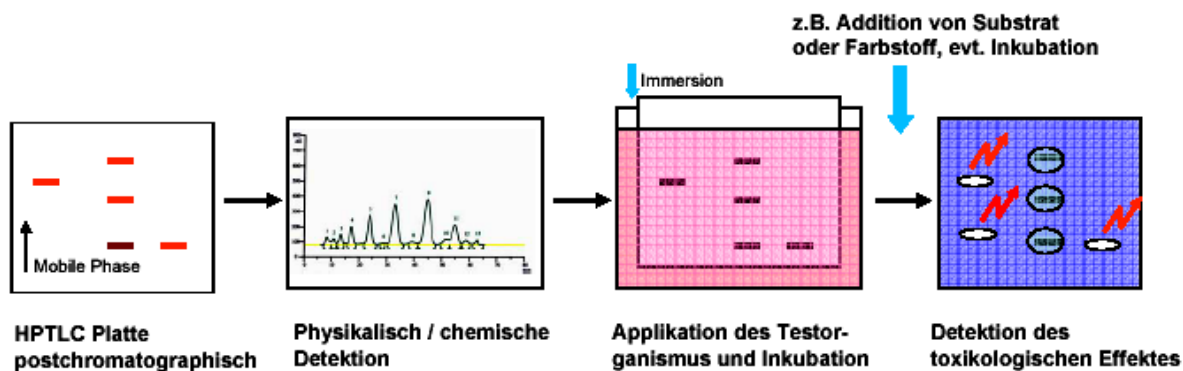


Abb.29: Allgemeine Vorgehensweise der toxikologischen Schadstoffbestimmung mit zellulären und subzellulären HPTLC - Detektionsverfahren

Die daraus resultierende Wirkung kann z.B. bei Wachstumshemmungen bei Penicilliumsporen durch Fungizide daraufhin direkt vermessen werden oder die Detektion des toxikologischen Effektes kann durch eine anschließende biochemische Reaktion sichtbar gemacht werden. Durch die Zugabe eines entsprechenden Substrats kann z.B. entweder eine Enzyminduktion oder Enzymhemmung nachgewiesen werden.

3.2.1.1 Detektion bakterientoxischer Substanzen mit *Bacillus subtilis*

Antibiotika sind Stoffe, die von Mikroben gebildet werden und die andere Mikroben hemmen oder abtöten. Dazu gehören u.a. die Penicilline, Aminoglykoside (Streptomycin), Tetracycline, Makrolide. Im weiteren Sinn gehören dazu auch synthetische Substanzen wie die Fluorchinolone und Sulfonamide (Teuber 2000).

Sulfonamide und zahlreiche Antibiotika wirken bakteriostatisch und hemmen mit verschiedenem Angriffspunkt und in reversibler Form das Bakterienwachstum. Bakterizide Chemotherapeutika führen dagegen beim Bakterium zu einer irreversiblen Schädigung. Nur Penicilline, Cephalosporine, Polymyxine und Aminoglykoside sind als bakterizid wirkende Antibiotika zu betrachten. Betalactamantibiotika wirken nur an wachsenden und in Vermehrung begriffenen Mikroorganismen bakterizid. Besonders sich rasch vermehrende Bakterien bieten sowohl den bakteriostatisch wirkenden Antibiotika (Tetracycline, Chloramphenicol u.a.) als auch den Sulfonamiden und den zellwandsynthesehemmenden bakteriziden Substanzen (Betalactamantibiotika) die besten Angriffspunkte (Adam und Christ 1990). Dies gilt auch für den Testorganismus *Bacillus subtilis*, ein grampositives, sporenbildendes, aerob oder fakultativ anaerob sich verhaltendes nicht pathogenes Stäbchenbakterium (Schlegel 1992). Auf zellulärer bzw. subzellulärer Ebene wirken die meisten bakterientoxischen Substanzen über einen der vier hauptsächlichen Mechanismen (Adam und Christ 1990):

- Hemmung der Zellwandsynthese
- Störung der Permeabilität der Zytoplasmamembran
- Hemmung der Proteinsynthese
- Hemmung der Nukleinsäuresynthese

Testverfahren auf der HPTLC-Platte

Basierend auf den Arbeiten von Hamburger und Cordell (1987) sowie Eymann et al. (2001) wurde das Testverfahren auf bakterientoxische Stoffe optimiert mit dem Ziel, die Versuchszeit zu verkürzen und die Detektionsgrenze zu senken.

Um bakterizid wirkende Substanzen in einem Chromatogramm zu bestimmen, werden die HPTLC-Platten nach der Chromatographie nach dem Eintauchen in eine entsprechende Organismensuspen-

sion (z.B. *Bacillus subtilis*¹⁸) in einer feuchten Kammer (am Kammerboden mit wassergetränktem Haushaltspapier ausgelegt) bei 25 °C inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von ca. 16 h kann die Vitalität der Bakterien durch Besprühen des bewachsenen Chromatogramms mit einer Lösung eines Tetrazoliumsalses (MTT-Lösung 3 mg/mL) dargestellt werden. Anschließend wird die Platte in der Laborluft getrocknet und mit einem Flachbett-Scanner dokumentiert. Bei diesem Vitalitätstest wird die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen bestimmt. Die Methode beruht auf der enzymatischen Reduktion des löslichen, gelben Tetra-zoliumsalses MTT (3, (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) zu einem blauen, unlöslichem Formazan, die nur in lebenden Zellen abläuft.

Abb. 30 zeigt die Wirkung drei verschiedener Antibiotika Chloramphenicol, Oxytetracyclin und Lasalocid, postchromatographisch auf der HPTLC-Platte auf das Wachstum von *Bacillus subtilis*.

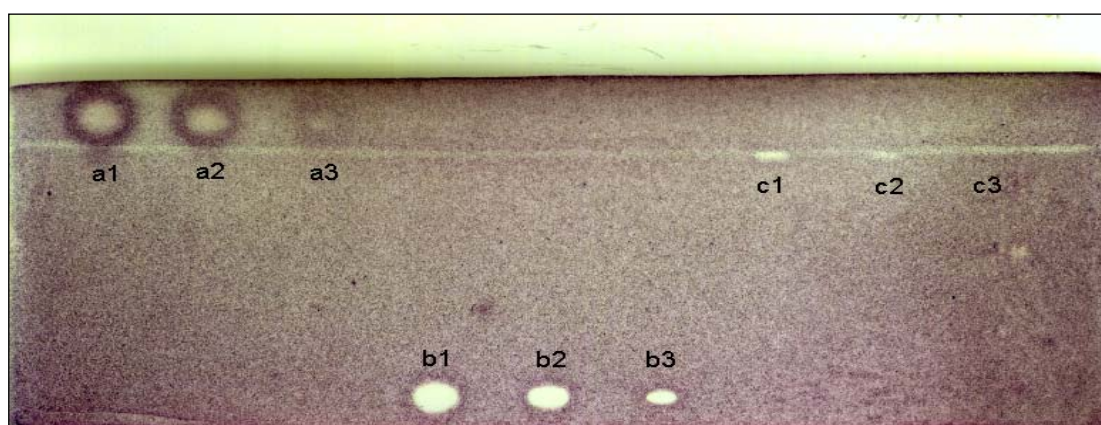


Abb. 30: Detektion von Antibiotika postchromatographisch auf der HPTLC Platte, stationäre Phase: KG 60 WRF 254s (MERCK, Art. Nr. 12363) Format: 10x20 cm; Schichtdicke 100 µm, Mobile Phase: Ethylacetat/Methanol/Ammoniak 25% 60/20/2 (v/v/v), a1 - a3: Chloramphenicol, b1- b3: Oxytetracyclin, c1 - c3: Lasalocid, jede Komponente 25 ng, 15 ng, 5 ng pro Fleck, Testorganismus: *Bacillus subtilis*”

In Tabelle 7 sind weitere Bakterienstämme aufgelistet, die es ermöglichen, die große Anzahl an Antibiotika wirkungsspezifisch zu erfassen.

¹⁸ *Bacillus subtilis*, ATCC 6633, wurde von der Fa. Merck als Sporensuspension bezogen und in einer entsprechenden Vorkultur 2h bei 30 °C für die Dünnschichtchromatographie als Tauchlösung inkubiert (Chrom Biodip® Antibiotics Merck Darmstadt, BRD).

Tab. 7: Häufig verwendete Testorganismen (Stahl 1967, Hamburger und Cordell 1987)

| Stamm-Bezeichnung | Stamm-Nr. der ATCC ¹⁹ |
|-------------------------------|----------------------------------|
| Bacillus subtilis | ATCC 6633 |
| Bacillus cereus var. mycoides | ATCC 11778 |
| Escherichia coli | ATCC 25922 |
| Micrococcus flavus | ATCC 10240 |
| Microsporium gypseum | ATCC 14683 |
| Staphylococcus aureus | ATCC 6538 |
| Staphylococcus epidermis | ATCC 12228 |

Eigene Arbeiten konnten zeigen, dass die wirkungsbezogene Detektion von bakterientoxischen Substanzen aufgrund der Vereinfachungen und Optimierungen bereits nach einer Inkubationsdauer der Testorganismen auf der Kieselgelschicht von 16h auswertbar ist. Als Testorganismus in der HPTLC hat sich *Bacillus subtilis* für die Detektion zahlreicher Antibiotika sehr sensitiv erwiesen und liegt bei Chloramphenicol bei 5 ng/4 mm Band. Die Detektionsgrenze von Oxytetracyclin liegt unter 5ng/4mm Band und bei Lasalocid, einem sehr selektiv wirkenden Antibiotikum, konnte eine Detektionsgrenze von 15 ng/ 4mm Band unter den beschriebenen Versuchsbedingungen ermittelt werden.

3.2.1.2 Detektion fungizider Substanzen mit Hefe bzw. Penicilliumstämmen

Wirkstoffe zur Behandlung von Pilzinfektionen werden in der Humanmedizin als Antimykotika und im Pflanzenschutz als Fungizide bezeichnet. Unter Fungiziden versteht man Substanzen, die das Wachstum von Pilzen hemmen (Fungistatika) oder völlig unterbinden (Fungizide). Fungizide sind Stoffe zur Vorbeugung gegen und Bekämpfung von Pilzen. Sie werden überwiegend im Pflanzenschutz, aber auch bei Farben, Lacken, im Holz- und Papierschutz eingesetzt.

Fungizide bzw. antimykotische Wirkstoffe können auf der HPTLC-Platte sowohl mit Penicilliumsporen als auch mit Hefestämmen qualitativ und quantitativ postchromatographisch nachgewiesen werden.

¹⁹ American Type Culture Collection (ATCC) 12 301 Park Lawn Drive, Rockville Maryland, 20 852 USA

Testverfahren auf der HPTLC-Platte

Basierend auf der Arbeit von Rahalison et al. (1991) wurde das Testverfahren optimiert mit dem Ziel, die Versuchszeit zu verkürzen und die Detektionsgrenze zu senken. Das vom Fließmittel befreite Chromatogramm wird 3 sec. in die Conidial Suspensionslösung²⁰ getaucht (z.B. *Penicillium expansum* ATCC 7861) und die überschüssige Lösung am Boden der Platte mit Haushaltspapier abgezogen. Die HPTLC-Platten werden in einer feuchten Kammer (am Kammerboden mit wassergetränktem Haushaltspapier ausgelegt) 1-3 Tage bei 25°C inkubiert.

Auf Kiesels gelplatten mit Fluoreszenzindikator, der bei $\lambda = 254$ nm angeregt wird, können die durch die fungiziden Wirkstoffe hervorgerufenen Hemmhöfe bereits nach 16 h Inkubation mit Hilfe der Video- oder Photodokumentation aufgezeichnet werden bei einer Bestrahlung der Platte mit $\lambda = 254$ nm.

Bei dem *qualitativen* Nachweis eines Wirkstoffes sind sowohl die Migrationsstrecke und das UV-Spektrum die ersten Indizien für seine Identifizierung. Die Bestimmung der Wirkung auf dem Chromatogramm sichert diesen Befund weiterhin ab. Abb. 32 a und 32 b zeigen zwei mit der AMD-Technik entwickelte HPTLC Platten mit sieben Standardlösungen von Fungiziden, deren Wirksamkeit mit einer Conidial Suspensionslösung von *Penicillium ssp.* postchromatographisch detektiert wurde. Die Sporen, die nach drei Tagen bei 25 °C auf dem Chromatogramm gebildet wurden, wurden mit einem Mattlack auf der Platte stabilisiert.

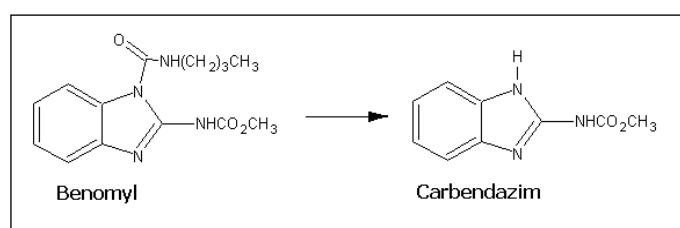


Abb. 31: Abiotischer Abbau von Benomyl in Carbendazim

Das mit der AMD entwickelte Chromatogramm trennt Benomyl (Abb. 32a) von seinem Abbauprodukt Carbendazim (Abb. 32a). Benomyl (methyl 1-(butylcarbamoyl)benzimidazol-2-ylcarbamate)

²⁰ *Penicillium*stämme und Hefestämme (z.B. *Penicillium expansum* ATCC 7861) wurden auf Sabouraud Agar kultiviert. Die Sporen von *Penicillium* Spezies wurden für den Test in einer Glucose-Mineral Salz Lösung suspendiert (Hostettmann 1997), während die Hefestämme in einem Sabouraud Flüssig-Medium (3-4 Stunden Wachstum vor dem Test) mit 0,035 % Gelrite® inkubiert wurden.

ist ein systemisch wirkendes Fungizid, das durch Blätter und Wurzeln aufgenommen wird. In der Standardlösung ist Benomyl nach 6 Tagen völlig in sein polareres Abbauprodukt Carbendazim zerfallen. (Abb. 32b).

Benomyl, als fungizides Carbamat, zeigt selbst keine inhibitorische Wirkung gegenüber Cholinesterase. Es wird sehr leicht zu Carbendazim und Butylisocyanat abgebaut, wobei das erste völlig inaktiv ist gegenüber diesem Enzym, während das letzte einen irreversiblen Cholinesteraseinhibitor darstellt, der in seiner Wirkstärke mit den Organophosphaten vergleichbar ist (Krupka 1974).

Neben dem *qualitativen* Nachweis von Fungiziden gelingt auch die *quantitative* Bestimmung fungizider Wirkstoffe auf der Dünnschichtplatte unter Verwendung zellulärer Organismen.

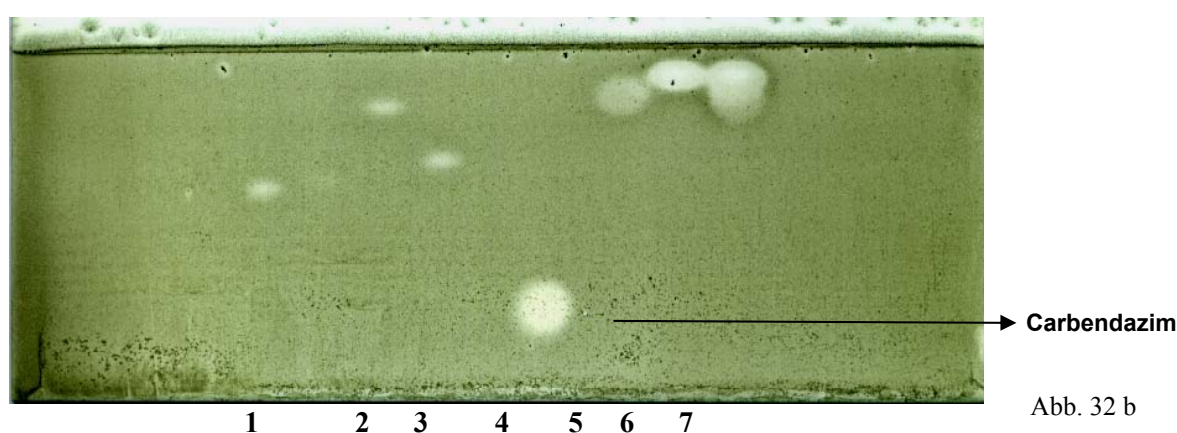
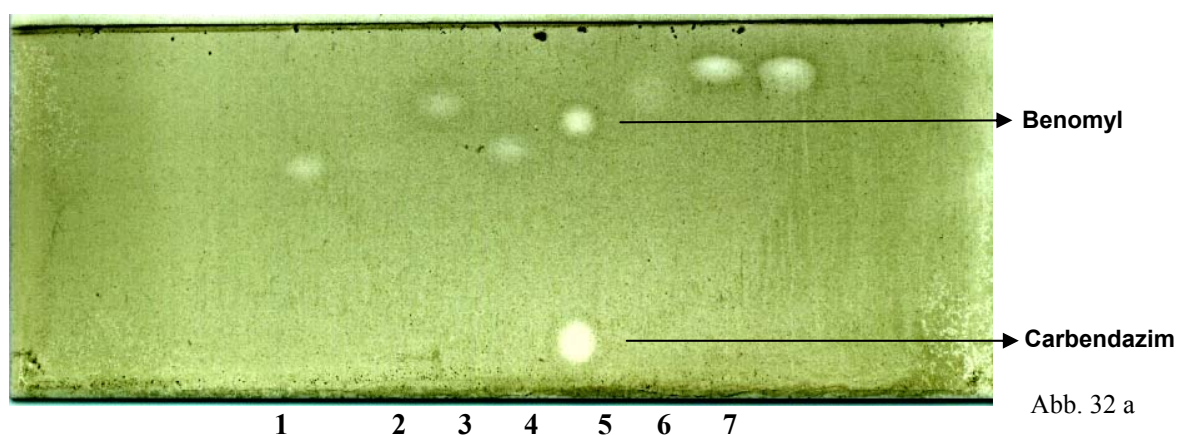


Abb. 32: Qualitative Detektion von Fungiziden postchromatographisch auf der HPTLC Platte, stationäre Phase: KG 60 WRF 254s (MERCK, Art. Nr. 12363) Format: 10x20 cm; Schichtdicke 200 µm, chromatographische Entwicklung: automatische Mehrfachentwicklung mit dem AMD2 Gerät von Camag (Muttenz, Schweiz), Testorganismus *Penicillium spec.*, Detektion nach 72 Stunden dokumentiert mit einem HP-Scanner, 1-Isoproturon 612 ng, 2-Linuron 648 ng, 3-Diuron 590 ng, 4-Benomyl 550 ng, 5-3,5 Dichlorphenol 600 ng, 6-Pentachlorphenol 620 ng, 7- Pentachlorphenol+3,5 Dichlorphenol 600 ng

Seit 2001 wird in der Umweltanalytik den Azol-Derivaten eine besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Tebuconazol mit der chemischen Bezeichnung α -tert-Butyl- α -(4-Chlorphenylethyl)-1,1,1,2,4-triazol-1-ylethanol gehört zur Gruppe der Triazole. Azol-Derivate werden in der Landwirtschaft vor allem zur Bekämpfung von Pilzkrankungen im Getreide- sowie im Obst- und Weinbau eingesetzt und zählen zu einer der wichtigsten Wirkstoffgruppen im Pflanzenschutz. Azole sind aber auch bei der Behandlung von systemischen Pilzinfektionen des Menschen von besonderer Bedeutung, da diese Wirkstoffe im Vergleich zu anderen Verbindungen gut verträglich und daher häufig die einzige therapeutische Alternative darstellen. In Anbetracht dieser Situation haben Mediziner der „Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft“ in jüngster Zeit Bedenken gegen den Einsatz von Azol-haltigen Pflanzenschutzmitteln erhoben. Es wurde die Vermutung geäußert, die wiederholte flächenmäßige Anwendung dieser Stoffe bewirke eine Selektion resistenter, potenziell humanpathogener Pilze in der Umwelt, die dann auf den Menschen übergehen und zu lebensbedrohlichen systemischen Infektionen führen könnten, oder durch Azol-Rückstände in der Nahrung könne eine Azol-Resistenz bei der Pilzflora von Mensch und Tier induziert werden (BGVV 2001). Da Tebuconazol ein sehr gut wirksames Fungizid darstellt, konnte nach der AMD-HPTLC auf dem Chromatogramm mit dem Hefestamm *Rhodoturula rubra* als Testorganismus eine Detektionsgrenze bei 1.8 ng/5mm Band, die Erfassungsgrenze bei 3.6ng/5mm Band und die Bestimmungsgrenze bei 5.2 ng/5mm Band ermittelt werden (Abb. 33).

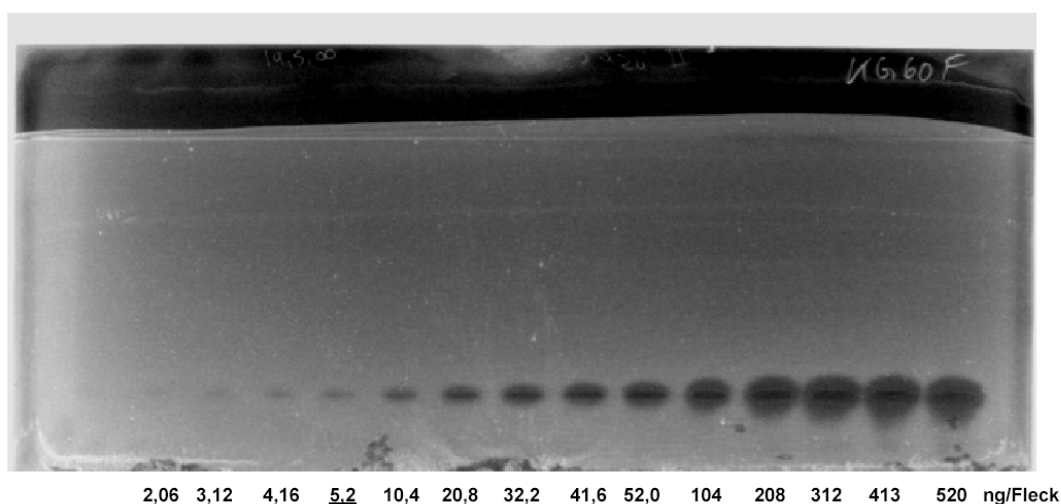


Abb. 33: Bestimmung der Detektionsgrenze von Tebuconazol, postchromatographisch auf der HPTLC Platte, stationäre Phase: KG 60 F 254s (MERCK, Art. Nr. 5365) Format: 10x20 cm; Schichtdicke 200 μ m, chromatographische Entwicklung: automatische Mehrfachentwicklung mit dem AMD2 Gerät von Camag (MuttENZ, Schweiz), Testorganismus Hefestamm *Rhodoturula rubra*, Detektion nach 16 Stunden, dokumentiert mit einer Peltier Cooled CCD Kamera SensiCam® (AVT Horn, Aalen, BRD), bei 254 nm.

Eigene Arbeiten zeigen, dass die wirkungsbezogene Detektion fungizider Substanzen nach einer Inkubationsdauer der Testorganismen auf der Kieselgelschicht von 16h auswertbar ist. Als Testorganismen in der HPTLC haben sich neben Penicilliumstämme auch Hefestämme für zahlreiche Fungizide bzw. Antimykotika als sehr sensitiv erwiesen (Rahalison et al. 1991).

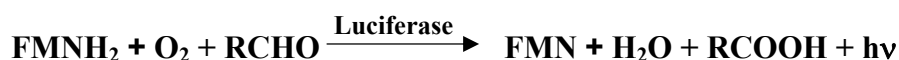
Die wirkungsbezogene Analytik fungizider Verbindungen kann eingesetzt werden sowohl bei der Suche nach pharmakologisch relevanten Antimykotika sowie bei der Rückstandsanalytik von Pestiziden im Umwelt- und Lebensmittelbereich (siehe Kapitel 3.3).

3.2.1.3 Hemmung der Biolumineszenz von *Photobakterium phosphoreum*

Leuchtakterien der Gattung *Vibrio fischeri* sind die Testorganismen der Wahl für die schnelle und exakte Erfassung toxischer Einflüsse von Flüssigkeiten und Feststoffen. Seit mehr als zehn Jahren werden Leuchtakterien allgemein zur Messung der Toxizität von Wasserproben eingesetzt, beschrieben in der Norm EN ISO 11348 Teil 1 bis Teil 3: "Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest)".

Leuchtakterien sind in der Lage, Stoffwechselenergie in Licht umzusetzen. Die Lichtemission ist dabei direkt an die Vitalität gekoppelt. Werden Leuchtakterien mit toxischen Stoffen konfrontiert, kommt es zu einer Verminderung der Leuchtintensität in Abhängigkeit von der toxischen Potenz dieser Stoffe. Der Leuchtbakterientest wird seit 1991 zur Prüfung von Abwasser herangezogen. Er ist ebenso für Chemikalienprüfungen anwendbar.

Genauere biochemische Untersuchungen des Leuchtvorganges zeigen, dass er sehr eng mit der Atmung der Bakterien zusammenhängt. Die Leuchtreaktion von *Photobakterium phosphoreum* benötigt Energie in Form von reduziertem Flavin-Mononukleotid FMNH₂. Dabei reagiert FMNH₂ mit molekularem Sauerstoff und einem langkettigen Aldehyd zu FMN, Wasser und der korrespondierenden Fettsäure nach der folgenden Reaktionsgleichung (Meighen und Dunlap 1993):



Die Reaktion wird katalysiert durch das Enzym Luciferase und ist sehr energieaufwendig. Eine Störung der Energieversorgung (Atmung) durch die Einwirkung von Chemikalien wirkt sich deshalb sehr schnell auf die Leuchtkraft der Bakterien aus. Da sämtliche Stoffwechselfvorgänge Ener-

gie erfordern, ist die Stärke der Hemmwirkung einer Chemikalie ein direktes Maß für die Beeinträchtigung des gesamten Stoffwechsels des Bakteriums.

Testverfahren auf der HPTLC-Platte

1996 gelang es Eberz, Weisemann und Weins erstmalig, den Leuchtbakterienhemmtest als Detektionsverfahren in der Dünnschichtchromatographie einzusetzen.

Das vom Fließmittel befreite Chromatogramm wurde 3 sec in eine leuchtende Bakteriensuspension von *Vibrio fischeri*²¹ getaucht und die überschüssige Lösung wurde am Boden der Platte mit Haushaltspapier abgezogen.

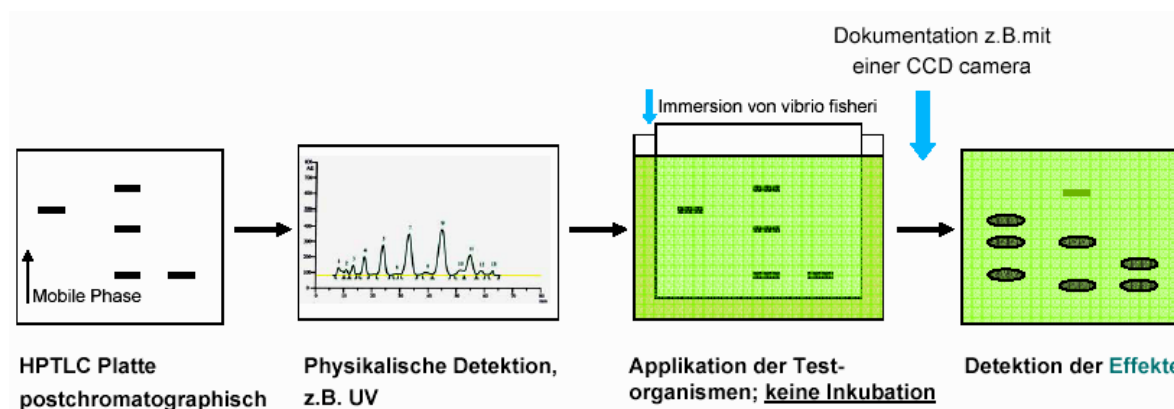


Abb. 34: Allgemeine Vorgehensweise der toxikologischen Schadstoffbestimmung mit Hilfe der Biolumineszenzhemmung auf der HPTLC – Platte (Weisemann et al. 1996, Eberz et al. 1996, Veröff. I)

Bei der Detektion wird sofort anschließend die Biolumineszenz des Photobakteriums *Vibrio fischeri* mit einer gekühlten CC-Kamera direkt auf dem Chromatogramm dokumentiert. Die Belichtungszeit hängt von Empfindlichkeit der eingesetzten Kamera ab. Eigene Untersuchungen zeigen, dass die Biolumineszenz ca. 20 Minuten auf der HPTLC-Platte stabil bleibt.

Einsatz des Biolumineszenzhemmtestes für die Reinheitskontrolle von Referenzsubstanzen

Während das *in vitro* Testverfahren in der Regel die Summeneffekte von Schädwirkungen aufweist, ist eine Einzelstoffidentifizierung nicht möglich. Die Detektion mit einer Leuchtbakteriensuspension auf der HPTLC-Platte ermöglicht sowohl eine Einzelstoffanalyse als auch durch die Migrationsstrecke im Chromatogramm eine Charakterisierung unbekannter Schadstoffe.

²¹ *Photobakterium vibrio fischeri*, Stamm NRRL B-11177 gefriergetrocknet, wurde gemäß DIN 38 412 Teil 32 rekonstituiert. Die Zellen wurden in einem Vollmedium nach einem Verfahren, dass in DIN 38 412 Teil 34 beschrieben wird, kultiviert, 20 h auf einem Schüttelgerät (150 rev. per min) bei 21 °C

Pentachlorphenol (PCP) hemmt die Biolumineszenz des Photobakteriums *Vibrio fischeri* sehr stark. Im Bereich von 20–80 ng/5mm Band kann eine lineare Korrelation zur gemessenen Hemmwirkung auf der HPTLC Platte aufgezeigt werden. Die Nachweisgrenze von PCP liegt bei diesem Verfahren zwischen 10-20 ng/5mm Band (Veröff. I). Unterzieht man PCP einer Chemikalienüberprüfung mit einer postchromatographischen Hemmung der Biolumineszenz des Photobakteriums *Vibrio fischeri* können unter diesen Testbedingungen weitere toxische Nebenprodukte bzw. Abbauprodukte in der Standardlösung aufgezeigt werden. In einer Standardlösung von PCP, als Ausgangssubstanz (1) können nach der dünnenschichtchromatographischen Auftrennung auf Kieselgel (Abb. 35) noch 4 weitere toxische polarere Begleitsubstanzen (2, 3, 4, 5) nachgewiesen werden (siehe auch Kapitel 3.4.1).

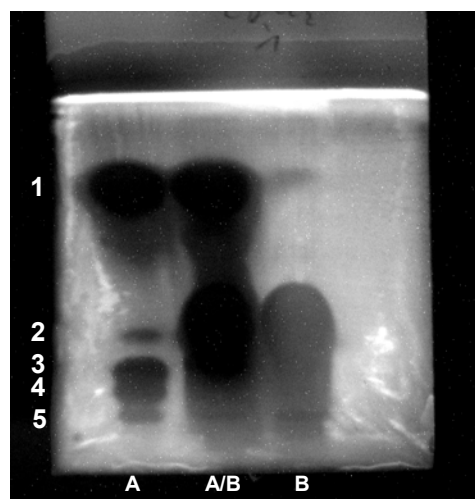


Abb. 35:
 Postchromatographische Detektion von 1µg Pentachlorphenol.(A), 1µg 3'5'Dichlorphenol (B) durch Hemmung der Biolumineszenz des Photobakteriums *Vibrio fischeri*, stationäre Phase HPTLC KG 60 F₂₅₄, mobile Phase n-Hexan/Ethylacetat 6:4 v/v, Migrationsstrecke 5 cm, Dokumentation: Peltier Cooled CCD Kamera SensiCam® (AVT Horn, Aalen, BRD), Belichtungszeit 600 min (siehe auch Abb. 2.3 in Veröff. II S. 52)

Der Biolumineszenz/HPTLC –Test wurde erfolgreich validiert für Applikationen im Umweltbereich, für Naturstoffe, Lebensmittelproben und für toxikologisch relevante Probleme im industriellproduktiven Bereich (Eberz et al. 1996).

3.2.1.4 Detektion östrogenen Verbindungen mit transgenen Hefen auf der HPTLC-Platte

Seit mehr als zehn Jahren ist bekannt, dass östrogen wirksame Substanzen in der Umwelt gesundheitliche Effekte auf Tiere und Menschen besitzen. Beobachtungen der letzten Jahre lassen vermuten, dass verschiedene anthropogene Umweltkontaminanten einen schädigenden Effekt auf das Reproduktionsvermögen von wildlebenden Tierpopulationen haben. Hieraus leitet sich die Be-

fürchtung ab, dass die Exposition mit solchen Stoffen auch beim Menschen zu Störungen der hormonellen Regulation und zu gesundheitlichen Folgeschäden führen könnte. Für eine Reihe von Umweltkontaminanten werden vor allem eine östrogene und eine antiandrogene Wirkung auf den Organismus diskutiert. Stoffe mit solchen Wirkungen werden als "endokrine Disruptoren" bezeichnet.

Zu den sog. „Endokrinen Disruptoren“ (engl. endocrine disruptors (Eds), oder endocrine disrupting chemicals (EDCs)), auch Umwelt- oder Ökohormone genannt, zählen Substanzen und deren Metaboliten, die mit der Produktion, der Freisetzung, dem Transport und dem Abbau körpereigener Hormone sowie mit der Wirkung von Hormonen auf deren Rezeptoren konkurrieren. Es handelt sich um Umweltchemikalien, die in geringen Konzentrationen bereits in das hormonelle System von Menschen und Tieren eingreifen können (Kuch und Ballschmitter 1999).

Nach dem derzeitigen Kenntnisstand gibt es über 200 Chemikalien, deren hormonelle Wirksamkeit bekannt ist. Allerdings wurde die östrogene Wirksamkeit bei vielen Umweltchemikalien eher zufällig durch ihr Vorkommen in der Umwelt oder durch Kontaminationsprobleme im Labor erkannt. Daher wird vermutet, dass weit mehr Substanzen endokrin wirksam sein könnten (Stroh 2005).

Messverfahren zur Überprüfung östrogenen Wirksamkeit von Substanzen

Zur Überprüfung der östrogenen Wirksamkeit einer Substanz wurden zahlreiche biologische in vivo- und in vitro - Methoden entwickelt (Gülden et al. 1997).

In vivo-Methoden sind sehr zuverlässig zur Überprüfung der östrogenen Aktivität von Substanzen. Bei ihnen werden alle Faktoren, die die östrogene Wirkung der Substanzen beeinflussen können, berücksichtigt. Nachteilig ist, dass in vivo-Methoden meist teuer und zeitaufwendig sind (Andersen 1998). Diese Tests geben nur die Summe der Wirkungen auf den Organismus wieder, nähere Informationen zu den Mechanismen der östrogenen Aktivität der Substanzen kann man daraus nicht erhalten (Shelby et al. 1996).

In vitro-Methoden sind dagegen schneller, günstiger und in der Regel mit geringerem Aufwand durchzuführen sind als in vivo-Methoden. Einige der in vitro-Methoden werden besonders als Screening-Methode eingesetzt (Andersen et al. 1998). Hierbei ist zu beachten, dass Ergebnisse aus den vitro-Tests nicht einfach auf in vivo-Bedingungen übertragbar sind, da bei diesen Testverfahren keine korrekten Aussagen über die Bioverfügbarkeit und Wirkung auf den jeweiligen Organismen gemacht werden können.

Der Hefezellentest nach Sumpter wurde 1996 als ein *in vitro* Test entwickelt zum Nachweis östrogen-wirksamer Substanzen. Durch molekularbiologische Methoden wurden fremde Gene in Bakterien, Hefezellen oder Säugetierzellen eingeschleust (Transfektion) und dadurch östrogen-sensitive Zellen hergestellt. Der verwendete rekombinante östrogensensitive Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* wurde von der „Genetischen Abteilung“ der Firma Glaxo, England, entwickelt. In die Hefezellen ist das Gen für den menschlichen Östrogen-Rezeptor (hER) in das Chromosom eingebaut. Zusätzlich enthält die Hefezelle ein Expressionsplasmid. Dieses Plasmid besteht aus einer Östrogenrezeptor-bindenden DNA-Sequenz („estrogene responsive element“: ERE), dem Reporter-Gen Lac-Z²² und einer Promotorsequenz (Routledge und Sumpter 1996). In der Hefezelle wird der menschliche Östrogen-Rezeptor über das im Zellkern vorhandene hER-Gen synthetisiert. Gelangt eine östrogen wirksame Substanz in die Zelle, kann sie an den hER binden. Der entstandene Komplex bindet dann an das ERE im Plasmid. Durch diese Bindung wird die Transkription des Reporter-Gens Lac-Z ausgelöst und es kommt zur Produktion des Enzyms β -Galaktosidase (Expression). Dieses wird in das die Zelle umgebende Medium ausgeschieden. Dem Medium wird ein chromogenes Substrat zugegeben, welches durch die β -Galaktosidase metabolisiert wird und zu einem farbigen Endprodukt führt.

Testverfahren auf der HPTLC-Platte(Veröff. IV)

In einer Kollaboration von Müller, Dausend und Weins gelang es, den Hefezellentest von Routledge und Sumpter als Detektionsverfahren auf der HPTLC-Platte zu übertragen, mit dem Ziel östrogen wirksame Verbindungen direkt auf dem Chromatogramm zu detektieren.

Basierend auf eigenen Arbeiten, die in Kapitel 3.2.1.2: „Detektion fungizider Substanzen mit Hefe bzw. Penicilliumstämmen“ beschrieben werden, gelang es, auch einen östrogensensitiven Hefestamm direkt auf der HPTLC-Platte zu kultivieren, wo in Gegenwart von östrogenen Substanzen die Bildung des Enzyms β -Galaktosidase induziert wird. Die Menge an induziertem Enzym ist abhängig von der Menge an östrogenwirksamen Verbindungen, die durch die Spaltung eines farbigen Substrats nachgewiesen werden kann. Als Standardsubstanz für östrogene Wirkung wurde das 17 β -Estradiol eingesetzt.

²² Das Lac-Z-Gen stammt ursprünglich aus dem Laktose-Operon von *Escherichia coli* und ist das Strukturgen für das Enzym β -Galaktosidase (Knippers 2001).

Das zelluläre Testverfahren zur Detektion von östrogenen Wirksamkeit gliedert sich in 3 Verfahrensschritte (Abb. 36):

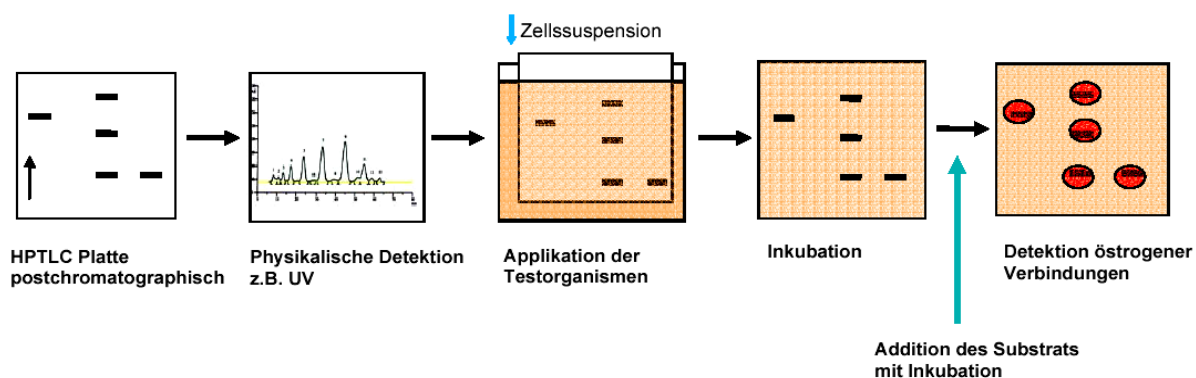


Abb. 36: Detektionsverfahren zur Bestimmung von östrogenen Wirksamkeit mit einem östrogensensitiven Hefestamm nach Routledge und Sumpter auf der HPTLC-Platte (Prinzip beschrieben in Veröff. IV)

1. Schritt: Immobilisierung der Organismen auf der lösemittelfreien Kiesegelschicht und Schaffung guter Wachstumsbedingungen auf der Schicht; Kontakt der Zellen mit den zu untersuchenden Verbindungen (vergleiche Kapitel 3.2.1.2):

Die von organischen Lösemitteln befreite HPTLC-Platte wird 3 sec in eine 24h alte östrogensensitive Hefekultur getaucht; die überschüssige Lösung am Boden der Platte wird mit Haushaltspapier abgezogen; die Platte wird bei 32 °C inkubiert.

2. Schritt: Substratumsetzung zum Nachweis des gebildeten Enzyms (vergleiche Kapitel 3.1.4.1) unter Berücksichtigung der optimalen Bedingungen für die entsprechende Enzymaktivität:

Nach einer Inkubationszeit von ca. 26 h wird zum Nachweis der induzierten β -Galaktosidase z.B. ein fluorogenes Substrat 4-Methylumbelliferyl β -D-Galaktopyranosid (MUG) auf die Platte gesprüht. Innerhalb von 3h bei 32°C wird dieses Substrat durch die β -Galaktosidase in Galaktose und das fluoreszierende 4-Methylumbelliferon (4MU) gespalten.

3. Schritt: Optimale Detektionsbedingungen für die instrumentelle Erfassung des gebildeten Substrats:

Das Emissionsmaximum des 4MU liegt im alkalischen pH-Bereich (pH-Wert > 8) bei $\lambda = 460$ nm ($\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm) und damit im sichtbaren Bereich. Das gebildete Substrat kann sowohl visuell als auch mit einem Densitometer unter Verwendung einer Quecksilber-Lampe ($\lambda_{\text{ex}} = 366$ nm) detektiert werden. Zur Erhöhung des pH-Wertes und somit zur Fluoreszenzverstärkung wird die Platte 5

Minuten in einer Doppeltrogkammer mit Ammoniak bedampft (Stahl 1967).

Die Testdauer konnte im Hinblick auf das *in vitro*-Testverfahren deutlich (um 20 h) verkürzt werden. Durch den Einsatz des fluorogenen Substrats 4-Methylumbellifery β -D-Galaktopyranosid (MUG) konnte die Inkubationszeit um die Hälfte reduziert werden und die Detektionsgrenze von 17 β -Estradiol um den Faktor 20 gesteigert werden als mit dem herkömmlichen Substrat Chlorophenol-Rot- β -D-Galaktopyranosid (CPRG).

Die Detektionsgrenze von 17- β Estradiol liegt unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen bei 5.5 pg/3mm Band.

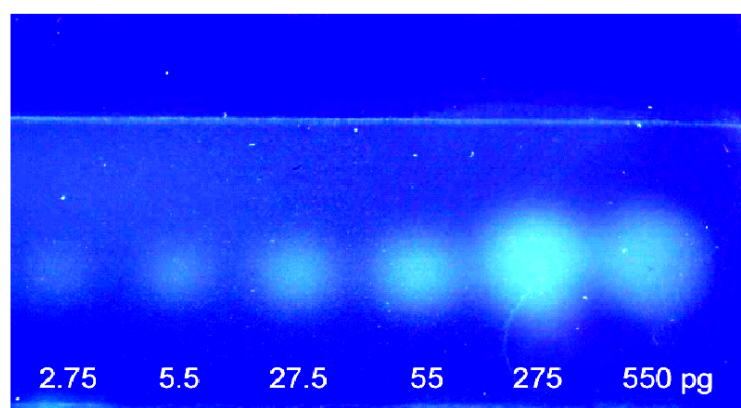


Abb.37: Photographische Dokumentation der fluoreszierenden Zonen auf Kieselgel unter UV Licht ($\lambda_{\text{ex}} = 366$ nm). Positiv Kontrolle von verschiedenen Konzentrationen 17 β -Estradiol/Auftragefleck, Testorganismus. Östrogensensitiver Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae*, Substrat: 4-Methylumbellifery β -D-Galaktopyranosid (MUG) (siehe Veröff. IV Abb. 2, S. 209)

Das Verhältnis zwischen dem Messsignal und dem Logarithmus der aufgetragenen Konzentration zwischen 2.75 und 550 pg 17- β Estradiol /3mm Band ergibt eine typische sigmoide Dosis-Wirkungskurve. Somit ist dieser Test in der Lage, östrogenwirksame Substanzen sowohl qualitativ als auch quantitativ zu bestimmen (siehe auch Abb. 4, Veröff. IV, S. 210).

Die Migrationsstrecken im Chromatogramm erlauben die weitere Charakterisierung der östrogenaktiven Substanzen.

Der Estradiol-Hefestest als Prototyp für einen Gentoxizitätstest auf der HPTLC-Platte

Das Prinzip des Estradiol-Hefestests bietet die Grundlage, weitere Wirkteste mit transgenen Organismen auf der Dünnschichtplatte durchzuführen. Basierend auf dem in dieser Arbeit entwickelten

Verfahren zur Bestimmung östrogenwirksamer Substanzen in der Dünnschichtchromatographie lässt sich theoretisch ein weiteres in vitro Testverfahren, der umu-Test (DIN 38415-3), analog auf die Dünnschichtplatte übertragen.

Mit dem umu-Test werden durch Genotoxine verursachte Schäden (Einzelstrang DNA) über den Nachweis der Induktion zelleigener DNA-Reparaturmechanismen angezeigt. Als Testorganismus dient das gentechnisch veränderte Bakterium *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK1002. Der Testorganismus reagiert bei der Induktion des Reparatursystems, das mit einem Gen gekoppelt ist, das die β -Galaktosidase codiert. Die Einzelstrang-DNA führt in Gegenwart von gentoxischen Substanzen zur Bildung von β -Galaktosidase, die z.B. durch den Einsatz des fluorogenen Substrats 4-Methyl-umbelliferyl β -D-Galaktopyranosid (MUG) nachgewiesen werden kann.

Im Folgenden wird ein zelluläres Testverfahren zur Detektion gentoxischer Wirksamkeit vorgeschlagen, das sich analog wie der entwickelte Estradiol-Hefestest in drei Verfahrensschritte aufgliedern ließe:

1. Schritt: Immobilisierung des Bakterium *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK1002 auf der lösemittelfreien Kiesegelschicht und Schaffung guter Wachstumsbedingungen auf der Schicht mit Kontakt der Zellen mit den zu untersuchenden Verbindungen. Inkubation der Zellkultur auf dem Chromatogramm zur Induzierung von β -Galaktosidase.

2. Schritt: Substratumsetzung zum Nachweis des gebildeten Enzyms unter Berücksichtigung der optimalen Bedingungen für die entsprechende Enzymaktivität.

3. Schritt: Optimale Detektionsbedingungen für die instrumentelle Erfassung des gebildeten Substrats

Die bisherigen Arbeiten eröffnen somit ein weiteres Anwendungsgebiet, Wirkstoffe zunächst über ein chromatographisches Trennverfahren zu isolieren, anschließend postchromatographisch mit molekularbiologischen Verfahren zu detektieren und sie mit Hilfe von Wirkungsäquivalenten zu quantifizieren.

3.3 Einsatz der wirkungsbezogenen Analytik bei Umwelt- und Lebensmittelproben

Der Einsatz der wirkungsbezogenen Analytik in Verbindung mit der HPTLC-AMD erlaubt ein erstes Erfassen unbekannter biologisch aktiver Substanzen in einer Umwelt- bzw. Lebensmittelprobe. Das Ziel der Probenvorbereitung bei diesen Verfahren ist es, für eine Risikoanalytik nicht einzelne Wirkstoffe zu isolieren, sondern die Gesamtheit aller möglichen organischen Toxine einer Probe zu erfassen.

3.3.1 Bestimmung bakterientoxischer Wirkung in Gewässerproben

In den letzten zehn Jahren konnte ein deutlicher Anstieg der Anzahl antibiotikaresistenter Bakterien beobachtet werden, die auf bis zu acht Antibiotika gleichzeitig resistent sein können. Antibiotikaresistente Bakterien treten vor allem in Bereichen vermehrt auf, in denen Antibiotika zum Einsatz kommen. Es konnte gezeigt werden, dass antibiotikaresistente Bakterien in großen Mengen in die Umwelt eingetragen werden. Zum einen werden sie aus der Intensivtierhaltung über die Gülle und Mistausbringung direkt in die Umwelt freigesetzt, zum anderen aus klinischen und häuslichen Abwässern in den Kläranlagen gesammelt und von dort über das geklärte Abwasser in die Umwelt entlassen. Es werden jedoch nicht nur antibiotikaresistente Bakterien freigesetzt, sondern auch Antibiotika selbst. Somit muss die Möglichkeit diskutiert werden, inwieweit Antibiotika nicht nur beim Einsatz in den Kliniken oder Tierhaltung an der Selektion antibiotikaresistenter Bakterien beteiligt sind, oder ob sie nach dem Eintrag in die Umwelt (insbesondere in den Kläranlagen und ihren Ausläufen) eine Zunahme antibiotikaresistenter Bakterien bewirken (Feuerpfeil et al. 1999). Man kennt derzeit über 8000 Antibiotika. Weltweit werden 100 000 Tonnen/Jahr produziert, ein Markt von 8.5 Milliarden Euro. Rund die Hälfte der weltweiten Antibiotikaproduktion wird derzeit an die über 40 Milliarden landwirtschaftlichen Nutztiere und rund 15 Millionen Tonnen Fisch und Krustentiere in Aquakultur verfüttert (Teuber 2000). Hiermit kommt der Messung von antibiotisch wirksamen Substanzen in Gewässern eine steigende Bedeutung zu.

Probenvorbereitung und Chromatographie in der wirkungsbezogenen Analytik

Für die Untersuchung von Umweltproben auf Schadwirkungen wurden primär Wasserproben aus Oberflächengewässern und Abwasserproben aus kommunalen Kläranlagen herangezogen. Die Probenvorbereitung erfolgt gemäß DIN 38 407 Teil 11. Die organischen Inhaltsstoffe von 100 mL nativer kommunaler Abwasserprobe bzw. 500 mL Oberflächenwasser wurden an einer mit Methanol konditionierten RP18 Kartusche angereichert, mit Methanol extrahiert, unter N₂ eingedampft und in 200 µL Methanol wieder aufgenommen. Parallel dazu wurden 40 mL Abwasserprobe gefriergetrocknet und die Trockenmasse mit Methanol extrahiert (Probenvorbereitung ausführlich dargestellt, Veröff. III, S. 59). Die Wiederfindungsraten wurden mit Coffein als Modellsubstanz für kommunale Abwässer bestimmt und betrug bei der Anreicherung über eine RP18 Kartusche bei $90 \pm 3 \%$ und bei der Anreicherung mittels Gefriertrocknung bei $94 \pm 3 \%$. Die Wiederfindungsraten bei den Modellsubstanzen Pentachlorphenol (PCP) und Dichlorphenol lagen beim Einsatz von RP18 Kartuschen bei $83 \pm 4 \%$ und bei Verwendung der Gefriertrocknung $89 \pm 3 \%$.

Die Auftrennung der Substanzen in der Normalphasen-Dünnschichtchromatographie erfolgt mit einem **Universalgradienten** aufgrund ihrer Polarität mittels **Automated-Multiple-Development (AMD)**-Technik gemäß DIN 38 407 Teil 11. Der Gradient ist ein 33 Stufengradient basierend auf Dichlormethan, der mit Acetonitril als polare Komponente beginnt und mit n-Hexan als unpolare Komponente endet. Nach der Chromatographie mit der AMD-Technik nach DIN 38407, Teil 11 wurden die Chromatogramme zunächst mit Hilfe des Mehrwellenlängenscans (200 nm – 320 nm) ausgewertet. Diese Auswertung spiegelt durch signifikante Peaks den chromatographischen „Fingerprint“ einer Wasserprobe wider (siehe Abb. 38). Die Identifikation einzelner Stoffe erfolgt zunächst aufgrund der Lage im Chromatogramm (Migrationsstrecke) und mit Hilfe einer Spektrenbibliothek anhand des Remissionsspektrums (Burger 1988).

In Abb. 38 fällt besonders die Gegenwart von Coffein (Migrationsstrecke im Chromatogramm: 32.9 mm) in dem Zu- und Ablauf einer kommunalen Kläranlage ins Auge. Ohne Zweifel ist Coffein eine charakteristische Substanz für fäkale Abwässer, die einen speziellen Anteil kommunaler Abwässer bilden. Aus diesem Grund kann Coffein als chemischer Indikator zum einen für die Kontamination von Gewässern durch anthropogene Fäkalien genutzt werden (Prösch und Puchert 1998), zum anderen auch als ein Maß für die Reinigungsleistung kommunaler Kläranlagen dienen.

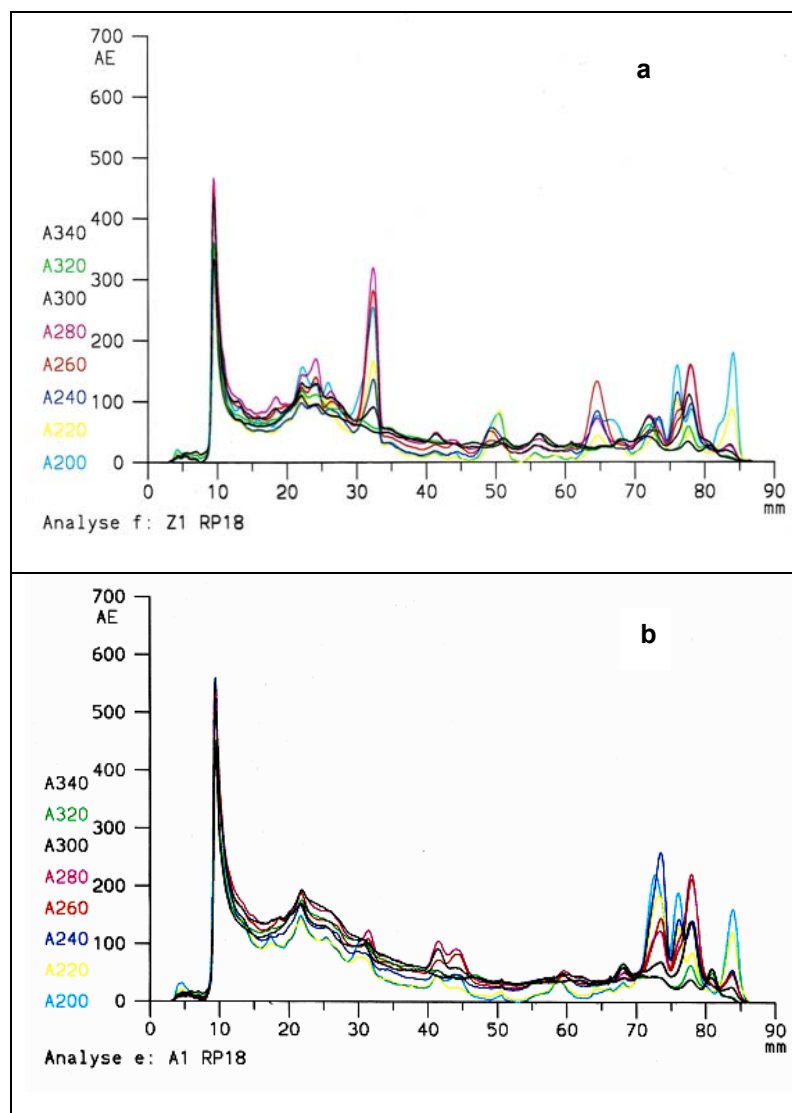


Abb. 38: Trennung organischer Verbindungen nach Polarität in einem Zulauf (a) und einem Ablauf (b) einer Kläranlage, stationäre Phase: KG 60 F 254s (MERCK, Art. Nr. 5365) Format: 10x20 cm; Schichtdicke 200 µm, chromatographische Entwicklung: automatische Mehrfachentwicklung nach DIN 38 407 Teil 11 mit dem AMD2 Gerät von Camag (MuttENZ, Schweiz), Detektion UV (Mehrwellenlängenscan, Scanner 3 von Camag (MuttENZ, Schweiz))

Detektion bakterientoxischer Wirkstoffe im Zu- und Ablauf einer Kläranlage

Nach der physikalischen Auswertung des Chromatogramms erfolgt mit *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) als Testorganismus der postchromatographische Test auf bakterientoxische Wirkstoffe. Durch antibiotisch wirksame Hemmstoffe wird das Wachstum der Testkeime auf dem Dünnschichtchromatogramm gehemmt und durch Hemmhöfe angezeigt. Die Detektion erfolgt mit einem Bakterienvitalitätstest durch Besprühen des Bakterienrasens auf dem Dünnschichtchromatogramm

mit einem MTT-Tetrazoliumsalz²³. Die Größe des Hemmhofs wird bestimmt einerseits durch die applizierte Menge und andererseits durch die Wirkungsspezifität der Wirkstoffe.

Abb. 39 macht deutlich, dass die methanolischen Extrakte (z.B. A*) der Abwassertrockenmasse eine bessere Ausbeute an bakterientoxischen Verbindungen aufweisen als durch eine Festphasenextraktion mit RP18 Material (z.B. A). Die extrahierten bakterientoxischen Verbindungen werden durch die Normalphasenchromatographie mit der HPTLC-AMD klar in 5-7 Polaritätsgruppen aufgetrennt.

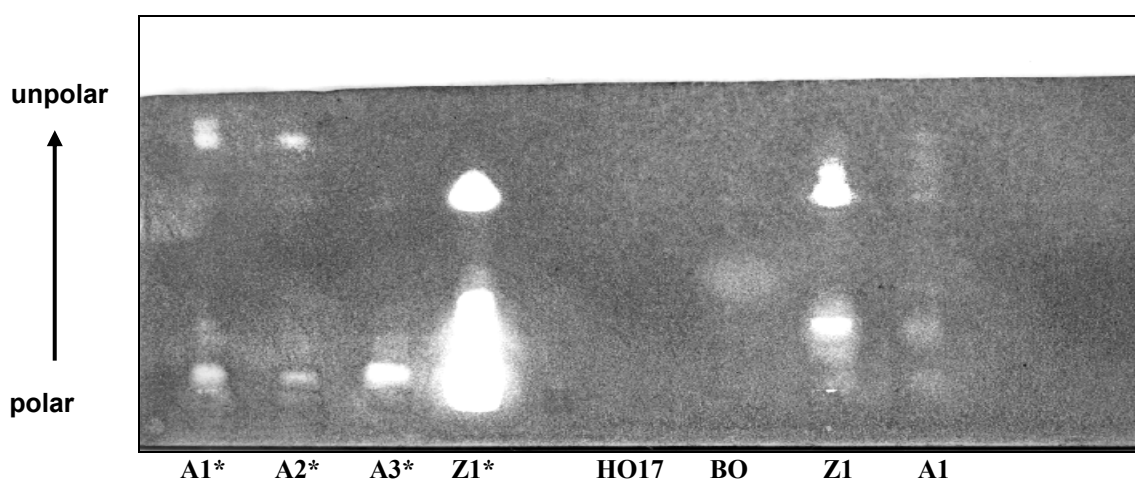


Abb. 39: Bakterientoxische Wirkstoffe im Zulauf (Z) und Ablauf (A) einer Kläranlage, negativ Kontrollen für unbelastete Oberflächengewässer HO17 (Hohlosee), BO (Bostalsee), (* sind methanolische Extrakte der Trockenmasse aus 40 mL nativer Abwasserprobe), stationäre Phase: KG 60 F 254s (MERCK, Art. Nr. 5365) Format: 10x20 cm; Schichtdicke 200 µm, chromatographische Entwicklung: automatische Mehrfachentwicklung mit dem AMD2 Gerät von Camag (Muttenez, Schweiz), Testorganismus *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)

Die Abläufe der Kläranlagen weisen im Vergleich mit den Kläranlagenzuläufen deutlich auf eine Reduzierung der antibiotischen Wirksamkeit hin. Dennoch ist bei zwei Proben im Ablauf eine mögliche Neusynthese von antibiotisch wirksamen Substanzen mit einer unpolaren Struktur zu beobachten (A1* und A2*).

²³ MTT (3, (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid)

Detektion bakterientoxischer Wirkstoffe im Flussprofil der Alb (1-6)

Insgesamt an sechs Probestellen²⁴ des Flusses Alb bei Karlsruhe wurden je 1 L Wasserprobe auf bakterientoxische Verbindungen untersucht. Die Probenvorbereitung und chromatographische Auftrennung der Verbindungen erfolgt mit der HPTLC-AMD gemäß DIN 38 407 Teil 11. Auf dem Chromatogramm werden durch den Einsatz von *Bacillus subtilis* als Testorganismus antibiotisch wirksame Substanzen deutlich sichtbar. Das Chromatogramm (Abb. 40) lässt erkennen, dass bereits die Probe Alb 1 (1) unmittelbar vor der Kläranlage Neurod mit antibiotisch wirksamen Substanzen belastet ist. Bei der Alb 2 (2) erfolgt ein stärkerer Eintrag von Antibiotika über die Kläranlage in das Gewässer. Diese Belastung wird bis zur Alb 5, dem Einlauf der Kläranlage Neureut, verdünnt und erfährt eine starke Zunahme dieser Wirkstoffe durch den Kläranlageneintrag Neureut. Abb. 40 macht deutlich, dass die Haupteintragsquellen für Antibiotika in die Oberflächengewässer die Ausläufe der kommunalen Kläranlagen sind.

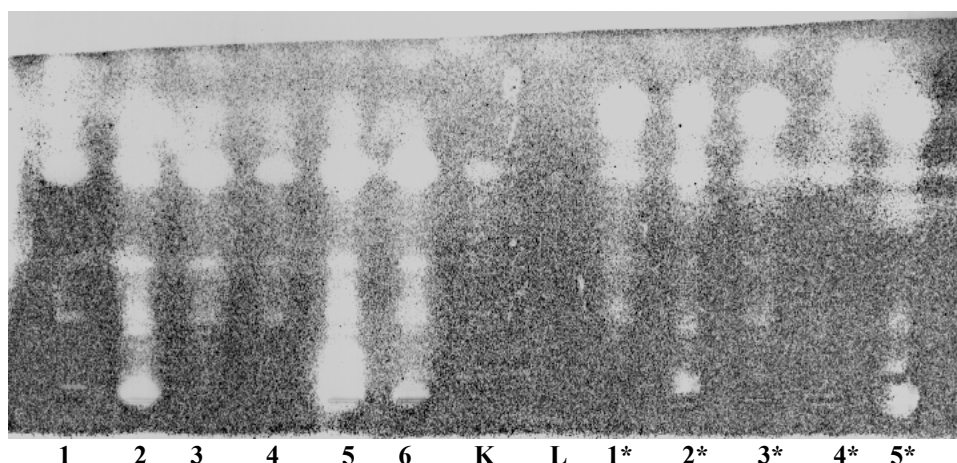


Abb. 40: Detektion von antibiotisch wirksamen Substanzen in der Alb, 1-5 = Probestellen Alb 1 bis Alb 5, K unbelastete Wasserprobe, L Leerbahn (* sind methanolische Extrakte der Trockenmasse aus 40 mL nativer Wasserprobe), stationäre Phase: KG 60 F 254s (MERCK, Art. Nr. 5365) Format: 10x20 cm; Schichtdicke 200 µm, chromatographische Entwicklung: automatische Mehrfachentwicklung mit dem AMD2 Gerät von Camag (Muttenz, Schweiz), Testorganismus *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)

Durch die Zuordnung von Referenzsubstanzen kann im Bereich der Startpunkte des Chromatogramms die Anwesenheit von Tetracyclinen vermutet werden.

²⁴ Probestellen der Alb 1- Alb 5 (Juli 1999 – Februar 2000), Alb 1 (Alb unmittelbar vor der Kläranlage Neurod), Alb 2 (Ablauf der Kläranlage Neurod), Alb 3 (Alb ca. 4 km nach der Kläranlage Neurod), Alb 4 (Alb unmittelbar vor der Kläranlage Neureut), Alb 5 (Ablauf der Kläranlage Neureut), Alb 6 (Alb ca. 5 km nah der Kläranlage Neureut)

3.3.2 Nachweis fungizider bzw. antimykotischer Wirkstoffe in Gewässerproben

Neben dem Einsatz von Penicilliumsporen hat sich der Hefestamm - *Rhodoturula rubra* ATCC 70403 - als sehr geeigneter Testorganismus gezeigt, der bei guten Wachstumbedingungen auf der Dünnschichtplatte nach ca. 24 h eine rote Eigenfärbung entwickelt. Bei Anwesenheit eines fungiziden Wirkstoffes erscheint ein weißer Hemmhof, dessen Größe bestimmt wird durch die applizierte Menge und durch die Wirkungsspezifität des Fungizids (siehe Kapitel 3.2.1.2).

An sechs Probestellen des Flusses Alb bei Karlsruhe wurden je 1 L Wasserprobe auf antimykotische Verbindungen untersucht (siehe Fußnote 24). Die Probenvorbereitung und chromatographische Auftrennung der Verbindungen erfolgt gemäß DIN 38 407 Teil 11.

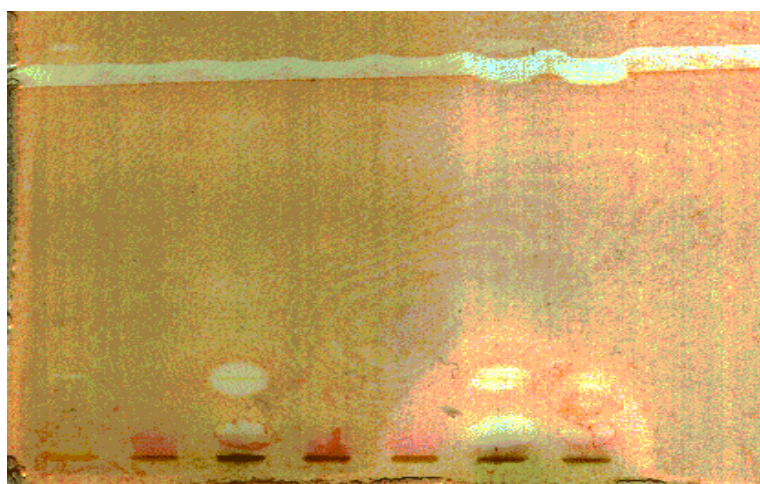


Abb. 41: Detektion von antimykotisch wirksamen Substanzen in der Alb, 1-5 = Probestellen Alb 1 bis Alb 5, L Leerbahn, stationäre Phase: KG 60 F 254s (MERCK, Art. Nr. 5365) Format: 10x20 cm; Schichtdicke 200 µm, chromatographische Entwicklung: automatische Mehrfachentwicklung mit dem AMD2 Gerät von Camag (Muttenz, Schweiz), Testorganismus *Rhodoturula rubra* ATCC 70403

Wie bei dem Eintrag von Antibiotika durch die Kläranlagen in das Oberflächengewässer erfolgt auch bei der Alb 2 ein stärkerer Eintrag von Fungiziden bzw. Antimykotika über die Kläranlage in die Alb. Diese Belastung wird bis zur Alb 5, dem Einlauf der Kläranlage Neureut, verdünnt und erfährt eine starke Zunahme dieser Wirkstoffe durch den erneuten Kläranlageneintrag. Inwieweit es sich bei einem kommunalen Abwasser um Fungizide oder um antimykotische Pharmaka handelt, kann mit dieser Methode nicht entschieden werden.

Detektion von fungiziden Wirkstoffen in Oberflächengewässern Saar – Mosel

Azol-Fungizide zählen zu einer der wichtigsten Wirkstoffgruppen im Pflanzenschutz und werden vor allem im Getreide- sowie im Obst- und Weinbau eingesetzt. Azol-Derivate besitzen auch bei der Behandlung von systemischen Pilzinfektionen des Menschen eine besondere Bedeutung, da diese Wirkstoffe im Vergleich zu anderen Antimykotika (z.B. Amphotericin B) geringere Nebenwirkungen aufweisen und daher häufig die einzige therapeutische Alternative darstellen. (BGVV 2001). Da im Hinblick auf den vorbeugenden Gesundheits- und Verbraucherschutz die möglichen Auswirkungen der Azol-Anwendung im Pflanzenschutz auf die Resistenzwirkung potentiell humanpathogener Pilze abgeklärt werden soll, besteht innerhalb der „Internationalen Saar-Mosel Kommission“ (IKSMS) ein großes Interesse, die mögliche Anwesenheit von Azol-Fungiziden zunächst in den Oberflächengewässern im Raum Luxemburg, Frankreich, Rheinland Pfalz und dem Saarland zu erfassen.

Insgesamt an 10 Probestellen²⁵ von Fließgewässern aus Luxemburg, Frankreich, Rheinland Pfalz und dem Saarland wurden von Mai 2000 bis September 2000 je 1 L Wasserprobe auf fungizide Verbindungen untersucht.

Chromatographische Auftrennung und „Fingerprint“ der Wasserprobe

Die Probenvorbereitung und chromatographische Auftrennung der Verbindungen erfolgt mit einem Universalgradienten gemäß DIN 38 407 Teil 11. (s.o.)

Aufgrund des geringen Anteils an Biomasse in den einzelnen Wasserproben konnten auf dem Chromatogramm mit Hilfe des Mehrwellenlängenscans (200 nm – 320 nm) anhand signifikanter Peaks, (auch „chromatographischen „Fingerprints“ genannt), die Wasserproben aus den einzelnen Regionen, wie Frankreich und Luxemburg und Saarland sowie aus Rheinland Pfalz gut voneinander unterschieden werden. Diese Unterschiede waren während des gesamten Untersuchungszeitraumes zu beobachten. Abb. 42 zeigt charakteristische Chromatogramme an zwei unterschiedlichen Probestellen.

Nach Überprüfung der gefundenen Substanzen mit den UV Spektren handelsüblicher Fungizide,

²⁵ Luxemburg: die Sauer bei Wasserbillig; die Alzette bei Ettelbruck; die Wiltz bei Tutschemillen, Frankreich: die Mosel bei Millery; die Saar bei Keskastel, die Mosel bei Chatel Nomexy, La Meurthe bei Azerailles, Rheinland Pfalz: die Saar bei Kanzem; die Mosel bei Frankel, bei Palzem und bei Koblenz Saarland: die Saar bei Gündingen und bei Fremersdorf, die Nied bei Niedaltdorf

wird in Abb. 42b eine unbekannte Substanz bei der Migrationsstrecke 44,5 mm detektiert. Inwiefern es sich um ein mögliches Fungizid handelt, kann mit der wirkungsspezifischen Detektion überprüft und verifiziert werden.

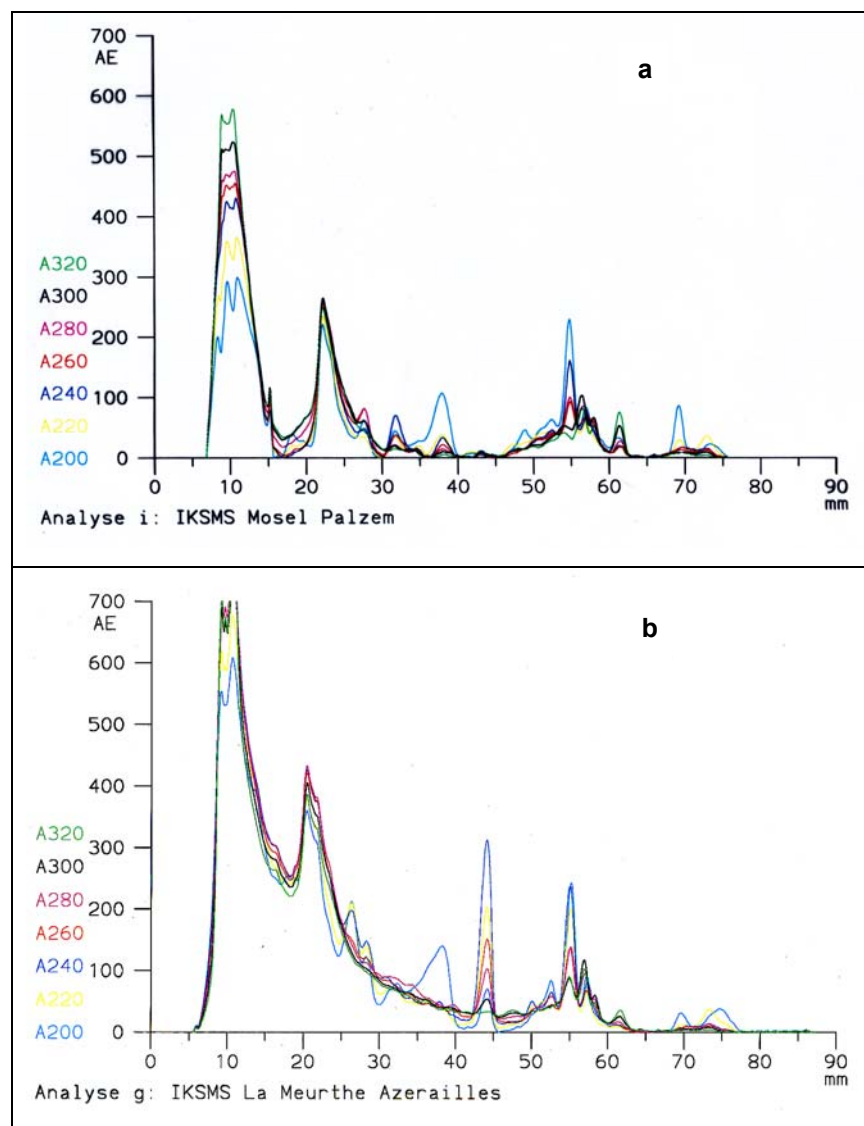


Abb. 42: Trennung organischer Verbindungen nach Polarität in Wasserproben aus der Saar bei Palzem (a) und der Mosel bei Azerailles (b), stationäre Phase: KG 60 F 254s (MERCK, Art. Nr. 5365) Format: 10x20 cm; Schichtdicke 200 µm, chromatographische Entwicklung: automatische Mehrfachentwicklung nach DIN 38 407 Teil 11 mit dem AMD2 Gerät von Camag (Muttenez, Schweiz), Detektion UV (Mehrwellenlängenscan, Scanner 3 von Camag (Muttenez, Schweiz))

Die anschließende wirkungsspezifische Detektion erfüllt somit zwei Aufgaben:

- Nach der physikalischen Auswertung kann eine erste Identifizierung der Wirkstoffe verifiziert werden, wie z.B. ob ein mögliches chromatographisch identifiziertes Fungi-

- zid auch fungizide Wirkung hat,
- die Gegenwart unbekannter Wirkstoffe (z.B. UV inaktive Substanzen, Stoffe mit Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze physikalischer Detektionsverfahren) bzw. aktiver Metaboliten kann aufgespürt werden.

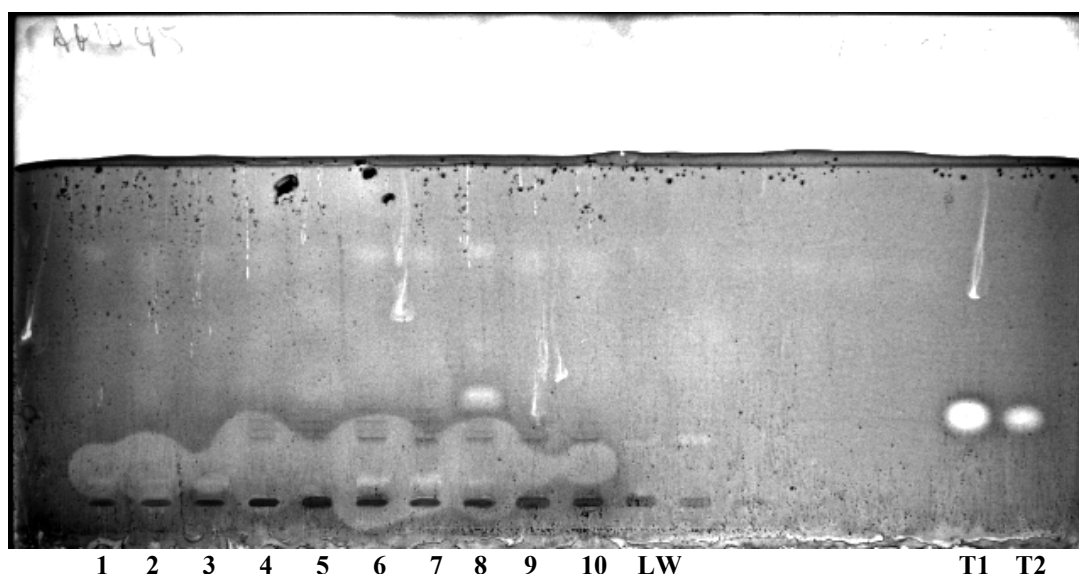


Abb. 43: Detektion von fungiziden Verbindungen in Oberflächengewässern, 1-3 Luxemburg, 4-7 Frankreich, 8-10 Saarland, LW Leerwert, T1, T2 Standards von Tebuconazol 20 ng, 10 ng, stationäre Phase: KG 60 F 254s (MERCK, Art. Nr. 5365) Format: 10x20 cm; Schichtdicke 200 µm, chromatographische Entwicklung: automatische Mehrfachentwicklung mit dem AMD2 Gerät von Camag (Muttens, Schweiz), Testorganismus: *Penicillium expansum* (ATCC 7861) (siehe Veröff. III, Abb. 1, S. 61)

Abb. 43 zeigt aufgrund der fungiziden Wirkung die Gegenwart von 2-3 Fungiziden in den Proben 1-10 auf. Die Migrationsstrecken lassen den Schluss zu, dass es sich bei den detektierten Wirkstoffen um polare Verbindungen handelt (siehe auch Veröff. III, S. 61).

Aufgrund dieses Befundes können bei der Suche nach den entsprechenden Schadstoffen in einer Wasserprobe zahlreiche Fungizide wie z.B. Procymidon, Vinclozolin Captafol, Chlozolinat u.a. bereits ausgeschlossen werden, da ihre Lage im Chromatogramm nicht den hier detektierten Stoffen entspricht. Die sehr zeit- und kostenaufwendige Einzelstoffanalytik auf Fungizide kann mit diesem Verfahren weitgehend eingegrenzt werden.

Nach der UV-Detektion anhand der vorliegenden Spektrenbibliothek und nach dem postchromatographischen Biomonitoring (s. Abb. 43) sind in Tabelle 8 die Fungizide aufgelistet, auf die die Wasserproben mit weiteren instrumentelle Analytikverfahren (z.B. GC/MS) weiter untersucht werden können.

Tab. 8: Vorschlagsliste möglicher Fungizide in Oberflächenwasserproben, basierend auf den Ergebnissen in Abb. 43 (siehe Tab. 1, Veröff. III, S. 61)

| Land | Fluss | Probestelle | Mögliche Fungizide |
|---------------|---------|---------------|--|
| Luxemburg | Sauer | Wasserbillig | Imazalil, Fenpropidin (Met.) |
| Luxemburg | Alzette | Ettelbruck | Imazalil, Fenpropidin (Met.), Benalaxyl |
| Luxemburg | Wiltz | Tutschemillen | Imazalil, Fenpropidin (Met.), Benalaxyl |
| Frankreich | Mosel | Millery | Benalaxyl, Iprodion, Propiconazol, Carbendazim |
| Frankreich | Saar | Keskastel | Fenpropimorph oder Benalaxyl, Iprodion |
| Frankreich | Mosel | Chatel Nomexy | Benalaxyl, Isoprot. o. Metoxuron, Carbendaz., Iprod. |
| Frankreich | Meurthe | Azerailles | Benalaxyl, Isoprot. o. Metoxuron, Carbendaz., Iprod. |
| Rheinl./Pfalz | Saar | Kanzem | Carbendazim, Imazalil, Benalaxyl |
| Rheinl./Pfalz | Mosel | Frankel | Carbendazim, Imazalil |
| Rheinl./Pfalz | Mosel | Palzem | Carbendazim, Imazalil |
| Rheinl./Pfalz | Mosel | Koblenz | Carbendazim, Imazalil |
| Saarland | Nied | Niedaltdorf | Carbendazim, Imazalil, Epoxiconazol |
| Saarland | Saar | Güdingen | Carbendazim, Imazalil |
| Saarland | Saar | Fremersdorf | Carbendazim, Imazalil |

Aufgrund der Möglichkeit eines Gehaltes an fungiziden Azolen in der Probe 8 von ca. 0.02 µg/L Tebuconazoleinheiten wurde die Saar an dieser Probestelle vermehrt überwacht. Eine weitere Kontamination mit diesem Wirkstoff konnte in der Folgezeit nicht gefunden werden.

Bei Untersuchungen in Rheinland - Pfalz an Oberflächengewässern und Kläranlagen wurde festgestellt, dass die meisten Pflanzenschutz-Wirkstoffe in sog. "Peaks" innerhalb des Jahres auftreten, um dann in ihrer Konzentration wieder sehr stark zurückzugehen bzw. unter der jeweiligen Nachweisgrenze zu liegen. Dies legt den Schluss nahe, dass immer noch nicht alle Spritzen im Feld gereinigt werden und auf diese Weise hohe Wirkstoffmengen über die Kanalisation in die Kläranlagen gelangen. Dort werden sie nicht abgebaut und gelangen in die Gewässer.

Einige Stoffe können ganzjährig nachgewiesen werden, wie z.B. Isoproturon (= IPU, der Gräserwirkstoff), Diuron (z.B. Vorox G, Rapir WG) und Tebuconazol (Getreide- und Weinbau-Fungizide) (Augustin 2002).

3.3.3 Charakterisierung von Biolumineszenz-Inhibitoren in Ultrafiltraten²⁶ von Gewässerproben

Bei der Ultrafiltration (Abk.: UF) wird die Ausschlussgrenze (engl. cut-off) auf die Molekülmasse anstatt auf die Partikelgröße bezogen. Sie liegt im Bereich von ca. 1000 bis 2×10^6 Dalton. Die UF wird im Prozessbereich überwiegend dynamisch durchgeführt, d.h. mit Membranüberströmung. Dabei fällt neben dem Filtrat, auch Permeat genannt, zusätzlich noch das Konzentrat an.

Der Einsatz der wirkungsbezogenen Analytik mit der HTLC-AMD bietet die Möglichkeit, die Wirkung der Schadstoffe nicht nur in fraktionierten Extrakten einer Wasserprobe sondern auch in Ultrafiltraten mit einem definierten Bereich ihrer Molmasse zu verfolgen. So können diese Toxine einerseits hinsichtlich ihrer Molmasse aber auch hinsichtlich ihrer Polarität näher charakterisiert werden. Durch die Chromatographie und UV-Detektion ist zunächst eine erste Charakterisierung und Differenzierung der einzelnen Fraktionen möglich. Als Modellproben für dieses Verfahren wurden Alb 1, eine verhältnismäßig unbelastete Wasserprobe, und Alb 5, eine durch den Auslauf einer kommunalen Kläranlage belastete Wasserprobe, für die Fraktionierung der organischen Bestandteile hinsichtlich ihrer Molmassen ausgewählt.

Die einzelnen Fraktionen (> 30 kDa bis < 1 kDa): **F1** > 30 kDa, **F2** 30-30 kDa, **F3** 3-10 kDa, **F4** 1-3 kDa, **F5** < 1 kDa wurden nach DIN 38 407 Teil 11 mit einem Universalgradienten chromatographiert und mittels eines Mehrwellenlängenscans (200 nm bis 320 nm) ausgewertet.

Der Nachweis von Biolumineszenz-Inhibitoren auf dem Chromatogramm erfolgt mit dem Testorganismus *Vibrio fischeri*. Der Leuchtbakterien-Hemmtest ist ein Standardtest bei der Untersuchung von Abwasser. Die Luminometrie ist eines der nachweisstärksten Messverfahren überhaupt und liefert im Fall der Leuchtbakterien eine exakte, quantitative Erfassung toxischer Effekte. In Abbildung 44 werden eindrücklich zahlreiche toxische Substanzen im polaren wie im unpolaren Bereich detektiert.

²⁶ Die Ultrafiltration wurde innerhalb eines gemeinsamen FE- Vorhabens: WISBOB 02WU9859/2 von der Arbeitsgruppe von Prof. Frimmel (Karlsruhe) durchgeführt. Die Filtrate der Wasserproben wurden gefriergetrocknet und dem LFU für die wirkungsbezogene Analytik zur Verfügung gestellt.

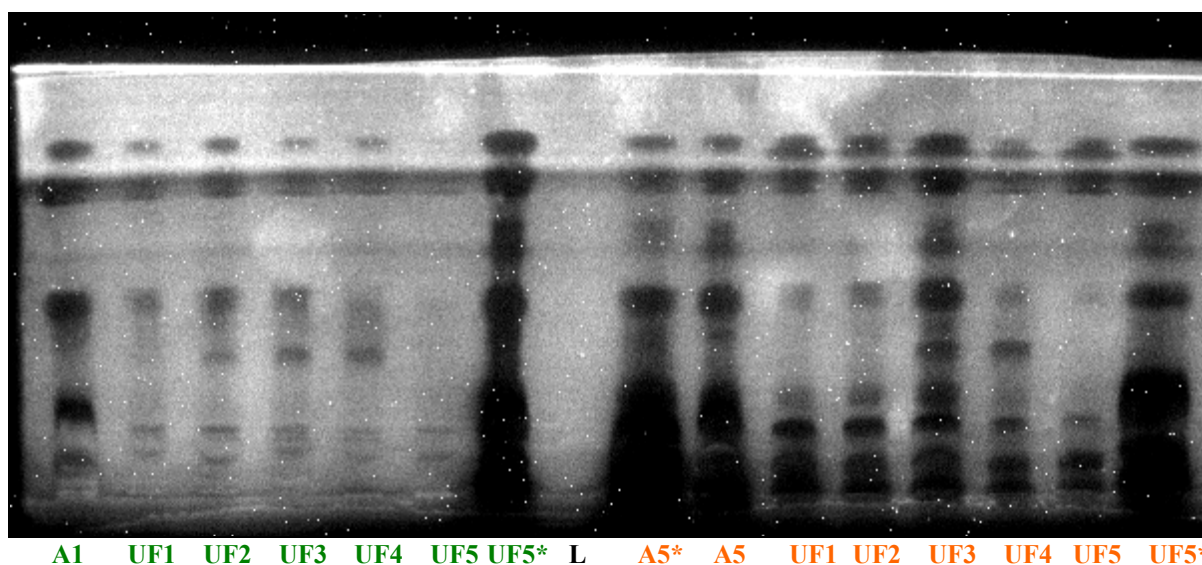


Abb. 44: Leuchtbakterientest postchromatographisch von Ultrafiltraten von **Alb 1** und **Alb 5**: **A1, A5** Original, UF1-UF5 Ultrafiltrate, L – Leerwert, * 10-fach konzentriert, stationäre Phase HPTLC KG 60 F₂₅₄, Format: 10x20 cm; Schichtdicke 200 µm, chromatographische Entwicklung: automatische Mehrfachentwicklung mit dem AMD2 Gerät von Camag (Muttens, Schweiz), Testorganismus: *Vibrio fischeri*, Dokumentation: Peltier Cooled CCD Kamera Sensi-Cam® (AVT Horn, Aalen, BRD), Belichtungszeit 800 sec, (Veröff. III, Abb. 3, S. 63)

Alb 5 erweist sich als weitaus belasteter als Alb 1 nicht nur hinsichtlich der Intensität an toxischen Stoffen sondern auch in der Anzahl gegenwärtiger Toxine. Polare Toxine werden über alle Fraktionen verschleppt. Biolumineszenz-Inhibitoren, die im mittelpolaren Bereich zu finden sind, werden bei Alb 5 im UF 3 bis UF 4 angereichert. Dies gilt für Proben der Alb 5 aber ebenso wie für die weniger belastete Wasserprobe Alb 1. Für diesen Effekt können Toxine (1-10 kDa) einer bestimmte Molmasse verantwortlich sein. Ebenso muss die Fähigkeit kleinerer Moleküle zur möglichen Assoziation an größere Moleküle diskutiert werden. Eine starke Anreicherung verschiedener Substanzgruppen bei Alb 5 ist im UF 3 zu beobachten.

Eine Assoziation der Toxine an größere Molmasseneinheiten kann durch Wasserstoffbrückenbindung oder auch durch hydrophobe Wechselwirkungen bedingt sein. Aufgrund der Lage im Chromatogramm und der Remissionsmessungen kann die Gegenwart von phenolhaltigen Substanzen als sehr wahrscheinlich angesehen werden (Weins et al. 2001).

Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass bei Zugabe von 2.0 µg/L Coffein, Theobromin und Theophyllin in die Wasserprobe vor der Ultrafiltration diese Xanthinderivate in allen Fraktionen UF1 bis UF5 wiedergefunden wurden. Es zeigte sich eine „Anreicherung“ dieser Coffeinmetabolite mit einer Molmasse von 194 D in allen Fraktionen.

3.3.4 Nachweis von Cholinesterasehemmstoffen im Flussprofil der Alb

An sechs Probestellen des Flusses Alb bei Karlsruhe wurden je 1 L Wasserprobe auf esterasehemmende Verbindungen untersucht (siehe Fußnote 17). Die Probenvorbereitung und chromatographische Auftrennung der Verbindungen erfolgt gemäß DIN 38 407 Teil 11.

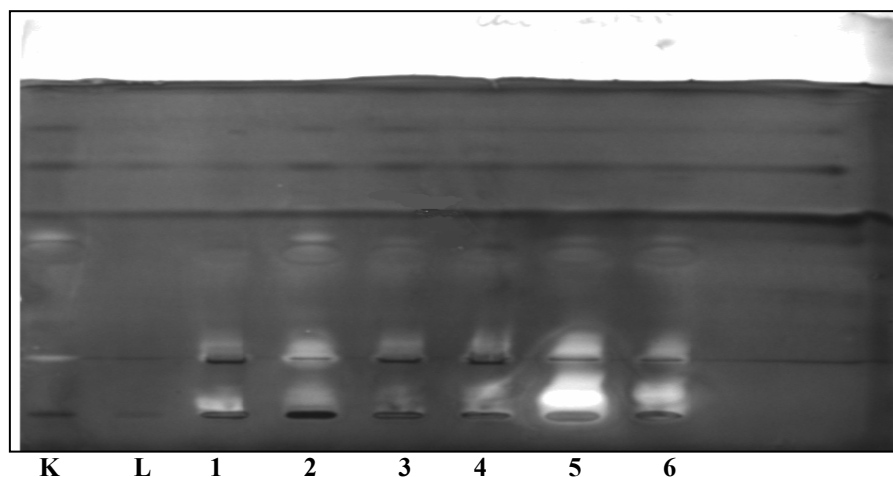


Abb. 45: Gegenwart von Inhibitoren der Cholinesterase in der Alb, 1-5 = Probestellen Alb 1 bis Alb 5, K unbelastete Wasserprobe, L Leerbahn, stationäre Phase HPTLC KG 60 F₂₅₄, Format: 10x20 cm; Schichtdicke 200 µm, chromatographische Entwicklung: automatische Mehrfachentwicklung mit dem AMD2 Gerät von Camag (MuttENZ, Schweiz), Dokumentation: Peltier Cooled CCD Kamera SensiCam® (AVT Horn, Aalen, BRD) (Veröff. III, Abb. 4, S. 64)

Nach der chromatographischen Trennung werden die Inhibitoren der Cholinesterase auf der Platte detektiert (siehe Kapitel 3.1.3).

In Abb. 45 wird deutlich, dass insbesondere der Kläranlagenauslauf Alb 5 (5) mit Inhibitoren der Cholinesterase belastet ist. Wie bei dem signifikanten Eintrag von Antibiotika und Antimykotika durch die Kläranlagen in das Oberflächengewässer erfolgt auch bei Alb 5 ein stärkerer Eintrag von Cholinesteraseinhibitoren über die Kläranlage in die Alb.

Zunächst müssen die Möglichkeiten diskutiert, auf welchem Wege Pestizide, die als Inhibitoren der Cholinesterase gelten, über die kommunalen Kläranlagen in die Oberflächengewässer gelangen können. Dennoch muss betrachtet werden, inwieweit auch mögliche Arzneistoffe wie z.B. Bambuterol und Terbutalin als Broncholytika, sowie cholinerge Parasympathomimetika wie Neostigmin und Tacrin, als die Ursache für die Hemmung der Cholinesterase in Frage kommen. Neben Bambuterol, Terbutalin und Neostigmin gilt Tacrin, ein Medikament zur Behandlung der Alzheimer

Krankheit, als sehr starker Inhibitor der Cholinesterase (Zollner 1993). Cholinesteraseinhibitoren sind in der Therapie der Alzheimer- Demenz etabliert. Drei Präparate Donepezil (Aricept®), Rivastigmin (Exelon®) und Tacrin (Cognex®) sind für die Indikation „leichte und mittelschwere Demenz vom Alzheimer-Typ“ seit 1996 zugelassen und erhältlich. Diese Wirkstoffe werden als zentral wirksame Hemmstoffe der Acetylcholinesterase bezeichnet. Sie binden sich reversibel an die katalytisch wirksame Seite des Cholinesterasemoleküls und blockieren so die Enzymaktivität. Damit wird die AcetylcholinKonzentration im synaptischen Spalt erhöht, d.h. die cholinerge Aktivität nimmt zu. Die Tagesdosis beträgt zwischen 5 mg und 160 mg. Die Nachweisgrenze von Tacrin im Cholinesterasehemmtest in der HPTLC-AMD beträgt 20 pg/pro Fleck.

Nachweis von Cholinesteraseinhibitoren in Ultrafiltraten von Alb 1 und Alb 5

Zur weiteren Charakterisierung werden wie in 3.3.3 beschrieben, die einzelnen Ultrafiltrate (> 30 kDa bis < 1 kDa): **F1**>30 kDa, **F2** 30-30 kDa, **F3** 3-10 kDa, **F4** 1-3 kDa, **F5** < 1k) der Wasserproben Alb1 und Alb5 nach DIN 38 407 Teil 11 mit einem Universalgradienten chromatographiert und auf dem Chromatogramm die Inhibitoren der Cholinesterase detektiert.

In Abb. 46 wird - wie in Abb. 45 bereits nachgewiesen - die Gegenwart von Cholinesteraseinhibitoren in der Wasserprobe Alb 1 bestätigt. Die polarste Komponente reichert sich hauptsächlich im Ultrafiltrat UF5 an, was auf eine Molmasse < 1kDa des Wirkstoffes schließen lässt. Die 10- fache Anreicherung der Moleküle < 1kDa in Fraktion 5 (**F5***) zeigt eine Wirkstoffmischung von mindestens 5 verschiedenen Inhibitoren unterschiedlicher Polarität nach. Weitere Untersuchungen bestätigten die Anreicherung eines unpolaren Wirkstoffes in UF1 und UF2.

Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich bei der Untersuchung der Ultrafiltrate der Wasserprobe Alb5. Die Hauptwirkung resultiert von einem oder mehreren Wirkstoffen mit polaren Gruppen. Tacrin (T) als Referenzsubstanz bleibt als polare Substanz unter den Chromatographiebedingungen des Universalgradienten im Startbereich liegen.

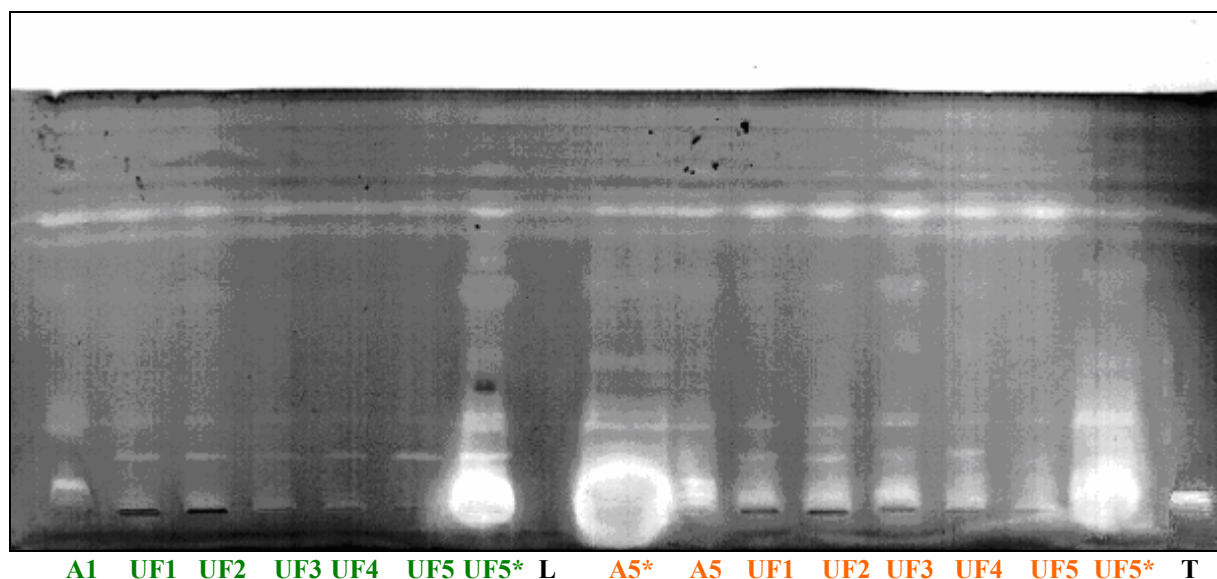


Abb. 46: Cholinesterasehemmtest postchromatographisch in Ultrafiltraten von **Alb1** und **Alb 5**: **A1**, **A5** Original, UF1-UF5 Ultrafiltrate, L – Leerwert, * 10-fach konzentriert T 50 ng Tacrin, stationäre Phase HPTLC KG 60 F₂₅₄, Format: 10x20 cm; Schichtdicke 200 µm, chromatographische Entwicklung: automatische Mehrfachentwicklung mit dem AMD2 Gerät von Camag (Muttenez, Schweiz), Dokumentation: Peltier Cooled CCD Kamera SensiCam® (AVT Horn, Aalen, BRD)

Eigene Untersuchungen konnten durch die Isolierung der Cholinesteraseinhibitoren mit Hilfe einer präparativen Chromatographie mit der GC/MS-Analytik den Wirkstoff Tacrin bisher nicht bestätigen. Die Gegenwart der starken Hemmwirkung im polaren Bereich der organischen Bestandteile von kommunalen Abwässern lässt anhand der Befunde in Abb. 46 stattdessen aktive Metaboliten dieser Wirkstoffe vermuten.

Bei der Überprüfung von 10 Wasserproben von Fließgewässern aus Luxemburg, Frankreich, Rheinland Pfalz und dem Saarland auf Inhibitoren der Cholinesterase konnten in jeder Wasserprobe Cholinesteraseinhibitoren nachgewiesen werden. Die Stärke der toxischen Wirkung korrelierte mit der Einwohnerdichte an der entsprechenden Probestelle. Dies lässt vermuten, dass die Kontaminationen der Oberflächengewässer mit Inhibitoren der Cholinesterase durch anthropogene Einträge erfolgt sind.

3.3.5 Bestimmungen von toxisch relevanten Rückständen in Lebensmitteln

Pflanzliche Lebensmittel gerieten nach Presseverlautbarungen im Frühjahr 2000 in Verdacht, mit einigen Chemikalien, wie etwa dem Anti-Milbenmittel Methiocarb, oder mit den Fungiziden Procyimidon und Imazalil über die zulässige Höchstmenge hinaus kontaminiert zu sein. Hierzu wurden von den staatlichen Überwachungsbehörden vermehrt pflanzliche Lebensmittel auf diese möglichen Kontaminationen hin untersucht. Mit der wirkungsbezogenen Analytik wurden Realproben auf die Gegenwart von Pestiziden untersucht. Die Untersuchungen beschränkten sich auf die Bestimmungen von Fungiziden und insektiziden Cholinesterasehemmstoffen.

Probenvorbereitung und chromatographische Trennung

Die Pestizide wurden aus den pflanzlichen Lebensmitteln gemäß dem deutschen Einheitsverfahren extrahiert (DFG S19).

Hierbei wurden 100 g pflanzliches Untersuchungsmaterial mit Aceton versetzt. Dabei wird soviel Wasser zugegeben, dass unter Berücksichtigung des natürlichen Wassergehalts der Probe das Verhältnis Aceton: Wasser während der Extraktion jeweils 2 : 1 Volumenteile beträgt. Zu dieser Lösung bzw. zum filtrierten Extrakt gibt man Dichlormethan, wobei sich überschüssiges Wasser abscheidet. Der Abdampfrückstand der organischen Phase wird durch eine Gelpermeationschromatographie an dem Polystyrol Bio-Beads S-X3 durch Elution mit einem Cyclohexan-Essigsäure-Gemisch gereinigt. Von der rückstandshaltigen Fraktion, die auf eine Konzentration von 4,5 g Untersuchungsmaterial/ ml eingestellt wurde, wurden für die Analyse 50 – 100 µl Extrakt auf die HPTLC Platte appliziert.

Die Auftrennung der Substanzen in der Normalphasen-Dünnschichtchromatographie erfolgt wie in der Wasseranalytik mit einem Universalgradienten aufgrund ihrer Polarität mittels Automated-Multiple-Development (AMD)-Technik. Der Gradient ist ein 33-Stufengradient, basierend auf Dichlormethan, der mit Acetonitril als polare Komponente beginnt und mit n-Hexan als unpolare Komponente endet. Die 1. Identifikation und Bestimmung wird durch in-situ-Remissionsmessung bei 7 Wellenlängen (200-320 nm) durchgeführt. Eine mögliche Identifikation einzelner Stoffe erfolgt aufgrund der Lage im Chromatogramm und anhand der Remissionsspektren handelsüblicher Fungizide in einer Spektrenbibliothek. Tabelle 9 gibt die Migrationsstrecken von 16 Fungiziden

an, die auf der Kieselgel (HPTLC KG 60 F254, Format: 10x20 cm; Schichtdicke 200 µm) als stationäre Phase und bei einer AMD-Entwicklung mit dem Universalgradienten nach DIN 38407, Teil 11 erreicht werden.

Tab. 9: Fungizide als Referenzsubstanzen und ihre Migrationsstrecken in der HPTLC-AMD, stationäre Phase (HPTLC KG 60 F254, Format: 10x20 cm; Schichtdicke 200 µm) mobile Phase (Universalgradienten nach DIN 38407, Teil 11)

| Fungizide | AMD-Migrationsstrecke | Fungizide | AMD-Migrationsstrecke |
|---------------|-----------------------|------------------|-----------------------|
| Aniliazin | 55,3 mm | Iprodion | 52,4 mm |
| Benalaxyl | 30,3 mm | Myclobutanil | 23,8 mm |
| Benomyl | 58,4 mm | Oxadixyl | 23,0 mm |
| Bitertanol | 23,1 mm | Penconazol | 24,8 mm |
| Bupirimat | 26,8 mm | Prochloraz | 23,6 mm |
| Captafol | 53,7 mm | Procymidon | 55,6 mm |
| Captan | 52,2 mm | Propiconazol | 24,0 mm |
| Carbendazim | 21,4 mm | Pyrazophos | 38,5 mm |
| Chlorthalonil | 58,5 mm | Pyrimethanil | 29,7 mm |
| Chlozolilat | 55,0 mm | Quintozen | 71,0 mm |
| Epoxiconazol | 32,8 mm | Tebuconazol | 24,9 mm |
| Fenarimol | 23,8 mm | Tecnazen | 69,7 mm |
| Fenpropidin | 16,9 mm | Tolcophos-methyl | 60,3 mm |
| Fenpropimorph | 29,6 mm | Tolyfluanid | 56,5 mm |
| Flusilazol | 26,5 mm | Triadimefon | 30,2 mm |
| Imazalil | 18,5 mm | Vinclozolin | 58,1 mm |

Untersuchung der Lebensmittelproben auf Fungizide

Die postchromatographische Untersuchung auf Fungizide wurde mit *Penicillium*sporen als Testorganismus durchgeführt. *Penicillium*sporen weisen bei Wachstumbedingungen von 25°C in einer feuchten Atmosphäre auf der Dünnschichtplatte eine grüne Eigenfärbung auf. Bei Anwesenheit eines fungiziden Wirkstoffes erscheint ein weißer Hemmhof, dessen Größe bestimmt wird durch die applizierte Menge und durch die Wirkungsspezifität des Fungizids.

Das Chromatogramm mit *Penicilliummycel* wurde dokumentiert bei einer Beleuchtung der Dünnschichtplatte mit einer Lichtquelle von $\lambda = 254$ nm. Die Hemmhöfe werden sichtbar durch den speziellen Phosphoreszenzindikator in der stationären Phase. Es können somit mit optischen Methoden belastete und unbelastete Lebensmittelproben direkt auf dem Chromatogramm unterschieden werden (Abb. 47).

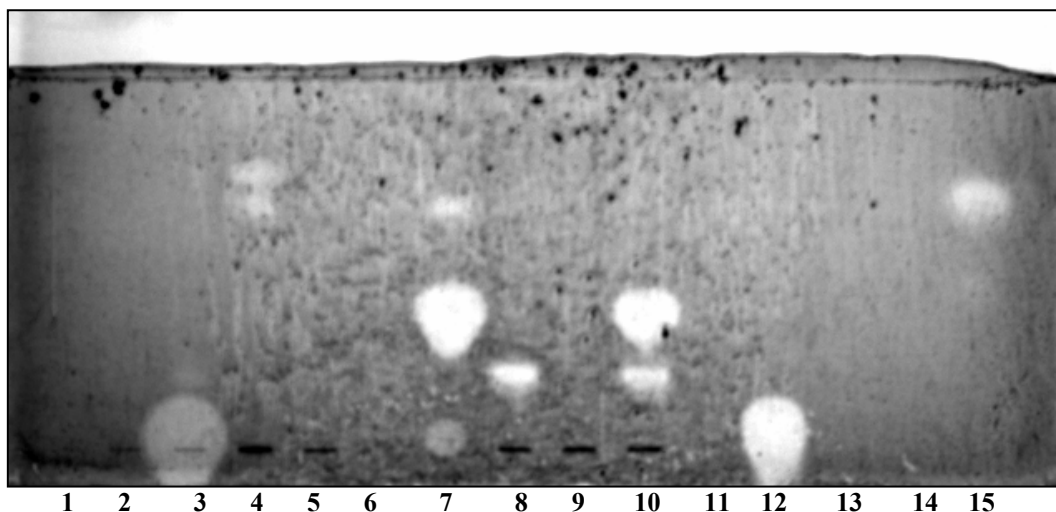


Abb. 47: Gegenwart von Fungiziden in verschiedenen pflanzlichen Lebensmittelproben, 1 Kontrolle Erdbeeren, 2-5, 9 Erdbeeren 6 Kontrolle Trauben, 7, 8, 10 Trauben, 11-15 Standards : Fenpropathrin 30 ng, Imazalil 10 ng, Mercaptodimethur 30 ng , Procymidon 100 ng, stationäre Phase HPTLC KG 60 F₂₅₄, Format: 10x20 cm; Schichtdicke 200 µm, chromatographische Entwicklung: automatische Mehrfachentwicklung mit dem AMD2 Gerät von Camag (MuttENZ, Schweiz), Dokumentation: Peltier Cooled CCD Kamera SensiCam® (AVT Horn, Aalen, BRD), Testorganismus: Penicilliumsporen (siehe Abb. 5, Veröff. III, S 65)

Die Migrationsstrecken fungizider Wirkkomponenten werden mit den Migrationsstrecken der entsprechenden Referenzsubstanzen (Tab. 9) verglichen. Somit kann die Anzahl möglicher Fungizide zu diesem Zeitpunkt schon eingeschränkt und eine Vorauswahl für die weitere Analytik getroffen werden (siehe Tab. 10) (Untersuchung beschrieben in Veröff. III, S. 65).

Die Bestimmungsgrenze u.a. von Tebuconazol wurde mit der Wirkungsanalytik untersucht und liegt bei 5 ng pro Fleck, Carbendazim als aktiver Hauptmetabolit des Fungizids Benomyl konnte noch bei 80 ng pro Fleck nachgewiesen werden. Die wirkungsanalytische Bestimmungsgrenze von Procymidon lag bei 110 ng pro Fleck. Hiermit wird für diese Substanz die Zielvorgabe der zulässigen Höchstmenge von 5 mg/kg bei Erdbeeren und Salat erfüllt. Bei Proben mit einer zulässigen Höchstmenge von 0,02 mg/kg bedarf es einer weiteren Konzentrierung des Untersuchungsextraktes.

Die Liste mit den 32 Referenzsubstanzen (Tab. 10) ist in keinem Fall vollständig und soll nur die Möglichkeiten aufzeigen, inwieweit die wirkungsbezogene Analytik ein geeignetes Instrument darstellt, fungizide Wirkungsäquivalente in einer Lebensmittelprobe aufzuspüren. Selbst eine Auflistung der Migrationsstrecken von weiteren fungiziden Standardsubstanzen wird die Analytiker

aufgrund physiko-chemischer Detektionsverfahren nicht davor bewahren, aktive Metabolite von Fungiziden zu übersehen, mit denen eine Lebensmittelprobe kontaminiert sein kann (siehe Abb. 47 und Tabelle 10, Probe 3).

Tab. 10: Auswertung der Proben 1-10 nach der wirkungsbezogenen Detektion (Abb. 47) auf mögliche Fungizide anhand der Migrationsstrecken von Referenzsubstanzen

| Proben-Nummer | Fungizide Wirkung | Mögliche Fungizide |
|---------------|------------------------|---|
| 1 | Keine | - |
| 2 | Keine | - |
| 3 | 10 mm | keine Referenzsubstanz vorhanden oder aktiver Metabolit |
| 4 | 54 mm, 59 mm | Procymidon, Vinclozolin |
| 5 | Keine | - |
| 6 | Keine | - |
| 7 | 10 mm, 27-35 mm, 54 mm | keine Referenzsubstanz vorhanden oder aktiver Metabolit, Burpirimat, Epoxiconazol, Fenpropimorph, Flusilazol, Pyrimethanil, Triadimefon, Procymidon |
| 8 | 22 mm | Carbendazim |
| 9 | Keine | - |
| 10 | 22 mm, 27 - 35 mm | Carbendazim, Burpirimat, Epoxiconazol, Fenpropimorph, Flusilazol, Pyrimethanil, Triadimefon, |

Untersuchung der Lebensmittelproben auf Insektizide

Parallel wurden Extrakte von Karotten und Salat auf Insektizide - mit der Eigenschaft als Cholinesteraseinhibitoren zu fungieren - untersucht.

In Abb. 48 ist deutlich zu erkennen, dass eine der vier Salatproben mit einem Cholinesteraseinhibitor belastet ist. Hier besteht der Verdacht einer Kontamination der Probe mit einem insektiziden Pestizid, z.B. Methiocarb oder einem Metaboliten von Mercaptodimethur.

Alle 4 Extrakte aus den verschiedenen Chargen von Karottenproben weisen einen charakteristischen Substanzgehalt an Inhibitoren der Cholinesterase auf.

Da die instrumentelle Analytik keine Belastung gängiger Pestizidwirkstoffe bestätigen konnte, sollten hier durch die Extraktion freigesetzte sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe diskutiert werden, die

als pflanzliche Insektizide fungieren können.

Insgesamt wurden in 10 von 35 Proben 1 – 4 Wirkstoffe als Kontaminanten detektiert.

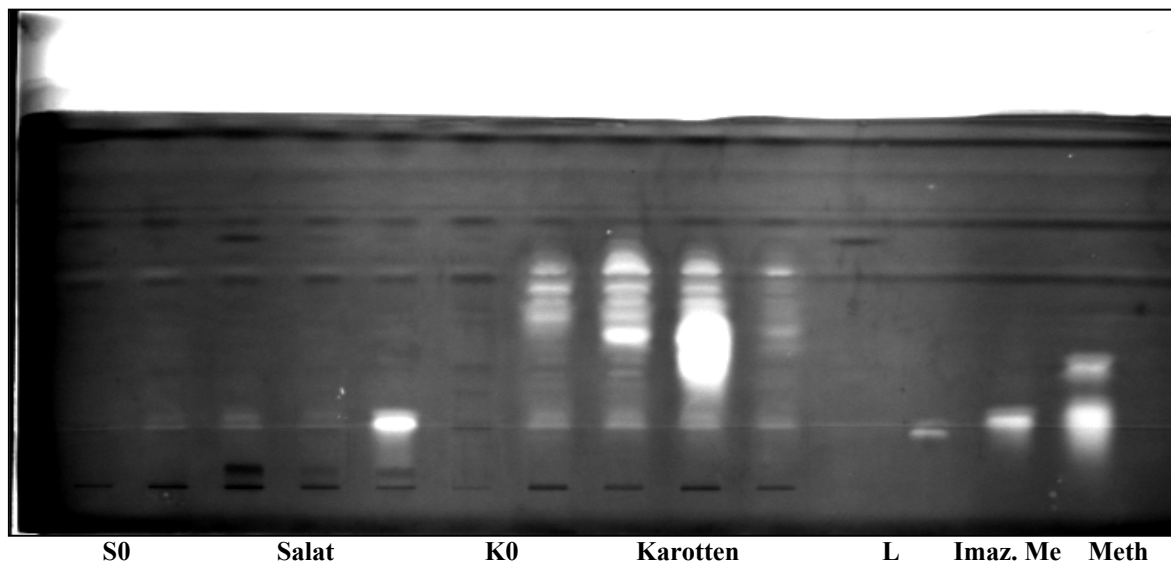


Abb. 48: Gegenwart von Cholinesteraseinhibitoren in verschiedenen pflanzlichen Lebensmittelproben, S0 Kontrolle Salat, 4 Salatproben, K0 Kontrolle Salat, L Leerbahn, Standards : Imazalil 10 ng, Mercaptodimethur 30 ng, Methiocarb 30 ng, stationäre Phase HPTLC KG 60 F254, Format: 10x20 cm; Schichtdicke 200 µm, chromatographische Entwicklung: automatische Mehrfachentwicklung mit dem AMD2 Gerät von Camag (MuttENZ, Schweiz), Dokumentation: Peltier Cooled CCD Kamera SensiCam® (AVT Horn, Aalen, BRD),

3.3.6 Möglichkeiten der wirkungsbezogenen Analytik im Umwelt- und Lebensmittelbereich

Die Ergebnisse der wirkungsbezogenen Analytik im Umwelt- und Lebensmittelbereich zeigen, dass mit Hilfe der Automatisierung der Chromatographie, der Weiterentwicklung der Schichten und Detektionsverfahren diese Methode geeignet ist, für die unterschiedlichsten Fragestellungen wie z.B. für die Analytik von Einzelstoffen oder als Screeningmethode in komplexen Matrices eingesetzt zu werden. In Abbildung 49 wird deutlich, welche Möglichkeiten heute dem Analytiker zur Verfügung stehen, um Wirkstoffe selektiv in einem Gemisch organischer Substanzen aufzuspüren.

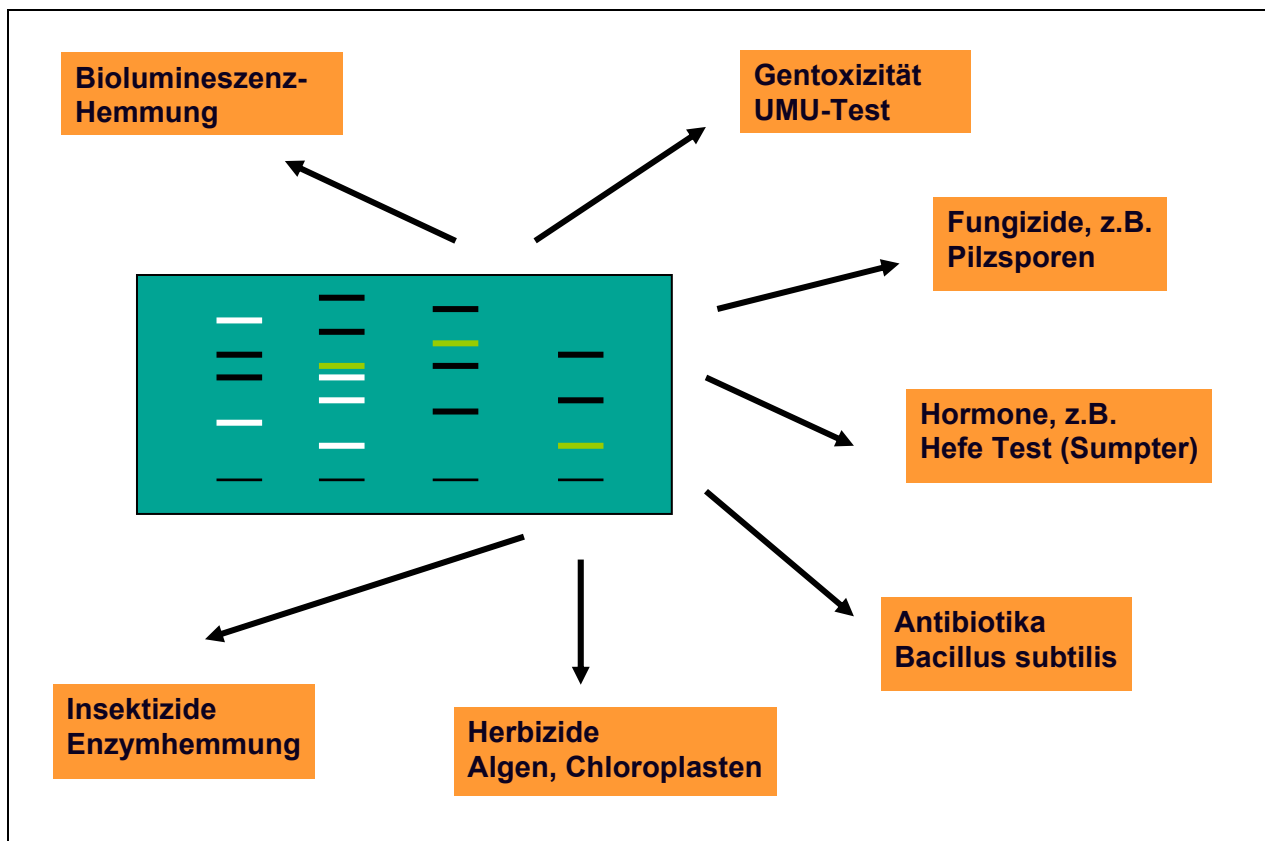


Abb. 49: mögliche Wirkteste bei der wirkungsbezogenen Analytik in der HPTLC

Die eigenen Arbeiten zeigen, dass die wirkungsbezogene Analytik durch ihre Flexibilität der Probenvorbereitung und der Möglichkeit auch Rohextrakte von Umweltproben zu untersuchen, Wirkungsäquivalente selektiv ausfindig macht, die in weiteren Schritten weiter isoliert, charakterisiert und identifiziert werden können.

Die Detektion von Wirkungsäquivalenten, die für eine Risikoanalytik eine wichtige Grundlage darstellt, ist als Screening-Verfahren zunächst unabhängig von Referenzsubstanzen.

3.4 Einsatz der wirkungsbezogene Analytik in der Metabolismusforschung organischer Verbindungen

Neben dem Einsatz in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik ergibt sich für die wirkungsbezogene Analytik die Metabolismusforschung als ein weiteres Anwendungsgebiet.

Die Metabolismusforschung ist bis heute für die Entwicklung moderner Pflanzenschutzmittel und für eine auf Ergebnissen begründete Risikoabschätzung erforderlich. Unter Metabolismus versteht man generell die Auf-, Um- und Abbauprozesse organischer Verbindungen in der belebten und unbelebten Natur. Ein Teil der Metabolismusforschung von Xenobiotika²⁷ besteht darin, ihre Umwandlungsprodukte in Tier, Pflanze sowie Boden, Wasser und Luft aufzuspüren, zu identifizieren und toxikologisch zu bewerten.

In höheren Tieren führen die Metabolisierungsprozesse überwiegend zur Bildung von Stoffen, die polarer als die Ausgangssubstanzen sind und infolgedessen besser über den Urin und die Galle ausgeschieden werden können. Bei den abiotischen Reaktionen kommen Sauerstoff, reduzierende anorganische und organische Verbindungen, Wasser und Alkohole, Phenole, Thiole und Amine als Reaktionspartner in Betracht; hinzukommen Einflüsse katalytisch wirkender Substanzen. Diese führen zu Oxidationen, Reduktionen, Hydrolyse und anderen nukleophilen Reaktionen; daneben treten Eliminierungen und Isomerisierungen auf. Die notwendige Energie steht in mehreren Formen zur Verfügung. Die Temperaturen auf Oberflächen von Böden oder Pflanzen können je nach Sonneneinstrahlung 40°C und mehr erreichen; mehr noch als Wärme kommt allerdings das Sonnenlicht als „Umwandlungsfaktor“ in Betracht (Thier und Frehse 1986).

3.4.1 Photochemischer Abbau von Organochlorverbindungen auf der HPTLC-Platte

Schon verhältnismäßig früh wurde beobachtet, dass sich chemisch labile Verbindungen – wie Vitamine, Karotine etc - bereits beim Auftragen auf DC Schichten oder während der anschließenden dünnschichtchromatographischen Trennung zersetzen. Für dieses Phänomen wird vor allem die

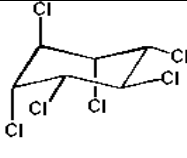
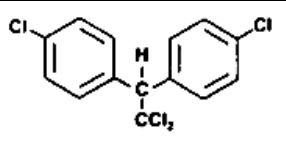
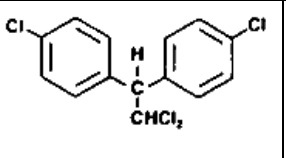
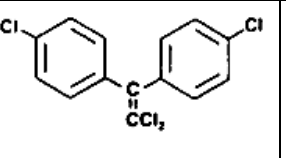
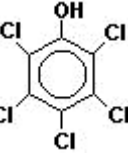
²⁷ Xenobiotika bezeichnen im weitesten Sinne die Stoffe, die einem Ökosystem, Organismus oder Gestein fremd sind. Im engeren Sinne versteht man darunter eine Sammelbezeichnung für in der Umwelt des Menschen - im engsten Sinne: in seiner Nahrung - nicht natürlich vorkommende Stoffe anthropogenen Ursprungs. (englische Bezeichnung: xenobiotics; von gr. xienos = Gast, Fremder und bios = Leben)

Anwesenheit von Sauerstoff (Oxidation) und Licht (photochemische Reaktion) in Gegenwart von aktiven Sorbentien, denen eine Wirkung als Katalysator zugeschrieben wird (photokatalytische Reaktion), verantwortlich gemacht (Jork et al. 1993).

Der photochemische Abbau von Schadstoffen hat nicht zwangsläufig eine Verminderung der Schädlichkeit zur Folge. Erst das Erfassen und Bewerten aller Metabolite lässt eine Beurteilung über die Risiken eines Schadstoffes zu. Die photochemische Umsetzung einer Substanz auf der Kieselgelplatte simuliert den photochemischen Abbau eines Schadstoffes, der auf einer Matrix, wie z.B. auf dem Erdboden oder Oberfläche eines Blattes, adsorbiert ist. Die anschließende Chromatographie trennt alle entstandenen Metabolite nach ihrer Polarität auf. Die wirkungsbezogenen Detektionsverfahren machen deutlich, welche wirkungsaktiven Metabolite aus der Photolyse hervorgegangen sind.

Als Modellsubstanzen wurden die Organochlorverbindungen Lindan, DDT (Dichlor-Diphenyl-Trichlorethan), DDD (Dichlor-Diphenyl-Dichlorethan), DDE (Dichlor-Diphenyl-Dichlor-ethylen), Lindan (γ -Hexachlorbenzol) und PCP (Pentachlorphenol) auf der Kieselgelplatte photochemisch umgesetzt.

Tab. 11: Strukturformeln ausgewählter Organochlorverbindungen

| Lindan | DDT | DDD | DDE | PCP |
|---|---|---|--|---|
|  |  |  |  |  |

Photoabbau von Organochlorverbindungen durch Bestrahlung mit einer Quecksilberdampf-lampe auf der HPTLC-Platte

Werden jeweils 8 μg Lindan, DDT, DDD, DDE und PCP in der Startzone auf der Kieselgelplatte zwischen einer und vier Stunden mit einer Quecksilber-Niederdrucklampe (1-4 Stunden) oder mit Sonnenlicht (1h) mit und ohne Gegenwart eines Sensibilisators bestrahlt, entstehen photochemische Abbauprodukte, die sich nach ihrer Polarität mit Hilfe der AMD mit einem Universalgradienten (nach DIN 38407, Teil 11) trennen lassen. Die UV-Detektion nach der Chromatographie zeigt

auf, dass die photochemischen Abbauraten bei den einzelnen Organochlorverbindungen mit einer Quecksilber-Niederdrucklampe deutliche Unterschiede aufzeigen (Abb.50).

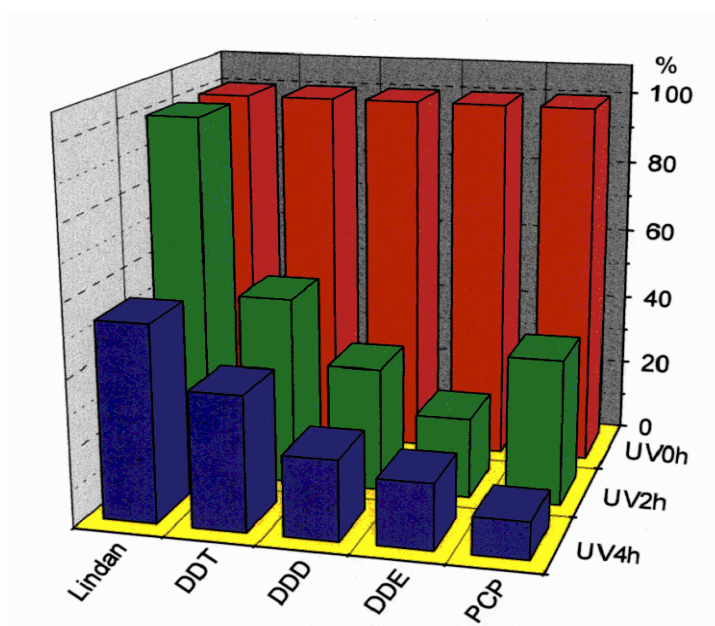


Abb.50: Photoabbau von 8 µg Organochlorverbindungen auf Kieselgel (Photoquelle Quecksilber Niederdrucklampe) nach 2 und 4 Stunden

Der Vergleich der Gehalte an Organochlorverbindungen mit und ohne Bestrahlung lässt den Schluss zu, dass durch die bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima der auf Kieselgel adsorbierten Verbindungen (Lindan $\lambda_{\max} < 190$ nm, DDT $\lambda_{\max} = 225$ nm, DDD $\lambda_{\max} = 220$ nm, DDE $\lambda_{\max} = 253$ nm, PCP $\lambda_{\max 1} = 220$ nm und $\lambda_{\max 2} = 310$ nm) nach 4 h Bestrahlung der Proben ohne Filter Lindan bis zu 48%, DDT bis zu 67%, DDD bis zu 79%, DDE bis zu 82% und PCP bis zu 90 % abgebaut werden. Bei allen photochemischen Umsetzungen von Schadstoffen auf Kieselgel konnte beobachtet werden, dass im Gegensatz zu der unbestrahlten Leerbahn Veränderungen durch die Bestrahlung der noch nicht benutzten Sorbensschicht (Aktivierungen) auftraten. Die Reaktionsprodukte dieser photochemischen Nebenprodukte aus dem Sorbens reichern sich durch die Chromatographie in Peak 5 und 6 und bei 45 mm (Abb. 51b) an.

Diese Veränderungen werden auf photochemische Oxidationen z.B. des Bindermaterials zurückgeführt. Bereits in der Kieselgelschicht entstehen aus den adsorbierten Wassermolekülen Hyperperoxide und aus dem Sauerstoff Ozon, die beide – möglicherweise unter dem Einfluss von Metallverunreinigungen oder Fluoreszenzindikatoren – mit dem Acrylat – und Methylacrylatpolymeren des Bindermaterials reagieren. Auf diese Weise bilden sich Transmittersubstanzen, die die Aktivität der Schicht stark erhöhen und u.U. tagelang wirksam sind. („Memory“-Effekt). Dieser „Post-

Photoeffekt“ kann zu den gleichen Reaktionsprodukten führen, die bei der direkten Bestrahlung des applizierten oder chromatographierten Untersuchungsgutes entstehen (Jork et al. 1993). Unter diesen Bedingungen entstehen bei allen Verbindungen polare Produkte, die aufgrund ihrer Polarität so stark an das Kieselgel adsorbiert werden, dass sie bei den oben beschriebenen Chromatographiebedingungen „am Start liegen bleiben“.

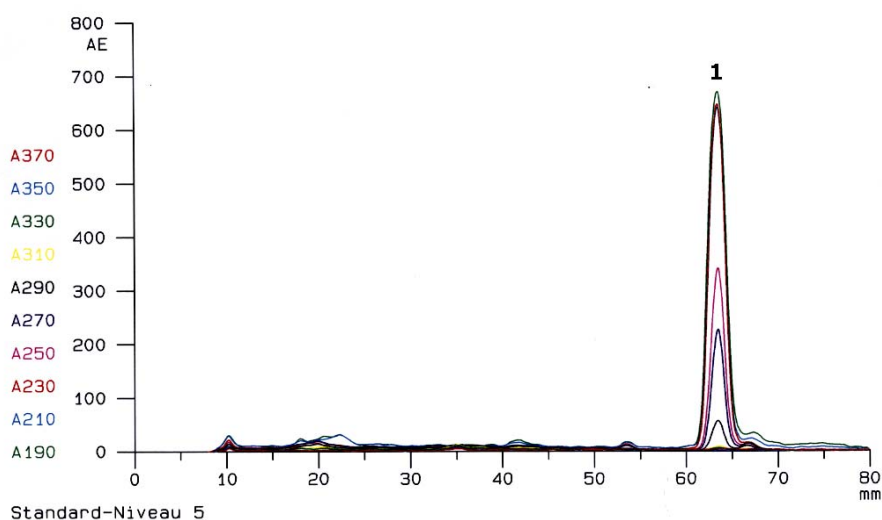


Abb. 51a

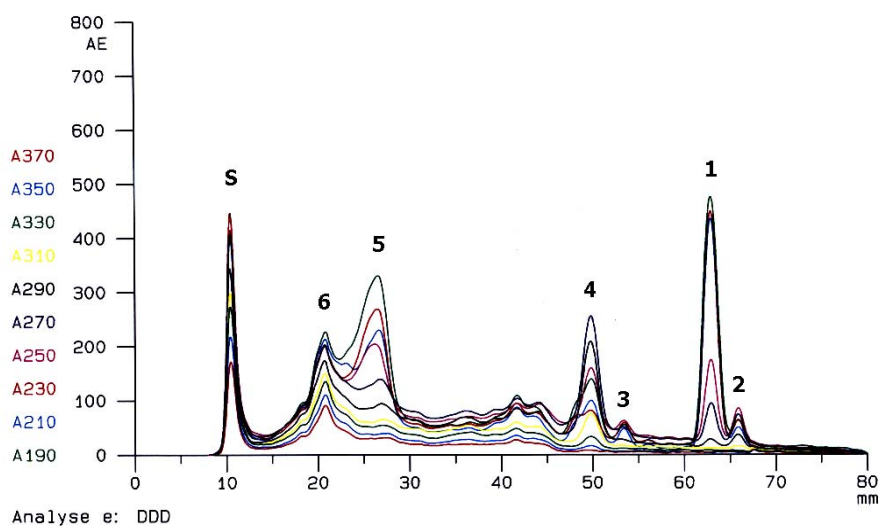


Abb. 51b

Abb. 51 a,b: Chromatogramm der photochemischen Reaktion von 8 µg DDD auf Kieselgel (Photoquelle Quecksilber Niederdrucklampe) nach 4 Stunden, stationäre Phase HPTLC KG 60 F254, Format: 10x20 cm; Schichtdicke 200 µm, chromatographische Entwicklung: automatische Mehrfachentwicklung mit dem AMD2 Gerät von Camag (MuttENZ, Schweiz), Detektion UV (Mehrwellenlängenscan, Scanner 3 von Camag (MuttENZ, Schweiz), Abb. 45a: Dunkel, Abb. 45b: bestrahlt, S= Start, 1 DDD, 2-6 photochemische Reaktionsprodukte

Beim Vergleich der Abbauraten erwies sich Lindan (43 mm Migrationsstrecke, $\lambda_{\max} < 190$ nm) als die stabilste Substanz, bei der nach der Bestrahlung ebenfalls keine UV-aktiven Oxidationsprodukte detektiert werden können. Nach der chromatographischen Trennung nach DIN 38407, Teil 11 können die Metabolite (P1-P3) der Organochlorverbindungen mit einer UV-Detektion gefunden werden. Das Hauptabbauprodukt von DDT, DDD und DDE ist polarer als die Ausgangssubstanz mit einem Absorptionsmaximum von $\lambda_{\max} = 271$ nm, was möglicherweise auf die Bildung einer C=O Gruppe hinweisen könnte. Das Chromatogramm der bestrahlten Probe von DDD zeigt auch eine geringe Bildung des Metaboliten DDE. Das Hauptabbauprodukt von PCP ergibt ein polareres Produkt als die Ausgangssubstanz mit einem Absorptionsmaximum von $\lambda_{\max} = 220$ nm, was auf eine Abspaltung eines Cl-Atoms hindeutet (siehe Tabelle 12).

Tab. 12 Abbauprodukte der photochemischen Reaktion von 8 μ g Organochlorverbindungen auf Kieselgel (Photoquelle Quecksilber Niederdrucklampe) nach 4 Stunden

| genuine Substanz Migrationsstrecke in mm | Detektierbare Abbauprodukte Migrationsstrecke in mm, λ_{\max} |
|--|---|
| Lindan 43 mm | Keine |
| DDT 62 mm, $\lambda_{\max} = 225$ nm | P1 50 mm, $\lambda_{\max} = 271$ nm |
| DDD 64 mm, $\lambda_{\max} = 220$ nm | P1 67 mm, $\lambda_{\max} = 252$ nm (DDE) P2 54 mm, $\lambda_{\max} = 248$ nm P3 50 mm, $\lambda_{\max} = 271$ nm |
| DDE 67 mm, $\lambda_{\max} = 253$ nm | P1 53 mm, $\lambda_{\max} = 266$ nm P2 50 mm, $\lambda_{\max} = 271$ nm |
| PCP 55 mm, $\lambda_{\max} = 220$ und 310 nm | P1 27 mm, $\lambda_{\max} = 220$ nm |

Mit Hilfe eines selektiven mikrochemischen Nachweises auf chlorhaltige Verbindungen mit o-Toluidin als Reagenz (Petrowitz und Wagner 1971) wurde auf der Platte nachgewiesen, dass alle Abbauprodukte noch Chlor als Substituenten enthielten.

Überprüfung der photochemischen Abbauprodukte mit dem Cholinesterasehemmtest

Auf der Suche nach selektiven Wirkmechanismen beschrieb Geike bereits 1969 den enzymatischen Nachweis von Chlorkohlenwasserstoff-Insektiziden auf der DC-Platte mit Rinderleberesterase (Tab. 13). Er konnte zeigen, dass durch eine Aktivierung mit UV-Bestrahlung (30 min mit ungefil-

tertem UV-Licht einer Hg-Analysen-Quarzlampe) postchromatographisch der Nachweis von Chlorkohlenwasserstoff-Insektiziden, wie z.B. Lindan, DDT, DDD und DDE, auf dem Dünnschichtchromatogramm erheblich gesteigert werden konnten, wobei alle untersuchten Wirkstoffe ausnahmslos eine Hemmung der Rinderleberesterase bewirkten (Geike 1969). Geike weist hier indirekt eine photochemische Metabolisierung nach, die eine Zunahme an enzyminhibitorischer Wirkung nach sich zieht.

Tab. 13: Nachweisgrenze von Chlorkohlenwasserstoff-Insektiziden mit und ohne UV Bestrahlung (Geike 1969)

| Wirkstoff | Nachweisgrenze mit Rinderleberesterase | |
|--------------|--|---------------------------------------|
| | ohne UV ($\mu\text{g}/\text{Fleck}$) | mit UV ($\mu\text{g}/\text{Fleck}$) |
| p.p' DDT | 5.0 | 1.0 |
| p.p' DDD | 5.0 | 1.0 |
| p.p' DDE | 6.0 | 1.0 |
| Lindan | 1.0 | 0.25 |
| Methoxychlor | 5.0 | 1.0 |
| Isodrin | 50.0 | 0.25 |
| Heptachlor | 1.0 | 0.25 |

Basierend auf den Untersuchungen von Geike (1969) wurden die photochemischen Abbauprodukte der Organochlorverbindungen Lindan, DDT, DDD, DDE und PCO nach der Chromatographie mit einem AMD-Universalgradienten nach DIN 38407, Teil 11 (siehe Tab.13) auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber Cholinesterase untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei allen bestrahlten Organochlorverbindungen am Startpunkt polare Produkte detektiert werden konnten, die inhibitorisch auf die Cholinesterase wirken. Auf der Leerbahn wurden trotz der Bildung von photochemischen Nebenprodukten aus dem Sorbens keine Cholinesteraseinhibitoren festgestellt.

Alle photochemisch entstandenen Abbauprodukte von Organochlorverbindungen wurden in situ mit dem Cholinesterasenhemmtest auf ihre inhibitorische Wirkung überprüft (siehe Tabelle 14). Die Ergebnisse von Geike (siehe Tab. 14) konnten hinsichtlich der verstärkten inhibitorischen Aktivität von Lindan nach der Bestrahlung nicht bestätigt werden. Die von Geike beobachtete Ver-

stärkung der inhibitorischen Wirkung und somit der Verringerung der Nachweisgrenze von DDT, DDD und DDT, sind nach eigenen Ergebnissen auf die Bildung polarer photochemischer Abbauprodukte zurückzuführen.

Abb. 52 zeigt deutlich die abnehmende inhibitorische Aktivität von DDD nach der Bestrahlung bei einer Migrationsstrecke von 64 mm und die Zunahme der inhibitorischen Wirkung von Abbauprodukten bei 50 mm und 54 mm.

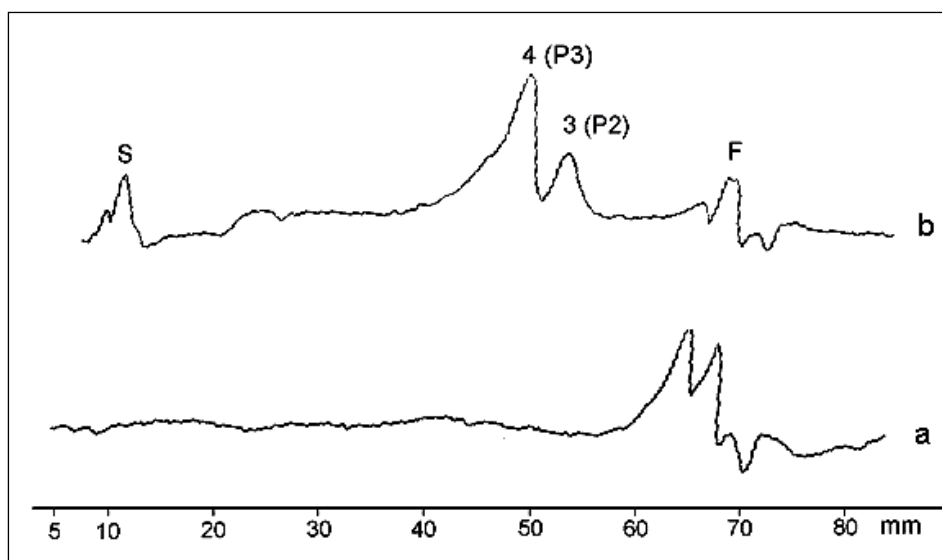


Abb. 52: Chromatogramm in mm von photochemischen Abbauprodukten von 8 µg DDD auf Kieselgel, Photoquelle Quecksilber Niederdrucklampe 4 Stunden, chromatographische Bedingungen siehe Abb. 53a,b, postchromatographischer Cholinesterasehemmtest, Messwellenlänge $\lambda=533$ nm, Original Scannerausdruck CD 60, Desaga, Heidelberg, Deutschland, S= Start, F= Lösemittelfront, a: DDD dunkel, b: DDD bestrahlt, 3 bzw.4 siehe Abb. 53b, P2, P3, siehe Tab. 14,

Tabelle 14 zeigt die photolytische Bildung von Cholinesteraseninhibitoren bei Lindan, DDT, DDD, DDE und PCP.

Die Bestrahlung ausgewählter Organochlorverbindungen als Modellsubstanzen auf Kieselgel beschreibt deutlich die photochemische Metabolisierung von persistenten Insektiziden (außer Lindan) in enzyminhibitorische Abbauprodukte.

Tab. 14: Abbauprodukte der photochemischen Reaktion von 8 µg einer Organochlorverbindung auf Kieselgel (Photoquelle Quecksilber Niederdrucklampe) nach 4 Stunden, siehe auch Abb. 53b

| Substanz | Inhibitorische Wirkung bei Cholinesterase | |
|----------|---|---|
| | ohne UV | mit UV |
| Lindan | Lindan gering inhibitorisch | Abnahme der inhibitorischen Aktivität durch photochemischen Abbau |
| DDT | nicht inhibitorisch | P1 50 mm inhibitorisch P2 54 mm inhibitorische Spuren (P2 gleiche Lage wie P2 bei DDD) |
| DDD | nicht inhibitorisch | P1 67 mm nicht inhibitorisch P2 54 mm inhibitorisch P3 50 mm inhibitorisch |
| DDE | nicht inhibitorisch | P1 53 mm gering inhibitorisch P2 50 mm inhibitorisch P3 30 mm inhibitorische Metabolite |
| PCP | inhibitorisch | P1 27 mm inhibitorisch |

Im adsorbierten Zustand z.B. in Böden bewirkt die bathochrome (Rot-) Verschiebung der langwelligsten Absorptionsbande im PCP-Spektrum (von 290 nach 310 nm) einen stärkeren photolytischen Abbau, als im nicht-adsorbierten Zustand. Bestrahlung von 80 mg PCP als Festkörper im O₂-Strom mit Licht der Wellenlänge oberhalb 290 nm bewirkte innerhalb von sieben Tagen eine ca. 14%ige Mineralisation des eingesetzten PCP zu HCl und CO₂; wird PCP auf Kieselgel aufgetragen ist unter den gleichen Bedingungen ein Abbau von 88% zu beobachten. Parlar (1983) berichtet von einer PCP-Photomineralisationsrate von 41,4 % innerhalb von drei Stunden bei Adsorption an Silikagel (Fiedler 1996).

Photoabbau von Organochlorverbindungen durch Bestrahlung mit Sonnenlicht in Gegenwart von Riboflavin als Sensibilisator auf der HPTLC-Platte

Die photolytische Abbauraten von Schadstoffen kann durch Photosensibilisatoren erhöht werden. Der Einsatz von Sensibilisatoren bewirkt, dass das absorbierte Licht Sauerstoff in eine aktivere Form überführt (Abb. 53). Dieser sogenannte *sensibilisierte Photoabbau* von Wirkstoffen, der am Boden- und Pflanzenoberflächen und in huminstoffreichen Gewässern denkbar ist, kann als Modellversuch auf der Kieselgelplatte durchgeführt werden.

Als Photosensibilisatoren können verschiedene Naturstoffe wie Bilirubin, Chlorophyll und Riboflavin oder andere Porphyrinoide agieren. Riboflavin fungiert als Photosensibilisator, der in Gegenwart von Elektronendonatoren wie z.B. EDTA zur Bildung von Wasserstoffperoxid führt (Weins 1979).

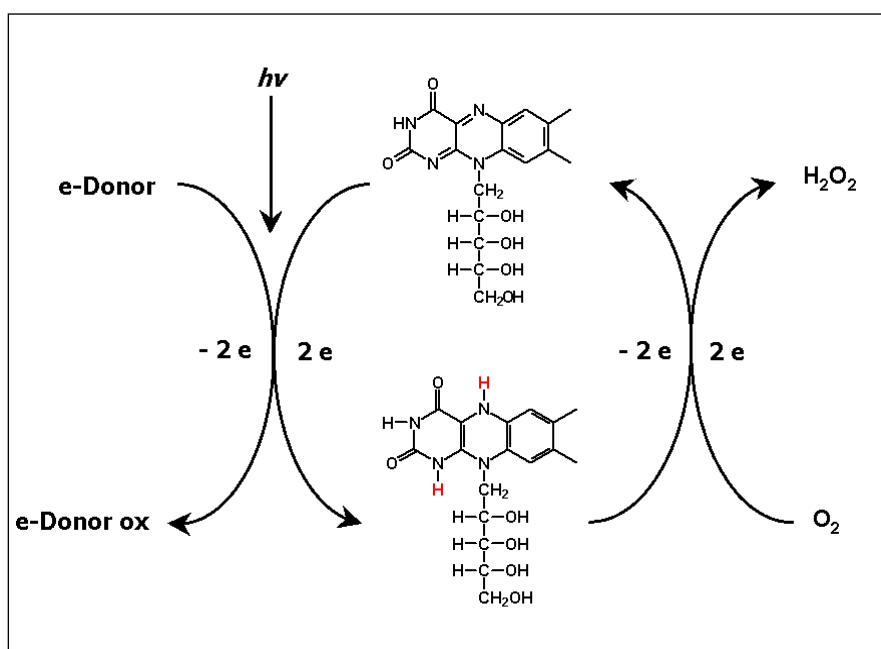


Abb. 53: Bildung von Wasserstoffperoxid durch Anregung von Riboflavin mit Sonnenlicht in Gegenwart eines Elektronendonors

Riboflavin besitzt aufgrund seiner Struktur mehrere Absorptionsmaxima. Für die hier betrachteten Photoreaktionen mit Sonnenlicht sind die drei Maxima bei 269, 372 und 445 nm von Bedeutung. Bereits 1971 untersuchten Ivie und Casida den Photoabbau mit Sonnenlicht von DDT und einigen chlorinierten Cyclodienen mit aromatischen Aminen als Photosensibilisatoren auf Kieselgel-Dünnschichtplatten. Sie stellten eine erhöhte Abbauraten in Gegenwart der Sensibilisatoren insbesondere bei DDT fest (Ivie und casida 1971).

Analog zu dem oben beschriebenen Modellversuch erfolgte der sensibilisierte Photoabbau von den Organochlorverbindungen Lindan, DDT, DDD, DDE und PCB auf einer Kieselgelplatte. Bei dem Photoabbau bei Sonnenhöchststand (1h) von jeweils 2 μg einer Organochlorverbindung überlagert mit Riboflavin (1 μg) wurden nach der chromatographischen Trennung der einzelnen Komponenten nach DIN 38407, Teil 11 unterschiedliche Abbauraten festgestellt. Zeigten sich unter diesen Bedingungen Lindan und DDT sowohl ohne und mit Riboflavin als stark persistente Verbindungen, konnte bei DDD in Gegenwart von Riboflavin eine geringe Abnahme der Ausgangssubstanz

und die Zunahme einer polareren Komponente (P1) verzeichnet werden. DDE erwies sich photolabiler bei Sonnenlicht als DDT und DDD und wurde bei Bildung einer polareren Substanz (P1) mit einem Absorptionsmaximum von $\lambda_{\max} = 252 \text{ nm}$ in Gegenwart von Riboflavin um 7% in einer Stunde abgebaut. Riboflavin mit Sonnenlicht erwies sich als besonders geeignet beim Photoabbau von PCP. Wurde ohne Riboflavin in einer Stunde 40% abgebaut, wurden mit Hilfe von Riboflavin 100% abgebaut.

Im Gegensatz zu der Bestrahlung der Sorbensschicht mit einer Quecksilber-Niederdrucklampe wurde unter den Bedingungen einer sensibilisierten Photoreaktion mit Sonnenlicht keine Veränderung der Schicht festgestellt. Tabelle 14 zeigt die Abbauraten von Organochlorverbindungen mit Sonnenlicht in Gegenwart von Riboflavin als Sensibilisator.

Tab. 15 Photoabbau von 2 μg Organochlorverbindungen auf Kieselgel (Photoquelle Sonnenlicht) nach 1 Stunde in Gegenwart von Riboflavin

| Substanz | Abbau rate von 2 μg Organochlorverbindung bei 1h Sonnenlicht [%] | |
|---------------|---|----------------------------|
| | Sonnenlicht ohne Riboflavin | Sonnenlicht mit Riboflavin |
| Lindan | 0 | 0 |
| DDT | 0 | 0 |
| DDD | 0 | < 5 |
| DDE | < 5 | 7 |
| PCP | 40 | 100 |

Die Überprüfung durch die Detektion mit Cholinesterase zeigten sich bei Lindan, DDT und DDD keine signifikanten inhibitorische Wirkungen. Bei DDE konnte P1 als Enzyminhibitor identifiziert werden. Bei PCP nahm durch den 40% bzw. 100 % Abbau der Ausgangssubstanz die Wirkung auch in dieser Größenordnung ab, während eine geringe inhibitorische Wirkung im polaren Bereich auftrat, ohne dass eine Zuordnung mit einem im UV detektierbaren Reaktionsprodukt getroffen werden konnte.

o-Toluidin als Photosensibilisator und Nachweisreagenz für Organochlorverbindungen

Ein effektiverer Sensibilisator für Organochlorverbindungen stellt o-Toluidin dar. Bei der Bestrahlung von Organochlorverbindungen in Gegenwart von o-Toluidin mit UV Licht (Quecksilberlampe) entstehen Chlor-Radikale, die die Bildung eines Azofarbstoffes aus o-Toluidin induzieren. Dieser gebildete Farbstoff kann bei $\lambda = 370$ nm vermessen werden und somit die Organochlorverbindungen selektiv auf dem Chromatogramm detektieren. Nach DIN 32 645 (1994) liegt die Nachweisgrenze von Lindan bei 20.06 ng/5mm Band, die Erfassungsgrenze bei 40.13 ng/5mm Band und die Bestimmungsgrenze liegt bei 61,65 ng/5mm Band, bei einer rel. Verfahrens-Standardabweichung von $\pm 4,64$ % (Weins 1995).

Die für ein Risikomanagement unerlässlichen Informationen und Analysendaten sind über das Instrument der wirkungsbezogene Analytik in sehr kurzer Analysenzeit einzuholen. Insbesondere können Wirkungsäquivalente sowohl von den Ausgangssubstanzen als auch von Nebenprodukten, von biotischen und abiotischen Abbauprodukten rasch erfasst werden.

Die Dünnschichtplatte hat bei der oben beschriebenen modellhaften Photolyse und Metabolisierung drei Funktionen:

1. Das Sorbens (stationäre Phase) fungiert bei diesem Versuchsmodell der photolytischen Metabolisierung als Träger und Katalysator für den Wirkstoff,
2. Das Sorbens fungiert als stationäre Phase für die chromatographische Trennung.
3. Die vom Fließmittel befreite Kieselgelschicht erweist sich als Trägerschicht für biochemisch/biologische Testverfahren.

4. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Dünnschichtchromatographie gehört zu den robustesten chromatographischen Verfahren, die seit über 40 Jahren zuverlässige Ergebnisse in der Analytik von Stoffen liefert. Molekularbiologische Testverfahren sind nicht nur *in vitro* durchzuführen sondern gelingen auch auf einer Dünnschichtplatte. Die Wirkungsteste auf dem Chromatogramm weisen Stoffe bei überlagerten, nicht vollständig getrennten Substanzgemischen selektiv nach.

Im ersten Teil der Arbeit wurden optimale Bedingungen für den Cholinesterasenhemmtest auf dem Chromatogramm definiert und die Nachweisgrenzen ausgewählter Schadstoffe bestimmt. Im Gegensatz zu den physikalischen Detektionsverfahren sind bei enzymatischen Hemmreaktionen der Einfluss durch das Testmedium, die Reaktionszeit und die Temperatur sehr stark, so dass die Testdurchführung detailliert angegeben werden muss, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Der Cholinesterasenhemmtest auf dem Dünnschichtchromatogramm konnte validiert werden und liefert vergleichbare Ergebnisse, eine Voraussetzung, dieses Verfahren durch zukünftige Ringversuche als ein gerichtfestes Analysenverfahren in Zukunft zuzulassen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden biologische Testsysteme zur Detektion von Fungiziden, Antibiotika, Lumineszenzhemmstoffe auf der Dünnschichtplatte optimiert sowie zur Detektion von Hormonen ein neues molekularbiologisches Testverfahren entwickelt. Dieses komplexe selektive Verfahren, zur Detektion von Östrogenen, wurde dahingehend optimiert, dass es auf dem Dünnschichtchromatogramm reproduzierbare Ergebnisse aufweist.

Bei dem Einsatz ausgewählter biochemischer und biologischer Detektionsverfahren in Umwelt- und Lebensmittelproben konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das chromatographische Trennverfahren bereits auf einem standardisierten Chromatographieverfahren basiert (DIN 38407, Teil 11). Die Wirkstoffe auf dem Chromatogramm können nicht nur selektiv detektiert, sondern auch ergänzend durch ihre Migrationsstrecke und ihr UV-Spektrum charakterisiert werden. Gerade bei der Suche unbekannter Schadstoffe bei einer Vielzahl von Proben in komplexen Matrices zeigt sich die wirkungsbezogene Analytik mit der HPTLC als ein geeignetes Instrument. Dieses Screeningverfahren ist zunächst für die Detektion von Wirkunsäquivalenten von Referenzsubstanzen weitgehend unabhängig. Besonders bei Prozesskontrollen ist die wirkungsbezogene Analytik ein

effektives Instrument.

Als ein weiteres Anwendungsgebiet erweist sich die wirkungsbezogene Analytik bei der Reinheitskontrolle und in der Metabolismusforschung von Chemikalien. Mit diesem Verfahren können Prozesse überwacht und die Metabolisierung von organischen Substanzen in bioaktive Metabolite überwacht werden.

Grenzen der wirkungsbezogenen Analytik mit der HPTLC

Die chromatographische Trennung der Wirkstoffe auf einer Dünnschichtplatte ist direkt (in situ) gekoppelt an eine biomolekulare Erkennung. Bedingt durch diese direkte Kopplung wird die Auswahl der für die Chromatographie einzusetzenden stationären Phasen eingeschränkt. Substanzgemische, die mit einer Umkehrphasenchromatographie auf hydrophobem RP-Material getrennt werden, können in der Regel nicht mit biochemischen Testverfahren (wie z.B. mit Enzymhemmtesten im wässrigen Milieu) detektiert werden, da C-18 RP Phasen nicht wasserbenetzbar sind. Biologische Detektionsverfahren daher bei diesen Platten mit hydrophobem Sorbens nur mit der „agar – overlay“ – Technik möglich (siehe Abb. 2). Amino-Phasen können bei bestimmten Substraten als chemische Co-Verbindung in das biochemische System aktiv einzugreifen und scheiden somit je nach Testverfahren als Trägermaterial aus.

In der Regel werden *akute Toxizitätsteste* als Detektionsverfahren in der HPTLC zur Detektion eingesetzt wie z.B. Enzymhemmteste für den Nachweis von Enzyminhibitoren oder Chloroplastensuspensionen für Inhibitoren der Photosynthese. Zelluläre Testverfahren detektieren Inhibitoren der Lumineszenz bei *Vibrio fischeri*, Antibiotika durch Hemmung des Bakterienwachstums, Fungizide durch Wachstumshemmung von Hefen oder Pilzmycel. Auch die biomolekulare Erkennung durch eine selektive Bindung von Wirkstoffen an biologische Rezeptoren gelingt auf der HPTLC-Platte wie z.B. der Nachweis von Hormonen an selektive Rezeptoren von transgenen Hefen und der Nachweis von mutagenen Stoffen mit transgenen Bakterien. Obwohl nach Baumann die Kultivierung von Blütenpollen und Kressekeimlingen auf der Platte zum direkten Nachweis pflanzentoxischer Wirkstoffe gelingt (Baumann 2001), kann die wirkungsspezifische Analytik auf der HPTLC einen direkten Bezug zur Humantoxikologie nicht leisten, denn toxikokinetische Studien über Aufnahme, Verteilung und Metabolisierung der Wirkstoffe in mögliche aktive Metabolite sind bisher nur in mehrstufigen in vitro Testverfahren oder in Tierversuchen zu ermitteln.

Dennoch konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass biochemische und biologische Detektionsverfahren auf dem Dünnschichtchromatogramm sehr selektiv und sensitiv sind und damit die Lücke zwischen biologischen in vitro-Testverfahren und instrumenteller Analytik schließen.

Die wirkungsbezogene Analytik als Strategie zur Risikoanalyse und Risikobewertung

Die Kombination von Biotesten mit chemischer Analytik eröffnet neue Möglichkeiten zum Aufspüren und zur Risikoabschätzung von problematischen Spurenstoffen in der Umwelt insbesondere dadurch, dass mit verschiedenen suborganismischen Testverfahren Methoden zur Verfügung stehen, mit denen subletale (chronische) toxische (z. B. endokrine, mutagene oder kanzerogene) Wirkungen nachgewiesen werden können. Eine Weiterentwicklung der wirkungsbezogenen Analytik mit der HPTLC besteht in der Identifizierung der Schadstoffe mit physikalischen Methoden, wie z. B. der Massenspektrometrie (Abb. 54).

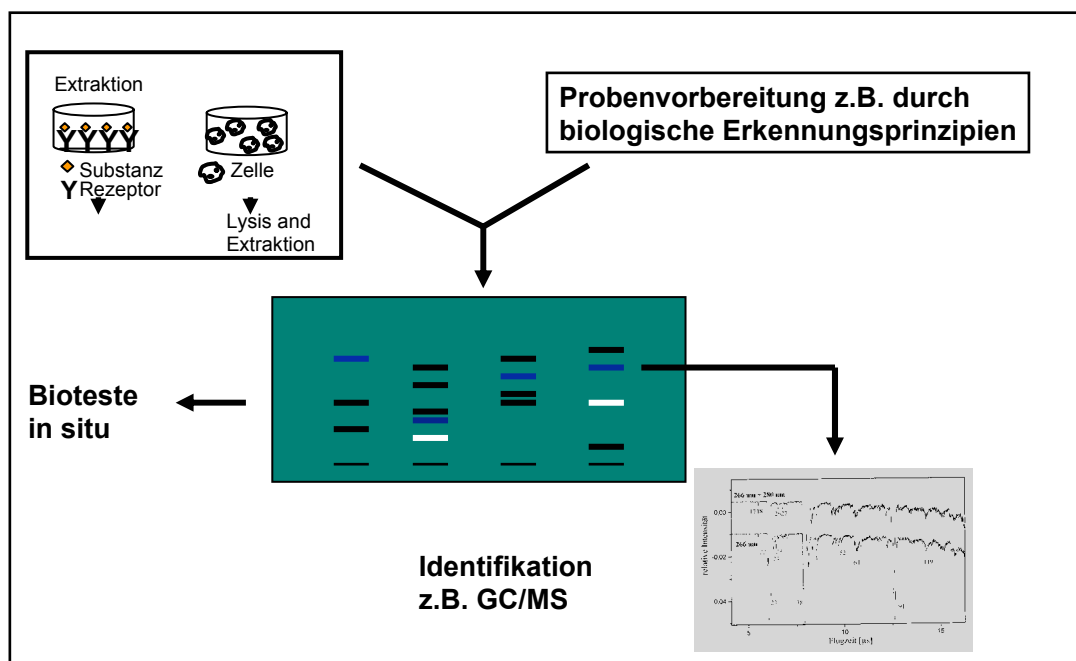


Abb. 54 Die wirkungsbezogene Analytik mit der HPTLC als Bindeglied zwischen Biotests und chemisch/physikalischen Analytik- und Identifizierungsverfahren

Dies kann zum einen durch sog. offline Verfahren (z.B. manuelles Übertragen der kritischen Substanzen in eine GC-MS Analyse) oder in einer instrumentellen in situ Analyse durch die Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)-Technik, die im Bereich der DC- und MS-Technik bereits wichtige Vorarbeiten leisten konnte. Auch sollten biologisch/chemische Testverfahren in

in vitro und in ein Gesamtkonzept mit eingebunden werden, wobei die wirkungsbezogene Analytik auf dem Dünnschichtchromatogramm ein Bindeglied darstellt zwischen Biotests und chemisch/physikalischen Analytik- und Identifizierungsverfahren.

Grundlage der Risikoanalytik kann nach heutiger Einschätzung nur eine wirkungsbezogene Analytik sein, die eine Bewertung der Ergebnisse methodenübergreifend erfordert, d.h. mit chemisch-physikalischen, biologischen, biochemischen und molekularbiologischen Verfahren (Abb. 55).

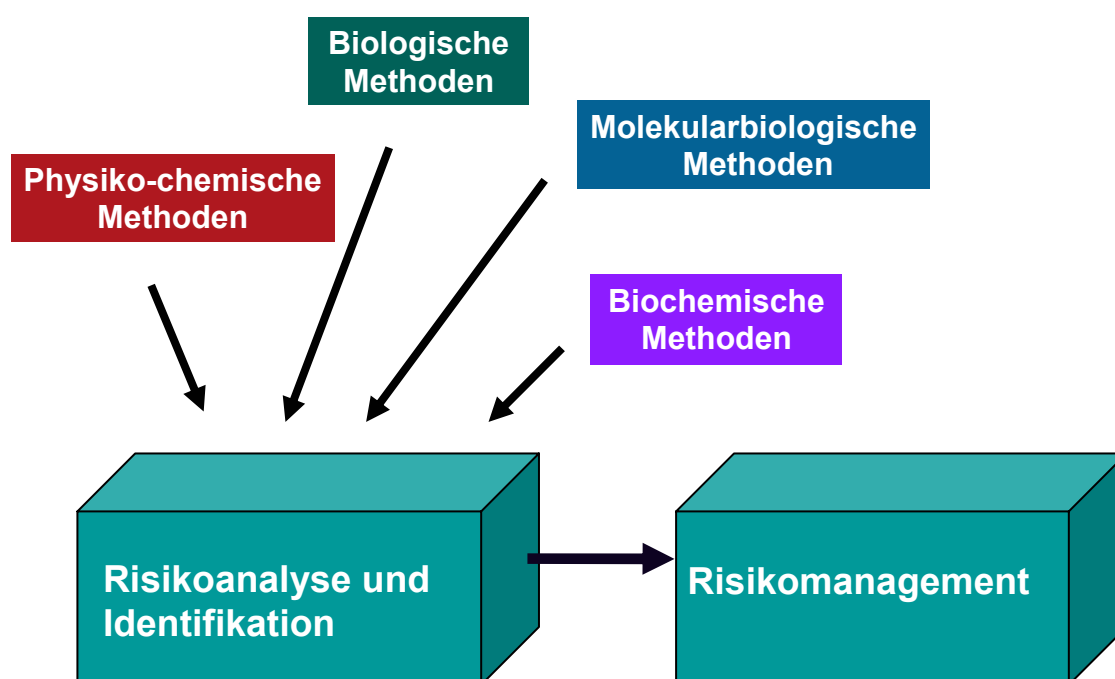


Abb. 55: Zukünftige Strategien der Risikoanalytik und des Risikomanagements

Innerhalb der wirkungsbezogenen Analytik müssen sowohl Schadwirkungen identifiziert, quantifiziert als auch Schwellenwerte und ein tragbares Risiko ermittelt werden. Somit kann eine wirkungsbezogene Analytik als zuverlässige Basis für eine Risikoanalytik im Zusammenhang mit einer Risikobewertung dienen. Heutige innovative Analytikkonzepte können nur interdisziplinär erarbeitet werden, um unbekannte bioaktive Stoffe in Umweltproben wie z.B. in Oberflächengewässern bzw. Ausläufen kommunaler Kläranlagen, in Roh- und Trinkwasser sowie im Lebensmittelbereich zu erfassen.

Im Gegensatz zu dem herkömmlichen Analytikverfahren, basiert dieses Konzept auf dem **steten Ineinandergreifen** von biologischen und chemisch/physikalischen Verfahren, um neben der bio-

logisch - selektiven Anreicherung bioaktiver Stoffe die Wirkstruktur ermitteln zu können und nach der Identifizierung des Wirkstoffes dessen Wirkstärke auch bestimmen zu können. Diese Erkenntnisse wiederum sollen die Grundlage darstellen für die Risikoabschätzung in der jeweiligen Probe in Bezug auf den Menschen.

Referenzen

- Adam, D. und Christ, W., (1990), Antibiotika und Chemotherapeutika, in „Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie“, Herausgeber W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, 5. Auflage, BI Wissenschaftsverlag, Mannheim /Wien/Zürich, ISBN 3-411-03150-6
- Ahlers, J. et al., (1982) Enzymkinetik, 2. erweiterte Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, S. 22ff
- Ambrus, A; Hargitai, E.; Caroly, G; Fulop, A; Lantos (1981), General method for determination of pesticide residues in samples of plant origin, soil and water, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64, 743-750
- Andersen, H.R. et al., (1998), Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone disrupting chemicals. Environ. Health Perspect., 107, 89-108.
- Augustin, D., (2002), Pflanzenschutzmittel in Oberflächengewässern und EU –Wasserrahmenrichtlinie, slva Oppenheim, Mainzer Pflanzenschutztag am 15.01.2002
- Baumann, U., Brunner, C., Pletscher, E., Tobler, N., (2001), Biologische Detektionsverfahren in der Dünnschichtchromatographie, unveröffentlichtes Manuskript, EMPA (Eidg. Materialprüfungs- und Forschungsanstalt) St. Gallen, Lerchenfeldstrasse 5, CH-9014 St. Gallen, urs.baumann@empa.ch,
- Baumann, U., Indermaur, H., Pletscher, E., (2000), Untersuchungskonzept zur Charakterisierung toxischer Stoffe in belastetem Wasser, UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox., 12, 63-67
- Beutler, H.O., (1993), Cholinesterase Hemmtest. In Fachgruppe Wasserchemie (Hrsg.) Biochemische Methoden zur Schadstofffassung im Wasser – Möglichkeiten und Grenzen, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, ISBN 3-527-28551-2
- BGVV, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, (2001), Problematik der Entwicklung von Resistenzen humaner Mykosen gegenüber Azol-Antimykotika und eventueller Wechselwirkungen mit den als Fungizid eingesetzten Pflanzenschutzmitteln, Bericht des BGVV vom 7.6.2001
- Burger, K., (1984) Dünnschichtchromatographie mit Gradienten-Elution im Vergleich zur Säulenflüssigkeits-Chromatographie, Fresenius Z. Anal. Chem., 318, 228-223
- Burger, K., (1988) Multimethode zur Ultraspurenbestimmung: Pflanzenschutzmittelwirkstoffe in Grund- und Trinkwasser, analysiert durch DC/AMD (Automated Development), Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 41, 173-224

- Bush, K.L., (1995), Desorption Ionization Mass Spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 30, 233-240
- Butz S. und Stan, H.-J., (1995) Screening of 265 pesticides in water by thin-layer chromatography with automated multiple Development. *Anal. Chem.*, 67, 620-630
- Dausend, C., (2002), Untersuchung hormonell wirksamer Substanzen in Gewässern mit Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie und dem Hefezelltest nach Sumpter, Diplomarbeit, Engler-Bunte-Institut, Bereich Wasserchemie, Universität Karlsruhe (TH)
- Dimenna, G.P., Walker, B.E.; Turnbull L. B.; Wright G. J., (1986), Thin Layer Bioautographic Assay for Salinomycin in Chicken Liver, *J. Agric. Food Chem.*, 34, 472-474
- DIN 32645, (1994), Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze. Beuth Verlag, Berlin
- Doerr, M., (1983) Isolierung einer neuen β -Galactosidase mit zugehörigem proteinogenen Aktivator und ihre Anwendung bei der enzymatischen Positionsanalyse von Glycosphingolipiden auf Dünnschichten, Dissertation vom 18.01.1983 an der Universität des Saarlandes
- Doll, T.E., (2004), Photochemischer und photokatalytischer Abbau von Carbamapazin, Clofibrinsäure, Iomeprol und Iopromid, Schriftenreihe des Lehrstuhls für Wasserchemie und der DVGW-Forschungsstelle am Bunte-Engler-Institut der Universität Karlsruhe (TH), Herausgeber Fritz H. Frimmel, Band 42, ISSN: 1612-118X
- Dörr, F., (1982), Allgemeine Grundlagen der Photophysik und Photochemie. In: Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H. und Ziegler, H. (Hrsg.) *Biophysik*, 2. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York pp. 275 - 289
- Dressler, M., (1986), Selective Gas Chromatographic Detectors, *J. Chromatogr.*, 36, 15-90
- Eberz G.; Rast H.-G.; Burger K.; Kreiss W.; Weisemann, C. (1996) Bioactivity Screening by Chromatography-Bioluminescence Coupling, *Chromatographia*, 43, 5-9
- Eberz G.; Rast H.-G.; Burger K.; Kreiss W.; Weisemann, C., (1996), Bioactivity Screening by Chromatography-Bioluminescence Coupling, *Chromatographia*, 43, 5-9
- Eymann R., W. Fischer, H. E. Hauck, C. Weins, (2001), Nachweis von Antibiotika in Futtermittel durch wirkungsbezogene Analytik, *Fleischwirtschaft* 8, 95-96
- Faupel, M., Felix, H.R., und von Arx, E., (1980), Fast and simple method for the separation of intermediates and cofactors involved in the biosynthesis of cephalosporin C using chemically bound C12 reversed-phase thin layer chromatography, *JPC-J. Planar Chromat.*, 193, 511-514

-
- Feuerpfeil, I.; López-Pila J.; Schmidt R. Schneider E.; Szewzyk R., (1999), Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt, Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 42; 37-50 Springer Verlag, Berlin.
- Fiedler, H., Hilpert, M., Hub, M., Hutzinger, O., (1996), Stoffbericht Pentachlorphenol (PCP), Texte und Berichte zur Altlastenbearbeitung 25/96, Herausgegeben von der Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, 1. Auflage, Karlsruhe, ISSN 0944-3304
- Frey, H. P., (1994), Planar chromatography in environmental analysis. Labor Praxis, 18, 26-27
- Frey, H.-P., Zieloff, K., (1993); Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie, Grundlagen und Praxis, VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim, ISBN 3-527-28373-0
- Fritz R. und Spiteller M., (1993) Metabolismusforschung für den Umweltschutz, Labor 2000, 20-31
- Funk, W. et al., (1985), Statistische Methoden in der Wasseranalytik – Begriffe, Strategien, Anwendungen, herausgegeben von W. Funk, V. Dammann, C. Vonderheid und G. Oehlmann in Zusammenarbeit mit der GDCh-Fachgruppe Wasserchemie, VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim, Deutschland, ISBN 3-527-26307-1
- Funk, W; Cleres, L; Pitzer, H; Donnevert, G; (1989), Organophosphorous Insecticides – Quantitative HPTLC Determination and Characterisation, JPC-J. Planar Chromat., 2, 285-289
- Gardyan, C. und Thier, HP., (1991), Identification and quantitative determination of currently important plant protectants by HPTLC, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 192, 40-5
- Geike, F., (1969) Dünnschichtchromatographisch-enzymatischer Nachweis und zum Wirkmechanismus von Chlorkohlenwasserstoff-Insektiziden, J. Chromatogr., 44, 95-102
- Geike, F., (1970), Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Carbamaten I, Nachweis insektizider Carbamate mit Rinderleberesterase, J. Chromatogr., 53, 269- 277
- Geike, F., (1970), Insektizide- und Antiesterase-Wirkung von Chlorkohlenwasserstoff-Insektiziden nach UV-Bestrahlung, Z. Angew. Entomol., 65, 98-101
- Geike, F., (1971), Dünnschichtchromatographisch-enzymatischer Nachweis einiger Pestizide durch Hemmung der Amylase-Aktivität, J. Chromatogr., 343-347
- Geike, F., (1971), Dünnschichtchromatographisch-enzymatischer und gaschromatographischer Nachweis von 4,4'-Dichlorbenzophenon und seinen Abbauprodukten, J. Chromatogr., 54, 282-283

- Geike, F., (1971), Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Carbamaten II, Nachweis herbizider Carbamate mit Rinderleberesterase, *J. Chromatogr.*, 58, 257-265
- Geike, F., (1971), Ein einfaches Verfahren zum Screening auf Amylase-Inhibitoren, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 256, 203-204
- Geike, F., (1971), Ein einfaches Verfahren zum Screening auf Phosphatase-Hemmer, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 255, 134-135
- Geike, F., (1972), Ausnutzung der Enzymhemmung von Phenoxyalkancarbonsäure-Herbiziden zu deren Dünnschichtchromatographisch-enzymatischen Nachweis, *J. Chromatogr.*, 72, 333-342
- Geike, F., (1972), Dünnschichtchromatographisch-Enzymatischer Nachweis einiger Lindan- und theoretisch möglicher DDT-Metaboliten sowie Pentachlorphenol, *J. Chromatogr.*, 67, 343-349
- Geike, F., (1972), Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Carbamaten III, Nachweis insektizider und herbizider Carbamate mit Phosphatase, *J. Chromatogr.*, 64, 383-387
- Geike, F., (1972), Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Organoquecksilberverbindungen, *J. Chromatogr.*, 72, 153-163
- Geike, F., (1972), Verfahren zum dünn-schichtchromatographischen Nachweis von Chymotrypsin, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 261, 397-398
- Geike, F., (1972), Verfahren zum dünn-schichtchromatographisch-enzymatischen Nachweis von Schwermetallen mit Urease, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 258, 284-285
- Geike, F., (1973), Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Pepsin Inhibitoren, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 266, 286-287
- Geike, F., (1973), Dünnschichtchromatographischer Screening-Test über die Hemmeigenschaften von Phenylharnstoff-Herbiziden gegenüber einigen Enzymen, *J. Chromatogr.*, 87, 199-210
- Geike, F., (1974), Simple Screening-Test for the Detection of Peroxidase Inhibitors, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 270, 367-368
- Geike, F., (1974), Thin-Layer Chromatographic Method for the Detection of the δ -Amino-levulinic Acid Dehydratase Inhibitors, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 270, 366-367
- Geike, F., (1975), Simple Screening -Test for the Detection of Lactoperoxidase Inhibitors, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 276, 77-78

-
- Gülden, M., Turan, A., Seibert, H., (1997), Endocrinically Active Substances in Surface Waters, German Environmental Protection Agency Research Report No. UBA-FB 97-068
- Hamburger O. M., Cordell G. A., (1987), A Direct Bioautographic TLC Assay for Compounds Possessing Antibacterial Activity, *J. Nat. Prod.*, 50, 25-29
- Hassall K. A., (1990), *The Biochemistry and Uses of Pesticides, Structure, Metabolism, Mode of Action and Uses in Crop Protection*, Second Edition, VCH Verlagsgesellschaft, D-6940 Weinheim (BRD) 124ff.
- Hauck, H. E., Bund, O., Fischer, W. und Schulz M., (2001), Ultra Thin-Layer Chromatography (TLC) – A New Dimension in Thin-Layer Chromatography, *Planar Chromatography – New Milestones in TLC*, in *Proceedings of the International Symposium on Planar Separations*, edited by Sz. Nyiredy, published by the Research Institute for Medical Plants, 67-73
- Herbeck-Engel, P., (1996), *Dünnschichtchromatographische Methode zur Bestimmung von Kohlenwasserstoffen in Abwasser*; Dissertation an Universität des Saarlandes bei Prof. Engelhardt,
- Hermanns B., (1995), *Wirkungsspezifische Detektion: Detektion von herbiziden Wirkstoffen in Dünnschichtchromatogrammen*, Diplomarbeit an der Fachhochschule Aachen Abt. Jülich (Prof. Dr. Jeromin)
- Herzprung, P., (1991), *Methodische Grundlagen des Nachweises und der Bestimmung von insektiziden Phosphorsäureestern und Carbamaten im Wasser mittels Cholinesterasehemmung*, Dissertation an der Technischen Universität München (Prof. Nießner)
- Hostettmann K, Terreaux C.; Marston A.; Potterat O., (1997), The Role of Planar Chromatography in the Rapid Screening and Isolation of Bioactive Compounds from Medicinal Plants, *JPC-J. Planar Chromat.*, 10, 251-257
- Ismailov, N. A und Shraiber, M. S., (1938), A drop-chromatographic method of analysis and its utilisation in pharmacy, *Farmatsya*, 3, 1
- Ivie, G.W., Casida J.E., (1971), Sensitized Photodecomposition and Photosensitizer Activity of Pesticide Chemicals to Sunlight on Silica Gel Chromoplates, *J. Agr. Food Chem.*, 19, 405-409
- Jork, H., (1986), *Advances in Thin Layer Chromatography: Part 1*, International Laboratory
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H., (1993), *Dünnschicht-Chromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden*, Band 1b, VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Wein-

heim

- Jork, H. und Wimmer H., (1986) TLC Report – A Collection of quantitative papers, GIT Verlag GmbH Darmstadt, ISBN-Nr. 3-921 956-57-9
- Judge, D. N.; Mullins, D. E.; Young, R. W., (1993), High-performance thin-layer chromatography of several pesticides and their major environmental by-products, *J. Planar Chromatogr.*, 6, 300-306
- Kaiser K.L.E. und Palabricia V.S., (1991), *Photobacterium phosphoreum* toxicity data index, *Water Pollut Res. J. Can.*, 26, 361-431
- Kaldewey und H., Ginkel, U., (1974), Influence of lycoricidinol on uptake and transport of IAA-2-14C in sections cut from different regions of the hypocotyls of light-grown seedlings of *Citrullus edulis*, *Plant Growth Subst.*, Hirokawa Publ. Comp., Tokyo, Japan, 1079-1089
- Kanne, R., (1993), *Biochemische Methoden zur Schadstofffassung im Wasser, Möglichkeiten und Grenzen*, Herausgegeben von der Fachgruppe Wasserchemie in der GDCH, VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim, ISBN 3-527-28551-2
- Kaune, A., (1997), *Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen zur Modellierung der Mineralisierung ausgewählter Triazine im Boden*, Dissertation, Technische Universität München, Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau
- Kirchner, J.G., Miller J.M. und Keller, G., (1951), Separation and identification of some terpenes by a new chromatographic technique, *Anal. Chem.*, 23, 420–429
- Knippers R., (2001), *Molekulare Genetik*, 8. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart,
- Koeber, R., Niessner, R., (1996), Screening of pesticide-contaminated soil by supercritical fluid extraction (SFE) and high-performance thin-layer chromatography with automated multiple development (HPTLC/AMD), *Fresenius J. Anal. Chem.*, 354, 464-469
- Krüger, J., (1991) *Enzymatischer Stoffnachweis nach dünnschichtchromatographischer Trennung*, Diplomarbeit an der Fachhochschule Gießen-Friedberg (Prof. Funk)
- Krupka, R. M., (1974), On the anti-cholinesterase Activity of Benomyl, *Pestic. Sci.*, 5, 211-216
- Kruse, A., Buschmann, N., Cammann, K., (1994), Separation of different types of surfactant by thin-layer chromatography, *J. Planar Chromatogr.*, 7, 22-24
- Kuch H. und Ballschmiter K., (1999), *Hormonell wirksame Verbindungen in der Umwelt Baden-Württembergs*, Arbeitsbericht Nr. 151, Akademie für Technikfolgenabschätzung in Baden-Württemberg, ISBN 3-932013-93-x

-
- Löbering, H.G., Weil, L., Quentin, K.E., (1978), Zur Analytik der Pestizide im Wasser. IX. Mitteilung: Bestimmung von herbiziden und insektiziden Carbamaten im Wasser in Vom Wasser, 51, 265-271
- Magnani, J. L., Brockhaus M., Smith D.F., Ginsburg V., (1981), A Monosialoganglioside Is a Monoclonal Antibody-Defined Antigen of Colon Carcinoma, Science 212, 55-56
- Mall, Th., (1995), Video-densitometrische Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen, International Symposium on Instrumentalized Analytical Chemistry and Computer Technology (InCom '95) Düsseldorf, 61
- Marrs, T.C., (1998), Methiocarb, Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues, JMPR Evaluations 1998 Part II Toxicology
- Mausser, H., (1974), Formale Kinetik- Experimentelle Methoden der Physik und der Chemie, Verlagsgruppe Bertelsmann Universitätsverlag Düsseldorf, ISBN3-571-19188-9
- Mazurek, M., Witkiewicz, Z., (1991), The Analysis of Organophosphorous Warfare Agents in the Presence of Pesticides by Overpressured Thin Layer Chromatography, JPC-J. Planar Chromat., 4, 379-384
- McKinley, W.P., Read, S.I., (1962), Esterase Inhibition Technique for the Detection of Organophosphorus Pesticides, Journal of the A.O.A.C. (heute J. AOAC Int), 45, 467-473
- Meighen, E. A.; Dunlap, P. V., (1993), Physiological, biochemical and. genetic control of bacterial bioluminescence. Adv. Microbial Physiol., 34, 1-67
- Mendoza, G.E; Schields, J.B.(1973) Determination of some carbamates by enzyme- inhibition techniques using thin layer chromatography and colorimetry, J. Agric. Food Chem., 21, 178-184
- Mincsovcics E., Tyihák E., Siouffi, A. M., (1988) Comparison of Off-Line and On-Line Overpressured Layer Chromatography (OPLC), JPC-J. Planar Chromat., 1, 141-145
- Montero, C., Bescós, B., Orea, JM., González Ureña, A., (2000), Food chemical analysis by laser desorption and resonant ionization mass spectrometry, Rev. Anal. Chem., 19, 1-29.
- Mori, H.; Sato, T.; Nagase, H.; Sakai, Y.; Yamaguchi, S.; Iwata, Y.; Hashimoto, R.; Yamazaki, F.; Hayata, M., (1994), Rapid screening method for pesticides as the cause substances of toxicosis by TLC., Jpn. J. Toxicol. Environ. Health, 40, 101-110
- Mouratidis, S. und Thier HP., (1995), Solid phase extraction for the confirmation of results in polar pesticides residue analysis by HPTLC, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 201, 327

- Müller, R., Ernst, G. und Schoch G., (1957), Der Nachweis von Insektizidrückständen auf Pflanzenmaterial (Gemüse und Früchte) und die Trennung einzelner Schädlingsbekämpfungsmittel mit Hilfe der Papierchromatographie, Mitt. Geb. Lebensm. Hyg. 48, 152-197
- Nau, H., (1997) Toxikokinetik, in Lehrbuch der Toxikologie, Herausgeber H. Marquardt und S.G. Schäfer, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin
- Nyiredy, S., (2003), Progress in forced-flow planar chromatography, J. Chromatogr. A., 6; 1000 (1-2), 985-99
- Obst, U., (1999) Biochemische Verfahren in der Wassergütebeurteilung, in Wasser und Gewässer, Herausgeber Fritz H. Frimmel, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, S. 105ff., ISBN 3-8274-0177-1
- Ortloff, R., Franz, P., (1965), Zwei neue Methoden der biochemischen Lokalisierung von phosphorhaltigen Insektiziden auf Dünnschichtchromatogrammen, Z. Chem.. 5, (10), 388-389
- Parlar, H., (1983), Photochemischer Abbau: GSF-Test, in: GSF-Bericht Ö-714: Überprüfung der Durchführbarkeit von Prüfungsvorschriften und der Aussagekraft der Grundprüfung des Chem. G., Januar 1983, 151-154.
- Patil, V. B. und Shingare, M. S., (1993), Thin-layer chromatographic detection of organophosphorus insecticides containing a nitrophenyl group, J. AOAC Int, 76, 1394-1395
- Peterson, C.A., Edgington L.V., (1969), Quantitative Estimation of the Fungicide Benomyl Using a Bioautograph Technique, J. Agr. Food Chem., 17 (4), 898-899
- Petrowitz, H.J., Wagner, S., (1971), γ -HCH, DDT on the Direct Densitometric Determination of Thin-Layer Chromatograms in the Analysis of Contact Insecticides, Chem. Ztg., 95, 331
- Pirker, W und Fischer, P., (2003), Cholinesterase-Hemmer in der Therapie der Parkinson-Demenz und der Demenz mit Lewy-Körperchen, J. Neurol. Neurosur. Ps., 4, 6-10
- Pla, A., Johnson, M.K., (1989), Degradation by rat tissues in vitro of organophosphorous esters which inhibit cholinesterase. Biochem. Pharmacol., 38, 1527-1533
- Plumb, D.C, (1996), Veterinary Drug Handbook, PharmaVet Publishing, White Bear Lake (USA); ISBN: 0-8138-2353-6
- Prösch, J, und Puchert, W., (1998), Coffein: Vorkommen in Fließgewässern Mecklenburg-Vorpommern, Vom Wasser, 91, 207-214

-
- Rahalison, L., Hamburger, M. und Hostettmann, K., (1991), A Bioautographic Agar Overlay Method for the Detection of Antifungal Compounds from Higher Plants, *Phytochem. Analysis*, 2, 199-203
- Ramachandran, K. N., Gupta, V. K., (1993) New analytical technique for the simultaneous determination of aromatic amines, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 346, 457-458
- Rathore, H. S.; Begum, T., Thin-layer-chromatographic methods for use in pesticide residue analysis, *J. Chromatogr.*, 1993, 643, 271-290
- Routledge, E.J.; Sumpter, J.P., (1996), Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15 (3), 241-248.
- Routledge, E.J.; Sumpter, J.P., (1997) Structural features of alkylphenolic chemical associated with estrogenic activity, *J. Biol. Chem.*, 272, 3280-3288.
- Sackmauerová, M., Kovác, J., (1978) Thin Layer Chromatographic Determination of Triazine and Urea Herbicides in Water by Hill-Reaction Inhibition Detection Technique, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 292, 414-415
- Sagunski H., Perger, G., (1997), Biozide, in *Lehrbuch der Toxikologie*, Herausgeber H. Marquardt und S.G. Schäfer, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin
- Sakthivel, S., Kisch, H., (2003), Tageslicht-Photokatalyse durch Kohlenstoff-modifiziertes Titandioxid, *Angew. Chem.* 115, 5057
- Schlegel, H.G., (1992), *Allgemeine Mikrobiologie*, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, ISBN 3134446073
- Shelby, M.D. et al., (1996), Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays. *Environ. Health Perspect.*, 104, 1296-1300
- Sherma, J., (2005) Pesticide Analysis by Thin Layer Chromatography; in: J. Cazes (ed.) *Encyclopedia of Chromatography*, 2nd edn, Marcel Dekker, New York, 1230-1238, ISBN 0-8247-2785-1
- Sherma, J., (2005) Thin-Layer Chromatography of Pesticides – A Review of Applications for 2002–2004, *Acta Chromatogr.*, 15, 5-30
- Sixt, S., (1998), Methoden zur Abschätzung umweltrelevanter physikalisch-chemischer und ökotoxikologischer Eigenschaften organischer Substanzen aus der Molekülstruktur, Dissertation an den naturwissenschaftlichen Fakultäten der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

- Sokolowski, M., Rozylo, J. K., (1993), TLC analysis of warfare agents under battlefield conditions, *JPC-J. Planar Chromat.*, 6, 467-471
- Spangenberg, B., Klein, K. F., (2000), Fibre optical scanning with high resolution in thin layer chromatography, *J. Chromatogr. A*, 898, 265-269
- Stahl, E., (1958), Dünnschichtchromatographie II: Standardisierung, Visualisierung, Dokumentation und Applikation, *Chemiker Ztg.*, 82, 323
- Stahl, E., (1967), Dünnschichtchromatographie, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin
- Stark, I., (1984), Insektizide und Nervengase: Vergiftung und Therapie, *Chemie unserer Zeit*, 3, 96ff.
- Štefanac, Z., Štengl, B. und Vasilič, Z., (1976), Quantitative determination of organophosphorus pesticides by thin-layer densitometry, *J. Chromatogr.*, 124, 127-133
- Steinhäuser, K.-G.,(2001), Hintergrund zu Ferntransport und Persistenz, in *Fachgespräche über Persistenz und Ferntransport von POP-Stoffen*, Zweites Fachgespräch am 6. und 7. September 2001, Seite 27, Herausgeber Umweltbundesamt, ISBN 0722-186X
- Stroh, K., (2005), Umweltchemikalien mit hormoneller Wirkung, BayLfU 2005 - PS1 / Umweltberatung Bayern, Herausgeber: Bayerisches Landesamt für Umweltschutz, Bürgermeister-Ulrich-Straße 160, 86179 Augsburg
- Stroh, K., Koller, U., (2002), UV-Strahlung - Wirkungen auf den Menschen, Fachinformation "Umwelt und Gesundheit", Bayerisches Landesamt für Umweltschutz, PS 1 Umweltberatung Bayern
- Teuber, M. (2000), Labor für Lebensmittelmikrobiologie, ETH Zürich, *biologen heute* (Fachzeitschrift des Verbandes Deutscher Biologen und biowissenschaftlicher Fachgesellschaften e. V. vdbiol), 2, 5ff.
- Thier, H.-P und H. Frehse, (1986) Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln, Herausgeber H. Hulpke, H. Hartmann, G. Tölg in *Analytische Chemie für die Praxis*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, ISBN 3-13-666601-1
- Timpe H.-J., (1993), Light-induced Conversion of Chemicals in Ecological Systems, *Kontakte*, 1, 14-20
- Touchstone, J.C., Sherma J., (1979), *Densitometry in Thin Layer Chromatography – Practice and Applications*, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York-Chichester-Brisbane-Toronto, ISBN 0-471-88041-8

-
- Tyihák, E.; Mincsovics, E., (1988), Forced-Flow Planar Liquid Chromatographic Techniques, JPC-J. Planar Chromat., 1, 6-19
- Walker, K. C. und Beroza, M., (1963), Thin Layer Chromatography for insecticide analysis, J. Assoc. Off. Agric. Chem., 46, 250-261
- Wallhäuser, K.H. (1969), Thin-Layer Chromatography a Laboratory Handbook, 2. Edit., Herausgeber E. Stahl, Springer, Berlin – Heidelberg – New York
- Weins, C., (1978), Flavine und Flavoproteine als Photosensibilisatoren beim lichtinduzierten Übergang auf Cytochrome unter aeroben Bedingungen, Diplomarbeit, Institut für Chemische Pflanzenphysiologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Weins, C., (1995), Identifizierung und quantitative Bestimmung von Organochlor-Insektiziden in Textilien (Lindan, DDT, DDD, DDE), in Practical Help for Practical People, DESAGA offprint. Thin-Layer Chromatography, 4, 1-7
- Weins, C., Jork, H., (1994), Toxikologische Bewertung von Schadstoffen in der Trinkwasseranalytik durch enzymatische in situ Detektion in der Dünnschichtchromatographie, Vom Wasser, 83, 279-288,
- Weins, C., Kirn, R., (2002) Charakterisierung der akut toxischen Wirksamkeit auf Organismen und standardisierte Enzymsysteme. Die wirkungsbezogene Analytik, ein geeignetes Verfahren für eine Risikoanalyse und Risikobewertung im Umweltmanagement, in: Abschlussbericht 2002 des vom BMBF geförderten Forschungsvorhabens: Einsatz eines neuen summarischen Konzepts für die wirkungsspezifische Beurteilung der organischen Belastung eines Gewässers (WISBOB) 1998-2002, herausgegeben vom Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, 84-103
- Weins, C., Schmitt, A., Kirn, R. (2001), Risk analysis - Risk assessment, Aspects of a rational environmental and food management, in Sz. Nyiredy, A. Kakuk (editors) Planar Chromatography, 55-66,
- Weisemann, C.; Kreiss W.; Rast H.-G.; Eberz G. (1996) European Patent Application No. 0558139 A1
- Weiss, G. und MacDonald A., (1985), Methods for Determination of Ionophore-Type Antibiotic Residues in Animal Tissues, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 68, 971-980
- Weissbuch der Europäischen Kommission, (2000), Weissbuch zur Lebensmittelsicherheit, KOM (1999), 719

- Weissbuch der Europäischen Kommission, (2001), Strategie für eine zukünftige Chemikalienpolitik, KOM (2001), 88
- Whittaker, M., (1984), Cholinesterases in Methods of Enzymatic Analysis, third Edition, Volume IV, herausgegeben von H.U. Bergmeyer, Verlag Chemie, Weinheim, 52ff., ISBN 3-527-26044-7
- Wippo, U., (2003), Bestimmung von thermolabilen und nichtflüchtigen Pflanzenschutzmittelrückständen in pflanzlichen Lebensmitteln, Anwendung der Hochleistungsdünnschichtchromatographie mit automatischer Mehrfachentwicklung und ihrer Online-Kopplung mit der Hochleistungsflüssigchromatographie, Dissertation am Institut für Lebensmittelchemie, Fakultät III –Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin bei Prof. Dr. rer. nat. H.-J. Stan
- Yamaguchi, Y., Hayashi C., Miyai K., (1980), Enzymatic color development of 3 α -hydroxysteroids on thin-layer chromatograms for determination of excretion pattern of 3 α -hydroxysteroids in patients with some adrenogenital syndrome, J. Chromatogr., 182, 430-434
- Zollner, H., (1993), Handbook of Enzyme Inhibitors, 2nd, revised and enlarged edition, Part A and B, VCH Verlagsgesellschaft mBH, D-6940 Weinheim, Germany, ISBN 3-527-28436-2

Veröffentlichung I

**Toxicological Evaluation of Harmful Substances by in situ Enzymatic
and Biological Detection in High Performance Thin - Layer Chromatography**

Ch. Weins and H. Jork , Journal of Chromatography A, 750 (1996), 403-407



Short communication

Toxicological evaluation of harmful substances by in situ enzymatic and biological detection in high-performance thin-layer chromatography

Christel Weins*, Hellmut Jork¹

Pharmacy and Environmental Technology, University of Saarland, D-66041 Saarbrücken, Germany

Abstract

The efficiency of a chromatographic analysis method is determined by the selectivity of the chromatographic separation and the specificity of the detection method. In the case of high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) the separated components can be detected and quantified directly on the chromatogram by physical and chemical methods. By coupling high-performance thin-layer chromatography with biological or biochemical inhibition tests it was possible to detect toxicologically active substances in situ. A linear relationship was shown between the signal of the inhibition of cholinesterase and the concentration of the inhibitor using a constant enzyme concentration and a constant incubation time. The graph of the inhibition of the luminescence of *Photobacterium vibrio fisheri* in relation to the concentration of pentachlorophenol (range 20–80 ng) is nearly linear. Measurements were done by using a densitometer or a videodensitometric scanner.

Keywords: Detection, TLC; *Photobacterium* spp; Enzyme inhibitors; Pesticides; Cholinesterase; Paraoxon

1. Introduction

For detection of toxic effects in the environment, the use of biosensors, e.g. inhibition of the growth of microorganism or enzyme-inhibition, is increasingly important. Biomonitoring means that most of the time the results show the summation of an effect in the test system.

Instrumental analytical methods like gas chromatography or liquid chromatography are used for physical or microchemical detection, whereas biomonitoring detects toxicity. Difficulties can arise when unknown toxic substances or metabolites are involved.

In the case of high-performance thin-layer chro-

matography (HPTLC) the separated components can be detected and quantified directly on the chromatogram by physical (e.g. UV, Vis, Fourier transform-IR, Raman) and chemical methods. There are sufficient microchemical derivatisation methods – e.g. the use of reagents to identify sulfur containing insecticides [1] – and physiological, biochemical and toxicological methods for determining a profile of harmful effects to allow further confirmation.

Cholinesterase, an enzyme which is irreversibly inhibited by harmful substances such as organophosphates, carbamates or some organochlor compounds and metabolites is often used [2]. The quantification of the inhibition can either be estimated by densitometric measurement (TLC scanner) or by using a videodensitometric scanner.

The comparatively quick and low-cost bioassay with the luminescent marine bacterium *Photobac-*

*Corresponding author.

¹Author deceased.

terium phosphoreum, strain NRRL-B-11177, has gained a considerable popularity for the monitoring of various industrial effluents and for the determination of the toxicity of different chemicals. Many toxic substances (nearly 1350 individual organic compounds) show an inhibition of the bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum* and *Vibrio fischeri* in vitro [3]. According to an European patent application of Weisemann et al. in HPTLC these substances have been identified post-chromatographically in situ by dipping the plate into a suspension of bacteria [4] and determining the difference of photon emission using a cooled charged coupled device (CCD) camera.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Cholinesterase from bovine serum (EC 3.1.1.8), bovine serum albumin, dichloromethane, Fast Blue salt B, ethanol, ethyl acetate, *n*-hexane, methanol, naphthyl acetate, 2-propanol, tetrahydrofuran and Tris were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Apparatus

The following equipment was used: HPTLC chamber for 10×10 cm plates (Desaga, Heidelberg, Germany), Linomat IV (Camag, Muttenz, Switzerland), TLC Scanner CD60 (Desaga, Heidelberg, Germany), TLC-Scanner 3 (Camag, Hüttens, Switzerland), Tauch-fix dipping device (Baron, Isle of Reichenau, Germany), precoated HPTLC silica gel 60 plates F₂₅₄ 10×10 cm (Merck 5365), Sharp Scanner JX-330 with Image Master Software (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) Peltier Cooled CCD Camera AT1 with software (Dilor, Bensheim, Germany), Ratio Turbidimeter (HACH, Loveland, CO, USA).

2.3. Standard solutions

Working standards were prepared by dissolving the organophosphates, carbamates and pentachlorophenol in methanol.

2.4. Purification of the plates

Before application of the samples the layers were prewashed by developing once with 2-propanol and dried at 110°C for 30 min.

2.5. Application mode

Paroxon was applied to the layer in 5 mm bands. The distance between the bands was 5 mm. The speed of application was 6 s/μl.

2.6. Chromatographic separation

| | |
|---------------------|---|
| Method: | One-dimensional development performed in a HPTLC chamber without chamber saturation at room temperature |
| Stationary phase: | Precoated HPTLC silica gel 60 F ₂₅₄ (10×10 cm) |
| Mobile phase: | Tetrahydrofuran- <i>n</i> -hexane (7:25, v/v) for the organophosphates and carbamates (10 ml) <i>n</i> -hexane-ethyl acetate (6:4, v/v) for the pentachlorophenol (10 ml) |
| Migration distance: | 5 cm |
| Migration time: | 15 min |

2.7. Solution of cholinesterase

11 mg cholinesterase (50 U/mg) were dissolved in 180 ml 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.8. To stabilize the activity of the enzyme on the plate 0.1% bovine serum albumin was added. This solution could be stored at 4°C for 3 weeks. The activity of the enzyme was controlled before the tests [5].

2.8. Solutions of the substrates

| | |
|-------------|--|
| Solution 1: | 250 mg 1-naphthyl acetate were dissolved in 100 ml absolute ethanol. |
| Solution 2: | 400 mg Fast Blue salt B were |

Table 1
Composition of the cultivation broth

| Substance | Concentration |
|---|---------------|
| Sodium chloride; NaCl | 30 g/l |
| Disodium hydrogenphosphate, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 4.65 g/l |
| Potassium dihydrogenphosphate KH_2PO_4 | 1.0 g/l |
| Magnesium sulfate $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 g/l |
| Glycerine | 3 ml/l |
| Peptone from casein | 5 g/l |
| Yeast extract | 2 g/l |

The pH was adjusted to 7.2 ± 0.2 by HCl or NaOH.

dissolved in 160 ml distilled water.

Dipping solution: 1 part of solution 1 and 4 parts of solution 2 were mixed just before use.

2.9. Cultivation of the bacteria strain

Photobacterium fischeri, strain NRRL B-11177, was cultivated in cultivation broth for 17 ± 1 h at $20 \pm 0.2^\circ\text{C}$ in Erlenmeyer flasks shaking with 180 U/min (see Table 1).

After incubation, the density of the bacterial suspension was estimated with a turbidimeter. As a standard for calibration a solution of formazin was used according to the German standard DIN 38 404 part 2, Chapter 3.2.2–3.2.3. The results were presented as units of formazin (FAU).

As dipping solution, a suspension of bacteria in cultivation broth was used with a density of 20–30 FAU.

3. Procedure

After the separation, the chromatograms were dried in a stream of warm air for 3 min and then immersed in the various dipping solutions. Oxidation of the organophosphorus compounds was carried out with bromine vapour as described elsewhere [6].

3.1. Enzyme inhibition

The HPTLC plate was dipped into the solution of cholinesterase (2 s), re-dried and incubated for 30 min at 37°C in an incubation chamber with 90%

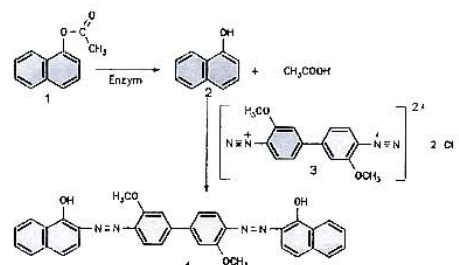


Fig. 1. Enzymatic reaction of cholinesterase on a TLC plate: (1) Naphthyl acetate; (2) naphthol; (3) Fast Blue salt B; (4) diazonium dye.

humidity. The chromatogram was then immersed for 2 s in the dipping solution of substrates. After 3 min white inhibition spots could be detected on a violet background (see Fig. 1). The in situ quantitation was performed either by absorption photometric analysis in the reflectance mode at $\lambda = 533$ nm (Fig. 2) or by detecting the differences of colour intensities by a videodensitometric scanner (Fig. 3).

3.2. Inhibition of the bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum* [4]

The HPTLC plate was dipped for 2 s into the dipping solution of a suspension of bacteria (20 FAU), re-dried and covered with a plate of glass. Toxic substances could be identified post-chromatographically in situ on the chromatogram by detecting

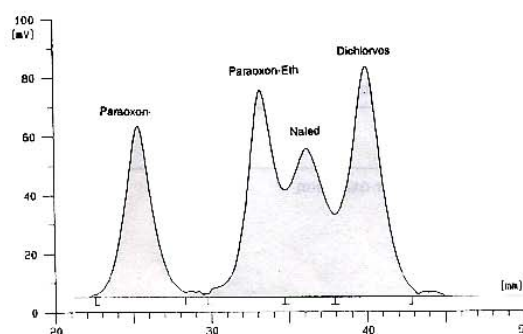


Fig. 2. Chromatogram of organophosphorus insecticides; detection mode: cholinesterase inhibition on a TLC plate, paraoxon-ethyl (0.4 ng), naled (0.4 ng), dichlorvos (2 ng); TIC-scanner absorbance in reflectance mode at $\lambda = 533$ nm.

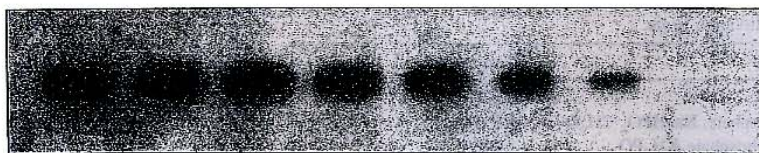


Fig. 3. Video scan report of cholinesterase inhibition on a TLC plate by oxamyl in the range of 0.8–32 ng/spot.

2–3 min the differences of photon emission using a cooled CCD camera in a dark chamber.

4. Results and discussion

A linear relationship between the signal of the inhibition of cholinesterase and the concentration of the inhibitor (paraoxon between 20–400 pg/5 mm band) could be shown using a constant enzyme concentration and a constant incubation time.

$$y = 1.124x + 7.01$$

$$[r = 0.99957; \text{S.D.} = 5.265; n = 7]$$

At higher concentrations of the inhibitor the results showed a calibration curve with second order polynomial regression. Table 2 shows the detection limits of several organophosphates, carbamates and pentachlorophenol. The detection limit should be proportional to the inhibition constant of the particular substance and can lie in the lower picogram range. The determination of the inhibition constant itself was performed *in vitro*. *In vitro* tests can only find the summation of the inhibitory effect. But the

biochemical detection in HPTLC could show that several working standards, such as parathionethyl, butocarbim and aldicarb are very often contaminated with more toxic impurities, which can only be detected after chromatographic separation [6].

A linear correlation between the inhibition of the bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum* and the concentration of pentachlorophenol could be shown.

$$y = 50.13x + 0.305$$

$$[r = 0.99615; \text{S.D.} = 0.6269; n = 6]$$

The graph of the inhibition of the luminescence of *Photobacterium vibrio fisheri* in relation to the concentration of pentachlorophenol range 20–80 ng) is almost linear. Under the conditions described above the detection limit of pentachlorophenol was found to be between 10 and 20 ng.

Using biological and biochemical detection methods, the presence of toxic metabolites could be shown by photosensitive destruction of organochlorines *in situ*.

After detection of the separated components by HPTLC and direct quantification on the chromato-

Table 2
Detection limit of inhibitors of cholinesterase in HPTLC

| Substance | Detection limit (ng) | Inhibition constant k_i ($1 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$) [7] |
|----------------------------------|----------------------|---|
| Parathion-ethyl, after oxidation | 0.045 | — |
| Paraoxon-ethyl | 0.013 | $4.9 \cdot 10^5$ |
| Paraoxon-methyl | 0.400 | $2.2 \cdot 10^4$ |
| Mevinphos | 0.200 | $1.4 \cdot 10^4$ |
| Dichlorvos | 0.200 | $5.2 \cdot 10^4$ |
| Carbaryl | 0.200 | $2.7 \cdot 10^4$ |
| Aldicarb | 0.400 | $1.6 \cdot 10^4$ |
| Butoxycarbim | 0.100 | $3.2 \cdot 10^3$ |
| Butocarbim | 0.800 | $1.6 \cdot 10^3$ |
| Oxamyl | 0.800 | $1.4 \cdot 10^5$ |
| Pentachlorophenol | 20.000 | $1.0 \cdot 10$ |

gram by physical methods, it was possible to use the same chromatogram in biological or biochemical inhibition tests to evaluate toxicologically active substances in situ. A linear relationship between the signal of the inhibition effect and the concentration of the inhibitor was shown.

Using this method it should be possible to look for harmful substances in the environment or to prove previous exposure of people. This method can contribute a lot of information about unknown toxins and unknown metabolites, for example during photocatalysed degradation of waste water. In combination with biosensors this method is suitable as a valid confirmatory test.

References

- [1] W. Funk, L. Cleres, H. Pitzer and G. Donnevert, *J. Planar Chromatogr.*, 2 (1989) 285
- [2] G.E. Mendoza and J.B. Schields, *J. Agric. Food Chem.*, 21 (1973) 178
- [3] K.L.E. Kaiser and V.S. Palabricia, *Water Poll. Res. J. Canada*, 26 (1991) 361
- [4] C. Weisemann, W. Kreiss, H.-G. Rast and G. Eberz, *European Pat. Appl.*, 0558139 A1 (1993)
- [5] M. Whittaker, in H.U. Bergmeyer (Editor), *Methods of Enzymatic Analysis*, Volume IV, Verlag Chemie, Weinheim, 3rd ed., 1984, p. 52
- [6] C. Weins and H. Jork, *Vom Wasser*, 83 (1994) 279
- [7] P. Herzsprung, Graduation, Technische Universität München, 1991 p. 62

Veröffentlichung II

**Detection of bioeffective environmental compounds by
high-performance thin layer chromatography**

Ch. Weins in - Bioresponse - linked - instrumental analysis -,

**Herausgeber Prof. Dr. Berthold Hock (editor) BG Teubner Verlag Stuttgart,
Leipzig, Wiesbaden, 39 - 56 (2001)**

2 DETECTION OF BIOEFFECTIVE ENVIRONMENTAL COMPOUNDS BY HIGH-PERFORMANCE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

Christel Weins

Staatliches Institut für Gesundheit und Umwelt des Saarlandes, Malstatterstr. 17,
66117 Saarbrücken, Germany

Abstract. The efficiency of a chromatographic analysis method depends on the selectivity of the chromatographic separation and the specificity of the detection method. In the case of High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) the separated components can be detected and quantified directly on the chromatogram by physical and chemical methods. Coupling high performance thin-layer chromatography with biological or biochemical inhibition tests it is possible to detect toxicological active substances in situ

2.1 Pollutant analysis in the environment and the principle of “activity analysis”

The investigation of environmental samples, such as water, soil and air, for toxicologically relevant substances presents problems for every analytical technique.

The use of biological toxicity tests or enzymatic inhibition tests as screening procedures for the analysis of ground, drinking, surface and waste waters provides an initial indication of the presence of toxic pollutants in an environment. The results of this “biomonitoring” generally yield a summation of the damaging

effects of pollutants in a defined test system; however, it is not possible to identify individual substances.

In order to demonstrate the presence of one or more pollutants, which are responsible for the toxic effect in the test system used above, it is necessary to resort to instrumental analysis, such as is carried out using gas chromatography or liquid chromatography (HPLC, HPTLC), with which it is now possible to detect the smallest traces of individual substance (e.g. in the ng to pg range).

For its part, the use of instrumental analysis requires previous selective enrichment of the active substance from the particular matrix: A fine analytical separation precedes identification with the aid of selected reference substances followed up by quantification of the active substance. Difficulties are encountered in the selection of relevant reference substances. It is only possible to detect those substances that are actively sought by the analyst. The analysis of individual substances does not detect unknown substances or metabolites, having adverse biological or toxicological effects, in an environmental sample.

2.2 Aims and fundamentals of activity analysis by thin-layer chromatography

The aim of activity analysis must be to detect and identify organic pollutants from environmental samples, having biological-toxicological activity in trace concentrations within the 100-200 ng/kg range. It is also necessary to detect and quantify a direct correlation with their toxic properties.

In order to be able to detect organic pollutants having biological-toxic effects, that are present in the environmental sample, it is necessary that the method selected should be as **universal** as possible. It is not the selectivity with respect to individual substances that is of importance for the method, but rather it is the

detection of all or at least as many as possible of the organic pollutants, that are present in the environmental sample. This is the goal of the analyst.

Hence, the choice of sample preparation is of decisive importance for this procedure. The problem involved initially determines whether selective sample preparation shall be used to detect one active substance in the environmental sample or whether universal sample preparation shall be used to detect as many active substances as possible.

A further parameter, the enrichment factor, depends on the toxicity of the active substance. It is possible to detect very small traces of highly toxic substances by means of activity analysis, so that enrichment may not have to be carried out in these circumstances.

2.3 Principle of the method

Activity analysis involves a **coupling** together of two different methods. On the one hand, a pollutant analysis, using trace analytical methods, is used for the determination of selected organic pollutants and, on the other hand, the physical/chemical assessment is followed by a biological or biochemical toxicity test, thus, allowing a direct activity-dependent evaluation to be made after chemical/physical characterisation.

2.3.1 HPTLC as an instrument for pollutant analysis in the environment

Thin-layer chromatography (TLC) is one of the longest known and most thoroughly tested methods used in the analysis of environmental pollutants. As the analysis of plant protection agent residues began to become important in the 1950s the only methods available to the analyst were spectrophotometry and paper

the AMD method according to DIN 38407, part 11 described a thin-layer chromatographic separation after enrichment of the contaminant by solid phase extraction.

This **universal method** involves the separation of the individual components by a stepwise multiple development on a normal stationary phase, whereby the elution commences with polar mobile phase and finishes with a nonpolar one. This allows the separation of substances of varying polarity, which is typical of the normal pollutants and their metabolites. Identification and determination is carried out by in situ reflectance measurement at 7 wavelengths (200 nm - 320 nm).

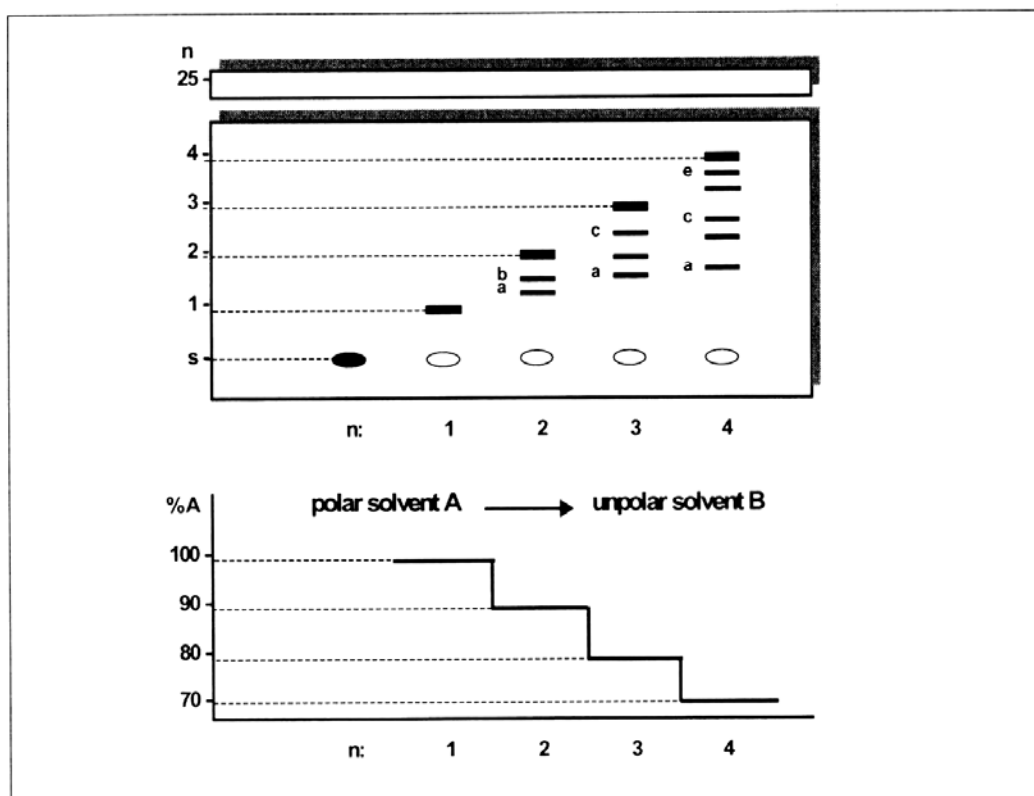


Fig. 2.1: Principle of the AMD gradient elution, N = number of step; a - e = components of the sample (Burger 1988)

The individual substances are subjected to preliminary identification – as in HPLC – on the basis of their position in the chromatogram and by comparison of the reflectance spectrum with a spectral library. Identification can then be secured by chromatographing the sample with a second gradient of different composition to confirm the result. Here the detection limit generally depends on the absorption coefficients of the substance or of its derivative, being tested.

By this method it is possible to separate, for example, 10 samples of unknown composition together with 10 test mixtures each containing 8 - 10 individual substances (i.e. a total of 80 - 100 reference substances) in parallel (Butz and Stan 1995).

Unknown pollutants are identified initially by comparing their retention factors with those of the reference substances and then the result is confirmed by means of the UV spectrum or multiple scanning of the chromatogram at various wavelengths. Chemical reactions carried out on the same chromatographic plate can be used to increase the reliability of identification.

Although unknown pollutants have generally been identified until now by the application of physical or microchemical techniques, it is also possible to differentiate the separated substances, according to their spectrum of action on the chromatogram itself, by the use of biological and biochemical test procedures.

2.3.1.2 Toxicity test (in situ) postchromatographically on the HPTLC-plate

The second step consists of the detection of the active substance on the same chromatogram by coupling with a biological/biochemical toxicity test, involving damage to an appropriate organism that forms the test system.

Here test organisms, such as mould spores, yeast cells, bacteria or cell organelles, such as chloroplasts, in a suitable nutrient medium are applied to the

chromatogram. The biological signal, such as inhibition or stimulation of growth, inhibition or stimulation of luminescence or inhibition of photosynthesis, is used to localize toxic substances on the chromatogram or to detect unknown toxic substances. In addition to the use of organisms or sub-organisms as test materials it is also possible to use enzyme inhibition tests, as biochemical marker, for toxicologically relevant substances.

Documentation can be carried out by means of a flat bed scanner or a video camera and the inhibition can be reported quantitatively in defined toxicity units. The sensitivity here depends on the toxicity of the substance concerned on this defined test system.

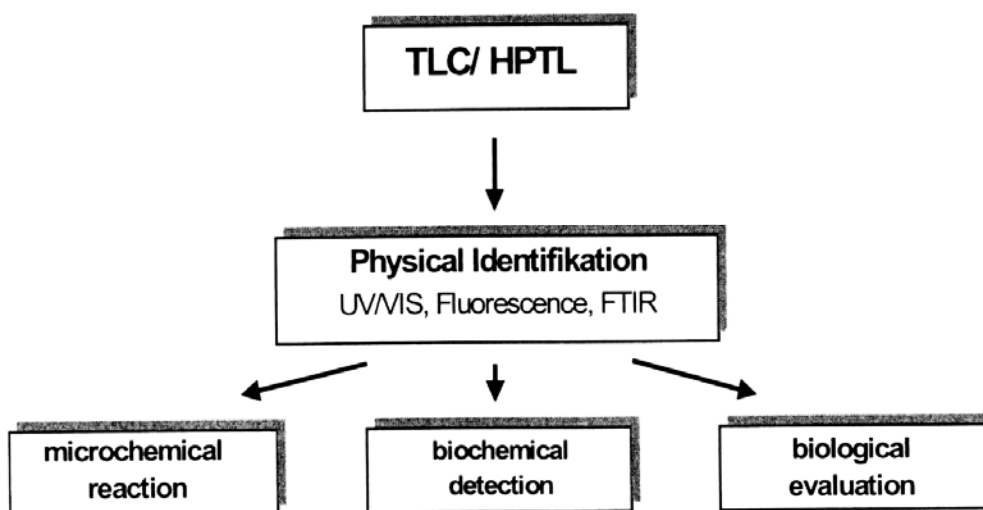


Fig. 2.2: Principle of "bioactivity based analysis" in HPTLC

2.4 Possible applications of activity analysis

Biological and biochemical test procedures are used to detect physically active pollutants in activity analysis. Specific enzyme inhibition tests on the thin-layer

plate or test procedures involving organisms that use inhibition of bacterial growth, inhibition of bacterial luminescence or inhibition of the growth of a yeast strain as the signal serve to detect the presence of toxicologically relevant pollutants.

2.4.1 Enzyme-inhibition tests as detection methods in thin-layer chromatography

Mendoza and Shields (1973) published a summary of the application of enzyme-inhibition techniques in combination with thin-layer chromatography in 1973. They discussed the determination and identification of pollutants with insecticidal effects in residue analysis of vegetable, soil and water samples, together with the forensic toxicology of the metabolism of individual active substances. The report summarises the detection limits for more than 100 phosphate esters and carbamates. In 1981 Ambrus et al. compared six TLC methods for the detection of 188 pesticides (Ambrus et al. 1981).

2.4.1.1 The detection of insecticides by means of cholinesterase

The inhibition of cholinesterase has long been recognized as a biochemical method for the detection of the enzyme-inhibiting effects of organophosphate esters and insecticidal carbamates. These materials are widely used as pesticides and have partially replaced persistent insecticides of the chlorinated hydrocarbon type. In contrast to organochlorine compounds, phosphate esters and carbamates are frequently characterized by high toxicity, low stability towards hydrolysis and good biological degradation properties, together with relatively high water solubility and high mobility. The investigations were carried out using isolated enzymes and enzyme homogenates (Herzprung 1991).

2.4.1.2 The physiological importance of cholinesterase

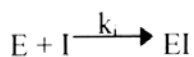
Acetylcholinesterase exerts a key function in the control of cholinergic stimulus transmission (c.f. chapter 5). It is localized at the synaptic cleft of the peripheral and central nervous system. There it ensures rapid hydrolytic degradation of the acetylcholine, that is produced during parasympathetic stimulation. Crystal structure analysis has recently made it possible to describe its function at the molecular level. The acetylcholinesterases are members of the family of serine hydrolases.

2.4.1.3 The molecular mechanism of cholinesterase inhibition

The inhibition of cholinesterase is the result of an irreversible phosphorylation or carbamylation of the serine OH groups in the active centre of the enzyme. The organophosphorus pesticides and carbamate insecticides inhibit the cholinesterase to very different degrees.

Most irreversible inhibitors inhibit the enzymatic reaction completely, frequently by formation of a covalent bond if their concentration exceeds that of the reacting groups in the enzyme.

Irreversible inhibition is expressed mathematically by the following equations, where k_i is the constant for the formation of the enzyme-inhibitor conjugate:



$$k_i = [L \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$$

The magnitude of the constants of inhibition k_i expresses the strength of the inhibiting effect of the inhibitor. Some pesticides and their metabolites exhibit

differences in the ratios of their inhibition constants with respect to cholinesterase of up to 1:500.

Tab. 2.1: Detection limits of several organophosphates, carbamates and pentachlorophenol with cholinesterase and their inhibition constant

| Active substance (enzyme inhibitor) | Detection limit | Inhibition constant $k_i = [\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$ |
|--|-----------------|---|
| parathion (after oxidation) | 0.045 ng | - |
| paraoxon-ethyl | 0.013 ng | 4.9×10^5 |
| paraoxon-methyl | 0.400 ng | 2.2×10^4 |
| mevinphos | 0.200 ng | 1.4×10^4 |
| dichlorvos | 0.200 ng | 5.2×10^4 |
| cabaryl | 0.200 ng | 2.7×10^4 |
| aldicarb | 0.400 ng | 1.6×10^4 |
| butoxycarboxim | 0.100 ng | 3.2×10^3 |
| butocarboxim | 0.800 ng | 1.6×10^3 |
| oxamyl | 0.800 ng | 1.4×10^5 |
| pentachlorophenol | 20.00 ng | 1.0×10 |

Many organophosphorus derivatives, in particular thio- and dithiophosphate derivatives, only inhibit cholinesterase to a very slight degree. However, their inhibiting effects can be increased by a factor of up to 1000 by oxidizing them to the organophosphate analogues.

Some insecticides can be determined qualitatively and quantitatively by means of the cholinesterase inhibition test. Thio- and dithiophosphate esters are converted to their analogous, toxicologically active phosphonates, using Br_2 as the oxidizing agent. The inhibitory effect is determined by the reduction in the enzymatic hydrolysis of 1-naphthyl acetate to 1-naphthol and acetic acid followed by coupling of the 1-naphthol to yield a violet-blue dye (diazonium salt, Echtblau B). White zones of inhibition on a coloured background are produced around toxicologically active substances (Geike 1969). The detection limit should be

proportional to the inhibition constant of the particular substance and can lie in the lower picogram range (Weins and Jork 1996).

Other enzymes as well as cholinesterase can be used in toxicity tests for specific pollutants or classes on the thin-layer plate.

Tab. 2.2: Possible pollutant or pollutant classes and the specific enzyme system for detection

| Enzyme system | Possible pollutant or pollutant class |
|---|---|
| chymotrypsin, trypsin, elastase, cholinesterase | insecticidal carbamates, insecticidal organophosphorus compounds, organochlorine compounds and their metabolites (Geike 1969) |
| urease, amylase, aminolaevulinic acid dehydratase | heavy metals and organometallic fungicides (Mendoza and Schields 1973) |
| vegetable peroxidase | quinones (Mendoza and Schields 1973) |
| catalase | 2,4-dichlorophenol, hydroxylamine, monochloramine, nitrite (Mendoza and Schields 1973) |

2.4.2 The detection of antibiotic activity in water samples

A significant increase has been observed in the numbers of antibiotic-resistant bacteria in the last decade. These can be simultaneously resistant to up to eight antibiotics. Antibiotic-resistant bacteria are more common in regions where antibiotics are in use. It has been demonstrated that large numbers of antibiotic-resistant bacteria are present in the environment. On the one hand, they are released directly into the environment during the application of slurry and dung from intensive animal rearing, and, on the other hand, they collect in water treatment plants arriving in the waste waters from clinical and domestic sources and from

there they reach the environment in the treated waste water. However, it is not just antibiotic-resistant bacteria that are released, but also the antibiotics themselves. This has led to discussions of the question of how far antibiotics are involved in the selection of antibiotic-resistant bacteria, not only in hospitals and intensive rearing units but also after they have entered the environment and bring about an increase in numbers of antibiotic-resistant bacteria, in water treatment plants in particular (Feuerpfeil et al. 1999).

Measurement of the antibiotically active substances in waters acquires an increasing importance in this context.

After chromatography by the AMD technique *Bacillus subtilis* (BGA) is used as the indicator organism in the activity analysis that follows. The growth of the test organism on the thin-layer plate is inhibited by antibiotically active inhibitors and is indicated by the production of zones of inhibition. Detection is carried out by means of a bacterial vitality test, where the bacterial lawn on the thin-layer chromatogram is sprayed with an MTT tetrazolium salt (Hamburger and Cordell 1987; Dimenna et al. 1986).

The size of the zone of inhibition is determined by the amount applied, on the one hand, and by the specific activity of the substance, on the other hand.

2.4.3 Detection of fungicidal and herbicidal active substances in environmental samples

One of the most costly procedures forming part of the characterisation of water is the determination of individual substances, such as traces of plant treatment agents, by instrumental methods. Here it is only possible to detect those substances for whose presence it is tested. As described above, it is not possible, in the analysis of individual substances, to detect unknown substances or active metabolites with

biological/toxicological activity. There are ca. 300 permitted active substances and the development of an analytical procedure for even one group of substances involves a great deal of time and expense, while the possibility still remains that the user will already have released an alternative product into the environment which is not detected by the measurement program that has been set up.

Here activity analysis with AMD/HPTLC acquires great importance because it constitutes an instrument capable of determining substances and unknown pollutants defined by the measurement program, e.g. that inhibit the growth of fungal spores or a yeast strain.

The yeast strain *Rhodotorula rubra* has proven itself a very suitable test organism, which colours the plate red when it is growing well. In the presence of a fungicidal active substance a white zone of inhibition is produced, whose size depends on the amount of fungicide applied and on its specific activity (Hostettmann et al. 1997).

Isolated chloroplasts or chloroplast fragments from plant juices can be applied to the thin-layer chromatogram in order to detect herbicidal active substances, which are introduced into the environment as inhibitors of photosynthesis. After chromatography, the active substances with herbicidal activity are revealed in the presence of dichlorophenolindophenol (DCPIP) as an electron acceptor and of light (Sackmauerová and Kovác 1978, Hermanns 1995).

2.4.4 Analysis of bioeffective environmental compounds by *Photobacterium phosphoreum* on the HPTLC-plate

The comparatively quick and low-cost bioassay with the luminescent marine bacterium *Photobacterium phosphoreum*, strain NRRL-B-11177, has gained considerable popularity for monitoring various industrial effluents and the toxicity

of different chemicals. Many toxic substances (nearly 1350 individual organic compounds) show an inhibition of the bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum* and *Vibrio fischeri* in vitro (Kaiser and Palabricia 1991).

In HPTLC these substances have been identified postchromatographically in situ on the plate by dipping the plate for 2 s into a suspension of bacteria and determination the difference of photone-emission using a cooled charged coupled device camera in a dark chamber (Weisemann et al. 1996, Eberz et al. 1996). A linear correlation between the inhibition of bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum* and the concentration of an inhibitor could be shown. Under the condition described the detection limit of pentachlorphenol was found between 10 and 20 ng on the HPTLC plate while the detection limit of dichlorphenol could be observed in the range of 7.5 ng (Weins and Jork 1996).

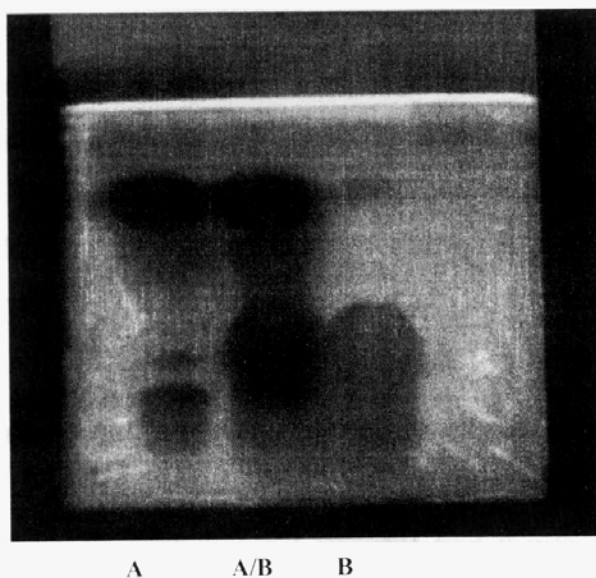


Fig. 2.3: Inhibition of the bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum* postchromatographically in situ on the HPTLC-plate. A: Pentachlorphenol, 1 μ g. B: 3'5'-Dichlorphenol, 1 μ g

The biological detection in HPTLC can show that several working standards, such as pentachlorophenol or dichlorophenol are very often contaminated with toxic impurities, which can only be detected after chromatographic separation.

2.5 Value of activity analysis

Activity analysis is a coupling of instrumental analysis with biological/biochemical activity tests. On the one hand, it is possible to assign physically detected substances to a selective activity, on the other hand, it is also possible to detect the presence of other unknown toxic active substances on the chromatogram. The universal gradient has been selected to optimize the chromatographic procedure so that it is possible to detect active substances of very different polarities, i.e. the actual substances and their active polar metabolites.

2.6 References

- Ambrus, A., Hargitai, E., Caroly, G., Fulop, A., Lantos (1981): General method for determination of pesticide residues in samples of plant origin, soil and water. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64, 743-750.
- Baranowska, I., Szeja, W., Wasilewski, P. (1994): Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil extracts by adsorption and reversed-phase thin-layer chromatography. *J. Planar Chromatogr.* 7, 137-141.
- Burger, K. (1988): Multimethode zur Ultraspurenbestimmung: Pflanzenschutzmittel-irkstoffe in Grund- und Trinkwasser, analysiert durch DC/AMD (Automated Development). *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 41, 173-224.

- Butz, S., Stan, H.-J. (1995): Screening of 265 pesticides in water by thin-layer chromatography with automated multiple development. *Anal. Chem.* 67, 620-630.
- Dimenna, G.P., Walker, B.E., Turnbull, L.B., Wright, G.J. (1986): Thin layer bioautographic assay for salinomycin in chicken liver. *J. Agr. Food Chem.* 34, 472-474.
- Eberz, G., Rast, H.-G., Burger, K., Kreiss, W., Weisemann, C. (1996): Bioactivity screening by chromatography-bioluminescence coupling. *Chromatographia* 43, 5-9.
- Feuerpfeil, I., López-Pila, J., Schmidt, R., Schneider, E., Szewzyk, R. (1999): Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 42, 37-50, Springer Verlag.
- Furton, K.G., Jolly, E., Pentzke, G. (1993): Recent advances in the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and fullerenes. *J. Chromatogr.* 642, 33-45.
- Geike, F. (1969): Dünnschichtchromatographisch-enzymatischer Nachweis und zum Wirkungsmechanismus von Chlorkohlenwasserstoff-Insektiziden. *J. Chromatogr.* 44, 95-102.
- Hamburger, O.M., Cordell, G.A. (1987): A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. *J. Natural Prod.* 50, 25-29.
- Hermanns, B. (1995): Wirkungsspezifische Detektion: Detektion von herbiziden Wirkstoffen in Dünnschichtchromatogrammen, Diplomarbeit an der Fachhochschule Aachen, Abt. Jülich (Prof. Dr. Jeromin).
- Herzprung, P. (1991): Methodische Grundlagen des Nachweises und der Bestimmung von insektiziden Phosphorsäureestern und Carbamaten im Wasser mittels Cholinesterasehemmung, Graduation Technische Universität München (Prof. Nießner).

- Hostettmann, K., Terreaux, C., Marston, A., Potterat, O. (1997): The role of planar chromatography in the rapid screening and isolation of bioactive compounds from medicinal plants. *J. Planar Chromatogr.* 10, 251-257.
- Judge, D.N., Mullins, D.E., Young, R.W. (1993): High-performance thin-layer chromatography of several pesticides and their major environmental by-products. *J. Planar Chromatogr.* 6, 300-306.
- Kaiser, K.L.E., Palabricia, V.S. (1991): *Photobacterium phosphoreum*, Toxicity Data Index. *Water Poll. Research J. Canada* 26, 361.
- Katagi, M., Tsuchihashi, H., Hanada, S., Himmori, H., Otsuki, K. (1993): Determination of dichlorvos, trichlorfon and their metabolites and degradation products in environmental water, drinks and human urine. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health* 39, 459-468.
- Kruse, A., Buschmann, N., Cammann, K. (1994): Separation of different types of surfactant by thin-layer chromatography. *J. Planar Chromatogr.* 7, 22-24.
- Mendoza, G.E., Schields, J.B. (1973): Determination of some carbamates by enzyme inhibition techniques using thin layer chromatography and colorimetry. *J. Agric. Food Chem.* 21, 178-184.
- Mori, H., Sato, T., Nagase, H., Sakai, Y., Yamaguchi, S., Iwata, Y., Hashimoto, R., Yamazaki, F., Hayata (1994): Rapid screening method for pesticides as the cause substances of toxicosis by TLC. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health* 40, 101-110.
- Patil, V.B., Shingare, M.S. (1993): Thin-layer chromatographic detection of organophosphorus insecticides containing a nitrophenyl group. *J. AOAC-Int.* 76, 1394-1395.
- Ramachandran, K.N., Gupta, V.K. (1993): New analytical technique for the simultaneous determination of aromatic amines. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 346, 457-458.

- Sackmauerová, Kovác (1978): Thin layer chromatographic determination of triazine and urea herbicides in water by Hill-reaction inhibition detection technique. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 292, 414-415.
- Sokolowski, M., Rozylo, J.K. (1993): TLC analysis of warfare agents under battlefield conditions. *J. Planar Chromatogr.* 6, 467-471.
- Tyrpien, K., Warzecha, L., Bodzek, D. (1994): Identification of PAH nitro derivatives in airborne particulate matter by TLC. *Chem. Anal. (Warsaw)* 39, 3.
- Walker, K.C., Beroza, M. (1993): Thin-layer chromatography for insecticide analysis. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 46, 250-261.
- Weins, C., Jork, H. (1996): Toxicological evaluation of harmful stances by in situ biological and biochemical detection in high performance thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.* 750, 403-407.
- Weisemann, C., Kreiss, W., Rast, H.-G., Eberz, G. (1996): European Patent Application No. 0558139 A1.

Veröffentlichung III

**Risk analysis - Risk assessment, Aspects of a rational environmental and food management. Detection of bio-effective environmental compounds by bio-activity based analysis in HPTLC,
C. Weins, A. Schmitt, R. Kirn, in: Sz. Nyiredy, A. Kakuk (editors)
Planar Chromatography 2001, pp 55-66, 2001**

L-06

Risk Analysis – Risk Assessment. Aspects of a Rational Environmental and Food Management

Detection of Bioeffective Environmental Compounds by Bioactivity-Based Analysis in HPTLC

C. Weins, A. Schmitt, R. Kirn

Landesamt für Umweltschutz des Saarlandes
Don - Bosco, 66119 Saarbrücken, Germany

Key Words

Bioeffective environmental compounds

Bioactivity-based analysis

HPTLC

Risk analysis

Summary

Risk assessment becomes possible since risk analysis produces results that make it clear what sources emit particular contaminants more than others, so that concrete objectives can be more clearly defined. Bioactivity-based analysis is a suitable instrument for application in risk analysis, in order to be able to quantify and assess the effects of contaminants. Risk analysis can be used to quantitate threshold levels and to determine a possible acceptable risk. This procedure is a coupling of instrumental analysis with biological/biochemical activity tests. So that, on the one hand, it is possible to assign physically detected substances to a selective activity, on the other hand, it is also possible to detect the presence of other unknown toxic active substances on the chromatogram.

L-06

1 Introduction

The emphasis of efforts towards rational environmental protection, in the sense of "sustainable development", lies in the careful exploitation of natural resources and the protection of these natural resources. Prophylactic, active, environmental protection means risk management with the aim of protecting people from environmental risks and recognition and limitation of environmental risks. Reliable data concerning the environmental interaction of contaminants forms the basis for an estimate of environmental risks. An estimate of risk requires, on the one hand, a knowledge of the effect of the individual contaminant on the environment and of the cumulative effect in the ecosystem, on the other, as well as the degradation behaviour and the effect of metabolites.

Objective of risk analysis in association with risk assessment

The most important concern of risk analysis is to identify the effect of damage, to quantify it (risk identification) and then to identify toxic substances or groups of substances. Risk identification should encompass all risks and rapidly lead to precise results, that are capable of being evaluated.

Risk analysis demands evaluation of the results, independent of method, i.e. obtained using physico-chemical, biological, biochemical and molecular biological methods.

Within risk analysis it is necessary to quantify both damaging effects and threshold levels in order to determine an acceptable risk.

Problems with the current analytical concept

The investigation of environmental samples, such as water, soil and air, for toxicologically relevant substances presents problems for every analytical technique.

The use of biological toxicity tests or enzymatic inhibition tests, as screening procedures for the analysis of ground, drinking, surface and waste waters, provides an initial indication of the presence of toxic pollutants in an environment. The results of this "biomonitoring" generally yield a summation of the damaging effects of pollutants in a defined test system; however, it is not possible to identify individual substances.

In order to demonstrate the presence of one or more pollutants, which are responsible for the toxic effect in the test system used above, it is necessary to resort to instrumental analysis, such as is carried out using gas chromatography or liquid

L-06

chromatography (HPLC, HPTLC), with which it is now possible to detect the smallest traces of individual substance (e.g. in the ng to pg range).

Analytical methods for single substances are not applicable to a palette of more than 30,000 relevant chemicals and their degradation products.

The history of environmental analysis reveals that the analysis of single substances has only underestimated the number of primary contaminants and, hence, is not a suitable instrument for risk management, in the sense of rational environmental protection.

The application of risk analysis is a foundation of an effective concept for risk analysis, on which to base risk management.

2 Definition

The aim of bioactivity-based analysis must be to detect and identify organic pollutants, from environmental samples, having biological-toxicological activity in trace concentrations within the 100–200 ng/kg range. It is also necessary to detect and quantify a direct correlation with their toxic properties.

Principle of the method

The so-called risk analysis is a bioactivity-based analysis which involves a coupling together of two different methods. On the one hand, a pollutant analysis, using trace analytical methods, is used for the determination of selected organic pollutants and, on the other hand, the physical/chemical assessment is followed by a biological or biochemical toxicity test, thus, allowing a direct activity-dependent evaluation to be made after chemical/physical characterisation.

Chemical-physical procedure in instrumental analysis (AMD)

The first step consists of determination of the organic pollutant using the Automated Multiple Development (AMD) technique in the trace range of High Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC).

The substances are separated chromatographically according to their polarity using a universal gradient. Identification and determination is carried out by in situ reflectance measurement at 7 wavelengths (200–320 nm) [1].

The individual substances are subjected to preliminary identification – as in HPLC – on the basis of their position in the chromatogram and by comparison of the reflectance spectrum with a spectral library.

L-06

Identification can then be secured by chromatographing the sample with a second gradient of different composition to confirm the result.

Here the detection limit is generally dependent on the absorption coefficients of the substance or of its derivative, being tested.

Toxicity test (in situ)

The second step consists of the detection of the active substance on the same chromatogram by coupling with a biological/biochemical toxicity test, involving damage to an appropriate organism that forms the test system.

Here test organisms, such as mould spores, yeast cells, bacteria or cell organelles, such as chloroplasts, in a suitable nutrient medium are applied to the chromatogram. The biological signal, such as inhibition or stimulation of growth, inhibition or stimulation of luminescence or inhibition of photosynthesis, is used to localize toxic substances on the chromatogram or to detect unknown toxic substances. In addition to the use of organisms or sub-organisms as test materials it is also possible to use enzyme inhibition tests, as biochemical marker, for toxicologically relevant substances.

Documentation can be carried out by means of a flat bed scanner or a video camera and the inhibition can be reported quantitatively in defined toxicity units. The sensitivity here depends on the toxicity of the substance concerned on this defined test system.

Possible applications of bioactivity-based analysis

Biological and biochemical test procedures are used to detect physically active pollutants in activity analysis. Specific enzyme inhibition tests on the thin-layer plate or test procedures involving organisms that use inhibition of bacterial growth, inhibition of bacterial luminescence or inhibition of the growth of a yeast strain as the signal serve to detect the presence of toxicologically relevant pollutants.

3 Experimental

Chemicals

Cholinesterase from bovin sera, bovine serum albumine, dichlormethan, Fast Blue B, ethanol, ethyl acetate, n-hexane, methanol, naphthylacetate, 2-propanol, tetrahydrofuran, Tris (Merck, Darmstadt, FRG).

L-06

Apparatus

AMD2 (CAMAG, Muttenz, Switzerland), Linomat IV (CAMAG, Muttenz, Switzerland), TLC Scanner 3 (CAMAG, Muttenz, Switzerland), Tauch-fix dipping device (BARON, Isle of Reichenau, FRG), precoated HPTLC-silica gel 60 plates F254 10 × 20 cm (Merck 5642, Darmstadt, FRG), Peltier Cooled CCD Camera SensiCam® with software (AVT Horn, Aalen, FRG), CabUVIS (DESAGA, Heidelberg, FRG), Vapo-therm TCS Trockentemperier-System (Barkey, Bielefeld, FRG).

Purification of the HPTLC-plates

Before application of the samples the layers were prewashed by completely immersing them into 2-propanol for at least 1 h and dried at 110 °C for 30 min.

Sample preparation and application

Waste water

A 40 mL sample of waste water is freeze dried and the dry residue is extracted with 400 µL methanol.

Nonpolar organic substances are extracted from 40 mL waste water at pH 7 and pH 2 with cyclohexane or chloroform respectively. The extract is evaporated to dryness under N₂ and then taken up in 40 µL cyclohexane or chloroform.

For the analysis 5–50 µL of this extract are applied to the HPTLC plate.

Surface water

In order to check for the possible presence of readily volatile compounds a parallel substance enrichment is carried out on methanol-conditioned RP18 silica gel cartridges by solid phase extraction, in accordance with DIN 38 407 Part 11.

The organic substances contained in a 500 mL sample of surface water are enriched by solid phase extraction on methanol-conditioned RP18 silica gel cartridges according to DIN 38 407 Part 11, extracted with methanol, evaporated to dryness under N₂ and dissolved in 400 µL methanol.

For the analysis, 50–100 µL of this extract are applied to the HPTLC plate.

Plant food

Pesticides are extracted from food samples according a German standard method for the determination of pesticides in plant food (DFG S19).

For the analysis, 50–100 µL of this extract are applied to the HPTLC plate.

L-06

Chromatography

Automated multiple development (AMD) chromatography was used with a 33 step solvent gradient based on dichloromethane with acetonitrile as a polar and n-hexane as a nonpolar component described in DIN 38 407 Part 11.

Micro-organism and culture medium

Photobacterium fischeri, strain NRRL B-11177 freeze dried, was reconstituted according the German Standard DIN 38 412 part 32. The cells were grown in a complex medium by following the procedure described in DIN 38 412 part 34. The bacteria were cultivated for 20 h on a rotary shaker (150 rev per min) at 21 °C [2,3]. Strains of *penicillium* were obtained from isolates of food from Dr. Stempka, Staatliches Institut für Gesundheit und Umwelt des Saarlandes, and maintained on Sabouraud agar plates (oxoid). Spore suspension of *penicillium* for the assay was prepared using a glucose-mineral salts medium [4].

4 Results and Discussion

Detection of fungicidal active substances in surface water samples

One of the most costly procedures forming a part of the characterisation of water is the determination of individual substances, such as traces of plant treatment agents, by instrumental methods. Here it is only possible to detect those substances for whose presence it is tested. As described above, it is not possible, in the analysis of individual substances, to detect unknown substances or active metabolites with biological/toxicological activity. There are ca. 300 permitted active substances and the development of an analytical procedure for even one group of substances involves a great deal of time and expense, while the possibility still remains that the user will already have released an alternative product into the environment which is not detected by the measurement program that has been set up. Here bioactivity-based analysis with AMD/HPTLC acquires great importance because it constitutes an instrument capable of determining substances and unknown pollutants defined by the measurement program, e.g. that inhibit the growth of fungal spores or a yeast strain.

Water samples from 10 different sites in Luxembourg, France, Saarland and the Rineland Palatinate were prepared and the methanolic extracts were chromatographed in accordance with DIN 38 407 Part 11.

L-06

A preliminary identification was then carried out using the spectral library available, where the running distance of the standard substance is taken into account.

Table 1 Results of screening for fungicides in surface waters

| Country | Fungicide investigated | Comments |
|---------------------------|--|--|
| Luxembourg | Imazalil, Fenpropidin (Met.), Benalaxyl | |
| France | Benalaxyl, Isoproteron or Metoxuron, Carbendazim, Fenpropimorph or Benalaxyl, Iprodion | |
| Saarland | Carbendazim, Imazalil, Epoxiconazol | |
| Rheineland/ Palatinate | Carbendazim, Imazalil, Benalaxyl | <i>Substances from comm. treatment, plants present e.g. caffeine</i> |

In a 2nd step the fungicide effect of the samples was detected using mould spores as detection organism (**Fig. 1**).

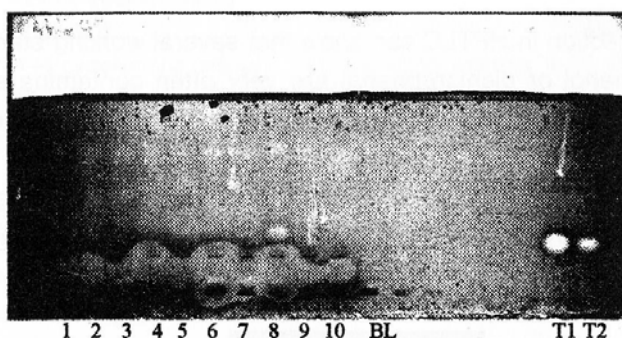


Figure 1 Testing surface waters for the possible presence of fungicides
1-11 surface water samples, T1, T2 standards of Tebuconazol 20 ng, 10 ng. Test organism: *Penicillium spec.* postchromatographically. 1-3 Luxembourg, 4-7 France, 8-10 Saarland, BL blank

Fig. 1 indicates the likely presence of 2-3 fungicides in samples 1-10. When trying to identify the contaminants it is possible to exclude numerous fungicides e.g. procymidon, vinclozolin, captafol, chlozolilat etc., since their position on the chromatogram does not correspond to that of the substances detected here.

L-06

It was decided to test these samples for carbendazim, imazalil, bitertanol etc. (see **Table 1**) and in the case of sample 8 for azoles.

*Waste water characterisation by bioactivity-based analysis with *Photobacterium phosphoreum**

The comparatively quick and low-cost bioassay with the luminescent marine bacterium *Photobacterium phosphoreum*, strain NRRL-B-11177, has gained a considerable popularity for the monitoring of various industrial effluents and for the toxicity of different chemicals. Many toxic substances (nearly 1350 individual organic compounds) show an inhibition of the bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum* and *vibrio fischeri* in vitro [5]. In HPTLC these substances has been identified postchromatographically in situ on the plate by dipping the plate 2 s into a suspension of bacteria and determination the difference of photone-emission using a cooled charged coupled device camera in a dark chamber [1,2]

A linear correlation between the inhibition of bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum* and the concentration of an inhibitor could be shown. Under the condition described the detection limit of pentachlorophenol was found to be between 10 and 20 ng on the HPTLC plate while the detection limit of dichlorophenol could be observed in the range of 7.5 ng [2].

The biological detection in HPTLC can show that several working standards, such as pentachlorophenol or dichlorophenol are very often contaminated with toxic impurities, which can only be detected after chromatographic separation. Coke plant waste water, which was found to inhibit the luminescence of luminescent bacteria (Gf 4), has been investigated by various extraction procedures, in order to identify the substances responsible for this inhibition (**Fig. 2**).

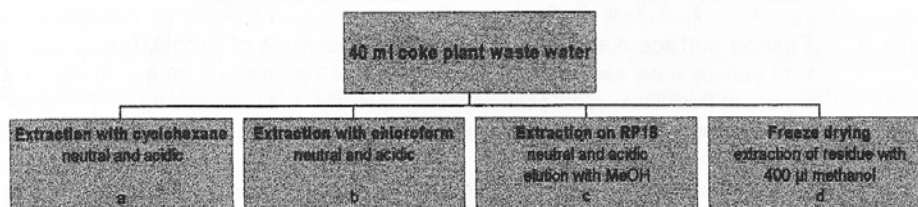


Figure 2 Scheme for the fractionation of coke plant waste water

L-06

Chromatography of the extracts by normal phase chromatography separated the waste water components according to their polarity.

In the postchromatographic identification test with luminescent bacteria with dichlorophenol (DCP) and pentachlorophenol (PCP) reference substances, it was possible to detect varying quantities of bioluminescence-inhibiting substances as a function of the extraction (Fig. 3).

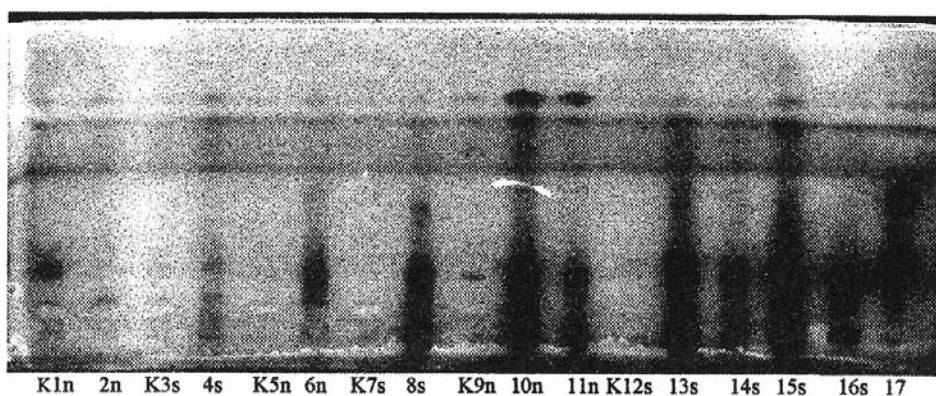


Figure 3 Luminescent bacteria test on the chromatogram (exposure time 800 sec)

(1–4 cyclohexane extracts, 5–8 chloroform extracts, 9–14 enrichment via RP 18 cartridges, 15–16 methanolic extraction of the dried residue; 17 DCP/PCP 30 ng; K = control; n = water sample neutral; s = water sample acid at pH 2)

The recovery rates for bioluminescence inhibitors increases with the polarity of the extraction method. It is clear from Fig. 3, which enrichment methods can be used to detect the organic substances responsible for the inhibition of bioluminescence. Direct measurement on a native water sample was not possible on account of the high salt content. It was possible to identify PCP unequivocally as one of the bioluminescence inhibitors in these fractions.

The detection of inhibitors of cholinesterase in surface water

The inhibition of cholinesterase has long been recognized as a biochemical method for the detection of the enzyme-inhibiting effects of organophosphate esters and insecticidal carbamates. The inhibitory effect is determined by the reduction in the enzymatic hydrolysis of 1-naphthyl acetate to 1-naphthol and acetic acid

L-06

followed by coupling of the 1-naphthol to yield a violet-blue dyestuff (diazonium salt, Echtblau B). White zones of inhibition on a coloured background are produced around toxicologically active substances [7]. The detection limit should be proportional to the inhibition constant of the particular substance and can lie in the lower picogram range [2].

When carrying out an effect analysis for cholinesterase inhibitors in the water samples, it was found, in particular, that the effect of these inhibitors was elevated in the water samples from the outfalls of water treatment plants (**Fig. 4**).

In this method the detection limit of tacrine, a medicament that has particularly been associated with Alzheimer's disease at high doses (160 mg per day), was 8 pg per zone in this method.

The size of the zone of inhibition is determined by the amount applied, on the one hand, and by the specific inhibitory activity of the substance, on the other hand.

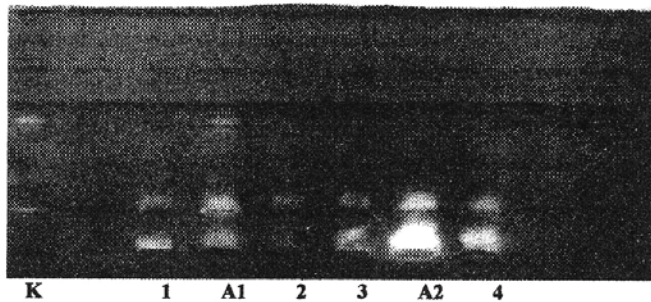


Figure 4 Presence of cholinesterase inhibitors in a river profile
(A1,2 = 12.5 ml water samples from treatment plant outflows K: control, uncontaminated water sample)

Further investigations have revealed that the outfalls of communal water treatment plants exhibit particularly high contamination with cholinesterase inhibitors. This procedure can be used to document the presence of bioactive substances in communal waste waters.

The sources of inhibitors of cholinesterase in surface water

L-06

Screening of pesticides in food

The results of a screening experiment with plant food for detecting the presence of fungicides in different samples are shown in **Fig. 5**. In this case samples with no contaminant and samples which are contaminated with 1 to 3 fungicides can be detected.

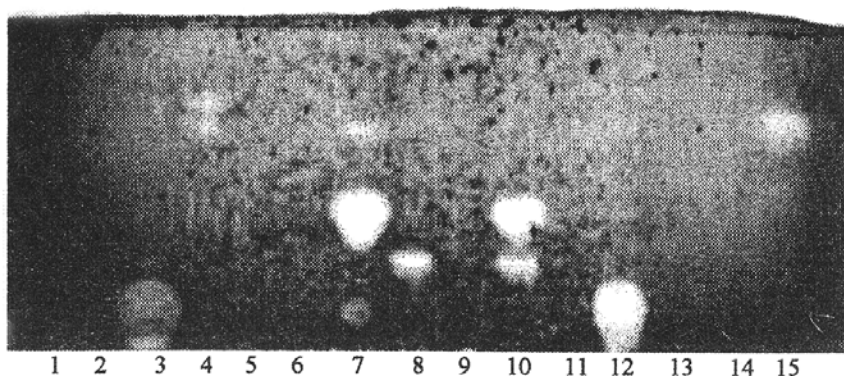


Figure 5 Presence of fungicides in different plant food samples
1 control strawberries, 2–5, 9 strawberries, 6 control raisins, 7, 8, 10 raisins, 11–15 standards of fungicides (Fenpropathrine 30 ng, Imazalile 10 ng, Mercaptodimethur 30 ng, Procymidom 10 ng)

The chromatogram combined with penicillium spores was documented by illumination of the plate with a light source of 254 nm. The inhibition spots can be seen by the special phosphorescence indicator in the stationary phase. According the migration distance of the inhibitors in sample 4 and 7, the presence of procymidon has to be discussed. This result was confirmed by gaschromatography.

5 Conclusion

Bioactivity-based analysis is a coupling of instrumental analysis with biological/biochemical activity tests. So that, on the one hand, it is possible to assign physically detected substances to a selective activity, on the other hand, it is also possible to detect the presence of other unknown toxic active substances on the chromatogram.

L-06

This procedure is a suitable instrument for application in risk analysis, in order to be able to quantify and assess the effects of contaminants. Risk analysis can be used to quantitate threshold levels and to determine a possible acceptable risk.

Risk assessment becomes possible since risk analysis produces results that make it clear what sources emit particular contaminants more than others, so that concrete objectives can be more clearly defined.

References

- [1] *K. Burger*, *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* **41** (1988) 173–224.
- [2] *C. Weins* and *H. Jork*, *Journal of Chromatography* **750** (1996) 403–407.
- [3] *G. Eberz*, *H.-G. Rast*, *K. Burger*, *W. Kreiss*, *C. Weisemann*, *Chromatographia* **43** (1996) 5–9.
- [4] *A.L. Homans* and *A. Fuchs*, *J. Chromatogr.* **51** (1970) 327–329.
- [5] *K.E. Kaiser* and *V.S. Palabricia*, *Water Poll. Research J. Canada* **26** (1991) 361.
- [6] *A. Ambrus*, *A. Hargitai*, *E. Caroly*, *G. Fulop*, *A. Lantos*, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **64** (1981) 743–750.
- [7] *F. Geike*, *Journal of Chromatography* **44** (1969) 95–102.

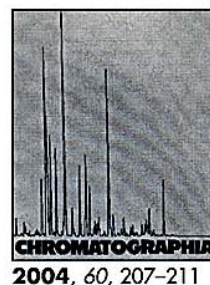
Veröffentlichung IV

**A New Bioautographic Screening Method for Detection
of Estrogenic Compounds,**

M. B. Mueller, C. Dausend, C. Weins, and F. H. Frimmel

Chromatographia, 60, pp 207-211, 2004

A New Bioautographic Screening Method for the Detection of Estrogenic Compounds



M. B. Müller¹, C. Dausend¹, C. Weins², F. H. Frimmel^{1,✉}

¹Engler-Bunte-Institut, Bereich Wasserchemie, Universität Karlsruhe (TH), Engler-Bunte-Ring 1, 76131 Karlsruhe, Germany; E-Mail: Fritz.Frimmel@ziv.uni-karlsruhe.de
²Landesanstalt für Umweltschutz des Saarlandes (LfU), Malstatt Str. 17, 66117 Saarbrücken, Germany

Received: 5 February 2004 / Accepted: 9 March 2004
Online publication: 9 July 2004

Abstract

The yeast estrogen screen was introduced as biological detection method for high performance thin layer chromatography. Yeast cells were grown directly on HPTLC plates, where in the presence of estrogenic substances the production of the enzyme β -galactosidase was induced. For the natural ligand 17 β -estradiol, sensitivity could be improved by a factor of 20 using the fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl β -D-galactopyranoside instead of the chromogenic substrate chlorophenol red- β -D-galactopyranoside. The fluorescence intensity of "estrogenic" zones was measured using a commercial TLC-Scanner. A nearly full dose-response curve was obtained for 17 β -estradiol masses between 2.75 and 550 pg, or concentrations of 2.75 to 550 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Keywords

Thin layer chromatography
Direct bioautography
Yeast estrogen screen
 β -Galactosidase
Endocrine disrupters

Introduction

Up to date, a wide variety of compounds with different chemical structures and physical properties are known to possess estrogenic properties, and new endocrine disrupting compounds (EDC) are still being discovered. Estrogen receptor agonists include natural and synthetic hormones [1], phytoestrogens [2], and chemicals such as metabolites of alkylphenol ethoxylates (APEO) [1, 3–6], bisphenol A [7], parabenes [8, 9], benz-

ophenones [9], phthalates [10], and various UV filters [11, 12]. Many of these compounds have been found in wastewater or sewage treatment plant (STP) effluents and are known to be released into the environment.

Investigations on the presence of endocrine disrupters in environmental samples are mostly done using either exclusively analytical, or biological methods only. Several papers report on the analysis and occurrence of selected estrogenic substances in various sample

matrices [13–16], while other researchers have focussed on measuring the biological effects of either individual compounds [1–12] or environmental samples using a particular bioassay [17, 18]. The limitations of such approaches are illustrated by the fact that analytical methods will only detect those compounds which are under investigation and do not yield information on biological effects. Bioassays, in turn, normally do not provide information on the identity and quantity of EDC in a particular sample.

To cope with the great number of EDC which can potentially be present in environmental samples, it is useful to develop screening methods which combine a separation of the sample components with biological detection methods. In bioautography, the chromatographic separation by high performance thin layer chromatography (HPTLC) is combined with a bioassay which can be carried out either directly on the HPTLC plate (direct bioautography) or after obtaining a reprint of the HPTLC plate on an agar layer which contains the test organism (indirect bioautography) [19, 20]. Direct bioautography allows for the *in situ* detection of bioactive compounds [21–23]. Various bioautographic methods have recently been developed within the field of environmental analysis. Bioautography has been used to measure acute toxicity (luminescence inhibition assay) [24] as well as antimicrobial [19] or fungicidal [20] effects, or for the detection of enzyme inhibitors (e. g. cholinesterase inhibition)

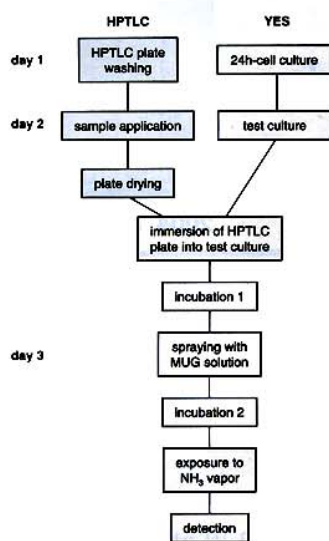


Fig. 1. Scheme of the HPTLC-YES procedure

[25]. For the final identification of compounds, LCMS or GCMS analysis of active TLC fractions will have to be carried out.

A great number of *in vivo* and *in vitro* test systems exists for the measurement of estrogenic activity [26]. The yeast estrogen screen (YES) is a reporter gene assay which has been developed for the assessment of the estrogenic potency of individual substances. We selected this bioassay from the existing *in vitro* test systems because the yeast cells are more suitable for cultivation on the HPTLC plate than the test organisms, or test organelles, or other bioassays such as the E-screen [3, 17], assays based on vitellogenin formation [27], or receptor binding assays. Furthermore, the specificity and limitations of the YES have been documented extensively by SUMPTER and co-workers, making the assay a very well characterized test system. The test principle has been explained in detail elsewhere [6]. In brief, the genetically engineered yeast cells contain the human estrogen receptor (hER) DNA sequence as well as the reporter gene *lacZ* on an expression plasmid. Upon binding of an hER agonist, *lacZ* expression is induced, resulting in the production of β -galactosidase. The original YES version is carried out in microtiter plates using yeast cell suspensions. Here, the enzyme is secreted into the medium, where it is de-

tected indirectly after metabolization of the substrate chlorophenol red β -D-galactopyranoside (CPRG). CPRG, which is normally yellow, is converted to a red product which is detected by measuring absorbance at 540 nm. Cell vitality and growth are monitored by measuring absorbance at 640 nm. With the original test format, 17 β -estradiol (E2) concentrations between 5×10^{-12} and 1×10^{-8} mol L⁻¹ (corresponding to 1.36 ng L⁻¹ and 2.72 μ g L⁻¹) can be detected [6].

The objectives of our work were as follows: (1) implementation of the yeast estrogen screen as a new bioautographic detection method for HPTLC (2) optimization of the HPTLC-YES test system for the positive control substance 17 β -estradiol (3) improvement of sensitivity by using a fluorogenic instead of a chromogenic enzyme substrate.

Experimental

Chemicals

All chemicals used for preparation of media were used in the quality as described for the original YES [6]. Gelrite[®] was purchased from Roth (Germany). CPRG was obtained from Roche Diagnostics (Germany), and MUG was obtained from Sigma-Aldrich (Germany). Ammonia solution (25% in water; Suprapur) was from Merck (Germany). A stock solution of the natural ligand 17 β -estradiol (>98%, Sigma-Aldrich) was prepared at a concentration of 55 mg L⁻¹ in absolute ethanol (Merck, Germany). Concentrations of the E2-test solutions (in ethanol) ranged from 2.75 μ g L⁻¹ to 550 μ g L⁻¹.

Yeast Estrogen Screen

Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells were provided by Prof. John Sumpter at Brunel University, UK. Preparation of short term yeast stocks (-20 °C storage), minimal and growth medium, and 24 h-cultures were performed as described in [6]. All tests were carried out using yeast cell cultures grown from 10-fold concentrated -20 °C stocks. Three major modifications of the original YES were made. Firstly, yeast cells were used in immo-

bilized form by growing them on the HPTLC plate (HPTLC-YES test system) instead of using cell suspensions in microtiter plates (original YES). Secondly, 23 mg of Gelrite[®] were added per 45 mL of minimal medium to increase the viscosity of the cell suspension. Thirdly, in the final version of the HPTLC-YES procedure, 4-methylumbelliferyl β -D-galactopyranoside (MUG) was used as enzyme substrate instead of CPRG. Enzymatic cleavage of MUG results in the production of 4-methylumbelliferone (4-MU), a fluorescent compound which was measured using an excitation wavelength of 365 nm. At pH values above 8 the emission maximum is observed at ~460 nm. MUG itself is virtually nonfluorescent [28].

HPTLC-YES Procedure

The scheme of the HPTLC-YES procedure is shown in Fig. 1. Total test duration was 3 days. On day 1, a yeast culture was prepared by inoculating 50 mL of growth medium (containing Gelrite[®]) with 125 μ L of yeast stock culture, and incubating it on an orbital shaker at 30 °C for 24 h. Silica gel KG 60 HPTLC plates with fluorescence indicator F254, 20 \times 10 cm, layer thickness 200 μ m (Merck, Germany) were precleaned by immersing them into *i*-propanol for at least 1 h, and by activating them at 110 °C for 30 min. Activated plates were covered with glass plates and stored in an exsiccator at 30% relative humidity until use. On day 2, test solutions of E2 (positive control) in ethanol (1 μ L) were applied as 5 mm bands onto the HPTLC plates using an ATS III sampling device (Camag, Germany). Ethanol was used as negative control. A blank, i.e. a sample without yeast cells, was not included on every plate, but only performed once to verify that no autohydrolysis of the substrate took place. The test culture was prepared by adding 50 mL of the 24h-culture (optical density (OD) at 620 nm = 1) to each 100 mL of fresh growth medium. The dried HPTLC plate was then dipped into the test culture with the help of an automated immersion device (Camag, Germany) at a speed of 2 for 5 s. In total, with the dipping chamber used here, 300 mL of test culture were needed for a 20 \times 10 cm plate. After removing excess cell suspension and

medium with a paper towel, the HPTLC plates with the yeast cells were placed horizontally in heat sterilized 30 × 20 cm glass boxes which also contained humid paper towels. The boxes were covered with a lid, and incubated at 32 °C (first incubation). Incubation times were varied to find out the optimal time period for each enzyme substrate. Two different substrates were used. The substrate CPRG was added directly to the test suspension (10 mL of a 10 g L⁻¹ solution in sterile, ultrapure water per 100 mL of growth medium). Additionally, HPTLC plates were also sprayed with CPRG solution (10 g L⁻¹ in medium) on day 3 after the first incubation of the plate to obtain a better contrast between the red zones indicating estrogenic activity and the yellow background. MUG was not added to the medium, but only sprayed onto the plate after the first incubation (on day 3). A 0.1 g L⁻¹, non-sterile solution of MUG was prepared directly before use by dispersing 2 mg of MUG in 100 µL of ethylene glycol monomethyl ether, and adding 20 mL of growth medium. CPRG or MUG solutions were applied onto the HPTLC plates with the help of a spraying device. After spraying, plates were incubated again for various times (second incubation) until conversion of the substrate could be detected visually. CPRG conversion could be observed as color change from yellow to red. For detection of 4-MU formation, plates were exposed to ammonia vapor in a twin-through chamber for 5 min to increase the fluorescence signal. Fluorescence signals were then observed visually using a 8 W mercury lamp (λ_{ex} = 366 nm, Camag, Germany) for excitation. Photographies of selected plates were taken using a Canon EOS D30 camera equipped with a UV filter B+W 010 under UV light (λ_{ex} = 366 nm). In addition to visual and photographic detection, absorbance or fluorescence measurements were made using a TLC Scanner 3 in combination with the software CATS (version 4.06; Camag, Germany). Absorbance was measured at 575 nm (λ_{max} of chlorophenol red; deuterium lamp, slit dimension 5 × 0.3 mm), and fluorescence measurements were made using a λ_{ex} of 366 nm (mercury lamp), a cutoff filter of 400 nm, and a slit dimension of 5 × 0.3 mm. Implementation and optimization of the yeast estrogen screen as bioautographic method for HPTLC were performed without chromatographic separation.

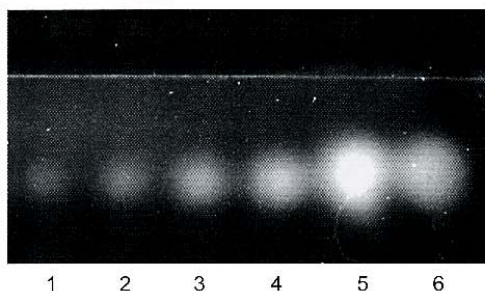


Fig. 2. Photographic documentation of fluorescent zones on the silica gel plate under UV light (λ_{ex} = 366 nm). Positive control 17 β -estradiol (E2); positions 1: 2.75 pg, 2: 5.5 pg, 3: 27.5 pg, 4: 55 pg, 5: 275 pg, 6: 550 pg of E2

Results and Discussion

HPTLC-YES with Substrate CPRG

Compound masses tested with the chromogenic substrate CPRG ranged from 55 pg to 55 ng of 17 β -estradiol (absolute mass per 5 mm band). The respective amounts of E2 (55 pg, 550 pg, 5.5 ng, 55 ng) were applied as individual bands on silica gel plates, and HPTLC-YES was performed without chromatographic separation. A color change from yellow to red at the E2 application zones was observed only after about 48 to 50 h (incubation 1). The minimal detectable amount which resulted in a visible color change was 55 pg of E2. Increasing amounts of E2 resulted in red zones with increasing diameter and a more intense color. Spraying with CPRG solution after incubation 1 and additional incubation for 20 h (incubation 2) slightly improved the contrast between red, "estrogenic" zones, and yellow background. Detection of red spots on the yellow HPTLC plate, however, was still difficult both visually and using the TLC scanner (data not shown). For densitometric absorbance measurements the contrast between the colors red and yellow was too weak, resulting in extended incubation periods and poor sensitivity.

HPTLC-YES with Substrate MUG

The fluorogenic substrate MUG was also tested for the positive control substance E2 (without chromatographic development). Tested amounts of estradiol were 2.75 pg, 5.5 pg, 27.5 pg, 55 pg, 275 pg,

and 550 pg per band (application volume 1 µL). Blue, fluorescent zones appeared at the positions where E2 had been applied bandwise, indicating that ER binding and β -galactosidase production had taken place on the HPTLC plate. A photography of the plate is shown in Fig. 2. "Estrogenic" zones were visible as round, fluorescent zones with an increasing diameter and more intense fluorescence signals for increasing masses of E2. Optimal incubation times for HPTLC-YES with MUG as enzyme substrate were 26 h (incubation 1) and 3 h (incubation 2). The minimal detectable amount for estradiol was 2.75 pg. As expected, the fluorescent product 4-MU could be detected with better sensitivity than chlorophenol red, resulting in a much shorter time required for incubation as well as a 20-fold lower minimal detectable amount.

With the substrate MUG the background (HPTLC plate) also exhibited a weak fluorescence. This was a consequence of background expression of β -galactosidase which is commonly observed in the yeast screen [6]. A similar fluorescence intensity could be observed for a plate without estradiol, but with yeast cells, confirming the above explanation. The negative control (ethanol) did not differ significantly from the background fluorescence. Autohydrolysis of MUG was tested on a second plate without yeast cells (blank). No fluorescence signal was visible on the blank plate, indicating that MUG was chemically stable during the second incubation period.

Fluorescence of the E2 plate was also recorded using a TLC scanner (8 W mercury lamp, excitation 366 nm, cutoff filter 400 nm (emission), slit

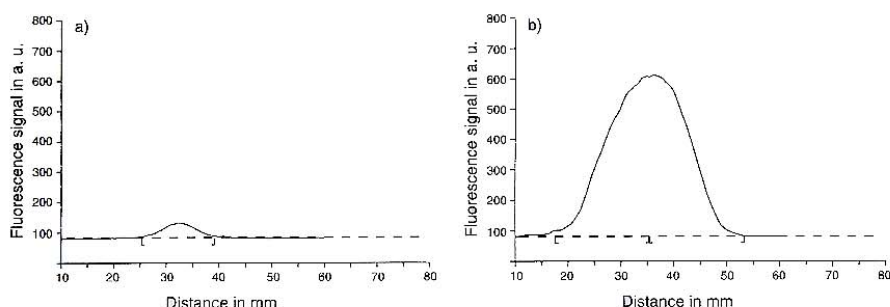


Fig. 3. Densitograms of fluorescent zones after HPTLC-YES assay of 17 β -estradiol (E2). Mercury lamp, λ_{ex} = 366 nm, cutoff filter 400 nm. (a) 2.75 pg of E2; (b) 550 pg of E2. a. u.: arbitrary units. Dash line indicates baseline position

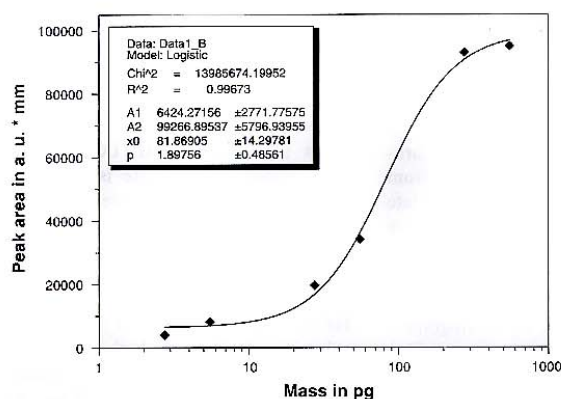


Fig. 4. Dose-response curve for 17 β -estradiol in the HPTLC-YES assay. a. u.: arbitrary units

5 \times 0.3 mm). In Fig. 3, densitograms of the lowest (2.75 pg) and for the highest (550 pg) amount of estradiol are shown. Due to lack of instrumentation, no video documentation of the plate could be made. The scanner data were used for quantification instead. In theory, signal areas should be a quantitative measure of the amount of a given estrogenic compound with a particular estrogenic potency. Areas were integrated using the CATS software, and plotted against the logarithm of the mass of E2 per band (Fig. 4). Fitting of data points was carried out using the logistic fit function of the Microcal Origin software (Version 6.0). A typical sigmoidal, nearly full dose-response curve was obtained when plotting peak areas against the log of the compound mass. This shows that the YES can be performed successfully on the HPTLC plate not only in a qualitative, but also in a quantitative manner.

From Fig. 2 it is obvious that estrogenic zones were rather large in diameter

for higher concentrations of E2. This is unfavorable if the HPTLC-YES is carried out after chromatographic separation because it may prevent unequivocal assignment of "estrogenic" zones to separated sample components. The size of the estrogenic zones is a consequence of diffusion of the test compound on the humid HPTLC plate during incubation. Compared to the original microtiter plate format (test duration 3 to 5 days, [6]), the test duration could be shortened considerably with the HPTLC-YES procedure which has been developed in this work. The incubation time is, however, still longer than incubation times for other bioautographic methods [24, 25]. This is due to the fact that the YES is a more complex test system which requires several biological processes (estrogen reporter production, ligand binding, *lacZ* expression, β -galactosidase production and excretion into medium) to take place before a detection of bioactivity is possible. The long incubation times are mainly

caused by slow excretion of the enzyme into the medium, and can be shortened by lysing the cells at the end of the test procedure [29, 30]. Lysis of yeast cells on the HPTLC plate, however, will also result in an impaired spatial resolution, and it needs to be evaluated in further studies whether such a step will result in narrower estrogenic zones or not. Alternatively, the conversion of the HPTLC-YES from a direct bioautography to an agar overlay method [19] may result in shorter incubation times and improved spatial resolution. Current work is focussing on this point as well as on investigations regarding the influence of different stationary and mobile phases on the HPTLC-YES assay, and on its combination with chromatographic separation. Furthermore, work is in progress to supplement the HPTLC-YES method with a cytotoxicity assay, and to test various known estrogenic compounds with the newly developed bioautographic method. After further optimization and validation, the HPTLC-YES method will be used to screen water samples (e. g. treated sewage treatment plant effluents, river waters) for the presence of estrogenic compounds.

Acknowledgements

This research was supported by the German Gas and Water Works Association (DVGW). The authors thank Dr. John Sumpter and Nicola Beresford for kindly supplying the original yeast culture used for this work. We are grateful to Philip Hörsch (Universität Karlsruhe (TH)), Dr. Zipperle (LfU Karlsruhe), and Peter Krolla Sidenstein (Forschungszentrum Karlsruhe GmbH) for helpful comments on YES work and enzymatic assays.

References

1. Routledge EJ, Sumpter JP (1997) *J Biol Chem* 272:3280–3288
2. Lee SJ, Chung HY, Maier CGA, Wood AR, Dixon RA, Mabry TJ (1998) *J Agric Food Chem* 46:3325–3329
3. Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C (1991) *Environ Health Perspect* 92:167–173
4. Jobling S, Sumpter JP (1993) *Aquat Toxicol* 27:361–372
5. White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG (1994) *Endocrinology* 135:175–182
6. Routledge EJ, Sumpter JP (1996) *Environ Toxicol Chem* 15:241–248
7. Krishan AV, Stathis P, Permeth SF, Tokes L, Feldman D (1993) *Endocrinology* 132:2279–2286
8. Routledge EJ, Parker J, Odum J, Ashby J, Sumpter JP (1998) *Toxicol Appl Pharmacol* 153:12–19
9. Miller C, Wheals BB, Beresford N, Sumpter JP (2001) *Environ Health Perspect* 109:133–138
10. Harris CA, Henttu P, Parker MG, Sumpter JP (1997) *Environ Health Perspect* 105:802–811
11. Schlumpf M, Cotton B, Conscience M, Haller V, Steinmann B, Lichtensteiger W (2001) *Environ Health Perspect* 109:239–244
12. Holbech H, Norum U, Korsgaard B, Bjerregaard P (2002) *Pharmacol Toxicol* 91:204–208
13. Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M (1999) *Sci Tot Environ* 225:81–90
14. Snyder SA, Keith TL, Verbrugge DA, Snyder EM, Gross TS, Kannan K, Giesy JP (1999) *Environ Sci Technol* 33:2814–2820
15. Ahel M, Giger W, Molnar E, Ibric S (2000) *Croatica Chimica Acta* 73:209–227
16. Ferguson PL, Iden CR, Brownawell BJ (2001) *J Chromatogr A* 938:79–91
17. Körner W, Hanf V, Schuller W, Kempter C, Metzger J, Hagenmaier H (1999) *Sci Tot Environ* 225:33–48
18. Holbrook RD, Novak JT, Grizzard TJ, Love NG (2002) *Environ Sci Technol* 36:4533–4539
19. Rahalison L, Hamburger M, Hostettmann K (1991) *Phytochem Anal* 2:199–203
20. Hostettmann K, Terreaux C, Marston A, Potterat O (1997) *J Planar Chromatogr* 10:251–257
21. Weins C (2001) Detection of bioeffective environmental compounds by highperformance thin layer chromatography. In: Hock B (ed) *Bioresponselinked instrumental analysis*. Teubner, Germany, pp 39–56
22. Eymann R, Fischer W, Hauck HE, Weins C (2001) *Fleischwirtschaft* 8:95–96
23. Weins C (2001) *Obst Gemüse Kartoffel* 3:90–93
24. Eberz G, Rast HG, Burger K, Kreiss W, Weisemann C (1996) *Chromatographia* 43:5–9
25. Weins C, Jork H (1996) *J Chromatogr A* 750:403–407
26. Gulden M, Turan A, Seibert H (1997) Endocrinically active substances in surface waters. German Environmental Protection Agency Research Report No. UB AFB 97-068
27. Jobling S, Sumpter JP (1993) *Aquat Toxicol* 27:361–372
28. http://www.turnerdesigns.com/t2/doc/appnotes/998_7073.html
29. Arnold SF, Robinson MK, Notides AC, Guillette LJ, McLachlan JA (1996) *Environ Health Perspect* 104:544–548
30. Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould JC, Babai D, Portier CJ, McDonnell DP (1997) *Toxicol Appl Pharmacol* 143:205–212

Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre, dass ich die Dissertation: „Möglichkeiten und Grenzen der wirkungsbezogenen Analytik mit der Hochleistungs – Dünnschichtchromatographie“ selbstständig nur mit der darin angegebenen Hilfe verfasst und bei keiner anderen Universität und keiner anderen Fakultät der Universität Basel eingereicht habe.“

Basel, den 23.02.2006

Christel Weins

Curriculum Vitae

Name: Christel Weins, geb. Pfandt
Geburtsdatum: 14.09.1951
Geburtsort: Düsseldorf
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet seit 1975, 4 Kinder

1958-1962 Besuch der Volksschule in Düsseldorf-Gerresheim, Deutschland
1962-1970 Besuch des Neusprachlichen Gymnasiums in Düsseldorf- Gerresheim, Deutschland

1970-1971 Studium der Biologie an der Universität Köln, Deutschland
1971-1977 Studium der Biochemie an der Universität Tübingen
1977-1978 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Helga Ninnemann an der Universität Tübingen

1978 Diplom in Biochemie

1979 Forschungsarbeit am Institut für Pathologie der Universität Tübingen über " Röntgenspektroskopische Elementanalyse im Elektronenmikroskop" bei Prof. Dr. Schlote

1979 – 1982 Forschungsarbeit an der Chirurgischen Universitätsklinik in Tübingen über " Biochemische Verfahren zur Erkennung von Zelldifferenzierungsvorgängen in Zellkulturen" bei Prof. Dr. Dr. Schmitt

1983 – 1986 Forschungsarbeit am Zentrum für Innere Medizin an der Universität Marburg über „Auswirkung von Luftschadstoffen auf den Lungenstoffwechsel (insbesondere NO₂ und SO₂) „ bei Prof. Dr. von Wichert

1989 – 1991 Forschungsprojekt am Staatlichen Institut für Gesundheit und Umwelt, Abteilung Wasser und Lebensmittelchemie über die "Erarbeitung neuer biochemischer und immunologischer Methoden zum frühzeitigen Erkennen umweltrelevanter Mikroorganismen, Toxinen und anderer Umweltschadstoffe für die routinemäßige Wasser- und Lebensmittelüberwachung."

1992 – 1997 Forschungsprojekt im Fachbereich 12.5 (Wasserchemie und Umwelttoxikologie) der Universität Saarbrücken über "Die Bedeutung organischer und suborganischer Testverfahren zur Erfassung umweltrelevanter

Schadstoffe mit besonderer Berücksichtigung der Dünnschicht-Chromatographie." bei Prof. Dr. Hellmut Jork

1998-2001

Durchführung eines vom BMBF geförderten -Forschungsvorhaben (02WU9859/2) am Staatlichen Institut für Gesundheit und Umwelt des Saarlandes (Deutschland) über den „Einsatz eines neuen summarischen Konzeptes für die wirkungsspezifische Bearbeitung der organischen Belastung eines Gewässers-WISBOB“- TP 4: Fraktionierung und biochemische akute Toxizität“

2001-2006

Projektkoordination am Max-Planck Institut für Informatik in Saarbrücken, Deutschland, und Doktorstudium in der Organischen Analytischen Chemie an der Universität Basel bei Prof. Dr. Michael Oehme