

**Validierung eines Enzymimmunoassays
und Entwicklung von Standardmaterialien
für die Analytik freier und gebundener Triazinrückstände**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Yasukazu Tambo
aus Hamburg

Hamburg 2002

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. A. Knöchel
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. W. Francke

**Für Tjane
und
meine Eltern**

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Juni 1999 bis Juni 2002 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. A. Knöchel am Institut für Anorganische und Angewandte Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. A. Knöchel danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit, seine wissenschaftliche Förderung sowie für die weitestgehenden Freiheiten, von denen mein Arbeiten geprägt war.

Ein Projekt wie diese Dissertation kann nur auf der Basis eines gut funktionierenden Teams zu einem guten Ende geführt werden. Ganz besonders möchte ich in diesem Zusammenhang dem „Kapitän des Arbeitskreises“, Herrn Dr. Markus Cichon für die uneingeschränkte Unterstützung und die geleisteten Hilfen in dieser Zeit danken. Ferner möchte ich auch den anderen Mitgliedern des Arbeitskreises für die gute Arbeitsatmosphäre, die zahlreichen Diskussionen und insbesondere die Erinnerung an gemeinsam verbrachte Probennahmen und Tagungen danken. Mein Dank richtet sich insbesondere an Frau Dipl.-Chem. Birgit „Taxi“ Runge, Herrn Dipl.-Chem. Dirk „Kollegiat“ Eifler, Herrn Dipl.-Chem. Frank „Regenbogen“ Miller, Herrn Dipl.-Chem. Thomas „Kienzel“ Kinzel und Herrn Dipl.-Chem. Jochen „dot net“ Feuerborn.

Zu tiefstem Dank verpflichtet bin ich Frau Dr. A. Dankwardt für ihren qualifizierten, fachlichen Rat und die unendliche Geduld, und der Fa. SENSION GmbH in Augsburg, die mit der Bereitstellung essentieller Antikörper und Enzymtracer für Enzymimmunoassays das Fundament dieser Arbeit gelegt hat.

Herrn Prof. Dr. Dr. W. Francke danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens, daneben für die schöne Zeit in seinem Arbeitskreis. Die Schwerpunktarbeit, die meinen ersten Kontakt mit der Analytischen Chemie darstellte, hat meine wissenschaftliche Ausrichtung maßgeblich mitgeprägt.

Herrn Dr. M. Preuße danke ich für die äußerst zuvorkommende Hilfe bei den massenspektrometrischen Untersuchungen. Herrn Dr. M. Weller (TU München) danke ich für unbürokratischen Transfer von Untersuchungsmaterial und Antikörpern, sowie die geleistete wissenschaftliche Hilfe.

Den Herren Andreas Bertscher, Sven Kloos, Markus Scheurell und Francis Hilscher danke ich für die geleisteten Arbeiten im Rahmen ihrer Forschungspraktika und für die Anregungen und Diskussionen.

Herrn Dr. W. Herdering danke ich für die Bereitstellung von Modellsubstanzen für Fulvin- und Huminsäuren.

Dem Sicherheitsingenieur des Fachbereichs Chemie, Herrn Dipl.-Ing. Dirk Wiedemann, sowie Herrn Heinz Graeske vom Chemikalienlager der Anorganischen Chemie danke ich für die stets freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft während meiner Zeit an der Universität. Den Bibliothekarinnen des Fachbereichs Chemie, allen voran Frau G. Oetken danke ich ebenso für die Unterstützung bei meinen umfangreichen Literaturrecherchen.

Meinem Lehrer und Tutor Herrn Dipl.-Chem. Klaus Peters danke ich für die Begeisterung für die Chemie, die er mir während meiner Schullaufbahn eingepflanzt hat. Sie war die Basis für das Ergreifen eines naturwissenschaftlichen Studiums.

Meiner Mutter Junko Tambo und meinem Vater Katsuhiko Tambo möchte ich meine Dankbarkeit aussprechen, dass sie mir in ihrer Liebe dieses Studium finanziell überhaupt ermöglicht haben. Ich bin stolz, solche Eltern haben zu dürfen.

Meinen Freunden gilt mein Dank für die moralische Unterstützung über alle Phasen meines Studiums. Christiane, meinem lieben Engel, die mich durch die steinige Zeit gebracht hat, danke ich für die absolute Unterstützung und die stets aufmunternden Worte, die für mich in den letzten Jahren unverzichtbar waren.

石の上にも三年

„Ishi no ue nimo sannen“

„Auch auf den Stein gehören drei Jahre“

Japanisches Sprichwort:

Beharrlichkeit bringt Erfolg

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Literaturteil	3
2.1. Triazin-Herbizide	3
2.1.1. Physikalische und chemische Eigenschaften	4
2.1.2. Verhalten in der Umwelt	5
2.1.2.1. Transport und Verlagerung in der Umwelt	6
2.1.2.2. Metabolisierung und Biotransformation in Pflanzen	7
2.1.3. Analytik der Triazinherbizide	11
2.1.3.1. Aufkonzentrierung der Triazine	12
2.1.3.1.1. Flüssig-Flüssig-Extraktion	12
2.1.3.1.2. Festphasenextraktion	13
2.1.3.1.2.1. Festphasen für die Analytik von Triazinherbiziden	14
2.1.3.1.2.2. Einfluß der Flußrate auf die Effizienz der Festphasenextraktion	15
2.1.3.1.2.3. Elutionsmittel für die Analytik von Triazinherbiziden	16
2.1.3.2. Detektion der Triazine	17
2.2. Huminstoffe und refraktäre organische Säuren (ROS)	19
2.2.1. Definition der Huminstoffe	20
2.2.1.1. Einteilung und Nomenklatur von Huminstoff-Fraktionen	21
2.2.1.2. Isolierung und Fraktionierung von Huminstoffen	22
2.2.2. Genese von Huminstoffen	26
2.2.3. Eigenschaften der Huminstoff-Fraktionen	28
2.2.4. Zusammensetzung und Struktur von Huminstoffen	30
2.2.5. Gebundene Rückstände	34
2.2.5.1. Definition	34
2.2.5.2. Analytik von gebundenen Rückständen	35
2.2.6. Modellsubstanzen für Huminstoffe	37
2.2.6.1. Primärreaktionen der Modellbildung	38
2.2.6.2. Modellsubstanzen für Huminstoff-gebundene Rückstände	41
2.3. Antikörper	45
2.3.1. Struktur der Antikörper	45
2.3.2. Genese und Produktion von Antikörpern	46
2.3.2.1. Immunogen	47
2.3.2.2. Polyklonale Antikörper	48
2.3.2.3. Monoklonale Antikörper	48
2.4. Immunoassays	50
2.4.1. Theoretische Grundlagen	51
2.4.1.1. Theoretische Grundlagen nicht-kompetitiver Immunoassays	52

2.4.1.2.	Theoretische Grundlagen kompetitiver Immunoassays	53
2.4.2.	Labels	57
2.4.2.1.	Radionuklide	57
2.4.2.2.	Lumineszenz	57
2.4.2.3.	Enzyme	59
2.4.2.4.	Optische Methoden	61
2.4.3.	Durchführung des kompetitiven Immunoassays	64
2.4.4.	Durchführung des nicht-kompetitiven Immunoassays	68
2.4.5.	Auswertung von Immunoassays	69
2.4.6.	Enzymimmunoassays für die Analytik von Triazinherbiziden	70
2.4.6.1.	Antikörper für die Analytik von Triazinen	70
2.4.6.2.	Enzymtracer für die Analytik von Triazinen	72
2.4.7.	Immunfiltration	73
2.5.	Methodenvalidierung	76
2.5.1.	Genauigkeit	77
2.5.1.1.	Richtigkeit	77
2.5.1.2.	Präzision	78
2.5.2.	Spezifität und Selektivität	80
2.5.3.	Sensitivität	80
2.5.3.1.	Nachweisgrenze	81
2.5.3.2.	Quantifizierungsgrenze (Bestimmungsgrenze)	82
2.5.4.	Linearität und Arbeitsbereich	82
2.5.5.	Robustheit	83
3.	Validierung eines Enzymimmunoassays und Entwicklung von Standardmaterialien für die Analytik freier und gebundener Triazinrückstände	84
3.1.	Validierung des Enzymimmunoassays mit pAb AS46 (AP1)	86
3.1.1.	Genauigkeit des Enzymimmunoassays	86
3.1.1.1.	Genauigkeit des Enzymimmunoassays in matrixfreier Lösung	87
3.1.1.2.	Genauigkeit des Enzymimmunoassays in Trinkwasser	88
3.1.1.3.	Genauigkeit des Enzymimmunoassays in Oberflächenwasser	89
3.1.2.	Sensitivität des Enzymimmunoassays	89
3.1.2.1.	Quantifizierungsgrenze und Arbeitsbereich des Enzymimmunoassays	90
3.1.2.2.	Nachweisgrenze des Enzymimmunoassays	90
3.1.2.3.	IC ₅₀ -Wert des Enzymimmunoassays	91
3.1.3.	Spezifität des Enzymimmunoassays	92
3.1.3.1.	Kreuzreaktion mit Triazinherbiziden und Metaboliten	92
3.1.3.2.	Kreuzreaktion mit Huminstoffen	95
3.1.4.	Robustheit des Enzymimmunoassays	96
3.1.4.1.	Präzision von Serie zu Serie	96
3.1.4.2.	Vergleichspräzision	97
3.1.4.3.	pH-Einfluß auf die Genauigkeit des Enzymimmunoassays	99
3.1.4.4.	Auswirkung von Inkubationszeiten	100
3.1.4.5.	Stabilität nach Stoppreaktion	101

3.2. Untersuchung aquatischer Proben der Oder (AP 2)	103
3.2.1. Triazinbelastung der oberen und mittleren Oder (PN 06/99)	104
3.2.2. Triazinbelastung der Oder (PN 05/00)	105
3.2.3. Triazinbelastung der Warthe (PN 05/00)	107
3.2.4. Interne Validierung durch Aufstockungs- und Verdünnungsreihe	108
3.2.5. Feldstudie mit Immunfiltration	108
3.2.6. Bestimmung von Triazinen durch GC/MS	110
3.2.7. Triazinbelastung der Oder (PN 10/00)	112
3.3. Entwicklung von Standardmaterialien für die Detektion von gebundenen Triazinrückständen (AP 3)	114
3.3.1. „Inkubationsstrategie“	115
3.3.1.1. Auswahl der synthetischen Modellsubstanzen und aquatischen Huminstoffe	115
3.3.1.2. Ansatz von Inkubationslösungen	115
3.3.1.3. Festphasenextraktion	116
3.3.1.3.1. Prüfung der Huminstoffwiederfindung	118
3.3.1.3.2. Prüfung der Durchlaufkapazität und des Elutionsmittels	120
3.3.1.3.3. Zusammenfassung der experimentellen Bedingungen	123
3.3.1.4. Analyse durch Enzymimmunoassay	125
3.3.1.4.1. Untersuchung der Störeffekte durch Huminstoffe	126
3.3.1.4.2. Quantifizierung gebundener Rückstände durch Enzymimmunoassay	127
3.3.2. „Direktpolymerisationsstrategie“	131
3.3.2.1. Durchführung der „Direktpolymerisation“	131
3.3.2.2. Charakterisierung der Modellsubstanzen HS100A und HS100T	132
3.3.2.3. Bestimmung der gebundenen Rückstände durch kompetitiven Enzymimmunoassay	133
3.3.2.3.1. Einstellung des kompetitiven ELISAs mit mAb K4E7	133
3.3.2.3.2. Quantifizierung durch kompetitiven Enzymimmunoassay ohne Inhibition der Huminstoffbindung	138
3.3.2.3.3. Quantifizierung durch kompetitiven Enzymimmunoassay mit Inhibition der Huminstoffbindung	140
3.3.3. „Monomerenstrategie“	143
3.3.3.1. Synthese des Monomers „N-Diol“ 1	144
3.3.3.2. Synthese des Monomers „Cl-Diol“ 2	149
3.3.3.3. Synthese und Charakterisierung triazinbeladener Modellsubstanzen	152
3.3.3.4. ELISA-Analyse von Triazinmonomeren und Modellsubstanzen	155
3.3.3.4.1. ELISA-Analyse von Triazinmonomeren	155
3.3.3.4.2. ELISA-Analyse von Triazinbeladenen Modellsubstanzen	157
4. Diskussion	159
4.1. Analytik freier Triazine	159
4.1.1. Bewertung der Validierungsleitlinie	159
4.1.2. Bewertung des aquatischen Oderflusssystems	163
4.1.3. Leistungsfähigkeit der Immunfiltration	168
4.2. Analytik Huminstoff-gebundener Triazinherbizide	169
4.2.1. Bewertung der „Inkubationsstrategie“	169

4.2.1.1.	Berechnung der gebundenen Triazinrückstände	170
4.2.1.2.	Berechnung der gebundenen Atrazinrückstände	170
4.2.1.3.	Berechnung der gebundenen Terbutylazinrückstände	174
4.2.1.4.	Zusammenführung der Ergebnisse	174
4.2.2.	Bewertung der „Direktpolymerisationsstrategie“	177
4.2.2.1.	Quantifizierung der gebundenen Rückstände durch Elementaranalyse	177
4.2.2.2.	Berechnung gebundener Rückstände durch Enzymimmunoassay	178
4.2.2.3.	Zusammenführung der Ergebnisse	183
4.2.3.	Bewertung der „Monomerenstrategie“	185
4.2.3.1.	Quantifizierung gebundener Rückstände durch Elementaranalyse	185
4.2.3.2.	Quantifizierung gebundener Rückstände durch Enzymimmunoassay	186
4.2.3.3.	Zusammenführung der Ergebnisse	189
4.2.4.	Übergeordnete Bewertung der Kalibrationsmaterialien für gebundene Triazine	191
4.2.5.	Bewertung des Enzymimmunoassays für die Analytik gebundener Triazine	193
4.3.	Ausblick	196
5.	Experimenteller Teil	197
5.1.	Verwendetes Material	197
5.1.1.	Geräte	197
5.1.2.	Antikörper	197
5.1.3.	Enzymtracer	198
5.1.4.	Chemikalien	198
5.1.5.	Standardsubstanzen	199
5.1.6.	Verbrauchsmaterialien	199
5.2.	Reinigung der Glasgeräte	200
5.3.	Probennahme, -lagerung und Feldstudien Immunfiltration	200
5.4.	Arbeitsvorschriften	200
5.4.1.	Enzymimmunoassays	200
5.4.1.1.	Darstellung des Enzymtracers ET2d („Isopropyltracer“)	200
5.4.1.2.	Ansatz von Puffern und Lösungen	201
5.4.1.2.1.	Carbonatpuffer	201
5.4.1.2.2.	Phosphatpuffer	201
5.4.1.2.3.	PBS-Waschpufferkonzentrat und PBS-Waschpuffer	201
5.4.1.2.4.	PBS-Substratpuffer A	201
5.4.1.2.5.	Citrat-Substratpuffer B	201
5.4.1.2.6.	Chromogenlösung	202
5.4.1.2.7.	Substrat-Chromogen-Lösung	202
5.4.1.2.8.	Stop-Lösung	202
5.4.1.2.9.	Triazinstandardlösungen	202
5.4.1.2.10.	Pufferlagerung für Enzymimmunoassay	203
5.4.1.3.	Coating der EIA-Platten	203
5.4.1.3.1.	Coating mit Antiserum AS46 und AS47	203
5.4.1.3.2.	Coating mit Antikörper K1F4 und K4E7	203

5.4.1.4.	Enzymtraceransatz	204
5.4.1.5.	Immunreaktion	204
5.4.1.6.	Enzymreaktion	204
5.4.2.	Evaluierung von Substratpufferlösungen	205
5.4.3.	Festphasenextraktion	205
5.4.4.	Darstellung von „Atrazin“ 14	205
5.4.5.	Darstellung von „Cl-Dimethoxy“ 15	206
5.4.6.	Darstellung von „Cl-Ol“ 2	207
5.4.7.	Versuch der Darstellung von „N-Dimethoxy“ 7	207
5.4.8.	Darstellung von „N-Dimethoxy“ 7	208
5.4.9.	Darstellung von „N-Monool“ 11	209
5.4.10.	Darstellung von „N-Diol“ 1	210
5.4.11.	Darstellung von „N-3,4-Dimethoxy“ 17	210
5.4.12.	Synthese von Modellsubstanzen für Huminstoffe aus Hydrochinon	212
5.4.12.1.	Darstellung von HS100 (Modellsubstanz für Huminsäuren)	212
5.4.12.2.	Darstellung von FS101 (Modellsubstanz für Fulvinsäuren)	212
5.4.12.3.	Darstellung von HS100A (Modellsubstanz für Atrazinbeladene Huminsäuren)	213
5.4.12.4.	Darstellung von HS100T (Modellsubstanz für Terbutylazinbeladene Huminsäuren)	213
5.4.13.	Synthese von Modellsubstanzen für Huminstoffe aus p-Benzochinon	213
5.4.13.1.	Darstellung von BQ-125 (Modellsubstanz für Huminsäuren)	213
5.4.13.2.	Darstellung von BQ310A (Modellsubstanz für Atrazinbeladene Huminsäuren)	214
5.4.13.3.	Darstellung von BQ-400A (Modellsubstanz für Atrazinbeladene Huminsäuren)	214
5.5.	Gefahrenhinweise für verwendete Chemikalien	215
6.	Zusammenfassung	223
7.	Literatur	227

Verwendete Abkürzungen

Ab	Antikörper (Antibody)
AEC	Atrazinäquivalentkonzentration
AEIC	Analytical Environmental Immunochemical Consortium
AOAC	Association of Analytical Communities
AS46	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen
BQ125	Modellsubstanz für Huminsäuren aus p-Benzochinon
BQ310A	Modellsubstanz für Huminsäuren aus p-Benzochinon; beladen mit „N-Diol“
BQ400A	Modellsubstanz für Huminsäuren aus p-Benzochinon; beladen mit „Cl-Diol“
BR	Gebundene Rückstände (Bound Residues)
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
CDR	Complementarity-determining regions
Cl-Dimethoxy	2-(2',5'-Dimethoxyphenylamino)-4-Ethylamino-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin
Cl-OI	2-(2',5'-Dihydroxyphenylamino)-4-Ethylamino-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin
CR	Kreuzreaktivität (Cross Reactivity)
DOC	Gelöster organischer Kohlenstoff (Dissolved organic carbon)
ECD	Elektroneneinfang-Detektor (Electron Capture Detection)
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESR	Elektronenspinresonanzspektroskopie
ET	Enzymtracer
FS 2/7-93	Natürliche Fulvinsäure aus dem Hohlohsee im Nordschwarzwald (Quelle: F. Miller, Universität Hamburg)
FS101	Modellsubstanz für Fulvinsäuren aus Hydrochinon
GC	Gaschromatographie
HO13FA	Natürliche Fulvinsäure aus dem Hohlohsee im Nordschwarzwald
HO13HA	Natürliche Huminsäure aus dem Hohlohsee im Nordschwarzwald
HOQ	Obere Quantifizierungsgrenze (High Limit of Quantitation)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HS100	Modellsubstanz für Huminsäuren aus Hydrochinon
HS100A	Modellsubstanz für Huminsäuren aus Hydrochinon; beladen mit gebundenen Atrazinrückständen
HS100T	Modellsubstanz für Huminsäuren aus Hydrochinon; beladen mit gebundenen Terbutylazinrückständen
HTD	Hochtemperaturdestillation
IA	Immunoassay
IC50	Konzentration der 50%igen Signalhemmung
Ig	Immunglobulin mit Unterklassen IgG, IgA, IgM, IgD, IgE
IHSS	International Humic Substances Society
K1F4	Monoklonaler Antikörper aus Maus
K4E7	Monoklonaler Antikörper aus Maus
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
LOD	Nachweisgrenze (Low Limit of Detection)
LOQ	Untere Quantifizierungsgrenze (High Limit of Quantitation)
mAb	Monoklonaler Antikörper
MH	Modellhuminstoff
MS	Massenspektrometrie
MWCO	Molecular Weight Cut Off
N-3,4-Dimethoxy	2-Chlor-4-(3',4'-Dimethoxyphenylamino)-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin
N-Dimethoxy	2-Chlor-4-(2',5'-Dimethoxyphenylamino)-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin
N-Diol	2-Chlor-4-(2',5'-Dihydroxyphenylamino)-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin
NG	Nachweisgrenze
N-Monool	2-Chlor-4-(2'-Methoxy-5'-Hydroxyphenylamino)-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin
NPD	Stickstoff-Phosphor-Detektor (Nitrogen Phosphorus Detection)
OD	Extinktion (Optical Density)

pAb	Polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline)
PN	Probennahme
POD	Meerrettichperoxidase
PSM	Pflanzenschutzmittel
ROS	Refraktäre organische Säuren
RP	Umkehrphase (Reversed Phase)
RT	Raumtemperatur
SFE	Extraktion mit überkritischen Fluiden (Supercritical Fluid Extraction)
SPE	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)
TEC	Terbutylazinäquivalentkonzentration
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
VB	Vertrauensbereich
XAD	Typ nicht-ionischer makroporöser Harze

1. Einleitung und Problemstellung

Wie für jedes Lebewesen ist die ausreichende Nahrungsversorgung ein Grundbedürfnis des Menschen. Um den eigenen Nahrungsbedarf zu decken, ist er daher schon früh dazu übergegangen, Nutzpflanzen zu kultivieren. Jedoch ist der Pflanzenbau ständig bedroht von verschiedenen Faktoren, die den Ertrag mindern oder gar vollständig aufzehren können. Hungersnöte, wie sie auch heute noch in ärmeren Ländern der Welt auftreten, sind die Folge. Wichtige äußere Faktoren stellen beispielsweise Pilze und Insekten dar, die die Pflanzen befallen und die Ernte beeinträchtigen können. Ganz besondere Aufmerksamkeit widmet man unerwünschten Pflanzenpopulationen, allgemein als „Unkräuter“ bezeichnet, da sie mit den Nutzpflanzen in Konkurrenz treten und zu einer reduzierten Versorgung mit Wasser und Mineralstoffen beitragen. Um dieser Unkräuter Herr zu werden, setzt man im modernen, integrierten Pflanzenbau unter anderem Herbizide ein. Triazinderivate wie Atrazin oder Terbutylazin nehmen in dieser Hinsicht als Pflanzenschutzmittel (PSM) eine bedeutsame Stellung ein und sind geeignet, bestimmte Kulturpflanzen wie Mais oder Zuckerrohr vor und nach dem Auflauf von Unkräutern zu schützen.

Neben dieser gewollten Hauptwirkung führte das großflächige Auftragen von PSM zur einer deutlichen Belastung der terrestrischen, atmosphärischen und aquatischen Ökosysteme. Damit wurden PSM neben anderen Xenobiotika zu einer Bedrohung für ein weiteres Grundbedürfnis des Menschen, nämlich die Versorgung mit sauberem Wasser.

Detaillierte Evaluierung der Belastungssituation von Ökosystemen mit PSM setzen entsprechend geeignete Analysenverfahren voraus. Als Analysenmethoden zur Untersuchung von Triazinherbiziden kommen beispielsweise Methoden der instrumentellen Analytik in Frage. In letzter Zeit wurden jedoch auch verstärkt immunochemische Methoden wie Enzymimmunoassays aufgrund ihrer ausgesprochenen Spezifität und Sensitivität für die Analytik von PSM und Umweltschadstoffen entwickelt.

Aufgabe dieser Arbeit ist die Prüfung des aquatischen Oberflächensystems auf seine Belastung mit Triazinen mit Hilfe eines Enzymimmunoassays. Erstaunlicherweise existieren bislang keine verbindlichen Leitlinien zur Validierung von Immunossays, was die Beurteilung und den Vergleich erzielter Ergebnisse erschwert. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es daher, den vorliegenden Enzymimmunoassay im Zuge einer Qualitätssicherung auf seine Eignung für die gewünschte Fragestellung zu prüfen. Dazu sollen die zu gewinnenden Ergebnisse einer strengen Validierung unterzogen werden.

Der Eintrag von Triazinen in Ökosysteme führt zur Wechselwirkung mit terrestrischen und aquatischen Huminstoffen, ubiquitären Makromolekülen mit polydisperser Struktur, die aus

dem Abbau pflanzlichen Materials hervorgehen. Huminstoffe können PSM-Moleküle binden. Hierdurch entstehen als Langzeithypothek nicht-extrahierbare Rückstände mit der Folge, dass die tatsächliche PSM-Belastung oftmals unterschätzt wird, da die gebundenen PSM-Rückstände durch die klassische PSM-Analytik nicht erfasst werden.

Bislang gibt es nur wenige Methoden, die geeignet sind, derartige nicht-extrahierbare Rückstände zu erfassen. Enzymimmunoassays sind prinzipiell auch zur Quantifizierung dieser Rückstände geeignet, die Entwicklung derartiger Methoden setzt jedoch das Vorhandensein von geeigneten Standardmaterialien zur Kalibration der Verfahren voraus. Ziel dieser Arbeit ist daher auch die Synthese und Charakterisierung neuartiger Modelle für Huminstoffgebundene Triazinrückstände und die analytische Erfassung der darin enthaltenen Triazinanteile.

2. Literaturteil

Die verschiedenen Kompartimente eines Ökosystems werden durch eine große Anzahl von vornehmlich anthropogen eingetragenen Substanzen belastet. Triazinherbizide, die zu den PSM gerechnet werden, tragen dazu in beträchtlichen Umfang bei. Durch Exponierung kommen sie mit den ubiquitären terrestrischen und aquatischen Huminstoffen in Kontakt und bilden u.a. nicht extrahierbare Rückstände, deren Untersuchung die Etablierung von neuen Analysenmethoden erfordert. Enzymimmunoassays mit verschiedenen Antikörpern können, nach Validierung entsprechender Methoden, hierzu einen Beitrag leisten.

2.1. Triazin-Herbizide

Seit der Mensch dazu übergegangen ist, bestimmte Pflanzen für seine Ernährung oder andere Bedürfnisse anzubauen, muß er sich mit dem Problem des Schutzes dieser Kulturpflanzen vor Tieren und Pilzen als Schaderregern beschäftigen. Dazu zählt auch die Eindämmung der Ertragsverluste durch Unkrautkonkurrenz. Als Unkräuter werden jene Pflanzen definiert, die an Orten wachsen, wo sie unerwünscht sind, und deren Schaden größer als ihr Nutzen ist (Schadpflanzen). In breiterem Sinne sind unter Unkräutern nicht nur krautartige höhere Pflanzen zu verstehen, sondern auch Gräser, Schachtelhalme, Farne, Moose und Algen. Auch parasitierende Pflanzen gehören dazu [1]. Die Schadpflanzen konkurrieren mit den Kulturpflanzen um Wasser, Licht, Nährstoffe und Lebensraum und verringern dadurch in nicht unerheblichen Maße die Flächenerträge. So benötigt z.B. der Ackersenf im Vergleich zum Hafer das Doppelte an Stickstoff und Phosphor und das Vierfache an Kalium und Wasser [2].

Der Schutz der Kulturpflanzen kann durch eine Kombination von Verfahren erreicht werden, zu denen anbau- und kulturtechnische, pflanzenzüchterische sowie physikalische, mechanische und biologische Maßnahmen ebenso gehören wie chemische. Im modernen System des „Integrierten Pflanzenbaus“ ist der Einsatz chemischer Pflanzenschutzmittel ein integraler Bestandteil bei der Produktion gesunder Pflanzen [1].

Unter den eingesetzten Pflanzenschutzmitteln nehmen Herbizide eine dominante Rolle ein. Der Name Herbizid leitet sich vom Lateinischen ab (lat. Herba=Kraut, caedere=töten). Es handelt sich bei ihnen um Mittel zur Bekämpfung von Unkräutern. Eine bedeutende Klasse von Herbiziden stellen die Triazine dar. Die Historie ihrer Verwendung als Totalherbizid beginnt im Jahre 1952, als J.R. Geigy die ersten Triazinderivate synthetisierte. Seit dieser Zeit hat sich eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen Triazinen herausgebildet [3]. Die Geschichte der Entdeckung der Triazine als Herbizide wird von H. Gysin beschrieben [4].

Atrazin und Terbutylazin sind wichtige Vertreter. Atrazin findet als Totalherbizid und selektives Herbizid gegen annuelle Gräser und breitblättrige Unkräuter Anwendung. Es wird eingesetzt in Mais-, Spargel-, Bananen-, Ananas-, Zuckerrohr- und Weinkulturen. Die Substanz ist aber phytotoxisch für viele Kulturpflanzen; dazu gehören verschiedene Gemüse, Kartoffeln, Sojabohnen und Erdnüsse [5, 6, 7]. Terbutylazin stellt ein über die Wurzeln wirksames Totalherbizid dar, das selektiv in Mais und Sorghum gegen Gräser und Unkräuter wirkt. In Kombination mit anderen Herbiziden ist es auch für Kartoffeln, Getreide, Obst und im Weinbau geeignet [8].

2.1.1. Physikalische und chemische Eigenschaften

Der größte Teil der Triazinherbizide leitet sich vom s-Triazin, einem Benzolkern mit drei symmetrisch angeordneten Stickstoffatomen ab, der an den Positionen 2, 4 und 6 substituiert ist. In Abbildung 1 sind die Strukturformeln von Atrazin und Terbutylazin dargestellt. Dies sind die Trivialnamen für 2-Chlor-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazin, sowie das 2-Chlor-4-ethylamino-6-tert-butyl-amino-1,3,5-triazin.

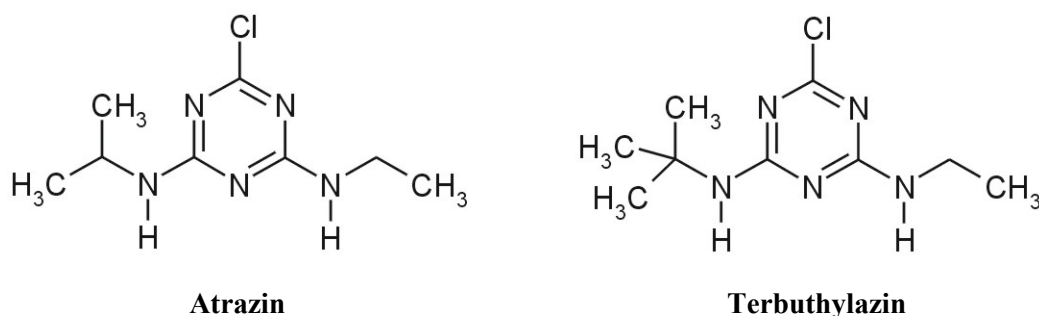


Abbildung 1: Strukturformeln der Triazinherbizide Atrazin und Terbutylazin

Das unsubstituierte s-Triazin weist eine gewisse Ähnlichkeit zu Benzol auf, jedoch ist seine Stabilität insgesamt niedriger, da das delokalisierte π -Elektronensystem des Benzols durch die Einführung von Stickstoffatomen an den Positionen 1, 3 und 5 gestört ist. Der Grund hierfür ist aufgrund der größeren Elektronegativität des Stickstoffs in einer Erhöhung der Elektronendichte an den Stickstoffpositionen und einer entsprechenden Elektronendichtenerniedrigung an den Positionen 2, 4 und 6 zu finden. Nukleophile Substitutionen an den Kohlenstoffpositionen werden dadurch erleichtert. Trotzdem ist die kinetische Persistenz der s-Triazine relativ groß [9].

Die Triazinherbizide Atrazin und Terbutylazin sind unter Normalbedingungen Feststoffe, die wenig wasserlöslich sind. Einige ausgewählte physikalische und chemische Eigenschaften für Atrazin und Terbutylazin sind in Tabelle 1 aufgeführt [10, 11].

Tabelle 1: Einige ausgewählte physikalische und chemische Eigenschaften der Triazinherbizide Atrazin und Terbuthylazin [9, 10, 11]

	Atrazin	Terbuthylazin
Chem. Summenformel	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	C ₉ H ₁₆ ClN ₅
CAS-Registry-Nummer	1912-24-9	5915-41-3
Physikalische Beschaffenheit	Kristallin, farblos	Weißes Pulver, geringer, unspez. Geruch
Molgewicht	215,69 g/mol	229,72 g/mol
Wasserlöslichkeit (25°C)	33 – 45 mg/L	8,5 mg/L
Dichte	Ca. 1,2 g/cm ³	1,19 g/cm ³
Schmelzpunkt	176°C	177 – 179°C
Siedepunkt	Nicht destillierbar	k.A.
Dampfdruck (20°C)	4 * 10 ⁻⁷ mbar	1,5 * 10 ⁻⁶ mbar
n-Octanol/Wasser-Vert. (log P _{ow})	2,64	3,21 (bei 25°C)
Säurekonstante pK _a	1,68	1,94
Adsorbierbarkeit (K _{OC})	145	k.A.
Henry-Koeffizient (20°C)	5 * 10 ⁻⁷	k.A.
Stabilität	Stabil in neutralem, schwach saurem und schwach alkalischem Medium	Hydrolysehalbwertszeit: 8 Tage (pH 1), 86 Tage (pH 5), >200 Tage (pH 7), 12 Tage (pH 13)

2.1.2. Verhalten in der Umwelt

Durch Applikation in der Landwirtschaft werden PSM direkt in die Umwelt eingetragen und stellen damit eine potentielle Kontaminationsgefahr für die Umgebung dar. Tatsächlich tragen sie zur Belastung von Grundwasser, Oberflächengewässern, Regenwasser und Böden bei [12, 13]. Für wasserwirtschaftliche Belange problematisch sind grundsätzlich alle Pestizide*, die ins Grundwasser, in oberirdische Binnengewässer (Flüsse, Seen) und in die Meeresumwelt gelangen. Entsprechend der Vielfalt der Anwendungs- und Wirkmöglichkeiten in der Landwirtschaft gibt es eine entsprechende Vielfalt von akuten und chronischen Wirkungen auf die aquatischen Lebensgemeinschaften, wenn Pestizide in zu hoher Konzentration in den Gewässern auftreten. Einzelne Pestizide können sich zudem in Fischen und somit in der Nahrungskette anreichern. Im Trinkwasser sollen generell keine Pestizide auftreten [12].

Daher wurde in einer Novellierung der Trinkwasserverordnung ab dem 1. Oktober 1986 ein Grenzwert für „Chemische Stoffe zur Pflanzenbehandlung und Schädlingsbekämpfung einschließlich toxischer Hauptabbauprodukte“ eingeführt, der mit 0,1 µg/L für die Einzelsubstanz und 0,5 µg/L für die Summe dieser Stoffe (zusammen mit Polychlorierten Biphenylen (PCBs) und Polychlorierten Terphenylen (PCTs)) festgeschrieben ist. Damit wurde eine am 15. Juli 1980 in der Richtlinie „Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch“ von der Euro-

* Dieser Begriff umfaßt Pflanzenschutzmittel und andere biozide Wirkstoffe

päischen Gemeinschaft festgelegte Regelung in bundesdeutsches Recht übernommen. Der Grenzwert von $0,1\mu\text{g/L}$ wurde willkürlich so niedrig festgelegt, um keine Gefährdung für die menschliche Gesundheit beim Verbrauch von Trinkwasser befürchten zu müssen („Besorgnisgrundsatz“). Er beruht nicht auf toxikologischen Untersuchungen, wie dies z.B. für die Health Advisory Levels (HAL) für Grund- und Trinkwasser in den USA der Fall ist [14, 15]. Die Weltgesundheitsorganisation legte den Atrazin-Grenzwert in Grund- und Trinkwasser mit $2\mu\text{g/L}$ fest. Am 01. Januar 2003 tritt eine neue Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch in Kraft. Für PSM und Biozidprodukte bleiben die Grenzwerte $0,1\mu\text{g/L}$ für die Einzelsubstanz und $0,5\mu\text{g/L}$ für die Gesamtmenge weiterhin erhalten [16].

Selbst zehn Jahre nach Inkrafttreten der Verordnung zum 1. Oktober 1989 gibt es in der Bundesrepublik Deutschland noch keinen flächendeckenden Überblick über die Einhaltung dieses Parameters. Zwar liegen bereits eine Reihe von Überlegungen und Handlungsvorschlägen vor, was bei einer Überschreitung dieses Parameters im Trinkwasser zu unternehmen ist und wie solche Überschreitungen gesundheitlich zu bewerten sind, ein geschlossenes Konzept für die vorsorgliche Abwehr von Pflanzenschutzmittel-Kontaminationen des Trinkwassers besteht jedoch noch nicht [17].

Das Pflanzenschutzrecht hat in Deutschland bereits zu einer wesentlichen Verschärfung der Zulassungs- und Anwendungsbestimmungen für Pflanzenschutzmittel geführt. Aufgrund dieser verstärkten Anforderungen wurden 1991 u.a. verschiedene Mittel mit den Wirkstoffen Atrazin, Simazin und Propazin verboten, während der Wirkstoff Terbuthylazin weiterhin zugelassen ist. [18, 19] Die Pflanzenvertilgungsmittel sind zwar alle wenig säugertoxisch, aber trotzdem als umweltschädlich einzustufen, da sie indifferente Pflanzen und bodenlebende Tiere vernichten. [20]

2.1.2.1. Transport und Verlagerung in der Umwelt

Nicht die gesamte applizierte PSM-Menge erreicht ihr eigentliches Ziel, nämlich Boden und Pflanze. Ein Teil der ausgebrachten Wirkstoffmenge wird über verschiedene Transportwege in der Umwelt verlagert. Abbildung 2 gibt die verschiedenen Verlagerungspfade der PSM in der Umwelt wieder.

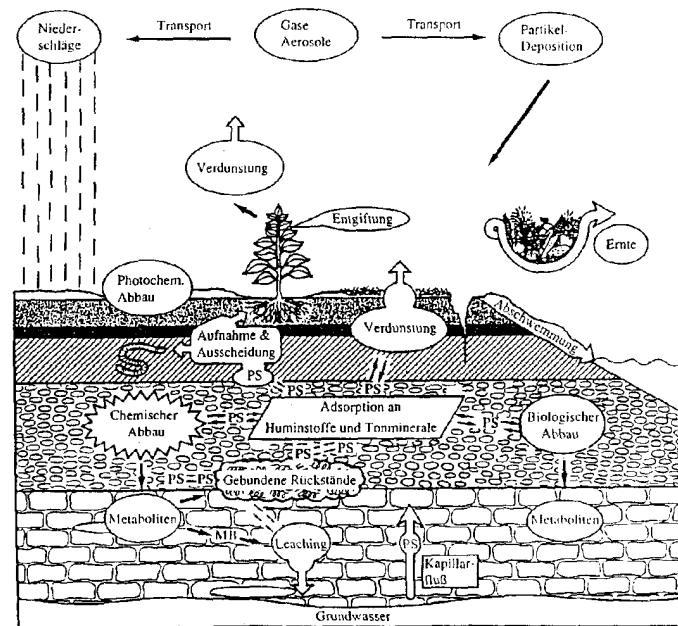


Abbildung 2: Transportpfade der Pflanzenschutzmittel in der Umwelt [21, 22]
(PS=Pflanzenschutzmittel; MB= Metaboliten)

Triazin-Herbizide verteilen sich in den vier Kompartimenten Pflanzen, Boden, Wasser und Luft. Sie können von der Bodenoberfläche durch Verdunstung oder als Aerosole mit dem Wind verdriftet werden. Durch Abschwemmung von Bodenmaterial erfolgt ein horizontaler Transport in Oberflächengewässer. Vertikaler Transport von Porenwässern führt zum Leaching ins Grundwasser. Im Boden selbst wird ein Teil der Pestizide durch chemische und biologische Prozesse metabolisiert, in den obersten Bodenschichten kann in geringem Ausmaß ein photochemischer Abbau erfolgen. Im Boden vorliegende Pflanzenschutzmittel binden außerdem an organische Bodenbestandteile wie die terrestrischen Huminstoffe sowie an Tonminerale. Ein Teil dieser adsorbierten Pestizide ist nach einiger Zeit nicht mehr desorbierbar. Sie werden als gebundene Rückstände bezeichnet [22, 23].

2.1.2.2. Metabolisierung und Biotransformation in Pflanzen

Die Resistenz von bestimmten Kulturpflanzen beruht auf ihrer Fähigkeit zur raschen Metabolisierung der PSM zu weniger phytotoxischen Substanzen. Der Metabolismus von Xenobiotika in Pflanzen wird allgemein in drei Phasen eingeteilt. In Phase I kommt es durch Funktionalisierungsreaktionen zu Veränderungen der Xenobiotikamoleküle selbst. Zu diesen Primärreaktionen zählen Hydrolyse, Oxidation und Reduktion. In der anschließenden Phase II werden die in der Phase I entstandenen Metabolite oder in geeigneten Fällen auch die originären Substanzen (zusammengefasst unter dem Begriff Exocons) über ihre freien Carboxylat-, Hydroxy-, Thiol- oder Amin-Funktionen mit endogenen Verbindungen (Endocons) konjugiert. Zur Phase III wird in der Pflanze die Speicherung von Konjugaten und die Bildung gebundener

Rückstände gerechnet [7]. Vier generelle Transformationen kennzeichnen den pflanzlichen Metabolismus von Triazinen:

- Phase I: N-Dealkylierung
- Phase I: Hydrolytische Dehalogenierung
- Phase II: Konjugation an Glutathion
- Phase III: Bildung von gebundenen Rückständen

Die beschriebenen Metabolisierungspfade sind interaktiv, sie können nacheinander in verschiedenen Kombinationen ablaufen. So kann beispielsweise ein dehalogenerter Phase-I-Metabolit einer N-Dealkylierung unterworfen werden [24].

Abbildung 3 gibt eine Übersicht über Metabolisierungswege des Atrazin.

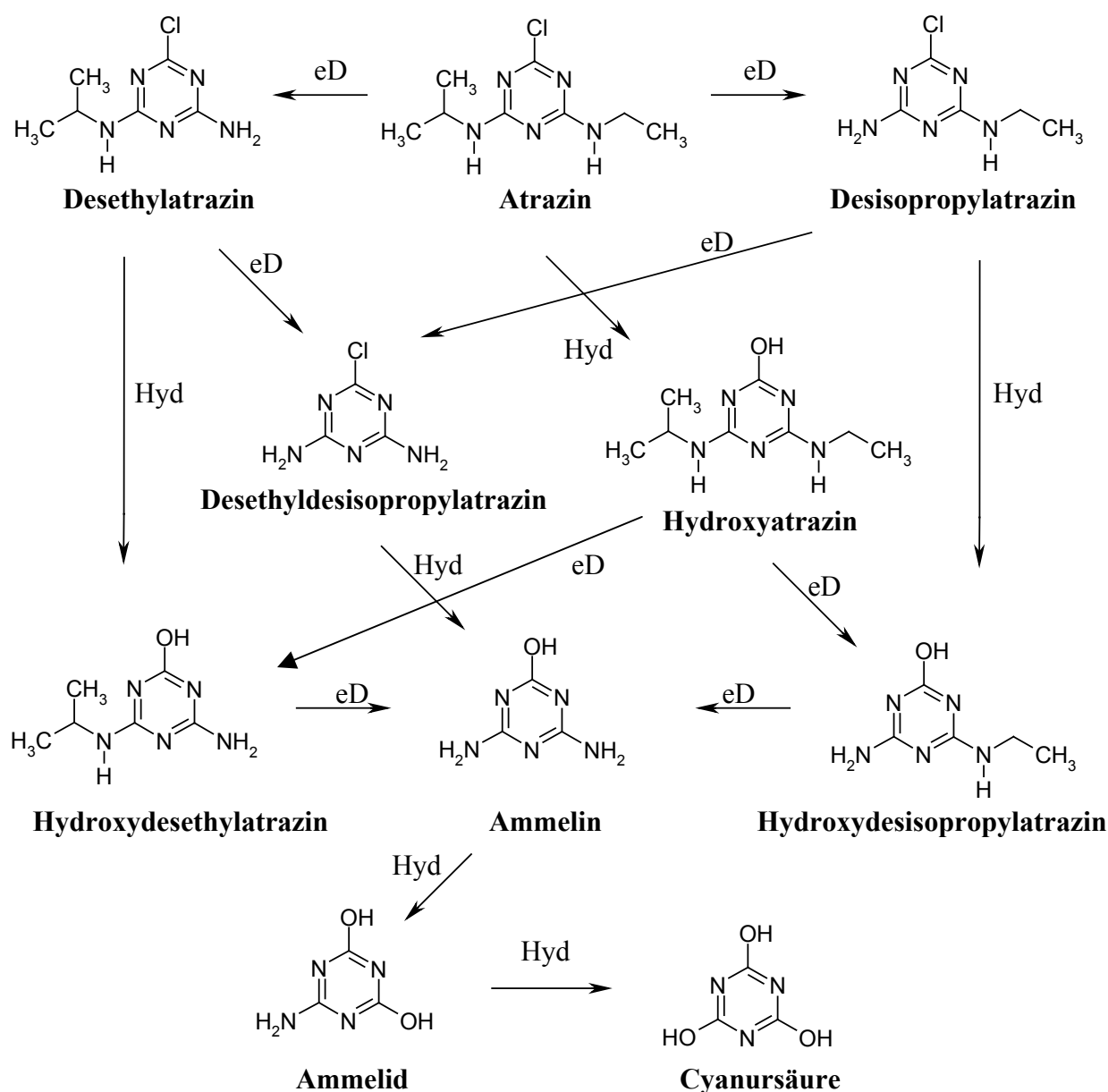


Abbildung 3: Phase-I-Atrazinmetaboliten (*eD*: enzym. Dealkylierung; *Hyd*: Hydrolyse) [24]

Ein wichtiger Metabolisierungspfad ist die enzymatische Dealkylierung an den Amin-Funktionen. Dieser Prozeß läuft in vielen Kulturpflanzen ab, z.B. Mais, Mohrenhirse, Baumwolle, Sojabohne, Weizen, Zuckerrohr und Zitrusfrüchten [25, 26, 27, 28]. Es wurde gezeigt, dass bei Erbsen und Mohrenhirse die N-Dealkylierung bevorzugt an der Seite mit der Ethylseitenkette abläuft. Die Konzentration von Desethylatrazin kann hier doppelt so hoch sein wie die von Desisopropylatrazin oder Atrazin selbst [26]. Die N-Dealkylierung läuft bei anfälligen Spezies primär zum mono-desalkylierten Metaboliten, bei toleranten Kulturpflanzen treten die bis-desalkylierten Metaboliten stärker auf [24]. Die Enzyme, die für die N-Dealkylierung der s-Triazine verantwortlich sind, wurden bislang nicht intensiv studiert, aber es scheint sich hierbei um Cytochrom P450 Monooxygenasen zu handeln, die auch die N-Dealkylierung von Methylharnstoffherbiziden katalysieren [29].

Daneben spielt die Hydroxylierung eine wichtige Rolle. Sie resultiert in einem Verlust der phytotoxischen Eigenschaften und wird als Detoxifikationsprozeß betrachtet. Die Reaktion verläuft in Pflanzen nicht enzymatisch und wird chemisch durch die endogene Substanz 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-on katalysiert [24].

Neben der Bildung von Phase-I-Metaboliten können auch Konjugationsreaktionen am Atrazin ablaufen. Diese Phase-II-Reaktionen laufen vor allem in toleranten Pflanzen wie Mais, Sorghum und Zuckerrohr ab. Grundlage hierfür ist die enzymatische Kopplung von Atrazin an endogene Tripeptide wie Glutathion (Primärstruktur: Glu-Cys-Gly) oder Homoglutathion (Primärstruktur: Glu-Cys-Ala). Die enzymatische Substitutionsreaktion wird durch Glutathion-S-Transferase katalysiert, wobei die Thiolgruppe unter formaler Abspaltung von HCl an das Exocon gebunden wird (Abbildung 4).

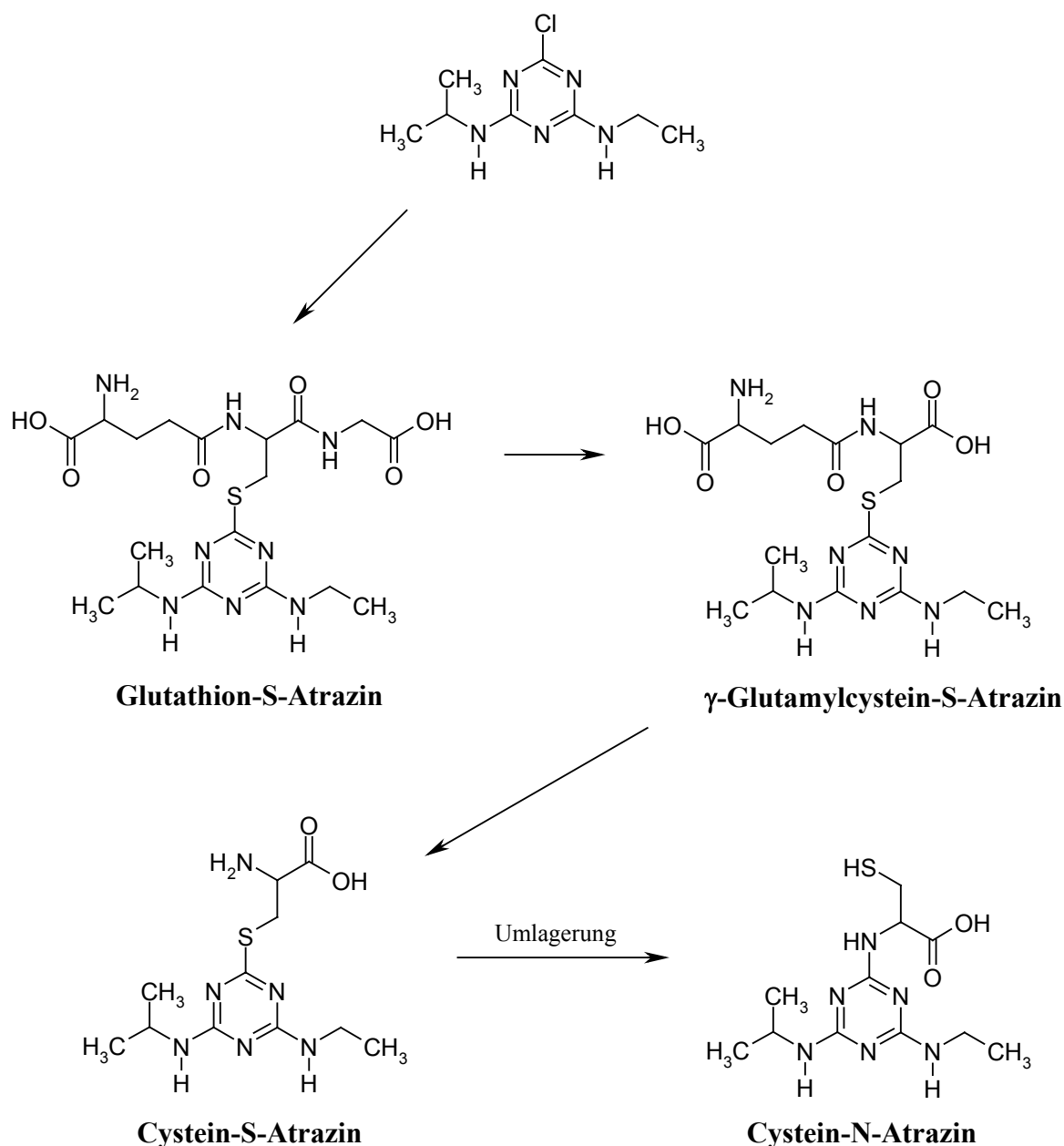


Abbildung 4: Phase-II-Metaboliten des Atrazins

Nach Konjugation des Atrazins an das Glutathion wird durch weiteren enzymatischen Abbau mit Peptidasen das Cystein-S-Atrazin gebildet. Der Metabolismus von 2-Chlor-s-Triazinen durch die Glutathion-Umwandlung ist relativ komplex, da nicht nur das Atrazin, sondern auch Phase-I-Metabolite wie Desethylatrazin umgesetzt werden können, und ferner Umlagerungsreaktionen ablaufen, die wieder eigene Metabolisierungspfade mit sich bringen. Ein Beispiel hierfür ist die Umsetzung des Cystein-S-Atrazin zum Cystein-N-Atrazin [24].

Gebundene Rückstände tragen stets zu einer hohen Prozentzahl der Gesamtrückstandsmenge in Pflanzen bei, die mit s-Trazinen behandelt worden sind. Obwohl der Glutathion-Mechanismus die Bildung gebundener Rückstände ermöglicht, ist der Mechanismus dieser Transformation ungewiss [25, 30]. Gebundene Rückstände werden nämlich auch dann gebil-

det, wenn es sich um Pflanzen handelt, bei denen der Glutathion-Pfad keine wichtige Rolle spielt. Das lässt auf unterschiedliche Mechanismen für die Bildung gebundener Rückstände schließen.

In Böden führt der Abbau von Atrazin über biotische und abiotische Prozesse hauptsächlich zur Bildung von Desalkyl- und Hydroxyatrazin. [22, 31]. Obwohl es bisweilen auch zur Spaltung des Triazinrings durch Mikroorganismen kommt, muß der Triazinring in der Regel als persistent und somit als umweltgefährdend angesehen werden. [32]

2.1.3. Analytik der Triazinherbizide

Proben können nur selten ohne Aufarbeitung direkt vermessen werden. Matrixsubstanzen und niedrige Konzentrationen der Analyten in den zu untersuchenden Proben machen die Anwendung von Aufkonzentrierung, clean-up und Trennschritten nötig. Dieses ist in Abbildung 5 illustriert.

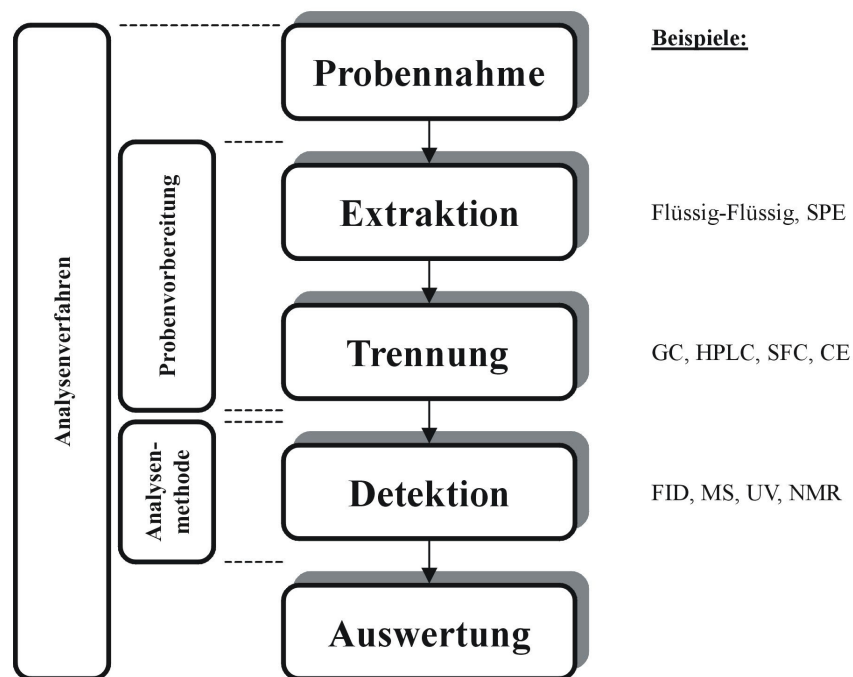


Abbildung 5: Analysenverfahren zur Analytik von Triazinherbiziden

Zunächst erfolgt eine Probennahme, deren Material repräsentativ für die Gesamtheit des zu untersuchenden Analysenobjekts sein muss. Danach wird die Probe einer Probenvorbereitung unterzogen, wobei verschiedene Extraktionsmethoden zur Abtrennung der Matrix und der Analytanreicherung zum Einsatz kommen. Die Trennung erfolgt durch gas-, flüssigchromatographische oder kapillarelektrophoretische Methoden, oftmals direkt gekoppelt mit geeigneten Detektionssystemen.

Daneben erlangen immunochemische Techniken immer mehr an Bedeutung. Für einige spezielle Fragestellungen können auch einfache spektrophotometrische und elektrochemische Detektionsmethoden geeignet sein [9].

2.1.3.1. Aufkonzentrierung der Triazine

Analysen von Triazinen und ihren Rückständen in Wasser, Böden und biologischen Materialien sind für gewöhnlich nur der Teil einer komplexeren Rückstandsanalyse. Die Probenzusammensetzung ist im Allgemeinen komplex, nicht nur hinsichtlich der Hauptkomponenten, sondern auch im Bereich der Spuren- und Ultraspurenkomponenten. Isolierungs- und Aufkonzentrierungsprozeduren sind fast immer notwendig. Die Auswahl der Prozedur richtet sich nach dem Probencharakter, der Anwesenheit verschiedener Spurenkomponenten und der Konzentration der Analyten [9].

Die gebräuchlichsten Techniken in der Wasseranalytik sind die folgenden:

- Flüssig-Flüssig-Extraktion
- Extraktion mit überkritischen Fluiden
- Festphasenextraktion

Diese Techniken werden verschiedentlich mit Trennmethoden kombiniert, die entweder off- oder online geschaltet werden.

Die Selektivität der Extraktionstechniken zeigt eine große Spannbreite. Einige einfache Extraktions- und Adsorptionsprozeduren sind nur wenig selektiv und der Haupteffekt liegt in der Aufkonzentrierung der Analyten. Andererseits können bestimmte modifizierte Adsorbentien und chemisch gebundene stationäre Phasen beachtliche Selektivität zeigen. Im allgemeinen werden störende anorganische Probenkomponenten und organische Makromoleküle während der Extraktionsprozedur entfernt. Die zurückbleibende Mischung ist immer noch komplex und muß weiterhin einer analytischen Trennprozedur unterzogen werden.

Die einzelnen Techniken zur Anreicherung von Triazinen haben ihre spezifischen Vor- und Nachteile, die für die jeweilige Applikation gegeneinander abgewogen werden müssen.

2.1.3.1.1. Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion stellt eine Methode dar, die nur wenig spezielles Equipment benötigt, was sie zu einer häufig angewendeten Methode gemacht hat, einschließlich vieler offizieller Standardverfahren. Daneben weist sie den Vorteil auf, daß eine Vielzahl an Extraktionssystemen verfügbar ist, welche intensiv studiert wurden und sich praktisch bewährt haben. Dennoch weist sie entscheidende Nachteile auf, weswegen sie gegenüber der Festphasenextraktion an Bedeutung verloren hat [33]:

- Die Extraktionsausbeuten sind oft nicht ausreichend und ein weiterer Schritt zur Aufkonzentrierung muß dem Analysenverfahren hinzugefügt werden.
- Die Phasentrennung wird häufig verkompliziert durch die Bildung von Emulsionen.
- Große Volumina an Lösungsmitteln sind vonnöten.
- Die Extraktionsprozedur neigt dazu, langsam und arbeitsintensiv zu sein und ist schwierig zu automatisieren.
- Die Extraktionseffizienzen für die individuellen Triazinderivate unterscheiden sich, was die Quantifizierung verkompliziert.

2.1.3.1.2. Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion (engl.: Solid phase extraction, SPE) stellt eine wichtige Alternative zur Flüssig-Flüssig-Extraktion bei der Anreicherung von Triazinen in wäßrigen Proben dar. Zu ihren Vorteilen zählt die Möglichkeit der Anwendung sehr verdünnter Lösungen, vorausgesetzt, daß ausreichend große Probenmengen vorhanden sind, sowie die leichte Automatisierbarkeit. Ihre Nachteile bestehen in den hohen Kosten für die Einwegfestphasen. Trotzdem hat die SPE eine sehr große Popularität erreicht und wurde in diverse Standardverfahren integriert [34]. Einen Überblick über die Analytik von Pestiziden in Wässern unter Anwendung der SPE bietet G. Font et al. [33].

Die beiden hauptsächlich zugrunde liegenden Mechanismen der Analytretention auf einer festen Phase sind die Adsorption und die Verteilung. Die Adsorption der Analyte erfolgt für gewöhnlich auf Aktivkohle oder auf porösen Polymeren.

Der zweite Mechanismus macht sich die Verteilung der Analyte zwischen der Probenlösung und chemisch oberflächenmodifizierten Materialien der Flüssigchromatographie, wie C18-, C8-, Cyano- und Aminophasen zunutze. Die ersten Versuche, diese Materialien als Anreicherungsmedien einzusetzen, gehen auf das Jahr 1971 zurück [35]. Der Startschuß für diese relativ moderne Technik wird jedoch im Jahr 1978 gesehen, als die Sep-Pak-Kartuschen kommerziell eingeführt wurden (Waters, Milford, MA, USA) [36]. Die am häufigsten eingesetzte Silikagelphase ist jene mit der Octadecylgruppe (C18).

Der Beladung der Festphase mit Analyt folgt ein Desorptionsschritt, der aus der Elution mit Lösungsmitteln oder überkritischem Kohlendioxid oder aus einer thermischen Desorption bestehen kann [33].

Die Festphasenextraktion kann über eine Vielzahl an Parametern variiert werden und ist nicht nur abhängig von den zu untersuchenden Analyten, sondern auch von deren Konzentration und von den Matrixeinflüssen. Daher ist ihre Optimierung auf die speziellen analytischen Fragestellungen unerlässlich, um eine reproduzierbare und hinreichend gute Arbeitsweise zu gewährleisten. Die folgende Aufstellung gibt Parameter wieder, die einen großen Einfluß auf die Effizienz der Festphasenextraktion ausüben [37]:

- Art des Trägermaterials
- Füllmenge des Trägermaterials
- Füllhöhe des Trägermaterials
- Art des verwendeten Elutionsmittels
- Menge des verwendeten Elutionsmittels
- Anreicherungs geschwindigkeit

2.1.3.1.2.1. Festphasen für die Analytik von Triazinherbiziden

Die Sorbentien, die in der SPE eingesetzt werden, sind hochselektiv, und es ist daher wegen großer Unterschiede in der Polarität der Verbindungen unmöglich, die Triazine und ihre Metaboliten in einer einzelnen Kartusche anzureichern. So sind die gemeinhin verwendeten Reversed-phase C18-Materialien geeignet für die Analytik der meisten Triazine, sie weisen allerdings schlechte Wiederfindungen bei den entsprechenden Hydroxymetaboliten auf. [38]

In der Rückstandsanalytik von Pestiziden, speziell der Triazinherbizide Atrazin und Terbutylazin kommt die Festphasenextraktion mit unterschiedlichen Trägermaterialien zum Einsatz. Neben der Adsorption auf Aktivkohle [39, 40] und verschiedenen XAD-Harzen [41, 42, 43] werden besonderes häufig modifizierte Kieselgele aufgrund ihrer hohen Selektivität verwendet. Obwohl vereinzelt auch C8-modifizierte Umkehrphasen (RP: Reversed phase) Verwendung finden [44, 45], ist die am häufigsten eingesetzte Phase die C18-modifizierte Kieselgelphase. [46, 47, 48, 49, 50, 51] Abbildung 6 gibt die chemische Struktur einer RP18-Phase wieder.

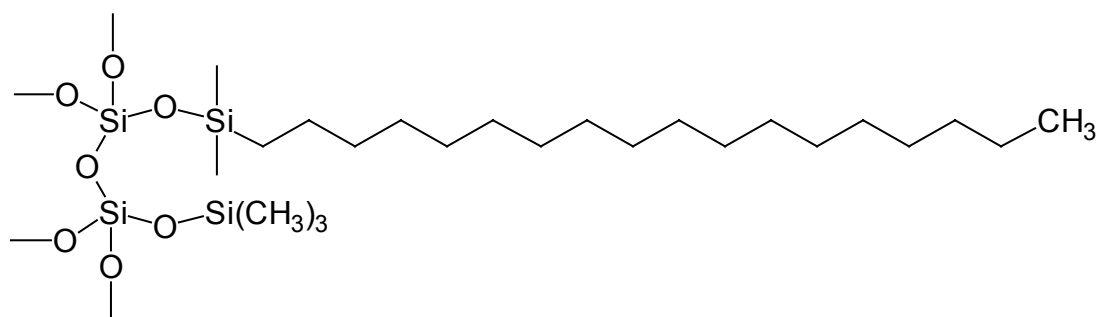


Abbildung 6: Chemische Struktur von C18-modifiziertem Kieselgel, kovalent gebunden an ein Siliciumpartikel

Ein großes Problem bei der Festphasenextraktion mit modifizierten Kieselgelen sind Unterschiede in den Eigenschaften der von verschiedenen Herstellern angebotenen Phasen. Bemerkenswert ist, daß starke Schwankungen in den Wiederfindungen einzelner Verbindungen auch bei identischen Materialien ein und desselben Herstellers festzustellen sind. Ebenso treten Veränderungen in der Selektivität von Phasen gegenüber bestimmten Substanzen auf. Es wird

angenommen, daß sich diese Verschiebungen durch Umstellungen im Produktionsprozeß ergeben. U. Oehmichen et al. [37] haben zur Beurteilung der Qualität der auf dem Markt angebotenen Phasen das Anreicherungsvermögen von verschiedenen C18-Umkehrphasen gegenüber dreißig ausgesuchten Pflanzenschutzmitteln und Metaboliten, darunter Atrazin und Terbutylazin, gegenübergestellt. Unter den dort gewählten Bedingungen* wurde unter anderem die C18-Phase der Fa. Waters mit Wiederfindungsraten von 90% und mehr für die s-Triazinherbizide Atrazin und Terbutylazin als geeignet für deren Analytik bewertet.

2.1.3.1.2.2. Einfluß der Flußrate auf die Effizienz der Festphasenextraktion

Festphasenkartuschen verhalten sich ähnlich wie chromatographische Säulen; Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Effizienz des eingesetzten Trägermaterials und der Flußrate, mit der die Probelösung die Säule passiert. Eine exzessive Flußrate ist eine der häufigsten Ursachen für eine schlechte Wiederfindung von Analyten. Es ist ferner eine der gemeinhin unkontrollierten Variablen in der Festphasenextraktion und findet häufig in Literaturstellen, die dieses Gebiet bearbeiten, gar keine Erwähnung [52]. Eine erhöhte Flußrate verringert die Effizienz der Kartusche, weil die Analyten in der vorliegenden Lösung keine ausreichende Zeit zur Wechselwirkung mit dem Trägermaterial haben und mit der wäßrigen Phase ausgetragen werden. Bei der Anwendung der Festphasenextraktion wird im allgemeinen empfohlen, eine Flußrate von 10mL/min nicht zu überschreiten. Eine weitere Erniedrigung der Flußrate kann in Einzelfällen eine bessere Wiederfindung bewirken [52, 53].

Das folgende Beispiel macht den Einfluß der Flußrate auf die Effizienz der Festphasenextraktion deutlich. P.F. Landrum et al. haben die Reverse-Phase-Trenntechnik dazu verwendet, um die assoziative Bindung von ^{14}C -markierten organischen Kontaminaten (z.B. Benz[a]pyren, Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT)) an Aldrich Huminstoffe in wäßrigen Lösungen zu ermitteln [54]. Die huminstoffgebundene Kontaminante wurde vom frei gelösten Schadstoff durch eine RP-C18-Festphase abgetrennt; Huminstoffgebundene Kontaminanten passierten die Kartusche, während die ungebundenen Kontaminanten in der Säule zurückgehalten wurden. Ihre anfänglichen Versuche, diese Trennung mit der HPLC zu bewerkstelligen, schlugen fehl, da die Variation der Flußraten zwischen 0,5 und 3mL/min zu einer Änderung in der detektierten Menge an gebundenen Schadstoffen führte. Der Betrag von huminstoffassoziiertem Benz[a]pyren nähert sich erst bei Flußraten von 4mL/min asymptotisch einem Maximalwert an (siehe Abbildung 7).

* Elution mit 1mL Ethylacetat; 500mg Trägermaterial; 3mL Füllvolumen; Wasserprobenmenge 1L in Konzentration zwischen 0,1-1µg/L

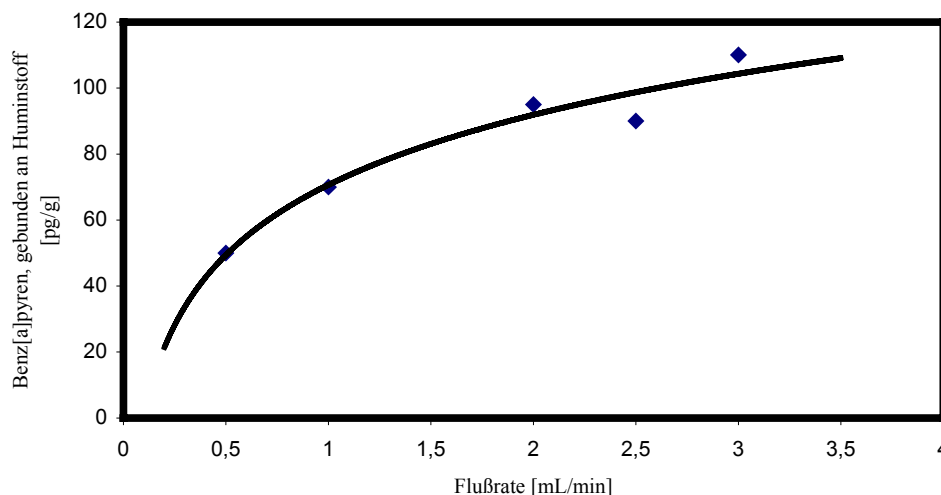


Abbildung 7: Anstieg der huminstoffgebundenen Benz[a]pyrenmenge mit ansteigender Flußrate durch eine 8cm RP-HPLC-Säule (nach [54])

Eine geringe Flußrate und eine relativ lange chromatographische Säule lassen andererseits dem Schadstoff anscheinend ausreichend Zeit, um durch Desorption eine Änderung im Gleichgewichtszustand der Huminstoff-Schadstoff-Bindung herbeizuführen. Die Durchführung der Trennung mittels einer Festphasenextraktion bei Flußraten von etwa 12mL/min führten schließlich zu einer optimalen Kontaktzeit zwischen der Säule und dem Huminstoff-Schadstoff-Komplex, was die potentielle Dissoziation dieses Komplexes minimierte.

2.1.3.1.2.3. Elutionsmittel für die Analytik von Triazinherbiziden

Nach der Anreicherung der Analyten auf der Festphase müssen die retardierten Triazine mit einem geeigneten Lösungsmittel eluiert werden. Seine Auswahl muß nach dem Prinzip: 'Similis similibus solvuntur - Gleiches löst sich in gleichem' so erfolgen, daß die Polarität des Lösungsmittels mit jener des Analyten die höchste Übereinstimmung aufweist.

Diese Übereinstimmung wird vor allem von den beiden für die Analytik von Triazinherbiziden häufig verwendeten Elutionsmitteln Aceton und Ethylacetat erfüllt, die eine vergleichbare Polarität und keine qualitativen Unterschiede bezüglich der Elution der Triazine zeigen [37, 48, 53]. Auch andere Lösungsmittel wie Methanol oder Acetonitril kommen für bestimmte Applikationen zum Einsatz [37, 55].

E.M. Thurman et al. [53] zeigten, daß bereits geringe Mengen an Lösungsmittel ausreichen, um die Triazine quantitativ von der Säule zu eluieren. So wird für Atrazin und Terbutylazin

jeweils eine Wiederfindungsrate von $99 \pm 5\%$ bei der Anwendung von 2mL Ethylacetat als Elutionsmittel angegeben.*

2.1.3.2. Detektion der Triazine

Die Gaschromatographie (GC) und die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) nehmen im Bereich der Trennung von Triazinrückständen eine zentrale Rolle ein. Beide lassen sich mit verschiedenen Detektoren koppeln. Die gekoppelten Systeme weisen recht verschiedene absolute Nachweisgrenzen auf, die in Tabelle 2 aufgeführt sind.

Tabelle 2: Gängige Systeme zur Trennung und Endbestimmung von aufgearbeiteten Extrakten [56]

Trennsystem	Detektor	Typ. Nachweisgrenze	Typ. Menge Probelösung
Kapillar-GC	FID	1000 pg	2 µL
Kapillar-GC	NPD	100 pg	2 µL
Kapillar-GC	ECD	50 pg	2 µL
Kapillar-GC	MS	10 pg	2 µL
HPLC	UV	1000 pg	100 µL
HPLC	Fluoreszenz	10 pg	100 µL

s-Triazine können nach erfolgter Auftrennung durch Kapillar-GC mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) detektiert werden. Ein weitaus sensitiveres und selektiveres Analysensignal wird erhalten, wenn der stickstoff-phosphor-selektive Detektor (NPD: nitrogen-phosphorus detector) eingesetzt wird, da bei Triazinen die Anwesenheit von Stickstoffatomen im zu untersuchenden Analyten gegeben ist. Analoges gilt für den Einsatz des electron capture detectors (ECD). Jedoch ist diesen gekoppelten Systemen das GC/MS-System, d.h. die Kopplung der Gaschromatographie mit einem Massenspektrometer vorzuziehen, da dadurch die Möglichkeit der Identifizierung der Triazine und ihrer Abbauprodukte gegeben ist. Die GC kann aber keine Verbindungen auftrennen, die sich unter ihren experimentellen Bedingungen zersetzen oder die polar und damit nichtflüchtig sind, wie z.B. die Hydroxy-s-triazine. Daher muß in diesen Fällen der Analyt derivatisiert werden. Die HPLC ermöglicht die parallele Bestimmung von nichtpolaren Triazinen und ihren polaren Metaboliten ohne Derivatisierung. Die Auflösung der flüssigchromatographischen Methoden ist jedoch häufig geringer als die der GC [9].

Immunochemische Methoden haben sich als nützliche Screeningmethoden erwiesen. Ihre Ergebnisse korrelieren gut mit denen von anderen, etablierten Methoden wie gekoppelten Sys-

* Die Fehlerangabe gibt die Standardabweichung s wieder, nicht das Vertrauensintervall. Die Wiederfindung wurde ermittelt durch Extraktion von 100mL Probe bei einer Konzentration von $1\mu\text{g/L}$ bei einer Flußrate von 4mL/min.

temen der HPLC oder der GC [9]. Sie können gegenüber diesen Vorteile aufweisen. So lassen sich aquatische Proben häufig ohne aufwendige clean-up-Prozeduren oder Lösungsmittelextraktionsschritte analysieren und die Analyte dabei in sehr niedrigen Konzentrationen im 10ng/L-Bereich, auch in geringen Probenmengen im Millilitermaßstab, detektieren. Außerdem können viele Proben in sehr kurzer Zeit vermessen werden. Konventionelle Methoden wie die GC sind teuer, verbrauchen viel Zeit und benötigen ein gut ausgerüstetes Laboratorium. Enzymimmunoassays sind vergleichsweise kostengünstig, einfach zu handhaben und kommen mit einem minimalen Equipment aus [57]. Die Praktikabilität der EIAs ist jedoch je nach Verfügbarkeit der benötigten Antikörper, die in spezialisierten Labors hergestellt werden müssen eingeschränkt. Einige Beschränkungen sind den EIAs auch dadurch auferlegt, daß sie de facto eine „Single-analyte“-Methode darstellen. Ein weiterer Nachteil ist der relativ kleine lineare Bereich, der sich häufig nur über drei Größenordnungen erstreckt.

2.2. Huminstoffe und refraktäre organische Säuren (ROS)

Der Ausdruck Huminstoff verweist auf höher- bis hochmolekulares organisches Material in der Umwelt, das über den Weg der Zersetzung von abgestorbenen Organismen und einen nachfolgenden „Humifizierungsprozeß“ entsteht. Huminstoffe fallen nicht in irgendeine diskrete Klasse von Verbindungen wie Proteine, Polysaccharide oder Polynucleotide, sondern sind eine polydisperse Substanzklasse. Sie sind ubiquitär, d.h. sie kommen überall auf der Welt vor und werden in Böden und in gelöstem Zustand in aquatischen Systemen gefunden. Obwohl bekannt ist, daß sie aus der Zersetzung von biologischem Gewebe entstehen, ist es noch nicht gelungen, den präzisen biochemischen und chemischen Pfad, über den sie geformt werden, aufzuklären [58, 59].

Huminstoffe werden auch als biogene, refraktäre organische Säuren (ROS) bezeichnet. Als „refraktär“ werden solche organische Stoffe bezeichnet, deren Umwandlungs- oder Abbaugeschwindigkeit im Ökosystem relativ gering ist und die daher in einem gegebenen System eine entsprechend große Verweil- oder Lebensdauer besitzen.

Huminstoffe werden seit über 200 Jahren untersucht. So sind bereits im Jahre 1786 Veröffentlichungen entstanden [60]. Die meisten dieser frühen Studien befassen sich mit Huminstoffen, die aus Böden isoliert wurden, allerdings hat schon im frühen 19. Jahrhundert Berzelius aquatische Huminstoffe untersucht [61]. Seit den frühen 1970ern gab es einen immensen Zuwachs in der Zahl der Veröffentlichungen über aquatische Huminstoffe. Als bedeutsamer Faktor, der zu diesem gesteigerten Interesse an aquatischen Huminstoffen führte, wird der Bericht von Rook im Jahre 1974 bezeichnet. Er wies nach, daß die Chlorierung von natürlichen Gewässersystemen zu der Bildung von Chloroform und anderen potentiell gesundheitsschädigenden chlorierten Kohlenwasserstoffen führt [62]. Das ist insofern von Bedeutung, als die Chlorierung einen der wichtigsten Desinfektionsprozesse in der Behandlung von Wasser und Abfall darstellt und viele chlorierte Chemikalien im Verdacht stehen, Krebs zu erzeugen.

Huminstoffe haben eine heterogene Struktur und besitzen in der Regel eine molare Masse bis zu einigen tausend Dalton. Sie bestehen zu etwa fünfzig Gewichtsprozent aus Kohlenstoff und haben trotz ihres polydispersen Charakters typische physikalische und chemische Eigenschaften. Im terrestrischen wie aquatischen Bereich ist der überwiegende Teil des organisch gebundenen Kohlenstoffs in den Huminstoffen festgelegt. So bestehen etwa 50% des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC: Dissolved organic carbon) in farblosen Oberflächengewässern aus Huminstoffen, wobei die durchschnittliche DOC-Konzentration in diesen Medien 2,2 mg/L beträgt [58]. In gefärbten Oberflächengewässern ist der DOC-Wert stärker variabel und bewegt sich typischerweise zwischen 5 und 50mg/L. Hier können die Huminstoffe einen höheren Anteil am gelösten Kohlenstoff ausmachen (bis zu 80%).

Aus der für das Leben essentiellen Depotfunktion leitet sich ein grundsätzliches Interesse an der Struktur und Funktionalität dieser Substanzklasse sowie an ihrer Bedeutung für Ökosys-

teme ab. Darüber hinaus sind die Huminstoffe im Bereich der Trinkwasserversorgung und Abwasserbehandlung wegen der Vehikelfunktion für Schadstoffe und als Präkursoren für toxikologisch relevante Substanzen technologisch bedeutsam. Die Wechselwirkungen mit Schwermetallionen und Xenobiotika, wie z.B. Pestiziden, sind für Transportvorgänge in Gewässern und aus umweltschutztechnologischen Aspekten besonders wichtig [63].

Die Aufklärung von Bildungsmechanismen für Huminstoffe stellt eine anspruchsvolle Aufgabe dar, schon alleine deshalb, weil Huminstoffe aus einer komplexen Mischung von Verbindungen bestehen. Als ein Hinweis auf die molekulare Heterogenität und Komplexität von Huminstoffen mag dienen, daß bis heute jeder Versuch fehlschlug, diese Materialien in Fraktionen diskreter Verbindungen aufzutrennen. Tatsächlich wurde jede Trennmethode, die von Chemikern und Biochemikern entwickelt wurde, auf Huminstoffe angewendet. Viele Fraktionierungsversuche waren in der Lage, den Grad der Heterogenität der Proben zu ermitteln, aber keine konnte auch nur annähernd ein Material isolieren, das als ein 'reiner' Huminstoff zu bezeichnen wäre, vorausgesetzt, man versteht unter dem Begriff 'rein' die im klassischen Sinne festgelegte Bedeutung 'reine Chemikalie' oder 'reine Gruppe von Chemikalien'. In dieser Hinsicht repräsentieren Huminstoffe eine einzigartige Kategorie von Naturstoffen, deren Wesen scheinbar per se durch ihre Heterogenität gekennzeichnet ist [58].

2.2.1. Definition der Huminstoffe

Das Unvermögen, Huminstoffe durch spezifische chemische Begriffe zu definieren, führte zu operationalen Definitionen. Ausgehend von der Reaktivität der Huminstoffe, deren Veränderung allen bisherigen Beobachtungen zufolge in weitgehender Übereinstimmung mit dem Ablauf des Humifizierungsprozesses erfolgt, wird die in Abbildung 8 aufgeführte Einteilung vorgenommen [64].

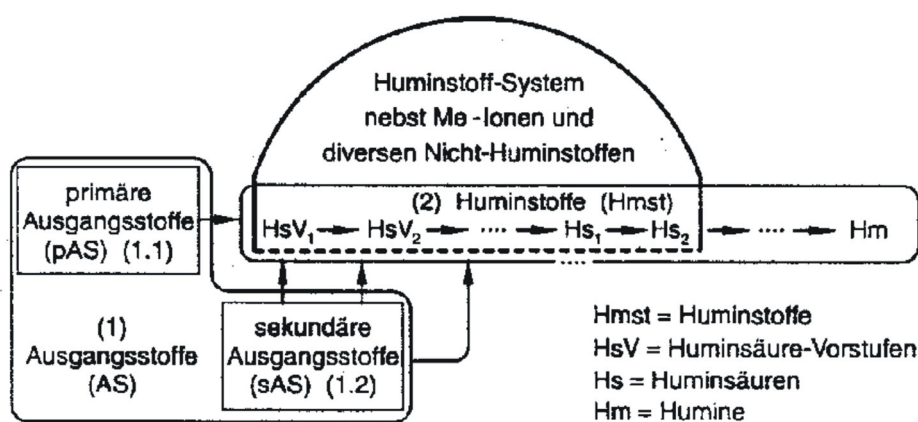


Abbildung 8: Stellung der Huminstoffe im Prozeß der Humifizierung [64]

Man unterscheidet:

- (1) **Ausgangsstoffe (As, n-Hmst*)**: sind zur Bildung von Huminstoffen notwendig, zählen aber (noch) zu den Nichthuminstoffen, und können leicht von diesen unterschieden werden (z.B. durch ihre Farbe)
 - Primäre Ausgangsstoffe (pAs): Aromatische, leicht in Radikale zu überführende Verbindungen. An ihnen vollzieht sich die „Startreaktion“ der Humifizierung.
 - Sekundäre Ausgangsstoffe (sAs): Für diese sind keine festgelegten Strukturen notwendig. Sie müssen jedoch leicht mit gewissen Huminstoff-Fractionen reagieren können, um so in der Konformationsphase Eingang in das Humifizierungsgeschehen zu erhalten.
- (2) **Huminstoffe (Hmst)**
 - Huminsäure-Vorstufen (HsV): Huminstoffe, die im Verlaufe des Humifizierungsprozesses in Huminsäuren übergehen.
 - Huminsäuren (Hs): Saure Huminstoffe relativer Stabilität.
 - Humine (Hm): Endprodukte des Humifizierungsprozesses, schwer löslich, wenig reaktionsfähig.

Nach diesem Schema ist eine Differenzierung der Huminstoffe und ihrer Ausgangssubstanzen möglich. Die aufgeführten drei Huminstoff-Fractionen (HsV, Hs, Hm), von denen die Humine (Hm) nur ein geringes Interesse besitzen, können gelegentlich noch eine weitere Unterteilung erfahren (HsV₁, HsV₂,... usw.). Der praktische Nutzen einer solchen Einteilung ist jedoch gering [65].

2.2.1.1. Einteilung und Nomenklatur von Huminstoff-Fractionen

Da eine Unterteilung der Huminstoffe nach strukturellen Gesichtspunkten wegen ihrer heterogenen Zusammensetzung nicht durchführbar ist, werden sie häufig nach Untergruppen (Fractionen) mit abweichenden Eigenschaften gegliedert [65].

Ihre unterschiedliche Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln wie z.B. Wasser und Alkohol führte im späten 19. Jahrhundert zu den Bezeichnungen Fulvin-, Hymatomelan-, schließlich Huminsäuren sowie Kren- und Apokrensäuren [61], später wurde diesen noch die Gruppe der Humine hinzugefügt.

Diese Nomenklatur erweckt den Eindruck, als seien es Substanzen, deren chemische Differenziertheit auch eine abweichende Bezeichnung rechtfertigt. Nach heutigem Wissensstand ist jedoch belegt, daß sie in den meisten Fällen lediglich verschiedene Stadien des Humifizierungsprozesses oder Übergänge zwischen ihnen darstellt. Die experimentelle Basis für eine solche Einteilung erweist sich daher als wenig tragfähig. So hat sich gezeigt, daß die Löslich-

* n-Hmst = Nicht-Huminstoffe

keitseigenschaften durch periphere Gruppen (z.B. Carboxyl- oder Phenolgruppen) oder andere Randstrukturen nachhaltig verändert werden, ohne daß sich dies auch auf wesentliche Eigenschaften des Huminstoffs beziehen muß. Beispielsweise führt die Methylierung oder Acetylierung von alkoholischen Gruppen im Huminstoffsystem zu einer verminderten Löslichkeit des Huminstoffs in Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln bzw. in alkalischen Medien [65].

Da es jedoch keine verbreitete Alternative zur Unterscheidung der in Kapitel 2.2.1. erwähnten Huminstofffraktionen gibt, wird trotz dieser Unzulänglichkeiten aus praktischen Gründen die Unterteilung auf der Basis der Lauge- bzw. Säurelöslichkeit die Unterteilung in Fulvinsäure, Huminsäure und Humin beibehalten [2, 59, 66]. Hierbei werden die Huminstoffe mit Natronlauge aufgelöst und anschließend die „Huminsäuren“ mit Salzsäure ausgefällt, wobei die „Fulvinsäuren“ in Lösung bleiben. Der in Natronlauge unlösliche Teil des Humus wird als „Humin“ bezeichnet. Man erhält also je nach Löslichkeit bei unterschiedlichen pH-Werten in wäßrigen Lösungen drei Hauptfraktionen:

- Fulvinsäuren - Sind über den gesamten pH- Bereich in wäßrigen Lösungen löslich.
- Huminsäuren - Sind löslich in Lauge, im sauren Medium ($\text{pH} < 2$) fällbar.
- Humine - Gänzlich unlöslich in Säuren und Laugen, auch in warmer Natronlauge.

Die gelösten organischen Moleküle werden dabei nach der Anzahl und Stärke hydrophiler, saurer Gruppen und nach der molaren Masse aufgetrennt [59].

Typischerweise bestehen 90% des gelösten Huminstoffmaterials in natürlichen Gewässern aus Fulvinsäuren und die restlichen 10% aus Huminsäuren. Dieses Verhältnis steht im krassen Gegensatz zu Huminstoffen in Böden, wo die Huminsäuren gegenüber den Fulvinsäuren im großen Überschuß vorliegen [58].

2.2.1.2. Isolierung und Fraktionierung von Huminstoffen

Wenn komplizierte Systeme aus der Umwelt untersucht werden, müssen die Proben von der komplexen Matrix abgetrennt werden. Im Fall der refraktären organischen Säuren werden mit Isolierungsprozeduren hauptsächlich zwei Absichten verfolgt [67]:

- Abtrennung von anorganischen und organischen Wasserinhaltsstoffen, welche keine Huminstoffe darstellen.
- Aufkonzentrierung, um geeignete Proben für definierte Reaktionen und Strukturuntersuchungen zu gewinnen.

Huminstoffe kommen nicht allein in der Umwelt vor. Sie sind mit anderen Klassen von Materialien entweder vermischt oder mit ihnen auf unterschiedliche chemische oder physikalische Art und Weise assoziiert. Beispielsweise sind Huminstoffe im aufgelösten Zustand in natürlichen Gewässern mit Aminosäuren, Zuckern, verschiedenen aliphatischen und aromatischen

Säuren, sowie einer ganzen Reihe von weiteren organischen Verbindungen vermischt. In Böden und Sedimenten und in Suspensionen aquatischer Systeme sind Huminstoffe darüberhinaus häufig an mineralische Komponenten gebunden. Die größte Herausforderung ist die Aufklärung der Rolle von Huminstoffen in ihrer natürlichen Umgebung. Konsequenterweise werden häufig Isolationsprozesse unterlassen und Untersuchungen an der Gesamtheit der Wasserproben oder nicht extrahierten Böden und Sedimente durchgeführt, um eine weitergehende Bewertung des Einflusses auf die Umwelt oder Behandlung von Huminstoffen durchführen zu können. Andere Untersuchungen gehen noch einen Schritt weiter und von der Prämisse aus, daß alle Studien in situ durchgeführt werden sollten, ohne das Substrat aus seiner natürlichen Umgebung zu entfernen, also Proben möglichst im ursprünglichen Zustand zu belassen, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Denaturierungen zu vermeiden [58]. Trotzdem ist es vielfach unerlässlich, Isolierungsprozeduren durchzuführen, da in-situ-Experimente gegenwärtig nur mit einer sehr geringen Anzahl von Analysenverfahren durchgeführt werden können. Es muß jedoch zu jedem Zeitpunkt im Auge behalten werden, daß diese Prozeduren nur zu operational definierten Substanzen bzw. Kenngrößen führen und Informationen über den ursprünglichen Zustand der Huminstoffe in der natürlichen Umgebung verloren gehen können [67].

Eine große Bandbreite an Isolierungsprozeduren wurde ausgearbeitet, bei denen Membranen, Sorbentien oder die Flüssig-Flüssig-Extraktionen eingesetzt wurden [68]. Methoden, die gemeinhin zur Isolation und Aufkonzentration von aquatischen organischen Substanzen verwendet werden, sind zusammen mit ihren Vor- und Nachteilen in Tabelle 3 aufgeführt:

Tabelle 3: Methoden zur Isolation/ Konzentration aquatischer organischer Substanzen [69]

Methode	Vorteile	Nachteile
<i>Gefriertrocknung</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Geringe Denaturierung • Hohe Aufkonzentrierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Langsame Prozedur • Anorganische Ionen verbleiben in der Probe
<i>Eindampfen</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Geringe Denaturierung bei niedriger Temperatur 	<ul style="list-style-type: none"> • Anorganische Ionen verbleiben in der Probe
<i>Lösungsmittlextraktion</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fraktionierung der Organik 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitierte Löslichkeit, je nach Polarität
<i>Reverse Osmose</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Großer Volumendurchsatz möglich • Schnelle Prozedur • Keine Artefaktbildung 	<ul style="list-style-type: none"> • Membranalterung • Aufkonzentrierung der meisten gelösten Stoffe erfolgt zusammen
<i>Ultrafiltration</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Schnelle Prozedur • Fraktionierung möglich • Keine Artefaktbildung 	<ul style="list-style-type: none"> • Membranalterung • Wenig definierte Fraktionierung, je nach Größe und Charge
<i>Sorption / Desorption</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Leicht kontrollierbar • Großer Volumendurchsatz • Harze können regeneriert werden 	<ul style="list-style-type: none"> • Ausbluten des Harzes • Irreversible Sorption • Artefaktbildung durch hohen pH-Gradienten

In allen Fällen entstehen Fraktionen unterschiedlicher Zahl und Eigenschaft. Während man bei den Sorption/Desorptions-Methoden drei unterschiedliche Fraktionen (Fulvinsäure-, Huminsäure- und Nichthuminstoff-Fraktion) anfallen, ergeben die Membranverfahren eine Hauptfraktion (Konzentrat) sowie eine schlecht charakterisierbare Permeat-Fraktion [69]. Zu den Membranverfahren zählen die Ultrafiltration und die Reverse Osmose. Diese Ergebnisse zeigen deutlich den operational definierten Charakter der Huminstoffe. Die Schlußfolgerung muß sein, daß Isolierungs- und Konzentrationsmethoden stets im Hinblick auf die spezifischen Bedürfnisse des angestrebten Untersuchungsziels ausgewählt werden müssen. In manchen Fällen kann es sogar ratsam sein, mehrere verschiedene Ansätze zu verfolgen, um das höchste Maß an Information zu erhalten [69].

Es ist der International Humic Substances Society (IHSS) zuzuschreiben, daß die Sorption und Desorption auf nichtionischen, makroporösen Harzen (z.B. Amberlite XAD-Typ) weltweit die gängigste Methode zur Isolierung von Huminstoffen geworden ist. Das Vorhandensein von Standard- und Referenzmaterialien, die durch eine definierte Methode aus spezifischen Oberflächengewässern gewonnen werden können, hat eine gute Basis für Vergleiche zwischen verschiedenen Labors mit unterschiedlichen Methoden und Ergebnissen geschaffen. Es sei aber nochmals klargestellt, dass die verschiedenen anzuwendenden Schritte, welche in Abbildung 9 dargestellt sind, stets die Möglichkeit der unkontrollierten Denaturierung, Fraktionierung und die Gefahr von Reaktionen jeglicher Art in sich bergen.

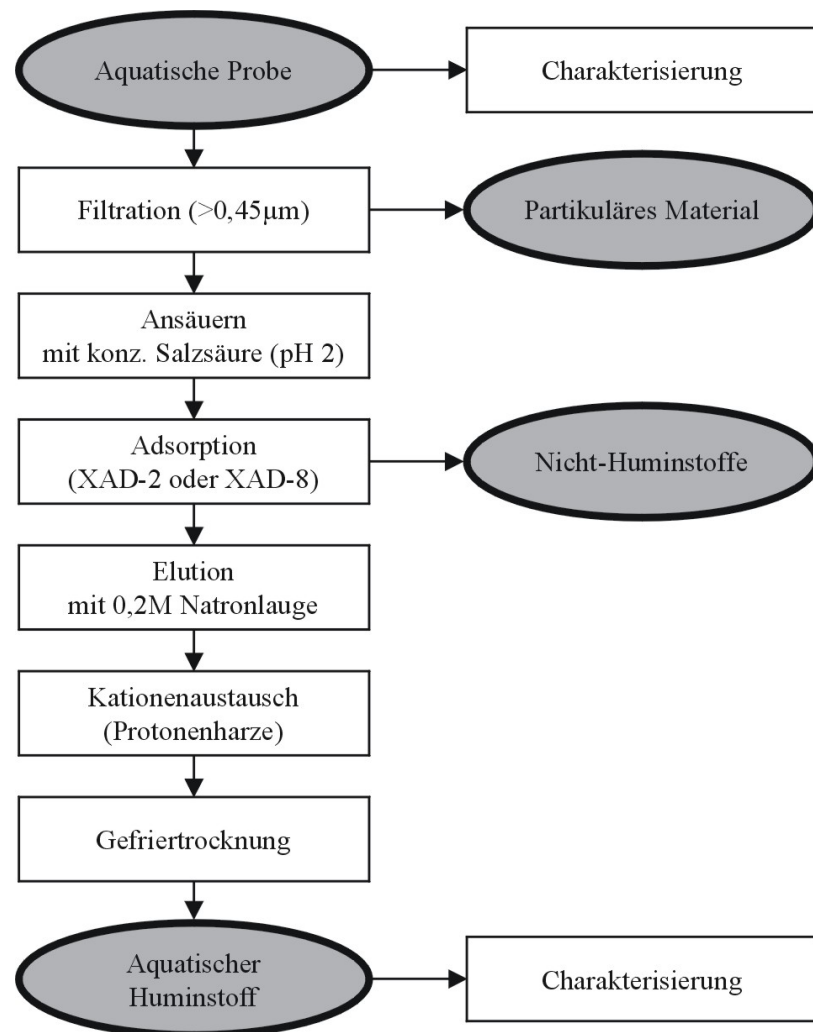


Abbildung 9: Schema der XAD-Isolierungsprozedur für aquatische Huminstoffe [67]

Die Isolierung der refraktären organischen Säuren beginnt mit der Abtrennung der gelösten von den partikulären Substanzen.* Hierbei wird auch die Huminstoff-Fraktion der Humine abgetrennt. Dieser Schritt ist kritisch, da Proben kolloidale Partikel beinhalten können, die kleiner als 0,45µm sind und die Filterporengröße mit zunehmender Verstopfung der Poren abnimmt. Das filtrierte Wasser wird mit Salzsäure auf pH 2 angesäuert und durch eine Säule geleitet, die hydrophobes XAD-Harz enthält. Die Huminstoffe werden an der Säule adsorbiert, während die hydrophileren Nicht-Huminstoffe die Säule passieren. Die Säule wird dann bei pH 7 eluiert, um Fulvinsäuren zu entfernen. Nachfolgende Elution mit 0,1molarer Natronlauge desorbiert die Huminsäuren. Anschließend werden die Huminstoff-Fractionen durch einen starken Kationenaustauscher in die protonierte Form überführt [58]. Die Isolierung kann prinzipiell zu einer unkontrollierten Produktion von Artefakten führen, besonders, wenn

* Die Bezeichnung 'gelöst' ist in diesem Fall nicht gleichbedeutend mit der Bedeutung, die es in der Chemie für gewöhnlich besitzt. In diesem umweltanalytischen Kontext wird in der Regel als 'gelöst' ein Material in aquatischen Systemen bezeichnet, welches einen 0,45µm Filter passiert. Tatsächlich können manche dieser Verbindungen eher in einer kolloidalen Suspension vorliegen, als in Lösung [58].

Sauerstoff und Licht zugegen sind. Der Ausschluß von Licht und Sauerstoff und die Minimierung der Reaktionszeiten bei extremen pH-Werten führen zu einer weiteren Verkomplizierung der ganzen Prozedur, sind jedoch zur Vermeidung einer größeren Artefaktbildung von Vorteil. Leider liegen nur wenige Informationen über die strukturellen Änderungen während der Isolationsprozedur vor. Die verblüffende Ähnlichkeit von vielen Proben aus verschiedenen Ursprüngen führt zu der Frage, ob diese Ähnlichkeiten natürliche Bedingungen widerspiegeln, oder ob sie ein Artefakt dieser Isolierungsmethode sind [67].

Die Ultrafiltration wird für Moleküle mit Durchmessern zwischen 5 und 500nm eingesetzt. Die Molmassen betragen etwa zwischen 500 und 500000g/mol. Die Trennwirkung einer Ultrafiltrationsmembran beruht im wesentlichen auf Siebeffekten und auf Wechselwirkungen mit den Porenwänden. Man geht davon aus, dass der gesamte Stofftransport durch die Membran ausschließlicly über die Membranporen erfolgt, die mit Flüssigkeit gefüllt sind. Wichtige Trennparameter stellen die Porenradienverteilung in der Membran, und Eigenschaften der gelösten Substanzen wie die effektiven Moleküldurchmesser, sowie Form und Flexibilität der Teilchen dar. Nachteile der Membranmethoden sind das Verstopfen der Poren und eine Veränderung der Porendurchmesser über die Zeit, auch etwas salopp als „Membranalterung“ bezeichnet [70]. Für Huminstoffe stellt sich die Auswahl des Molecular Weight Cut Off (MWCO) der Membran als kritisch dar. Je größer das MWCO, desto höher der Anteil an Huminstoffen, der ins Permeat übergeht und je kleiner das MWCO, desto höher der Gehalt an niedermolekularen Substanzen, der sich in der Konzentratfraktion wiederfindet.

Abschließend soll noch die Extraktion mit wäßrigen alkalischen Lösungen erläutert werden, da es sich hierbei um eine klassische Untersuchungsmethode handelt und sie vor allem in der älteren Literatur häufig Erwähnung findet. Bei ihr werden oft über 80% der Huminstoffe erfaßt. Nachteilig ist jedoch, daß auch Streustoffe und Bestandteile der lebenden Biomasse aufgelöst werden. Außerdem verändern sich die Huminstoffe bei der Extraktion chemisch, so daß die Extraktionsprodukte nicht mehr als direkte Bausteine der Huminstoffmoleküle angesehen werden können. Bei pH-Werten über 10 setzt z.B. die alkalische Hydrolyse von Esterbindungen ein, was Molekülstrukturen irreversibel verändert. Besonders empfindlich sind die Huminstoffe in alkalischer Lösung gegenüber Oxidationsmitteln. Schon durch Luftsauerstoff kann eine oxidative Umwandlung der Moleküle ausgelöst werden. Daher wird möglichst unter Luftabschluß gearbeitet [66].

2.2.2. Genese von Huminstoffen

Man kann Huminstoffe als typische Substanzen der Böden ansehen und dort ihren primären Bildungs- und Wirkungsort finden, auch wenn nach neueren Erkenntnissen Huminstoffe und verwandte Verbindungen bereits in einem sehr frühen Stadium der chemischen Evolution aus einfachen Verbindungen wie Methan, Wasser, Ammoniak, Wasserstoff sowie deren Folgeprodukten gebildet wurden [64].

In Übereinstimmung mit zahlreichen Beobachtungen sowie Modellreaktionen kann ihr differenzierter Entstehungsprozeß mit dem in Abbildung 10 dargestellten Modell beschrieben werden.

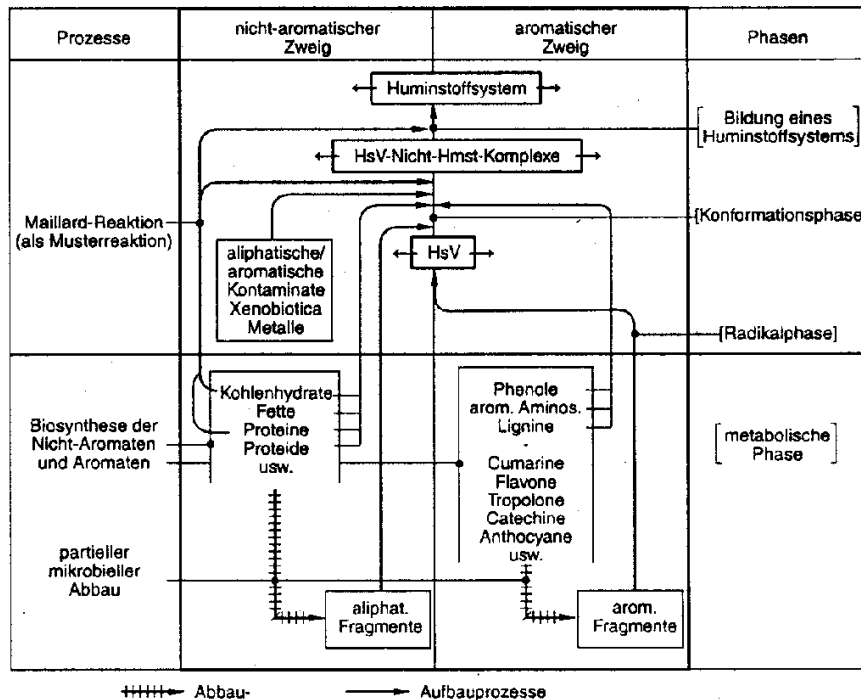


Abbildung 10: Zur Genese von Huminstoffen [64]

Im Bildungsgeschehen (die senkrechten Achsen dieser Darstellung) sind mehrere Phasen zu unterscheiden. Die Zersetzung abgestorbener Pflanzenteile und Tierrückstände sowie Exkremente der Bodentiere führen zur Bildung aliphatischer und aromatischer Einzelbausteine. Nach der Biosynthese von aromatischen und nichtaromatischen Verbindungen, den Ausgangsstoffen der Huminstoffe, erfolgt deren partieller mikrobieller Abbau. Diese sogenannte metabolische Phase umfaßt Vorgänge, die zu den biochemischen Grundprozessen zählen. Sie sind enzymgesteuert und von den sonstigen Gegebenheiten des Bodens abhängig.

Aus den aromatischen Fragmenten dieser Stoffe werden über radikalische Zwischenstufen in der sogenannten Radikalphase die Huminsäure-Vorstufen (HsV) gebildet.

Wenn von mehrwertigen Phenolen – im Boden leicht nachweisbar – ausgegangen wird, entstehen reaktionsfähige Radikale und Huminsäure-Vorstufen. Mit dieser bemerkenswerten Huminstoffspezies vollziehen sich insofern folgenreiche Umsetzungen, weil jetzt – in der sog. Konformationsphase – auch Nichthuminstoffe via Huminsäurevorstufen in den Humifizierungsprozeß eingeschleust werden. Die Folge dieser wichtigen Umsetzungen sind die in den Böden leicht nachweisbaren Nichthuminstoff / Huminstoffkomplexe. Schließlich wird mit der Konstituierung eines Huminstoffsystems (Hmst-S) der natürliche Endstatus dieser Naturstoffklasse erreicht.

Dieses Modell stellt das wichtige Moment der Huminstoffgenese, das besondere Reaktionsvermögen bestimmter Zwischenstufen heraus. Jedes Partikel vermag mit jedem anderen zu reagieren, weshalb als Folge zufälliger Ereignisse weder ein linearer Reaktionsverlauf noch eine definierte chemische Konstitution der Endprodukte zu erwarten ist.

Huminstoffe werden also über verschiedene chemische und biochemische Pfade unter sehr divergierenden, natürlichen Bedingungen gebildet, es existiert also kein verbindlicher Genese-Chemismus.

2.2.3. Eigenschaften der Huminstoff-Fractionen

Die Eigenschaften von Huminstoffen variieren sehr stark, da sie wesentlich von den Bildungsbedingungen der Huminstoffe (Bodentyp, Vegetation, Bodenbiologie) abhängen. Trotzdem wurde versucht, verschiedene Eigenschaften von Huminstoff-Fractionen zusammenzustellen (Tabelle 4):

Tabelle 4: Eigenschaften von Huminstoff-Fractionen [66]

Merkmal	Fulvinsäuren	Huminsäuren	Humine
Farbe	gelb / gelbbraun	braun / tiefbraun	Schwarz
Kohlenstoff-Gehalt [%]	43 – 52	50 – 62	> 60
Stickstoff-Gehalt [%]	0,5 – 2	3 – 8	unterschiedlich
Molekulargewicht	800 - 9000	zunehmend bis 10 ⁵	unterschiedlich
Molekülbausteine	mehr Polysaccharide	mehr Aromaten	
innere Vernetzung	➔	zunehmend	➔
Löslichkeit, funktionelle Gruppen, Sauerstoff-Gehalt, Säurestärke	➔	Abnehmend	➔

Obwohl die oben genannten Eigenschaften sehr allgemein gehalten sind, tut man gut daran, diese lediglich als Leitlinien zu verstehen, die gewisse Trends bei der mannigfaltigen Anzahl der Huminstoffe widerspiegeln. So wurden beispielsweise in der Literatur für Molekulargewichte sehr unterschiedliche Werte vorgeschlagen, die von den erwähnten sehr stark abweichen, je nach verwendetem Huminstoff bzw. angewendetem Analysenverfahren. Die Fulvinsäuren unterscheiden sich von den Huminsäuren derselben Bodenprobe im wesentlichen durch ihr niedrigeres Molekulargewicht, durch den im Mittel höheren Sauerstoff-, geringeren Kohlenstoff- und Stickstoffanteil und durch den meist höheren Gehalt an funktionellen Gruppen. Die Zahl der sauren Carboxylgruppen und phenolischen OH-Gruppen, die den Hauptteil der hydrophilen Gruppen stellen, ist bei Fulvinsäuren mit etwa 12 Mol/kg Boden etwa doppelt so hoch wie bei Huminsäuren, während sich die Konzentrationen an Carbonyl- und alkoholischen OH-Gruppen mit zusammen etwa 7 Mol/kg nicht signifikant unterscheiden [59].

Der Anteil an Polysaccharid-Bausteinen kann bei Fulvinäsuren bis zu 30% betragen, aromatische Komponenten sind kaum vorhanden. Fulvinsäuren sind ebenso wie ihre Salze, die Fulvate, wasserlöslich und vermögen Mangan- und Eisenoxide unter Reduktion zu lösen und Metallionen komplex zu binden. In Böden liegen die Fulvinsäuren oft in adsorbierter Form vor, z.B. gebunden an Eisen- und Aluminiumoxide, Tonminerale und höhermolekulare organische Verbindungen [66].

Die Huminsäuren besitzen ein höheres Molekulargewicht, enthalten mehr aromatische Anteile und Methylen-Gruppen, aber weniger Polysaccharidfragmente als die Fulvinsäuren. Huminsäuren sind in Wasser schwerlöslich und bilden auch mit mehrwertigen Kationen (Calcium, Magnesium, Eisen und Aluminium) schwerlösliche Verbindungen, die sogenannten Humate. Die höhere Löslichkeit in Natronlauge beruht neben der Wirkung des Natriumkations darauf, daß durch Dissoziation von schwach sauren Gruppen die pH-abhängige Ladung der Huminsäuren erhöht und damit die Hydratisierung erleichtert wird. Ferner werden durch die pH-Erhöhung bestehende Bindungen zu anderen Humaten gelöst. Der Säurecharakter der Huminsäuren und damit auch die Fähigkeit zum Kationenaustausch beruht wie bei den Fulvinsäuren vorwiegend auf der Anwesenheit von Carboxyl- und phenolischen OH-Gruppen. Einen Überblick über die sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen und ihre typischen Konzentrationen gibt Tabelle 5.

Tabelle 5: Sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen von Fulvin- und Huminsäuren aus Böden unterschiedlicher Klimazonen (arktisch bis tropisch; Angabe des Mittelwerts in Klammern) [66]

Funktionelle Gruppe	Fulvinsäuren [mMol/g]	Huminsäuren [mMol/g]
Gesamtacidität	6,4 - 14,2 (10,3)	5,6 - 8,9 (6,7)
Carboxyl-Gruppen	5,2 - 11,2 (8,2)	1,5 - 5,7 (3,6)
Saure OH-Gruppen	0,3 - 5,7 (3,0)	2,1 - 5,7 (2,9)
Alkoholische und schwach saure OH-Gruppen	2,6 - 9,5 (6,1)	0,2 - 4,9 (2,6)
Ketone und Chinone	1,2 - 4,2 (2,7)	0,1 - 5,6 (2,9)
Methoxy-Gruppen	0,3 - 1,2 (0,8)	0,3 - 0,8 (0,6)

Die Anzahl dieser Gruppen ist bei den Huminsäuren geringer als bei den Fulvinsäuren. Die Bestimmung der Gesamtacidität erfolgt meist durch direkte oder auch durch indirekte Titration. Die quantitative Bestimmung von funktionellen Gruppen erfolgt neuerdings auch durch ^{13}C -NMR-Spektrometrie [71]. Das Röntgenbeugungsdiagramm isolierter Huminsäuren weist breite Interferenzen auf, die auf eine graphitähnliche Struktur oder auf ein schlecht geordnetes System aromatischer Strukturen hindeuten [66].

Die Eigenschaften der Humine schließlich, die als in Natronlauge unlösliche Anteile der Huminstoffe bezeichnet werden, sind nur auf sehr diffuse Art und Weise zu beschreiben. Dies

liegt daran, daß sie methodisch nur sehr schwer oder garnicht von wenig zersetzten Tier- und Pflanzenresten, die strenggenommen nicht zu den Huminen zählen, abgetrennt werden können. Gleiches gilt für diejenigen Humin- und Fulvinsäuren, die so fest an Tonminerale gebunden sind, daß sie nicht mit kalter Natronlauge zu extrahieren sind [66].

2.2.4. Zusammensetzung und Struktur von Huminstoffen

Für Huminstoffe kann ein gewisser, wenn auch weiter Bereich der Elementarzusammensetzung angegeben werden. Zwar wirken sich Provenienz, Alter und Gewinnungsmethode (Vorbehandlung, Fraktionierung) auf die elementare Zusammensetzung der Huminstoffe aus, jedoch geschieht dies wieder so unspezifisch, daß von diesem Ansatz her keine Klassifizierung möglich ist. Tabelle 6 gibt eine Übersicht.

Tabelle 6: Mittlere Bereiche für die elementare Zusammensetzung für Huminstoffe [65]

	Mittlerer Wert	Schwankung
C – Gehalt	54%	± 10%
O – Gehalt	33%	± 8%
H – Gehalt	4,5%	± 3%
N – Gehalt	2,7%	± 2,6%

Huminstoffe enthalten eine Reihe von Bausteinen, wobei neben größeren Spaltstücken von Lignin, Polysacchariden und Proteinen vor allem OH-haltige aromatische Polycarbonsäuren, Chinone, Zuckerbruchstücke, sauerstoff- und stickstoffhaltige Heterocyclen sowie verschiedene Aminosäuren zu nennen sind. Diese Moleküleinheiten sind durch verschiedene Brücken (z.B. Schwefel, Methylengruppen, und auch längere Kohlenwasserstoffketten) in unterschiedlichen Mengenverhältnissen miteinander verknüpft. Neben Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff kommen selbst in chromatographisch gereinigten Humin- und Fulvinsäuren bestimmte, meist aus Eiweißspaltstücken stammende Elemente in geringen Konzentrationen stets vor [66]:

- **Stickstoff** - Stickstoff ist ein wichtiger, allerdings nicht zwingend obligater Bestandteil aller Huminstoffe. Aminosäuren und Amino Zucker bilden mit zusammen etwa 30-70% des gesamten organischen Stickstoffs den Hauptteil der N-haltigen Molekülbausteine.
- **Schwefel** - Schwefel ist in Huminstoffen stets enthalten. In landwirtschaftlich genutzten Böden sind bis zu 90% des Schwefels in Huminstoffen gebunden, etwa die Hälfte davon in esterartiger Bindung.
- **Phosphor** - Phosphor kommt in Huminstoffen häufig vor. Durch Kernresonanzspektroskopie (^{31}P) wurde gefunden, daß die wichtigsten Bindungsformen Orthophosphatmono- und -diester sind; beide Fraktionen zusammen machen etwa 60-90% des gesamten Phosphors dieser organischen Bodenfraktion aus, entsprechend 25-35% des Gesamtphosphors.

Die große Zahl möglicher Ausgangsstoffe, die komplexe Genese und das Fehlen von reaktionssteuernden Mechanismen bedingen, daß Huminstoffe keine einheitliche Strukturformel besitzen. Es wird davon ausgegangen, daß zumindest für Huminstoffe mit höherer Molmasse keine zwei identischen Moleküle existieren [2, 64]. Würde es gelingen, die Struktur eines Huminstoffpartikels aufzuklären, dann läge insofern ein nicht verwertbares Ergebnis vor, weil schon ein benachbartes Molekül der gleichen Stoffgruppe bereits eine abweichende Konstitution hätte. Im Prinzip kann es also soviel Strukturen wie Moleküle geben, weshalb sich Bemühungen zur Aufklärung der Huminstoffstruktur einem Scheinproblem zuwenden. Ein überzeugender Beleg für diese, experimentell indirekt längst gesicherte Auffassung kann in der Tatsache gesehen werden, daß bis jetzt keine der vielen vorgeschlagenen „Konstitutionsformeln“ für Huminstoffe diese richtig abzubilden vermögen [64].

Trotzdem ist es für die Beschreibung von Huminstoffen nützlich, Strukturmodelle zu kennen, solange man sich ihrer jeweiligen Schwächen und Unzulänglichkeiten bewußt ist. Ein mögliches Molekülmodell, das die wichtigsten der bisher nachgewiesenen Atomgruppierungen wie auch ihre ungefähren Mengenverhältnisse widerspiegelt, ist in Abbildung 11 aufgeführt.

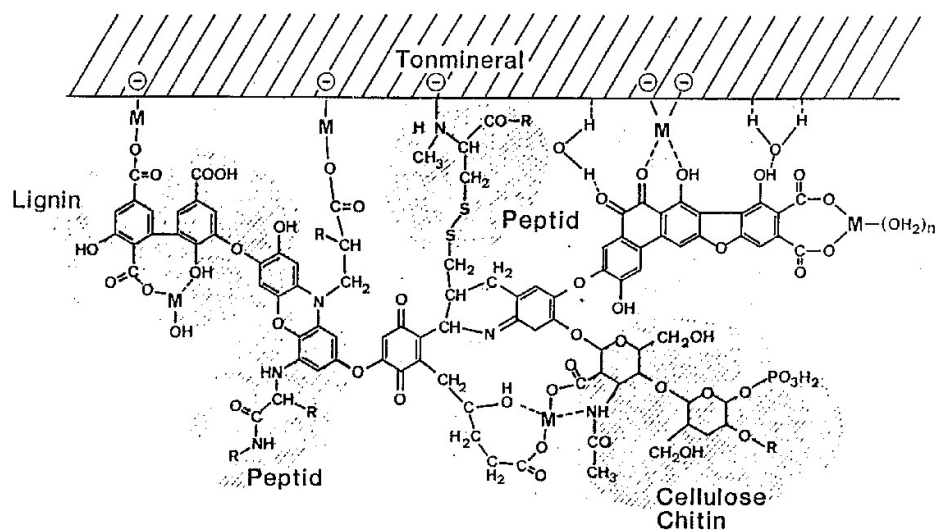


Abbildung 11: Strukturschema eines Huminstoffmoleküls und seiner Bindung an die Oberfläche eines Tonminerals. Einzelne Reststücke größerer Moleküle sind erkennbar (M=Metallkationen) [66]

Neben aromatischen und aliphatischen Funktionen findet man in der Struktur Nicht-Huminstoffe (Peptide, Zucker, Metallionen) wieder. Bindung an Tonminerale erfolgt durch Komplexbindung, kovalente Bindung oder Wasserstoffbrückenbindung.

Ein weiterer Strukturvorschlag in Abbildung 12 bringt den aliphatischen und aromatischen Charakter von Huminstoffen zum Ausdruck.

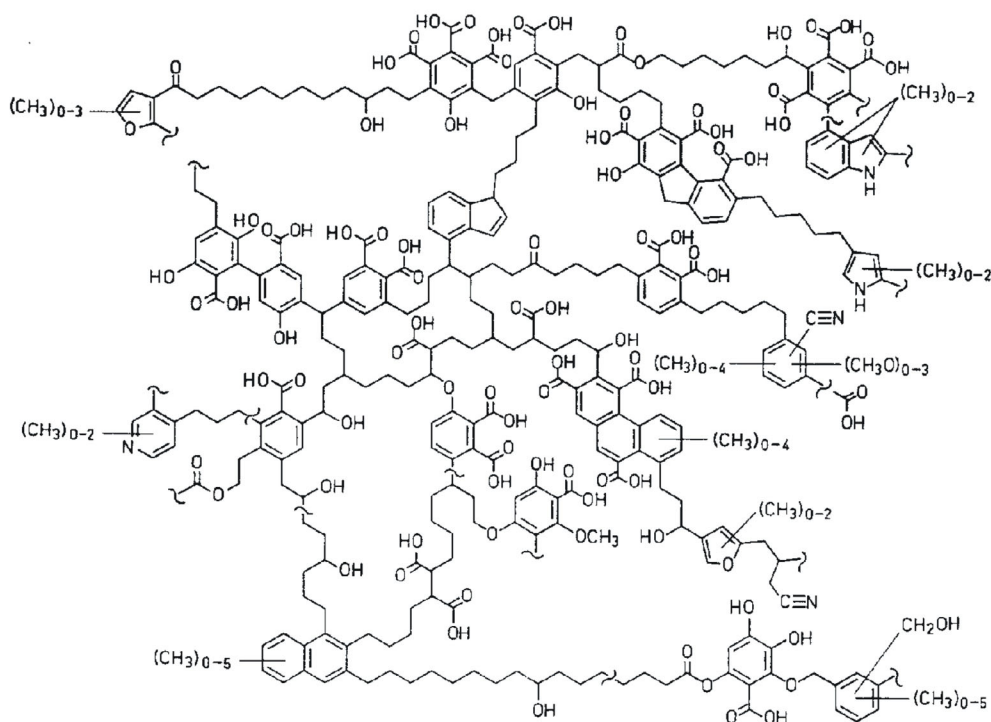


Abbildung 12: Strukturvorschlag für ein Huminstoffmolekül [72]

Ferner sind Funktionalitäten wie Carboxyl- und Phenolgruppen zu erkennen, welche wesentlich zur Wasserlöslichkeit von Huminstoffen beitragen. Schwächen dieses Modells sind eine Unterrepräsentation von Heteroatomen wie Stickstoff, Schwefel und Metallkationen. Einpolymerisierte Nicht-Huminstoffanteile fehlen sogar gänzlich [72].

An anderer Stelle wird a priori darauf verzichtet, solche chemischen Konstitutionen anzugeben [64]. Stattdessen wird, wie Abbildung 13 zeigt, unter Verzicht auf Details ein Strukturmuster angegeben, welches den allgemeinen Status eines Huminstoffsystems wiedergibt. Dieses Strukturmuster berücksichtigt vor allem die zu einem System führenden Wechselwirkungen der Huminstoffkerne untereinander wie zu anderen, integrierten Nicht-Huminstoffen.

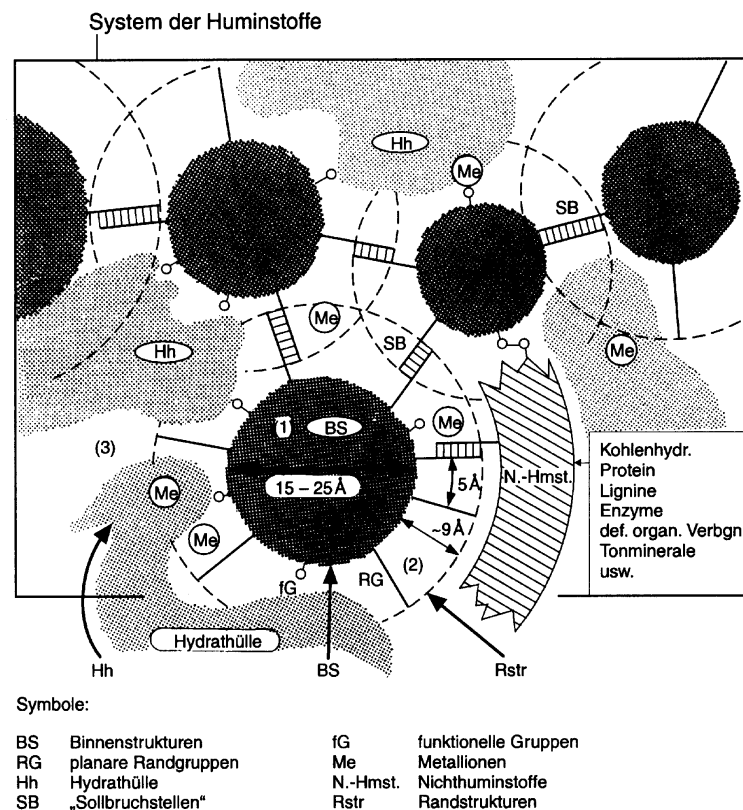


Abbildung 13: Strukturmuster eines Huminstoffsystems [64]

Für die sogenannten Binnenstrukturen konnte röntgenographisch ein Durchmesser von 1,5-2,5 nm ermittelt werden. Hier besorgen Kovalenzen zwischen den Grundeinheiten den Zusammenhalt. Planare Randgruppen chinoider und phenolischer Art schaffen die Möglichkeiten über ε -Donator-Acceptor-Beziehungen oder Wasserstoffbrücken, elektrostatische oder van der Waals-Kräfte die Voraussetzungen für den Aufbau eines Huminstoffsystems. Mit diesen zwischenmolekularen Wechselbeziehungen sind gewissermaßen die „Sollbruchstellen“ im System eingebracht, die wegen der geringen Bindungskräfte bei Angriffen von außen geöffnet werden, ohne daß davon die Binnenstrukturen betroffen sind. In dieses vielfältige Bindungsgeflecht sind Metallionen, Wassermoleküle, aber auch nieder- oder höhermolekulare organische Verbindungen integriert, woraus dann mit vielfältigen Nicht-Huminstoff/Huminstoff-Komplexen ein Huminstoffsystem resultiert.

Allein diese „Konstruktion“, die dem natürlichen Vorkommen und den Reaktionseinheiten der Huminstoffe entspricht, läßt verstehen, daß entgegen früheren Vorstellungen die Huminstoffe durchaus ein chemisch reaktives Material darstellen, welches in besonderem Maße die chemischen und physikalischen Verhältnisse seines Umfelds zu bestimmen vermag [64].

2.2.5. Gebundene Rückstände

In der vergangenen Zeit hat besonders das Auftreten „gebundener Rückstände“ von Umweltschadstoffen als Langzeithypothek in terrestrischen wie aquatischen Huminstoffen Aufmerksamkeit erregt. Gebundene Pestizidrückstände bilden aus den folgenden Gründen ein potentielles Umweltproblem [73]:

- Die Natur und/oder Identität von gebundenen Rückständen der Pestizide, die in Böden oder Pflanzen erwartet werden, ist unbekannt;
- Man weiß nur wenig über gebundene Rückstände in Bezug auf Bioverfügbarkeit, Toxizität und Art der Akkumulation;
- Konventionelle analytische Methoden können diese Art von Rückständen nicht ermitteln und unterschätzen damit die Belastung der Böden und Pflanzen mit Pflanzenschutzmitteln;
- Das weitere genaue Schicksal gebundener Rückstände in der Natur ist unbekannt.

Durch die Art der Bindung kann die Mobilität der Xenobiotika erhöht werden, was direkt mit einem erhöhtem Sickerpotential verbunden ist, was zu vermehrtem Auftreten in Abläufen von landwirtschaftlich genutzten Flächen und schließlich in Oberflächen- und Grundwässern führt. Bislang ist nur wenig über die Mengen an Pestiziden bekannt, die an wasserlösliche Huminstoffe gebunden sind oder die Mechanismen ihres Transports zu den verschiedenen Kompartimenten der Umwelt. Gebundene Rückstände sind in jedem Fall zu beobachten, da die Umweltschadstoffe z.B. durch mikrobielle Aktivitäten wieder freigesetzt werden können und so wieder bioverfügbar für Tiere und Pflanzen werden [74].

Ferner können die Toxizitäten dieser Substanzen eventuell in gebundener Form erhöht oder erniedrigt werden, was die toxikologische Bewertung der jeweils betrachteten Schadstoffe erschwert.

Studien über Pestizide verschiedener Art haben gezeigt, daß sie mit der organischen Bodenfraktion den Hauptteil der unextrahierbaren Pestizidrückstände bilden. Daher konzentriert sich das Hauptaugenmerk der Untersuchungen auf die Fraktion der Huminstoffe, welche den größten Teil des organisch gebundenen Kohlenstoffs in diesen Kompartimenten bildet. Die Verteilung der gebundenen Rückstände zwischen den einzelnen Huminstoff-Fractionen ist nicht konstant und variiert für verschiedene Pestizide und unterschiedliche Aussetzungszeiten [75].

2.2.5.1. Definition

Als gebundene Pestizidrückstände werden im allgemeinen solche Rückstände bezeichnet, welche mit konventionellen Methoden wie z.B. der Lösungsmittlextraktion nicht aus der betreffenden Matrix zu extrahieren sind und sich damit einer gewöhnlichen analytischen De-

tektion und Quantifizierung entziehen. Die IUPAC hat die folgende Definition für nicht-extrahierbare Rückstände eingeführt [75]:

Nicht-extrahierbare Pestizidrückstände in Pflanzen und Böden stellen eine chemische Spezies dar, welche durch praxisgerechte landwirtschaftliche Anwendung von Pestiziden entstehen und nicht durch Methoden extrahiert werden können, welche die chemische Natur dieser Rückstände nicht wesentlich verändern.*

Bei der Angabe von nicht-extrahierbaren Rückständen ist die Art der Extraktionsprozedur von entscheidender Bedeutung und sollte stets mit angeführt werden.

2.2.5.2. Analytik von gebundenen Rückständen

Es wurden verschiedene Verfahren zur Analyse von gebundenen Rückständen entwickelt. Die Methoden lassen sich einteilen in:

- Extraktionsverfahren mit anschließender Detektion
- Markierungsverfahren
- Immunchemische Verfahren

Die Extraktions- und Markierungsverfahren werden teilweise auch in Kombination genutzt. Zu den Extraktionsverfahren werden die Hochtemperaturdestillation (HTD) [76, 77] und die Extraktion mit überkritischen Fluiden (SFE: Supercritical Fluid Extraction) [78] gezählt, die apparativ anspruchsvoll sind. Kernidee bei der Hochtemperaturdestillation ist die Extraktion unter drastischen Bedingungen bei 800°C [76], die eine Abtrennung der Analyten begünstigen. Nachteil der Methode ist die thermische Belastung, der die Rückstände ausgesetzt sind. Daher können keine thermolabilen Substanzen untersucht werden. Es wurde gezeigt, dass die SFE adsorptiv gebundene Rückstände effektiver als die HTD freisetzen kann [79, 80].

Weitere analytische Methoden zur Detektion und Quantifizierung gebundener Rückstände basieren auf Isotopenmarkierungen, im allgemeinen unter Verwendung von ^{14}C -markierten Pestiziden [76, 77, 81, 82, 83, 84]. Neuerdings wird auch die Kernresonanzspektroskopie zum Nachweis gebundener Rückstände eingesetzt. Verwendet werden in der Regel mit ^{13}C oder ^{15}N markierte Spezies [85].

Mit Hilfe ^{14}C -markierter Triazine konnte gezeigt werden, dass Atrazin und die zugehörigen Phase-I-Metabolite gebundene Rückstände bilden, die sich nicht durch ausgiebige Lösungsmittelextraktion freisetzen lassen (Tabelle 7).

* Werden ebenfalls bezeichnet als „gebundene“ Rückstände.

Tabelle 7: Gebundene ^{14}C -markierte Triazinrückstände in Böden nach ausgiebiger Lösungsmittelextraktion [86]

Analyt	Inkubationszeit	Gebundene ^{14}C -markierte Triazinrückstände im Boden
Atrazin	90 Tage	16 – 23 %
Atrazin	180 Tage	39 – 48 %
Atrazin	1 Jahr	54 %
Atrazin	9 Jahre	50 %
Hydroxyatrazin	180 Tage	24 – 28 %
Desethylatrazin	180 Tage	48 %
Desisopropylatrazin	180 Tage	55 %
Desethyldeisopropylatrazin	180 Tage	71 %
Terbuthylazin	242 Tage	40 %

Die Ergebnisse sind nicht alle direkt vergleichbar, da unterschiedliche Böden verwendet wurden. Jedoch sind die gefundenen Quantitäten stets signifikant. So fanden beispielsweise P. Capriel et al. [78], daß noch neun Jahre nach der Anwendung von ^{14}C -markiertem Atrazin unter Feldbedingungen annähernd 50% der ursprünglich eingesetzten Radioaktivität im Boden in einer nicht-extrahierbaren Form gegenwärtig waren. Die Bindung erfolgte hierbei über die terrestrischen Huminstoffe.

Da diese Strategie markierte Analyten voraussetzt, lassen sich so keine gebundenen Triazine in Böden bestimmen, die aus der Landwirtschaft stammen.

Im begrenzten Maße können auch Strukturinformationen gewonnen werden, z.B. bei der Metabolisierung der Triazine zu $^{14}\text{CO}_2$. Allerdings kann keine Aussage über die chemische Umgebung gebundener Rückstände getroffen werden, was für die ökotoxikologische und toxikologische Bewertung von entscheidender Bedeutung ist.

In der letzter Zeit rücken immunchemische Methoden immer stärker in den Vordergrund, da sie apparativ weniger anspruchsvoll sind. Sie können in gewissem Maße Strukturinformationen über die gebundenen Rückstände liefern. Anfang der 90er Jahre wurde über die Anwendung von Antikörpern zur Detektion von gebundenen Rückständen in Böden und Pflanzen berichtet [87, 88]. Eine eingehende Studie über nicht-extrahierbare Atrazinrückständen mit Enzymimmunoassays wurde von A. Dankwardt et al. [89] durchgeführt. Arylamino-s-triazine wurden als Modellverbindungen für nicht-extrahierbare Atrazinrückstände in Huminstoffen synthetisiert. Kompetitive Enzymimmunoassays wurden verwendet, um Atrazinrückstände zu untersuchen, die kovalent an aromatische Strukturen gebunden waren. Sie wurden mit einer vergleichbaren Affinität detektiert wie freies Atrazin. Untersuchungen verschiedener polyklonaler und monoklonaler Antikörper auf ihre Eignung zur Bestimmung gebundener Triazinrückstände haben ergeben, daß diejenigen Antikörper geeignet waren, welche nach Immunisierung mit Hilfe eines Ametrynsulfoxidkonjugats erhalten worden sind [90]. Man nimmt aufgrund der Antikörperselektivitäten an, dass die Bindung von Atrazin an

aufgrund der Antikörperselektivitäten an, dass die Bindung von Atrazin an Huminstoffe durch Substitution des Chlors erfolgt [74].

P. Ulrich et al. [91] entwickelten einen nicht-kompetitiven Immunoassay zur Bestimmung von Huminstoff-gebundenen Atrazinrückständen. Der Immunoassay beruht auf Antikörpern, die durch die Immunisierung mit Huminstoffen gewonnen wurden. Diese immobilisieren die Huminstoffe, und anschließend werden die kovalent gebundenen Triazinrückstände mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. P. Pfortner et al. [178] konnten zeigen, dass die Huminstoffe durch unspezifische Wechselwirkung an die Antikörper gebunden werden. Durch Substitution der Anti-Huminstoff-Antikörper mit verschiedenen Proteinen konnte gezeigt werden, dass basische Proteine mit einem hohen isoelektrischen Punkt besonders gut Huminstoffe immobilisieren können. Die Verwendung von Histon als Coating Protein führte zu einem sensitiveren Test zur Detektion von Huminstoff-gebundenen TNT-Rückständen. Daher wird angenommen, dass Huminstoffe mit negativer Nettoladung durch elektrostatische Wechselwirkung an die kationischen Proteine binden. Die Verwendung von methyliertem Rinderserumalbumin [92, 93, 94] führte zu einer weiter verbesserten Sensitivität des Tests. E. Simon et al. [95] adaptierten das Testprinzip auf gebundene Triazinrückstände.

2.2.6. Modellsubstanzen für Huminstoffe

Reaktive Verbindungen mit phenolisch-chinoidem Charakter reagieren unter oxidativen und alkalischen Bedingungen zu intensiv braun bis schwarz gefärbten Substanzen. Diese sind den natürlichen Huminstoffen in verschiedenen physikochemischen Eigenschaften ähnlich und werden daher als synthetische Modellsubstanzen für Huminstoffe betrachtet. Sie können an das betrachtete Einzelproblem angepasst und so der Einsatz von hochkomplexen natürlichen Huminstoffen vermieden werden [96].

Als Ausgangssubstanzen kommen „monomere“ Einzelbausteine wie Salicylaldehyd [97], Phenol, Hydrochinon, Brenzcatechin und p-Benzochinon [98] in Frage. Als Oxidationsmittel werden neben elementarem Sauerstoff auch Verbindungen wie Wasserstoffperoxid, Kaliumperoxodisulfat oder Kaliumpermanganat eingesetzt [98]. Bewährt hat sich die Darstellung von Modellsubstanzen für Huminstoffe durch die Oxidation von Hydrochinon oder p-Benzochinon mit Luftsauerstoff unter Zugabe von Natriumcarbonat. Die Methoden arbeiten in guten Ausbeuten und weisen den Vorteil auf, daß sie ohne Zugabe an weiteren Reagenzien auskommen [99].

Diese zunächst rein empirisch durchgeführten Experimente haben gesteigertes Interesse erregt, als sich zeigte, dass beim Abbau des makromolekularen Lignins, eines der wesentlichsten Edukte für die Huminstoffbildung, derartige Polyphenole entstehen können. Baustein des Lignins ist der phenolische Coniferylalkohol [100]. Es konnten Phenolcarbonsäuren isoliert werden, die durch Demethylierung und weiteren Abbau gebildet werden [101, 102].

2.2.6.1. Primärreaktionen der Modellbildung

Synthetische Modellsubstanzen werden genutzt, um die Bildung von Huminstoffen zu simulieren und können so eingesetzt werden, um Informationen über die Genese oder Struktur von Huminstoffen zu gewinnen. Am Beispiel von Hydrochinon und p-Benzochinon, die in einem Redox-Gleichgewicht stehen, sollen die Primärreaktionen dieser Modellbildung skizziert werden. Wird Hydrochinon als Ausgangssubstanz eingesetzt, so findet zunächst in einer milden Autooxidationsreaktion die Umsetzung mit elementarem Sauerstoff zu p-Benzochinon und Wasserstoffperoxid statt [103, 104] (Abbildung 14).

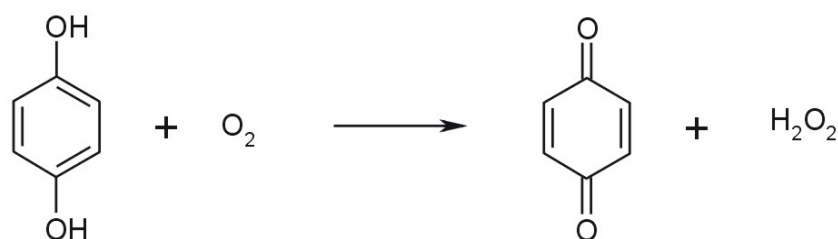


Abbildung 14: Autooxidation von Hydrochinon

Hydrochinon und p-Benzochinon reagieren zum Chinhydron, einem Charge-Transfer-Komplex, wobei das Hydrochinon als Elektronendonator und das Benzochinon als Elektronenakzeptor fungiert. Im alkalischen Medium sind Chinhydronen unbeständig und zerfallen unter Übertragung eines Elektrons vom Donator zum Akzeptor zu einem Semichinon-Radikalanion, das mesomeriestabilisiert ist (Abbildung 15) [105, 106].

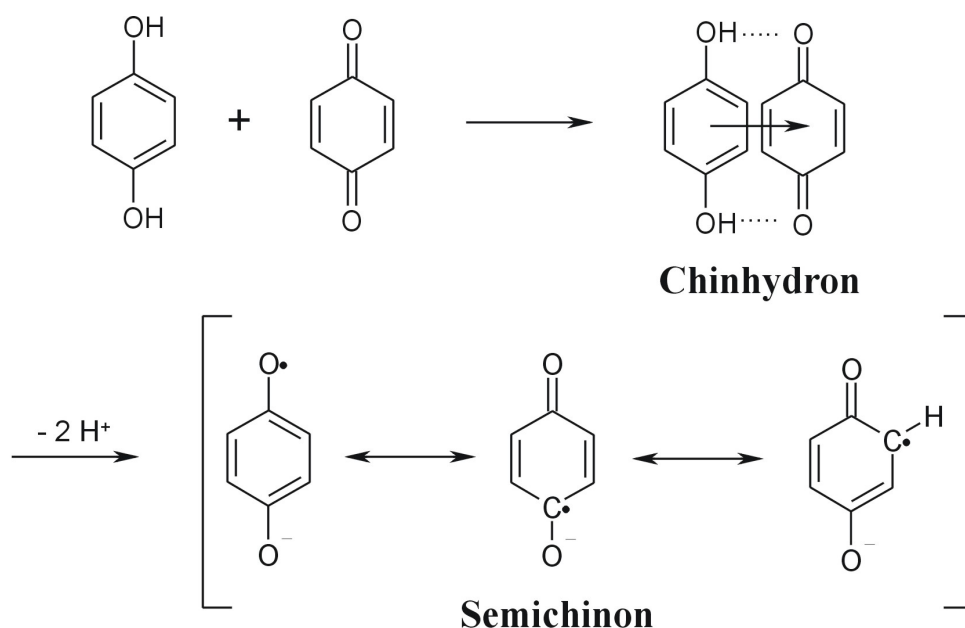


Abbildung 15: Bildung des Semichinon-Radikationen

Der Nachweis des Semichinons erfolgte durch Elektronenspin Resonanzspektroskopie (ESR). Aus dem Semichinon werden anschließend über einen Radikalmechanismus polymere Substanzen gebildet [107]. Daneben konnte gezeigt werden, dass auch die Reaktion von p-Benzochinon über das Hydroxy-p-Benzochinon zu polymeren Materialien verläuft. Wie in Abbildung 16 dargestellt, reagiert p-Benzochinon im alkalischen Medium unter 1,4-Addition von Hydroxid-Ionen zu Triphenolaten, die nach Elektronenabgabe an elektrophiles p-Benzochinon das Hydroxy-p-Benzochinon ergeben [108, 109].

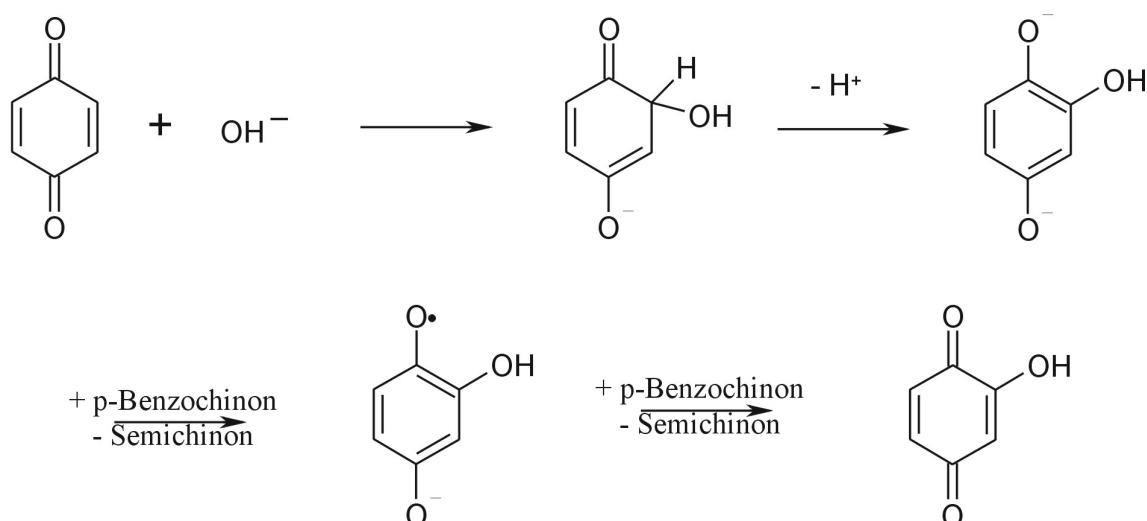


Abbildung 16: Bildung von Hydroxy-p-Benzochinon aus p-Benzochinon

Erdtman et al. [110] gelang darüber hinaus alkalische Polymerisierung von p-Benzochinon in Abwesenheit von Sauerstoff, was sich mit dem oben aufgeführten Mechanismus verträgt. Die Isolierung von 2,5,2',5'-Tetrahydroxydiphenyl als Nebenprodukt der Reaktion lässt vermuten, dass die durch C-C-Verknüpfungsreaktionen miteinander verbundenen aromatischen Systeme das Grundgerüst von synthetischen Huminstoffmodellen auf der Basis von Hydrochinon und p-Benzochinon bilden.

Die bisher bekannten monomeren Reaktionsprodukte der alkalischen Oxidation von Hydrochinon und damit die ersten Reaktionsstufen bei der Bildung von synthetischen Huminsäuren sind demnach p-Benzochinon, Semichinon und Hydroxy-p-Benzochinon. Die gebildeten Mengen dieser Verbindungen hängen jeweils vom pH-Wert ab [111, 112].

Im festen Zustand und in saurer Lösung bilden sich aus Hydroxy-p-Benzochinon sehr rasch dunkel gefärbte Produkte. So fällt in 1 molarer Schwefelsäure das intramolekulare Chinhydron von 4,4'-Dihydroxy-dichinon-2,5,2',5' als schwarzer Niederschlag aus. Dieser lässt sich leicht zum 4,4'-Dihydroxy-dichinon-2,5,2',5' oxidieren (Abbildung 17).

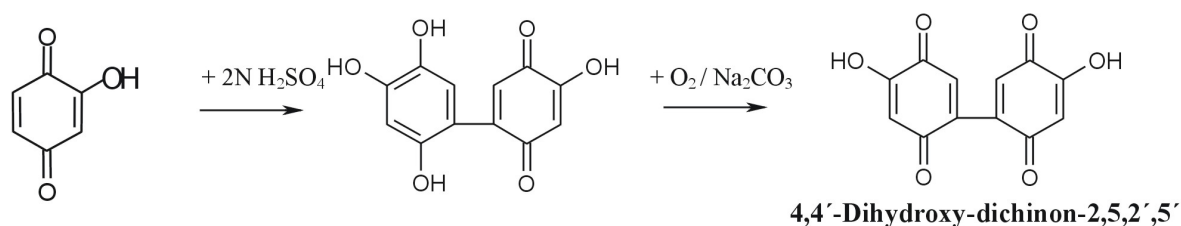


Abbildung 17: Bildung von 4,4'-Dihydroxy-dichinon-2,5,2',5'

Diese C-C-Kopplungsreaktion ist bisher die einzige von Hydroxy-p-Benzochinon, die zu einem einheitlichen Reaktionsprodukt führt. Bereits in neutraler Lösung finden in unübersichtlicher Weise zahlreiche Reaktionen statt. Auf papierchromatographischem Wege lassen sich etwa acht verschiedene Substanzen nachweisen, während in alkalischer Lösung rasch dunkelgefärbte huminsäureähnliche Produkte entstehen [108].

Wichtiges Strukturmerkmal der synthetischen Modellsubstanzen sind neben den gezeigten phenolischen und aromatischen Strukturen die Carboxylatgruppen [113]. Da die alkalische Oxidation von Hydrochinon ferner zur Bildung der Abbauprodukte Kohlendioxid, Essigsäure und Oxalsäure führt, muß die Spaltung der aromatischen und chinoiden Ringsysteme eine Rolle spielen [114].

An der Modellsubstanz 3,5-Di-tert-butyl-1,2-Dihydroxybenzol konnte die Spaltung eines aromatischen Rings über das entsprechende ortho-Dichinonderivat nachgewiesen werden [114].

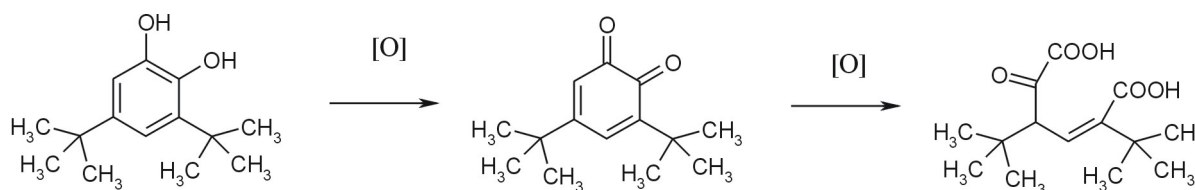


Abbildung 18: Oxidative Spaltung eines Catechol-Derivats

Auf der Basis experimenteller Daten nimmt W. Flaig [114] folgendes an:

- Synthetische Modellsubstanzen sind mehr oder weniger ein Polymer auf der Basis von Hydroxy-p-Benzochinon;
- Es existiert eine o-p-Tautomerisation der Hydroxy-chinoiden Struktur;
- Teilweise erfolgt Spaltung des Rings;
- Dicarboxylische Säuren werden teilweise decarboxyliert;
- Entsprechend den physikalischen Eigenschaften ist das Polymer verzweigt;
- Inter- und intramolekulare Chinhydrone werden geformt.

Der letzte Punkt führt zum Schluß, dass das Polymer als Elektronenaustauscher fungiert und ein Redoxsystem darstellt. Es begünstigt die globuläre Struktur des Polymers, wobei die Charge-Transfer-Komplexregionen als eine Art „Klebstoff“ wirken.

2.2.6.2. Modellsubstanzen für Huminstoff-gebundene Rückstände

Die ausgeprägte polydisperse Struktur natürlicher Huminstoffmaterialien erschwert die Charakterisierung ihrer Eigenschaften bezüglich Reaktivität, Bindung und Transport von Metallionen und Xenobiotika [64].

Modellsubstanzen können einen Beitrag zur Aufklärung der Entstehungspfade gebundener Schadstoffrückstände an Huminstoffe leisten. Neben der Wechselwirkung eines bereits vorliegenden Huminstoffsystems mit den Schadsubstanzen wird als weiterer Bildungsmechanismus die Einpolymerisierung dieser Verbindungen im Verlauf des Entstehungsprozesses der Huminstoffe aus ihren Vorstufen vorgeschlagen [75]. Da diese Huminstoffvorstufen in der Lage sind, in der Konformationsphase Nichthuminstoffe in den Humifizierungsprozeß mit einzuschleusen, existiert die Vorstellung, dass auch Pestizide und andere anthropogene Substanzen als „Nichthuminstoffe“ an der Stelle von Zuckern und Aminosäuren in das Huminstoffsystem einpolymerisiert werden. Die Durchführung solcher Studien in natürlichen Systemen ist sehr komplex. Modellsysteme stellen aufgrund ihrer strukturellen Vereinfachung und der Möglichkeit, Laborversuche durchzuführen, ein nützliches Werkzeug zur Erweiterung des vorliegenden Kenntnisstands dar.

Anhand der synthetischen Modellsubstanzen lassen sich zudem ganze Sätze von Modellen mit bekannter Zusammensetzung und definierten Eigenschaften bereitstellen, um daran z.B. das Bindungsverhalten von Fremdstoffen zu studieren. So wurde das Komplexierungsverhalten von Schwermetallionen bei verschiedenen Elementarzusammensetzungen untersucht [115].

Es wurden Modellreaktionen durchgeführt, um die Inkorporierung von Fremdsubstanzen in Huminstoffe aus Böden zu demonstrieren. So wurden verschiedene Aminosäuren oder Peptide als Nicht-Huminstoffanteile in das Huminstoffgeflecht einzupolymerisiert [116].

Haider et al. [117] konnten jeweils signifikante Mengen der zwölf essentiellen Aminosäuren in das Polymergerüst einbauen. Als Grundbaustein diente ihnen Brenzcatechin und Hydrochinon. Diese gebundenen Aminosäuren waren beständig gegen Hydrolyse. Bei verschiedenen Peptiden konnten alle Aminosäuren bis auf die N-terminal gebundene hydrolysiert werden. Die Umsetzung von Serumalbumin führte zur Reaktion am N-terminalen Ende, sowie mit der ϵ -Aminofunktion der Protein-Lysine.

Auch andere Fremdsubstanzen, die keine Aminosäuren darstellen, können in das Polymergerüst eingebaut werden. So wurden in unserer Arbeitsgruppe synthetische Huminstoffe mit Natriumsulfid oder Ammoniak dargestellt [99]. Tabelle 8 zeigt die Elementarzusammensetzung einiger so synthetisierter Modellsubstanzen.

Tabelle 8: Elementarzusammensetzungen ausgewählter synthetischer Modellsubstanzen*

Probe**	Zusatz	Menge	C	H	N	O	S
HS 100	-	-	54,00	3,51		44,55	
FS 101	-	-	50,71	3,67		47,50	
HS 28	Glycin	0,34g	57,59	3,49	1,03	40,27	
FS 27	Glycin	0,34g	53,12	3,52	0,85	43,29	
HS 25	Glycin	1,72g	56,88	3,41	2,11	39,31	
FS 26	Glycin	1,72g	51,61	3,62	0,85	41,77	
HS 102	β -Alanin	1,00g	50,64	3,80	2,30	40,10	
FS 103	β -Alanin	1,00g	47,32	3,93	2,25	44,28	
HS 104	β -Alanin	2,00g	51,56	3,91	3,33	37,35	
FS 105	β -Alanin	2,00g	48,10	4,08	2,92	42,35	
HS 108	Natriumsulfid	0,70g	56,55	3,54		40,98	0,93
FS 109	Natriumsulfid	0,70g	51,19	3,88		44,63	1,18
HS 110	Natriumsulfid	1,40g	55,55	3,55		42,27	2,01
FS 111	Natriumsulfid	1,40g	48,07	3,81		43,47	2,10
HS 20	L-Cystein	0,54g	55,48	3,31	1,18	36,52	1,85
FS 21	L-Cystein	0,54g	50,40	3,23	0,76	44,42	2,08
HS 6	L-Cystein	2,70g	48,81	3,01	3,77	34,64	6,65
FS 19	L-Cystein	2,70g	45,90	3,20	2,45	42,01	7,20
HS 2	Ammoniak	k.A.	50,35	3,63	10,60	34,92	
FS 35	Ammoniak	k.A.	48,00	3,69	7,06	39,59	

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass es zur Copolymerisation mit den eingesetzten Zusätzen kommt. Die zugesetzte Menge an Fremdstoffen korreliert mit dem Stickstoff- bzw. Schwefelgehalt.

PSM waren ebenfalls intensiver Untersuchungsgegenstand zur Bestimmung gebundener Rückstände. Untersuchungen zum Bindungsverhalten von Pestiziden wurden entweder durch Reaktion mit den synthetischen Modellsubstanzen oder mit den entsprechenden Monomeren während des Polymerisierungsprozesses durchgeführt. Mathur und Morley [118] ließen das Insektizid Methoxychlor mit Hydrochinon reagieren und fanden, daß nach mehrfacher Extraktion mit Lösungsmitteln noch etwa 4-5% des Methoxychlors in der Modellsubstanz verblieben sind. Daher vermuteten sie, daß Pestizide an die Huminstoffe, entweder über kovalente oder starke adsorptive Bindungsformen, die mit gewöhnlicher Lösungsmittlextraktion nicht zu überwinden sind, gebunden werden.

* Sämtliche Huminstoffe wurden synthetisiert aus 5,0g Hydrochinon. Oxidation erfolgte mit Luftsauerstoff unter Zugabe von Natriumcarbonat. Zusätzlich eingesetzte Mengen an Detergentien sind aufgeführt.

** HS = Huminsäure; FS = Fulvinsäure

Adrian et al. [119] konnten über eine analoge Synthesevariante 4-Chloranilin bei der Reaktion mit Brenzcatechin addieren. In Abbildung 19 ist ein vorgeschlagenes Reaktionsschema für die Einbindung von 4-Chloranilin an o-Benzochinon dargestellt.

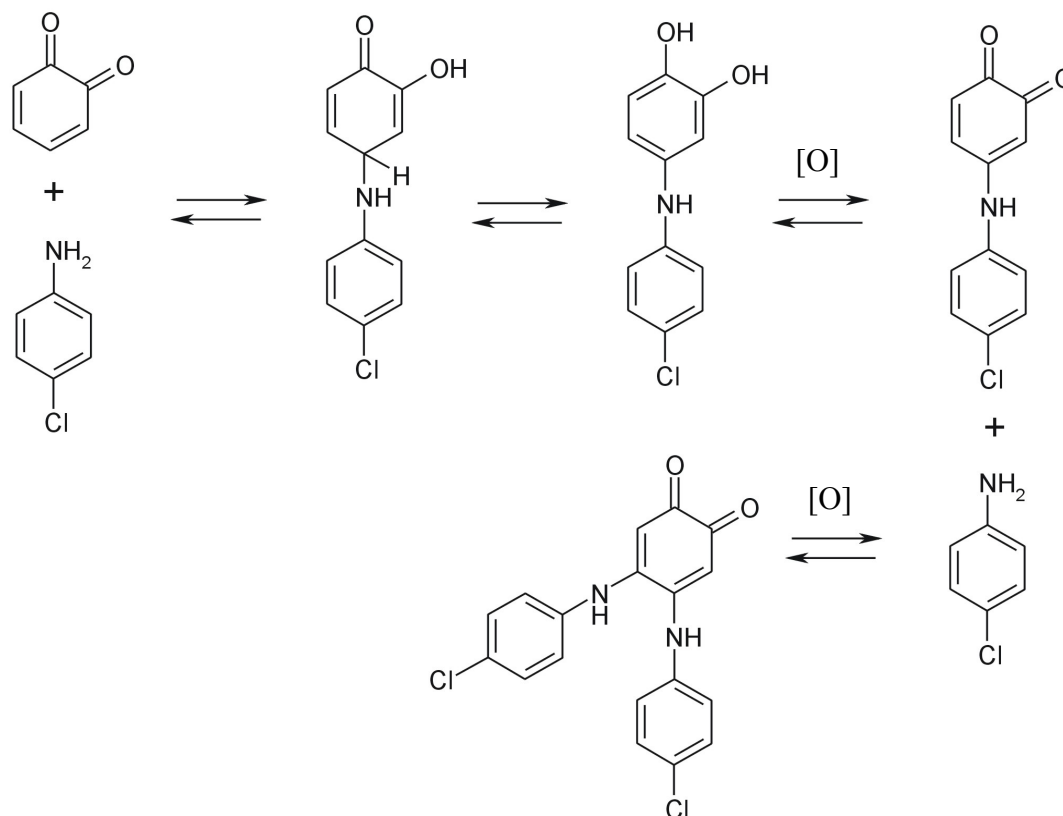


Abbildung 19: Vorgeschlagenes Reaktionsschema für die Addition von 4-Chloranilin an Brenzcatechin [119]

Brenzcatechin addiert hierbei nach Oxidation zum o-Chinon über 1,4-Addition und nachfolgende Oxidation zwei Mole des Anilins. Auch andere ring-substituierte Aniline reagieren mit chinoiden Systemen [120, 121] oder auch Huminsäuren [122]. Van der Trenck et al. [123] wiesen in Modellreaktionen die Copolymerisation von 4-Chloranilin mit Coniferylalkohol in Lignin nach.

Atrazin wurde unter abiotischen Bedingungen in ein Modellpolymer aus Brenzcatechin einpolymerisiert. Die Mengen waren jedoch relativ gering und konnten mit Methoden wie UV/VIS- und FTIR-Spektroskopie nicht nachgewiesen werden [116]. G. Bertin et al. [124] konnte durch Modifikation der Synthese Brenzcatechinpolymere darstellen, an denen einpolymerisiertes Atrazin mit IR-Spektroskopie nachzuweisen war. F. Andreux et al. [125] geben an, bei der Synthese von Modellsubstanzen mit Atrazin und seinen Metaboliten Desethylatrazin und Desisopropylatrazin 75-86% des eingesetzten Triazins einpolymerisiert zu haben. Bei Diaminoatrazin lag dieser Wert sogar bei 99,5% und im letzterem Fall wurde der größte Teil der gebundenen Rückstände in der Huminsäurefraktion gefunden. Es wird angenommen, dass

die freien Aminogruppen die Inkorporation in das Huminsäurepolymer begünstigen. Es wurden die in Abbildung 20 abgebildeten Intermediärstrukturen vorgeschlagen, jedoch wurde bislang keine dieser Substanzen nachgewiesen.

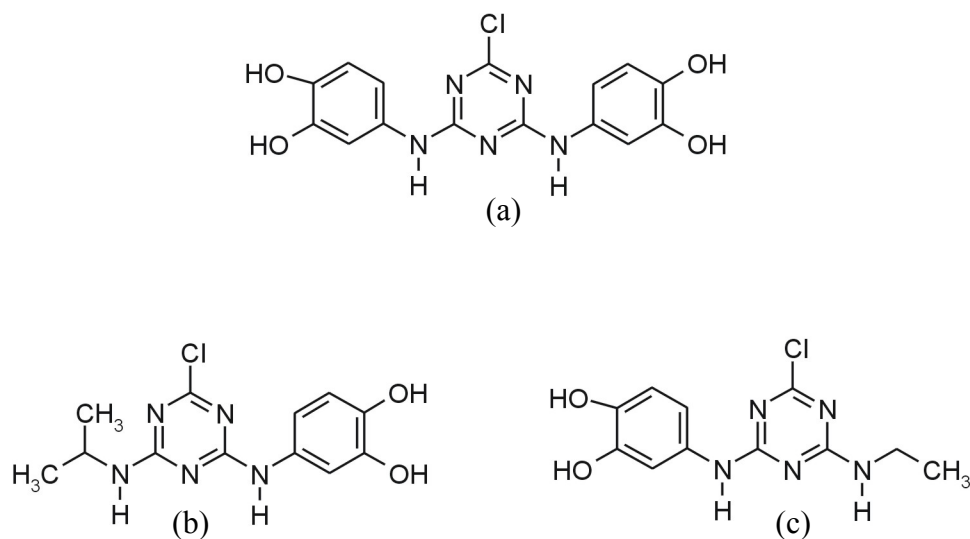


Abbildung 20: Vorgeschlagene Strukturen für Reaktionsprodukte mit dealkylierten Derivaten von Atrazin: Diaminoatrazin (a), Desethylatrazin (b), Desisopropylatrazin (c)

2.3. Antikörper

Unser Immunsystem bestreitet einen wichtigen Teil der Abwehrreaktionen des Körpers [126, 127]. Es wehrt Krankheitserreger und Schadstoffe ab, denen wir alltäglich ausgesetzt sind, findet und eliminiert körpereigene Zellen, die unkontrolliert wachsen oder von intrazellulären Parasiten befallen sind. Dabei werden die eigenen Organe und Gewebe zuverlässig als solche erkannt und nicht angegriffen. Teil dieses Immunsystems sind neben einer Armada von Fress- und Killerzellen, die eingedrungene Fremdkörper attackieren, auch die Antikörper [128].

Die schützende Wirkung von Antikörpern oder Immunglobulinen (Ig) leitet sich aus ihrer Fähigkeit ab, mit Fremdsubstanzen spezifische Komplexe zu bilden, die anschließend bestimmte Effektormechanismen des Immunsystems aktivieren und letztlich zur Zerstörung und Eliminierung des Eindringlings führen. Substanzen, die im Körper eine spezifische Antikörpersynthese generieren, werden als Antigene (Antikörpergenerator) bezeichnet. Bei ihnen handelt es sich stets um Makromoleküle die Proteine, Polysaccharide oder Nukleinsäuren enthalten [129].

2.3.1. Struktur der Antikörper

Antikörper stellen Glykoproteine dar. Die elementare Struktureinheit aller Antikörper ist stets dieselbe, unabhängig von ihrer Spezifität [128, 129]. Die Abbildung 21 zeigt die Struktur eines Antikörpers. Jede Grundeinheit besteht aus vier Polypeptidketten; Zwei identischen schweren Ketten (H) und zwei identischen leichten Ketten (L). Die H-Ketten bestehen aus etwa 450-600 Aminosäuren, die L-Ketten aus etwa 220 Monomeren. Die Ketten sind jeweils durch Disulfidbrücken und nicht-kovalente Interaktionen miteinander verknüpft. Die H- und L-Ketten weisen jeweils eine konstante (C) und eine variable (V) Region auf. Während die konstante C-Region für sekundäre biologische Funktionen wie z.B. Komplement- und Makrophagenbindung zuständig ist und für die Antigenbindung keine Rolle spielt, formen die variablen V-Regionen am N-terminalen Ende der H- und L-Ketten jene Position am Antikörper, an die das Antigen spezifisch gebunden wird. Diese wird auch als Paratop bezeichnet. Die variablen V-Regionen wiederum gliedern sich in drei hypervariable Regionen, welche als Komplementarität-bestimmende Regionen (engl.: complementarity-determining regions (CDR)) bezeichnet werden. Die CDR, die den Antikörper mit einer einmaligen Spezifität für ein bestimmtes Antigen versehen, sind jeweils in vier Rahmenregionen (FR: Frame) eingebettet, die bei allen Antikörpern relativ ähnlich sind [129, 130, 131].

Immunglobulinmonomere lassen sich durch Proteaseabbau in kleinere Komponenten zerlegen. Mit Papain beispielsweise erhält man drei Fragmente, davon zwei identische F_{ab} -Fragmente (ab: antibody binding), die Antigenbindungsstellen aufweisen, und ein drittes Fragment F_c , das über keine Antigenbindungsstelle verfügt. Im Gegensatz zum F_{ab} kann das

F_c-Fragment (c: cristallizable) aufgrund seiner homogenen Struktur aus einem Antiserum kristallisiert werden [129]. Abbildung 21 zeigt schematisch die Struktur eines Antikörpers.

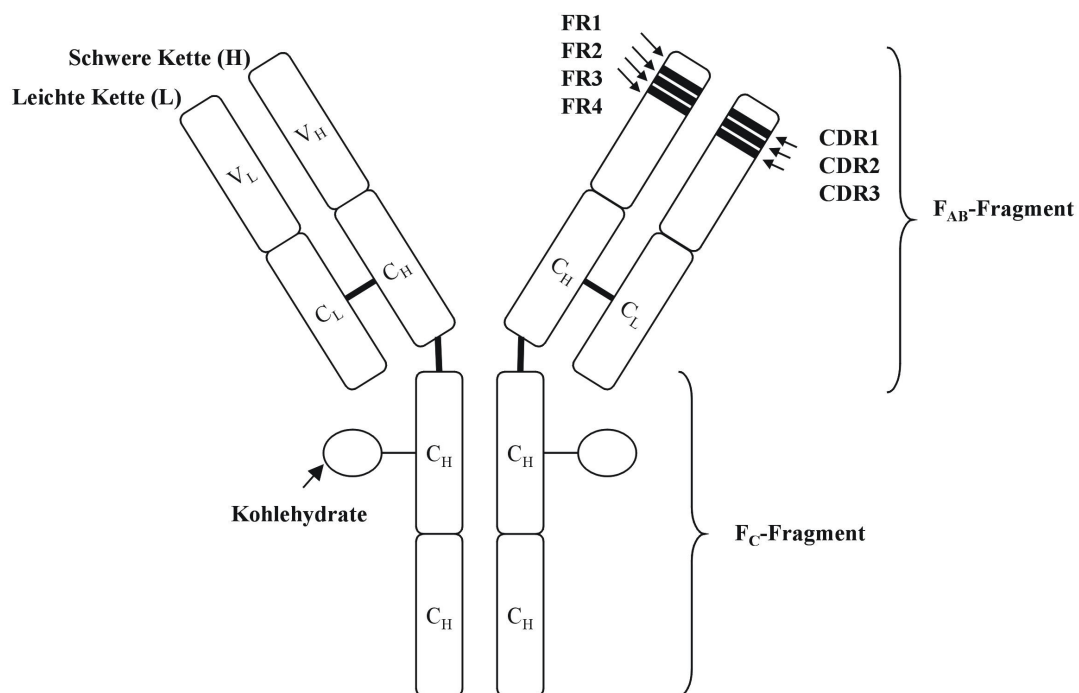


Abbildung 21: Struktur eines IgG-Antikörpers [nach 130]

Die meisten Säugetiere verfügen über fünf unterschiedliche Immunglobulin-Klassen (IgA, IgD, IgE, IgG*, IgM). Sie unterscheiden sich in der Sequenz der Aminosäuren, sowie im Kohlenhydratanteil der schweren Ketten. Es gibt insgesamt neun H-Ketten-Isotype, hingegen nur zwei Typen der L-Ketten, nämlich kappa (κ) und lambda (λ) [130, 131].

Der größte Teil des Antiserums besteht aus Immunglobulin G (Abbildung 21), beim Menschen beispielsweise macht das IgG etwa 80% an der Immunglobulin-Gesamtmenge aus. Beim IgA und IgM handelt es sich um dimere bzw. pentamere Versionen des grundlegenden Immunglobulinmoleküls mit einigen zusätzlichen Proteinen, u.a. der sogenannten J-Kette (engl.: joining), die mit Disulfidgruppen an die Immunglobuline gekoppelt ist. IgA liegt in der Regel als Monomer vor [126].

2.3.2. Genese und Produktion von Antikörpern

Im Körper zirkulieren kontinuierlich B-Lymphozyten, die bestimmte Typen von weißen Blutkörperchen darstellen. Wie alle Blutzellen werden sie aus gemeinsamen Stammzellen im

* IgG hat die vier Unterklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4, die sich in den schweren γ -Ketten unterscheiden. [126]

Knochenmark gebildet [126]. Die B-Lymphozyten (bzw. B-Zellen) tragen auf der Zelloberfläche ein spezifisches Antikörpermolekül als Rezeptor. Kommt nun eine B-Zelle mit „seinem“ Antigen in Kontakt, so beginnt sie sich zu teilen und zu vermehren. Es entsteht ein Zellklon, eine Familie von Zellen genetisch identischer Zusammensetzung [128].

Ferner wird durch die Antigenbindung die Differenzierung der B-Zellen angeregt. Die meisten B-Zellen reifen zu Plasmazellen heran, die darauf spezialisiert sind, den für das Antigen spezifischen Antikörper in großen Mengen freizusetzen. Ein weiterer Teil der B-Zellen wird zu Gedächtniszellen, die für die sogenannte sekundäre Immunantwort verantwortlich zeichnen. Eine besondere Eigenschaft des Immunsystems ist nämlich, daß ein Tier oder Mensch kaum zweimal von genau dem gleichen Erreger infiziert wird, da er nach einer überstandenen Infektion gegen diesen Erreger immun ist. Dies liegt darin begründet, daß die Gedächtniszellen viel schneller zur Bildung von Antikörpern in der Lage sind, als B-Zellen, die noch nie Kontakt mit „ihrem“ Antigen hatten [126]. Auf diesem immunologischen Prinzip beruht auch die Impfung: Ein abgeschwächter Krankheitserreger mit intakter Immunität löst eine Immunreaktion aus, Plasma- und Gedächtniszellen werden gebildet und können im Falle einer Infektion mit dem virulenten Erreger sofort reagieren [128]. Die Genese der Antikörper erfolgt bei Vertebraten (Wirbeltieren) vor allem in sekundären Lymphoidgeweben wie z.B. Milz, Lymphknoten und Mandeln [129].

Über eine ausführliche Diskussion der Antikörperbildung und der Prozesse, die im Organismus ablaufen, findet man umfangreiche Literatur, z. B. [126, 127].

2.3.2.1. Immunogen

Im Allgemeinen muß die Größe eines Moleküls etwa 3000 Dalton betragen, um die Bildung von Antikörpern induzieren zu können. Aufgrund der mikrobiologischen Abläufe im Organismus, die an dieser Stelle nicht näher ausgeführt werden, sind niedermolekulare Verbindungen im Gegensatz von Antigenen nicht in der Lage, Antikörperbildung auszulösen. Da sie jedoch auch zur Bildung von Komplexen mit Antikörpern befähigt sind, werden sie als Haptene bezeichnet [129, 131]. Um dennoch Antikörper im Fall von kleinen Substanzen gewinnen zu können, muß man diesen Mangel beheben, indem das Hapten kovalent an ein größeres Molekül, in der Regel an ein Protein gekoppelt wird. Das Molekül nach der Kopplung wird als Immunogen bezeichnet. Die Proteinträger, die Verwendung finden, sind beispielsweise Globulinfraktionen, Serumalbumine, Ovalbumin, Thyroglobulin und Fibrinogen. Es hat auch Bemühungen gegeben, Nichtproteinstrukturen wie Liposome oder Dextran als Trägersubstanzen einzusetzen [130]. Keyhole limpet hemocyanin (KLH), ein aus Schnecken gewonnenes Protein wird jedoch oft als ein überlegenes Protein angesehen, da es dem Immunsystem der Wirbeltiere fremd ist und dieses stark stimuliert [132].

Ein wichtiger Punkt, der beachtet werden muß, ist die Position der kovalenten Kopplung des Haptens an das Trägermaterial [133, 134]. Eine derartige Kopplung bringt stets eine Verände-

rung in der molekularen Struktur mit sich, die sich nachteilig auf die Spezifität der entstehenden Antikörper auswirken kann. Es muß daher sorgfältig geprüft werden, welches Epitop dem Immunsystem präsentiert werden soll. Die Kooplung ist so durchzuführen, daß die antigene Determinante möglichst unverändert bleibt. Bei niedermolekularen Haptene ist ferner die Einführung von Spacergruppen notwendig, um eine optimale Lage des Analyten auf der Proteinoberfläche zu gewährleisten. Meist haben diese Spacer eine Länge von drei bis sechs Kohlenstoff-Atomen.

Das Immunogen ist nun in der Lage, im Tierkörper eine Immunantwort zu induzieren. Dabei entstehen Antikörper, die in der Lage sind, die spezifische Struktur der angekoppelten Haptene zu erkennen [129].

2.3.2.2. Polyklonale Antikörper

In den Anfängen der Immunchemie wurden ausschließlich polyklonale Antikörper (pAb) verwendet. Man gewinnt sie nach Immunisierung aus dem Blut von Wirbeltieren. Die Auswahl des zu immunisierenden Tieres muß aufgrund von Kriterien wie der gewünschten Menge an Antiserum oder den Beschaffungs- und Haltungskosten des jeweiligen Tiers erfolgen. Zur Produktion geringerer Mengen Antiserum sind weiße Neuseeland-Kaninchen, und zur Produktion größerer Mengen Ziegen am gebräuchlichsten [136]. Aber auch Versuchstiere wie Meerschweinchen, Hühner, Ratten, Pferde und Schafe finden als Wirt Verwendung.

Jede Injektion eines Antigens in den Tierkörper führt zur Produktion einer Vielzahl von Plasmazellen, die Antikörper bilden, die sich gegen unterschiedliche antigene Positionen richten. Diese Antikörper sind gegen unterschiedliche Epitope auf dem Antigen gerichtet. Ein derartiges Antiserum wird als polyklonal bezeichnet, wobei der Begriff der Polyklonalität auf die Tatsache verweist, daß die Antikörper eines Antiserums sich von einer Vielzahl von Plasmazellen ableiten. Ein Teil dieses Antiserums ist gegen das Immunogen gerichtet, die übrigen Antikörper stammen von früheren Kontakten mit weiteren Fremdanthigenen, denen das Tier über sein ganzes Leben ausgesetzt war [129]. Über die praktische Gewinnung von polyklonalen Antikörpern findet sich umfangreiche Fachliteratur, z.B. [129, 135, 136].

Der Vorteil der polyklonalen Antikörper liegt in der schnellen Verfügbarkeit des Antiserums bei verhältnismäßig geringem Aufwand und niedrigen Kosten. Nachteile sind einerseits die Uneinheitlichkeit der Seren, die vom Versuchstier und dem Zeitpunkt der Blutentnahme abhängen, andererseits stehen von den Antiseren stets nur begrenzte Mengen zur Verfügung. Durch beides wird die Charakterisierung der Seren erheblich erschwert [130].

2.3.2.3. Monoklonale Antikörper

Über Jahrzehnte haben Immunologen versucht, den polydispersen Charakter der Antiseren zu eliminieren und monoklonale Antikörper herzustellen, die von einem einzigen B-Zellklon

abstammen. Die direkte Isolation ist bis heute nicht gelungen, da ein bestimmter Antikörpertyp im Blut nur in verschwindend geringer Menge vorkommt. Das Jahr 1975 kann heute als großer Meilenstein in der Geschichte der Immunologie angesehen werden. C. Milstein und G. Köhler [137] entdeckten, daß man quasi unbegrenzte Mengen homogener Antikörper fast jeder beliebigen Spezifität herstellen kann, wenn man eine antikörperproduzierende Plasmazelle mit einer Myelomzelle fusioniert.

Hierbei wird das Versuchstier zunächst mit dem zu analysierenden Antigen infiziert. Dann entfernt man die Milz und aus ihrem Lymphgewebe werden die reifen, Antikörperproduzierenden B-Zellen gewonnen [128]. Unter normalen Umständen sterben diese B-Lymphzyten in vitro nach zehn bis vierzehn Tagen ab und sind auch während dieser Zeit nur begrenzt teilungsfähig [129]. Man kann sie aber mit Myelomzellen, speziellen Krebszellen des Immunsystems fusionieren. Hierbei entstehen Hybridomzellen, die die Antikörperbildende Eigenschaft der B-Zellen mit der Unsterblichkeit der Krebszellen verbinden. Allerdings sind diese noch polyklonal. Sie enthalten eine bunte Mischung an Spezifitäten und müssen aufgetrennt werden. Anschließend werden die Hybridomzellen hinsichtlich ihrer Antikörperproduktion geprüft und zur Vermehrung bereitgestellt. Eine isolierte Hybridomzelle kann eine Zellpopulation erzeugen, die durch Zellteilung aus einer einzigen Zelle hervorgegangen ist. Dieser Zellklon kann eine unbegrenzte Menge an monoklonalen Antikörpern liefern, die nur eine einzige antigene Position erkennen. Hybridomzellen lassen sich einfrieren, nach beliebiger Zeit wieder auftauen und in vitro rekultivieren. Damit steht einem eine regenerierbare und unerschöpfliche Quelle an Antikörpern zur Verfügung [129].

Obwohl diese Einheitlichkeit einen wesentlichen Vorteil gegenüber polyklonalen Antiseren darstellt, darf nicht übersehen werden, daß die Herstellung monoklonaler Antikörper einen erheblichen Mehraufwand bedeutet, der einhergeht mit verhältnismäßig hohen Kosten. Auch sind monoklonale Antikörper nicht gleichbedeutend mit höherer Affinität und geringerer Kreuzreaktion [130]. Die Frage nach dem Einsatz polyklonaler oder monoklonaler Antikörper sollte eng an die gestellte Fragestellung geknüpft sein, um die Verschwendung von Ressourcen zu vermeiden.

2.4. Immunoassays

Die Immunchemie [131] beschäftigt sich mit Vorgängen, die die Reaktion eines Antikörpers mit seinem komplementären Antigen nutzen. Immunreaktionen stellen eine wichtige Klasse von Methoden dar, die das spezifische Schlüssel-Schloß-Prinzip zur Trennung von Analyten nutzen [138].

Durch Kopplung mit einem Signalträger gewinnt man Trennung und Detektion vereinende Analysenverfahren. Derartige Immunoassays (IA) [139, 140, 141] nehmen heute im Gesamtspektrum der analytischen Methoden eine bedeutende Stellung ein. Im Bereich der Medizinischen Diagnostik werden sie aufgrund ihrer Spezifität und Sensitivität zum Nachweis geringster Konzentrationen von spezifischen Proteinen, Nukleinsäuren und anderen biologischen Substanzen eingesetzt. In der klinischen Chemie stellen Immunoassays oftmals das Standardverfahren dar, da alternative Analysenverfahren zu teuer und nur als Referenzverfahren einsetzbar sind. Schwangerschaftstests beispielsweise beruhen auf einem Immunoassay, der das Plazenta-Hormon HCG (engl. human chorion gonatropin) im mütterlichen Urin nachweist, das nur während der Schwangerschaft auftritt [126, 127].

Daneben haben sich IAs als nützliche Screeningmethode im Bereich der niedermolekularen Analyten erwiesen, da sie Vorteile gegenüber anderen etablierten Analysenmethoden wie den Chromatographie-gekoppelten Techniken aufweisen. So können in der Umweltanalytik aquatische Proben häufig ohne aufwändige clean-up-Prozeduren oder Extraktionsschritte analysiert werden, die bei chromatographischen Methoden häufig den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellen. Die Empfindlichkeit der Tests ist vergleichbar, und man benötigt nur geringe Probenmengen im Millilitermaßstab. Außerdem können viele Proben in sehr kurzer Zeit vermessen werden. Konventionelle Methoden wie die GC sind dagegen teuer, verbrauchen viel Zeit und benötigen ein gut ausgerüstetes Laboratorium. Durch die Einführung von verstärkenden Enzymreaktionen als Signalträger kann die Detektion mittlerweile vergleichsweise nachweisstark und trotzdem kostengünstig, einfach und mit minimalem Equipment durchgeführt werden [57]. Die Ergebnisse liefern gute Korrelationen mit den Messdaten etablierter Methoden wie der HPLC/UV oder der GC/MS [142].

Die Praktikabilität der IAs ist jedoch je nach Verfügbarkeit der benötigten Antikörper eingeschränkt, da sie nur in spezialisierten Labors hergestellt werden können. Einige Beschränkungen sind den IAs auch dadurch auferlegt, dass sie de facto eine „Single-analyte“-Methode darstellen. Ein weiterer Nachteil ist der relativ kleine lineare Bereich der Analysenverfahren, der sich häufig nur über drei Größenordnungen erstreckt.

2.4.1. Theoretische Grundlagen

Grundsätzlich lassen sich Immunoassays auf die spezifische Reaktion zwischen Antigen (Ag) und Antikörper (AK) zu einem Antigen-Antikörper-Addukt (AgAK) zurückführen [143]:



Unter der Voraussetzung, dass der Ligand univalent und homogen ist, kann das nachfolgende Massenwirkungsgesetz aufgestellt werden:

$$K = \frac{[AgAK]}{[Ag][AK]} \quad (\text{Gleichung 2})$$

mit: [K]: Gleichgewichtskonstante (Affinitätskonstante)
 [Ag]: Konzentration freier Antigene im Gleichgewicht
 [AK]: Konzentration freier Antikörper im Gleichgewicht
 [AgAK]: Konzentration des Antigen-Antikörper-Addukts im Gleichgewicht

Die Affinitätskonstante weist in der Regel Werte zwischen 10^7 und 10^{12} L/Mol auf. Sie beschreibt die Bindungsstärke zwischen einem monovalenten Antigen und einer Antigenbindungsstelle [144]. Die Affinitätskonstante wird durch den Scatchard-Plot [145, 146] bestimmt. Die Scatchard-Beziehung leitet sich aus dem Massenwirkungsgesetz ab und lautet:

$$\frac{[B]}{[F]} = K([AK_{ges}] - [B]) \quad (\text{Gleichung 3})$$

mit: [B]: Konzentration gebundener Antikörper
 [F]: Konzentration freier Antikörper im Gleichgewicht ($[AK] \equiv [F]$)
 $[AK_{ges}]$: Gesamtkonzentration der Antikörper ($[AK_{ges}] = [B] + [F]$)

Durch Auftragung von $[B]/[F]$ gegen $[B]$ erhält man eine lineare Kurve, dessen Steigung $-K$ ist. In der Praxis können die Voraussetzungen für den Scatchard-Plot jedoch nur schwer eingehalten werden. Zum einen weisen polyklonale Antikörper eine Vielzahl an Antikörperpopulationen mit unterschiedlichen Affinitätskonstanten auf, weiterhin kann in vielen Fällen die völlige Einstellung des Gleichgewichts nicht abgewartet werden [143].

Während die Affinität die Bindungsstärke zwischen einer antigenen Determinante und einer einzelnen Antigenbindungsstelle bestimmt, bindet ein Antikörper an Antigene mit mehreren identischen Epitopen mit allen seinen Bindungsstellen. Das erhöht die Bindungsstärke, da beide Bindungsstellen gleichzeitig vom Antigen abdissoziieren müssen, wenn sich die beiden

Moleküle voneinander lösen sollen. Diese Bindungskoopertivität wird auch als Avidität bezeichnet, welche die Gesamtbindungsstärke zwischen einem Antikörper und einem Molekül beschreibt [144]. Für IgG kann eine bivalente Bindung die Avidität deutlich erhöhen.

Die Antigen-Antikörper-Bindung wird für sich genommen meist nicht direkt gemessen, sondern es wird zuvor einer der beiden Reaktionspartner markiert. Die Markierung wird so gewählt, dass sie messtechnisch leicht zu erfassen ist. Ihr Ausmaß (Konzentration) wird beschrieben durch die spezifische Aktivität s :

$$s = \frac{\text{Zahl der Signale}}{\text{Masse}} \quad (\text{Gleichung 4})$$

Sie ist unabhängig von der Art der Markierung, auf die in Abschnitt 2.4.2. eingegangen wird. Das fundamentale Differenzierungskriterium für Immunoassays ist das Testformat [147, 148]. Man unterscheidet:

- Nicht-kompetitive Immunoassays und
- Kompetitive Immunoassays

Beide Formate zeigen grundsätzlich unterschiedliches Verhalten und werden daher unabhängig voneinander behandelt. Häufig wird auch die Art des Labels oder des gemessenen Signals als Klassifizierungskriterium herangezogen. Die Einordnung mit Hilfe äußerer Kriterien erlaubt jedoch nicht die Vorhersage der typischen Merkmale des Immunoassays und ist daher ungeeignet [129].

2.4.1.1. Theoretische Grundlagen nicht-kompetitiver Immunoassays

Bei nicht-kompetitiven Immunoassays wird im Fall der Bestimmung des Antigens der Antikörper und zur Bestimmung von Antikörpern das Antigen markiert. Das Prinzip nicht-kompetitiver Immunoassays leitet sich von der Radiochemischen Analyse ab, bei der als Markersubstanzen radioaktiv markierte Reaktionspartner eingesetzt werden. Für eine bekannte spezifische Aktivität s des eingesetzten Tracers folgt:

$$s = \frac{\Lambda_0}{m_0} \quad (\text{Gleichung 5})$$

mit: Λ_0 : Zahl der Signale (Aktivität des Tracers) [s^{-1}]
 m_0 : Masse des Tracers [g]

Die zu bestimmende Substanz wird quantitativ mit Tracerüberschuß in einer Antigen-Antikörper-Reaktion umgesetzt und nach Abtrennung des Reaktionsprodukts in diesem das Signal detektiert, das direkt proportional zu der Analytkonzentration ist. Es folgt für die spezifische Aktivität s :

$$s = \frac{\Lambda_x}{m_x} \quad (\text{Gleichung 6})$$

bzw.

$$m_x = \frac{\Lambda_x}{s} \quad (\text{Gleichung 7})$$

mit: Λ_x : Aktivität der Messprobe nach Tracerzugabe [s^{-1}]
 m_x : Masse des Analyten [g]

Da die spezifische Aktivität s unverändert bleibt und bekannt ist, kann durch Bestimmung der Signalanzahl (Aktivität) der Messprobe Λ_x die Masse des Analyten m_x berechnet werden. Die oben genannten Formeln lassen sich auf alle andere Markierungsarten übertragen.

Mit dem nicht-kompetitiven IA können nur Analyte untersucht werden, wenn sie ausreichende Größe aufweisen. So müssen Antigene mindestens zwei Epitope für die Bindung von zwei verschiedenen Antikörpern aufweisen.

2.4.1.2. Theoretische Grundlagen kompetitiver Immunoassays

Die theoretischen Grundlagen kompetitiver Immunoassays leiten sich von der substöchiometrischen inversen Isotopenverdünnungsanalyse ab. Bei der einfachen Isotopenverdünnungsanalyse (IVA) handelt es sich um eine Methode der quantitativen Analyse, bei der dem zu bestimmenden Stoff eine geringe, genau definierte Menge desselben Stoffs, aber in markierter Form zugesetzt wird. Die Methode kann auf Elemente, aber auch auf Verbindungen angewendet werden. Voraussetzung ist lediglich eine entsprechende Markierung. Die Methode wurde für Markierungen durch Radioisotope entwickelt [149], sie ist aber auf beliebige andere Markierungstypen übertragbar, wenn man berücksichtigt, dass die Aktivität der Zahl der emittierten Signale des eingesetzten Tracers entspricht.

Wird ein gleichartiger, markierter Tracer mit der spezifischen Aktivität s_0 (Gleichung 5) und der Masse m_0 der inaktiven Probe mit Gewicht m_x hinzugefügt, so reduziert sich die spezifische Aktivität auf s_x :

$$s_x = \frac{\Lambda_0}{m_0 + m_x} \quad (\text{Gleichung 8})$$

Werden die Gleichungen (5) und (8) nach Λ_0 aufgelöst und gleichgesetzt, so folgt:

$$(m_0 + m_x)s_x = m_0s_0 \quad (\text{Gleichung 9})$$

Nach Umformung folgt:

$$m_x = m_0 \left(\frac{s_0}{s_x} - 1 \right) \quad (\text{Gleichung 10})$$

mit: m_x : zu bestimmende Masse inaktiver Substanz
 m_0 : Masse markierter Substanz
 s_0 : spezifische Aktivität vor Zugabe inaktivem Materials
 s_x : spezifische Aktivität nach Zugabe inaktivem Materials

Gleichung 10 gibt die Kernformel der einfachen IVA wieder. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität s_x und s_0 und damit der Mengenbestimmung genügt die Isolierung einer ausreichenden Teilmenge, denn es kommt dabei nur auf die Bestimmung von Konzentrationen an. Es ist unerheblich, ob die Isolierung quantitativ erfolgt. Die dazu notwendigen Mengenbestimmungen können beispielsweise durch Wägung erfolgen. Wichtig ist jedoch die Reinheit des Isolats.

Bei der normalen IVA wird die Masse m_x der zu bestimmenden inaktiven Substanz durch Verdünnen mit gleichartigem, markierten Material bestimmt. Zur Bestimmung markierter Substanzen wird die inverse Verdünnungsanalyse eingesetzt. Hierbei wird ein Aliquot m_0 der zu bestimmenden markierten Substanz rein isoliert und seine spezifische Aktivität s_0 bestimmt. Ein anderes Aliquot wird mit inaktivem Material der Masse m_x versetzt, wobei die spezifische Aktivität auf s_x sinkt, während die Aktivität Λ konstant bleibt. Aus den bestimmten Aktivitäten:

$$\Lambda = s_0 m_0 \quad (\text{Gleichung 11})$$

und

$$\Lambda = s_x (m_x + m_0) \quad (\text{Gleichung 12})$$

folgt durch Gleichsetzen die Kernformel der inversen IVA:

$$m_0 = m_x \left(\frac{s_x}{s_0 - s_x} \right) \quad (\text{Gleichung 13})$$

mit: m_0 : zu bestimmende Masse markierter Substanz
 m_x : Masse inaktiver Substanz
 s_0 : spezifische Aktivität vor Zugabe inaktivem Materials
 s_x : spezifische Aktivität nach Zugabe inaktivem Materials

Die Notwendigkeit zur Isolierung relativ großer Mengen für die Massenbestimmungen erlaubt es nicht, mit der IVA Spurenanalytik zu betreiben. Dies wurde erst durch die von J. Ruzicka und J. Stary [150, 151, 152] entwickelte substöchiometrische IVA bzw. ihrer Varianten möglich. Das Problem der in kleinen Mengen nicht bestimmbar markierten Substanzen wird von ihnen gelöst, indem vom unverdünnten Markierungsreagenz und der verdünnten Probe jeweils die gleichen Mengen m_{vor} bzw. m_{nach} isoliert werden. Dann gilt:

$$m_{\text{vor}} = m_{\text{nach}} \quad (\text{Gleichung 14})$$

und aus Gleichung 10 wird somit:

$$m_x = m_0 \left(\frac{\Lambda_{\text{vor}}}{\Lambda_{\text{nach}}} - 1 \right) \quad (\text{Gleichung 15})$$

mit: m_x : zu bestimmende Masse inaktiver Substanz
 m_0 : Masse markierter Substanz
 Λ_{vor} : Aktivität vor Zugabe inaktivem Materials
 Λ_{nach} : Aktivität nach Zugabe inaktivem Materials

Für die substöchiometrische IVA ist die Mengenbestimmung in den abgetrennten Anteilen obsolet. Die Bestimmung ist auf zwei Aktivitätsmessungen (Λ_{vor} und Λ_{nach}) reduziert.

Um Spurenanalytik für radioaktiv oder anderweitig markierte Substanzen zu betreiben, muß die substöchiometrische inverse IVA eingesetzt werden. Trennt man in unverdünnten und verdünnten Aliquoten der Probe jeweils wieder einen charakteristischen Anteil ab, d.h.:

$$m_{\text{vor}} = m_{\text{nach}} \quad (\text{Gleichung 16})$$

so resultiert aus Gleichung (13) durch umformen:

$$m_0 = m_x \left(\frac{\Lambda_{\text{nach}}}{\Lambda_{\text{vor}} - \Lambda_{\text{nach}}} \right) \quad (\text{Gleichung 17})$$

mit: m_0 : zubestimmende Masse markierter Substanz
 m_x : Masse inaktiver Substanz (konstant)
 Λ_{vor} : Aktivität vor Zugabe inaktivem Materials
 Λ_{nach} : Aktivität nach Zugabe inaktivem Materials

Die Gleichung (17) stellt die Kerngleichung der substöchiometrischen inversen IVA und damit vom kompetitiven Immunoassay dar. Sie gestattet wie die „normale“ inverse Isotopenverdünnungsanalyse die Bestimmung markierter Substanzen durch Verdünnung mit inaktivem Material. Im Gegensatz zur „normalen“ inversen IVA sind bei der substöchiometrischen Variante keine Mengenbestimmungen nötig und die Empfindlichkeit daher wesentlich größer.

Durch Umformen der Gleichung (17) erhält man:

$$\Lambda_R = \frac{\Lambda_{\text{nach}}}{\Lambda_{\text{vor}}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{m_x}{m_0} \right)} \quad (\text{Gleichung 18})$$

mit: Λ_R : relative Aktivität ($= \Lambda_{\text{nach}} / \Lambda_{\text{vor}}$)
 Λ_{vor} : Aktivität vor Zugabe inaktivem Materials
 Λ_{nach} : Aktivität nach Zugabe inaktivem Materials
 m_x : Masse inaktiver Substanz (konstant)
 m_0 : zu bestimmende Masse markierter Substanz

Je kleiner die gemessene relative Aktivität Λ_R wird, desto kleiner ist die Analytmenge an markiertem Material m_0 bei konstanter Menge inaktivem Materials m_x . Trägt man die relative Aktivität Λ_R als Funktion von der Masse des zu bestimmenden Analyten m_0 auf, so erhält man in halblogarithmischer Auftragung einen sigmoidalen Kurvenverlauf (Abbildung 22).

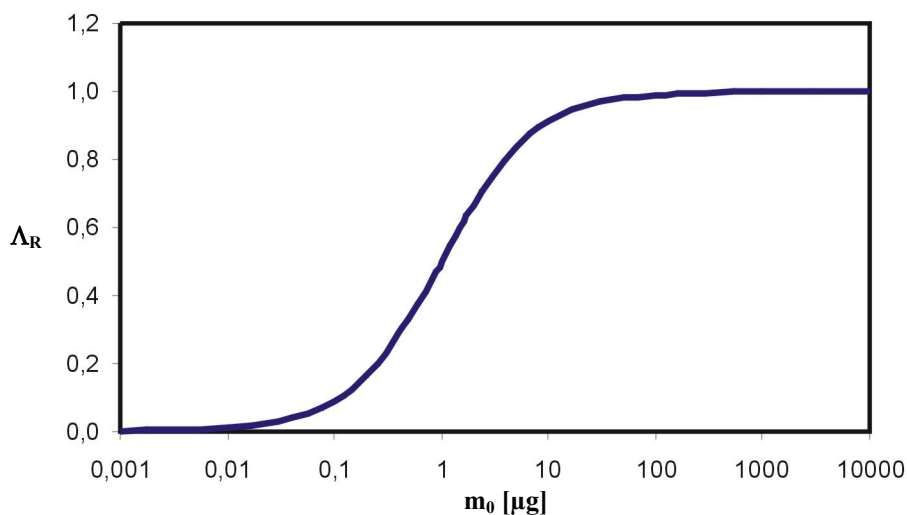


Abbildung 22: Kalibrationskurve der substöchiometrischen inversen IVA ($m_x=1\mu\text{g}$)

Die Kurve gibt den Zusammenhang zwischen Signal (bzw. relativer Aktivität Λ_R) und Analytgewicht m_0 für den Fall $m_x = 1\mu\text{g}$ wieder. Sie weist einen „Testmittelpunkt“ auf, an dem die Analytmenge der zugesetzten Masse markierter Substanz entspricht. Der Bereich um den Testmittelpunkt ist durch eine hohe Steigung gekennzeichnet und für quantitative Bestimmungen geeignet. Er wird von zwei Bereichen umschlossen, in denen selbst große Änderungen in der Masse m_0 nur geringfügige Änderungen der relativen Aktivität Λ_R bewirken.

2.4.2. Labels

Im Allgemeinen ist die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung für sich allein nur für die Abtrennung der zu bestimmenden Substanz geeignet. Zur quantitativen Detektion müssen Signalträger (Label) angebracht und die Anzahl seiner Signale mengenmäßig erfasst werden. Dies erfolgt in der Regel unter Anwendung physikalisch-chemischer Meßmethoden. Die häufigsten in Immunoassays angewendeten Labels sind:

- Radionuklide - Messung der emittierten Strahlung
- Lumineszenz - Messung der emittierten Photonen
- Enzyme - Photometrische Bestimmung der durch die Enzymreaktion gebildete Molekülanzahl

2.4.2.1. Radionuklide

Die älteste Immunoassay-Technik ist der Radioimmunoassay [153, 154]. Als Marker werden Radionuklide verwendet, deren β - oder γ -Strahlung durch Flüssig-Szintillations-Zähler (engl.: Liquid Scintillation Counter (LSC)) bzw. Natriumiodid/Thallium-Szintillationsdetektoren aufgenommen wird. Im ersten Radioimmunoassay war das Iod-131-Radionuklid der verwendete Signalgeber. Als besonders starker γ -Strahler wurde es 1959 von R.S. Yalow und S.A. Berson [153] erfolgreich zur Quantifizierung von Insulin eingesetzt. Die Entwicklung der Radioimmunoassays stellte aus heutiger Sicht einen Quantensprung in der Immunchemieforschung und der klinischen Diagnostik dar [155]. Weitere im RIA eingesetzte Labels sind beispielsweise Iod-125, Kohlenstoff-14, Wasserstoff-3, Phosphor-32 und Schwefel-35 [136].

Radioimmunoassays zeichnen sich durch hohes Nachweisvermögen aus. Manche Verbindungen lassen sich in Konzentrationen von pg/mL bestimmen. Außerdem kann jede immunogene Substanz bestimmt werden, wenn sie rein und radioaktiv markiert zur Verfügung steht. Nachteile des RIA sind die hohen Kosten für Markierungsreagentien, Entsorgung der radioaktiven Abfälle und die Notwendigkeit des teuren Betriebs eines Isotopenlabors [135].

2.4.2.2. Lumineszenz

Die Bezeichnung Lumineszenz [156] dient als Oberbegriff für Lichtemissionsprozesse wie Fluoreszenz, Phosphoreszenz und Chemilumineszenz. Sie ist damit ein Sonderfall der Emis-

sion [157]. Moleküle können unter Absorption von Energie vom elektronischen Grundzustand S_0 in einen höheren elektronischen Singulett-Zustand S_1 angeregt werden. Bei Lumineszenz erfolgt diese Anregung durch Licht, d.h. Photonen entsprechender Energie (Abbildung 23).

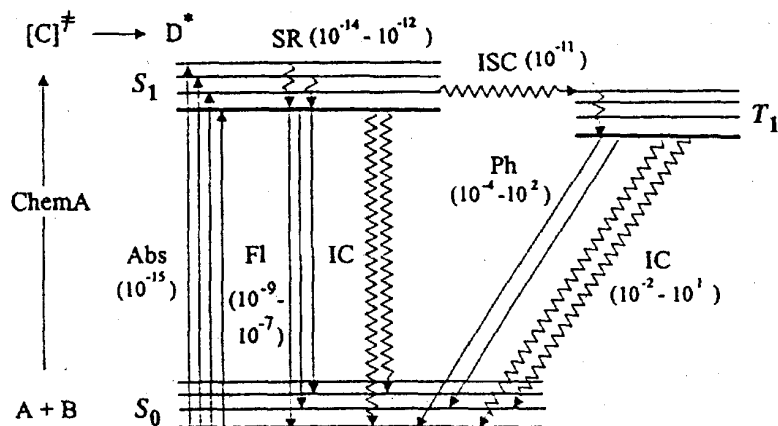


Abbildung 23: Vereinfachtes Termschema photophysikalischer Prozesse (Durchgezogene Linien entsprechen strahlenden und Wellenlinien strahlungslosen Übergängen) *

Nach Photonenabsorption (Abs) relaxiert der angeregte Zustand auf verschiedene Arten in den Grundzustand. Bei der strahlungslosen Desaktivierung geht die überschüssige Energie durch „internal conversion“ (IC), „intersystem crossing“ (ISC) d.h. Übergang in den Triplettzustand T_1 oder Quenching in Form von Wärmestrahlung verloren. Alternativ kann einer von zwei Lichtemissionsprozessen erfolgen: Fluoreszenz (FI) oder Phosphoreszenz (Ph).

Fluoreszenz entsteht, wenn bei dem Übergang aus dem angeregten S_1 - in den S_0 -Grundzustand wieder Photonen emittiert werden. Phosphoreszenz entsteht, wenn das Molekül aus einem Triplettzustand T_1 über einen verbotenen Übergang in den Grundzustand S_0 zurückfällt [158, 159]. Fluoreszenzimmunoassays [131, 157] nutzen Fluoreszenzsignale für die Detektion von Tracermolekülen. Der am häufigsten eingesetzte Fluoreszenzmarker ist Fluoresceinthiocyanat (FITC), möglicherweise wegen der hohen Quantenausbeute und Stabilität. Grundsätzlich sind Fluoreszenzmessungen mit höchster Empfindlichkeit möglich, in der Praxis ist die Sensitivität aber durch Untergrundfluoreszenz, Lichtstreuung und Löscheffekte drastisch eingeschränkt. Das Untergrundsignal resultiert hauptsächlich aus der Eigenfluoreszenz von Serumbestandteilen, die einen breiten Wellenlängenbereich überdeckt. Phosphoreszenzimmunoassays mit phosphoreszierenden Markern haben sich nicht durchgesetzt, da bei den langlebigen Phosphoreszenzprozessen strahlungslose Desaktivierung zu geringer Effizienz führt.

* Angabe der Lebensdauer τ [s] in Klammern; Abs=Absorption; FI=Fluoreszenz; Ph=Phosphoreszenz; SR=Schwingsrelaxation; ChemA=Chemische Anregung; IC=internal conversion; ISC=intersystem crossing

Chemilumineszenz entsteht, wenn Luminophore Substanzen durch chemische Reaktion in angeregte Zustände S_1 promoviert werden (ChemA; Abbildung 23) und anschließend Photonen emittieren. Die Oxidation der chemilumineszenten Arylhydrazide Luminol und Isoluminol durch Meerrettichperoxidase liefert beispielsweise in einer hohen Quantenausbeute Licht [160]. Die Quantenausbeute ist der Prozentsatz der Ausgangsmoleküle, die ein Photon emittierendes Endprodukt liefern und liegt in diesem Fall bei etwa 1%. Immunoassays mit Chemilumineszenzmarkern weisen im Einzelfall eine höhere Sensitivität als Enzymimmunoassays auf. Jedoch kommt es auch hier wie beim Fluoreszenzimmunoassay durch Matrixmaterialien zu Lichtstreuungseffekten („Quenching“), wodurch die Quantenausbeute und damit die Sensitivität beeinträchtigt wird [160, 161].

2.4.2.3. Enzyme

Bei der Entwicklung von Immunoassays mit Enzymen als Signalträger macht man sich die katalytische Aktivität dieser biologischen Materialien nutzbar. Unter Einsatz entsprechender Substratlösungen wird die charakteristische Enzymreaktion durchgeführt und die Menge des Enzymkonjugats in Form des durch gefärbten, fluoreszierenden oder chemilumineszierenden Reaktionsprodukts gemessen [147]. In der IA-Nomenklatur kommt es zu überlappenden Formulierungen, wenn beispielsweise Enzyme als Label verwendet werden und diese durch fluoreszierende Substrate nachgewiesen werden. Je nach definierendem Autor ist dies dann ein Enzym- bzw. ein Fluoreszenzimmunoassay. Als Enzyme werden heute insbesondere Peroxidase, Alkalische Phosphatase und β -Galactosidase eingesetzt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Enzyme, die häufig im Enzymimmunoassay verwendet werden [130]

Enzym	Quelle	Molekulargewicht	pH – Optimum*
Peroxidase	Meerrettich	40.000	5 – 7
Alkalische Phosphatase	Kalbsdünndarm	100.000	9 – 10
β -Galactosidase	Escherichia coli	540.000	6 – 8

Weiterhin finden in Spezialfällen auch Glukoseoxidase, Urease, Ribonuclease oder Glukose-6-phosphat-dehydrogenase Anwendung [131, 162]. Verschiedene Enzymsubstrate kommen zum Einsatz, bei denen Farbveränderungen durch photometrische Detektion bestimmt werden. Grundlage der Photometrie ist das Lambert-Beersche-Gesetz, es herrscht ein linearer Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration des erhaltenen Reaktionsprodukts. Häufig eingesetzte Enzymsubstrate, bei denen lösliche gefärbte Produkte entstehen, sind in Tabelle 10 dargestellt.

* pH-Bereich der maximalen Aktivität des Enzyms

Tabelle 10: Enzymsubstrate für Enzymimmunoassay

Enzym	Substrat	Kürzel	Absorptionsmessung bei
Peroxidase	3,3'-5,5'-Tetramethyl-benzidin / H ₂ O ₂	TMB	450nm
Peroxidase	o-Phenylendiamin / H ₂ O ₂	OPD	492nm
Peroxidase	2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benz-thiazolinsulfonsäure-6) / H ₂ O ₂	ABTS	405-410nm
Phosphatase	p-Nitrophenylphosphat	pNPP	405nm
β-Galactosidase	o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid	oNPG	405nm
β-Galactosidase	Chlorophenolrot-β-D-Galactopyranosid	-	574-578nm

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wird durch Hydrolyse einer Phosphatgruppe z.B. am pNPP und anschließende Messung der Absorption von p-Nitrophenol bei 405nm bestimmt. Analog läuft die Bestimmung von β-Galactosidase mit o-NPG, wobei das Enzym stereoselektiv glykosidische Bindungen spaltet.

Meerrettich-Peroxidase (POD) weist jedoch viel schnellere Geschwindigkeit als Phosphatase oder Galactosidase auf, mit der es Substrat umsetzt („Turnover number“) und ist zudem preiswerter. Wird POD mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) kombiniert, resultiert ein hochempfindliches Redoxsubstratsystem. TMB zeigt außerdem keine oder nur geringe mutagene und kanzerogene Aktivität. Es weist damit einen Vorteil gegenüber o-Phenylendiamin auf, das ebenfalls weit verbreitet ist [163].

Mechanistisch reagiert die Peroxidase zunächst mit H₂O₂ zur „Compound-I“ [164] (Abbildung 24), die danach in die „Compound-II“ [165] übergeht und dabei das farblose TMB zum blaugefärbten Radikalkation oxidiert.

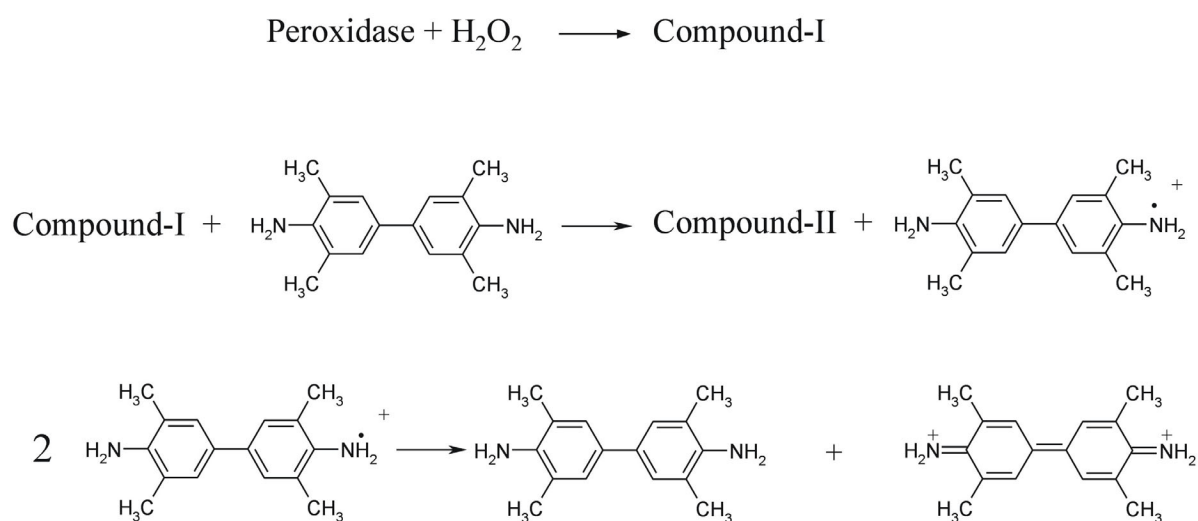


Abbildung 24: Reaktionen bei der katalytischen Umsetzung von Tetramethylbenzidin

Im nächsten Schritt wird das Radikal über eine Disproportionierungsreaktion zum gelben 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumsalz überführt. Das letzte Reaktionsgleichgewicht kann auch durch die Senkung des pH-Wertes auf pH 1,0 oder darunter, stark auf die Seite der Produkte verschoben werden. Die Absorption dieses gelben Produktes wird schließlich bei 450nm bestimmt [166]. Weitere Aspekte zum Reaktionsmechanismus sind in [167] aufgeführt.

Die Auswahl von Enzym und Substrat hängt aber noch von anderen Faktoren ab. Nachteil der Peroxidase ist beispielsweise, dass das zugegebene Wasserstoffperoxid nicht nur Substrat, sondern auch Inhibitor darstellt. Es können daher keine Langzeitkinetiken aufgenommen werden. In diesem Fall müsste beispielsweise auf die Alkalische Phosphatase ausgewichen werden. Die β -Galactosidase wiederum weist den Vorteil auf, dass sie nicht im Plasma oder Körperflüssigkeiten auftritt [162].

Die ersten Enzymimmunoassays waren auf die quantitative Bestimmung von IgG [168] und Gonatropin [169] ausgelegt. Heute macht die Klasse der Enzymimmunoassays die große Mehrzahl der routinemäßig eingesetzten Immunoassays aus. Dafür gibt es eine Reihe an Gründen:

- Hohe spezifische Aktivität der Enzyme
- Verfügbarkeit analytisch reiner und kostengünstiger Enzyme
- Einfache Konjugationsmethoden bei milden Reaktionsbedingungen
- Hohe Stabilität der Enzyme und Enzymkonjugate im Test und bei Lagerung
- Verfügbarkeit günstiger, stabiler und ungiftiger Substrate
- Kostengünstige Ausrüstung
- Wenig störanfällige und einfach zu handhabende photometrische Auswerteeinheit

2.4.2.4. Optische Methoden

Die Synthese von Tracersubstanzen ist arbeits- und kostenaufwendig. Daher sind in jüngster Zeit optische Methoden, die ohne Markierungssubstanzen auskommen, verstärkt in den Vordergrund getreten. Mittlerweile wurde die Sensitivität der Methoden soweit gesteigert, dass der direkte Nachweis von Rezeptor-Ligand- und Antikörper-Antigen-Interaktionen möglich ist [170]. Beispiele sind die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) [171], die Oberflächenplasmonresonanz (surface plasmon resonance (SPR)) [172] und die Submonolayer-Ellipsometrie [173].

Grundlage der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) [174] ist die Mehrfachreflexion von polychromatischem Licht an dünnen Schichten. Beim Lichteinfall auf die Substratoberfläche bildet sich ein Reflexionsspektrum mit einem Interferenzmuster, das von den optischen Schichtdicken der einzelnen Schichten abhängt. Die Bindung von Molekülen auf der Substratoberfläche, z.B. die von Antikörpern, ändert die optische Schichtdicke, die von

Brechungsindex und der Schichtdicke der angelagerten Moleküle abhängt. Dadurch verschiebt sich das Interferogramm und damit auch die Lage der zur Auswertung herangezogenen Extrempunkte. Die quantitative Bestimmung der angelagerten Moleküle wird möglich [175].

Die Oberflächenplasmonresonanz [176] nutzt das Phänomen der Totalen Internen Reflexion. Ein Lichtstrahl, der sich in einem Medium hoher Dichte fortsetzt und dort auf eine Schicht mit einem niedrigeren Brechungsindex trifft, wird an der Grenzschicht total reflektiert und setzt sich im höher refraktiven Medium fort. Voraussetzung für die Totalreflexion ist ein Einfallswinkel, der oberhalb des kritischen Winkels liegt. Der Lichtstrahl hinterlässt an der Grenzschicht eine elektromagnetische Intensität, eine infinitesimale Welle, die in das niedrigere refraktive Medium eindringt. Die Durchdringungstiefe entspricht etwa einer Lichtwellenlänge. Bei Beschichtung der Grenzschicht mit einem dünnem Metallfilm werden elektromagnetische Oberflächen-Plasmonwellen („Surface Plasmons“) zur Fortpflanzung in der Grenzschicht angeregt. Das wiederum führt zu einer verstärkten infinitesimalen Welle. Dadurch werden die Bedingungen für die Anregung einer Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) erheblich empfindlicher gegenüber Brechungsindex-Veränderungen nahe der Grenzschicht. Bei konstanter Wellenlänge und konstantem Einfallswinkel des eintretenden Lichts kann die SPR als Delle in der gemessenen Intensität des reflektierten Lichts beobachtet werden. Stattfindende biomolekulare Interaktionen verändern die Konzentration des gelösten Stoffs und damit den Brechungsindex innerhalb der Durchdringungstiefe der infinitesimalen Welle. Die resultierende Verschiebung des Dellenminimums ist das Ergebnis der Brechungsindex-Veränderung. Die Brechungsindex-Verschiebung ist bei gegebener Konzentration für alle organischen Moleküle wie Proteine oder Nukleinsäuren nahezu gleich. Der SPR-Detektor ist daher nur von der angelagerten Masse an Biomolekülen abhängig.

Unter Ellipsometrie wird ein Verfahren verstanden, bei dem polarisierte Lichtwellen von einem Träger reflektiert werden. Die Spur von Feldstärkevektoren der Lichtwellen hat, entgegen der Strahlrichtung betrachtet, die Form einer Ellipse. Daher resultiert der Begriff Ellipsometrie. Durch Reflexion kommt es zu einer Veränderung des Polarisationszustands der Lichtwelle. Eine dünne Schicht auf dem Träger verändert den Polarisationszustand des reflektierten Lichts zusätzlich. Aus den beiden detektierten ellipsometrischen Kenngrößen Orientierung und Elliptizität wird die Dicke der angelagerten Molekülschicht berechnet.

Mit der Submonolayer-Ellipsometrie, einer Fortentwicklung der Ellipsometrie, konnte die Sensitivität soweit gesteigert werden, dass auch nicht geschlossene Schichtsysteme untersucht werden können. Die Methode ist bereits so sensitiv, dass geringe molekulare Oberflächenkontaminationen erfasst werden können [173]. Lichtquelle ist hierbei ein HeNe-Laser, dessen Polarisation verändert werden kann. Kernstück des Submonolayer-Ellipsometers ist ein feh-

lerkorrigierter Schrittmotor mit einer physikalischen Schrittweite von $0,001^\circ$ und einer virtuellen Auflösung von $0,0001^\circ$.*

Die ANDREA (**A**nisotropieberücksichtigende, **n**icht kontaktierende, partielle **R**esonanz nutzende, **e**igenpolarisationsverstärkende **A**nalyse) – Ellipsometrie ist eine Weiterentwicklung der Submonolayer-Ellipsometrie [177]. Die ANDREA-Technik ist in der Lage, Polysubmonolayerschichten zu untersuchen, das sind einmolekulare Schichten aus Molekülgemischen, die nicht geschlossen sind. Messtechnisch erfasst werden hierbei Parameter der reflektierten, elliptisch polarisierten Lichtwelle und Parameter der Meßobjektanisotropie, die durch Eigenpolarisationen und Eigenwerte beschrieben werden. Im Gegensatz zur Submonolayer-Ellipsometrie wird hier das anisotrope Probenverhalten berücksichtigt und nicht von makroskopisch isotropem Probenverhalten ausgegangen.

* Unter virtueller Auflösung wird die mathematisch berechnete Auflösung des Submonolayer-Ellipsometers verstanden.

2.4.3. Durchführung des kompetitiven Immunoassays

Beim kompetitiven Immunoassay für Antigene stellt der Antikörper, der im Unterschuß eingesetzt wird, das substöchiometrische Reagenz dar. Es existiert also nur eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen, um die freie und gemarkerte Antigene konkurrieren. Grundvoraussetzung für die Durchführung einer derartigen substöchiometrischen inversen IVA ist Abtrennung gleicher Massen an Antigenen. Dies wird durch Immobilisierung von Antigenen oder Antikörpern an eine feste Phase realisiert. Man unterscheidet direkte und indirekte Testformate. Beim direkten IA erfolgt „direkte“ Immobilisierung der Antikörper an die Oberfläche der Mikrotiterplatte, beim indirekten IA werden diese Antikörper „indirekt“ über Coatingantigene gebunden.

In Abbildung 25 ist die Durchführung des direkten kompetitiven Immunoassays am Beispiel eines Enzymimmunoassays schematisch dargestellt. Sie stellt die am häufigsten genutzte IA-Variante dar.

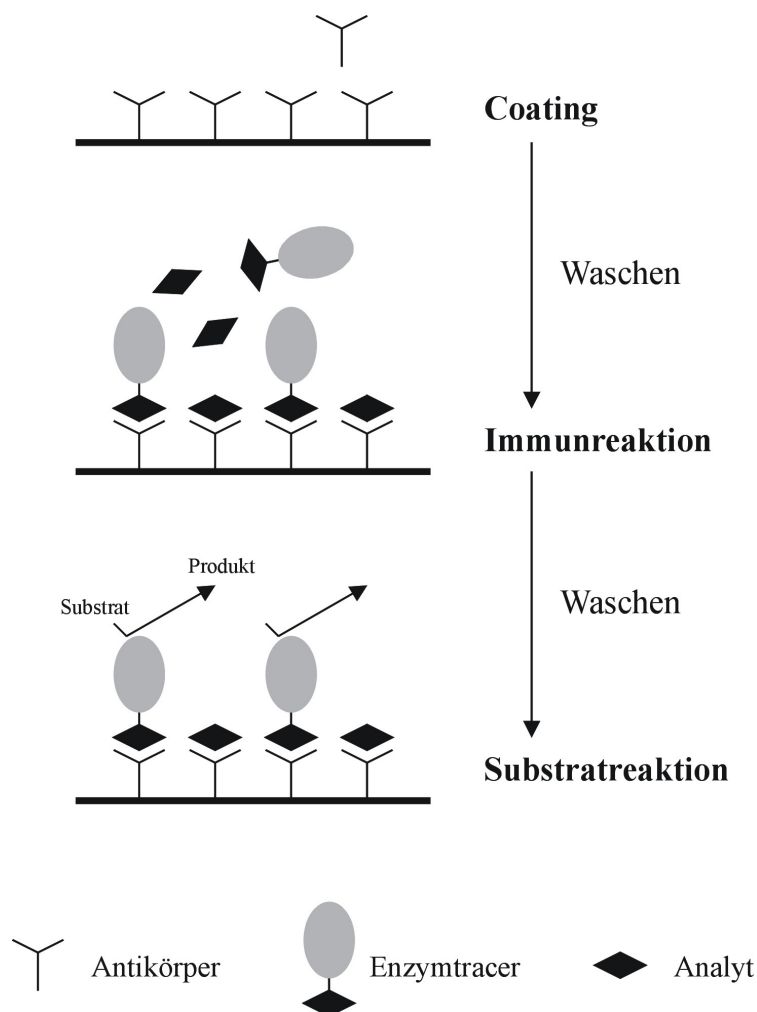


Abbildung 25: Durchführung des direkten kompetitiven ELISAs (nach [178])

Antikörper werden zunächst in konstanter Menge an eine feste Oberfläche, z.B. die Kavität einer Mikrotiterplatte adsorbiert („Coating“) und binden daher stets gleiche Mengen Antigene. Nach Waschen zur Entfernung der nicht-gebundenen Immunglobuline erfolgt Immunreaktion mit dem Analyten und dem Enzymtracer. Markierte Tracer werden jeweils in konstanten Mengen eingesetzt. Treten nun in einer Probe nebeneinander Hapten und Tracer auf, werden umso mehr Tracermoleküle gebunden, je weniger Hapten im Testansatz vorhanden ist.* Durch einen erneuten Waschschrift werden anschließend nicht-gebundene Moleküle entfernt. Dann erfolgt Zugabe eines Enzymsubstrats und die Bestimmung der Enzymaktivität über die Absorption. Diese verhält sich umgekehrt proportional zur Tracerkonzentration. Mit Hilfe von mitgeführten Kalibrationsreihen wird die Konzentration der unbekannten Probe ermittelt.

Die schematische Durchführung des indirekten IAs ist in Abbildung 26 wiedergegeben.

* Zur Vereinfachung sind die Antikörper in der Abbildung 25 monovalent dargestellt. Antikörper weisen in der Regel Polyvalenz auf. Das wichtigste Immunglobulin IgG ist divalent.

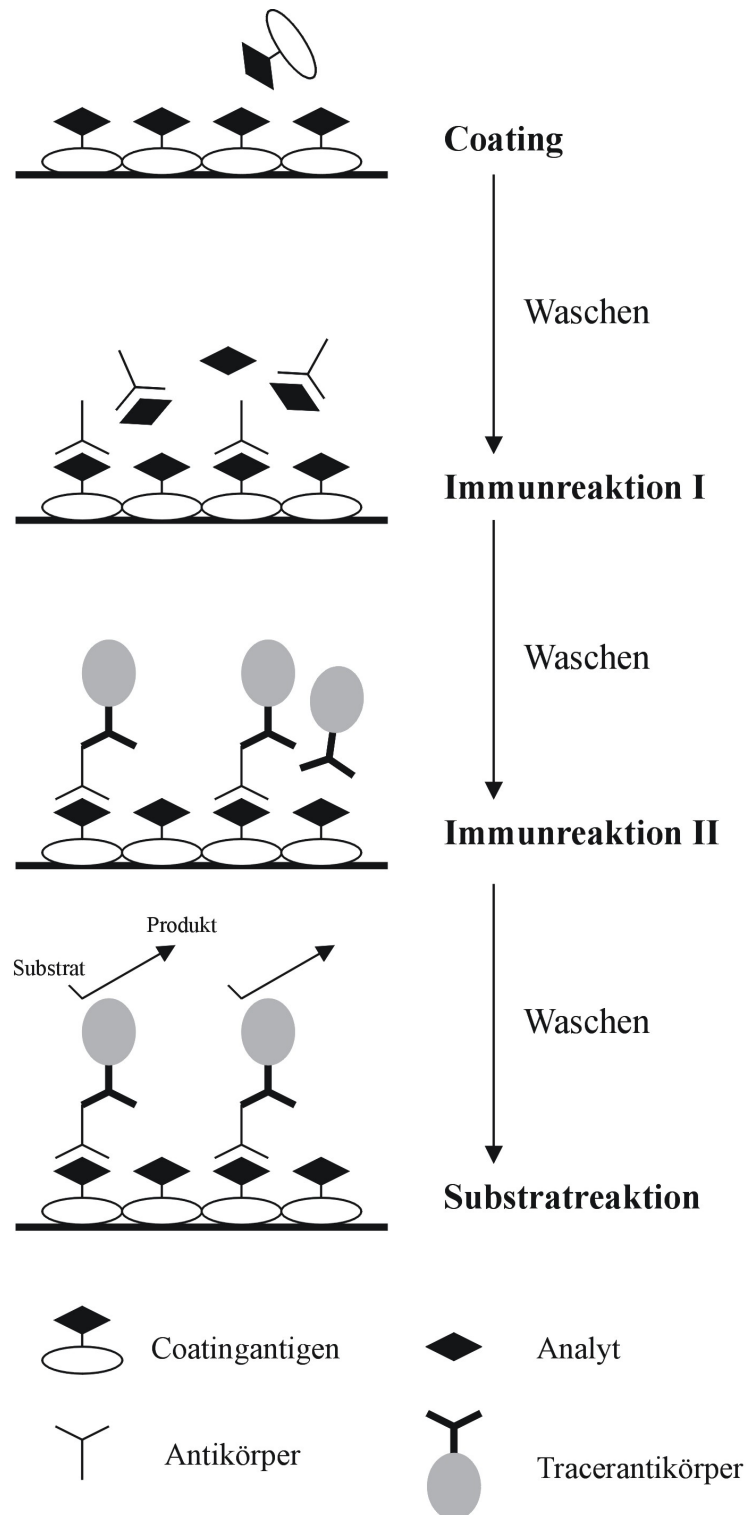


Abbildung 26: Durchführung des indirekten kompetitiven ELISAs [nach 178]

Beim indirekten ELISA wird mit einer konstanten Menge an Coatingantigen beschichtet, das antigene Strukturen auf seiner Oberfläche aufweist. Es besteht meist aus adsorbierbaren Proteinen mit kovalent gebundenen Haptenen. Die gleichmäßige Beschichtung mit Coatingantigen gewährleistet die Abtrennung gleicher Anteile substöchiometrischen Reagenzes aus der

Lösung. Nach einem Waschschrift kann je nach den vorliegenden Testbedingungen ein Blockierungsschrift zur Absättigung der freien Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte notwendig sein (in der Grafik nicht gezeigt). Ansonsten erfolgt die erste Immunreaktion, wobei die unbekannte Probe jeweils mit konstanter substöchiometrischer Menge Antikörper versetzt wird. Es tritt Konkurrenz zwischen den Coatingantigen-gebundenen Haptenen und dem freien Analyt um die Bindungsstellen auf. Je mehr Analyt in der Lösung vorliegt, desto weniger Antikörper wird an der Festphase immobilisiert. Die Menge an gebundenen Antikörpern ist umgekehrt proportional zur Analytmenge. Die primären Antikörper werden nach einem weiteren Waschschrift durch Sekundärantikörper quantifiziert, die an ein Enzym gekoppelt sind. Dieser Tracer-Antikörper bindet in einer zweiten Immunreaktion an den Primärantikörper. Eine abschließende Substratreaktion ergibt dann ein photometrisch auswertbares Messsignal. Durch direkte Kopplung des Primärantikörpers an ein Enzym kann das Verfahren um einen Inkubationsschrift reduziert werden. Die Enzymkopplung von Primärantikörpern ist jedoch nicht trivial, da die Antikörperaktivität reduziert werden kann. Sekundärantikörper hingegen sind kommerziell erhältlich und kostengünstig. Daher wird im Allgemeinen dem beschriebenen Verfahren der Vorzug gegeben.

Das gezeigte Format stellt einen heterogenen Test dar, bei dem im Verlauf der Analyse eine Phasentrennung durchgeführt wird. Die meisten kompetitiven Immunoassays sind heterogen, allerdings gibt es auch die Möglichkeit homogene Immunoassays aufzubauen [179]. Hierbei läuft die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung sowie der folgende Nachweis dieser Reaktion in einer homogenen Lösung ab. Signalgeber kann hierbei beispielsweise ein Enzymtracer sein, dessen Aktivität durch Bindung eines Analyten beeinträchtigt wird. Zwar vereinfacht der Verzicht auf Trennschritte das Testverfahren, jedoch treten relativ leicht gravierende Störungen durch Probenkomponenten auf. Daher wird häufig auf diesen Ansatz verzichtet.

2.4.4. Durchführung des nicht-kompetitiven Immunoassays

In Abbildung 27 ist die Durchführung des nicht-kompetitiven Immunoassays am Beispiel eines Enzymimmunoassays schematisch dargestellt.

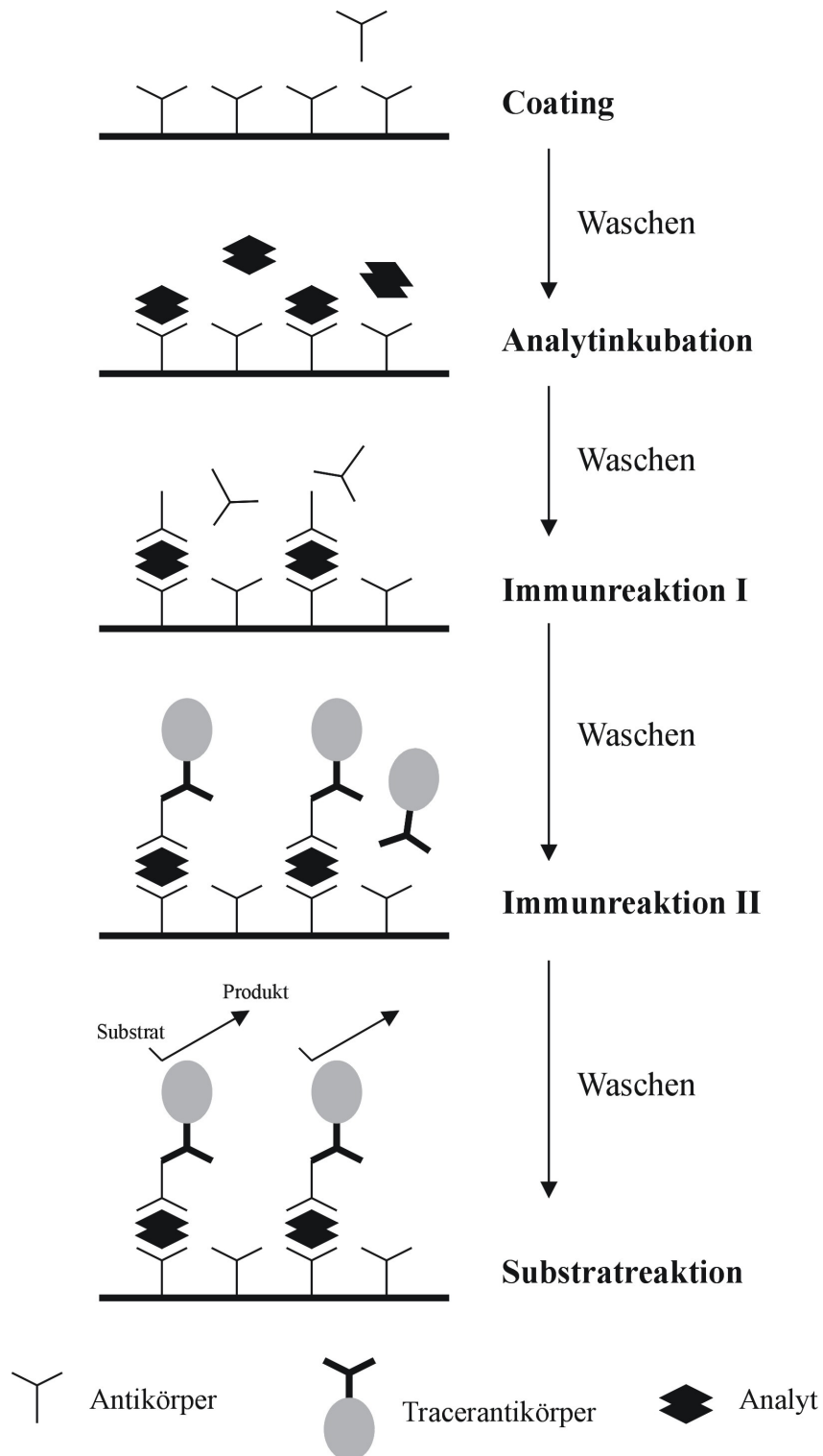


Abbildung 27: Durchführung eines nicht-kompetitiven ELISAs [nach 178]

Zunächst erfolgt Immobilisierung von Primärantikörpern an eine feste Phase. Man trennt so Analytmengen aus der Lösung ab, die proportional der Analytkonzentration in der Lösung sind. Die überschüssigen Analytanteile werden fortgespült und dann ein Sekundärantikörper zur Erkennung eines zweiten Epitops zugegeben. Dieser wird im Überschuß eingesetzt, um die verbliebenen, gebundenen Analyten quantitativ umzusetzen. Da der Analyt von zwei Antikörpern umschlossen ist, wird auch vom Sandwich-Immunoassay gesprochen [180]. Nach Immunreaktion erfolgt Detektion der immobilisierten Sekundärantikörper durch markierte Tertiärantikörper und anschließende signalgebende Substratreaktion.

2.4.5. Auswertung von Immunoassays

Zur Auswertung von Immunoassays wird die Höhe des Meßsignals gegen den Logarithmus der Analytkonzentration aufgetragen. Unabhängig vom vorliegenden Format erhält man eine sigmoidale Kurve. Die Internationale Atomenergiebehörde regte einen Vergleich verschiedener Verfahren zur Auswertung derartiger Immunoassay-Daten an. Darin wird die Anpassung der Daten an das logistische Modell von D. Rodboard [181, 182], eine 4-Parameter-Funktion als gut geeignet bewertet [183]:

$$y = \frac{(A - D)}{\left[1 + \left(\frac{x}{C} \right)^B \right]} + D \quad (\text{Gleichung 19})$$

mit:

- x: Konzentration des Analyten
- y: Signal (z.B. Extinktion beim Enzymimmunoassay)
- A: Maximales Signal (obere Asymptote)
- B: Steigung der Kurve am Testmittelpunkt
- C: Konzentration des Analyten am Testmittelpunkt
- D: Minimales Signal (untere Asymptote)

Der „fit“ wird iterativ durch einen Simplexalgorithmus entwickelt, bis ein Minimum in der Summe der Standardabweichungen erreicht wird [184]. Mit dem logistischen Modell können nicht-kompetitive und kompetitive Immunoassays gleichermaßen ausgewertet werden. Beim nicht-kompetitiven Immunoassay erhält man positive Steigungen, während man beim kompetitiven Immunoassay negative Steigungen erhält.

2.4.6. Enzymimmunoassays für die Analytik von Triazinherbiziden

Auch für Pflanzenschutzmittel wurden zahlreiche Immunoassays entwickelt [185]. Zum Nachweis von s-Triazinen, insbesondere Atrazin, in verschiedenen Matrices wurde eine Reihe von Enzymimmunoassays aufgebaut und verwendet. Eine Übersicht über derartige Immunoassaysysteme bietet die Arbeit von A. Dankwardt [22].

2.4.6.1. Antikörper für die Analytik von Triazinen

Antikörper zum sensitiven und selektiven Nachweis von Atrazin entstehen, wenn das Immunkonjugat Atrazinaminocaprinsäure-KLH (engl.: keyhole limpet hemocyanin) zur Immunisierung von Wirbeltieren verwendet wird (Abbildung 28) [90]. Diese Substanz wird aus der Kopplung von 2-Amino-hexancarbonsäure-4-Isopropylamino-6-Chloro-1,3,5-Triazin mit dem Trägerprotein Hämocyanin von Nacktschnecken (KLH) hergestellt und trägt Atrazinhapten, an denen die Ethylgruppe des Triazins durch einen C6-Spacer substituiert ist. Das Immunkonjugat wurde erfolgreich für die Immunisierung von Schafen [186] und Kaninchen [187] angewendet. Wenig später gelang es mit dem gleichen Hapten, den monoklonalen Antikörper mAb K4E7 aus Mäusen herzustellen [188]. Beim K4E7 wurde jedoch ein Immunkonjugat des Haptens mit Serumalbumin aus Rind eingesetzt.

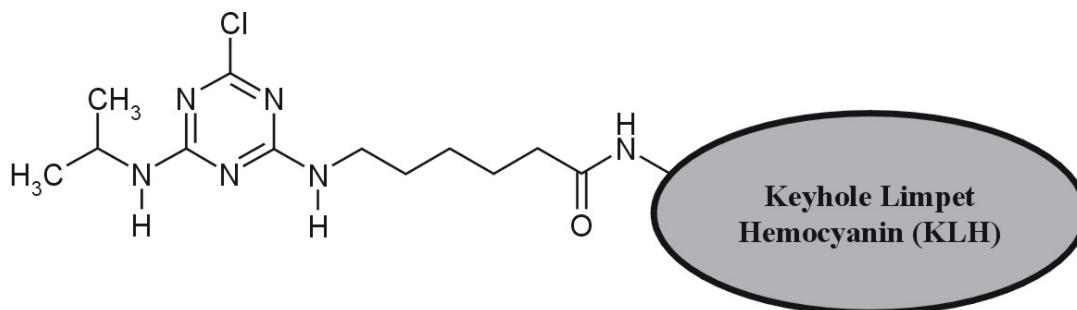


Abbildung 28: Immunkonjugat Atrazin-aminocaprinsäure-KLH

Mit dem gleichen Immunkonjugat produzierte A. Dankwardt (Firma Sension, Augsburg) das Antiserum AS46 aus Kaninchen.

Auch die Immunisierung mit einem Immunkonjugat aus der Kopplung von Ametrynsulfoxid (2-ethylamino-4-isopropylamino-6-methylsulfoxid-1,3,5-triazin) mit Rinderserumalbumin führt zu Atrazin-selektiven Antikörpern (Abbildung 29) [189, 190].

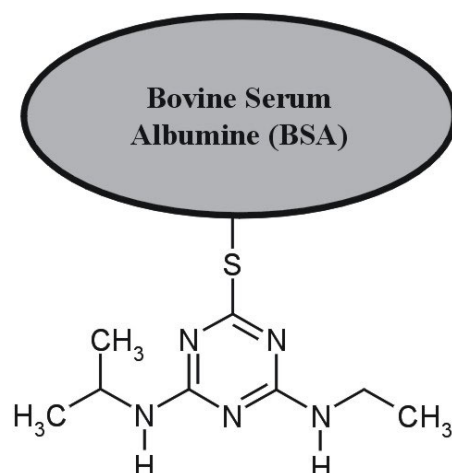


Abbildung 29: Immunkonjugat Ametrynsulfoxid-BSA für die Herstellung des Antikörpers K1F4

Einen Vertreter dieser Gruppe stellt der monoklonale Antikörper K1F4 dar, der durch Immunisierung von Mäusen erhalten wurde.

Das Antiserum pAb AS46 zeichnet sich im Vergleich zum mAb K1F4 durch eine bessere Nachweisgrenze für Atrazin aus. In Tabelle 11 sind die Testbereiche und Testmittelpunkte verschiedener Antikörper für die Triazinherbizide Atrazin und Terbutylazin wiedergegeben [74, 191].

Tabelle 11: Antikörper für die Detektion von Triazinherbiziden mit Immunoassay

Antikörper	Quelle	Analyt	Testbereich [µg/L]	IC ₅₀ [µg/L]*
K1F4	Maus	Atrazin	0,1 – 10	0,8
K1F4	Maus	Terbutylazin	0,05 – 5	0,3
K4E7	Maus	Atrazin	0,01 – 1	0,08
AS46	Kaninchen	Atrazin	0,02 – 2	0,2
AS46	Kaninchen	Terbutylazin	0,05 – 5	0,5
AS47	Kaninchen	Terbutylazin	0,03 – 3	0,3

Beim Antiserum AS47 handelt es sich um einen polyklonalen Antikörper, der zur sensitiven und selektiven Detektion von Terbutylazin geeignet ist. Er wurde durch die Immunisierung von Kaninchen gewonnen.

* IC₅₀: Testmittelpunkt

2.4.6.2. Enzymtracer für die Analytik von Triazinen

Bei Enzymimmunoassays für die Analytik von Triazinen hängt die Leistungsfähigkeit des Immunoassays nicht nur von der Charakteristik der verwendeten Antikörper, sondern auch von der Struktur des eingesetzten Enzymtracers ab, welcher mit den freien Analyten um die Bindungsstellen konkurriert.

Für den Antikörper K1F4 wird häufig der ET tert-Butyl (auch: „tert-Butyl-Tracer“) eingesetzt (Abbildung 30). Der Tracer stellt ein Konjugat aus dem Enzym Meerrettichperoxidase und mehreren gekoppelten Haptenen dar. In Kombination mit diesem Antikörper ergibt dieser Tracer einen leistungsstarken Enzymimmunoassay für Atrazin und Terbutylazin* [192].

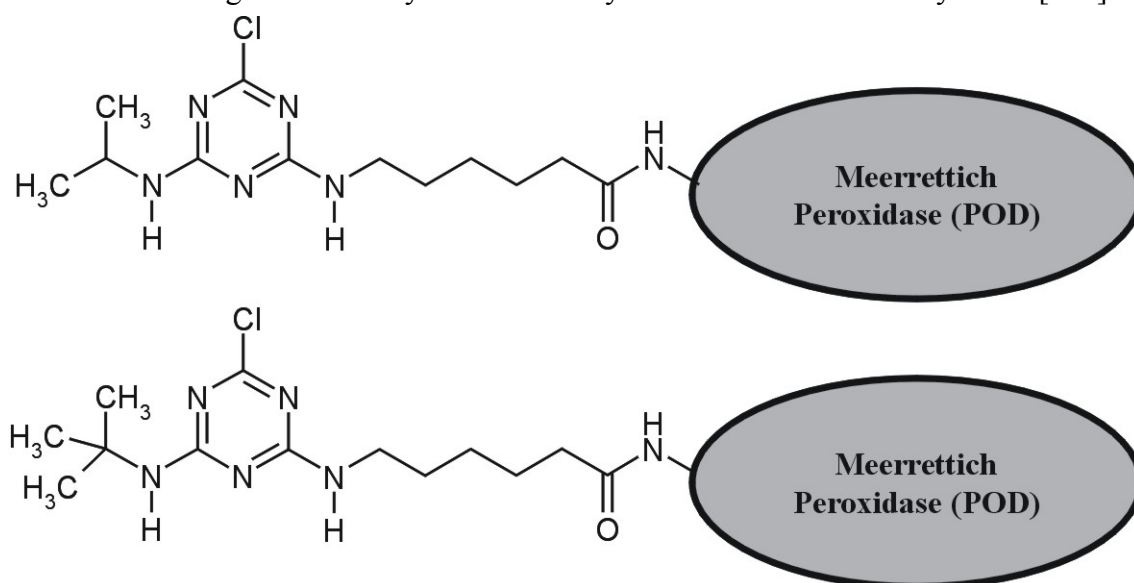


Abbildung 30: Schematische Strukturformeln für den „Isopropyl-Tracer“ (oben) und den „tert-Butyl-Tracer“ (unten)

Für die Darstellung des „tert-Butyl-Tracer“ wird zunächst ein Hapten synthetisiert, welches in der Lage ist, kovalent an die Peroxidase zu binden. Dieses ist das Triazinderivat 6-Chlor-2-(tert-butylamino)-1,3,5-triazin-4-(6-aminohexansäure), welches formal als ein Terbutylazinmolekül mit einem Hexancarbonsäurespacer an einer der beiden Aminofunktionen beschrieben werden kann [193].

Dieses Hapten wird mit der Meerrettichperoxidase nach der Carbodiimidkonjugationsmethode unter Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen den Carboxylgruppen und den freien Aminogruppen des Enzyms gekoppelt [192, 194].

Für die Antiseren AS46, sowie AS47 kommt der Enzymtracer ET Isopropyl zum Einsatz (Abbildung 30), der auch als „Isopropyl-Tracer“ beschrieben wird [192, 195]. Er hat eine mit

* EIA-Testmittelpunkt für Atrazin $IC_{50}=0,8\mu g/L$ und für Terbutylazin $IC_{50}=0,3\mu g/L$

dem „tert-Butyl-Tracer“ verwandte Struktur mit einer Methylgruppe weniger an der exponierten Alkylaminofunktion. Die Synthese läuft analog zu oben ab [22, 186].

2.4.7. Immunfiltration

Der laborunabhängige Einsatz diagnostischer Untersuchungen kann dazu beitragen, Kosten einzusparen und die Verfügbarkeit der relevanten Informationen zu beschleunigen. Konventionelle ELISAs sind im Vergleich mit instrumentellen Methoden zwar relativ einfach und schnell durchzuführen, sie erfordern jedoch ein gewisses Maß an Ausrüstung und Training, so dass auf ein Laboratorium und entsprechend ausgebildetes Personal nicht verzichtet werden kann.

Die Spezifikationen der ELISAs erlauben es jedoch, Schnelltestsysteme zu entwickeln, die direkt vor Ort eingesetzt werden können. Die ersten und bekanntesten Schnelltestsysteme wurden für die klinische Diagnostik entwickelt. Gegenwärtig werden beispielsweise der Blutzuckerspiegel, die Ovulation und das Schwangerschaftshormon Gonatropin auf der Basis von ELISAs gemessen [196, 197]. Auch für den Bereich der landwirtschaftlichen Diagnostik wurden Schnelltests für die Untersuchung verschiedener PSM entwickelt [198, 199, 188].

A. Dankwardt und B. Hock [200, 201] entwickelten einen immunchemischen Atrazin-Schnelltest nach dem Prinzip der Immunfiltration. Ihr Prinzip ist in Abbildung 31 dargestellt.

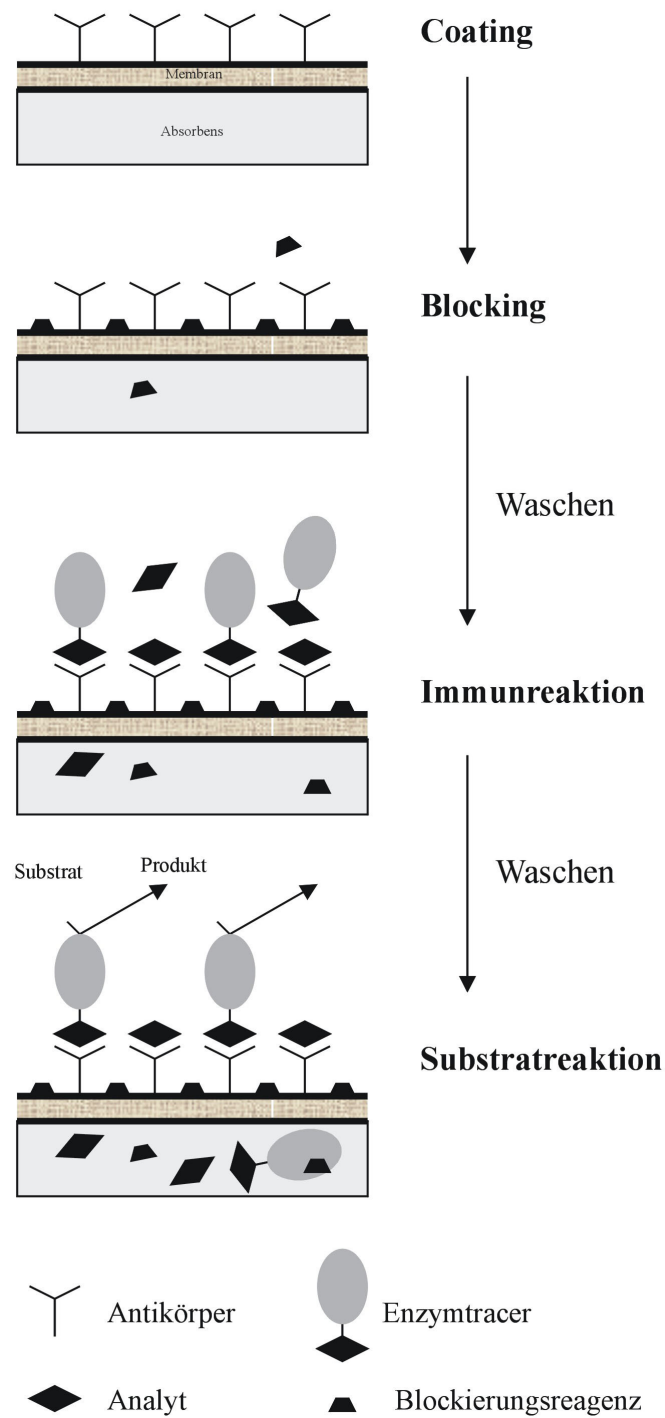


Abbildung 31: Ablaufschema des Immunfiltrationsschnelltests [nach 201]

Das der Immunfiltration zugrunde liegende Immunoassayformat ist der kompetitive Enzymimmunoassay. Anstelle einer Mikrotiterplatte werden in diesem Fall definierte Mengen Antikörper auf einer durchlässigen Membran immobilisiert, unter der ein Absorbermaterial positioniert ist. Nach Coating mit Antikörpern erfolgt eine Blockierung der verbliebenen Membranbindungsstellen. Überschüssiges Material diffundiert beim Waschen von der Membran ins Absorbergewebe. Danach erfolgt die Immunreaktion zwischen der unbekannten Probe und dem Enzymtracer und nach einem weiteren Waschschritt werden die immobilisierten Tracer durch eine Substratreaktion detektiert.

Als optimal erwies sich eine Kombination von Immobilon-P-Membran, Serumalbumin aus Rind als Blockierungsmittel und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin als Substrat. Die Immunfiltration gestattet eine visuelle Auswertung in weniger als 10 Minuten, wobei die Nachweisgrenze bei etwa 0,2 µg/L Atrazin liegt. Der Test läßt sich als schnelle Screening-Methode im Feld einsetzen [201]. Nach dem oben genannten Mechanismus funktioniert der SensioScreen TR500-Immunfiltrationsschnelltest (Fa. Sension GmbH) für Triazine [202]. Es besteht aus einem Testkit, in dem alle benötigten Materialien und Reagenzien zur Analyse von Wasserproben enthalten sind (Abbildung 32).



Abbildung 32: SensioScreen TR500-Schnelltest (Fa. Sension GmbH, Augsburg)

2.5. Methodenvalidierung

Die ISO 8402:1994 [203] definiert den Begriff der Validierung wie folgt: „Confirmation by examination and provision of objective evidence that the particular requirements for a specified intended use are fulfilled.“

Die EURACHEM [204] hat auf Grundlage dieser Definition die Methodenvalidierung interpretiert. Sie umfasst danach die Bestimmung des analytischen Bedarfs und die Bestätigung der an die Analysenmethode zu stellenden Leistungsanforderungen für die Beantwortung der analytischen Fragestellung. Dies impliziert neben der Entscheidung über die Eignung der Methode alle Schritte, die zur Evaluierung der Leistungsfähigkeit der Methode notwendig sind. Grundsätzlich dürfen also nur solche Analysenmethoden eingesetzt werden, die für die Beantwortung der anhängigen analytischen Fragestellung geeignet sind und richtige Ergebnisse liefern.

Die Methodenvalidierung besteht im wesentlichen aus der Ermittlung von Verfahrenskenngrößen, die in Tabelle 12 zusammengestellt sind [204]. Aufgrund von Übersetzungsfehlern und Mißverständnissen haben einige Begriffe eine kaum noch zu entflechtende Vieldeutigkeit erfahren. Die Begriffe wurden daher in verschiedenen Deutschen Normen DIN 55350 [205] und 58936 [206, 207] mit dem Ziel einer Vereinheitlichung zusammengestellt und auf der Basis international gültiger Konventionen neu definiert [208, 209, 210].

Tabelle 12: Verfahrenskenngrößen von Analysenmethoden

Verfahrenskenngröße deutsch [205-209]	Verfahrenskenngröße englisch [204]
Genauigkeit	Accuracy
Richtigkeit	Trueness
Präzision	Precision
Wiederholpräzision	Repeatability
Vergleichspräzision	Reproducibility
Spezifität	Specificity
Selektivität	Selectivity
Sensitivität	Sensitivity
Linearität	Linearity
Arbeitsbereich	Range
Robustheit	Ruggedness

Obwohl auch Enzymimmunoassays einer Validierung bedürfen und die Zahl der kommerziell verfügbaren Enzymimmunoassays in den letzten Jahren rapide angestiegen ist, wird in der Literatur der Methodenvalidierung nur wenig Beachtung geschenkt. Einige Studien fokussieren ihre Anstrengungen stattdessen auf die Entwicklung des biochemischen Teils der Immu-

noassays. Nur ein geringer Anteil dieser Tests wird einer eingehenden Validierung unterzogen. Häufig sind die Daten bezüglich der Sensitivität und Spezifität der Immunoassays unzureichend, oder aber die Autoren beschränken sich auf die Untersuchung einer geringen Anzahl von gespikten Proben [211].

Bislang liegen keine verbindlichen Leitlinien für die Validierung und den Gebrauch immunochemischer Analysenmethoden vor [212, 213, 214]. Bei der Validierung von Immunoassays sind im Vergleich zu Methoden der instrumentellen Analytik verschiedene Unwägigkeiten zu bewältigen, daher wird, sofern dies bei den einzelnen Punkten relevant ist, darauf eingegangen.

2.5.1. Genauigkeit

Nach EURACHEM [204] und der ISO 3534-1 [215] drückt die Genauigkeit die Nähe eines Ergebnisses zum wahren Wert aus. Die Genauigkeit wird quantifiziert, indem der Einfluß systematischer und statistischer Fehler auf das Ergebnis abgeschätzt wird. Sie wird normalerweise durch die beiden Komponenten Richtigkeit und Präzision bestimmt.

2.5.1.1. Richtigkeit

Die Richtigkeit bezieht sich auf die Übereinstimmung des Mittelwertes aus mehreren Messungen mit einem Referenzwert bzw. dem wahren Wert und ist damit ein Maß für den systematischen Fehler.

In der Praxis können die wahren Werte von charakterisiertem Referenzmaterial oder den Werten einer anderen charakterisierten Referenzmethode stammen.

Um die Richtigkeit ausgehend von Referenzmaterial zu bestimmen, wird der Mittelwert einer Serie von Ergebnissen, die bei mehrfacher Anwendung der Analysenmethode festgestellt wurden, dem charakterisierten Wert des Referenzmaterials gegenübergestellt. Das ideale Referenzmaterial ist ein zertifiziertes Referenzmaterial in der natürlichen Matrix. Wenn ein solches Material nicht zur Verfügung steht, können auch typische Matrices mit reinen zertifizierten Referenzmaterialien oder anderen Materialien geeigneter Reinheit und Stabilität gespickt werden. Die prozentuale Wiederfindung R wird dann wie folgt berechnet [216]:

$$R = \frac{CF - CU}{CA} * 100\% \quad (\text{Gleichung 20})$$

mit: CF: Analytkonzentration, gemessen in gespikter Probe
CU: Analytkonzentration, gemessen in unbehandelter Probe
CA: Zugegebene Analytkonzentration („wahre Konzentration“)

Ein anderes Maß für die Richtigkeit eines Ergebnisses ist die Schiefe („Bias“). Sie gibt die Differenz zwischen dem erwarteten Testergebnis und dem analytisch ermittelten Ergebnis an. Das Referenzmaterial muß für die vorgesehene Validierung geeignet sein. Für extrem unterschiedliche Matrices und Konzentrationsniveaus muß die Richtigkeit erneut geprüft werden. Bei Langzeitvalidierungen muß die Stabilität des Referenzmaterials gewährleistet werden.

Zur Prüfung der Richtigkeit durch eine Referenzmethode werden identische Proben in einem Verbundverfahren eingesetzt. Abbildung 33 zeigt ein Verbundverfahren mit Analysenverfahren, die nach Probennahme in gesonderte Arbeitsschritte aufspalten und durch Vergleich der Ergebnisse eine Bewertung der einzelnen Analysenmethoden ermöglichen.

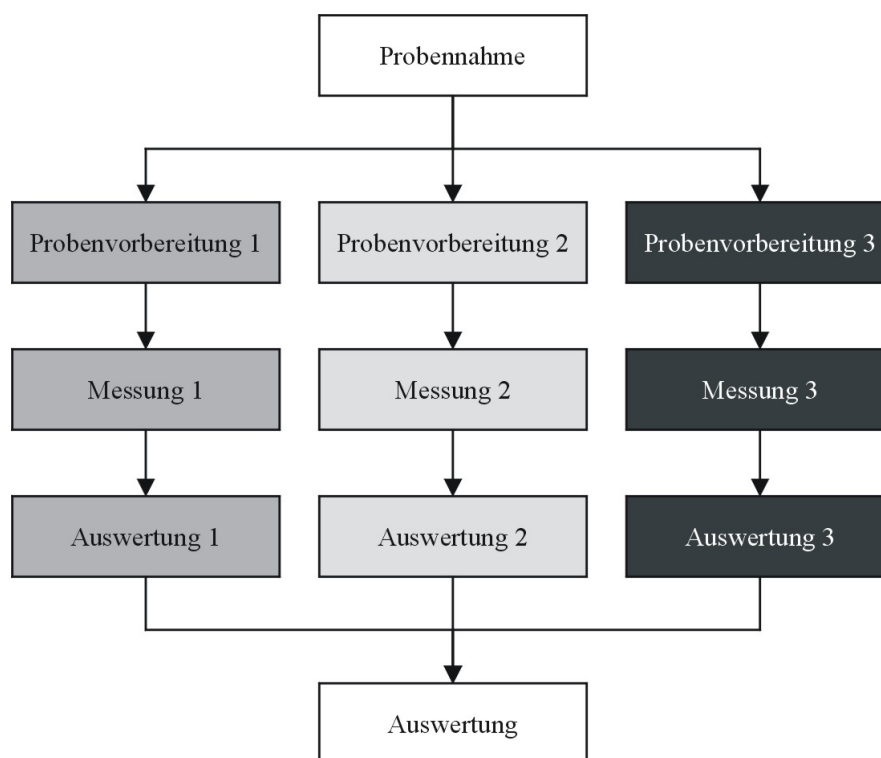


Abbildung 33: Schematische Darstellung eines Verbundverfahrens

Die Proben können zertifizierte Referenzmaterialien, selber angesetzte Standards oder typische Proben (z.B. mit angepasster Matrix) sein.

2.5.1.2. Präzision

Die Präzision ist das Ausmaß der Übereinstimmung von unabhängigen Testergebnissen, die unter festgelegten Bedingungen erzielt wurden. Sie ist ein Maß für den statistischen Fehler. Er wird in der Regel charakterisiert durch die Standardabweichung s . Die Standardabweichung eines Einzelwerts berechnet sich nach:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Gleichung 21})$$

Für die Standardabweichung des Mittelwerts s_M gilt:

$$s_M = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}} \quad (\text{Gleichung 22})$$

mit:

\bar{x} : Mittelwert aus n Meßwerten

x_i : i-ter Meßwert

Quantitative Untersuchungen der Präzision hängen stark von den festgelegten Bedingungen, unter denen die Messwerte x_i gewonnen werden, ab. Die Wiederholpräzision und die Vergleichspräzision stellen hierbei besondere Zusammenstellungen von Extrembedingungen dar. Die Wiederholpräzision s_r stellt die kleinste erwartete Präzision dar. Sie wird erhalten, wenn bei der Gewinnung voneinander unabhängiger Analysenergebnisse geltende Bedingungen, insbesondere Probe, Operator und Laborausrüstung nicht verändert werden und die Ergebnisse über eine relativ kurze Zeitspanne gewonnen werden. Für Enzymimmunoassays sind diese Randbedingungen gegeben, wenn die gleiche Probe im gleichen Labor vom gleichen Operator auf der gleichen Mikrotiterplatte untersucht wird (Intraplatten-Präzision).

Werden Aliquote einer Probe im Rahmen von Ringversuchen in mehreren Laboratorien mit der gleichen Analysenmethode untersucht, so wird die Vergleichspräzision s_R erhalten, die normalerweise den größten Wert für die Präzision liefert, obwohl sie formal die Variation über die Zeit ausschließt.

Für einige Anwendungen kann die Bestimmung von Präzisionen mit dazwischen liegenden Randbedingungen wichtig sein („Intermediate precision“). Dazu gehört die Präzision von Serie zu Serie s_t , die auch als Langzeitvariabilität des Meßprozesses definiert wird. Sie wird bestimmt, indem die Ergebnisse, die mit einer Methode innerhalb eines Labors über einen längeren Zeitraum gewonnen wurden, miteinander verglichen werden. Für Enzymimmunoassays wird die Interplattenpräzision als ein Maß für die Präzision von Serie zu Serie zu Rate gezogen, d.h. es werden Ergebnisse auf unterschiedlichen Mikrotiterplatten miteinander verglichen. Als Einflußgrößen sind zu nennen: Änderungen der Raumtemperatur, Luftfeuchte und das Altern von Verbrauchsmaterialien. Auch neue Chemikalienchargen und Geräte können Ursache einer größeren Unpräzision sein.

2.5.2. Spezifität und Selektivität

Die Begriffe Selektivität und Spezifität werden häufig fälschlicherweise als Synonyme verwendet.

Als Spezifität wird die Fähigkeit eines Verfahrens bezeichnet, nur einen Einzelstoff richtig und spezifisch zu erfassen, ohne daß andere Probeninhaltsstoffe (z.B. Nebenprodukte, Metabolite) das Analyseergebnis beeinflussen können.

Als selektiv wird ein Verfahren dann beurteilt, wenn mehrere Komponenten nachgewiesen werden können, ohne daß sie sich gegenseitig beeinflussen [209]. Letzteres trifft beispielsweise auf chromatographische Methoden zu. Bei Immunoassays, bei denen es sich um eine Einzelanalytmethode handelt, ist der Begriff der Spezifität angemessen.

Für die Validierung von immunochemischen Methoden ist die Evaluierung der Spezifität von zentraler Bedeutung, da die Spezifität von Immunoassays durch Kreuzreaktionen eingeschränkt ist. Das Meßsignal wird durch andere Substanzen als der spezifische Analyt beeinflusst. Interferenzen mit anderen Pestiziden, Metaboliten oder Huminstoffen sind möglich und müssen daher charakterisiert werden [212].

2.5.3. Sensitivität

Die Sensitivität beschreibt allgemein die Fähigkeit eines Verfahrens, benachbarte Werte (z.B. Konzentrationen) zu differenzieren. Sie gibt an, in welchem Maße sich ein Wert in Abhängigkeit vom Signal des messenden Systems verändert. Sie läßt sich bei den meisten instrumentellen Analysenmethoden durch die Steigung der Kalibrationsgeraden quantifizieren [207].

Bei Immunoassays kann in Ermangelung eines linearen Bereichs der Kalibrationskurve keine Steigung angegeben werden. Daher ist die Festlegung der Sensitivität über die Steigung nicht möglich. Bislang wurde eine Reihe an Definitionen eingeführt, jedoch ist die Sensitivität eines Immunoassays bis heute nicht standardisiert [217, 218]. Einige Autoren beschreiben die Sensitivität ihrer Assays mit Hilfe des IC_{50} -Wertes, d.h. derjenigen Analytkonzentration, die noch 50% des Maximalsignals erzeugt. Dies entspricht einer Inhibition (Hemmung) $\%B/B_0$ von 50%. Andere wiederum wählen willkürliche $\%B/B_0$ -Werte zwischen 95% und 80% (entspricht einer Hemmung von 5-20%), um die Sensitivität festzulegen. Diese Ansätze berücksichtigen jedoch keine statistischen Fehler und sind daher wenig empfehlenswert. Weitere Autoren ziehen die zwei- oder dreifache Standardabweichung vom Signalmittelwert des Analytblank ab und definieren diesen Wert als minimal detektierbare Dosis [219].

Das Analytical Environmental Immunochemical Consortium (AEIC) hat einen Versuch unternommen, einige Begriffe für immunochemische Analysenmethoden neu zu definieren, um sie im Kontext mit der Umweltanalytik vergleichbar zu machen. Nach AEIC-Definition wird

die Sensitivität mit der Nachweisgrenze (Kapitel 2.5.3.1.) und der Quantifizierungsgrenze (Kapitel 2.5.3.2.) beschrieben [219].

2.5.3.1. Nachweisgrenze

Es ist wichtig zu wissen, welches die niedrigste Konzentration eines Analyten ist, welche durch eine Methode zuverlässig detektiert werden kann. Die Association of Analytical Communities (AOAC) definiert die Nachweisgrenze allgemein als die niedrigste Konzentration eines Analyten, die mit einer angemessenen statistischen Sicherheit von einer Analysenmethode detektiert werden kann [216]. Der Begriff Nachweisgrenze („Limit of Detection“ oder „Detection Limit“) ist jedoch nicht allgemein anerkannt. Von der ISO 11843 [220] leitet sich die „Minimum Detectable Net Concentration“ ab. Die IUPAC ist vorsichtig mit dem Gebrauch des Wortes Nachweisgrenze und zieht den Begriff „Minimum Detectable True Value“ vor [221]. Die EURACHEM [204] empfiehlt, dass bei der Verwendung des Begriffs Nachweisgrenze stets die Konvention zitiert werden sollte, um Missverständnisse zu vermeiden. Eine eigene Definition für die Nachweisgrenze hat sie nicht entwickelt.

AEIC definiert die Nachweisgrenze als die kleinste Konzentration des Analyten, die statistisch signifikant mit einem festgelegten Zuverlässigkeitsgrad von einer Nullprobe in einer gegebenen Matrix unterschieden werden kann [219].

Wie bereits angesprochen wurde, liegen für Immunoassays keine standardisierten Ansätze für die Ermittlung von Nachweisgrenzen vor. D. Rodboard [217] schlug jedoch bereits 1978 folgendes Verfahren zur Ermittlung von Nachweisgrenzen für Immunoassays vor. Es erfüllt die Erfordernisse für die Definition sowohl der AEIC als auch der AOAC:

$$y_{\min} = \bar{y}_1 - ts \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}} \quad (\text{Gleichung 23})$$

mit:

y_{\min} : Extinktion, erzeugt durch Analytkonzentration an der Nachweisgrenze

\bar{y}_1 : Mittlere Extinktion, erzeugt durch Analytblank-Lösung

n_1 : Anzahl der Messungen des Analytblank

n_2 : Anzahl der Messungen Analytkonzentration an der Nachweisgrenze

s : geschätzte Standardabweichung, die bei der Messung einer Analytkonzentration an der Nachweisgrenze erhalten wird. (Kann in der Regel durch die Standardabweichung des Analytblank angenähert werden.)

t : Faktor der t-Verteilung für eine einseitige Fragestellung; Signifikanzniveau $P=95\%$; Freiheitsgrad $f = n_2 - 2$

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze wird das Meßsignal berechnet, das sich statistisch signifikant vom Analytblank unterscheidet. Dieser Wert wird in die sigmoidale Standardkurve

eingeführt und die entsprechende Grenzkonzentration ermittelt. Ist diese Grenzkonzentration kleiner als der kleinste mitgeführte Standard, muß die Nachweisgrenze auf diesen Standard angepaßt werden, da eine Detektion außerhalb des Arbeitsbereichs nicht möglich ist. Ist die Grenzkonzentration größer als der kleinste Standard, ist der ermittelte Wert identisch mit dem berechneten. Der besondere Vorteil dieser Methode ist, daß dem Einfluß der Präzision auf die Nachweisgrenze und der Anzahl der Bestimmungen Rechnung getragen wird [217, 217].

2.5.3.2. Quantifizierungsgrenze (Bestimmungsgrenze)

Nach EURACHEM und AEIC ist die untere Quantifizierungsgrenze die kleinste Analytkonzentration, die in Proben mit einer vorgegebenen Konzentration mit einer festgelegten Genauigkeit gemessen werden kann [219]. Sie ist auch bekannt als Bestimmungsgrenze.

Für instrumentelle Methoden wurde sie von verschiedenen Konventionen definiert als Analytkonzentration, die sich aus dem Wert des Probenblanks plus 5, 6 oder 10 Standardabweichungen zusammensetzt. Eine weitere Methode ist das Spiken von Probenblanks durch Analytkonzentrationen nahe der Nachweisgrenze [204].

Die Quantifizierungsgrenze kann bei immunologischen Methoden auf die gleiche Art wie bei Methoden der instrumentellen Analytik durch das Durchführen von Wiederfindungsstudien in den verschiedenen Probenmatrices, in denen der Test genutzt werden soll, ermittelt werden. Interessanterweise beschäftigen sich die meisten Publikationen mehr mit der Nachweisgrenze als mit der Quantifizierungsgrenze, obwohl der Quantifizierungsgrenze mehr Bedeutung beigemessen werden muß [217].

Die untere Quantifizierungsgrenze ist die untere Grenze des nutzbaren Arbeitsbereichs. Liegt ein Analysenergebnis zwischen Nachweis- und Quantifizierungsgrenze, so wird es als „Ergebnis unterhalb der Quantifizierungsgrenze“ deklariert [217, 222]. Das gleiche gilt analog für die obere Quantifizierungsgrenze.

2.5.4. Linearität und Arbeitsbereich

Bei den meisten quantitativen Bestimmungen wird für einen bestimmten Konzentrationsbereich oder Meßbereich nach entsprechender Funktionalisierung ein linearer, d.h. proportionaler und mathematisch definierter Zusammenhang zwischen der Menge an der zu bestimmenden Komponente und dem Signal angenommen. Dieser Linearitätsbereich ist als die Güte definiert, mit der eine Kalibrierfunktion innerhalb eines begrenzten Bereichs durch eine Gerade angenähert werden kann [209]. Als Arbeitsbereich einer Analysenmethode wird im Allgemeinen das Intervall zwischen dem oberen und unteren Level (einschließlich) bezeichnet, für das gezeigt wurde, dass es die Anforderungen bezüglich Richtigkeit, Präzision und Linearität erfüllt.

Bei Immunoassays ist streng genommen kein linearer Meßbereich vorhanden. Wie bereits in Abschnitt 2.4.1. ausgeführt wurde, zeigt sich über einen größeren Konzentrationsbereich ein sigmoidaler Verlauf der Signal-Dosis-Beziehung. Am unteren Dosisende der Kurve ist der Assay unempfindsam gegenüber Veränderungen, da die angewendeten Dosen zu klein sind, um eine Änderung des Signals zu bewirken. Analoges gilt für den oberen Dosisbereich der Kurve [217]. Da Immunoassays die Forderung nach der Linearität nicht erfüllen können, muß eine eingehende Validierung erfolgen, daß der sigmoidale Kurvenverlauf über den gesamten Arbeitsbereich keinen Einfluß auf Richtigkeit und Präzision hat. Der Arbeitsbereich wird bei Immunoassays durch die untere und obere Quantifizierungsgrenze begrenzt [210].

2.5.5. Robustheit

Ein Analysenverfahren ist dann robust, wenn Variationen von Methodenparametern wie Labor, Analytiker, Geräte, Zeit und Temperatur keinen wesentlichen Einfluß auf das Testergebnis haben. Sie ist damit ein Indikator für die Verlässlichkeit einer Methode während ihrer normalen Verwendung [209, 212]. Sie wird untersucht, indem Parameter in realistischen Bereichen variiert und ihr quantitativer Einfluß ermittelt wird. Befindet sich der Einfluß innerhalb einer spezifizierten Toleranz, befindet sich der Parameter innerhalb des Robustheitsbereichs der Analysenmethode. Befindet er sich außerhalb dieses Bereichs, muß die gesamte Analysenmethode revalidiert werden [210]. Bei Immunoassays können vor allem die verschiedenen Inkubationszeiten, Raumtemperatur und –feuchtigkeit, sowie Antikörper- und Tracerkonzentrationen einen Einfluß haben.

3. Validerung eines Enzymimmunoassays und Entwicklung von Standardmaterialien für die Analytik freier und gebundener Triazinrückstände

Herbizide der Triazinklasse werden in der Landwirtschaft eingesetzt, und finden durch eine Vielzahl an Transport- und Verlagerungsprozessen ihren Weg in die verschiedenen Kompartimente des Ökosystems. Dort entfalten sie nachteilige Wirkungen auf Flora, Fauna und Mensch. Das Triazinherbizid Atrazin, das in Deutschland verboten ist, darf in ehemaligen Ostblockstaaten wie Polen nach wie vor eingesetzt werden. Trotzdem existiert nur eine geringe Anzahl an Informationen über die Atrazinbelastung osteuropäischer Flüsse, wie beispielsweise die Oder. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine umfassende Übersicht über das aktuelle Belastungsprofil des Oderflusssystems mit Triazinen erstellt werden vor dem Hintergrund folgender übergeordneter Fragestellungen:

- Wie ist die aktuelle Triazinbelastung des aquatischen Oderflusssystems zu bewerten?
- Wird Atrazin im Einzugsgebiet der Oder eingesetzt und wenn ja, in welchem Ausmaß hat dies zu Kontaminationen des aquatischen Systems geführt?
- Besteht die Notwendigkeit von Einsatzbeschränkungen bzw. ein Verbot für Atrazin und verwandte Triazine?

Den ersten Schritt stellte die Auswahl eines geeigneten Analysenverfahrens dar. Das Kurzzeitgedächtnis eines aquatischen Systems ist das Kompartiment Wasser. Entlang des gesamten Flusslaufs wurde daher eine große Zahl an Wasserproben genommen. Der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln kann regional sehr unterschiedlich sein. Um den Beitrag verschiedener Zuflüsse zur Triazinbelastung bewerten zu können, mussten Proben direkt an Flussmündungen genommen werden.

Was die Sensitivität betrifft, musste ein Analysenverfahren eingesetzt werden, das den Nachweis von Atrazin im ng/L- bis µg/L-Bereich ermöglicht. Diese Bedingung wird von den etablierten Chromatographie-gekoppelten Standardverfahren erfüllt. Die große Probenanzahl machte jedoch den Einsatz von Methoden wie GC/MS und HPLC/UV unattraktiv, da der Arbeitsaufwand für das gesamte Analysenverfahren zu hoch und damit zu kostspielig geworden wäre. Als Alternative kam der kompetitive Enzymimmunoassay mit Atrazinspezifischen Antikörpern in Frage, da dieser einen hohen Probendurchsatz und einen sensitiven Nachweis von Triazinen gestattet. Die Messproben konnten zudem ohne aufwendige Probenvorbereitung untersucht werden (Arbeitspaket 2). Abbildung 34 stellt die Gliederung der zu leistenden Arbeit dar.

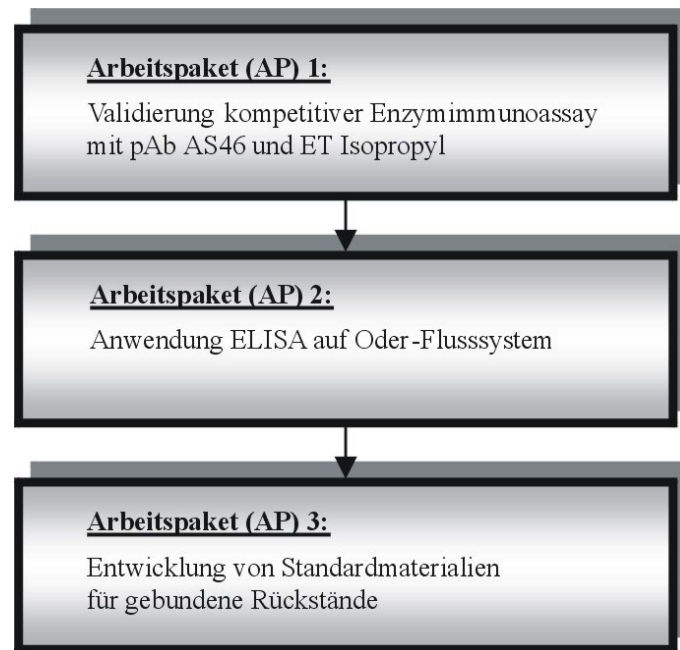


Abbildung 34: Gliederung der Arbeitspakete

Für die Untersuchungen wurde ein direkter, kompetitiver Enzymimmunoassays auf der Basis des polyklonalen Antiserums AS46 aus Kaninchen, kombiniert mit dem Enzymtracer ET Isopropyl ausgewählt, da dieser die zum Atrazinnachweis notwendige Sensitivität verfügt, wie in Abschnitt 2.4.6. beschrieben wurde.

Zur Bewertung der eingesetzten Methode und der erzielten Ergebnisse war eine eingehende Validierung notwendig. Dies ergab sich beispielsweise aus der Tatsache, dass bei dem vorliegenden Format natürliche Wasserproben direkt untersucht werden und sich durch eine Anfälligkeit auf Matrixsubstanzen auszeichnen. Angesichts dieser Tatsache erstaunt es, dass verbindliche Leitlinien zur Validierung von Immunossays nicht existieren. Hier mussten also Überlegungen angestellt werden, wie eine solche Leitlinie aussehen könnte (AP1).

Ein weiteres Problem neben den „frei“ in der Wasserphase detektierbaren Atrazintrückständen ist die Wechselwirkung mit aquatischen und terrestrischen Huminstoffen. Diese weisen das Potential auf, gebundene Atrazintrückstände zu bilden. Die Bildung derartiger nicht-extrahierbarer Rückstände führt zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Belastung, da sich diese einer Untersuchung mit konventionellen Methoden entziehen.

Die Entwicklung von Analyseverfahren für gebundene Rückstände setzt jedoch das Vorhandensein von geeigneten Standardmaterialien zur Kalibration der Verfahren voraus. Daher sollten neuartige Synthesewege für Modelle mit gebundenen Triazintrückstände entwickelt werden. Die Charakterisierung dieser Substanzen sollte unter anderem mit Enzymimmunoassay erfolgen, da diese zur Detektion und Quantifizierung dieser Rückstände geeignet sind. Mit diesem Material kann außerdem die Bioverfügbarkeit sowie die Toxizität gebundener Rückstände ermittelt werden. (AP3)

3.1. Validierung des Enzymimmunoassays mit pAb AS46 (AP1)

Es sollte ein kompetitiver Anti-Atrazin-Enzymimmunoassay auf der Basis des aus Kaninchen gewonnenen „pAb AS46“ (siehe Kapitel 2.4.6.1) und des Enzymtracers „ET Isopropyl“ (siehe Kapitel 2.4.6.2.) eingesetzt werden. Das Protokoll, d.h. die Arbeitsanweisung für den kompetitiven Enzymimmunoassay bestand im wesentlichen aus folgenden Schritten:

- Coating der Mikrotiterplatten mit Antikörpern in Carbonat-Puffer (pH 9,6 / 20h / 4°C)
- Immunreaktion der immobilisierten Antikörper mit Atrazin der Meßprobe und Enzymtracer in PBS-Puffer (pH 7,6 / 1h / RT)
- Enzymreaktion mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin- und Wasserstoffperoxid enthaltender Substratlösung in PBS-Puffer (pH 5,5 / 30min / RT)
- Bestimmung der Extinktion des umgesetzten Tetramethylbenzidins ($\lambda=450\text{nm}$)
- Vergleich der Extinktionen mit externen Standards, mitgeführt auf der gleichen Mikrotiterplatte

Das genaue ELISA-Protokoll ist in Kapitel 5.4.1. wiedergegeben. Um eine richtige Interpretation der Meßergebnisse zu ermöglichen, wurde die Methode einer eingehenden Validerung unterzogen.

3.1.1. Genauigkeit des Enzymimmunoassays

In Abschnitt 2.5.1. wurde deutlich gemacht, dass zur Abschätzung der Genauigkeit die beiden Parameter Richtigkeit und Präzision charakterisiert werden müssen. Es war hierbei zu berücksichtigen, dass bei Analysenverfahren mit Enzymimmunoassays keine Probenvorbereitung durchgeführt und die genommenen Wasserproben mit den Messproben identisch sind. Es musste daher abgeschätzt werden, ob die in der Messprobe vorliegenden Matrixsubstanzen Einfluss auf die Genauigkeit der Methode haben.

Die Richtigkeit bezieht sich auf die Übereinstimmung eines Mittelwerts aus verschiedenen Messungen mit einem Referenzwert. Es standen jedoch keine zertifizierten Referenzmaterialien in natürlicher Matrix zur Verfügung. Daher wurden durch Spiken typischer Matrices mit einem käuflichen, festen Atrazinstandard (Reinheit: 99,0%) Messproben mit bekannter Atrazinkonzentration in natürlichen Matrices bereitet. Die Proben wurden stets frisch angesetzt. Die Ermittlung der Richtigkeit und Wiederholpräzision erfolgte über die Bestimmung der Wiederfindung von Atrazin durch Enzymimmunoassay in den gespikten Lösungen.

3.1.1.1. Genauigkeit des Enzymimmunoassays in matrixfreier Lösung

Zur Bestimmung der maximalen Genauigkeit wurden Messproben mit Enzymimmunoassay untersucht, die keine Matrixsubstanzen enthielten. Dazu wurden Atrazinstandards in entionisiertem Wasser angesetzt und die Messungen sechsfach-horizontal durchgeführt. Bei dem gewählten Beladungsschema befindet sich jeweils eine Probe am Rand der Mikrotiterplatte. Diese Randkavität weist fast immer eine höhere Optische Dichte (bis zu 14 %) als die Kavitäten in der Plattenmitte auf. Dieses Phänomen wurde bereits von verschiedenen Autoren beobachtet [23, 147]. Hierfür werden stärkere Temperaturabweichungen am Testrand verantwortlich gemacht. Da Temperaturveränderungen bei dem gewählten ELISA-Protokoll unausweichlich sind, wurden daher die Randkavitäten bei den Auswertungen nicht berücksichtigt. Es wurden Meßproben in zehn Konzentrationen zwischen 0,01 µg/L und 10 µg/L angesetzt und jede Probe in fünffacher Wiederholung mit dem ELISA vermessen. Zur Berechnung der Atrazinkonzentration wurden die Ergebnisse einer Kalibrationsreihe gegenübergestellt, die auf der Mikrotiterplatte mitgeführt wurde. Die Reihe bestand aus sechs verschiedenen Lösungen zwischen 0,01 µg/L und 3 µg/L sowie einem Blank- und Überschussstandard. Wiederfindungen sind in der Abbildung 33 aufgeführt.

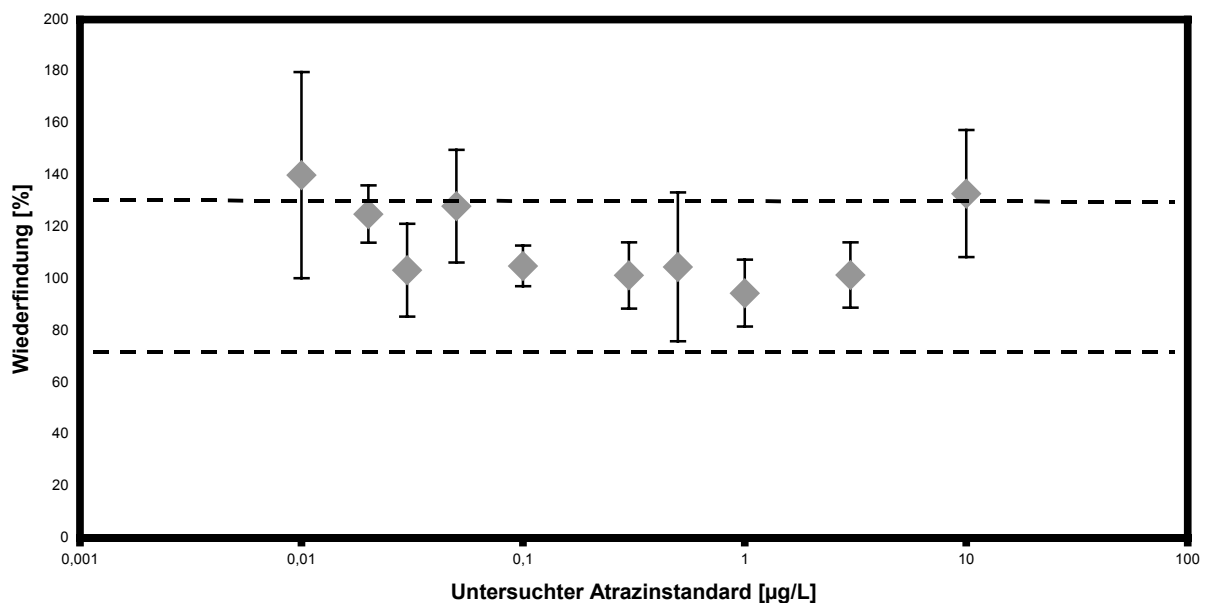


Abbildung 35: Wiederfindung von Atrazin in entionisiertem Wasser (Angabe der Fehler durch Vertrauensintervalle der t -Verteilung für $P=95\%$ und $f=4$)

Eine Analysenmethode, die zur Quantifizierung von Analyten eingesetzt werden soll, muß ausreichend hohe Wiederfindung gewährleisten. Für den vorliegenden Immunoassay wurde festgelegt, daß sie in einem Korridor zwischen $70 \pm 29\%$ und $130 \pm 15\%$ liegen soll. Die Fehlerangabe stellt die relative Standardabweichung bezogen auf die betrachteten Wiederfin-

dungen dar und wird zwischen den Extrempunkten linear interpoliert. Sie entspricht einer zulässigen Fehlerbreite von $\pm 20\%$ bei einer Wiederfindung von 100%. Vergleichbare Korridorbereiche werden in der Spurenanalytik auch instrumentellen Methoden zugebilligt (Kapitel 2.5.3.2.). Die Wiederfindung hängt von dem untersuchten Konzentrationsbereich ab und mußte daher über einen breit gefaßten Bereich untersucht werden.

Bei Standards konnte die Richtigkeit des Ergebnisses unterhalb von $0,02 \mu\text{g/L}$, sowie oberhalb von $3 \mu\text{g/L}$ aufgrund einer Überschätzung der Atrazinkonzentration nicht gewährleistet werden. Zwischen diesen Werten kann der Enzymimmunoassay mit hinreichender Richtigkeit angewendet werden. Diese Aussage gilt für matrixfreie Standardlösungen.

3.1.1.2. Genauigkeit des Enzymimmunoassays in Trinkwasser

Zur Bestimmung der Genauigkeit des Enzymimmunoassays in der Matrix „Trinkwasser“ wurden drei verschiedene unbelastete Trinkwässer aus drei verschiedenen Quellen (Fonte Laura, Staatlich Fachingen und Fürst Bismarck Quelle) ausgewählt, und an diesen Lösungen exemplarisch die Wiederfindung geprüft. Es wurde zur Vereinfachung angenommen, daß diese Lösungen repräsentativ für die Matrixart „Trinkwasser“ sind. Mit jeder Matrix wurden Meßproben mit fünf Atrazinkonzentrationen zwischen $0,03 \mu\text{g/L}$ und $3 \mu\text{g/L}$ angesetzt und jede Probe mit dem ELISA vermessen. Tabelle 13 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 13: Wiederfindung von Atrazin in gespikten Trinkwasserproben (Angabe der Fehler durch die Vertrauensintervalle der t-Verteilung für $P=95\%$ und $f=4$)

Konzentration Atrazin [$\mu\text{g/L}$]	Wiederfindung Trinkwasser		
	Fonte Laura	Staatlich Fachingen	Fürst Bismarck Quelle
0,03	$123,3 \pm 22,5 \%$	$113,3 \pm 16,3 \%$	$96,7 \pm 16,3 \%$
0,1	$130,0 \pm 6,4 \%$	$105,0 \pm 7,9 \%$	$83,0 \pm 10,0 \%$
0,3	$106,3 \pm 16,5 \%$	$98,7 \pm 14,1 \%$	$96,0 \pm 15,4 \%$
1	$94,7 \pm 9,1 \%$	$97,5 \pm 6,0 \%$	$89,7 \pm 7,1 \%$
3	$135,5 \pm 9,8 \%$	$103,6 \pm 12,2 \%$	$93,1 \pm 13,6 \%$

Die Genauigkeit der vorliegenden Analysenmethode ist matrixabhängig. Für unterschiedliche Trinkwasserproben, d.h. für Proben mit relativ hohem Salzgehalt (bestehend vornehmlich aus Alkali-, Erdalkali-, Hydrogencarbonat-, Sulfat- und Chloridionen) wurden unterschiedliche Ergebnisse erhalten. Eine eingehendere Untersuchung des Matrixeffektes erfolgte jedoch nicht, da diese das benötigte Maß für die Validierung überschritten hätte. Entscheidend ist vielmehr, dass sich die Schwankungsbreiten der Genauigkeit innerhalb der spezifizierten Toleranzen bewegten und in der Regel die Richtigkeit der Wiederfindung zwischen $0,03 \mu\text{g/L}$ und $3 \mu\text{g/L}$ gewährleistet werden kann. Lediglich die Wiederfindung des mit $3 \mu\text{g/L}$ Atrazin

gespikten Trinkwassers Fonte Laura weicht leicht ab. Hier wird die Atrazinbelastung leicht überschätzt.

3.1.1.3. Genauigkeit des Enzymimmunoassays in Oberflächenwasser

Zur Bestimmung der Genauigkeit des Enzymimmunoassays in der Matrix „Oberflächenwasser“ wurden drei verschiedene unbelastete Oberflächenwässer (zwei Wasserproben aus der Oder, sowie eine Probe aus der Alster bei Hamburg) ausgewählt und an diesen Lösungen exemplarisch die Wiederfindung geprüft. Oberflächenwasserproben zeichnen sich in aller Regel durch einen relativ hohen Salzgehalt, sowie Gehalte an DOC aus, häufig liegen auch Kontamination mit anorganischen und organischen Substanzen (z.B. Schwermetalle, BTX-Aromaten) vor. Auch biologische Materialien und Mikroorganismen können in den Proben vorhanden sein. Es wurde zur Vereinfachung angenommen, daß die untersuchten Lösungen repräsentativ für die Matrixart „Oberflächenwasser“ sind. Mit jeder Lösung wurden Meßproben erstellt und jede Probe in fünffacher Wiederholung mit dem ELISA vermessen.

Tabelle 14: Wiederfindung von Atrazin in gespikten Oberflächenwasserproben (Angabe der Fehler durch die Vertrauensintervalle der t-Verteilung für $P=95\%$ und $f=4$)

Konzentration Atrazin [$\mu\text{g/L}$]	Wiederfindung Oberflächenwasser		
	OT24OB	WA03SI	Alster01
0,03	$123,3 \pm 7,5 \%$	$156,7 \pm 5,9 \%$	$160,0 \pm 23,1 \%$
0,05	$108,0 \pm 15,4 \%$	$130,0 \pm 17,1 \%$	$140,0 \pm 7,9 \%$
0,1	$120,0 \pm 11,6 \%$	$119,0 \pm 9,3 \%$	$128,0 \pm 17,4 \%$
0,3	$114,7 \pm 21,0 \%$	$103,2 \pm 10,8 \%$	$112,7 \pm 9,9 \%$
0,5	$92,4 \pm 4,8 \%$	$91,4 \pm 5,5 \%$	$99,0 \pm 5,6 \%$
1	$107,0 \pm 18,4 \%$	$100,6 \pm 14,3 \%$	$102,5 \pm 10,8 \%$
3	$125,6 \pm 18,4 \%$	$113,6 \pm 14,6 \%$	$106,7 \pm 10,3 \%$

Für die untersuchten Oberflächenwasserproben wurde im unteren Messbereich eine Überschätzung der Atrazinkonzentration gefunden. Für die Probe WA03SI lieferte die mit 0,03 $\mu\text{g/L}$ Atrazin-Standard gespikte Probe keine befriedigende Wiederfindung. Noch gravierender war dieser Effekt bei der Alster01-Probe. Dies lässt den Schluß zu, dass eine genaue Messung mit dem vorliegenden ELISA bei Oberflächenwasserproben unterhalb eines Konzentrationsniveaus von 0,1 $\mu\text{g/L}$ nicht in allen Fällen möglich ist.

3.1.2. Sensitivität des Enzymimmunoassays

Wie bereits im Abschnitt 2.5.3. erläutert wurde, sind die Mittel, mit denen die Sensitivität eines Immunoassays beschrieben werden kann, bislang nicht standardisiert. Einer Empfeh-

lung der Analytical Environmental Immunochemical Consortium (AEIC) folgend wurde die Sensitivität über die Nachweis- und die Quantifizierungsgrenze definiert. Gängig bei vielen Herstellern sowie Anwendern von Immunoassays ist weiterhin der sogenannte IC₅₀-Wert (IC: Inhibition concentration), diejenige Konzentration an Hapten, die nötig ist, um das maximale Meßsignal um 50% zu reduzieren. Aufgrund seiner weiten Verbreitung wird auch dieser Wert hier aufgeführt.

3.1.2.1. Quantifizierungsgrenze und Arbeitsbereich des Enzymimmunoassays

Die ermittelten Quantifizierungsgrenzen und Arbeitsbereiche der verschiedenen Matrices sind in der Tabelle 15 zusammengefaßt.

Tabelle 15: Quantifizierungsgrenzen und Arbeitsbereich des Atrazin-Enzymimmunoassays für die untersuchten Proben

Matrix	Untere Quantifizierungsgrenze	Arbeitsbereich
Destilliertes Wasser	0,02 µg/L	0,02 – 3 µg/L
Trinkwasser (Fonte Laura)	0,03 µg/L	0,03 – 1 µg/L
Trinkwasser (Staatlich Fachingen)	0,03 µg/L	0,03 – 3 µg/L
Trinkwasser (Fürst Bismarck)	0,03 µg/L	0,03 – 3 µg/L
Oberflächenwasser (OT24OB)	0,03 µg/L	0,03 – 3 µg/L
Oberflächenwasser (WA03SI)	0,05 µg/L	0,05 – 3 µg/L
Oberflächenwasser (Alster01)	0,1 µg/L	0,1 – 3 µg/L

Die Quantifizierungsgrenzen des verwendeten Atrazinspezifischen Enzymimmunoassays hängen wesentlich von der beobachteten Matrix ab. Im Vergleich mit matrixfreien Lösungen ist eine Erhöhung der unteren Quantifizierungsgrenze in „Trinkwasser“- und „Oberflächenwasser“-Matrices zu beobachten.

3.1.2.2. Nachweisgrenze des Enzymimmunoassays

Unter Verwendung der Formel von D. Rodboard (Kapitel 2.5.3.1.) wurden weiterhin mit Hilfe verschiedener Standardreihen die Nachweisgrenzen der Methode berechnet. Sie stellen das Limit dar, oberhalb dessen die qualitative Detektion von Atrazin mit einer Wahrscheinlichkeit von P=95% möglich ist. Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 16: Nachweisgrenzen des Atrazin-Enzymimmunoassays für verschiedene Matrices (berechnet nach D. Rodboard)

Matrix	Nachweisgrenze nach Rodboard	
	Ohne Berücksichtigung von Matrixeffekten	Mit Berücksichtigung von Matrixeffekten
Destilliertes Wasser	0,01 µg/L	0,01 µg/L
Trinkwasser (Fonte Laura)	0,01 µg/L	0,011 µg/L
Trinkwasser (Staatlich Fachingen)	0,01 µg/L	0,01 µg/L
Trinkwasser (Fürst Bismarck)	0,01 µg/L	0,01 µg/L
Oberflächenwasser (OT24OB)	0,01 µg/L	0,01 µg/L
Oberflächenwasser (WA03SI)	0,01 µg/L	0,018 µg/L
Oberflächenwasser (Alster01)	0,01 µg/L	0,021 µg/L

Die linke Spalte gibt die Nachweisgrenze wieder, wenn in die von Rodboard entwickelte Formel die Extinktion des Analytblank ohne Matrix eingesetzt wird. Hierdurch wird die begrenzte Anzahl der Messungen berücksichtigt, die sich auf die Statistik auswirken. Die Nachweisgrenze ist jedoch auch abhängig von der Zusammensetzung der Matrix, was durch die ursprüngliche Definition nicht berücksichtigt wird. Daher wurden Extinktionen unbelasteter Matrixlösungen bestimmt und für die Berechnung verwendet. Die auf diese Art berechneten Nachweisgrenzen liegen höher als die nach der ursprünglichen Definition ermittelten Werte und sind der rechten Spalte von Tabelle 16 zu entnehmen.

Es wird deutlich, daß die Nachweisgrenzen ohne Berücksichtigung der Matrixeffekte beim niedrigsten mitgeführten Standard liegen (0,01 µg/L), während unter Berücksichtigung realer Proben die Nachweisgrenzen auf bis zu 0,011 µg/L bei Trinkwasser und 0,021 µg/L bei Oberflächenwässern ansteigen. Bei Meßwerten unterhalb der Nachweisgrenzen kann nicht zweifelsfrei gesagt werden, ob die Probe positiv ist, da die Meßsignale beispielsweise von Matrixsubstanzen ausgelöst werden können.

3.1.2.3. IC₅₀-Wert des Enzymimmunoassays

Zur Bestimmung der IC₅₀-Konzentrationen wurden zwölf Werte auf unterschiedlichen Mikrotiterplatten durch Auswertung der mitgeführten Standardkurven analysiert. Es wurden Werte zwischen 0,044 und 0,088 µg/L Atrazin ermittelt, das arithmetische Mittel lag bei $0,059 \pm 0,025$ µg/L Atrazin. Aus diesem Ergebnisses wird klar, daß die in der Literatur häufig anzutreffende Aussage, man sollte allgemein möglichst am Testmittelpunkt arbeiten, da dieser die Testregion mit der größten Genauigkeit darstellt, nicht bestätigt werden kann. Wie in Abschnitt 3.1.2.1. gezeigt wurde, liegt der gemittelte IC₅₀-Wert für manche Matrices unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze und ist daher für quantitative Untersuchungen unbrauchbar. Selbst für Trinkwässermatrices liegt der IC₅₀-Wert sehr nah an der unteren Quantifizie-

rungsgrenze. Daher stellt die Bestimmung der unteren Quantifizierungsgrenze einen wichtigen Bestandteil der Validierung von Enzymimmunoassays dar.

3.1.3. Spezifität des Enzymimmunoassays

Die Spezifität des Enzymimmunoassays hängt stark von der Kreuzreaktivität des betreffenden Antikörpers sowie von den in der Probe vorliegenden Matrixsubstanzen und der Acidität ab. Kreuzreagierende Antikörper sind solche, die sich mit einem Antigen (bzw. Hapten) verbinden können, das nicht ihre Produktion stimuliert hat. Die Kreuzreaktion kann weniger stark als die Bindung mit dem eigentlichen Antigen sein, kann aber ebenso intensiver ausfallen.

3.1.3.1. Kreuzreaktion mit Triazinherbiziden und Metaboliten

Der Anti-Atrazin Antikörper AS46 mußte auf seine Kreuzreaktivität bezüglich der strukturell stark verwandten Herbizide der Triazinreihe geprüft werden, da auch diese befähigt sein können, ein positives Messsignal zu erzeugen. Die Kreuzreaktion wird in dieser Arbeit definiert als:

$$CR_c = \frac{x}{c} * 100\% \quad (\text{Gleichung 24})$$

mit:	CR _c :	Kreuzreaktion des Triazins [%]
	x:	Inhibition durch Triazin [µg/L AEC]
	c:	Eingesetzte Konzentration des Triazins [µg/L]

Die Kreuzreaktion CR eines Analyten stellt keine unveränderliche Konstante, sondern eine Variable in Abhängigkeit verschiedener Parameter dar. Ein wichtiger Parameter ist hierbei die eingesetzte Konzentration des Triazins. Werden CR der Triazine in unterschiedlich stark konzentrierten Lösungen ermittelt, ergeben sich signifikant voneinander abweichende Werte.

Um die Triazine auf ihre CR zu untersuchen, wurden aus einer Stamm-Lösung (1mg/mL in DMSO) Standard-Lösungen verschiedener Konzentration angesetzt. Hydroxyatrazin war in allen getesteten Lösungsmitteln schwer löslich und konnte daher nicht hochkonzentriert angesetzt werden. In diesem Fall wurde eine 10mg/L-Lösung in Methanol angesetzt. Proben in organischen Lösungsmitteln können jedoch nicht direkt im ELISA eingesetzt werden, da sie die Polystyrolplatten angreifen. Daher wurden die Proben mit Wasser verdünnt.

Dabei war zu berücksichtigen, dass sich bei der Aufstockung der methanolischen Proben die Wiederfindung von Atrazin verringerte (Tabelle 17).

Tabelle 17. Wiederfindung in methanolischen Lösungen (Angabe der Fehler durch die Vertrauensintervalle der t -Verteilung für $P=95\%$ und $f=4$)

Probe	Undotiert	+ 0,1 µg/L Atrazin	+ 1 µg/L Atrazin
1% (v/v) Methanol	< NG	93,0 ± 2,2 %	102,4 ± 19,4 %
3 % (v/v) Methanol	< NG	50,0 ± 1,3 %	72,9 ± 1,3 %

Undotierte Lösungen ergaben zwar für den Blank erwartungsgemäß einen Messwert unterhalb der Nachweisgrenze, jedoch wurden für die aufgestockten Proben signifikant verringerte Wiederfindungsraten gefunden. Daraus war zu folgern, dass keine Proben sinnvoll analysiert werden können, die mehr als 1% (v/v) Methanol enthalten.

Dieses Ergebnis war auch insofern erstaunlich, da der ELISA nur in sehr seltenen Fällen die Atrazinbelastung unterschätzt. Die auftretende Signalpromotion wird möglicherweise durch eine Verringerung der dielektrischen Eigenschaften der Messprobe hervorgerufen.* Dies beeinflusst die Oberflächenspannung und möglicherweise auch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Antikörper und Hapten [223].

Um auszuschließen, dass die Variabilität der CR auf weitere Testparameter, wie Druck, Temperatur und Inkubationsdauer zurückzuführen ist, wurden die Kreuzreaktivitäten stets aus den Daten einer einzelnen Mikrotiterplatte berechnet. In *Abbildung 36* sind exemplarisch ermittelte CR aufgeführt.

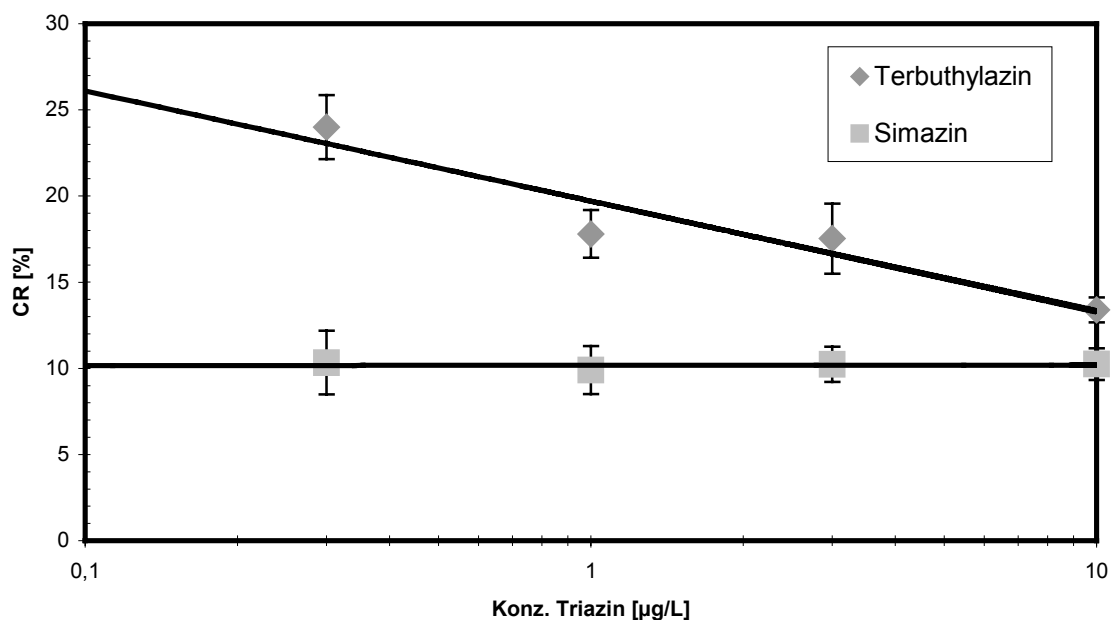


Abbildung 36: Kreuzreaktivität ausgewählter Triazine (Angabe der Fehler durch Vertrauensintervalle der t -Verteilung für $P=95\%$ und $f=4$)

* Dielektrizitätskonstanten: Methanol $\epsilon=33,0$ (20°C); Wasser $\epsilon=80,1$ (20°C)

Am Beispiel des Chlortriazins Terbutylazin sieht man deutlich, dass die CR eine Funktion der Konzentration ist und die Werte monoton fallen. Dieser Trend wurde von einer Reihe untersuchter Substanzen unterstützt, wie z.B. Propazin, Ametryn, Terbutryn, Prometryn, Desethylatrazin, Hydroxyatrazin. Trotzdem ist diese Feststellung nicht allgemein gültig. Andere Triazine wie Simazin ergaben scheinbar konzentrationsunabhängige CR-Werte. Aber auch reziprokes Verhalten konnte aufgrund der erhobenen Daten nicht ausgeschlossen werden. Anscheinend weisen die Triazine eine konzentrationsabhängige Affinität zu den Antikörpern auf, d.h. die Affinität der Antikörper hängt von ihrer Polarität, Größe und der genauen Struktur der Paratopregion ab. Insgesamt konnte aufgrund der relativ geringen Zahl von Messungen und untersuchten Triazine kein eindeutiges, abschließendes Fazit gezogen werden.

Aus den genannten Gründen verbietet sich eine Zusammenfassung der Werte zu einem arithmetischen Mittelwert. Daher wird als charakterisierende Größe der Median der prozentualen Kreuzreaktivität bezogen auf Atrazin gewählt und zusätzlich die Spannweite angegeben. Zur Vervollständigung wird der Konzentrationsbereich der Triazine angegeben, der zu auswertbaren Ergebnissen führt. Schließlich wird auch die Konzentration der jeweiligen Triazine angegeben, die zur 50%igen Inhibition führt. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte ihre Bestimmung durch Interpolation. Die Tabelle 18 gibt die Ergebnisse wieder.

Tabelle 18: Kreuzreaktivität des pAb AS46 auf die wichtige Triazinherbizide bzw. Metaboliten

Triazin	CR Median (Spannweite) *	Konz.	IC ₅₀
Atrazin	100 % (def.)	-	0,059 µg/L
Propazin	227 % (176 – 240 %)	0,03 – 1 µg/L	0,015 µg/L
Terbutylazin	17,7 % (13,4 – 24,0 %)	0,3 – 10 µg/L	0,15 µg/L
Simazin	10,2 % (9,9 – 0,3 %)	0,3 – 10 µg/L	0,39 µg/L
Ametryn	3,0 % (2,3 – 3,6 %)	1 – 30 µg/L	0,72 µg/L
Prometryn	0,73 % (0,60 – 1,03 %)	3 – 100 µg/L	3,9 µg/L
Terbutryn	0,73 % (0,61 – 0,90 %)	3 – 100 µg/L	4,6 µg/L
Desethylatrazin	0,83 % (0,73 – 1,13 %)	3 – 100 µg/L	2,6 µg/L
Hydroxyatrazin	0,09 % (0,05 – 0,13 %)	30 – 100 µg/L	356 µL**

Mehrere Triazinherbizide zeigen aufgrund ihrer starken strukturellen Ähnlichkeit eine hohe Kreuzreaktivität. So erzeugen Propazin, Terbutylazin und Simazin, die sich jeweils nur im Fehlen oder im Zusatz einer einzelnen Methylgruppe vom Atrazin unterscheiden, eine über

* Die Angaben der Kreuzreaktivität beziehen sich auf Atrazin (per Definition 100%).

** Wurde durch Extrapolation bestimmt.

10%ige Kreuzreaktivität. Propazin ist sogar in der Lage, wesentlich stärker an die Antikörperrezeptoren zu binden als Atrazin und erzeugt daher Signale hoher Atrazinäquivalentkonzentration. Die Herbizide der Thiomethylreihe hingegen zeigen eine vergleichsweise niedrige Kreuzreaktion mit dem Antikörper, ebenso wie die Phase-I-Metabolite Desethylatrazin und Hydroxyatrazin.

3.1.3.2. Kreuzreaktion mit Huminstoffen

Es wurde bereits über die Befähigung von Huminstoffen berichtet, unspezifisch an Antikörper zu binden und somit ein inkorrekt positives Signal zu erzeugen [130]. Huminstoffe stellen ubiquitäre Substanzen dar und treten auch in Wasserproben, vor allem in Oberflächengewässern auf. Daher mußte auch diese Kreuzreaktion mit unterschiedlichen Huminstoffen quantifiziert werden.

Zum Einsatz kamen der aquatische Huminstoff HO13FA, der im Rahmen des Schwerpunktprojekts ROSIG (Refraktäre Organische Säuren in Gewässern) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) aus dem Hochmoorsee Hohlohsee angereichert wurde, ferner zwei kommerziell erhältliche Huminstoffe der Firma ROTH bzw. ALDRICH, und schließlich zwei Modellsubstanzen für Huminstoffe, welche synthetisch dargestellt worden waren und teilweise vergleichbare Eigenschaften mit natürlichen Huminstoffen aufweisen.

Es wurden Lösungen mit unterschiedlichen Huminstoffgehalten hergestellt und diese einer Untersuchung mit Enzymimmunoassay unterworfen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt.

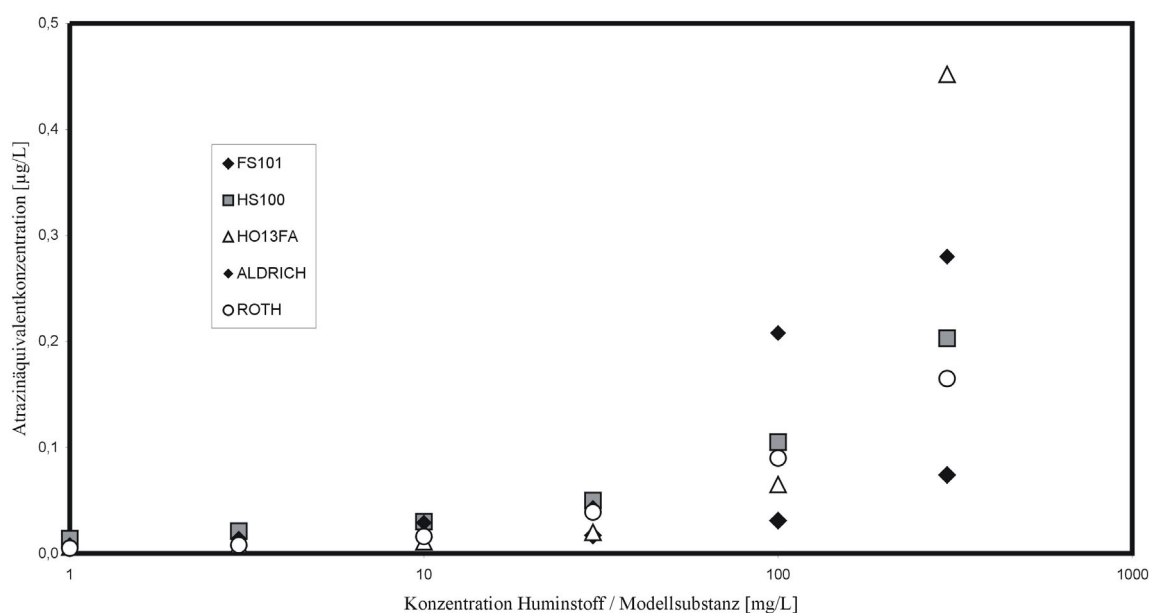


Abbildung 37: Unspezifische Bindung ausgewählter Huminstoffe und synthetischer Modellsubstanzen

Viele Oberflächengewässer weisen DOC-Konzentrationen unter 10 mg/L auf (Kapitel 2.2.). In diesem Konzentrationsbereich konnte für die untersuchten Huminstoffe HO13FA, FS100 und den ROTH-Huminstoff keine signifikante Störung registriert werden. Bei den Substanzen HS100 und dem kommerziell erhältlichen Huminstoff der Firma ALDRICH wurden Konzentrationen unterhalb der Quantifizierungsgrenzen für Oberflächenwasser gefunden ($LOQ=0,021\mu\text{g/L}$; Abschnitt 3.1.2.1.). Der natürlich vorkommende aquatische Huminstoff HO13FA kann als am ehesten repräsentativ für aquatische Huminstoffe angesehen werden. Er erzeugt kaum Matrixeffekte.

3.1.4. Robustheit des Enzymimmunoassays

Eine Analysenmethode muß stabil gegenüber geringen Veränderungen in den äußeren Testbedingungen sein. Es wurde daher der Einfluß geringer Veränderungen in den Inkubationszeiten, der Raumtemperatur und -feuchte, sowie unterschiedlicher Antikörper- und Tracerkonzentrationen auf die Testperformance bestimmt. Die Variation der verschiedenen Parameter erfolgte innerhalb von realistischen Toleranzen und ist in den nachfolgenden Kapiteln näher spezifiziert.

3.1.4.1. Präzision von Serie zu Serie

Die mehrfache Analyse von Immunoassayproben auf derselben Mikrotiterplatte, d.h. einer Serie, dient der Bestimmung der Wiederholpräzision s_I . Werden gleichartige Proben auf verschiedenen Platten untersucht, so wird von verschiedenen Serien gesprochen und die Schwankungsbreite bestimmt, die als Präzision von Serie zu Serie s_t (Kapitel 2.5.1.2.) bezeichnet wird. Diese erfasst auch die Auswirkungen sich stetig ändernder äußerer Einflüsse wie beispielsweise Temperatur und Luftfeuchte und ist mit größeren Schwankungsbreiten behaftet. Sie wurde für Standards in entionisiertem Wasser bestimmt (Tabelle 19). Zum Vergleich wurde sie der Wiederholpräzision s_I in gleicher Matrix gegenübergestellt.

Tabelle 19: Wiederholpräzision s_I und Präzision von Serie zu Serie s_t am Beispiel von Standardreihen in destilliertem Wasser (Angabe der Fehler durch die Vertrauensintervalle der t -Verteilung für $P=95\%$ und $f=4$)

Konzentration Atrazin	Wiederholpräzision s_I	Präzision von Serie zu Serie s_t
0,03 $\mu\text{g/L}$	$\pm 16,3 \%$	$\pm 13,4 \%$
0,1 $\mu\text{g/L}$	$\pm 8,2 \%$	$\pm 8,7 \%$
0,3 $\mu\text{g/L}$	$\pm 9,5 \%$	$\pm 5,3 \%$
1 $\mu\text{g/L}$	$\pm 12,9 \%$	$\pm 4,6 \%$
3 $\mu\text{g/L}$	$\pm 12,6 \%$	$\pm 9,3 \%$

Die Präzision von Serie zu Serie ist verglichen mit den Wiederholpräzisionen innerhalb einer Platte nicht schlechter. Teilweise wurde sogar eine Verbesserung der Präzision gefunden. Besonderes Augenmerk wurde auf die Validierung des vorliegenden Enzymimmunoassays für Untersuchungen von Oberflächenwasser gelegt. Daher wurde die Präzision von Serie zu Serie auch in der Matrix Oberflächenwasser charakterisiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Wiederholpräzision und Präzision von Serie zu Serie von mit Atrazinstandards gespiktem Oberflächenwasser (Alster01) (Angabe der Fehler durch die Vertrauensintervalle der t-Verteilung für $P=95\%$ und $f=4$)

Konzentration Atrazin	Wiederholpräzision s_1	Präzision von Serie zu Serie s_t
0,03 µg/L	± 12,9 %	± 23,3 %
0,1 µg/L	± 7,9 %	± 27,4 %
0,3 µg/L	± 9,5 %	± 28,9 %
1 µg/L	± 5,6 %	± 34,2 %
3 µg/L	± 10,3 %	± 21,3 %

Die Präzision von Serie zu Serie zeichnet sich jetzt durch eine geringere Präzision aus als die Wiederholpräzision. Man erhält jedoch reproduzierbare Ergebnisse. Möglicherweise haben hier äußere Einflüsse wie Temperatur, Luftfeuchte bzw. kleine Unterschiede in der Handhabung von Immunoassays einen relativ großen Einfluß auf die Testergebnisse. Warum dieser Effekt nur bei realen Proben auftritt war nicht zu erkennen.

3.1.4.2. Vergleichspräzision

Zur Bestimmung der Vergleichspräzision s_R (Kapitel 2.5.1.2.) wurden zwölf Oberflächenwasserproben der Oder-Probenahmekampagne im Mai 2000 mit demselben Enzymimmunoassay von uns (Labor 1) sowie von der Firma SENSION GmbH, Augsburg (Labor 2) auf ihre Atrazinäquivalentgehalte geprüft. Die Tabelle 21 gibt die Ergebnisse wieder.

Tabelle 21: Vergleichspräzision des Anti-Atrazin-Enzymimmunoassays mit pAb AS46 (Für Labor 1 sind die Vertrauensintervalle angegeben für die t-Verteilung mit $P=95\%$; $f=4$, für Labor 2 mit $P=95\%$; $f=1$)

Probe	Ergebnis [$\mu\text{g/L}$ Atrazinäquivalente]	
	Labor 1	Labor 2
OT07OS	$0,740 \pm 0,042$	$0,666 \pm 0,174$
OT12SL	$0,697 \pm 0,031$	$0,560 \pm 0,724$
OT18BA	$0,619 \pm 0,022$	$0,656 \pm 0,000$
OR07OP	$0,396 \pm 0,028$	$0,292 \pm 0,559$
OR01CH	$0,337 \pm 0,058$	$0,258 \pm 0,216$
OR05KR	$0,294 \pm 0,014$	$0,292 \pm 0,191$
WT03PR	$0,253 \pm 0,033$	$0,196 \pm 0,152$
OR19GL	$0,103 \pm 0,017$	$0,072 \pm 0,034$
OR41SZ	positiv ($0,045 \pm 0,006$)	$0,075 \pm 0,025$
OR29AU	positiv ($0,038 \pm 0,003$)	$< 0,03$
OT32WA	positiv ($0,026 \pm 0,006$)	$< 0,03$
OR54DW	$< \text{LOD}$	$< 0,03$

Die Ergebnisse von Labor 2 weisen sehr hohe Vertrauensintervalle auf, da diese Messungen stets in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Durch Vergleich der beiden Analysenserien mit Hilfe des t-Tests wurde bestimmt, ob die unabhängig voneinander gewonnenen Daten einander äquivalent sind, oder ob sich die Werte statistisch signifikant unterscheiden. Abbildung 38 zeigt das Ergebnis.

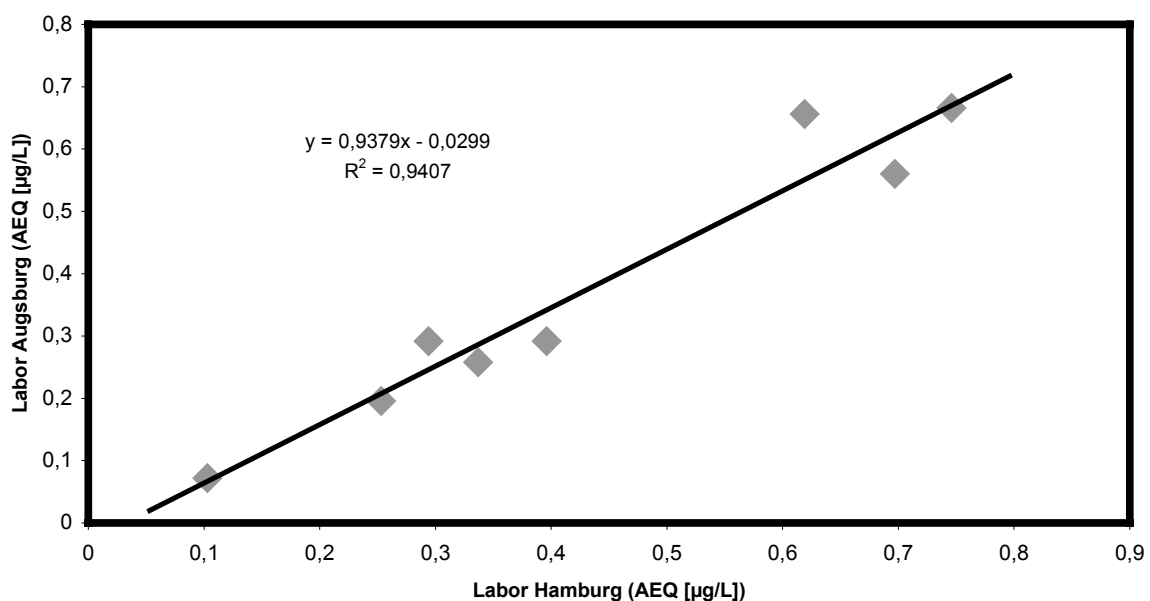


Abbildung 38: Vergleichspräzision des ELISAs

Der Prüfwert t_d , der aus den acht Proben mit quantifizierbaren Atrazinäquivalentdosen berechnet wurde, lag mit 2,07 unter dem Prüfwert der t-Verteilung für das Signifikanzniveau $P=95\%$ und den Freiheitsgrad $f=7$ (2,36). Dies bedeutet, dass die Ergebnisse keinen statistisch signifikanten Unterschied zeigen und gute Interlaboratoriumspräzisionen vorliegen. Die Vergleichspräzision der Methode kann daher als hinreichend robust angesehen werden.

3.1.4.3. pH-Einfluß auf die Genauigkeit des Enzymimmunoassays

Wasserproben können durch einen stark variierenden pH-Wert charakterisiert sein, z.B. durch Lösung von Kohlendioxid oder Einleitungen kommunaler Abwässer. Es war daher auch zu prüfen, ob der Immunoassay ausreichend robust gegenüber extremen pH ist. Hierzu wurden matrixfreie Meßproben auf Werte zwischen pH 1 und 13 eingestellt und jeweils mit dem E-LISA untersucht. Zusätzlich wurden Proben mit Standards auf eine 0,1 bzw. 1 $\mu\text{g/L}$ Atrazinkonzentration aufgestockt, um die Wiederfindung innerhalb dieser Reihe feststellen zu können. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 angegeben. Für die Proben ohne Aufstockung sind direkt die Meßergebnisse angegeben, für die Proben mit Aufstockung die Wiederfindungen.

Tabelle 22: Atrazin-Wiederfindung bei unterschiedlichen pH (Bei Proben ohne Aufstockung sind direkt die Meßergebnisse angegeben; Fehler geben die Vertrauensintervalle der t-Verteilung für $P=95\%$; $f=4$ wieder)

pH-Wert	ohne Aufstockung	mit 0,1 $\mu\text{g/L}$ Atrazin	mit 1 $\mu\text{g/L}$ Atrazin
1	> HOQ (> 3 $\mu\text{g/L}$)	>> 100 %	>> 100 %
2	0,055 \pm 0,069 $\mu\text{g/L}$	227,0 \pm 15,9 %	>> 100 %
3	< LOD (< 0,01 $\mu\text{g/L}$)	100,0 \pm 8,3 %	82,5 \pm 5,0 %
4	< LOD (< 0,01 $\mu\text{g/L}$)	102,0 \pm 1,9 %	85,5 \pm 17,5 %
5	< LOD (< 0,01 $\mu\text{g/L}$)	98,0 \pm 28,3 %	97,4 \pm 5,1 %
6	positiv (0,011 \pm 0,002)	115,0 \pm 4,8 %	104,7 \pm 8,5 %
7	< LOD (< 0,01 $\mu\text{g/L}$)	99,0 \pm 5,6 %	87,1 \pm 20,4 %
8	< LOD (< 0,01 $\mu\text{g/L}$)	104,0 \pm 13,3 %	107,6 \pm 11,6 %
9	< LOD (< 0,01 $\mu\text{g/L}$)	114,0 \pm 9,7 %	113,1 \pm 9,6 %
10	< LOD (< 0,01 $\mu\text{g/L}$)	114,0 \pm 7,3 %	100,5 \pm 2,5 %
11	< LOD (< 0,01 $\mu\text{g/L}$)	118,0 \pm 4,7 %	104,5 \pm 4,5 %
12	0,913 \pm 0,378	>> 100 %	>> 100 %
13	> HOQ (> 3 $\mu\text{g/L}$)	>> 100 %	>> 100 %

In einem pH-Bereich von 3 bis 11 wird die Genauigkeit nicht beeinträchtigt. Die Quantifizierung ist möglich. Oberhalb und unterhalb dieser Grenzen werden Atrazinkonzentrationen detektiert, die weit über den eingesetzten Mengen liegen und falsch sind. Die Proben, bei denen

nicht mit Atrazinstandards gespiked wurde, sondern nur der pH-Wert eingestellt worden war, sind im genannten Bereich als negativ zu bewerten. Beim Meßwert bei pH 6 handelt es sich um einen Ausreißer (wurde nachgewiesen durch t-Test). Sollte wider Erwarten eine Probe vorliegen, die einen pH außerhalb des gegebenen Bereichs aufweist, so ist der pH-Wert entsprechend zu korrigieren.

3.1.4.4. Auswirkung von Inkubationszeiten

Beim vorliegenden ELISA ist im Arbeitsprotokoll die Inkubation auf der Mikrotiterplatte bzw. eine Substratreaktion an drei verschiedenen Stellen vorgesehen. Diese Arbeitsschritte unterliegen kaum vermeidbaren Variationen auf die Inkubationszeit. Daher wurde geprüft, in welcher Art sich diese Variationen in der Leistungsfähigkeit des Immunoassays auswirken. Im einzelnen wurden studiert:

- Inkubation mit einer Verdünnung des Immunglobulins
- Inkubation mit der Probe und dem Enzymtracer
- Substratreaktion

Die Beschichtung der Mikrotiterplatte mit dem Kaninchen-Immunglobulin AS46 nimmt etwa 16 Stunden in Anspruch. Zwischen 14 und 24 Stunden wurden keine Auswirkungen auf die Genauigkeit des ELISAs festgestellt. Diese Coatingzeiten sollten aber nicht unterschritten werden. Ansonsten ist zu prüfen, ob die Polystyroloberfläche vollständig mit Antikörpern abgesättigt ist, damit im weiteren Verlauf des ELISAs keine unspezifische Bindung (z.B. vom Enzymtracer) mehr erfolgen kann. Außerdem sollten die Coatingszeiten nicht überschritten werden, da sonst die Gefahr von Antikörperdenaturierung steigt. Die polyklonalen Antikörper sind gegen Carbonat-Puffer relativ inert.

Als Inkubationszeit mit Probe und Enzymtracer werden im Mittel 60 Minuten angegeben. Es wurde die Wiederholpräzision in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bestimmt. Die Daten sind in der Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 23: Ermittelte Wiederholpräzision für verschiedene Proben-Inkubationszeiten (Angabe der Fehler durch Vertrauensintervalle der t-Verteilung für $P=95\%$ und $f=4$)

Standard [$\mu\text{g/L}$]	50 Minuten	60 Minuten	70 Minuten
0,03	$\pm 19,8 \%$	$\pm 17,9 \%$	$\pm 6,8 \%$
0,1	$\pm 20,9 \%$	$\pm 7,9 \%$	$\pm 14,0 \%$
0,3	$\pm 27,1 \%$	$\pm 12,8 \%$	$\pm 5,0 \%$
1	$\pm 32,0 \%$	$\pm 12,9 \%$	$\pm 19,4 \%$
3	$\pm 20,4 \%$	$\pm 12,6 \%$	$\pm 20,6 \%$

Inkubationszeiten von 60 Minuten sollten nicht unterschritten werden. Für kürzere Inkubationszeiten war eine höhere Unpräzision zu beobachten, so daß davon auszugehen ist, dass erst nach 60 Minuten die Anlagerung der Enzymtracer an die Antikörper erfolgt ist und keine weiteren wesentlichen Veränderungen mehr erfolgen. Geringfügig höhere Inkubationszeiten scheinen sich nicht negativ auszuwirken. Trotzdem sollte im Interesse konsistenter Daten die Inkubationszeit konstant bei 60 Minuten gehalten werden.

Unterschiedliche Dauer der Substratreaktion führt zu unterschiedlich starker Intensität des Meßsignals bzw. unterschiedlicher Farbentwicklung. Selbst bei gleicher Dauer der Substratreaktion kann die Intensität sehr unterschiedlich ausfallen, da die Enzymtracerkonzentration aufgrund der starken Verdünnung, die gewählt werden muß, sehr großen Schwankungsbreiten unterliegt. Die verwendeten, bei Immunoassays üblichen Pipetten weisen im Volumenbereich von 1 µL und weniger Abweichungen von bis zu 25% auf und sind dadurch sehr ungenau.

In der Literatur wird allgemein empfohlen, Optische Dichten (OD: Optical Density) von 0,8 für das Maximalsignal nicht zu unterschreiten, um mit hinreichender Sicherheit quantitative Untersuchungen durchführen zu können [57].

Im vorliegenden Fall wurde bei zwölf untersuchten Enzymimmunoassays, die eine Optische Dichte zwischen 1,0 und 2,2 aufweisen, kein Einfluß auf die Genauigkeit der Methode festgestellt. Bei Tests, bei denen die OD höher ausfällt, sollte man sich unterhalb des durch das Photometer vorgegebenen Meßbereichs bewegen. Laut Spezifikation reicht dieser bis 3,0. Trotzdem sollte, sofern das Meßsignal einmal höhere Werte ergibt, eine weitergehende Validierung durchgeführt werden.

3.1.4.5. Stabilität nach Stoppreaktion

Der nach Abstoppen der Substratreaktion mit 1M Schwefelsäure entstehende Farbstoff ist nur über einen endlichen Zeitraum stabil und sollte daher möglichst sofort photometrisch untersucht werden, um Verfälschungen des Ergebnisses durch erfolgende ungleichmäßige nachreagierendes Substrat bzw. durch Zerfall des Farbstoffes zu vermeiden. Der Einfluß verschieden langer Wartezeiten ist in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Optische Dichte (OD) nach verschiedenen Zeiten, nachdem die Farbreaktion mit Im Schwefelsäure abgestoppt wurde. (Angabe der Fehler durch Vertrauensintervalle der t-Verteilung für $P=95\%$ und $f=4$)

Zeit nach Abstoppen	Extinktion Messung 1	Extinktion Messung 2	Extinktion Messung 3	Extinktion Messung 4
0 Minuten	$1,945 \pm 0,133$	$1,553 \pm 0,067$	$1,309 \pm 0,108$	$0,802 \pm 0,022$
5 Minuten	$1,948 \pm 0,139$	$1,553 \pm 0,092$	$1,312 \pm 0,103$	$0,802 \pm 0,022$
10 Minuten	$1,912 \pm 0,214$	$1,581 \pm 0,155$	$1,325 \pm 0,114$	$0,814 \pm 0,031$
20 Minuten	$1,909 \pm 0,175$	$1,580 \pm 0,186$	$1,326 \pm 0,133$	$0,816 \pm 0,031$
30 Minuten	$1,901 \pm 0,150$	$1,588 \pm 0,194$	$1,327 \pm 0,136$	$0,819 \pm 0,032$
60 Minuten	$1,878 \pm 0,114$	$1,567 \pm 0,214$	$1,316 \pm 0,147$	$0,814 \pm 0,030$
120 Minuten	$1,829 \pm 0,108$	$1,485 \pm 0,150$	$1,260 \pm 0,103$	$0,785 \pm 0,023$
240 Minuten	$1,701 \pm 0,100$	$1,404 \pm 0,142$	$1,193 \pm 0,100$	$0,750 \pm 0,022$

Das Meßsignal und damit die Genauigkeit der Methode unterliegt bei einer Vermessung innerhalb von 5 Minuten keiner signifikanten Veränderung. Nach 10 Minuten hingegen nimmt die Präzision sprunghaft ab, und mit weiter fortschreitender Zeit zerfällt der Farbstoff immer mehr. Daher sollte die Auswertung einer abgestoppten Platte innerhalb von 5 Minuten erfolgen, um Fehler zu vermeiden, die auf die Veränderung der Farbintensität zurückzuführen sind.

3.2. Untersuchung aquatischer Proben der Oder (AP 2)

Die Oder stellt einen bedeutenden Fluss des östlichen Mitteleuropa dar und ist von der Quelle bis zur Mündung in die Ostsee etwa 854 km lang. Sie entspringt 25 km östlich von Ölmütz im Odergebirge der östlichen tschechischen Sudeten in einer Höhe von 634 m über dem Meeresspiegel und besitzt ein Einzugsgebiet von 118.861 km². Davon liegen 89% auf polnischem Gebiet, 6% auf tschechischem Gebiet und 5% auf dem Gebiet der Bundesrepublik Deutschland. Die Oder ist mit einer mittleren Jahresabflußsumme von 16.5 Mrd. km³ Wasser am Pegel Hohensaaten Finow der sechstgrößte Süßwasserzufluß der Ostsee [224].

Entsprechend der Geomorphologie und dem Abflußverhalten läßt sich die Oder in folgende drei große Einzugsgebiete untergliedern:

- *Obere Oder:* Von den Quellen bis Wroclaw (ehemals Breslau)
- *Mittlere Oder:* Von Wroclaw bis zur Mündung der Warthe
- *Untere Oder:* Von der Mündung der Warthe bis zur Mündung in das Stettiner Haff

Es existieren für Pflanzenschutzmittel der Triazinreihe in der Polnischen Republik Grenzwerte für Grundwässer, die fünffach höher liegen als jene der europäischen Union (0,5µg/L; Kategorie B: „Weitergehende Untersuchungen sind erforderlich“). Ferner sind viele Triazine wie Atrazin, Propazin oder Simazin, die in der Bundesrepublik Deutschland verboten sind, in Polen nach wie vor zugelassen [225].

Aufgrund der Ergebnisse von Einzelanalysen mit gaschromatographischen Methoden war davon auszugehen, daß Triazinherbizide, allen voran das Atrazin, weite Verwendung in der polnischen und tschechischen Landwirtschaft finden und daher in das Ökosystem der Oder eingetragen werden [226]. Eine Erfassung der Triazinbelastung über den gesamten Oderlauf erfolgte bislang jedoch nicht. Gerade im Hinblick die mögliche Erweiterung der Europäischen Union ist es jedoch nötig, Klarheit über die aktuelle Belastungssituation der Oder mit Triazinherbiziden, sowie über die potentiellen Eintragsquellen zu erhalten. Die Abbildung 39 gibt das Netz der Probennahmekampagnen mit den einzelnen Probennahmepunkten wieder.

In der *Abbildung 40* sind die Atrazinäquivalentkonzentrationen der Proben der oberen und mittleren Oder dargestellt. In der Grafik wird der Flussverlauf entsprechend der Entfernung zur Quelle von links nach rechts wiedergegeben. Die hellen Balken geben Proben des Hauptflußlaufs wieder, die dunklen die Proben der Zuflüsse. Die Werte sind jeweils dem Grenzwert der EU-Trinkwasserverordnung von $0,1\mu\text{g/L}$ gegenübergestellt.

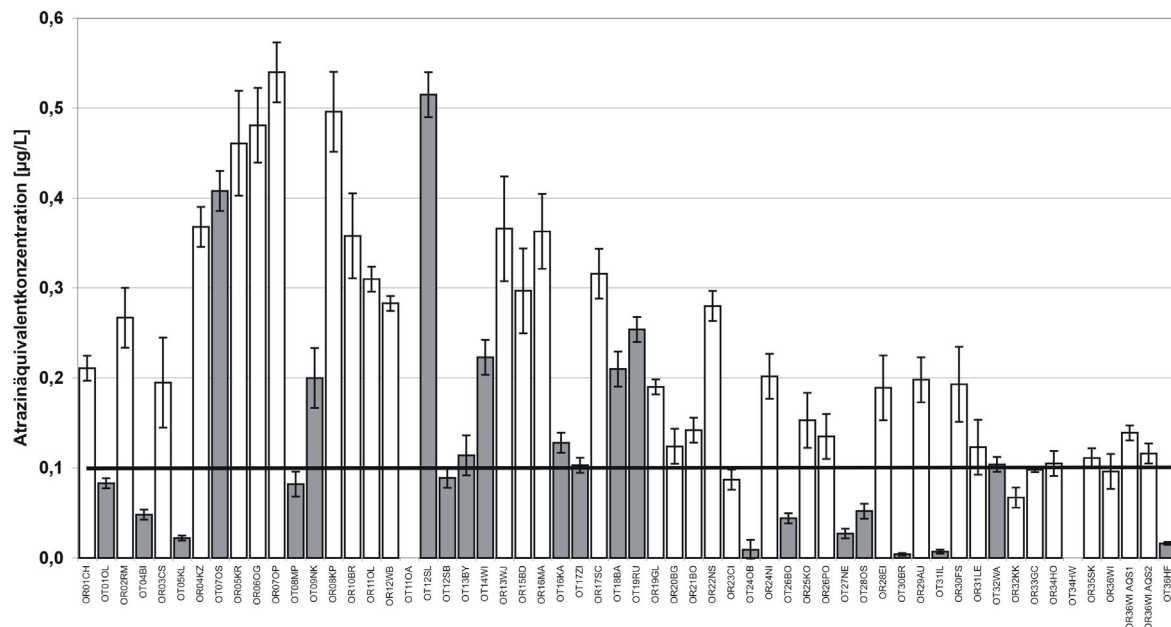


Abbildung 40: Triazinbelastung der oberen und mittleren Oder im Juni 1999; (Angabe der Fehler durch Vertrauensintervalle der t-Verteilung für $P=95\%$ und $f=4$; die hellen Balken repräsentieren den Oderlauf, die dunklen die Nebenflüsse der Oder)

Die obere Oder ist signifikant durch Triazine kontaminiert. Sie zeigt ein Belastungsprofil, das bei Opole (ORP07OP) ein Maximum von $0,5\mu\text{g/L}$ erreicht, welches danach durch geringer konzentrierte Zuflüsse kontinuierlich verdünnt wird. Allerdings sind einige Nebenflüsse ebenfalls stark durch Triazine belastet. Die zeigt die Belastung der Sleza (OT12SL) mit über $0,5\mu\text{g/L}$ Atrazinäquivalenten. Die mittlere Oder weist eine insgesamt niedrigere Belastung auf. Trotzdem wird der Grenzwert der EU-Trinkwasserverordnung in vielen Fällen überschritten.

3.2.2. Triazinbelastung der Oder (PN 05/00)

Das Ausmaß der Kontamination mit Triazinen wurde daraufhin durch Analyse von weiteren Wasserproben bestätigt und das Probennahmenetz auf die untere Oder, das Stettiner Haff, sowie die Warthe ausgedehnt. Die entsprechende zweite Probennahmekampagne erfolgte im Mai 2000. Die Ergebnisse dieser Untersuchungskampagne sind in *Abbildung 41* wiedergegeben.

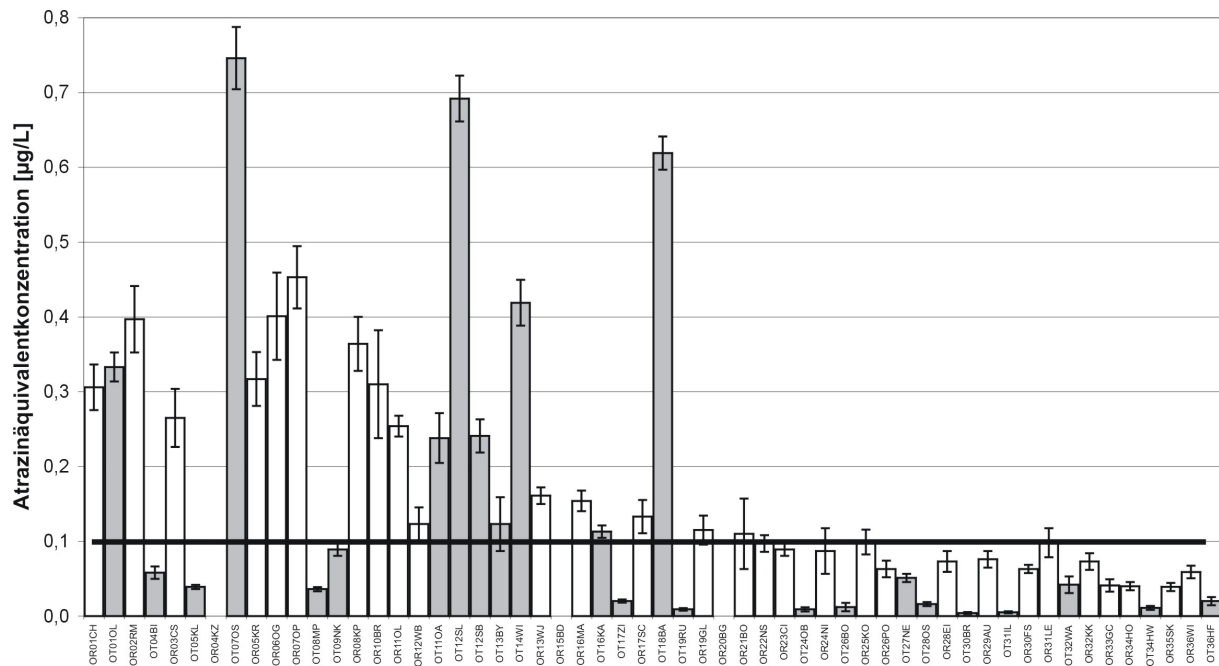


Abbildung 41: Triazinbelastung der oberen und mittleren Oder im Mai 2000; (Angabe der Fehler durch Vertrauensintervalle der t-Verteilung für $P=95\%$ und $f=4$; die hellen Balken repräsentieren den Oderlauf, die dunklen die Nebenflüsse der Oder)

Erneut lagen die Atrazinkonzentrationen in der gesamten oberen Oder deutlich oberhalb des deutschen bzw. polnischen Grenzwerts. Der höchste Meßwert trat mit $>0,4\mu\text{g/L}$ wieder bei Opole (OR07OP) auf. Danach nahm die Konzentration flußabwärts kontinuierlich ab. Die mittlere Oder wies deutlich niedrigere Atrazinäquivalentkonzentrationen nahe am EU-Trinkwassergrenzwert ($0,1\mu\text{g/L}$) auf.

Besondere Aufmerksamkeit verdienen die Odernebenflüsse bei Osobloga (OT07OS), Sleza (OT12SL) und Barycz (OT18BA). Hier lagen sehr hohe Belastungen vor. (Atrazinäquivalente von über $0,6\mu\text{g/L}$) Sie überschreiten selbst den zulässigen EU-Trinkwassergrenzwert für die Summe an allen Pflanzenschutzmitteln und PCBs. Die Proben sind auch nach der Trinkwasserklassifizierung der polnischen Umweltbehörde der Kategorie B zuzuordnen.

In der unteren Oder und im Stettiner Haff wurde der Grenzwert der EU-Trinkwasserverordnung nicht erreicht, wobei die untere Oder Werte aufweist, die um eine Äquivalentkonzentration von $0,05\mu\text{g/L}$ schwanken. Im Stettiner Haff werden durch den Enzymimmunoassay Atrazinäquivalentkonzentrationen festgestellt, die um die Nachweisgrenze ($0,02\mu\text{g/L}$) schwanken.

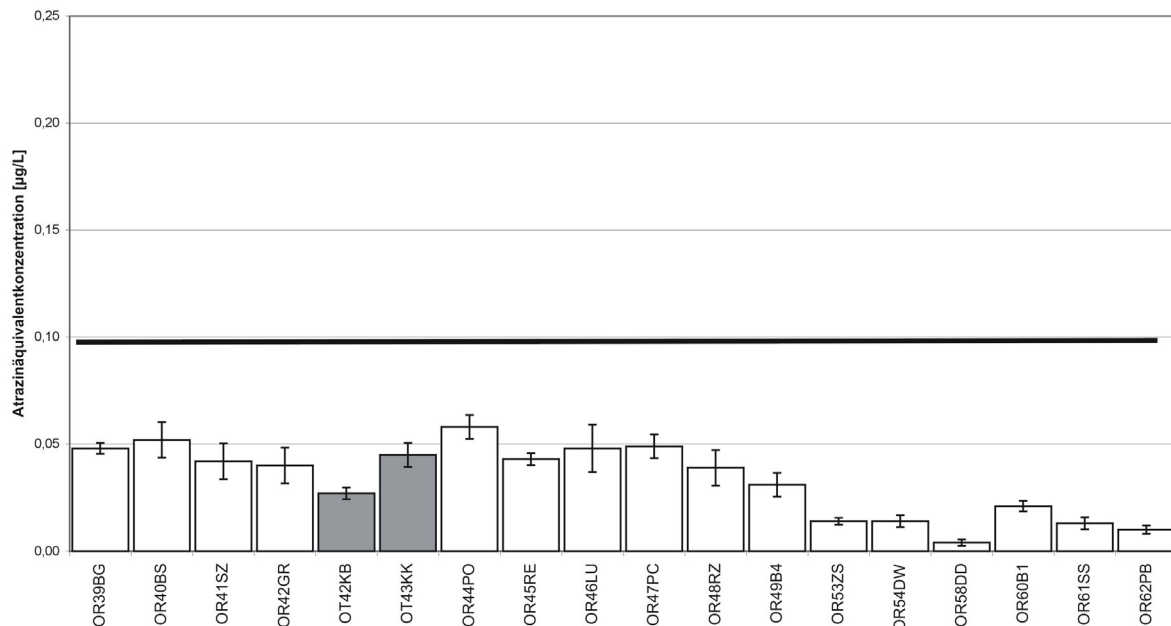


Abbildung 42: Triazinbelastung der unteren Oder und des Stettiner Haffs im Mai 2000 (Angabe der Fehler durch VB der t-Verteilung für $P=95\%$ und $f=4$; die hellen Balken repräsentieren den Hauptflußlauf, die dunklen die Zuläufe)

3.2.3. Triazinbelastung der Warthe (PN 05/00)

Abbildung 43 gibt an der Warthe gemessenen Werte wieder. Die Warthe erscheint danach nur als geringfügig belastet. Der Warthezufluß bei Prosna-Komorze (WT03PR) wies als einzige Probe eine Atrazinäquivalentkonzentration oberhalb des EU-Grenzwerts auf.

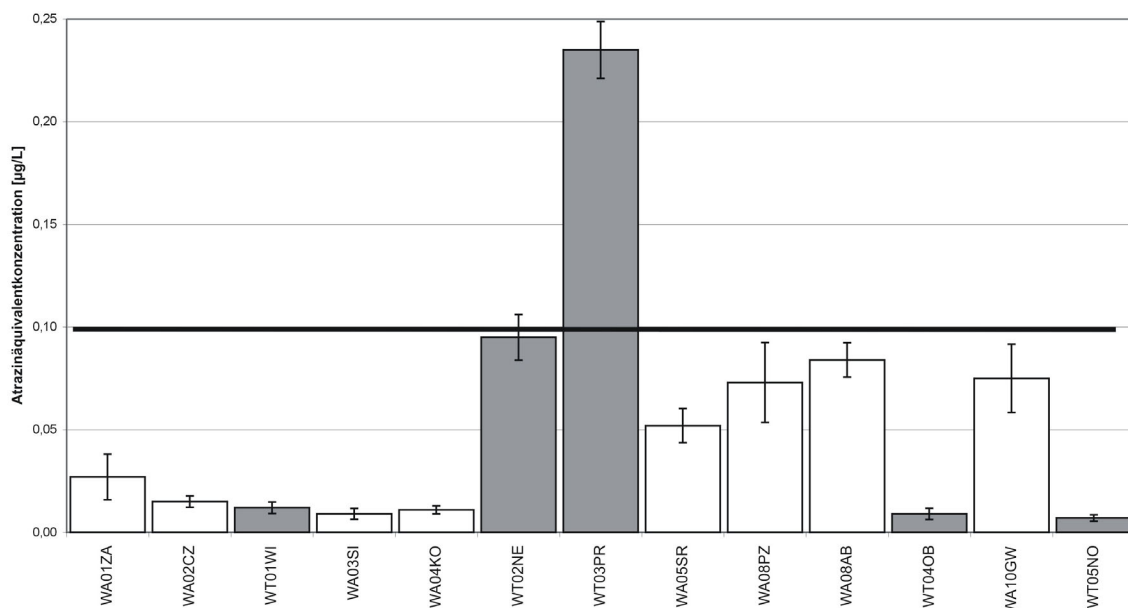


Abbildung 43: Triazinbelastung der Warthe im Mai 2000 (Angabe der Fehler durch VB der t-Verteilung für $P=95\%$ und $f=4$; die hellen Balken repräsentieren den Warthefluß, die dunklen die Warthezuflüsse)

3.2.4. Interne Validierung durch Aufstockungs- und Verdünnungsreihe

Wie in Abschnitt 3.1.1. erwähnt, werden die Messergebnisse beim Enzymimmunoassay durch Einflüsse von Matrixsubstanzen verfälscht. Um diese Matrixeffekte in realen Proben besser beurteilen zu können, wurden die am höchsten belasteten Proben OT07OS, OT12SL und OT18BA der Probennahme Mai 2000 in verschiedenen Verdünnungen angesetzt bzw. mit Standards aufgestockt und anschließend mit dem ELISA untersucht. Die Tabelle 25 zeigt die Ergebnisse nach Hochrechnung auf die Gesamtprobe.

Tabelle 25: Aufstockungs- und Verdünnungsreihe von drei ausgewählten Proben. (Angabe der Fehler durch Vertrauensintervalle der t-Verteilung für P=95% und f=4)

Verdünnung / Aufstockung	OT07OS (05/00) [µg/L]	OT12SL (05/00) [µg/L]	OT18BA (05/00) [µg/L]
10 % (1:10)	$0,890 \pm 0,167$ (f=4)	$0,870 \pm 0,194$ (f=4)	$0,870 \pm 0,278$ (f=4)
25 % (1:4)	$0,724 \pm 0,078$ (f=4)	$0,760 \pm 0,122$ (f=4)	$0,752 \pm 0,078$ (f=4)
50 % (1:2)	$0,716 \pm 0,067$ (f=4)	$0,698 \pm 0,072$ (f=4)	$0,724 \pm 0,150$ (f=4)
100 % (Original)	$0,726 \pm 0,086$ (f=4)	$0,685 \pm 0,050$ (f=4)	$0,684 \pm 0,161$ (f=4)
+ 0,1 µg/L	$0,696 \pm 0,109$ (f=4)	$0,662 \pm 0,063$ (f=4)	$0,681 \pm 0,215$ (f=4)
+ 0,3 µg/L	$0,709 \pm 0,235$ (f=4)	$0,676 \pm 0,100$ (f=4)	$0,639 \pm 0,147$ (f=4)
Mittelwert:	$0,714 \pm 0,031$ (f=20)	$0,696 \pm 0,094$ (f=20)	$0,696 \pm 0,108$ (f=20)

Bei den 1:10-Verdünnungen fallen alle Werte höher aus als bei den weiteren Proben der Verdünnungs- und Aufstockungsreihe. Dies läßt sich damit begründen, dass hier eine Messprobe vorlag, deren Konzentration unterhalb der Quantifizierungsgrenze der vorliegenden Matrix lag. Die Atrazinbelastung wird dadurch überschätzt. Für alle weiteren Proben war innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs kein statistisch signifikanter Unterschied in den ermittelten Konzentrationen festzustellen. Die ermittelten Werten konnten daher unter Vernachlässigung der niedrigsten Verdünnungsstufe zu einem Wert zusammengezogen werden.

Die interne Validierung untermauert das Ergebnis, dass an den drei untersuchten Probenahmeorten die Atrazinbelastung mit 0,7µg/L hoch ist. Es belegt ferner die Wichtigkeit der Kenntnis über die Quantifizierungsgrenzen, unterhalb derer es zu einer Überschätzung der Atrazinäquivalentkonzentration kommt.

3.2.5. Feldstudie mit Immunfiltration

Der ELISA stellt eine schnelle Methode zum Nachweis von Triazinen dar, ist jedoch für Untersuchungen im Feld nicht geeignet, da er ohne eine gewisse apparative Ausstattung nicht auskommt. Die Firma Sension GmbH entwickelte daher mit dem SensioScreen TR500 (Kapitel 2.4.7.) einen Schnelltest auf der Basis der Immunfiltration, mit dem es gelingt, innerhalb von wenigen Minuten eine qualitative bzw. semi-quantitative Triazinanalyse vorzunehmen.

Auch qualitative Tests müssen vor ihren Einsatz einer Validierung unterzogen werden. Hierzu wurde als Referenzverfahren der konventionelle Mikrotiterplatten-ELISA mit den gleichen Antikörpern und Enzymtracern gewählt, da dieser bereits in Abschnitt 3.1. ausführlich behandelt wurde.

Die Analyse im Immunfiltrations-Schnelltest erfolgt mit Hilfe einer Kassette, in die die zu untersuchenden Proben und die benötigten Reagenzien nacheinander eingetropft wurden. Die Kassette enthält eine mit pAb AS46 beschichtete Membran sowie Absorbermaterial. Zwei Kavitäten sind für Proben vorgesehen, die restlichen drei Kavitäten für Atrazin-Standards (Blank; 0,5µg/L; 10µg/L). Nach der Durchführung des Tests wird eine visuelle Auswertung der Farbintensitäten durchgeführt und dadurch eine Abschätzung der Konzentration erreicht. Von daher ist keine zusätzliche apparative Ausrüstung erforderlich.

62 Proben wurden mit dem SensioScreen TR500 im Feld untersucht. Mit jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Da es sich um einen qualitativen Test handelt, der nur Konzentrationsbereiche liefert, mußten die Ergebnisse in Kategorien eingeteilt werden. Für umweltanalytische Betrachtungen ist 0,5µg/L der EU-Summengrenzwert für PSM, der nicht überschritten werden sollte. Alle Proben mit Atrazinkonzentrationen oberhalb dieses Wertes wurden daher als „positiv“ bewertet. Alle Proben in denen kein Atrazin nachzuweisen war, wurden als „negativ“ bewertet. Aufgrund des qualitativen Charakters der Immunfiltrations-Ergebnisse wird ein Bereich gekreuzt, der keiner der beiden Kategorien zuzuordnen ist. Dieser Bereich wurde als „unklarer“ oder „Bereich mit Spurenkonzentrationen“ bezeichnet.

Kategorie 1: Negativ (entspricht einer Färbung gleich dem Atrazin Blank-Standard)

Kategorie 2: Spurenkonzentrationen (entspricht einer Färbung zwischen dem Atrazin Blank- und dem 0,5µg/L-Standard)

Kategorie 3: Positiv (entspricht einer Färbung gleich dem 0,5µg/L Atrazin-Standard oder heller)

Die Zuordnung erfolgte von drei unabhängigen Personen. So konnten die Farbintensitäten der Kavitäten ohne zusätzlichen apparativen Aufwand möglichst objektiv erfasst werden. Unter Berücksichtigung der Kategorisierung wurden 31 Wasserproben als Atrazin-„negativ“ beurteilt, bei 14 Proben wurden als Atrazin-„positiv“ eingestuft. Bei 17 Proben erfolgte die Zuordnung in die Kategorie „Spurenkonzentrationen“. In Abbildung 44 sind die Ergebnisse des SensioScreen TR500 auf der x-Achse wiedergegeben. Zum Vergleich sind die Ergebnisse der Mikrotiterplatten-ELISAs auf der y-Achse gegenübergestellt. Jeder Punkt entspricht einer Einzelprobe. Für ein Maximum an Übersichtlichkeit wurden innerhalb der drei Immunfiltrationskategorien die Proben nach aufsteigender Atrazinkonzentration des Mikrotiterplatten-ELISAs geordnet.

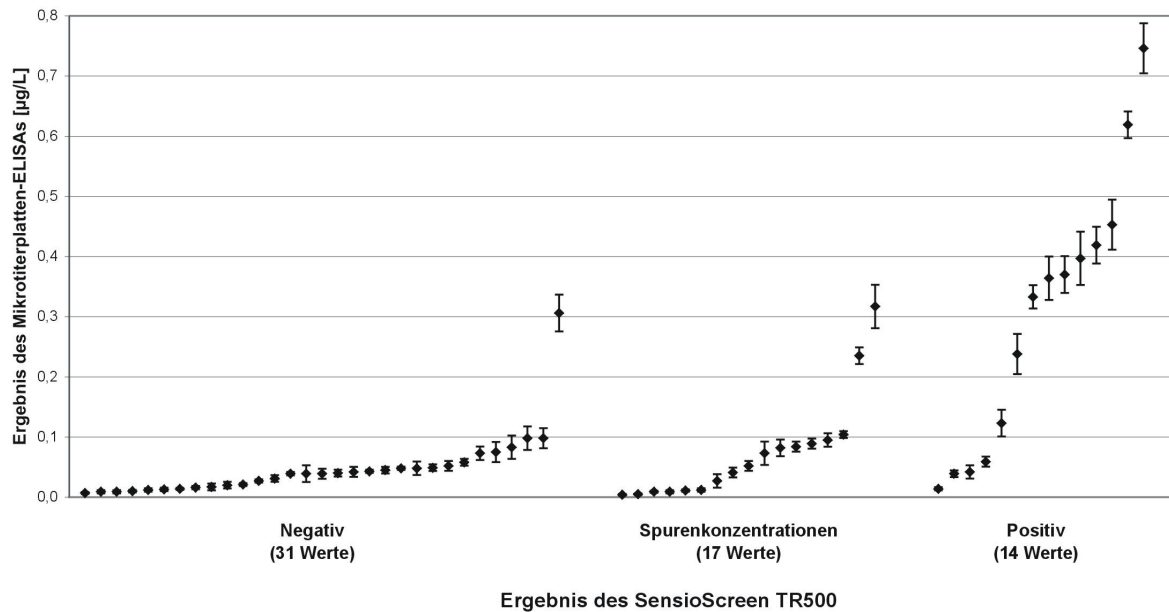


Abbildung 44: Vergleich Immunfiltrations-Schnelltest mit Mikrotiterplatten-ELISA (Angabe der Fehler durch Vertrauensintervalle der t -Verteilung für $P=95\%$ und $f=4$)

Die meisten mit dem SensioScreen TR500 erhaltenen Meßwerte bestätigen die Analyse mit dem konventionellen ELISA. 30 von 31 Proben, die im Schnelltest als „negativ“ beurteilt wurden, lagen im konventionellen ELISA unterhalb einer Atrazinäquivalentdosis von $0,1\mu\text{g/L}$. 10 von 14 Proben, die im Schnelltest als „positiv“ beurteilt wurden, lagen oberhalb dieses Wertes. Durch das Ergebnis wird belegt, dass durch Immunfiltration eine große Zahl an Proben vor einer weitergehenden Analyse aussortiert und so Kosten eingespart werden können.

Zur Bestimmung der Belastbarkeit der erzielten Ergebnisse erfolgte eine Wiederholungsmessung von Proben im Grenzbereich sowie die Analyse weiterer Proben mit dem Immunfiltrationsassay. Einige Proben hätten danach in andere Kategorien eingeordnet werden müssen. Es ergab sich dabei eine noch bessere Übereinstimmung zwischen Immunoassay und SensioScreen TR500. Die Diskrepanz zeigt, dass die Robustheit des Tests noch verbessert werden kann.

3.2.6. Bestimmung von Triazinen durch GC/MS

Zur weiteren Validierung wurden in 26 Wasserproben der Probennahme im Mai 2000 die Triazingehalte mit Hilfe der GC/MS bestimmt. Tabelle 26 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 26: Mit GC/MS bestimmte Triazinbelastung (PN 05/00) (n.d.: not detected)

Probennahmepunkt	Simazin [$\mu\text{g/L}$]	Atrazin [$\mu\text{g/L}$]	Propazin [$\mu\text{g/L}$]
OR01CH	n.d.	0,15	0,01
OT01OL	0,08	0,26	n.d.
OR02RM	n.d.	0,45	0,05
OR05KR	n.d.	0,55	n.d.
OR07OP	0,13	0,44	0,03
OT08MP	n.d.	0,03	n.d.
OT09NK	n.d.	0,01	0,03
OR10BR	n.d.	0,3	n.d.
OR11OL	n.d.	0,81	n.d.
OR12WB	n.d.	0,13	n.d.
OT13BY	n.d.	0,11	n.d.
OR15BD	n.d.	n.d.	n.d.
OR16MA	n.d.	0,18	n.d.
OT16KA	n.d.	0,11	n.d.
OR17SC	n.d.	0,11	n.d.
OR22NS	n.d.	0,07	n.d.
OT26BO	n.d.	n.d.	n.d.
OT32WA	n.d.	0,01	n.d.
OR48RZ	n.d.	0,03	n.d.
OR49B4	n.d.	n.d.	n.d.
OR52B2	n.d.	0,23	n.d.
OR53ZS	n.d.	n.d.	n.d.
OR54DW	n.d.	n.d.	n.d.
OR58DD	n.d.	0,01	n.d.
OR60B1	n.d.	n.d.	n.d.
OR61SS	n.d.	n.d.	n.d.

In den meisten Proben wurde Atrazin gefunden. In vier Fällen waren auch Propazin und in zwei Fällen Simazin nachzuweisen. Terbutylazin wurde nicht gefunden.

Die GC/MS bestätigt die Ergebnisse des ELISA, dass hier eine signifikante Belastung mit Triazinen vorliegt. Zweifelhaft ist jedoch die Belastung bei OR11OL, die deutlich höher ausfällt als die Belastung an den beiden benachbarten Probenahmepunkten. Da in dieser Region keine großen Zuflüsse liegen und die ELISA-Daten damit plausibel sind, wurde angenommen, dass dieser Wert falsch ist und aus der weiteren Auswertung genommen. Abbildung 45 stellt die gemessenen Atrazinäquivalente des ELISAs denen der durch GC/MS bestimmten Atrazinwerten gegenüber.

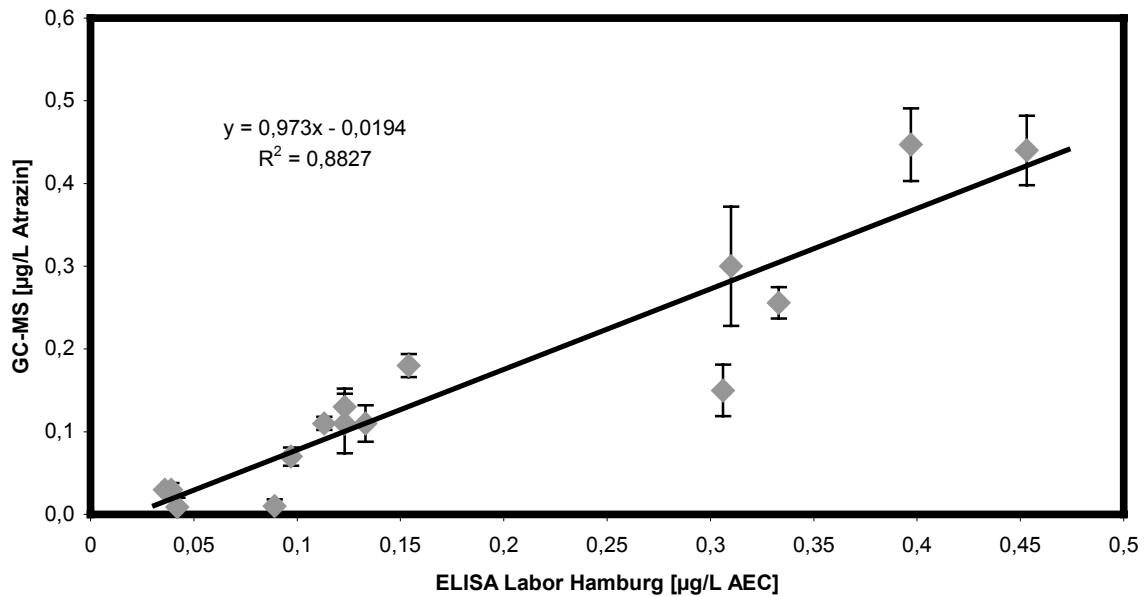


Abbildung 45: Vergleich ELISA mit GC/MS (Angabe der Fehler durch Vertrauensintervalle der t -Verteilung für $P=95\%$ und $f=4$)

Vergleicht man die beiden Verfahren statistisch, so wird für die vorliegende Reihe nach t -Test $t_d=0,64$ ermittelt. Der Prüfwert ist 2,12 ($P=95\%$; $f=16$). Damit liegt kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Messreihen vor.

3.2.7. Triazinbelastung der Oder (PN 10/00)

Der Applikationszeitraum der Triazinherbizide in der Landwirtschaft liegt hauptsächlich zwischen Mai und Juni. Zur Abklärung der Verweildauer des Triazins wurden auch im Oktober 2000 Proben genommen und mit ELISA auf Triazine untersucht. Tabelle 27 beschreibt die Ergebnisse.

Tabelle 27: Triazinbelastung der oberen Oder im Oktober 2000 (Angabe der Fehler durch Vertrauensintervalle der t-Verteilung für $P=95\%$ und $f=4$)*

Probennahmeort	Atrazinäquivalentkonzentration [$\mu\text{g/L}$]
OR02RM	< LOQ ($0,035 \pm 0,003$)
OR04KZ	< LOQ ($0,028 \pm 0,003$)
OR05KL	< LOQ ($0,020 \pm 0,003$)
OR05KR	< LOQ ($0,035 \pm 0,006$)
OR15BD	< LOQ ($0,029 \pm 0,003$)
OR19GL	< LOQ ($0,032 \pm 0,006$)
OR26PO	< LOQ ($0,029 \pm 0,006$)

Alle detektierten Atrazinäquivalente lagen nur knapp über der Nachweisgrenze und deutlich unter der Quantifizierungsgrenze für Oberflächenwasser. Die Belastung ist möglicherweise auf kontinuierliches Leaching von landwirtschaftlich genutzten Ackerflächen zurückzuführen.

* LOQ: untere Quantifizierungsgrenze (Kapitel 3.1.2.1.)

3.3. Entwicklung von Standardmaterialien für die Detektion von gebundenen Triazinrückständen (AP 3)

Atrazin wird anthropogen in das Ökosystem eingetragen und kommt dadurch direkt mit Böden in Kontakt, deren organisches Material zu einem großen Teil in Huminstoffen festgelegt ist. Diese können Atrazin unter Bildung von nicht extrahierbaren Rückständen binden und entziehen es einer Untersuchung mit Methoden der konventionellen Analytik. Wie im Abschnitt 2.2.5. gezeigt wurde, erwachsen durch gebundene Rückstände Langzeithypothesen, die die betroffenen Böden belasten. Vergleichbares gilt für nicht extrahierbare Rückstände in Pflanzen, die über die Nahrungskette von Tieren und Menschen aufgenommen werden.

Grundvoraussetzung für den Aufbau eines Analysenverfahrens für gebundene Rückstände ist der Einsatz von geeigneten Kalibrationsmaterialien. Wichtige Anforderungen an dieses Material sind:

- Huminstoff: Die physikochemischen Eigenschaften und die Gestalt des „hosts“, an den die PSM-Rückstände gebunden sind, müssen repräsentativ für natürlich auftretende Huminstoffe sein.
- „bound residue“: Struktur und Bindungsart müssen mit einem natürlich vorkommenden gebundenen Rückstand identisch sein. Die Quantität der gebundenen Rückstände (im folgenden auch als „Beladung“ bezeichnet) muß über einen großen Bereich variierbar sein.
- Verfügbarkeit: Die Standards sollten möglichst allgemein, d.h. zeitlich und räumlich zugänglich sein, um das Kalibrationsmaterial reproduzierbar herstellen zu können. Es muß in ausreichenden Mengen herstellbar sein.
- Kontrollsubstanz: Es sollte eine Substanz existieren, die den gleichen Huminstoff ohne gebundene Rückstände darstellt und damit als Negativkontrolle des Analysenverfahrens eingesetzt werden kann.
- Einfachheit der Synthese: Die Substanzen sollten leicht zugänglich sein. Auch Kosten- und Zeitfaktoren sollten einen überschaubaren Rahmen nicht überschreiten.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, neuartige Standardsubstanzen für gebundene Triazinrückstände zu entwickeln und die „bound residue“-Analysen mit Enzymimmunoassays durchzuführen.

Drei verschiedene Strategien wurden eingesetzt:

- „Inkubationsstrategie“
- „Direktpolymerisationsstrategie“
- „Monomerenstrategie“

3.3.1. „Inkubationsstrategie“

Zur Herstellung der gebundenen Triazinrückstände wurden ausgewählte Humin- und Fulvinsäuren mit Atrazin- bzw. Terbutylazinlösungen in jeweils wohldefinierten Konzentrationen über einen identischen Zeitraum miteinander inkubiert. Diese Versuche werden unter dem Begriff der „Inkubationsstrategie“ zusammengefasst.

3.3.1.1. Auswahl der synthetischen Modellschadstoffe und aquatischen Huminstoffe

Als synthetische Modelle wurden Substanzen ausgewählt, die aus der Umsetzung von Hydrochinon mit Natriumcarbonat ohne Zugabe weiterer Reagenzien synthetisiert worden waren. Sie symbolisieren Huminstoffe mit der einfachsten denkbaren Elementarzusammensetzung. Das Modell für Huminsäure trägt die Bezeichnung HS100, das Modell für Fulvinsäure das Kürzel FS101*. Für vergleichende Betrachtungen wurden die Fulvinsäure- und Huminsäure-refraktion aus der ROS-Probe HO13 in die Untersuchungsreihe aufgenommen. Die Fulvinsäure HO13FA sowie die Huminsäure HO13HA entstammen dem Hochmoor-Hohlohsee im Nordschwarzwald.

3.3.1.2. Ansatz von Inkubationslösungen

Die vier Huminstoffe wurden gemäß Tabelle 28 mit den Triazinherbiziden Atrazin und Terbutylazin inkubiert.

Tabelle 28: Ansatzmatrix der Inkubationslösungen

Schadstoff Huminstoff*	Ohne Schadstoff	Atrazin (100µg/L)	Terbutylazin (106,5µg/L)
Natur-Fulvinsäure (HO13FA; DOC=0,3g/L)	1 Probe	3 Proben	3 Proben
Natur-Huminsäure (HO13HA; DOC=0,3g/L)	1 Probe	3 Proben	3 Proben
Synthese-Fulvinsäure (FS101; DOC=0,3g/L)	1 Probe	3 Proben	3 Proben
Synthese-Huminsäure (HS100; DOC=0,3g/L)	1 Probe	3 Proben	3 Proben

* Die Substanzen HS100 und FS101 wurden von Herrn Dr. W. Herdering aus unserem Arbeitskreis synthetisiert und bereitgestellt.

* DOC = Gelöster organischer Kohlenstoff (Dissolved organic carbon)

Sämtliche triazinhaltige Lösungen wurden dreifach angesetzt. Kontrolllösungen enthielten lediglich die Huminstoffe in den entsprechenden Konzentrationen, jedoch keine Triazine. Sie wurden jeweils einfach angesetzt, um eventuelle Störeffekte durch Huminstoffe von den tatsächlichen Meßwerten unterscheiden zu können. Die Atrazinkonzentrationen der Inkubationslösungen lagen bei $0,47\mu\text{mol/L}$ (Atrazin $100\mu\text{g/L}$; Terbutylazin $106,5\mu\text{g/L}$). Die Huminstoffe wurden wegen ihrer polydispersen Struktur über ihren DOC charakterisiert. Üblicherweise lag er bei $0,3\text{g/L}$. Der pH-Wert sämtlicher Lösungen wurde mit $0,1\text{molarer}$ Natronlauge auf $7,0$ eingestellt und hierzu gleiche Mengen (5mL) der entsprechenden Triazin- und der Huminstofflösung gegeben. Das Gesamtvolumen der Inkubationslösungen betrug jeweils 10mL . Die angesetzten Lösungen wurden acht Wochen lang unter Rühren bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluß inkubiert.

Die DOC-Konzentration spiegelt nicht die natürlichen Gegebenheiten wieder, die in der Regel bei maximal 50mg/L liegen. Trotzdem wurde diese, um etwa eine Größenordnung höhere Konzentration gewählt, da bei niedrigeren Werten zu befürchten war, daß sich sonst zu geringe Triazinemengen an die Huminstoffe binden. Auch die Triazinkonzentration wurde mit $0,47\mu\text{mol/L}$ relativ hoch angesetzt, um die Situation von „Hot-Spots“ mitzuerfassen.

3.3.1.3. Festphasenextraktion

Nach der Inkubationsperiode wurden die entstandenen nicht-extrahierbaren Rückstände von den freien Triazinen durch Festphasenextraktion getrennt. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion war bei den vorliegenden, extrem geringen Probenmengen und der hohen Probenzahl keine sinnvolle Alternative, da die Extraktionsausbeuten zu gering und eine angestrebte Quantifizierung nicht möglich gewesen wäre und zudem viel Zeit beansprucht hätte.

Als Trägermaterial wurde C18-modifizierte Kieselgelphase eingesetzt. Bei der Wahl des Trägermaterials wurde beachtet, daß neben der Art der „stationären“ Phase die Packungsmenge und Packungshöhe des verwendeten Trägermaterials von entscheidender Bedeutung für eine reproduzierbare Analytik ist. Als optimal erwies sich die „Sep-Pak Classic“-Kartusche der Fa. Waters mit fest installiertem Trägermaterial (360mg), da sie die Erprobung von Versuchen an einer konstanten Menge an Füllmaterial in einer vorgegebenen Geometrie ermöglicht.

In Kapitel 2.1.3.1.2.2. wurde der Einfluß der Flußrate auf die Effizienz der Festphasenextraktion näher erläutert. Um einen Durchbruch der Analyten durch die Säule zu vermeiden, wurde die empfohlene Maximalflußrate von 10mL/min nicht überschritten. Um eventuell vorliegenden Gleichgewichte assoziativer Bindungen nicht zu stören und Dissoziationen zu vermeiden, wurde festgelegt, daß sich die Flußraten bei der Festphasentrennung von gebundenen und freien Triazinmolekülen oberhalb einer Flußrate von 8mL/min bewegen sollten,

Nach Anreicherung der gewünschten Analyten auf der RP-C18-Phase und einem Spülschritt zur Entfernung unerwünschter Matrixsubstanzen, wurden die retardierten Analyten mit Ethylacetat eluiert, das sich für diesen Zweck als besonders geeignet erwiesen hat.

Die experimentellen Bedingungen der Festphasenextraktion wurden auf Eignung zur vollständigen Trennung der gebundenen und frei in Lösung vorliegenden Triazine geprüft.

3.3.1.3.1. Prüfung der Huminstoffwiederfindung

In den angesetzten Inkubationslösungen lagen ungebundene Triazinmoleküle und die Huminstoff-gebundenen Triazine nebeneinander in Lösung vor. Es durfte zu keiner Adsorption der refraktären organischen Säuren an das lipophile Trägermaterial kommen, da die Abtrennung quantitativ erfolgen sollte.

Aus der Literatur waren Untersuchungen an im Handel erhältlichen Huminstoffen der Firma Aldrich bekannt, welche ergeben hatten, daß die Sorption dieser Huminstoffe an Umkehrphasenmaterialien nur geringfügig stattfindet, wenn ein pH-Wert von 5 nicht überschritten wird. Die entsprechenden Messungen der DOC-Gehalte vor und nach Durchführung einer Festphasenextraktion ergaben, daß die Huminstoffe die Säule quantitativ passiert ($98 \pm 3\%$) [54]. Zur Abklärung der Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf den vorliegenden Fall wurden jeweils 10mL Huminstofflösung (DOC=0,3g/L; pH 7) nach entsprechender Konditionierung der Festphasensäulen bei einer Flußrate von 8-10mL/min über die Säule gegeben. Von der eluierten Lösung wurden drei Fraktionen in gleichen Mengen genommen und die mittlere Fraktion zur photometrischen Vermessung bereitgestellt. Diese Fraktion wird als wässriger Durchlauf bezeichnet. Die beiden anderen Fraktionen wurden verworfen. Anschließend wurde die Säule mit insgesamt 10mL Wasser gespült, und zehn Fraktionen zu je 1mL gebildet. Die Lösungen wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 400nm untersucht, um den Gehalt an Huminstoff zu quantifizieren. Das Verfahren ist in Abbildung 46 wiedergegeben.

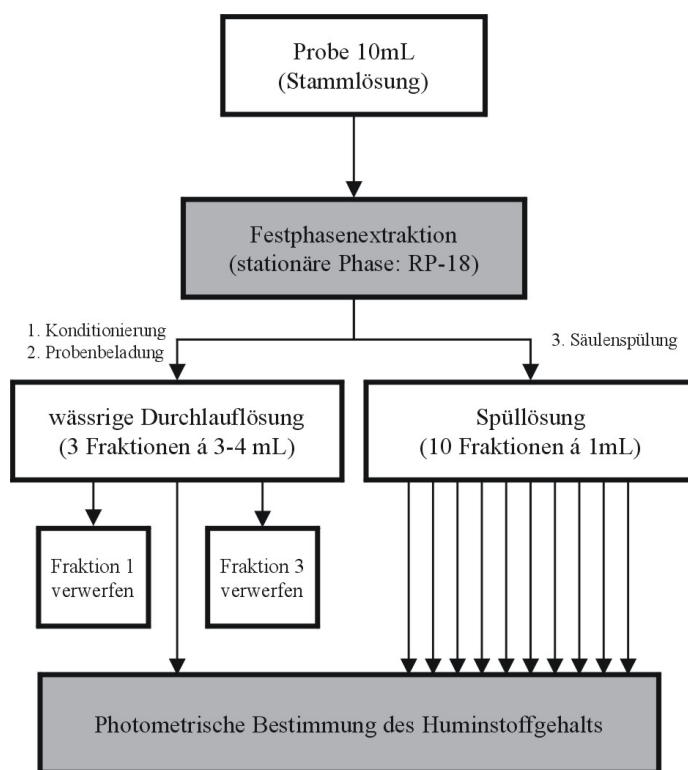


Abbildung 46: Verfahren zur Überprüfung der Huminstoffwiederfindung

Von jedem Huminstoff wurden drei Parallelversuche durchgeführt und von jeder zu vermessenden Probe fünf photometrische Differenzmeßwerte gegenüber reinem Wasser aufgenommen. Über eine externe Kalibrierung wurde auf Huminstoffgehalte in den Lösungen zurückgerechnet. Weiterhin wurde ein Blindversuch mit reinem Wasser durchgeführt, um auf unerwünschte Interferenzen im verwendeten Wellenlängenbereich zu prüfen, die durch Ausbluten der Säule oder durch kontaminiertes Wasser hätten entstehen können. Es wurden keine Kontaminationen festgestellt.

Die Wiederfindung wurde an den Huminstoffen geprüft. Da nicht ausreichend Substanz von HO13FA und HO13HA für den Ansatz von Vorversuchen gegeben war, wurde die Fulvinsäure FS2/7-93 eingesetzt. Diese stammt aus dem Hohlohsee im Nordschwarzwald und wurde durch Adsorption auf Polystyrolharz XAD-8 angereichert. Es wird postuliert, daß diese Fulvinsäure ähnliches Verhalten bezüglich ihrer Sorption an C18-Trägermaterial aufweist wie die aquatischen Huminstoffe HO13FA und HO13HA. Weiterhin wurde die Wiederfindung an den synthetischen Huminstoffen FS101 und HS100 untersucht. So wurden die Huminstoffmengen bestimmt, die bei der Durchführung einer Festphasenextraktion die Säule passieren. Abbildung 47 faßt die Ergebnisse der Wiederfindungsuntersuchungen zusammen, wobei die Wiederfindung gegen die Gesamtpülmengen und die Huminstoffe aufgetragen sind.

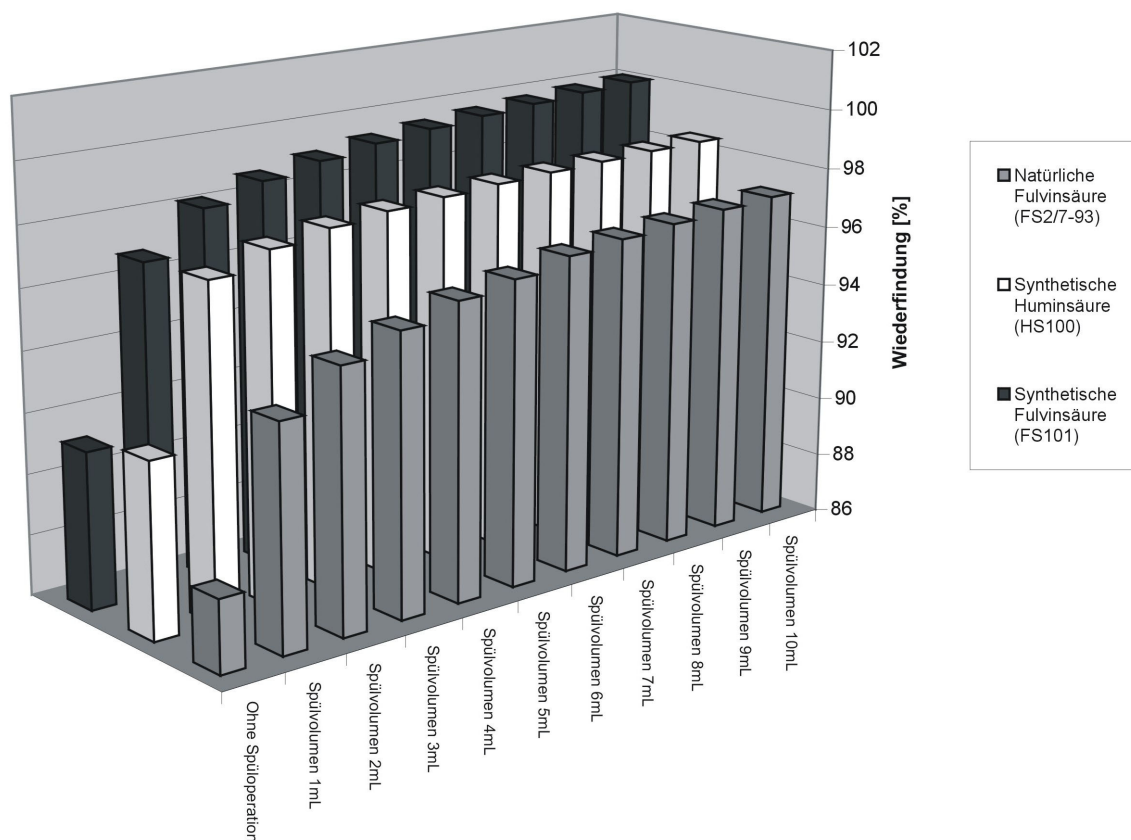


Abbildung 47: Wiederfindung der verschiedenen Huminstoffe

Mit $88,4 \pm 1,2\%$ passiert ein Großteil des Huminstoffs FS2/7-93 die Säule bei den gewählten experimentellen Bedingungen, insbesondere dem pH-Wert von 7. Bei der synthetischen Fulvinsäure FS101 durchlaufen $91,2 \pm 0,6\%$ sowie bei der synthetischen Huminsäure HS100 $91,8 \pm 1,4\%$ die Säule, ohne retardiert zu werden.

Einfaches Durchspülen der Phase mit 10mL Wasser erhöht diesen Wert bei FS2/7-93 auf bis zu $97,1 \pm 1,3\%$ bzw. $98,4 \pm 1,9\%$ bei HS100 und $100,0 \pm 0,9\%$ bei FS101. Es ist unklar, ob diese Schwankungsbreite auf die Polydispersität der Huminstoffe zurückzuführen ist. Unter Umständen finden Wechselwirkungen statt, bei denen der geringe, aber dennoch vorhandene Heteroatomanteil der natürlichen Fulvinsäure eine Rolle spielt.

Alle untersuchten Huminstoffe passierten die Sep-Pak-Säule quantitativ. Es fanden also keine irreversiblen Wechselwirkungen des Huminstoffs mit dem Trägermaterial statt.

Selbstverständlich fällt die Wiederfindung höher aus, je mehr Wasser zum Spülen der stationären Phase verwendet wird. Die Spülmenge wurde jedoch gering gehalten, damit kein „Durchbruch“ der Triazinherbizide zusammen mit der wäßrigen DurchlaufLösung auftritt. Die Menge Wasser wurde daher auf 5mL begrenzt und mit dieser der restliche, leicht abtragbare Huminstoff entfernt.

3.3.1.3.2. Prüfung der Durchlaufkapazität und des Elutionsmittels

Zur Bestimmung der Durchlaufkapazität, d.h. der Fähigkeit der Festphase, frei in Lösung vorliegende Triazinherbizide quantitativ zurückzuhalten, wurden wäßrige Lösungen mit definierten Mengen an Triazinen angesetzt und die Festphasenextraktion und anschließend die Elution mit Ethylacetat durchgeführt. Schließlich wurden die Konzentrationen in den Ethylacetatlösungen bestimmt, um die optimalen Ethylacetatmengen zu bestimmen.

Zunächst wurde die Säule mit Methanol und Ethylacetat konditioniert und dadurch aktiviert, anschließend erfolgte bei einer Flußrate von 8-10mL/min die Probenbeladung mit einer Atrazinhaltigen wäßrigen Lösung (Konzentration: $100\mu\text{g/L}$). Danach wurde nacheinander zwei Mal mit je 5mL Wasser gewaschen. Die auf der Festphase retardierten Triazine wurden mit zweimal 2mL Ethylacetat von der Säule eluiert. Der dabei erhaltene wäßrige Durchlauf, die Spüllösungen und die Ethylacetat-Lösung wurden mit immunochemischen Methoden auf Triazin untersucht. Die eingesetzten Enzymimmunoassays (EIA) können nicht in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden. Daher wurden die Ethylacetatfraktionen bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand der ersten organischen Eluatfraktion (in der Folge als 'Eluat 1' bezeichnet) wurde in $2000\mu\text{L}$ Ethylacetat aufgenommen, $10\mu\text{L}$ dieser Lösung abgenommen und 1:1000 in Wasser verdünnt. Diese Lösung diente zur Ermittlung der Triazinkonzentration in der Eluat 1-Fraktion. Der Rückstand der zweiten organischen Eluatfraktion (Eluat 2) wurde in $3000\mu\text{L}$ Wasser aufgenommen und der Bestimmung von Atrazin mit immunochemischen Methoden zugeführt. Abbildung 48 gibt das Verfahren wieder.

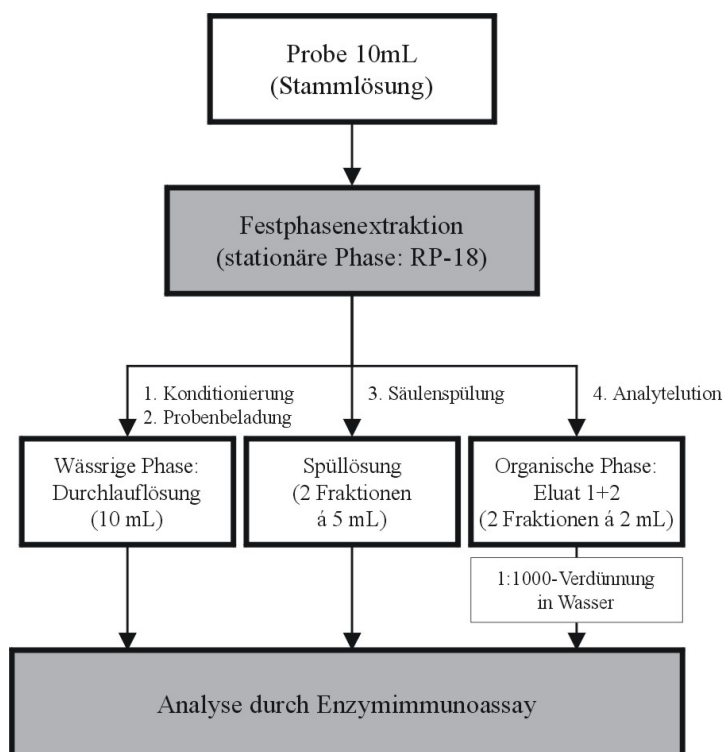


Abbildung 48: Gewähltes Verfahren zur Prüfung der Durchbruchkapazität des Trägermaterials und des Elutionsmittels für Atrazin

Zusätzlich wurde mit dem Immunoassay die Konzentration der verwendeten atrazinischen Inkubationslösung überprüft. Dazu wurde die Inkubationslösung 1:200 verdünnt, um am Testmittelpunkt des verwendeten EIAs arbeiten zu können. Die immunochemischen Untersuchungen wurden mit pAb AS46 durchgeführt. Die Tabelle 29 gibt die Ergebnisse der ELISA-Tests wieder.

Tabelle 29: Ergebnisse Leistungsfähigkeit Sep-Pak-Kartuschen (Angabe von VB der t -Verteilung für $P=95\%$; $f=2$)

Meßlösung	Atrazin [$\mu\text{g/L}$]	Terbuthylazin [$\mu\text{g/L}$]
Wässriger Durchlauf	< NG	< NG
Spüllösung 1	< NG	< NG
Spüllösung 2	< NG	n. b.
Org. Eluat 1	$0,58 \pm 0,09$	$0,22 \pm 0,07$
Org. Eluat 2	$1,4 \pm 0,5$	$0,6 \pm 0,3$
Inkubationslösung	$0,5 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,2$

In den wässrigen Durchlauf- und Spüllösungen lagen die gemessenen Atrazinwerte unterhalb der Nachweisgrenze. Daraus folgt, dass bei der Probenbeladung Triazine unter den gegebenen Bedingungen quantitativ auf dem Trägermaterial zurückgehalten werden.

Aus den Konzentration der Eluat 1-Fractionen ergaben sich Atrazingehalte von $117 \pm 17 \mu\text{g/L}$. Die aus den EIA-Daten berechnete Konzentration der Inkubationslösungen belief sich auf $104 \pm 49 \mu\text{g/L}$. Die hohe Varianz bei den Inkubationslösungen war auf die verhältnismäßig geringe Anzahl von drei Messungen zurückzuführen. Daher war die hieraus durch Division berechnete Wiederfindung von $112 \pm 55\%$ nicht sehr aussagekräftig. Es kann jedoch die Aussage getroffen werden, daß die Inkubationslösungen in Konzentrationen vorliegen, die dem Sollwert von $100 \mu\text{g/L}$ nahe kommen und daß Atrazin quantitativ in der organischen 'Eluat 1'-Lösung gefunden wurde.

Die Eluat 2-Fractionen wiesen Atrazinkonzentrationen von $1,4 \pm 0,5 \mu\text{g/L}$ auf. Durch die Anwendung von weiteren 2mL Ethylacetat als Lösungsmittel konnte die Wiederfindung nur um etwa 0,5% von der Gesamtmenge im Eluat 1 gesteigert werden, was vernachlässigbar ist.

Trotzdem wurde in der Folge ein Elutionsvolumen von 4mL eingesetzt, da bekannt war, daß sich die Erhöhung des Elutionsvolumens in einem engeren Vertrauensintervall bemerkbar macht [48].

Zur Validierung der Festphasenextraktion für das Terbutylazin wurde das gleiche Verfahren wie für Atrazin angewendet. Im Einzelnen wurden folgende Fractionen aufgenommen (siehe Abbildung 48):

<i>Wäßriger Durchlauf</i>	- Die bei der Probenbeladung durch die Säule laufende wäßrige Phase
<i>Spüllösung 1</i>	- Die zum Reinigen der Säule eingesetzte Waschlösung
<i>Eluat 1</i>	- Die ersten 2mL Ethylacetateluat, 1:1000 verdünnt in Wasser
<i>Eluat 2</i>	- Die zweiten 2mL Ethylacetateluat, 1:30 verdünnt in Wasser
<i>Inkubationslösung</i>	- Stammlösung Terbutylazin ($106,5 \mu\text{g/L}$); 1:200 in Wasser verdünnt

Das Analysenprinzip, welches zur Detektion und Quantifizierung des Terbutylazins herangezogen wird, ist der Enzymimmunoassay mit dem polyklonalen Antikörper AS47, der speziell zur Detektion von Terbutylazin entwickelt worden ist. Die Ergebnisse sind in Tabelle 29 zusammengefaßt.

Die EIA-Analyse der wäßrigen Durchlauf- und Spüllösungen ergab ausschließlich negative Befunde, d.h. es fand kein Durchbruch des Terbutylazins statt, es wurde von der unpolaren Umkehrphase vollständig zurückgehalten.

In der 1:200 verdünnten Lösung der Inkubationslösung wurde eine Terbutylazinkonzentration von $0,8 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$ bestimmt. Hochgerechnet auf 10mL Inkubationslösung entspricht dies einer Absolutmenge von $1,5 \pm 0,4 \mu\text{g}$ Terbutylazinäquivalenten. Für die 1:1000 verdünnte „Eluat 1“ Fraction wurde eine Konzentration von $0,22 \pm 0,07 \mu\text{g/L}$ bestimmt, was gleichbedeutend ist mit $0,44 \pm 14 \mu\text{g}$ Terbutylazinäquivalenten absolut. Das entspricht lediglich einer Wiederfindung von $30 \pm 12\%$.

Ferner ergab die Analyse der Eluat 2-Fractionen, daß zusätzlicher Einsatz von 2mL Ethylacetat die Wiederfindung lediglich um etwa 1,8% auf 31,8% erhöht. Ursache hierfür könnte die starke Verdünnung (1:1000) sein, in der die Proben untersucht werden oder Matrixeffekte 2. Art durch das Lösungsmittel Ethylacetat, das in der Probe vorlag.

Daher wurde in Folge darauf verzichtet, die organische Eluat-Fraktion zu untersuchen. Das beeinträchtigt das weitere Vorgehen nicht, da hier primär das Ziel vorlag, gebundene Rückstände direkt in der wässrigen Durchlauf- und Spüllösung zu detektieren.

Anschließend wurde ein Blindversuch mit 10mL Wasser durchgeführt und die wässrige Durchlauf- und Spüllösung, sowie die organische Eluatphase ebenfalls mit dem Antikörper AS46 auf Atrazin untersucht. Wie erwartet zeigten die vermessenen Lösungen ausschließlich negative Befunde an Atrazin.

3.3.1.3.3. Zusammenfassung der experimentellen Bedingungen

Die Ergebnisse der Vorversuche lassen sich dahingehend zusammenfassen, daß die Festphasenextraktion an RP18-modifizierten Kieselgelphasen zur vollständigen Trennung der gebundenen von den frei in Lösung vorliegenden Triazinen geeignet ist. Diese Tatsache basiert auf folgenden Ergebnissen:

- Bei pH 7 finden keine nennenswerten Wechselwirkungen zwischen den untersuchten Huminstoffen und dem Trägermaterial statt, und bereits nach einem Spülvolumen von 5mL passieren die refraktären organischen Säuren die Säule quantitativ.
- Bei der gewählten Triazinkonzentration von 100µg/L, einem Probenvolumen von 10mL und einer Flußrate zwischen 8-10mL/min laufen keine frei gelösten Triazine mit der wässrigen Phase durch, sondern werden vollständig auf der RP-Phase zurückgehalten.
- Die Elution mit Ethylacetat verläuft bereits nach einem Elutionsvolumen von 2mL quantitativ, es sollte trotzdem mit 4mL Ethylacetat eluiert werden, da der Einsatz von weiteren 2mL Ethylacetat die Schwankungsbreite der Ergebnisse verringert.

Die oben genannten experimentellen Bedingungen wurden für alle folgenden Festphasenextraktionen eingehalten. Ihr Schema ist in Abbildung 49 wiedergegeben.

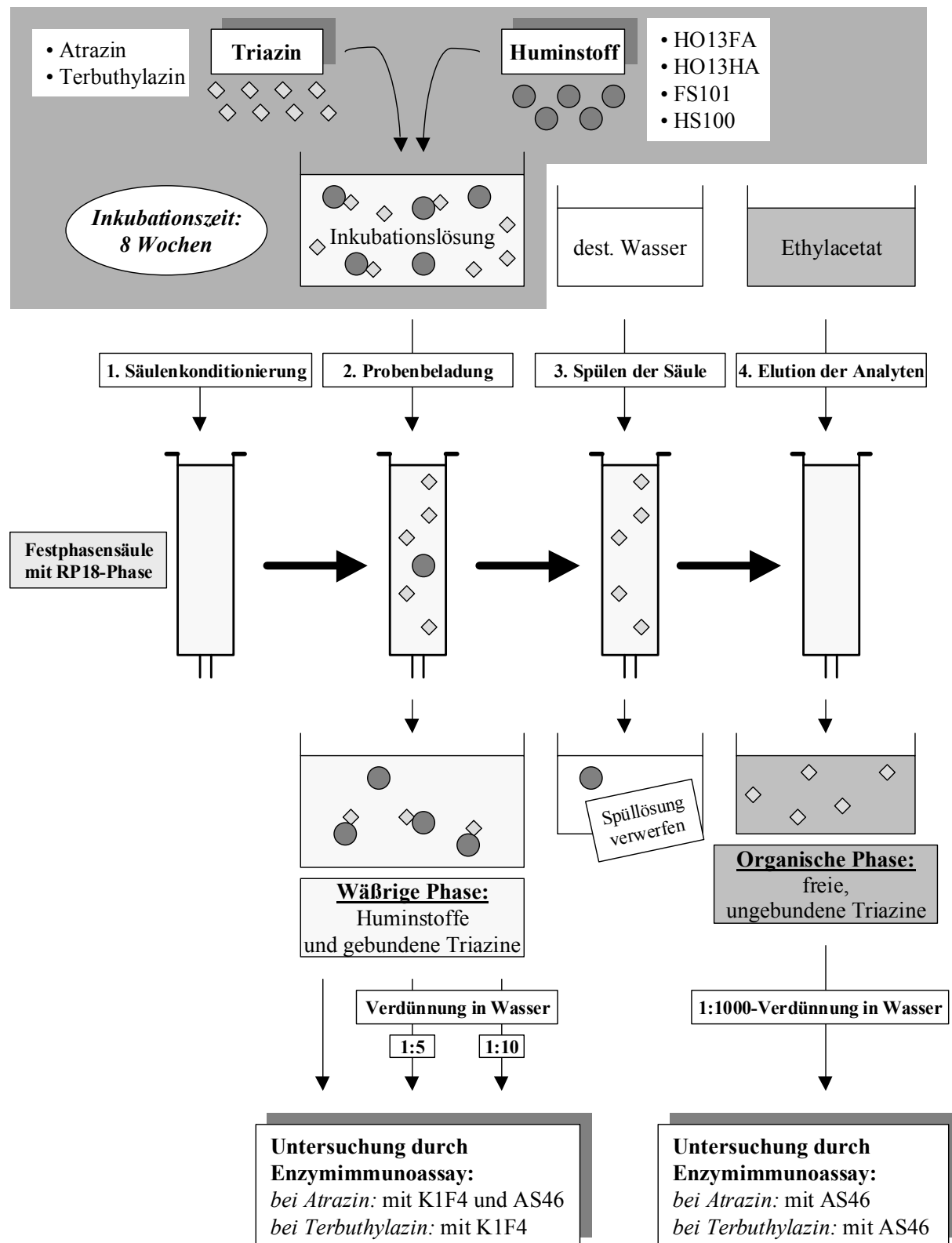


Abbildung 49: Gesamtschema der durchgeführten Inkubationsversuche

Zur Trennung der „frei“ in Lösung vorliegenden Triazinmoleküle von den „gebundenen“ wurde Inkubationslösung über die Festphase gegeben, dabei scheiden sich die freien Triazine

auf der Umkehrphase ab, und die Huminstoffe durchlaufen zusammen mit den gebundenen Rückständen die Sep-Pak-Kartusche. Hierbei wird eine wäßrige DurchlaufLösung mit den Huminstoffen und den gebundenen Triazinen erhalten. Anschließend wurde die Säule mit Wasser gespült, um den Huminstoff vollständig von der Phase zu eluieren. Schließlich wurden die freien Triazinmoleküle mit 4mL Ethylacetat eluiert.

3.3.1.4. Analyse durch Enzymimmunoassay

Zur Untersuchung der wässrigen DurchlaufLösungen, die bei der Festphasenextraktion erhalten worden waren, wurde der Triazin-spezifische kompetitive Enzymimmunoassay mit mAb K1F4 (Kapitel 2.4.6.1.) eingesetzt. Zur Validierung wurde für die Messungen der atrazini-schen Proben mit dem pAb AS46 ein zweiter Antikörper ausgewählt.

Huminstoffhaltige Lösungen zeigten in allen eingesetzten ELISAs stets hohe Atrazinäquivalentkonzentrationen. Dies deutete auf unspezifische Bindungen der Huminstoffe an die Immunglobuline hin, was die Quantifizierung gebundener Triazinrückstände erschwerte. Die unspezifischen Bindungen stellten eine potentielle Fehlerquelle dar und mussten daher unterdrückt werden.

Zur Inhibition von unspezifischen Wechselwirkungen von Huminstoffen findet Rinderserumalbumin (BSA) Einsatz, welches ein endogenes Protein mit einem Molekulargewicht von 66 kDa mit einer globulären Struktur darstellt. Dieses weist eine hydrophobe Kluft auf, über die das Protein Substanzen wie Fettsäuren, Bibirubin, Hormone oder auch Huminstoffe binden kann. Daher wurde für weitere Untersuchungen dem Enzymtracer 1% (w/v) BSA in PBS-Puffer zugesetzt und somit der Versuch unternommen, die unspezifische Reaktion während des Probeninkubationsschrittes zu unterdrücken. Es wurde geprüft, ob die Zugabe von BSA die Bestimmung von Atrazin im ELISA mit pAb AS46 beeinträchtigt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 30 dargestellt.

Tabelle 30: Leistungsfähigkeit des pAb AS46-ELISA bei BSA-Zugabe zum Tracerpuffer (Angabe der Fehler durch Vertrauensintervalle der t-Verteilung für $P=95\%$ und $f=4$)

Messobjekt	Konzentration	Wiederfindung Atrazin
Atrazin	0,5µg/L	109 ± 12 %
Kontrollhuminsäure HS100	50mg/L (DOC)	< NG
Kontrollhuminsäure HS100 + Atrazin	(wie oben)	92 ± 8 %

Durch Zugabe von BSA wird die Wiederfindung des Atrazins nicht signifikant beeinflusst. Wird eine Lösung des Modellhuminstoffs HS100 mit dem Protein BSA versetzt, so wird kein Messsignal mehr oberhalb der Nachweisgrenze der Methode gefunden. Die unspezifische Bindung des Modellhuminstoffs wird also im Falle des ELISAs mit pAb AS46 vollständig

unterbunden. Es konnten nun Proben mit dem neuen Verfahren auf gebundene Rückstände untersucht werden.

Als weitere Blockingproteine kommen neben Serumalbuminen z.B. Lactalbumine oder Ovalbumine, Casein oder auch Detergentien wie Tween 20 in Frage. Diese finden in immunologischen Testverfahren wie Western Blotting oder ELISA Anwendung, um unterschiedlichste unspezifische Bindungen zu unterdrücken.

3.3.1.4.1. Untersuchung der Störeffekte durch Huminstoffe

Huminstoffe können Einfluß auf die Leistungsfähigkeit der Festphasenextraktionen ausüben. Daher wurden Proben aus Triazinen und Huminstoffen dem in Abbildung 49 beschriebenen Festphasenextraktionsverfahren unterworfen, jedoch ohne achtwöchige Inkubationszeit.

Für diese Untersuchungen wurden Lösungen mit synthetischer Fulvinsäure (FS101; DOC=0,3g/L) und Atrazin (100µg/L) in dreifacher Ausführung angesetzt. Zusätzlich wurde eine Kontrollösung mit der gleichen Huminstoffkonzentration ohne Atrazinbelastung hergestellt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte unmittelbar nach ihrem Ansatz. Die erhaltenen wäßrigen Phase wurden in drei Verdünnungen (unverdünnt, 1:5 sowie 1:10 mit Wasser verdünnt) mit den Antikörpern AS46 und K1F4 untersucht, wobei 1% (w/v) BSA zur Enzymtracelerlösung gegeben wurde, um unspezifische Huminstoffbindung zu unterdrücken. Die ELISA-Ergebnisse sind in Tabelle 31 zusammengefaßt.

Tabelle 31: Mit Enzymimmunoassay gemessene Atrazinkonzentrationen (Vertrauensbereiche (VB) der t-Verteilung für P=95% und f=2; mit einem Stern markierte Vertrauensintervalle wurden für f=8 berechnet)*

Fraktion (Verdünnung)	Anti-körper	Fulvinsäure ohne Atrazin		Fulvinsäure mit Atrazin	
		Mittelwert x [µg/L]	VB [µg/L]	Mittelwert x [µg/L]	VB [µg/L]
wäßriger Durchlauf	AS 46	0,020	± 0,001	0,03	± 0,03*
wäßriger Durchlauf (1:5)	AS 46	< NG	-	< NG	-
wäßriger Durchlauf (1:10)	AS 46	< NG	-	< NG	-
wäßriger Durchlauf	K1F4	1,5	± 0,8	1,5	± 0,2*
wäßriger Durchlauf (1:5)	K1F4	0,5	± 0,2	0,5	± 0,2
wäßriger Durchlauf (1:10)	K1F4	0,3	± 0,2	0,35	± 0,05

Die Vermessung der unverdünnten wäßrigen Durchlaufösungen der Fulvinsäure/Atrazin-Lösungen und der Kontrollösungen ergab im AS46-ELISA eine Atrazinkonzentration, die etwas über der Nachweisgrenze lag (0,03µg/L bzw. 0,02µg/L). Dies ist auf unspezifische Bindung der synthetischen Fulvinsäure mit Antikörpern zurückzuführen. Die Proben zeigen,

gegenüber der Kontrolle keinen signifikanten Unterschied. Ein Atrazindurchbruch findet also auch in dieser hochkonzentrierten Huminstoffmatrix nicht statt.

Beim Antikörper K1F4 ist die unspezifische Bindung stärker ausgeprägt. Die unspezifische Bindung tritt hier selbst bei hohen Verdünnungen (1:10) auf. Auch beim Antikörper K1F4 zeigen die Ergebnisse, daß in dieser Huminstofflösung kein Atrazin mit der wäßrigen Phase durchläuft.

3.3.1.4.2. Quantifizierung gebundener Rückstände durch Enzymimmunoassay

Zur Quantifizierung der in den gebundenen Rückständen vorhandenen Trioazinmengen wurden die angesetzten Inkubationslösungen einschließlich der Kontrolllösungen ohne Triazinbelastungen nach achtwöchigem Rühren bei Raumtemperatur dem in Abbildung 49 beschriebenen Aufarbeitungsverfahren unterworfen. Dies führte zu einer wäßrigen DurchlaufLösung, von der drei Verdünnungen angesetzt (unverdünnt, 1:5 sowie 1:10 mit Wasser verdünnt) und jeweils mit den Antikörpern pAb AS46 und mAb K1F4 untersucht wurden. Es erfolgte Zugabe von 1% BSA zum Enzymtracer.

Die wäßrigen DurchlaufLösungen enthielten die Huminstoffe und die ROS-gebundenen Triazine. Die verschiedenen Verdünnungen der wäßrigen Phase waren nötig, um möglichst EIA-Werte im Arbeitsbereich des Tests zu erhalten. Tabelle 32 bis Tabelle 35 zeigen die Ergebnisse.

Tabelle 32: Mit Enzymimmunoassay gemessene Atrazinkonzentrationen in den Lösungen aus der Festphasenextraktion mit der natürlichen Fulvinsäure (HO13FA) (Angabe von VB der t-Verteilung für P=95%)

Huminstoff: Natürliche Fulvinsäure (HO13FA)		Kontrolllösung ohne Atrazin		Inkubationslösung mit Atrazin	
Fraktion (Verdünnung)	Anti- körper	Mittelwert [µg/L]	± VB (f=2) [µg/L]	Mittelwert [µg/L]	± VB (f=8) [µg/L]
wäßriger Durchlauf	AS 46	< NG	-	0,03	± 0,01
wäßriger Durchlauf (1:5)	AS 46	< NG	-	< NG	-
wäßriger Durchlauf (1:10)	AS 46	< NG	-	< NG	-
wäßriger Durchlauf	K1F4	1,0	± 0,5	4,1	± 0,9
wäßriger Durchlauf (1:5)	K1F4	0,3	± 0,5	0,5	± 0,2
wäßriger Durchlauf (1:10)	K1F4	0,2	± 0,1	0,3	± 0,1

Tabelle 33: Mit Enzymimmunoassay gemessene Atrazinkonzentrationen in den Lösungen aus der Festphasenextraktion mit der natürlichen Huminsäure (HO13HA) (Angabe von VB der t-Verteilung für P=95%)

Huminstoff: Natürliche Huminsäure (HO13HA)		Kontrolllösung ohne Atrazin		Inkubationslösung mit Atrazin	
Fraktion (Verdünnung)	Anti- körper	Mittelwert [µg/L]	± VB (f=2) [µg/L]	Mittelwert [µg/L]	± VB (f=8) [µg/L]
wäßriger Durchlauf	AS 46	0,022	± 0,005	0,17	± 0,05
wäßriger Durchlauf (1:5)	AS 46	< NG	-	0,022	± 0,005
wäßriger Durchlauf (1:10)	AS 46	< NG	-	< NG	-
wäßriger Durchlauf	K1F4	5,0	± 1,1	8,8	± 2,2
wäßriger Durchlauf (1:5)	K1F4	0,8	± 0,2	1,1	± 0,3
wäßriger Durchlauf (1:10)	K1F4	0,5	± 0,2	0,7	± 0,2

Tabelle 34: Mit Enzymimmunoassay gemessene Atrazinkonzentrationen in den Lösungen aus der Festphasenextraktion mit der synthetischen Fulvinsäure (FS101) (Angabe von VB der t-Verteilung für P=95%)

Huminstoff: Synthetische Fulvinsäure (FS101)		Kontrolllösung ohne Atrazin		Inkubationslösung mit Atrazin	
Fraktion (Verdünnung)	Anti- körper	Mittelwert [µg/L]	± VB(f=2) [µg/L]	Mittelwert [µg/L]	± VB (f=8) [µg/L]
wässriger Durchlauf	AS 46	< NG	-	0,027	± 0,006
wässriger Durchlauf (1:5)	AS 46	< NG	-	< NG	-
wässriger Durchlauf (1:10)	AS 46	< NG	-	< NG	-
wässriger Durchlauf	K1F4	1,3	± 0,6	> NG	
wässriger Durchlauf (1:5)	K1F4	0,5	± 0,2	1,7	± 0,3
wässriger Durchlauf (1:10)	K1F4	0,3	± 0,2	0,6	± 0,1

Tabelle 35: Mit Enzymimmunoassay gemessene Atrazinkonzentrationen in den Lösungen aus der Festphasenextraktion mit der synthetischen Huminsäure (HS100) (Angabe von VB der t-Verteilung für P=95%)

Huminstoff: Synthetische Huminsäure (HS100)		Kontrolllösung ohne Atrazin		Inkubationslösung mit Atrazin	
Fraktion (Verdünnung)	Anti- körper	Mittelwert [µg/L]	± VB (f=2) [µg/L]	Mittelwert [µg/L]	± VB (f=8) [µg/L]
wässriger Durchlauf	AS 46	0,032	± 0,007	0,07	± 0,02
wässriger Durchlauf (1:5)	AS 46	< NG	-	< NG	-
wässriger Durchlauf (1:10)	AS 46	< NG	-	< NG	-
wässriger Durchlauf	K1F4	6,0	± 3,2	> NG	-
wässriger Durchlauf (1:5)	K1F4	0,9	± 0,5	2,1	± 0,2
wässriger Durchlauf (1:10)	K1F4	0,6	± 0,2	0,9	± 0,2

Die Werte, die durch den pAb AS46 bestimmt wurden, sind sehr gering und bewegen sich in der Nähe der Quantifizierungsgrenze. Daher wurden die analog angesetzten Inkubationslösungen mit Terbutylazin nur mit dem K1F4 und nicht mit dem AS46 untersucht (Tabelle 36).

Tabelle 36: Mit Enzymimmunoassay gemessene Terbutylazinkonzentrationen in den Lösungen aus der Festphasenextraktion (Angabe von VB der t-Verteilung für $P=95\%$; $f=2$)

<i>Huminstoff</i>	<i>Fraktion (Verdünnung)</i>	<i>Anti-körper</i>	Kontrolllösung ohne Terbutylazin		Inkubationslösung mit Terbutylazin	
			<i>Mittelwert [µg/L]</i>	<i>VB [µg/L]</i>	<i>Mittelwert [µg/L]</i>	<i>VB [µg/L]</i>
HO13FA						
	wäßriger Durchlauf	<i>K1F4</i>	0,3	± 0,1	1,5	± 0,4
	wäßriger Durchlauf (1:5)	<i>K1F4</i>	< NG		0,17	± 0,04
	wäßriger Durchlauf (1:10)	<i>K1F4</i>	< NG		0,11	± 0,06
HO13HA						
	wäßriger Durchlauf	<i>K1F4</i>	0,94	± 0,07	2,5	± 0,8
	wäßriger Durchlauf (1:5)	<i>K1F4</i>	0,22	± 0,09	0,37	± 0,08
	wäßriger Durchlauf (1:10)	<i>K1F4</i>	0,16	± 0,06	0,22	± 0,02
FS101						
	wäßriger Durchlauf	<i>K1F4</i>	0,32	± 0,15	5,0	± 2,1
	wäßriger Durchlauf (1:5)	<i>K1F4</i>	0,13	± 0,07	0,36	± 0,04
	wäßriger Durchlauf (1:10)	<i>K1F4</i>	< NG		0,17	± 0,05
HS100						
	wäßriger Durchlauf	<i>K1F4</i>	1,3	± 1,7	8,6	± 5,7
	wäßriger Durchlauf (1:5)	<i>K1F4</i>	0,2	± 0,2	0,38	± 0,06
	wäßriger Durchlauf (1:10)	<i>K1F4</i>	0,15	± 0,04	0,23	± 0,04

Das Huminstoffmaterial enthält gebundene Triazinrückstände. Die eingesetzten Antikörper pAb AS46 und mAb K1F4 zeigen signifikant erhöhte Signale, die ausgedrückt werden in Atrazin- bzw. Terbutylazinäquivalentkonzentrationen. Es muß allerdings festgehalten werden, dass die Beladung der Huminstoffe bzw. Modellsubstanzen vergleichsweise gering ist.

3.3.2. „Direktpolymerisationsstrategie“

Da die „Inkubationsstrategie“ keine hohen Triazinbeladungen erlaubte, mußte eine neue Strategie gefunden werden, um die gewünschte hohe Dichte an gebundenen Rückständen zu erhalten. Ausgehend von der Biogenese der Huminstoffe, bei der angenommen wird, dass Huminstoffe während ihrer Bildung aus Huminstoffvorstufen gebundene Rückstände generieren, wurden größere Mengen an Triazinen in das makromolekulare Huminstoffgerüst eingebaut, indem man diese den Ausgangsmaterialien im Entstehungsprozeß zuführte. Diese direkte Synthese der Modellsubstanzen in Gegenwart von Atrazin und Terbutylazin wurde als „Direktpolymerisationsstrategie“ bezeichnet.

3.3.2.1. Durchführung der „Direktpolymerisation“

Für die Polymerisation stehen zwei alternative Wege zur Verfügung. Es kann einerseits p-Benzochinon als Ausgangssubstanz eingesetzt werden und andererseits Hydrochinon. Die Reaktion mit p-Benzochinon verläuft innerhalb weniger Stunden und damit bestand die Gefahr, dass die Modellpolymere sich zu schnell formieren, ohne das, in Wasser nur mäßig lösliche, Triazin einzupolymerisieren. Daher wurde für diese Strategie zugunsten der Verwendung von Hydrochinon als Ausgangssubstanz entschieden.

Zur Durchführung der „Direktpolymerisation“* wurde eine gesättigte triazinische Lösung in Wasser mit überschüssigem, festen Triazin, Hydrochinon und Natriumcarbonat versetzt, wobei letzteres Reagenz ein alkalisches Medium erzeugt, das einerseits die Polymerisation des Hydrochinons ermöglicht, andererseits die Nukleophilie der phenolischen Gruppen erhöht. Die ablaufenden Reaktionen sind schematisch in Abbildung 50 dargestellt.

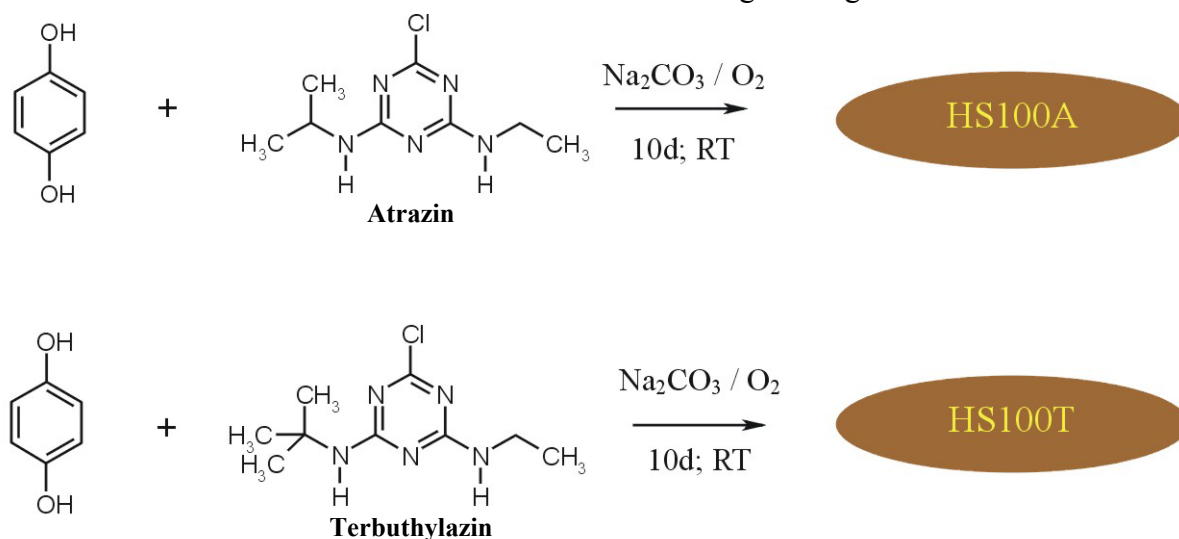


Abbildung 50: Darstellung der Modellhuminstoffe HS100A und HS100T

* Vielen Dank an Herrn Dr. W. Herdering (Universität Hamburg; Institut für Anorganische und Angewandte Chemie) für die Bereitstellung der synthetisierten Huminstoffmodelle HS100A und HS100T

Das Reaktionsgemisch wurde zehn Tage bei Raumtemperatur unter Zuführung von Luftsauerstoff gerührt, unlösliche Rückstände abfiltriert und die „Huminsäurefraktion“ mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Die Reaktion wurde mit den Triazinherbiziden Atrazin und Terbutylazin durchgeführt.

Die resultierenden Modellsubstanzen wurden wie folgt benannt:

- HS100A – Modellsubstanz synthetisiert aus Hydrochinon in Gegenwart von Atrazin
- HS100T – Modellsubstanz synthetisiert aus Hydrochinon in Gegenwart von Terbutylazin
- HS100 – Modellsubstanz synthetisiert aus reinem Hydrochinon (Kontrolle)

3.3.2.2. Charakterisierung der Modellsubstanzen HS100A und HS100T

Die Charakterisierung der synthetisierten Modellhuminstoffe erfolgte mittels FTIR-Spektroskopie in KBr. Abbildung 51 zeigt typische Spektren.

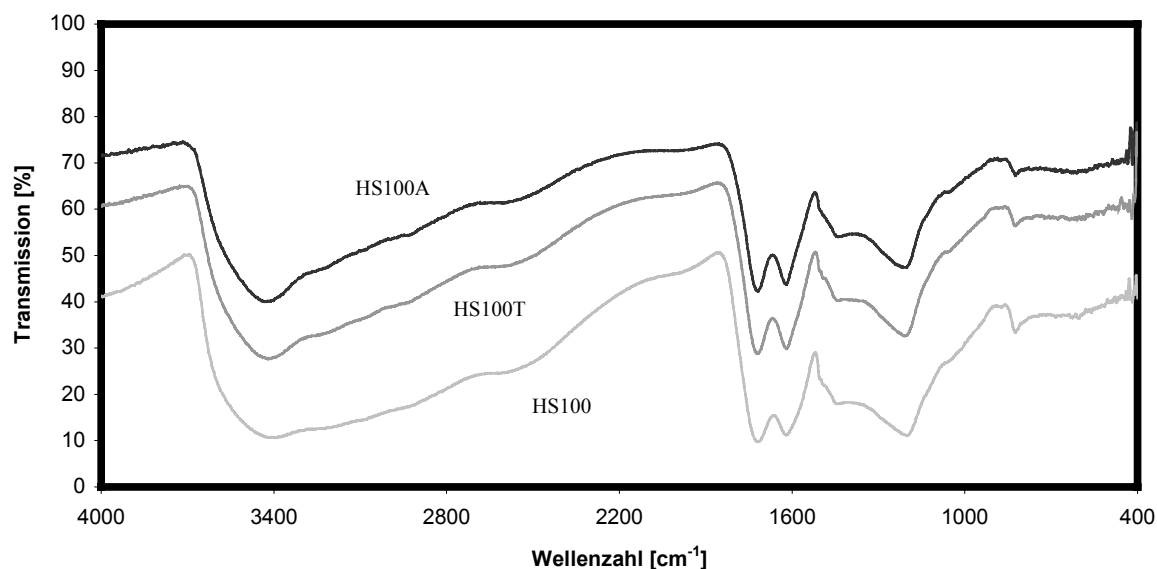


Abbildung 51: FTIR-Spektren durch „Direktpolymerisation“ synthetisierter Modellsubstanzen (oben: HS100A; mitte: HS100T; unten: HS100 (Kontrolle))

Neben der breiten (O-H)-Valenz-Schwingungsbande bei der Wellenzahl $\nu = 3400\text{cm}^{-1}$, lässt sich eine Doppelbande für (C=O)-Valenzschwingungen bei etwa 1620 und 1720cm^{-1} sowie eine (C-O)-Deformationsbande bei 1200cm^{-1} identifizieren. Diese unterstreichen den ausgeprägten carboxylischen und phenolischen Charakter der gewonnenen Substanzen, lassen jedoch keine weiteren Rückschlüsse zu.

Die CHN-Elementanalyse ergab neben den für diese Substanzen typischen Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalten (ca. 50% resp. 3%), dass signifikante Mengen an Stickstoff in das Polymer eingebaut wurden (Tabelle 37).

Tabelle 37: CHN - Elementarzusammensetzung der Modells-substanzen

Substanz	C-Gehalt [%]	H-Gehalt [%]	N-Gehalt [%]
HS100A	52,64	3,51	0,26
HS100T	51,26	3,19	0,39
HS100 (Kontrolle)	54,00	3,51	<NG

3.3.2.3. Bestimmung der gebundenen Rückstände durch kompetitiven Enzymimmunoassay

Zur weiteren Charakterisierung wurden die beladenen Modellhuminstoffe mit verschiedenen kompetitiven Enzymimmunoassays untersucht.

3.3.2.3.1. Einstellung des kompetitiven ELISAs mit mAb K4E7

Für den monoklonalen Antikörper K4E7 kann im wesentlichen das gleiche ELISA-Protokoll eingesetzt werden wie beim pAb AS46. Da es sich beim K4E7 jedoch um empfindliche Antikörper handelt, die im basischen Medium des Carbonat-Puffers einen Teil der Aktivität ihrer funktionellen Bindungsstellen einbüßen, war ein Vorbeschichten der Mikrotiterplatten notwendig.

Dazu wurden die Polystyrolplatten mit Anti-Maus IgG aus Ziege in Carbonat-Puffer (pH 9,6) vorbehandelt und anschließend mit dem K4E7 in PBS-Puffer (pH 7,6) inkubiert. Wie in Abschnitt 3.1. beschrieben, erfolgte danach die Immunreaktion mit einer Mischung aus Messprobe und Enzymtracer „Isopropyl“ und schließlich die Substrat- und die Stoppreaktion. Der „Isopropyl“-Tracer wird gut vom Antikörper gebunden und kann daher in Kombination mit K4E7 in einem sensitiven Nachweisverfahren für Atrazin eingesetzt werden ($IC_{50} = 0,06 \mu\text{g/L}$ Atrazin). Literaturdaten liefern IC_{50} -Werte zwischen 0,08 und $0,37 \mu\text{g/L}$. [74, 89, 195]

Bevor die gebundenen Triazinrückstände mit ELISA untersucht werden konnten, war noch abzuklären, ob der Antikörper mit strukturell verwandten Triazinen kreuzreagiert. Daher wurde die Kreuzreaktion einiger Chlortriazine, Thiomethyltriazine und Metaboliten geprüft. Sie wurde in der angegebenen Triazinkonzentration bestimmt und Literaturdaten [190] gegenübergestellt (Tabelle 38). Die Bestimmung der Kreuzreaktion erfolgte wie unter Abschnitt 3.1.3..

Tabelle 38: Kreuzreaktion des mAb K4E7 (Angabe von VB der t-Verteilung für $P=95\%$; $f=1$)

Kreuzreaktion (CR)	Eigene CR-Werte	Triazinkonzentration	Literatur [190]
Atrazin	100% (per Def.)	-	100% (per Def.)
Propazin	$184 \pm 50\%$	0,3 µg/L	136%
Terbuthylazin	$69 \pm 5\%$	1 µg/L	26%
Simazin	$40 \pm 4\%$	10 µg/L	4%
Prometryn	$2,1 \pm 0,2\%$	100 µg/L	0,1%
Terbutryn	$0,3 \pm 0,0\%$	30 µg/L	0,3%
Ametryn	$0,3 \pm 0,1\%$	100 µg/L	0,1%
Desethylatrazin	$17 \pm 5\%$	3 µg/L	18%
Hydroxyatrazin	$0,7 \pm 0,1\%$	10 µg/L	0,1%

Neben Atrazin werden auch die Chlortriazine Propazin, Terbuthylazin und Simazin gut vom Antikörper erkannt. Propazin weist sogar eine Kreuzreaktion von 184% auf und wird damit besser erkannt als Atrazin. Hingegen werden alle Triazine und Metabolite, denen das Chloratom fehlt, schlechter erkannt. Der Antikörper ist also auf eine Epitopregion angewiesen, die ein Chloratom enthält. Die eigenen Werte stimmen im Wesentlichen mit den Literaturdaten überein, die Abweichungen lassen sich damit begründen, dass die eigenen Werte nur in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden, was zu großen Vertrauensbereichen führt. Außerdem ist unbekannt, bei welcher Konzentration die Literaturwerte aufgenommen wurden.

Beim ELISA mit K4E7 war bei der Substrat-Reaktion die Farbentwicklung nicht so intensiv, was zu großen Schwankungen und Ableseungenauigkeiten führte. Im Bereich der instrumentellen Analytik werden derartige Effekte unter dem Begriff Signal/Rausch-Verhältnis zusammengefaßt. Eine Extinktion von mindestens 0,8 für die Blankprobe war in jedem Fall wünschenswert. Daher musste die Substratreaktion optimiert werden. Variable Größen für die Aktivität der Meerrettich-Peroxidase sind neben der Konzentration von Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid auch das zugrunde liegende Puffersystem. Kritisch ist besonders der eingestellte pH-Wert, da die Aktivität der Peroxidase wesentlich von diesem Parameter abhängt [227]. Bislang wurde für die vorliegenden Versuche stets eine Kombination von Tetramethylbenzidin / Wasserstoffperoxid in PBS-Puffer (pH 5,5) verwendet. In der Literatur wurde jedoch gezeigt, dass durch den Einsatz von Citronensäurepuffer eine schnellere Substratreaktion erzielt wird [z.B. 147]. Daher wurde die Aktivität der Peroxidase im Citrat-Puffer über einen weiten pH-Bereich geprüft. Hierzu wurden zwei Lösungen angesetzt:

Lösung A: Wasserstoffperoxid in Citrat-Puffer (200mmol/L; pH 3,0-5,7)

Lösung B: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Dimethylsulfoxid (DMSO)

Die Lösungen wurden vermengt und anschließend mit Meerrettich-Peroxidase versetzt. Es resultierte eine 3mMol Wasserstoffperoxid- und eine 1mMol Tetramethylbenzidin-Lösung. Nach erfolgter Farbreaktion wurde mit 2M Schwefelsäure abgestoppt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 52 dargestellt .

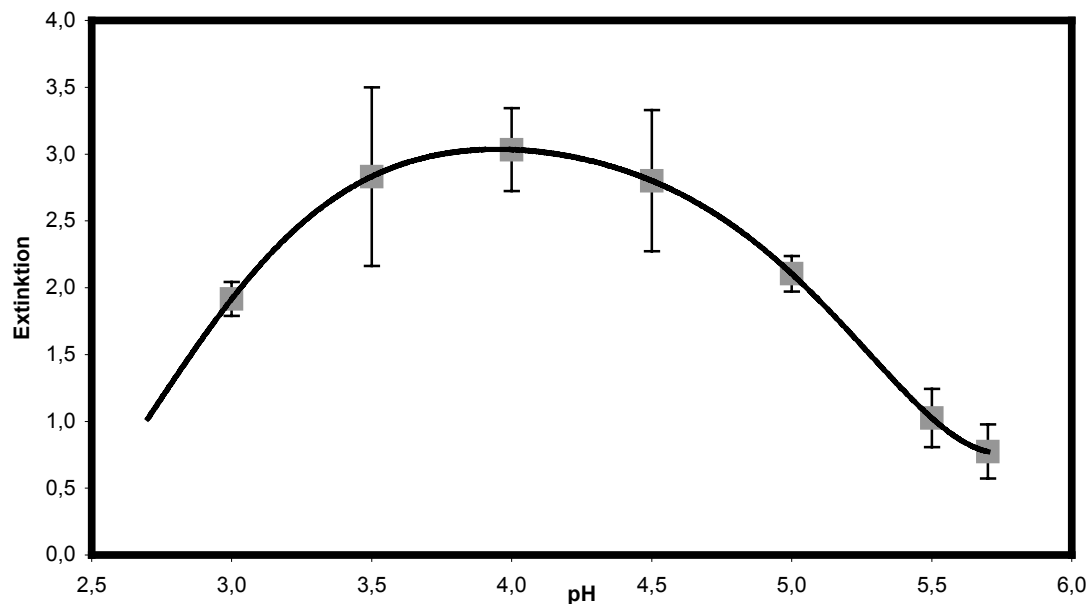


Abbildung 52: Abhängigkeit der Peroxidase-Aktivität vom pH-Wert des Citrat-Puffers (Angabe von VB der t-Verteilung für $P=95\%$; $f=3$)

Es wird ein Maximum zwischen pH 3,5 und 4,5 durchlaufen. Die hohen Extinktionswerte ($>3,0$) werden hierbei schon nach fünf Minuten Reaktionszeit erzielt.

Alkalischere pH-Werte lassen sich mit dem Citrat-Puffer nicht einstellen. Der gleiche Versuch wurde daher auch mit dem PBS-Puffer durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 53 zusammen mit den im Citratpuffer erhaltenen Werten dargestellt.

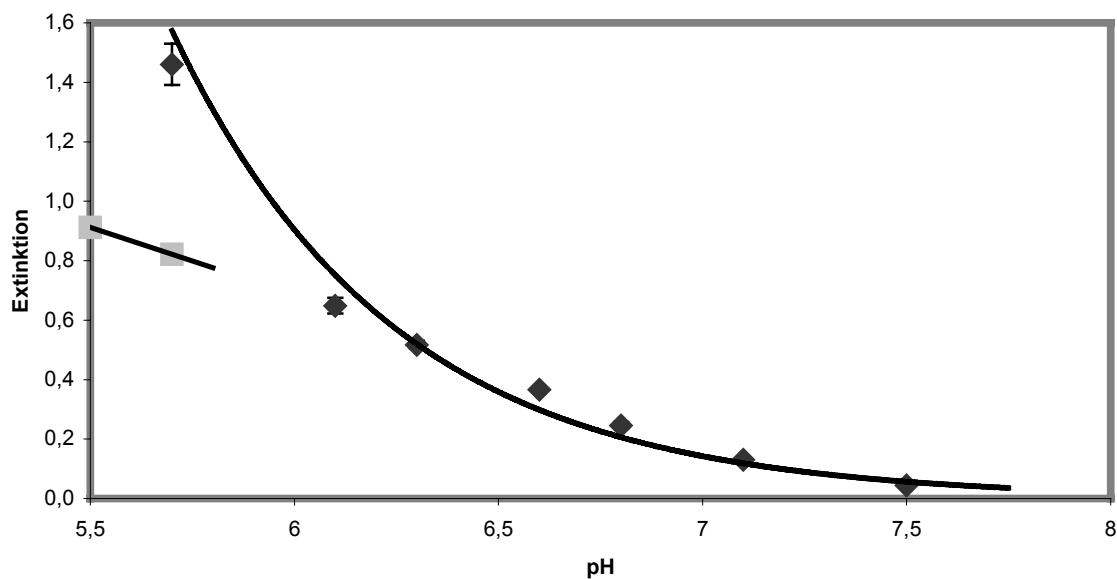


Abbildung 53: Abhängigkeit der Peroxidase-Aktivität vom pH-Wert des PBS-Puffers (Angabe von VB der t -Verteilung für $P=95\%$ und $f=3$; Rauten: PBS-Puffer; Quadrate: Citrat-Puffer))

Der PBS-Puffer bleibt hinter der „Turnover-number“ zurück, die mit dem Citrat-Puffer erzielt wurde. Die Aktivität in Citrat-Puffer konnte lediglich in einem Fall übertroffen werden. Erstaunlicherweise wird durch PBS bei pH 5,7 eine signifikant höhere Aktivität erreicht als mit Citrat-Puffer desselben pH-Werts. Die Gründe für diesen Effekt waren nicht zu erkennen. Andererseits ist auch in diesem Fall die Aktivität der Peroxidase deutlich niedriger als in den saureren Citrat-Lösungen. Außerdem mußte doppelt so viel Zeit (10 Minuten) für die Farbreaktion angewendet werden.

Es wurden zwei ELISAs mit dem AS46 durchgeführt. Einmal wurde PBS als Puffersubstanz für den Substratpuffer eingesetzt, das andere Mal Citrat-Puffer. Die Ergebnisse sind in Abbildung 54 gegenübergestellt.

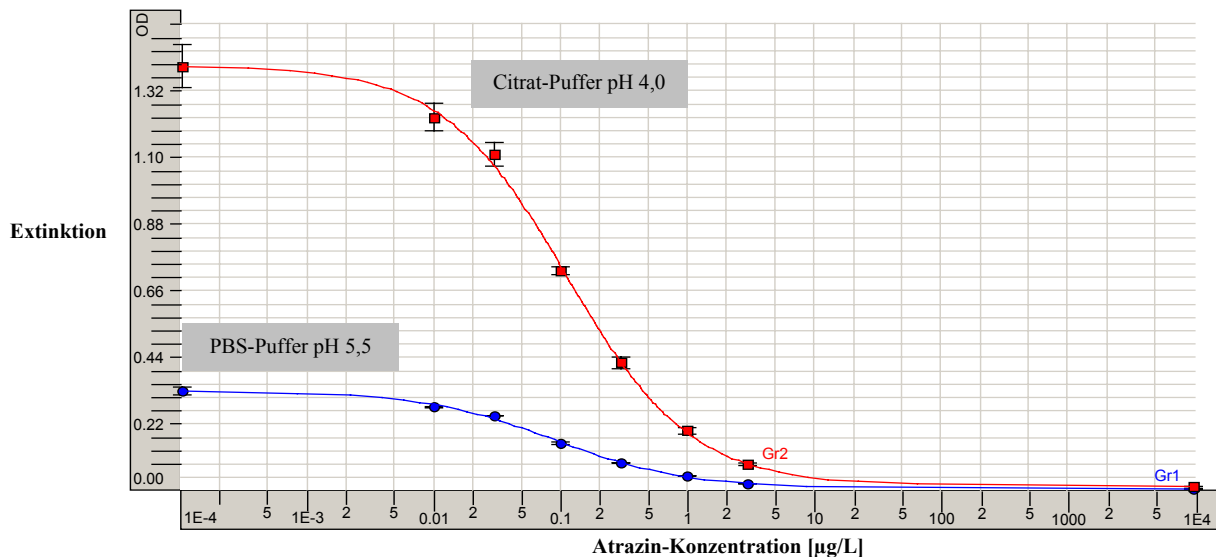


Abbildung 54: Kalibrationskurven für verschiedene Substratpuffer (Angabe von VB der t -Verteilung für $P=95\%$; $f=5$) (Bedingungen: Coating: pAb AS46 (1,65 µg/mL in Carb. (pH 9,6); 300 µL; über Nacht; 4°C); Immunreaktion: Atrazinstandards (0,01-3 µg/L) und ET Isopropyl 1:40000 (PBS (pH 7,6); 1h; RT); Entwicklung: 5 Minuten)

Das Optimum für die Peroxidaseaktivität liegt bei pH 4,0. Die Maximaextinktion von 1,4 wird hier schon nach 5 Minuten Substratreaktion erreicht. Dies ermöglicht den Durchsatz größerer Mengen an Proben. Es kommt jedoch zu einem leicht erhöhten Untergrund infolge einer unspezifischen Farbentwicklung. Gründe hierfür können produktionsbedingte Verunreinigungen in der eingesetzten Citronensäure bzw. dem Natriumcitrat sein, die die Substratreaktion katalysieren.

Der Versuch wurde mit dem mAb K4E7 wiederholt. Mit der Substratlösung in Citratpuffer konnten erstmals ausreichende Absorptionen ($OD = 1,2$) schon nach 20 Minuten Substratreaktion erreicht werden. Alle Enzymimmunoassays auf der Basis des mAb K4E7 wurden daher mit pH-4-Substratlösungen entwickelt und alle weiteren Parameter konstant gehalten. Bei ELISAs mit pAb AS46 wurde auf den Einsatz des Citratpuffers verzichtet, da in diesem Fall die erzielten Extinktionen ausreichend waren.

3.3.2.3.2. Quantifizierung durch kompetitiven Enzymimmunoassay ohne Inhibition der Huminstoffbindung

Zur Quantifizierung der gebundenen Rückstände wurden vom Modellhuminstoff HS100A eine, auf der logarithmischen Skala äquidistant konzentrierte Reihe mit DOC-Konzentrationen zwischen 0,3-100mg/L angesetzt und diese mittels ELISA auf gebundene Atrazinanteile untersucht. Da Huminstoffe zur unspezifischen Bindung an die beteiligten Antikörper befähigt sind, wurden diese Effekte quantifiziert, indem man parallel Lösungen der Kontrollsubstanz HS100 studierte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 39 dargestellt.

Tabelle 39: Atrazinäquivalentkonzentration für HS100A und HS100 im ELISA (Angabe von VB der t-Verteilung für $P=95\%$; $f=3$)

DOC[mg/L]	Antikörper	HS100A [$\mu\text{g/L AEQ}$]		HS100 [$\mu\text{g/L AEQ}$]	
		Mittelwert x	$\pm \text{VB}$	Mittelwert x	$\pm \text{VB}$
100	AS46	> HOQ	-	0,54	$\pm 0,01$
30	AS46	2,8	$\pm 0,3$	0,22	$\pm 0,01$
10	AS46	1,2	$\pm 0,1$	0,094	$\pm 0,006$
3	AS46	0,49	$\pm 0,02$	0,06	$\pm 0,04$
1	AS46	0,19	$\pm 0,02$	0,03	$\pm 0,01$
0,3	AS46	0,07	$\pm 0,01$	< LOQ	-
100	K4E7	> NG	-	1,7	$\pm 0,7$
30	K4E7	> NG	-	0,6	$\pm 0,1$
10	K4E7	3,8	$\pm 3,2$	0,33	$\pm 0,06$
3	K4E7	1,2	$\pm 0,1$	0,15	$\pm 0,01$
1	K4E7	0,40	$\pm 0,03$	0,07	$\pm 0,003$
0,3	K4E7	0,15	$\pm 0,02$	0,03	$\pm 0,04$

Die Antikörper detektieren unterschiedliche Mengen an gebundenem Atrazin am HS100A. Die Werte sind beim K4E7 höher und suggerieren damit, dass er gebundene Rückstände besser erkennen kann als der AS46. Allerdings ist, wie man aus den Werten der kein Atrazin enthaltenden Modellsubstanz HS100 entnehmen kann, die unspezifische Bindung von Huminstoffen beim monoklonalen Antikörper ebenfalls größer, und dieses Signal dürfte sich mit den gebundenen Rückständen überlagern.

Die Modellsubstanz HS100T wurde durch kompetitiven ELISA mit den gleichen Antikörpern untersucht. In diesem Fall wurde eine Standardreihe von Terbutylazin mitgeführt und die Terbutylazinäquivalentkonzentration bestimmt. Um unspezifische Bindungen der Hu-

minstoffe herausrechnen zu können, wurde auch hier die kein Terbutylazin enthaltende Kontrollhuminsäure HS100 mitgeführt. Tabelle 40 gibt die Ergebnisse wieder.

Tabelle 40: Terbutylazinäquivalentkonzentration für HS100T und HS100 im ELISA (Angabe von VB der t-Verteilung für $P=95\%$; $f=3$)

DOC[mg/L]	Antikörper	HS100T [µg/L TEQ]		HS100 [µg/L TEQ]	
		Mittelwert x	± VB	Mittelwert x	± VB
100	AS46	> NG	-	3,8	± 0,3
30	AS46	> NG	-	0,8	± 0,1
10	AS46	8,3	± 1,3	0,26	± 0,03
3	AS46	1,7	± 0,2	0,13	± 0,01
1	AS46	0,47	± 0,07	0,08	± 0,01
0,3	AS46	0,11	± 0,01	0,02	± 0,02
100	K4E7	> NG	-	> NG	-
30	K4E7	> NG	-	2,0	± 1,6
10	K4E7	> NG	-	1,6	± 0,8
3	K4E7	2,85	± 0,21	0,686	± 0,172
1	K4E7	0,730	± 0,045	0,476	± 0,108
0,3	K4E7	0,358	± 0,041	0,101	± 0,169

Die Antikörper AS46 und K4E7 detektieren unterschiedliche Mengen an gebundenem Terbutylazin am HS100T. Die EIA-Meßwerte der kein Triazin enthaltenden Huminsäure HS100 sind beim K4E7 etwa um den Faktor 5 höher als beim AS46, was bedeutet, dass die unspezifische Bindung von Huminstoffen beim K4E7 höher ist als beim AS46.

3.3.2.3.3. Quantifizierung durch kompetitiven Enzymimmunoassay mit Inhibition der Huminstoffbindung

Die Bestimmung der gebundenen Triazinrückstände an den Modellsubstanzen HS100A und HS100T wird erschwert durch die unspezifische Bindung der Modelle an die Immunglobuline. Daher wurde 1% (w/v) BSA zum Enzymtracer-Puffer hinzugegeben. Das unspezifische Signal wurde so experimentell stark reduziert. Tabelle 41 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 41: Atrazinäquivalentkonzentration für HS100A und HS100 im ELISA mit BSA-Inhibition (Angabe von VB der t-Verteilung für $P=95\%$ und $f=3$ (AS46; K4E7) bzw. $f=2$ (K1F4))

DOC [mg/L]	Antikörper	HS100A [$\mu\text{g/L AEQ}$]		HS100 [$\mu\text{g/L AEQ}$]	
		Mittelwert x	\pm VB	Mittelwert x	\pm VB
100	AS46	0,45	$\pm 0,08$	0,066	$\pm 0,003$
30	AS46	0,08	$\pm 0,01$	< LOQ	-
10	AS46	0,042	$\pm 0,006$	< NG	-
3	AS46	< LOQ	-	< NG	-
1	AS46	< LOQ	-	< NG	-
0,3	AS46	< LOQ	-	< NG	-
100	K4E7	> NG	-	0,079	$\pm 0,003$
30	K4E7	2,2	$\pm 1,7$	0,03	$\pm 0,01$
10	K4E7	0,5	$\pm 0,3$	0,010	$\pm 0,006$
3	K4E7	0,14	$\pm 0,02$	< NG	-
1	K4E7	0,05	$\pm 0,02$	< NG	-
0,3	K4E7	0,044	$\pm 0,013$	< NG	-
3	K1F4	> NG	-	0,04	$\pm 0,2$
1	K1F4	11,0	$\pm 1,9$	< NG	-
0,3	K1F4	4,0	$\pm 0,6$	< NG	-
0,1	K1F4	1,2	$\pm 0,5$	< NG	-
0,03	K1F4	0,4	$\pm 0,6$	< NG	-
0,01	K1F4	0,2	$\pm 0,3$	< NG	-

In den Kontrolllösungen wurden Atrazinäquivalentkonzentrationen gemessen, die gegenüber der atrazinbeladenen Huminsäure HS100A klein und vernachlässigbar sind. Das unspezifische Signal wurde also erfolgreich unterdrückt. Im Vergleich zu den ELISA-Messungen ohne Zugabe von BSA ist jedoch zu registrieren, dass die Atrazinäquivalente beim HS100A ebenfalls

reduziert wurden. Das BSA scheint also auch einen Einfluß auf die Erkennung der antigenen Determinanten durch die Antikörper zu haben.

Für eine begrenzte Anzahl von Untersuchungen stand mit dem mAb K1F4 aus Maus ein weiterer Atrazin-spezifischer monoklonaler Antikörper zur Verfügung. Sein ELISA-Protokoll wurde analog zum Protokoll für mAb K4E7 durchgeführt.* Der mAb K1F4 erkannte etwa 11 µg Atrazinäquivalente je mg DOC Modellsubstanz. Die gebundenen Rückstände des HS100A liefern gegenüber K4E7 und gegenüber AS46 durch den K1F4 um Faktor 250 bzw. Faktor 3000 höhere Meßwerte.

Auch die Modellsubstanz HS100T wurde durch kompetitiven ELISA bei gleichzeitiger experimenteller Unterdrückung der Huminstoffsignale mit Serumalbumin aus Rind untersucht. In diesem Fall wurde eine Standardreihe von Terbutylazin mitgeführt und die Terbutylazinäquivalentkonzentration bestimmt. Um unspezifische Bindungen der Huminstoffe zu bestimmen, wurde die Kontrollhuminsäure HS100 mitgeführt. Tabelle 42 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 42: Terbutylazinäquivalentkonzentration für HS100T und HS100 im ELISA mit BSA-Inhibition (Angabe von VB der t-Verteilung für P=95%; f=3)

		HS100T	[µg/L TEQ]	HS100	[µg/L TEQ]
DOC[mg/L]	Antikörper	Mittelwert x	± VB	Mittelwert x	± VB
100	AS46	> NG	-	1,1	± 0,6
30	AS46	2,3	± 0,1	0,12	± 0,01
10	AS46	0,78	± 0,07	0,05	± 0,02
3	AS46	0,28	± 0,05	0,032	± 0,003
1	AS46	0,11	± 0,01	0,04	± 0,01
0,3	AS46	0,05	± 0,01	> NG	-
100	K4E7	> NG	-	0,19	± 0,05
30	K4E7	8,8	± 2,3	0,07	± 0,03
10	K4E7	2,8	± 0,3	0,04	± 0,02
3	K4E7	0,89	± 0,03	> NG	-
1	K4E7	0,32	± 0,03	> NG	-
0,3	K4E7	0,12	± 0,01	> NG	-

Die unspezifische Bindung wurde auch beim HS100T durch Zugabe von BSA soweit unterdrückt, dass die Werte des Kontrollhuminstoffs vernachlässigbar gegenüber den bestimmten

* Bedingungen: Coating I: anti-Maus IgG (5 µg/mL in Carb. (pH 9,6); 300 µL; über Nacht; 4°C); Coating II: anti-Atrazin mAb K1F4 (1 µg/mL in PBS (pH 7,6); 300 µL; 2h; RT); Immunreaktion: Atrazinstandards (0,03-10 µg/L) und ET tert-Butyl 1:10000 (PBS (pH 7,6); 1h; RT); Entwicklung: 45 Minuten

gebundenen Terbutylazinrückständen sind. Auch hier wird das Signal der am HS100T gebundenen Stoffe durch die Zugabe von BSA vermindert.

Das zur Verfügung stehende Aliquot des mAb K1F4 war nicht ausreichend, um die nicht-extrahierbaren Terbutylazinrückstände am HS100T zu bestimmen. Auch war eine Nachbestellung nicht möglich, da weitere Aliquots auch beim Erzeuger nicht mehr vorlagen und eine erneute Produktion zum gegebenen Zeitpunkt nicht vorgesehen war.

Die „Direktpolymerisation“ erlaubte die Darstellung von Modellsubstanzen für Huminstoff-gebundene Triazinrückstände, deren Beladungsgrad signifikant höher ist als bei der durch „Inkubationsstrategie“ erhaltenen Stoffen. Ein Nachteil dieser Strategie ist jedoch, dass die genaue Struktur des gebundenen Triazine nicht gesichert ist. Einbindung kann durch Substitution des Chloratoms am Triazinring durch Nukleophile wie z.B. phenolische Gruppen erfolgen, allerdings ist diese Hypothese bisher unbestätigt. Außerdem ist der Ansatz nicht allgemein auf andere PSM und Umweltschadstoffe übertragbar, da hierfür eine reaktive funktionelle Gruppe vorhanden sein muß, was nicht immer gegeben ist. Daher sind auch radikalische Mechanismen nicht auszuschließen.

3.3.3. „Monomerenstrategie“

Die Eigenschaften der bislang synthetisierten Modelle weisen drei Schwächen auf:

- 1.) Struktur des gebundenen Rückstands: Die Triazine werden auf unterschiedliche Weise kovalent an den Modellhuminstoff gebunden. Die genaue Bindungsstruktur ist unbekannt.
- 2.) Beladungsdichte: Die Beladung der Modelle mit Triazinen ist im wesentlichen durch die Löslichkeit der Triazine begrenzt. Daher ist es nicht möglich, sehr hohe Triazinbeladungen zu realisieren.
- 3.) Unflexibilität: Die Strategie ist nicht allgemein auf andere Analyten anwendbar, da sie eine funktionelle Gruppe voraussetzen, die unter den gegebenen Bedingungen unter Bildung einer kovalenten Bindung reagiert.

Um diese Schwächen auszumerzen, wurde ein neuer Ansatz ausgearbeitet, der im folgenden als „Monomerenstrategie“ bezeichnet wird. Formal wurde Atrazin kovalent an Hydrochinon gekoppelt und dadurch ein neues „Monomer“ synthetisiert. Anschließend wurde es einer Polymerisationsreaktion mit einem Überschuß an p-Benzochinon unterworfen. Die Vorstellung war hierbei, dass die polyphenolische Verbindung in einer Copolymerisationsreaktion in das Polymergerüst der synthetischen Modellsubstanzen eingebaut wird. Hierdurch wird die Struktur des gebundenen Rückstands vor der Polymerisation festgelegt und ist bekannt. Durch Veränderung der eingesetzten Mengen Atrazin-Hydrochinon-Monomer und p-Benzochinon kann die Beladungsdichte mit Triazinen fast beliebig variiert werden.

Abbildung 55 stellt die beiden synthetisierten Atrazin-Hydrochinon-Strukturen dar.

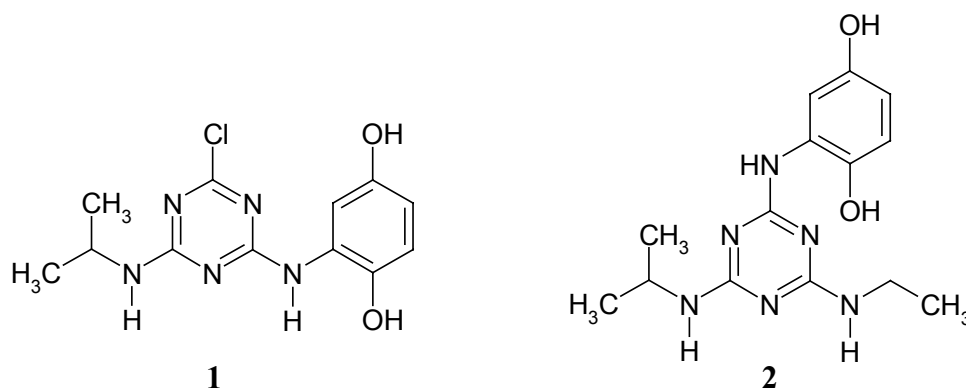


Abbildung 55: Zielstrukturen für die „Monomerenstrategie“ („N-Diol“ **1**; „Cl-Diol“ **2**)

Bei **1** wurde das Triazin formal über ein Stickstoffatom an das Diphenol gebunden und wird als „N-Diol“ bezeichnet. Es wurde ausgewählt, da als Reaktionsmechanismus für gebundene Rückstände die 1,4-Addition einer freien Aminogruppe an α,β -ungesättigte chinoide Systeme vorgeschlagen wird, wie in Abschnitt 2.1.2.2. ausgeführt wurde (Abbildung 56).

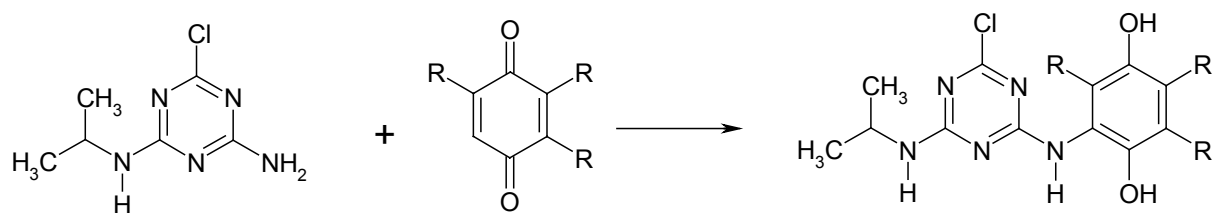


Abbildung 56: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus zur Bildung von gebundenen Rückständen aus dem Phase-I-Metabolit Desethylatrazin

Chinoide Systeme sind Bestandteil von Huminstoffen. Es entstehen gebundene Triazine, die mit **1** vergleichbare Struktur aufweisen.

2 wurde ausgewählt, da als zweiter wichtiger Reaktionsweg die nukleophile Substitution des Chloratoms am Atrazin vorgeschlagen wird. Geeignete Nukleophile sind beispielsweise Amine, wie Abbildung 57 zeigt.

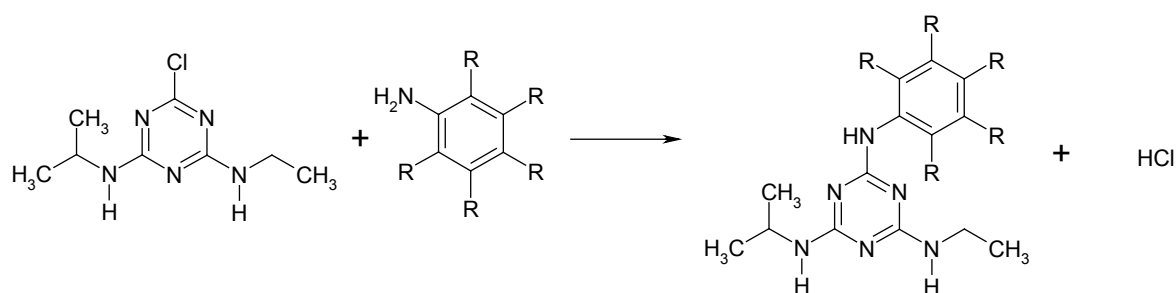


Abbildung 57: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus zur Bildung von gebundenen Rückständen aus Atrazin über nukleophile Substitution am C2-Kohlenstoff

Die dabei entstehenden gebundenen Triazine weisen eine mit **2** vergleichbare Struktur auf. Es wird als „Cl-Diol“ bezeichnet, da das Diphenol durch Substitution eines Chloratoms am Atrazin erzeugt wurde. Die Reaktion ist prinzipiell auch beim Phase-I-Metaboliten Hydroxyatrazin denkbar, hier stellt jedoch die Hydroxygruppe eine schlechte Abgangsgruppe dar und spielt in der Realität eine untergeordnete Rolle.

3.3.3.1. Synthese des Monomers „N-Diol“ **1**

In Anlehnung an [228] wurde „N-Diol“ **1** durch Totalsynthese aus Cyanurchlorid **3** und den entsprechenden Aminverbindungen durch zwei sukzessive Kondensationsreaktionen dargestellt. Wie in Abbildung 58 dargestellt, entsteht durch Zugabe von Isopropylamin **4** zunächst 2,4-Dichlor-6-Isopropylamino-1,3,5-triazin **5**, das mit 2,5-Dimethoxyanilin **6** direkt weiter umgesetzt wird.

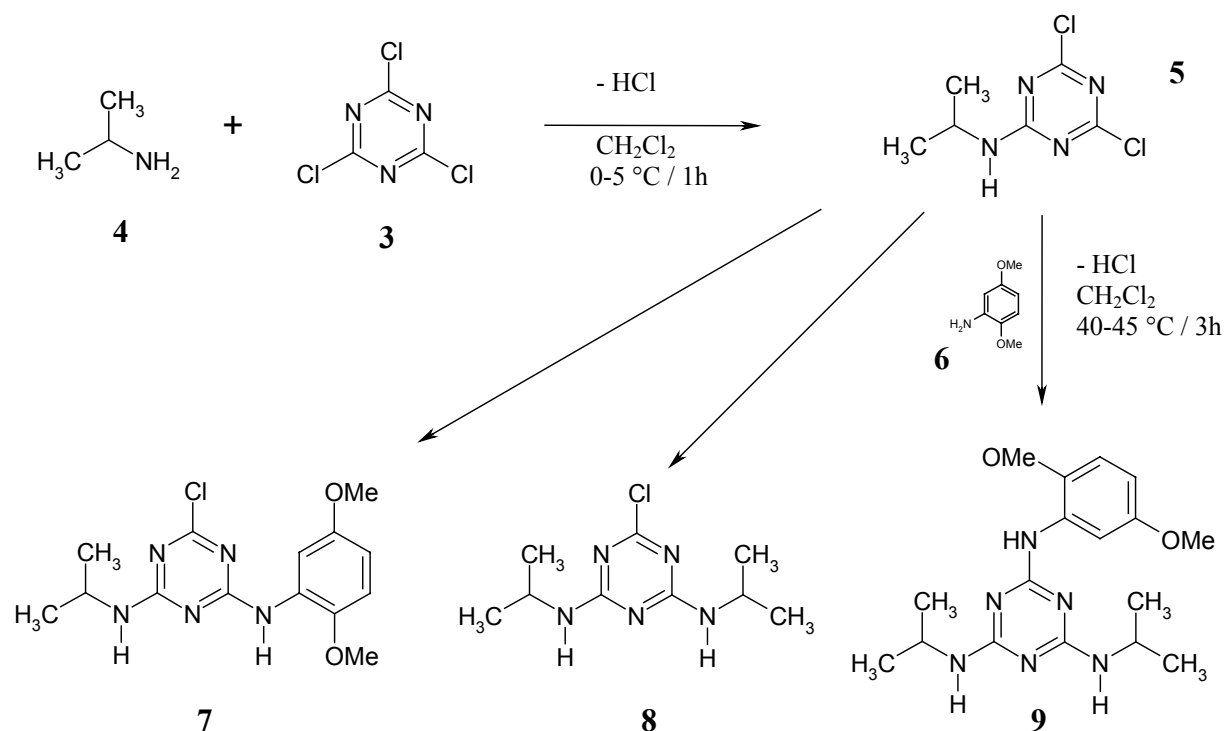


Abbildung 58: Kondensationsprodukte aus 2,4-Dichlor-6-Isopropylamino-1,3,5-triazin **5**

Durch GC/MS wurden fünf Verbindungen identifiziert. Es entsteht zwar das gewünschte Produkt „N-Dimethoxy“ **7**, jedoch liegen auch nach sechs Stunden Reaktionszeit noch große Mengen an den Edukten **3** und **4** vor. Außerdem entstehen signifikante Mengen an Propazin **8** und Verbindung **9**.

Dies weist darauf hin, dass die Reaktivität des in ortho-Stellung substituierten Anilins **6** aufgrund sterischer Effekte herabgesetzt ist, was längere Reaktionszeiten oder höhere Temperaturen notwendig macht. Beides begünstigt jedoch die Bildung von dreifach aminierten Nebenprodukten wie **9**, da es auch zur Abspaltung des letzten Chloratoms kommt [229]. Daneben ist mit weiteren dreifach aminierten Produkten zu rechnen, die nicht verdampfbar sind und sich nicht durch GC trennen lassen. Um die vorliegenden Nebenreaktionen zu vermeiden, wurde die Zugabereihenfolge der kondensierten Aminverbindungen vertauscht und zunächst das Anilinderivat und erst danach das Isopropylamin zuzugeben (Abbildung 59).

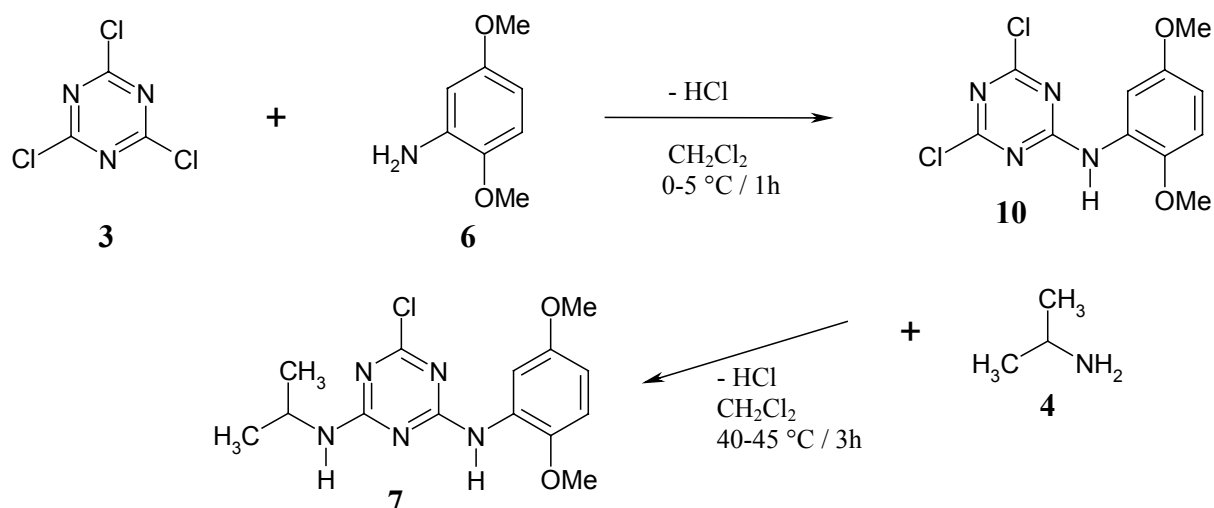


Abbildung 59: Reaktionsweg zum „N-Dimethoxy“ **7**

Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie und Umkristallisation aufgereinigt. Das EI-Massenspektrum der Substanz zeigte einen Massenpeak bei $m/z=323$, sowie den für Chlor charakteristischen Isotopenpeak bei $m/z=325$. Daneben konnten Abspaltungen von Methyl- und Methoxy-Gruppen der Verbindung **7** zugeordnet werden.

Nun sollten die beiden Methylgruppen am Phenylring der Verbindung **7** mit Iodtrimethylsilan entfernt werden [230, 231]. Dieses spaltet Arylalkylether in hohen Ausbeuten unter Bedingungen, die von verschiedenen funktionellen Gruppen wie Aminogruppen und aromatischen Halogenen toleriert werden [232]. Da es verhältnismäßig teuer ist, wurde mit einem Mischreagenz von Chlortrimethylsilan und Natriumiodid auf eine kostengünstige Alternative zurückgegriffen, bei der sich in situ Iodtrimethylsilan bildet [233]. Für 1 Mol der Verbindung **7** wurden 4 Mole des Demethylierungsreagenzes eingesetzt, um seine durch die beiden Aminfunktionen hervorgerufenen Lewis-basischen Eigenschaften zu kompensieren. Seine Umsetzung mit Chlortrimethylsilan/NaI unter Rückfluß in Acetonitril führte zu einer Reihe von Substanzen, die durch DC detektiert wurden. Die Reaktion wurde nach 48 Stunden abgebrochen. Das Edukt **7** lag zu diesem Zeitpunkt noch in hoher Konzentration vor.* Durch GC/MS wurden neben dem Edukt drei weitere Substanzen identifiziert. Abbildung 60 stellt den Reaktionsablauf dar.

* Abschätzung durch Betrachtung der entsprechenden DCs

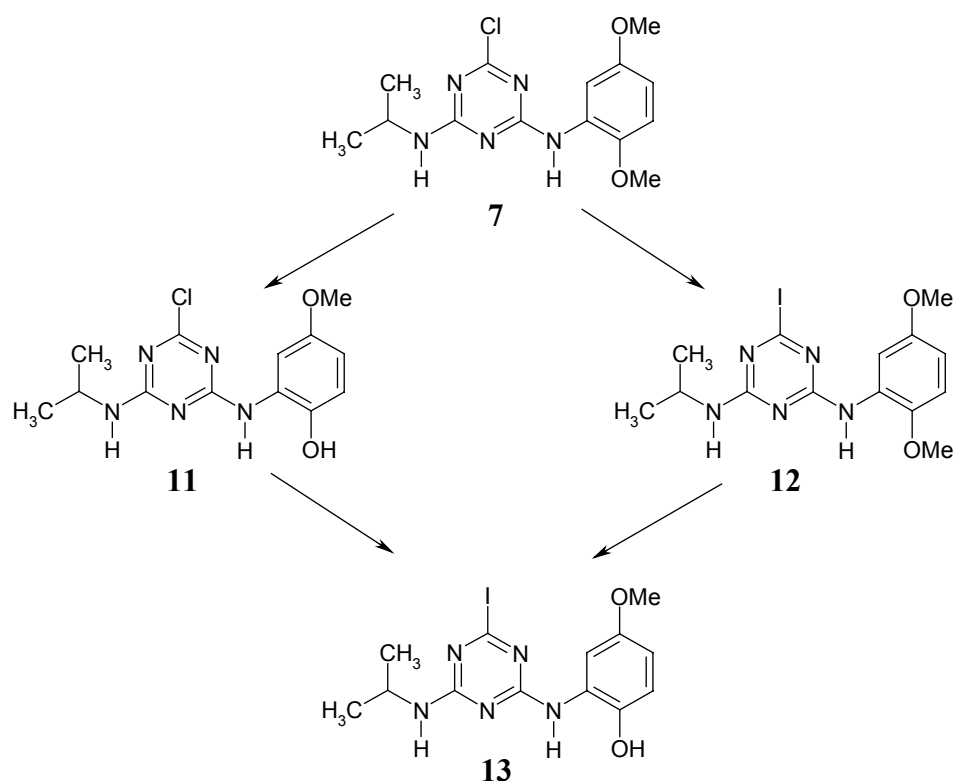


Abbildung 60: Umsetzung von **7** mit Chlortrimethylsilan/Natriumiodid

Durch Massenspektrometrie wurde das einfach demethylierte Produkt „N-Monool“ **11** (Massenpeak: $m/z=309$), sowie die iodierten Produkte **12** (Massenpeak: $m/z=415$) und **13** (Massenpeak: $m/z=401$) identifiziert. Bei letzteren beiden wurde jeweils das Chloratom durch Iod substituiert. Erstaunlicher Weise konnte nur ein Isomer für die einfach methylierte Substanz, nämlich **11**, gefunden werden. Möglicherweise ist das korrespondierende Isomer nicht GC-gängig. Im DC wurde jedoch kein Spot entdeckt, der diesem Isomer zuzuordnen wäre. Um die Frage zu klären, welche der beiden Methylgruppen hierbei abgetrennt wurde, wurde **11** durch Säulenchromatographie isoliert und einer $^1\text{H-NMR}$ -Analyse (200MHz; in MeOH-d_4) unterworfen. Abbildung 61 zeigt die Zuordnung der Signale.

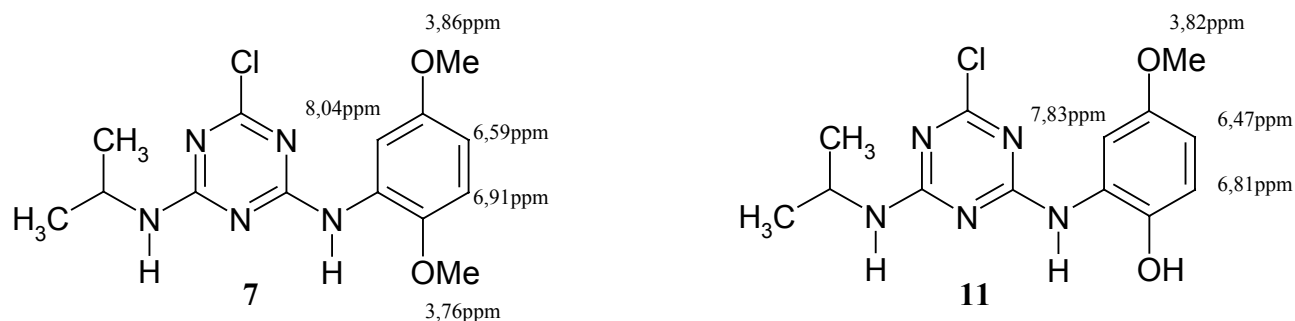


Abbildung 61: Chemische Verschiebungen im $^1\text{H-NMR}$ (200MHz; in MeOH-d_4)

Die Methoxygruppe an **11** weist eine chemische Verschiebung $\delta=3,82\text{ppm}$ auf. Nach einem Inkrement-System zur Abschätzung der chemischen Verschiebung werden Protonen am A-

romaten und einer Methoxygruppe leicht ins Hochfeld verschoben, wenn am Aromaten eine Methoxygruppe durch eine Phenolgruppe ersetzt wird [234]. Tatsächlich wurde beobachtet, dass die aromatischen Protonen der Verbindung **11** in Richtung hohes Feld verschoben sind. Daher sollte die Methoxygruppe verglichen mit der Verbindung **7** ebenfalls Hochfeld verschoben sein. Im Edukt weist die Methoxygruppe in ortho-Stellung zum Amin eine Verschiebung von nur $\delta=3,76\text{ppm}$ auf. Es kann daher angenommen werden, dass diese sterisch stärker gehinderte Methoxygruppe selektiv abgespalten wurde. Von der regioselektiven Eigenschaft des Iodtrimethylsilans wurde bereits von E.H. Vickery et al. [235] berichtet.

Durch die Reaktion mit Iodtrimethylsilan wurde nicht das gewünschte doppelt demethylierte Produkt **1** erhalten. Aufgrund der vielfältigen Nebenreaktionen wurde nach einer Alternative unter deutlich milderen Reaktionsbedingungen gesucht. Im Prinzip kommen für mögliche Spaltungsreagentien von Arylalkylethern auch Lewis-Säuren (z.B. AlCl_3 [236], BBr_3 [237, 238, 239], BCl_3 [240]) in Frage. Daher wurde **7** mit dem Spaltungsreagenz Bortribromid bei Raumtemperatur umgesetzt. Durch DC war bereits nach 2 Stunden kein Edukt **7** mehr zu detektieren und die Reaktion konnte beendet werden. Das Produkt wurde durch Säulenchromatographie in reiner Form isoliert und durch ^1H -NMR, Direkteinlaß-EI/MS und CHN-Elementaranalyse charakterisiert. In Abbildung 62 ist das ^1H -NMR (200MHz) der Verbindung in deuteriertem Methanol dargestellt.

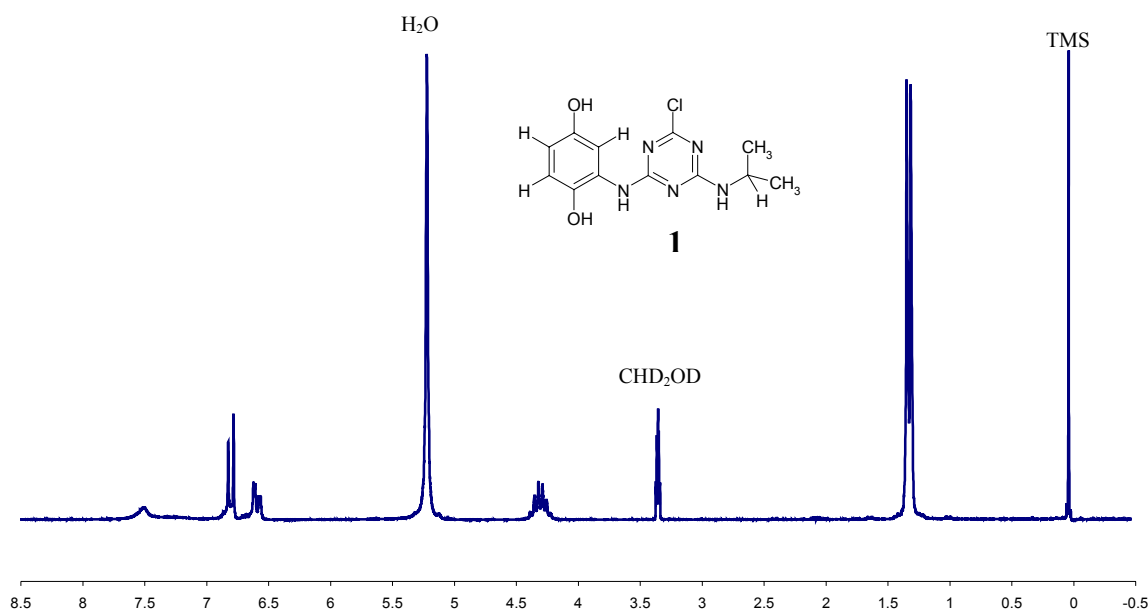


Abbildung 62: ^1H -NMR von „*N*-Diol“ **1** (200MHz; in MeOH-d_4)

Im aliphatischen Bereich ist ein Dublett bei $\delta=1,29\text{ppm}$ für sechs Methylprotonen und ein Multiplett bei $\delta=4,26\text{ppm}$ für ein tertiäres Proton der Isopropylgruppe zu erkennen. Die $^3\text{J}(\text{H,H})$ -Kopplung zwischen diesen Protonen beträgt 6,59Hz. Im aromatischen Bereich kop-

pelt ein Benzolproton in para-Stellung zum Amin (6,55ppm) mit dem vicinalen Proton bei 6,76ppm und in einer $^4J(\text{H,H})$ -Kopplung mit einem Proton bei 7,46ppm. Amin- und phenolische Protonen werden aufgrund von rapidem Austausch mit dem Lösungsmittel nicht als scharfes Signal wahrgenommen.

Das Direkteinlaß-EI/MS der Verbindung offenbarte im Spektrum neben dem Massenpeak bei $m/z=295$ den zugehörigen Chlorisotopenpeak bei $m/z=297$, sowie als Hauptfragment die Abspaltung einer OH-Gruppe (-17 Massen). Abbildung 63 zeigt das Spektrum.

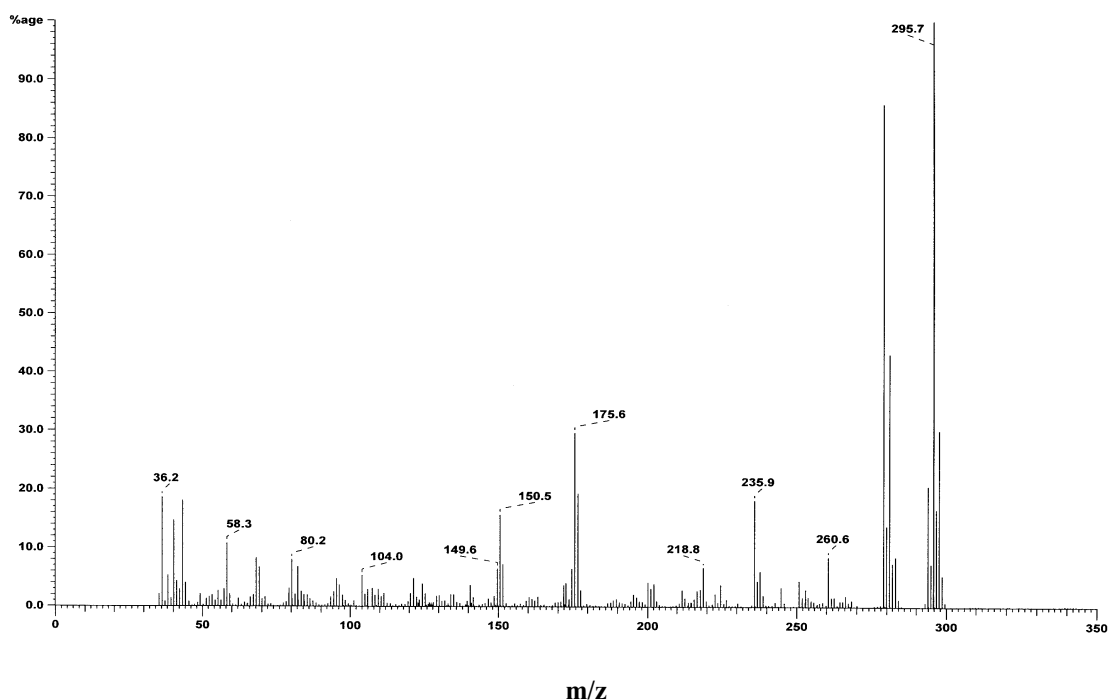


Abbildung 63: Massenspektrum der Verbindung „N-Diol“ **1**

Das MS identifizierte das Produkt eindeutig als das gewünschte N-Diol **1**. Bortribromid ermöglicht also die zweifache Demethylierung des N-Dimethoxy **7** in einer schnellen und milden Reaktion. Das N-Diol **1** zeigte die Tendenz zu Folgereaktionen, z.B. Polymerisation.

3.3.3.2. Synthese des Monomers „Cl-Diol“ **2**

Zur Darstellung des Monomers „Cl-Diol“ **2** wurde zunächst eine große Menge an Atrazin bereitgestellt. Atrazin kann käuflich erworben werden, aus Kostengründen wurde jedoch der präparativen Darstellung der Vorzug gegeben. Die 2-stufige Synthese nach Vorschrift [228] lieferte Atrazin **14** in hoher Ausbeute und Reinheit. In Anlehnung an [229] wurden anschließend Atrazin **14** und 2,5-Dimethoxyanilin **6** in wässriger Lösung zum Sieden erhitzt und so das Melaminderivat „Cl-Dimethoxy“ **15** dargestellt (Abbildung 64).

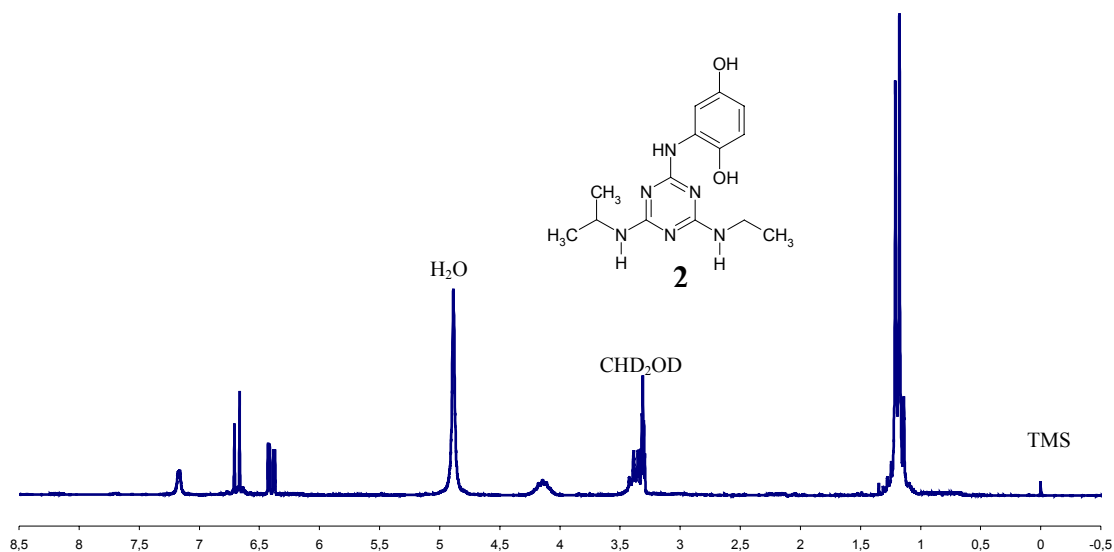


Abbildung 65: ¹H-NMR von „Cl-Diol“ 2 (200MHz; in MeOH-d₄)

Durch Direkteinlaß-EI/MS wurde neben der Molekülmasse $m/z=304$ ein Basispeak bei $m/z=302$ detektiert, was eine bevorzugte Abspaltung von zwei H-Atomen anzeigt, sowie ein Fragment mit der Masse $m/z=287$, was auf die Abspaltung einer Methylgruppe vom Fragment $m/z=302$ oder einer Hydroxygruppe vom Molekülion hindeutet (Abbildung 66).

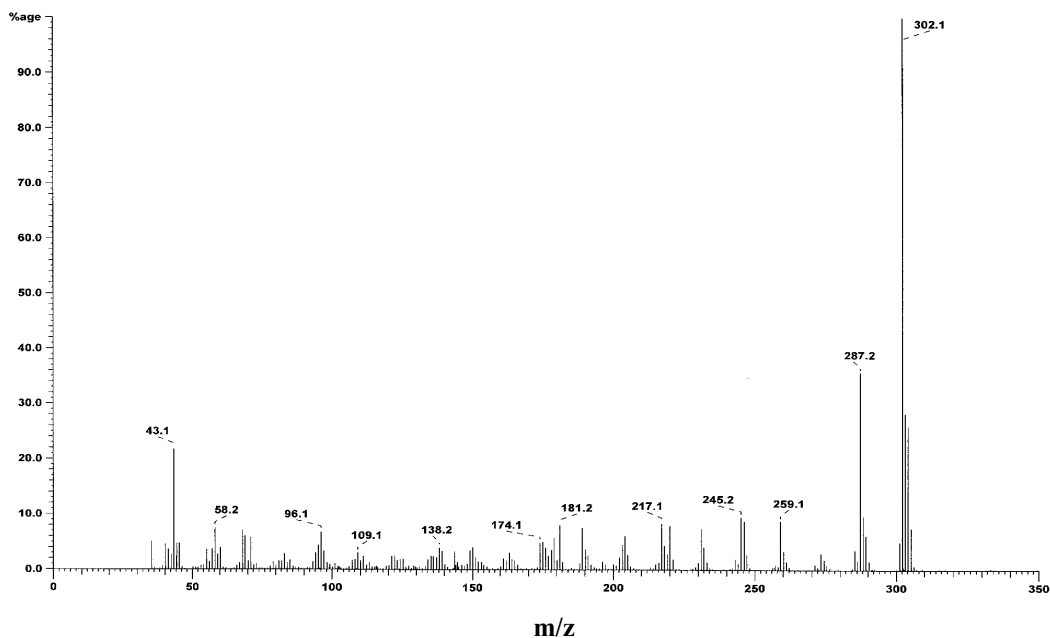


Abbildung 66: Massenspektrum der Verbindung „Cl-Diol“ 2

Diese Ergebnisse belegen die Struktur von Cl-Diol **2**. Bei dieser Synthese traten diverse Nebenprodukte auf. Der Aufklärung der genauen Struktur wurde jedoch nicht weiter nachgegangen.

3.3.3.3. Synthese und Charakterisierung triazinbeladener Modellsbstanz

Zur Darstellung triazinbeladener Modellsbstanz wurde eine Copolymerisation mit p-Benzochinon **16** und N-Diol **1** durchgeführt. Sie wurden in wässriger Lösung mit Natriumcarbonat versetzt und unter Zufuhr von Sauerstoff umgesetzt. In diesem alkalischen Medium entstand bereits nach 16 Stunden Reaktionszeit in hohen Ausbeuten eine dunkelbraun bis schwarz gefärbte Substanz. Die resultierende Substanz wurde BQ310A genannt (Abbildung 67).

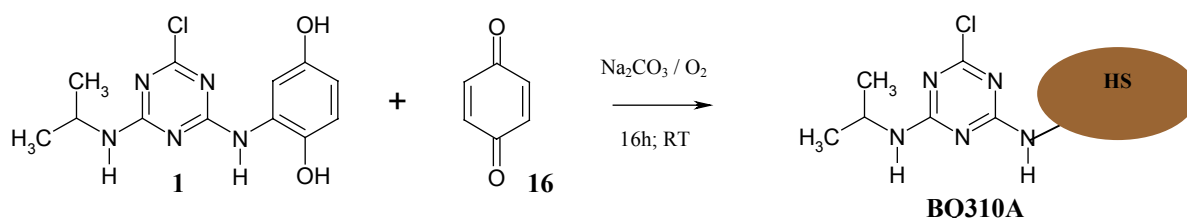


Abbildung 67: Synthese der triazinbeladenen Modellhuminsäure BQ310A

Um den Polymerisationsvorgang möglichst nicht zu stören, wurde dem p-Benzochinon mit 5 Gew.-% (w/w) N-Diol **1** eine möglichst kleine Menge des Triazinderivats zugesetzt.

Bei der anschließenden Isolierung der Polymerisate wurden Edukte, Salze und Lösungsmittel vollständig entfernt. Zunächst wurde die Reaktionslösung mit Dichlormethan ausgeschüttelt, um niedermolekulare, unpolare Verbindungen zu entfernen. In diesem Schritt wurden unter anderem die Edukte abgetrennt. Danach wurde mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, wobei die hochmolekularen synthetisch erzeugten Modellhuminsäuren aus der Lösung ausfallen und anschließend zentrifugiert. Die Mutterlauge, in der sich noch Fulvinsäuren und säurelösliche Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht befinden, wurde verworfen. Zur Entfernung mitgefällter Salzspuren wurde anschließend mit Säure und schließlich mit Wasser gewaschen. Schließlich wurde der Rückstand lyophilisiert.

Analog wurde eine Substanz aus der Copolymerisation mit dem System p-Benzochinon **16** / Cl-Diol **2** dargestellt. Der Gewichtsanteil des Cl-Diol **2** betrug 2 Gew.-% (w/w). Die Substanz wurde BQ400A genannt (Abbildung 68).

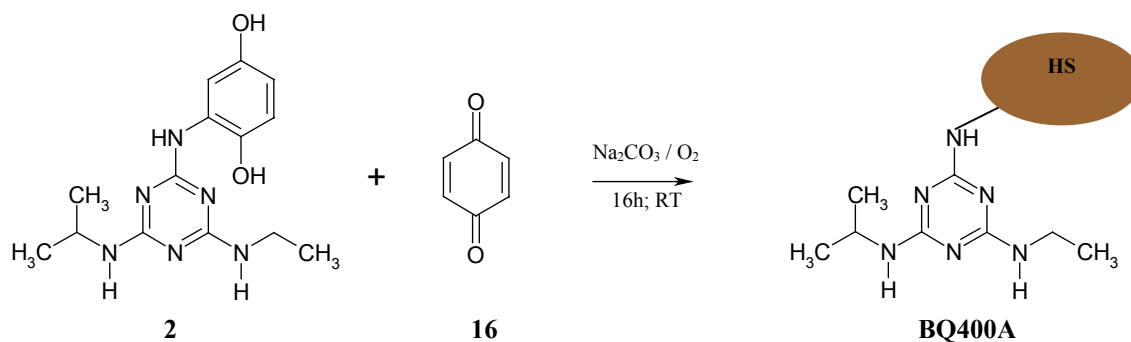


Abbildung 68: Synthese der Triazinbeladenen Modellhuminsäure BQ400A

Schließlich wurde eine Kontrollsubstanz aus reinem p-Benzochinon **16** in Abwesenheit von Triazinderivaten synthetisiert. Sie wurde BQ125 genannt.

Die Charakterisierung der nach der „Monomerenstrategie“ synthetisierten Modellschubstanzen erfolgte durch FTIR-Spektroskopie und CHN-Elementaranalyse. Die FTIR-Spektren von BQ310A, BQ400A und der Kontrollsubstanz BQ125 in KBr, sind in Abbildung 69 dargestellt.

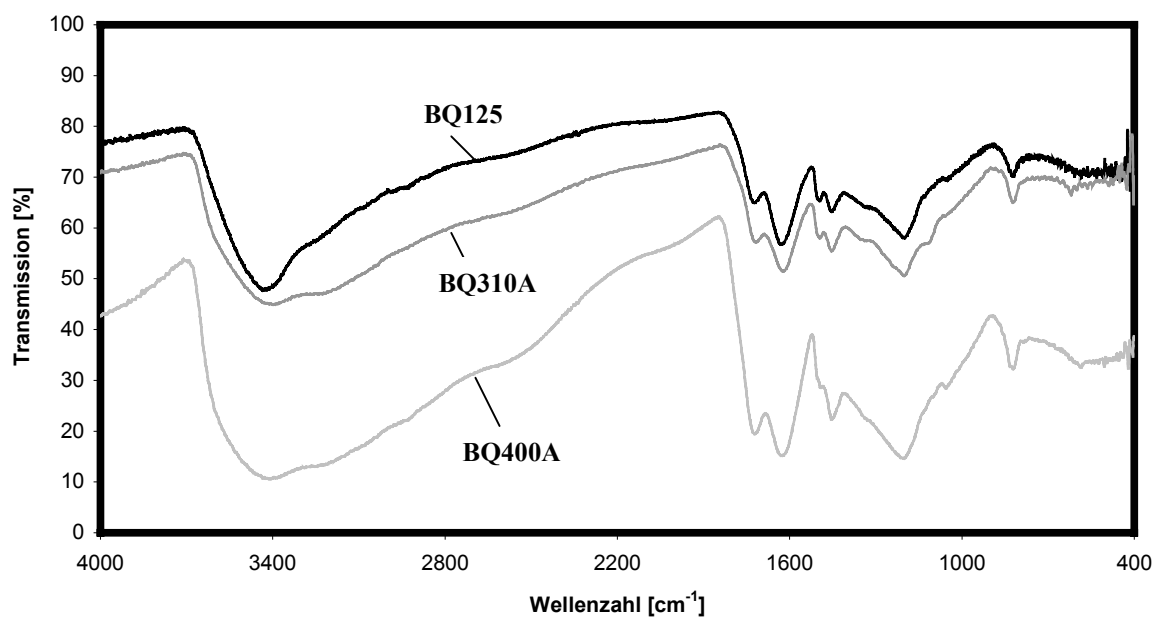


Abbildung 69: FTIR-Spektren (in KBr) von BQ310A, BQ400A und BQ125 (Kontrolle)

Die drei Spektren sind sich sehr ähnlich. Es sind (O-H)-Valenzen um $\nu = 3400\text{cm}^{-1}$, sowie eine (C-O)-Deformationsbande bei 1200cm^{-1} zu erkennen, welche auf Ether oder phenolische Gruppen zurückzuführen sein dürften. Die Doppelbande von Carbonylfunktionen um 1620 und 1720cm^{-1} ist in allen Substanzen zu erkennen. Aufgrund der Lage der Carbonyl-Absorptionen lassen sich Einflüsse ihrer molekularen Umgebung ablesen. Die energiereichere Bande kann auf Keto-Absorptionen, die energieärmere auf Carbonsäure-Funktionalitäten

zurückgeführt werden. Bei den Modellverbindungen, die aus Benzochinon synthetisiert wurden, ist die Bande um 1620cm^{-1} stärker ausgeprägt. Dies deutet auf eine niedrigere Dichte an Carboxylat-Gruppen und damit einen stärkeren „Huminsäure“-Charakter hin. Es wurden keine Banden gefunden, die dem p-Benzochinon oder einem der Edukte zuzuordnen sind. Die FTIR-Spektren zeigen Ähnlichkeit mit den Spektren der Produkte aus Hydrochinon (z.B. HS100; Abschnitt 3.3.2.2.), was die Verwandtschaft dieser beiden Verbindungen verdeutlicht. Eine Absorption bei 1452cm^{-1} unterscheidet die Verbindungen HS100 und BQ125 voneinander. Bei BQ125 ist diese deutlich intensiver. Sie könnte auf eine (C-H)-Deformationsschwingung einer Methylengruppe hindeuten [234].

Die Ergebnisse der CHN-Analyse sind in Tabelle 43 dargestellt.

Tabelle 43: CHN-Elementarzusammensetzung nach „Monomerenstrategie“ synthetisierter Modellsubstanzen

Substanz	C-Gehalt [%]	H-Gehalt [%]	N-Gehalt [%]
BQ310A	57,56	3,19	1,51
BQ400A	54,83	3,38	0,45
BQ125 (Kontrolle)	54,21	3,33	<NG

Der Stickstoffgehalt deutet auf einpolymerisierte Triazinderivate hin.

3.3.3.4. ELISA-Analyse von Triazinmonomeren und Modellsubstanzen

Zur Quantifizierung der gebundenen Triazinderivate wurden die synthetisierten Modells-substanzen Analysen mit kompetitiven ELISAs unterworfen. Um diese Ergebnisse vernünftig bewerten zu können, war es notwendig, Kenntnis über die Kreuzreaktion der eingesetzten Triazinmonomere in den entsprechenden Immunoassays zu haben und so einen Vergleich der „freien“ mit den „gebundenen“ Triazinen anstellen zu können.

3.3.3.4.1. ELISA-Analyse von Triazinmonomeren

Die im Rahmen der „Monomerenstrategie“ synthetisierten Triazinderivate weisen strukturelle Verwandtschaft mit Atrazin auf. Da jedoch auch geringe Strukturänderungen einen erheblichen Einfluß auf das Bindungsverhalten der Atrazinspezifischen Antikörper haben, wurden CR-Werte analog zum Abschnitt 3.1.3.1. mit dem AS46 (Tabelle 44) bestimmt.

Tabelle 44: Kreuzreaktion Triazinmonomere im pAb AS46 ELISA

Kreuzreaktion (CR)	CR: Median (Schwankungsbreite)	Konz.
Atrazin	100% (per Def.)	-
N-Dimethoxy 7	0,14 % (0,11-0,29)	30-1000 µg/L
N-Monool 11	0,18% (0,15-0,26)	30-1000 µg/L
N-Diol 1	1,22% (0,81-1,62)	30-100 µg/L
Cl-Dimethoxy 15	0,027% (0,026-0,031)	100-1000 µg/L
Cl-Diol 2	0,027% (0,027-0,037)	100-1000 µg/L
N-3,4-Dimethoxy 17	5,25% (5,00-5,73)	1-10 µg/L

Die synthetisierten Triazine **1**, **7** und **11** wiesen nur sehr geringe Kreuzreaktion mit dem pAb auf. Das war überraschend, da diese Verbindungen über eine im Vergleich mit Atrazin unveränderte Isopropylamin-Funktion und ein Chloratom am Triazinring verfügen und derartige Verbindungen gewöhnlich sehr gut von der Paratopregion der Antikörper erkannt werden. So weist N-Dimethoxy **7** CR von 0,14% auf, das ist um Faktor 100 niedriger als bei Simazin (CR 10,2%), das über vergleichbare funktionelle Struktur und Polarität verfügt. Bei den durch Demethylierung des aromatischen Rings synthetisierten Verbindungen **1** und **11** steigt die CR bis auf etwa 1,2%, bleibt allerdings weiterhin erstaunlich niedrig.

Möglicherweise erschweren die aromatischen ortho-Substituenten die Antikörperbindung an das Epitop. So können die Methoxy- bzw. Hydroxygruppe als „sterischer Zaun“ wirken und das sekundäre Amin und den Triazinring abschirmen. So werden die CDRs daran gehindert, das Hapten effektiv zu binden. Bei OH-Gruppen ist ferner mit einer Hydrathülle zu rechnen, die die Abschirmung verstärkt. Zur Prüfung, ob sterische Beanspruchung als Ursache in Frage

kommt, wurde N-3,4-Dimethoxy **17** nach einer zu **7** analogen Vorschrift synthetisiert und ebenfalls im kompetitiven ELISA untersucht.

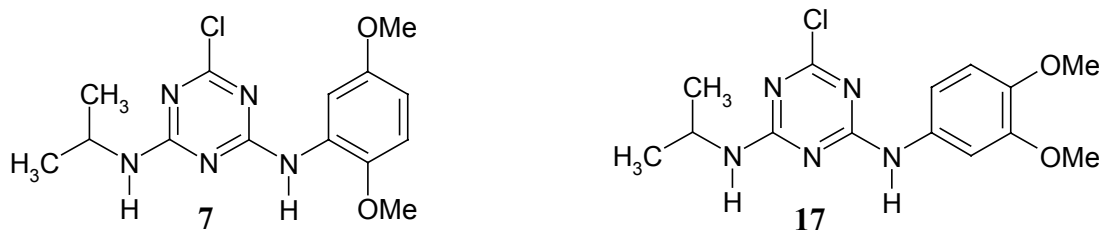


Abbildung 70: Strukturen von N-Dimethoxy **7** und N-3,4-Dimethoxy **17**

In Verbindung **17** ist formal eine Methoxygruppe der Verbindung **7** von der ortho- in die para-Stellung zur Aminfunktion verschoben worden. Dort sollte sie nur noch ein Minimum an Störung der Antikörper-Hapten-Bindung zeigen. Tatsächlich ist nach dieser Strukturänderung der pAb besser in die Lage, das Hapten zu detektieren. Mit einer CR von 5,25% liegt es damit in der Größenordnung der Triazinherbizide Terbutylazin oder Simazin.

Die Bestimmung der CR-Werte erfolgte danach auch mit K4E7 (Tabelle 45), um die oben erzielten Ergebnisse mit einem weiteren Antikörper validieren zu können.

Tabelle 45: Kreuzreaktion Triazinmonomere im mAb K4E7 ELISA

Kreuzreaktion (CR)	Median CR (Schwankungsbreite)	Konz.
Atrazin	100% (per Def.)	-
N-Dimethoxy 7	13,4 % (12,5-20,9)	3-30 µg/L
N-Monool 11	8,2% (8,2-8,3)	10-30 µg/L
N-Diol 1	2,93% (2,87-2,99)	30-100 µg/L
Cl-Dimethoxy 15	0,021% (0,018-0,023)	100-1000 µg/L
Cl-Diol 2	0,005% (0,005)	1000 µg/L
N-3,4-Dimethoxy 17	27,4% (20,4-34,4)	1-10 µg/L

Alle vier im ELISA mit mAb K4E7 untersuchten chlorhaltigen Triazine (**1**, **7**, **11**, **17**) zeigen deutlich höhere CR als mit AS46. Für das N-Dimethoxy **7** und N-Diol **1** werden etwa um Faktor 100 bzw. 50 höhere CR bestimmt als mit AS46. Der K4E7 kann diese Verbindungen also viel sensitiver erkennen und kann damit besser als gruppenspezifischer Antikörper für Triazine eingesetzt werden, um eine Vielzahl an unterschiedlichen Triazinstrukturen zu detektieren und zu quantifizieren. Dagegen weist der AS46 stärker den Charakter eines Atrazin-selektiven Antikörpers auf.

Die CR der Verbindungen **2** und **15** fallen aufgrund der fehlenden Chlorgruppe am Triazinring bei beiden Antikörpern sehr gering aus.

3.3.3.4.2. ELISA-Analyse von Triazinbeladenen Modellsubstanzen

Zur Quantifizierung der gebundenen Rückstände durch ELISA wurden die Modellsubstanzen BQ310A und BQ400A in verschiedenen Konzentrationen im kompetitiven ELISA untersucht. Parallel wurde auf der gleichen Mikrotiterplatte die Kontrollhuminsäure BQ125 mitgeführt, um unspezifische Bindungen der Huminstoffmodelle an Antikörper zu bestimmen. Es wurden ELISAs mit den Antikörpern pAb AS46 und mAb K4E7 eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 46 dargestellt.

Tabelle 46: Atrazinäquivalentkonzentration für BQ310A, BQ400A und BQ125 im ELISA ohne Inhibition mit BSA (Angabe von VB der t-Verteilung für $P=95\%$; $f=3$)

Konzentration [mg/L]	AK	BQ310A [µg/L AEQ]		BQ400A [µg/L AEQ]		BQ125 [µg/L AEQ]	
		Mittelwert x	± VB	Mittelwert x	± VB	Mittelwert x	± VB
30	AS46	> NG	-	1,5	± 0,3	0,17	± 0,06
10	AS46	3,46	± 0,13	0,56	± 0,06	0,08	± 0,03
3	AS46	0,87	± 0,05	0,16	± 0,03	0,03	± 0,02
10	K4E7	> NG	-	2,6	± 0,8	1,6	± 0,2
3	K4E7	2,7	± 1,4	0,41	± 0,06	0,56	± 0,09
1	K4E7	1,0	± 0,2	0,18	± 0,05	0,14	± 0,14

BQ310A zeigte in allen untersuchten Proben im Vergleich mit der Kontroll-Huminsäure signifikant erhöhte Äquivalentkonzentrationen. Damit wird das Ergebnis der CHN-Elementanalyse bestätigt, die Stickstoff und damit einpolymerisierte Triazinderivate nachweist.

Beim BQ400A konnte dies nur bei den mit pAb AS46 untersuchten Proben festgestellt werden. Der mAb K4E7 erwies sich bereits in niedrigen Konzentrationen der Kontrollmodells substanz als so empfindlich gegenüber unspezifischer Bindung, dass sich der Beitrag der gebundenen Triazine nur in der 10mg/L-Lösung signifikant vom Untergrund abhob.

Daher wurden weitere ELISA-Analysen durchgeführt, bei denen die Enzymtracertlösungen mit 1% (w/w) BSA versetzt und so die Huminstoffsignale inhibiert wurden (Tabelle 47).

Tabelle 47: Atrazinäquivalentkonzentration für BQ310A, BQ400A und BQ125 im ELISA mit Inhibition durch 1% BSA (Angabe von VB der t-Verteilung für $P=95\%$; $f=3$)

Humin- stoff [mg/L]	AK	BQ310A [$\mu\text{g/L AEQ}$]		BQ400A [$\mu\text{g/L AEQ}$]		BQ125 [$\mu\text{g/L AEQ}$]	
		Mittelwert x	$\pm \text{VB}$	Mittelwert x	$\pm \text{VB}$	Mittelwert x	$\pm \text{VB}$
30	AS46	0,06	$\pm 0,03$	0,09	$\pm 0,03$	< NG	-
10	AS46	0,02	$\pm 0,01$	0,03	$\pm 0,02$	< NG	-
100	K4E7	1,7	$\pm 0,3$	0,3	$\pm 0,2$	0,10	$\pm 0,05$
30	K4E7	0,3	$\pm 0,2$	0,09	$\pm 0,11$	0,06	$\pm 0,08$
10	K4E7	0,11	$\pm 0,03$	0,05	$\pm 0,05$	0,06	$\pm 0,03$

Nur beim pAb AS46 gelang vollständige Unterdrückung der Huminstoffbindung. Beim mAb K4E7 blieb ein Restsignal übrig, das weiterhin die Detektion der gebundenen Rückstände erschwerte. Insgesamt wurde ein stärkeres Signal beim BQ310A festgestellt werden, da die eingesetzten Monomere und damit die hauptsächlich auftretende Struktur des gebundenen Rückstands von den Antikörper besser erkannt werden als beim BQ400A.

4. Diskussion

Triazinherbizide treten in natürlichen Proben einerseits frei gelöst, andererseits in Huminstoff-gebundener Form auf. Enzymimmunoassays stellen eine neuartige Analysenmethode dar, welche zur Bestimmung beider Triazinformen befähigt ist. In dieser Hinsicht nehmen sie im vielfältigen Spektrum der analytischen Methoden eine Sonderstellung ein. Im Bereich der „freien“ Analyte treten ELISAs in Konkurrenz mit etablierten instrumentellen Methoden. Sie werden als ergänzende Methoden eingesetzt oder haben sich Nischenbereiche gesichert, in denen ihre Vorteile zur Geltung kommen. Auf der anderen Seite liefern sie wertvolle quantitative und strukturelle Informationen über „gebundene“ Triazine und nehmen daher eine führende Position unter den wenigen Analysenmethoden ein, die zur Bestimmung derartiger Rückstände befähigt sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse machen deutlich, dass die Leistungsfähigkeit eines ELISAs erheblich davon abhängt, ob „freie“ oder „gebundene“ Triazine untersucht werden. Ein entscheidender Grund hierfür ist das Fehlen von Standardsubstanzen zum Kalibrieren von Analysenmethoden für die Untersuchung von gebundenen Triazinrückständen. Die beiden Aufgabenbereiche müssen daher einer unabhängigen Bewertung zugeführt werden.

4.1. Analytik freier Triazine

Um sich gegenüber bestehenden instrumentellen Standardverfahren durchzusetzen zu können, müssen Enzymimmunoassays als neuartige Analysenmethoden zur Bestimmung von frei gelösten Triazinen, Vorteile aufweisen. Hierbei stellt eine eingehende Validierung die Entscheidungsgrundlage dar, da nur so die Methodenmerkmale spezifiziert werden. Erst mit derartig validierten Methoden ist die Anwendung der Methode und die Gewinnung belastbarer Ergebnisse möglich.

4.1.1. Bewertung der Validierungsleitlinie

Jede Analysenmethode muß validiert werden. Trotzdem existieren bislang keine verbindlichen Leitlinien für die Validierung von Enzymimmunoassays [213]. Dieser Mangel stellt ein Hindernis auf dem Weg zu ihrer allgemeinen Akzeptanz für die Analytik von freien Triazinen dar. Daher wurde eine solche Leitlinie entwickelt, und der Enzymimmunoassay auf der Basis des polyklonalen Atrazinspezifischen Antikörpers AS46 in Kombination mit dem Enzymtracer ET Isopropyl exemplarisch validiert.

Einen wichtigen Validierungsparameter stellt die Genauigkeit dar. Seine Bestimmung erfolgte an Referenzmaterialien, bereitgestellt durch Aufstocken von Wasserproben mit Atrazin-

Standards. Durch diese Vorgehensweise wurden unmittelbar die Wiederfindung bzw. Dosis-Signal-Beziehung, die Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen sowie die Arbeitsbereiche der Methode ermittelt.

Die Genauigkeit hängt von der vorliegenden Matrix ab, da beim ELISA keine Probenvorbereitungsschritte durchgeführt werden und es somit zu unerwünschten unspezifischen Reaktionen der Matrixkomponenten mit den Immunglobulinen kommen kann. Bei Enzymimmunoassays ist also entscheidend, die Genauigkeit in allen Matrices zu prüfen, die später als Messprobe vorliegen können.

Es reicht nicht aus, lediglich gespikete matrixfreie Lösungen zu untersuchen. Dies wird auch durch die in Tabelle 48 zusammengefaßten Quantifizierungsgrenzen und Arbeitsbereiche belegt.

Tabelle 48: Quantifizierungsgrenzen und Arbeitsbereich des des Atrazinspezifischen Enzymimmunoassays mit pAb AS46 und ET2d für verschiedene Matrices

Matrix	Untere Quantifizierungsgrenze	Arbeitsbereich
Destilliertes Wasser	0,02 µg/L	0,02 – 3 µg/L
Trinkwasser	0,03 µg/L	0,03 – 3 µg/L
Oberflächenwasser	0,1 µg/L	0,1 – 3 µg/L

Während in matrixfreien Proben im Bereich zwischen 0,02-3 µg/L Atrazin hinreichend genau bestimmt wurde, verschiebt sich die untere Quantifizierungsgrenze von Atrazin in Trinkwasser- und Oberflächenwasserproben durch Fremdstoffen zu höheren Werten.

Es ist ein Nachteil der Methode zur Bestimmung der Genauigkeit, dass eine repräsentative Matrix für die Bestimmung der Wiederfindungen vorliegen muß. Liegen zertifizierte Referenzmaterialien nicht vor, müssen Matrices ausgewählt und mit Standardmaterialien aufgestockt werden. Die Einführung neuartiger Arbeitsschritte birgt jedoch die Gefahr potentieller Fehlerquellen. Außerdem vergrößert sich hierdurch der Arbeitsaufwand.

Andere Autoren bestimmten aquatische Proben und fanden im Vergleich von ELISAs mit GC/MS oder HPLC/UV eine leichte Überschätzung der Atrazinkonzentration durch den ELISA [53, 241]. Mögliche Erklärung sind kreuzreagierende Substanzen in der Probe. Die vorliegenden Wiederfindungsversuche zeigen jedoch, dass die Überschätzung der Atrazinbelastung auch Folge des Testformats sein kann. Im vorliegenden Format wurde die Standardreihe vor den unbekannten Proben auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Da der vorliegende ELISA nicht im Gleichgewichtszustand [242] betrieben wird, macht sich dieser Umstand in einer gewissen „Drift“ auf der Platte bemerkbar.

Mit dem vorliegenden ELISA ist die Quantifizierung im Arbeitsbereich innerhalb der angegebenen Grenzen möglich. Werden die Quantifizierungsgrenzen über- bzw. unterschritten,

kann eine Überschätzung der Atrazinkonzentration nicht ausgeschlossen werden. Dieses ist bei der Auswertung von unbekannten Proben zu berücksichtigen.

Tabelle 49 zeigt eine Zusammenfassung der ermittelten Nachweisgrenzen. Angegeben sind die jeweiligen Höchstwerte.

Tabelle 49: Nachweisgrenzen des Atrazinspezifischen Enzymimmunoassays mit pAb AS46 und ET2d für verschiedene Matrices

Matrix	Nachweisgrenze
Destilliertes Wasser	0,01 µg/L
Trinkwasser	0,011 µg/L
Oberflächenwasser	0,021 µg/L

Auch hier hängt die Nachweisgrenze entscheidend von der Matrix ab. Da eine Voraussage der genauen Zusammensetzung der Matrix bei unbekannten Proben nicht möglich ist, ist eine genaue Festlegung der Nachweisgrenze streng genommen nicht möglich. Die gezeigten Werte können nur eine Orientierung über die Größenordnung der Nachweisgrenze geben.

Der Nachweisgrenze sollte insgesamt weniger Bedeutung beigemessen werden als der unteren Quantifizierungsgrenze, da ELISAs in der Regel als quantitative Untersuchungen eingesetzt werden.

Die Kenntnis über kreuzreagierende Verbindungen mit leicht abweichender Struktur ist von Bedeutung, da der pAb AS46 nicht ausschließlich Atrazin-spezifisch ist. Er bindet auch strukturell verwandte Triazinherbizide. Das Chlortriazin Propazin zeichnet sich gegenüber Atrazin durch eine signifikant höhere Kreuzreaktion aus. Andere wichtige Vertreter dieser Substanzklasse, die ebenfalls stark vom Antikörper gebunden werden, sind Terbutylazin und Simazin. Damit kann der Enzymimmunoassay nach Bedarf in einen Propazin- oder Terbutylazinspezifischen IA umgewandelt werden. Letzteres würde sich für die Bundesrepublik anbieten, da der Einsatz der meisten anderen Triazine verboten ist. (seit 1991: Simazin, Atrazin und Terbutryn; seit 1989: Propazin; seit 1975: Prometryn [18]) Auch bei anderen ELISA-Tests wird so verfahren. So wird von der Fa. Coring System Diagnostix GmbH in Gernsheim ein Lindan-Röhrchentest angeboten, der eine Nachweisgrenze von 400ng/g für Lindan aufweist. Es handelt sich hierbei jedoch eigentlich um einen verkappten Test gegen Endrin, Endosulfan, Heptachlor und Dieldrin (Nachweisgrenze: 6ng/g) [243].

Bei der Ermittlung der Kreuzreaktionen ist die Reinheit der Substanzen kritisch. Verunreinigungen mit einem stark kreuzreagierenden Derivat können dazu führen, dass es zu einer Überbestimmung der Kreuzreaktion kommt. Im vorliegenden Fall kann dies bei Hydroxyatrazin vorliegen, dessen Reinheit nur bei 94,7% liegt. Diese Verbindung wird durch Hydrolyse von Atrazin gewonnen. Deswegen muß die festgestellte Kreuzreaktion von 0,09% mit Vorsicht betrachtet werden. Der wahre Wert kann auch niedriger sein.

Im Falle von Triazingemischen ist mit gänzlich anderen CR-Werten im kompetitiven ELISA zu rechnen, da dann mehrere Komponenten um die freien Antikörperbindungsstellen konkurrieren. Bei natürlichen Proben ist zusätzlich mit Störungen der Matrix zu rechnen. Daher kann der angegebene CR-Wert nur als ein Näherungswert verstanden werden, um die Selektivität der betreffenden Antikörper abschätzen zu können.

Durch Kreuzreaktionen kann auch die Identifizierung neuer Metabolite erfolgen. Bei der Verwendung eines Alachlor-ELISAs wurde eine Reihe falsch-positiver Ergebnisse entdeckt. Direkte Folge war die Entdeckung eines neuen Metaboliten, der Ethansulfonsäure [244].

Im Falle von hohen Konzentrationen mit Huminstoffen trat ab DOC-Konzentrationen von 30mg/L eine signifikante unspezifische Bindung auf. Proben mit hohem Huminstoffgehalt müssen also stets mit einer Methode der instrumentellen Analytik validiert werden.

Im pH-Bereich von 3 bis 11 wird die Methode nicht beeinträchtigt und Quantifizierung ist möglich. Oberhalb und unterhalb dieser Grenzen werden Atrazinkonzentrationen detektiert, die weit über den eingesetzten Mengen liegen. Dies ist die Folge einer starken Denaturierung der immobilisierten Antikörper bzw. der Meerrettichperoxidase. Durch eine Veränderung der Antikörper-Antigenbindungsstellen können weder Enzymtracer noch Haptene an die Antikörper binden, was zur Folge hat, daß im weiteren Verlauf des Tests keine Substratreaktion stattfinden kann. Geringe Farbentwicklung ist jedoch bei diesem Format mit einer hohen Atrazinkonzentration gleichzusetzen. Daher wird hierbei ein falsches positives Signal gemessen. Auch Denaturierung des Enzyms kann die Aktivität der Peroxidase so weit erniedrigen, daß falsch-positive Ergebnisse erzielt werden. Müssen Proben mit extremen pH untersucht werden, so empfiehlt sich das Einstellen eines angemessenen pH oder die Wahl eines anderen Testformats.

Zusammengefasst kommt im ELISA Überschätzung der Analytkonzentration zustande durch:

- Unspezifische Bindung von Matrixsubstanzen
- Enzymdeaktivierung
- Paratopdenaturierung der Antikörper
- „Drift“ durch variierende Inkubationszeiten

Unterschätzung der Analytkonzentration kam beim vorliegenden ELISA nur in Ausnahmen vor, wenn bestimmte Lösungsmittel wie Methanol in hohen Konzentrationen eingesetzt wurden. Negative Untersuchungsergebnisse von aquatischen Wasserproben können damit in der Regel als richtig angesehen werden.

4.1.2. Bewertung des aquatischen Oderflusssystems

Zwölf Staaten aus Mittel- und Osteuropa verhandeln mit der Europäischen Union über ihren Beitritt. Hierzu gehört auch die Republik Polen im Osten Mitteleuropas. Zwar hat sich der wirtschaftliche Schwerpunkt von der Landwirtschaft auf die Industrie verlagert [245], trotzdem beträgt der Anteil der Landwirtschaft am Bruttoinlandsprodukt noch 3,8% (EU-Durchschnitt: 1,8%) und die landwirtschaftliche Nutzfläche 18,4 Mio. Hektar. 18% der beschäftigten zivilen Erwerbsbevölkerung sind in der Landwirtschaft beschäftigt (EU-Durchschnitt: 4,5%) [246].

60% des Einzugsgebiet der Oder, einem wichtigen polnischen Ostseezufluß mit einem Einzugsgebiet von 106.060 km² Größe werden landwirtschaftlich genutzt und stellen so potentielle Belastungsquellen für das aquatische Ökosystem dar [247]. Hiervon werden etwa 2/3 als Saatflächen genutzt, wobei mit einem Anteil von 70,9% verschiedene Getreidesorten (zusammen mit Körnermais) überwiegen [248].

Im Zuge der Osterweiterung und der Aufnahme Polens in die EU wird ein Aspekt auch die Umsetzung der EU-Trinkwasserverordnung und der Wasserrahmenrichtlinie in das Landesrecht sein. Die Frage nach der Atrazinbelastung ist daher von zentraler Bedeutung.

Die Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen sind in Abbildung 71 (Juni 1999) und Abbildung 72 (Mai 2000) gegenübergestellt. Hierbei wurden für die Farbcodierung folgende Grenzwerte berücksichtigt: 0,02 µg/L als Nachweisgrenze für Oberflächenwasser (nach Kapitel 3.1.2.2.), 0,1 µg/L als Grenzwert für die PSM-Einzelsubstanz, sowie 0,5 µg/L als Grenzwert für die Summenkonzentration an PSM nach der EU-Trinkwasserverordnung.

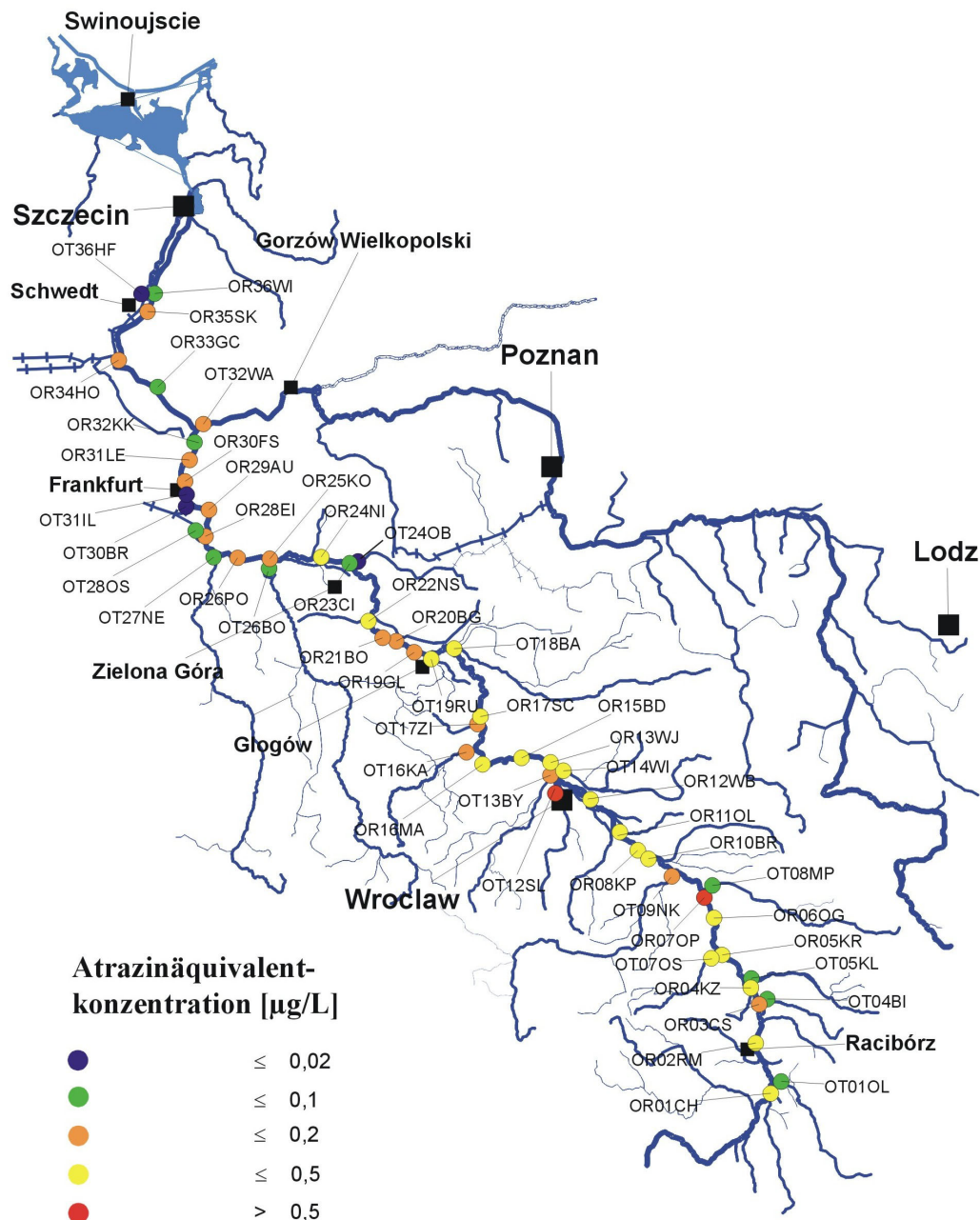


Abbildung 71: Belastungssituation des Oderflusssystems mit Triazinen (Juni 1999)

Die Daten geben Momentaufnahmen der kurzfristigen Belastung der Oder mit Atrazinäquivalenten während der Hauptapplikationsperiode wieder. Durch Validierung der Analysenmethode und der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die detektierte Inhibition hauptsächlich durch Atrazin hervorgerufen wird. Matrixbestandteile wie Huminstoffe spielen eine untergeordnete Rolle. Viele der ermittelten Konzentrationen bewegen sich im Arbeitsbereich der Methode für Oberflächenwasser ($0,1\text{--}3\mu\text{g/L}$) und besitzen von daher eine hohe Richtigkeit. Für Werte unterhalb der Quantifizierungsgrenze ($0,02\text{--}0,1\mu\text{g/L}$) kann eine Überschätzung der Ergebnisse (bis 60%) nicht ausgeschlossen werden.



Abbildung 72: Belastungssituation des Oderflusssystems mit Triazinen (Mai 2000)

Die Ergebnisse machen deutlich, dass Atrazin nicht nur in Polen verwendet wird, sondern zu einem beträchtlichen Teil über Tschechien eingetragen wird. Bereits an der tschechisch-polnischen Grenze bei Chalupki (OR01CH) werden $0,21\mu\text{g/L}$ (Juni 1999) und $0,31\mu\text{g/L}$ (Mai 2000) Atrazinäquivalente bestimmt. Da große Teile der landwirtschaftlich genutzten Saatflächen entlang der oberen Oder gelegen sind, wird in beiden Fällen die Maximalbelastung bei Opole ($0,54\mu\text{g/L}$ (Juni 1999) und $0,45\mu\text{g/L}$ (Mai 2000) gefunden.

Von den Odernebenflüssen war die Sleza bei beiden Probennahmen verhältnismäßig hoch belastet ($0,52\mu\text{g/L}$ (Juni 1999) und $0,76\mu\text{g/L}$ (Mai 2000)). Diese Werte liegen sogar über dem EU-Trinkwassergrenzwert für die Summe an PSM und Bioziden. Die Sleza ist ein Nebenfluß von 79km Länge der am gleichnamigen Ort kurz hinter Wroclaw in die Oder mündet. Dies deutet auf verstärkten Einsatz von Atrazin in der Landwirtschaft dieser Region hin. Die Einzugsfläche ist mit 970km^2 jedoch relativ klein ($<1\%$ des Odereinzugsgebietes) und der Abolutbetrag an eingetragenen Triazinen verhältnismäßig gering. Insofern sind weitergehende Untersuchungen nicht von höchster Priorität.

Vergleichbares gilt für die Osobloga (deutsch: Hotzenplotz), die im Mai 2000 mit $0,69\mu\text{g/L}$ Atrazinäquivalenten belastet war. Mit einer Länge von 65,5km und einem Einzugsgebiet von 993km^2 handelt es sich hierbei ebenfalls um einen kleineren Oderzufluß bei Krapkowice.

Besondere Beachtung verlangt jedoch die Barycz (deutsch: Bartsch), ein Nebenfluß der Oder vor Glogow. Diese erwies sich im ELISA hoch belastet mit Triazinen ($0,79\mu\text{g/L}$ (Mai 2000)). Die Barycz stellt mit einer Länge von 133km und einem Einzugsgebiet von 5535km^2 den drittgrößten Oderzufluß nach Warthe (54.529km^2) und Bober (5876km^2) dar. Besorgniserregend ist der Tatbestand, dass der Flusslauf der Barycz durch die Milicz-Teiche in Schlesien nahe Wroclaw verläuft. Milicz ist ein Ort mit 13000 Einwohnern. Die Milicz-Teiche gehören mit 77km^2 Größe zu den größten europäischen Fischteichen und zu den sieben Orten in Polen, die dem Schutz der „Ramsar Convention on Wetlands“ unterstellt sind. Nach Bird Life International ist dies eines der wichtigsten Vogelgebiete in Europa. Es ist unklar, ob die Triazinbelastung bereits nahe der Quelle der Barycz vorliegt. Da sich diese aber im Flussverlauf mit weiteren Flüssen vereinigt, ist eine höhere Belastung in des Naturschutzgebiets mit Triazinen nicht ausgeschlossen. Aufgrund der ökotoxikologischen Relevanz des Atrazins sollten hier weitergehende Untersuchungen erfolgen.

Die Belastung der mittleren und unteren Oder kommt vorrangig durch Verlagerung der Triazine aus der oberen Oder zustande. Durch Verdünnung verringert sich die Belastung kontinuierlich. Die Warthe ist nur geringfügig belastet. Ebenso verhält es sich mit dem Stettiner Haff. Es wurden keine Hinweise gewonnen, dass in der Bundesrepublik Deutschland illegal Atrazin oder andere verbotene Triazinherbizide eingesetzt werden. Dieses wurde nach dem Verbot des Atrazins Mitte der 90er Jahre von verschiedenen Autoren gefunden [195, 249].

Der Hauptflusslauf der Oder im Mai 2000 ist niedriger belastet als im Juni 1999, dafür sind jedoch die Nebenflüsse teilweise höher belastet. Das macht deutlich, dass die Applikation von Triazinen im Mai erst langsam beginnt und im Juni intensiviert wird.

Die Verwendung von PSM in den vergangenen 30 Jahren hat in Polen zum Entstehen tausender Tonnen von toxischen PSM-Abfällen geführt, was eine alarmierende Situation für Natur

und Mensch darstellt. Amador [250] berichtet über die Deposition verbotener oder abgelaufener PSM in wenig gesicherten Bunkern und Friedhöfen. Durch Leaching erfolgt erhebliche Kontamination der Umgebung. Obwohl die meisten PSM-Friedhöfe bis 1985 geschlossen wurden und der Betrieb dieser Anlagen mittlerweile verboten ist, werden mangels geeigneter Alternativen weiterhin PSM hier vergraben. Die Folge war eine Kontamination der umliegenden Wasserbrunnen und Seen [251]. Obwohl in den meisten Fällen eher „veraltete“ PSM wie Organochlorverbindungen (DDT, Methoxychlor, Lindan etc.) gefunden wurden, ist es denkbar, dass auch die „modernerer“ Triazinherbizide auf ähnliche Art und Weise einer unsauberen Entsorgung zugeführt wurden. Somit kam der Probennahme im Oktober 2000 auch die Bedeutung zu, zu prüfen, ob die im Juni 1999 und Mai 2000 gefundenen Kontaminationen durch kontinuierliches Leaching oder durch landwirtschaftliche Applikation zustande kommen. Da die Wasserproben der oberen Oder im Oktober 2000 nur schwach positiv waren, ist davon auszugehen, dass aktueller Einsatz von Triazinen in der landwirtschaftlichen Praxis den größten Anteil an der festgestellten Triazinbelastung ausmacht. Trotzdem kann das Problem des Leachings von Triazinen aus Bunkern nicht ausgeschlossen werden, da nur eine geringe Anzahl von Proben untersucht wurde.

Die gezeigten Ergebnisse bestätigen den Fund von Triazinherbiziden vorangegangener Probennahmen. J. Namiesnik et al. [252] untersuchten eine kleine Zahl von Proben der Oder im August 1997 und Mai 1998 mit GC/NPD und GC/ECD. Erstaunlicherweise wurde in 11 Proben vom August 1997 nur einmal Atrazin nachgewiesen und selbst dann nur in geringen Mengen ($0,005\mu\text{g/L}$). Vorrangig wurden Propazin und Terbutylazin gefunden. Besonders auffällig waren die Oderzuflüsse Olza mit $1,1\mu\text{g/L}$ Propazin und $0,54\mu\text{g/L}$ Terbutylazin, sowie Klopot mit $0,17\mu\text{g/L}$ Propazin und $1,8\mu\text{g/L}$ Terbutylazin. Im Mai 1998 wurden Atrazin, Propazin, Simazin, Terbutylazin und Prometryn nachgewiesen. Die höchste Triazin-Summenbelastung lag an der Bobr (OT26BO) mit $0,13\mu\text{g/L}$ Atrazin und $0,73\mu\text{g/L}$ Propazin vor. Diese Ergebnisse liegen im gleichen Größenordnungsbereich wie die durch ELISA nachgewiesenen Triazinkonzentrationen.

Herbizide gelangen also in das Oberflächenwasser und von da aus möglicherweise in das Grund-, Roh- bzw. Trinkwasser. Bei den Belastungsquellen handelt es sich um diffuse Einträge, insbesondere aus der Landwirtschaft, sowie um punktförmige Einträge. Punktförmig können Pestizide über industrielle Direkteinleiter und kommunale Kläranlagen in die Gewässer gelangen. In Kläranlagen gelangen Pestizide vor allem von befestigten Flächen und im ländlichen Gebiet von Hofabläufen, wenn diese an die Kanalisation angeschlossen sind. Trinkwasser wird in Deutschland zum überwiegenden Teil (ca. 73%) aus unterirdischem Quell- und Grundwasser gewonnen. Der Rest stammt aus Uferfiltrat und Oberflächengewässern, z.B. Talsperren [12].

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass der Triazineintrag in die Oder in den Applikationsmonaten der PSM recht hohe Werte erreichen kann. Punktuell wird der EU-Summengrenzwert für PSM und Biozide unterschritten. Daher sollte auch die Belastung von Grund- und Trinkwasser im Einzugsgebiet der Oder evaluiert werden. Da in der Polnischen Republik ein Teil des Trinkwassers aus Uferfiltrat gewonnen wird, sollte darauf besonderes Augenmerk gelegt werden. Der Schwerpunkt sollte dabei im Gebiet der oberen Oder liegen. Auch weitere PSM und Xenobiotika sollten im Rahmen eines Screenings untersucht werden. Alle ermittelten Triazinäquivalente lagen deutlich unter dem WHO-Grenzwert von $2\mu\text{g/L}$.

4.1.3. Leistungsfähigkeit der Immunfiltration

Die Leistungsfähigkeit der Immunfiltration wurde durch direkten Vergleich mit einem konventionellen Mikrotiterplatten-ELISA auf der Basis des identischen Antikörper-Tracer-Systems beurteilt. Die Ergebnisse wurden im wesentlichen durch den konventionellen ELISA bestätigt. Wiederholungsmessungen einer Auswahl einiger Proben durch die Immunfiltration im Labor führten zu einer weiteren Verbesserung der Übereinstimmung zwischen konventionellem Immunoassay und Immunfiltration. Es wird daher vermutet, dass kritische Punkte für die Leistungsfähigkeit des Schnelltests Auswirkungen der Feldbedingungen und Unerfahrenheit des Personals sind. Beispielsweise wurde festgestellt, dass direkte Sonneneinstrahlung trotz der kurzen Inkubationszeiten einen großen Einfluß auf die Leistungsfähigkeit des Tests hat. Die Tests sollten daher entweder im Schatten oder während der Farbentwicklung in der mitgelieferten Schachtel des Kits gelagert werden. Außerdem wird die Farbentwicklung von verschiedenen Personen als unterschiedlich intensiv empfunden und unterliegt damit einer gewissen Subjektivität. Diese wird noch verstärkt, wenn stark gefärbte Schwebstoffe oder Partikel in den Wasserproben die Membran farblich verändern und so über Verdunkelung niedrigere Atrazingehalte vortäuschen.

Selbst unter den vorliegenden Feldbedingungen stellt der Immunfiltrations-Schnelltest eine robuste und zuverlässige Methode dar. Der Schnelltest kann daher besonders für Anwendungen seine Nische finden, wo eine sehr schnelle Evaluierung einer großen Probenzahl durchzuführen ist und für eine semi-quantitative Aussage über den Triazinäquivalentgehalt der Probe ausreicht. Ferner kann sich der Test als sinnvoll erweisen, um bei einer Vorort-Untersuchung eine schnelle Entscheidung über eine Auswahl von potentiell belasteten Proben zu treffen. Negative Befunde können dann ausgesondert und gleichzeitig das Probennahmenetz an unzulässig hohen Kontaminationsquellen verdichtet werden.

Das Ergebnis verdeutlicht, dass der Operator über ein gewisses Maß an Training verfügen muß, um zuverlässige Ergebnisse mit dem SensioScreen TR 500 zu erhalten. Das Schnelltestkit muß durch ausführliche Arbeitsanweisungen ergänzt werden. Positive Proben müssen im Labor durch die Anwendung einer konventionellen Analytik überprüft werden.

4.2. Analytik Huminstoff-gebundener Triazinherbizide

Die Untersuchung „gebundener“ Triazine unterscheidet sich beträchtlich von der bislang betrachteten Analytik „freier“ Triazine. Entscheidender Grund ist das Fehlen von Standardsubstanzen zum Kalibrieren der Analysenmethode. Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Darstellung synthetischer Modellsubstanzen für gebundene Triazinrückstände. Diese neuartigen Standardmaterialien wurden anschließend eingesetzt, um die analytische Leistungsfähigkeit der Enzymimmunoassays zu bewerten.

4.2.1. Bewertung der „Inkubationsstrategie“

Die Aufarbeitung der Inkubationslösungen durch Festphasenextraktion trennte frei in Lösung vorliegende überschüssige Triazine von den Huminstoffen. Das Trennverfahren führte zu einer wässrigen Durchlaufung, die neben den Huminstoffen die nicht-extrahierbaren Triazine enthielt. Die Quantifizierung der nicht-extrahierbaren Rückstände erfolgte mit verschiedenen Immunoassays. Das Bewertungsschema für die Ergebnisse ist in Abbildung 73 skizziert.

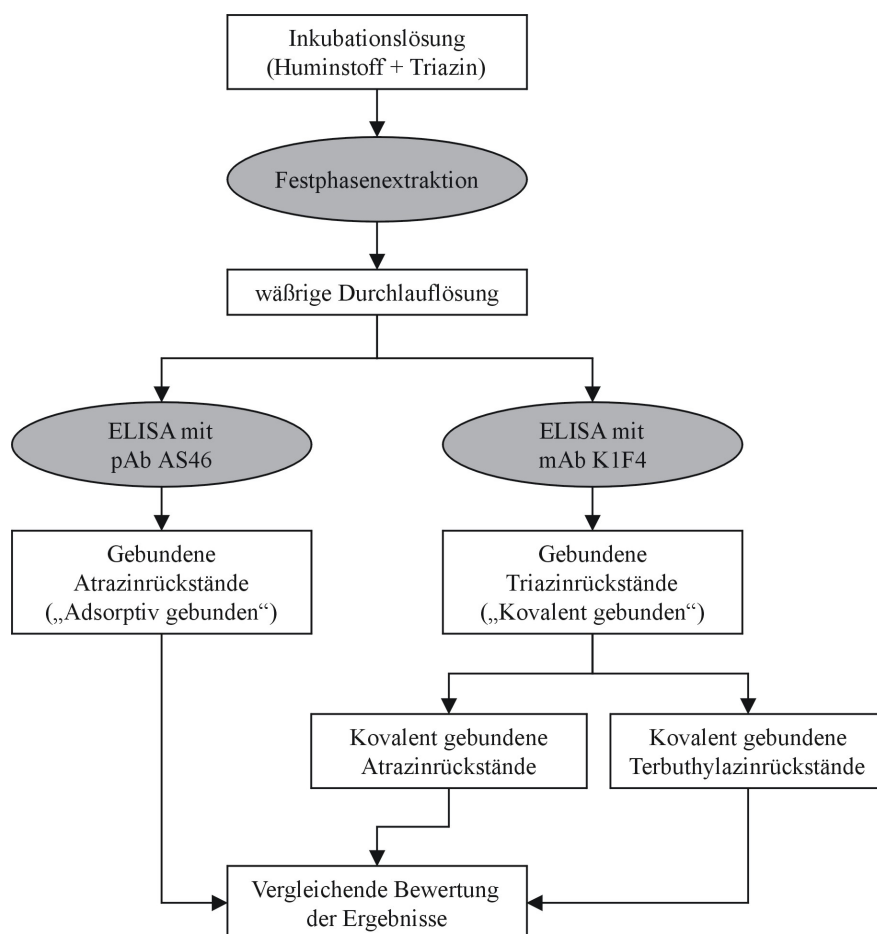


Abbildung 73: Bewertungsschema der „Inkubationsstrategie“

4.2.1.1. Berechnung der gebundenen Triazinrückstände

Die Analyse der gebundenen Rückstände durch Enzymimmunoassay wurde durch Huminstoffe gestört. In den relevanten Konzentrationen traten hohe Kreuzreaktionen mit den Antikörpern auf. Zur Ermittlung der nicht-extrahierbaren Rückstände wurden daher die in wäßrigen Durchlaufösungen ermittelten Triazinkonzentrationen mit den entsprechenden Kontrollhuminstoffen korrespondierender Konzentration verglichen und auftretende Störeffekte der Huminstoffe vom ermittelten Wert subtrahiert. Die Berechnung gebundener Triazinrückstände BR_I erfolgte nach folgender Gleichung:

$$BR_I = \frac{c_{\text{geb.Triazin}}}{c_{\text{DOC}}} = \frac{[(c_{\text{Triazin}} - c_{\text{Kontrolle}}) * F_{\text{Verdünnung}}]}{(W_{\text{Huminstoff}} * 300 \frac{\text{mg}}{\text{L}})} * 1000 \left[\frac{\text{ng Triazin}}{\text{mg DOC}} \right] \quad (\text{Gleichung 25})$$

mit:

BR_I :	Gebundene Triazinrückstände nach „Inkubationsstrategie“ [ng/mg]
$c_{\text{geb. Triazin}}$:	Gebundene Triazinrückstände; gemessen mit K1F4 im wäßrigen Durchlauf [ng/L] $(= (c_{\text{Triazin}} - c_{\text{Kontrolle}}) * F_{\text{Verdünnung}} * 1000)$
c_{DOC} :	Huminstoffkonzentration im wäßrigen Durchlauf [mg/L DOC] $(= W_{\text{Huminstoff}} * 300 \text{ mg/L})$
c_{Triazin} :	Triazinkonzentration; gemessen mit K1F4 im wäßrigen Durchlauf [$\mu\text{g/L}$]
$c_{\text{Kontrolle}}$:	Störeffekt des Huminstoffs; gemessen mit K1F4 im wäßrigen Durchlauf der Kontrollösung, ausgedrückt in Triazinäquivalenten [$\mu\text{g/L}$]
$F_{\text{Verdünnung}}$:	Verdünnungsfaktor; Verdünnung des wäßrigen Durchlaufs: Für 1:10-Verdünnung des wäßrigen Durchlaufs: $F=10$ Für 1:5-Verdünnung des wäßrigen Durchlaufs: $F=5$ Für unverdünnten wäßrigen Durchlauf: $F=1$
$W_{\text{Huminstoff}}$:	Huminstoffwiederfindung im wäßrigen Durchlauf [%] (Kapitel 3.3.1.3.): Für natürliche Huminstoffe (HO13FA/HO13HA): $W = 88,39 \pm 1,16\%$ Für synthetische Fulvinsäure FS101: $W = 91,18 \pm 0,56\%$ Für synthetische Huminsäure HS100: $W = 91,76 \pm 1,41\%$

4.2.1.2. Berechnung der gebundenen Atrazinrückstände

Bei der Untersuchung der erhaltenen Inkubationslösungen konnte im Falle des pAb AS46 nur in den unverdünnten wässrigen Durchlaufösungen auswertbares Datenmaterial gewonnen werden. Um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurden nur die Werte aus den unverdünnten Durchlaufösungen weiter ausgewertet. Die Menge an gebundenem Atrazin wurde nach der oben genannten Formel berechnet. Diese Daten ergaben sich aus der Differenz der Atrazinkonzentrationen, die in den Probenlösungen gemessen wurden und denen der Kontrollösungen, sofern ein Matrixeffekt oberhalb der Quantifizierungsgrenze des Antikörper AS46 aufgetreten ist. Diese wurden in BR_I , d.h. in Absolutmengen an gebundenem Atrazin je

Gewichtseinheit gelöstem organischem Kohlenstoff umgerechnet. Die in Abbildung 74 präsentierte graphische Darstellung der gebundenen Absolutmengen an Atrazin zeigt, daß bei der Hohlohseehuminsäure (HO13HA) vergleichsweise hohe Atrazinmengen detektiert werden, während die Werte der drei weiteren ROS vergleichbar sind.

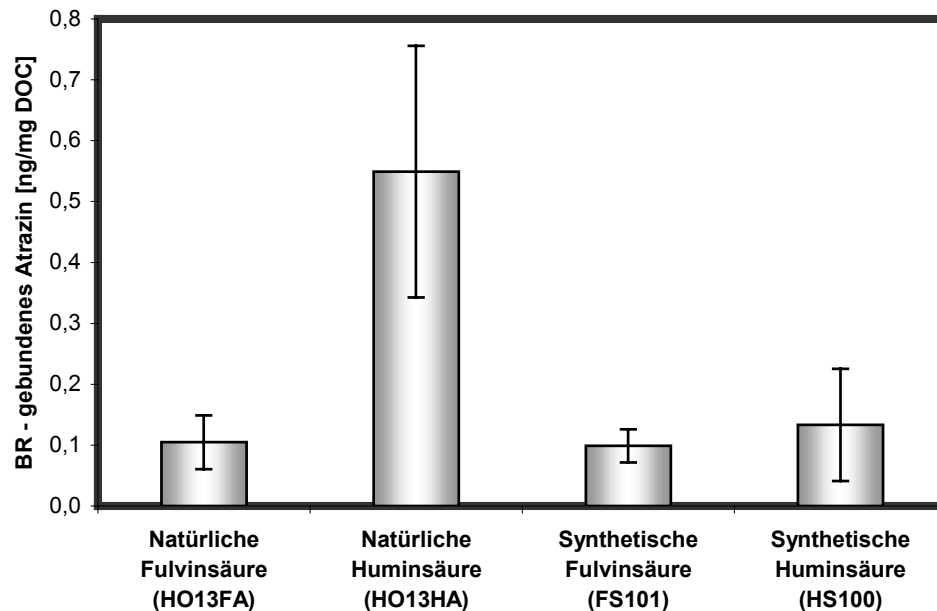


Abbildung 74: Nicht-extrahierbare Atrazinrückständen in verschiedenen Huminstoffen nach Analyse mit pAb AS46 (Fehlerbalken geben das Vertrauenintervall für $P=95\%$; $f=8$ wieder)

Die Validierung der Festphasenextraktion hat ergeben, daß unter den gegebenen Bedingungen kein Atrazin aus der Inkubationslösung in die wäßrige Phase mitgerissen wird, d.h. dass wirklich gebundene Rückstände vorliegen.

Der mAb K1F4 ist ein Antikörper, der zum sensitiven Nachweis von Atrazin befähigt ist. Untersucht man mit ihm die gleichen Lösungen aus den Inkubationsversuchen, so lagen einige Messwerte unverdünnter Proben teilweise über der oberen Nachweisgrenze ($10\mu\text{g/L}$). Die Lösungen wurden daher 1:5 verdünnt und diese Daten gegenübergestellt, da sich diese im Arbeitsbereich des ELISAs bewegen (Tabelle 50).

Tabelle 50: Gebundene Atrazinrückstände BR_I , ermittelt durch Enzymimmunoassay mit dem Antikörper K1F4 (Angaben der Vertrauensintervalle für das $P=95\%$ -Niveau der t -Verteilung; $f=8$)

Huminstoff-Fraktion	Gebundene Rückstände BR_I [ng/mg DOC]
Natürliche Fulvinsäure (HO13FA)	$4,2 \pm 9,3$
Natürliche Huminsäure (HO13HA)	$6,6 \pm 6,8$
Synthetische Fulvinsäure (FS101)	$22,9 \pm 6,3$
Synthetische Huminsäure (HS100)	$22,3 \pm 8,7$

Die Synthese-Huminstoffe binden deutlich höhere Mengen an Atrazin als die natürlichen Hohlohseehuminstoffe. So bindet das FS101 etwa 6,9% des insgesamt eingesetzten Materials als gebundenen Rückstand, das HO13FA hingegen nur etwa 1,3%. Die jeweils korrespondierenden Fulvinsäure- und Huminsäurefraktionen weisen keinen nachweisbaren signifikanten Unterschied in den detektierten gebundenen Rückständen auf. Bei den natürlichen Huminstoffen könnte ein solcher Effekt vorliegen (6,6ng Atrazin / mg DOC verglichen mit 4,2ng Atrazin / mg DOC bei Fulvinsäuren), er ist jedoch so wenig ausgeprägt, daß zusätzliche Messungen nötig sind, um diese Aussage statistisch abzusichern.

Die berechneten Werte stehen anscheinend im Widerspruch zueinander, da die mit pAb AS46 detektierten Atrazinmengen, verglichen mit denen, die bei der K1F4-Untersuchung ermittelt wurden, deutlich geringer sind. Die Diskrepanz kann damit erklärt werden, daß nur noch geringe Mengen an Atrazin in ihrer ursprünglichen Form vorliegen und der übrige Teil zu einer strukturell modifizierten Form umgewandelt wurde, die nicht mehr dem Erkennungsmuster des Antikörpers AS46 entspricht, sehr wohl jedoch dem des K1F4. Eine derartige Veränderung der Struktur tritt beispielsweise bei der kovalenten Bindung des Atrazins an den Huminstoff auf. Es wird angenommen, daß Huminstoffe, die kovalent gebundenes Atrazin aufweisen, eine ähnliche Struktur haben wie das Immunkonjugat, mit dem der Antikörper K1F4 hergestellt wurde. Das Besondere am mAb K1F4 war im Vergleich zu dem AS46 die deutlich abweichende Immunogenstruktur. Während der pAb AS46 aus der Immunisierung mit einem Atrazinaminocapronsäure-Derivat **18** hervorgegangen sind, wurde der mAb K1F4 durch A-metrynsulfoxid-Konjugate **19** hergestellt (Abbildung 75).

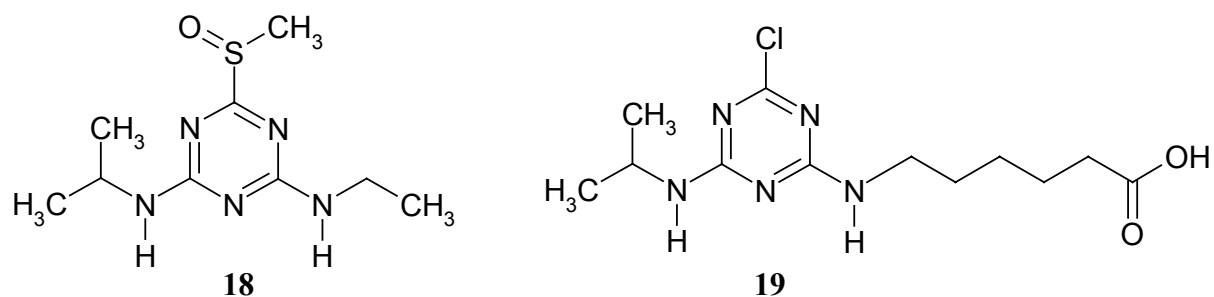


Abbildung 75: Haptenstrukturen (Ametrynsulfoxid **18** und Atrazinaminocapronsäure **19**)

Wenn die kovalente Bindung über die Substitution des Chloratoms erfolgt, enthält das kovalent gebundene Atrazin weiterhin Strukturen, die dem Erkennungsmuster des Antikörpers K1F4 entsprechen, während der Antikörper AS46 nicht mehr in der Lage ist, diese strukturell modifizierte Form zu erkennen. Diese These wurde bereits von A. Dankwardt et al. aufgestellt und eingehend untersucht [74, 89]. Beim pAb AS46 bleibt das Chloratom am Hapten unsubstituiert und ist dadurch essentiell für eine Erkennung des Atrazins. Man kann daher vermuten, daß die Bindung des Atrazins an die Huminstoffe über eine Substitution des Chloratoms erfolgt und die entstehenden Strukturen durch K1F4 erkannt werden.

Es läßt sich nicht abschließend aussagen, ob die mit Antikörper AS46 gemessenen Werte von an die Huminstoffe adsorptiv angelagertem Atrazin herrühren oder ob sie durch Kreuzreaktion mit dem strukturell veränderten Atrazin zustande kommen. Es wird jedoch angenommen, daß es sich bei den mit Antikörper AS46 gemessenem Atrazin um adsorptiv gebundenes Material handelt. Wäre die mit dem Antikörper AS46 gemessene Atrazinkonzentration auf Kreuzreaktivitäten mit strukturell modifiziertem Atrazin zurückzuführen, müßte der AS46 wie der K1F4 proportionale Atrazinmengen an den Huminstoffen detektieren. Dieser Effekt wird jedoch nicht beobachtet; Die mit Antikörper AS46 gemessenen Atrazinwerte bei der natürlichen Huminsäure HO13HA liegen, verglichen mit jenen von den Synthesehuminstoffen, deutlich höher. Die Hohlohseehuminsäure HO13HA adsorbiert danach signifikant höhere Mengen an Atrazin als ihre korrespondierende Fulvinsäure und als die synthetischen Huminstoff-Fractionen. Dies könnte mit einer größeren spezifischen Oberfläche der HO13HA im Vergleich mit den Fulvinsäuren HO13FA und FS101 sowie der Huminsäure HS100 zusammenhängen.

Ferner ist denkbar, daß das hohe Bindungsvermögen der HO13HA auf ihren Heteroatomgehalt zurückzuführen ist, der beispielsweise mit 2,16 Gew.-% Stickstoff deutlich höher liegt als bei den übrigen Fraktionen. (HO13FA: 0,68%; HS100/FS101: 0%) Unter Umständen wirkt sich hier das freie Elektronenpaar der Stickstoffatome positiv auf das Adsorptionspotential der Huminsäuren aus. Vergleichbare Effekte ließen sich beim Komplexierungsvermögen der Huminstoffe gegenüber Schwermetallionen beobachten, der mit dem Stickstoffgehalt korrelierbar ist [115]. Insgesamt ist die mit AS46 detektierte Beladung jedoch gering. An HO13HA binden beispielsweise nur etwa 0,1% des insgesamt eingesetzten Materials.

Aus der Größe der Unterschieds zwischen der Messung mit AS46 und der mit K1F4 kann man daher schließen, daß die Fähigkeit der Huminstoffe zur kovalenten Bindung von Atrazin um zwei Größenordnungen höher ist als die zur adsorptiven Bindung.

4.2.1.3. Berechnung der gebundenen Terbutylazinrückstände

Die gebundenen Rückstände BR_I wurden nach Gleichung (25) für die Inkubationslösungen mit Terbutylazin berechnet (Tabelle 51).

Tabelle 51: Gebundene Terbutylazinrückstände BR_I ; ermittelt durch Enzymimmunoassay mit dem Antikörper K1F4 (Angaben der Vertrauensintervalle für das $P=95\%$ -Niveau der t -Verteilung; $f=8$)

Huminstoff-Fraktion	Gebundene Rückstände BR_I [ng/mg DOC]
Natürliche Fulvinsäure (HO13FA)	$1,4 \pm 1,8$
Natürliche Huminsäure (HO13HA)	$2,9 \pm 2,3$
Synthetische Fulvinsäure (FS101)	$4,1 \pm 1,5$
Synthetische Huminsäure (HS100)	$3,5 \pm 4,3$

Bei den Ergebnisse der Terbutylazin-Inkubationslösungen fallen die hohen Schwankungsbreiten auf. Oberflächlich betrachtet lassen sich die Tendenzen, die beim Atrazin beobachtet wurden, auch hier wiederfinden. Die Werte lassen vermuten, dass HO13HA mehr Terbutylazin als HO13FA bindet, und die Synthesuminstoffe binden möglicherweise mehr Terbutylazin als die natürlichen ROS-Fractionen. Die gemessenen Mengenunterschiede sind jedoch gering und auf einem Signifikanzniveau von 95% nicht signifikant.

4.2.1.4. Zusammenführung der Ergebnisse

Zur weiteren Bewertung der Inkubationsversuche sind die ermittelten Quantitätsunterschiede kovalent gebundener Schadstoffrückstände, die durch mAb K1F4 bestimmt wurden, in Abbildung 76 für alle untersuchten Systeme einander gegenübergestellt.

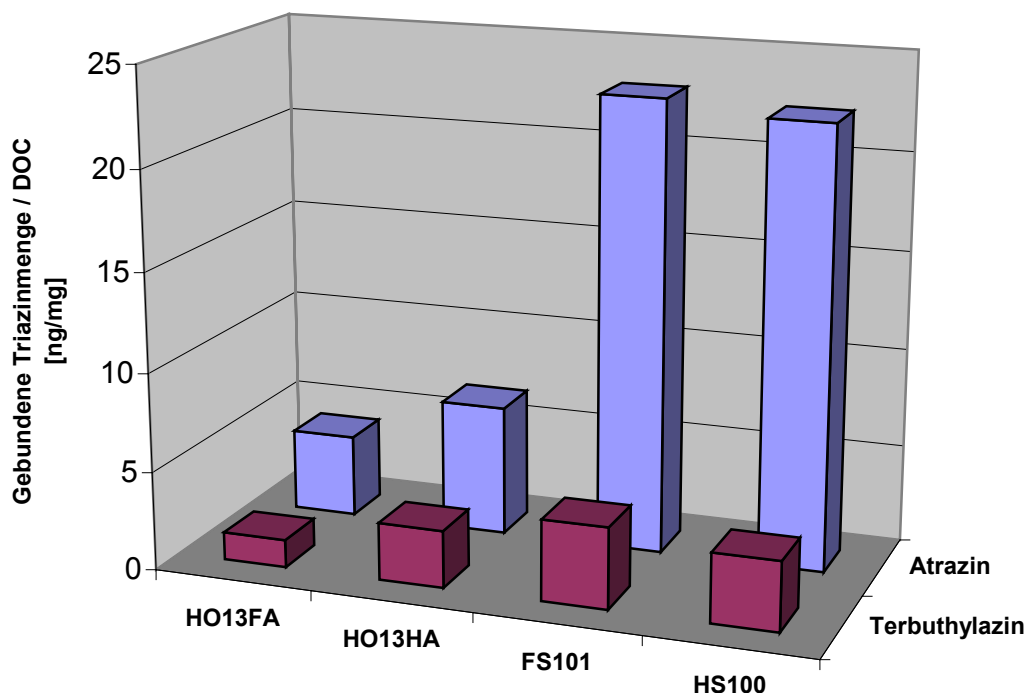


Abbildung 76: Ermittelte Bindungskapazitäten nicht-extrahierbarer Triazine

Grundsätzlich gilt, dass der mAb K1F4 bei allen untersuchten ROS-Materialien mehr nicht-extrahierbare Rückstände an Atrazin als an Terbuthylazin detektiert. Terbuthylazin ist aufgrund seiner zusätzlichen Methylgruppe an der Alkylaminofunktion unpolarer als Atrazin. Durch die gesteigerte Lipophilie wird seine Affinität zu den verhältnismäßig polaren Huminstoffen gesenkt und dadurch auch sein Potential zur Wechselwirkung mit den ROS. Unter Umständen wird deshalb Terbuthylazin in einem geringeren Ausmaß an die Huminstoffe gebunden als Atrazin.

Es ist aber auch vorstellbar, daß bei Terbuthylazinrückständen eine geringere Nachweisfähigkeit bzw. Kreuzreaktion des Antikörpers K1F4 vorliegt. Es müßte daher geprüft werden, ob die gleichen Mengen an Triazin auf den Huminstoffen mit der gleichen Präzision detektiert werden können wie bei freien Molekülen. Durchaus vorstellbar ist, daß der Antikörper K1F4 ein geringeres Potential zur Detektion von gebundenem Terbuthylazin aufweist wie zur Detektion von gebundenem Atrazin. Dies hätte jedoch den Umfang der Arbeit gesprengt, da hierzu ein zweites Verfahren zur Validierung des ELISAs notwendig gewesen wäre, das gebundene Rückstände in diesen geringen Probenmengen quantitativ bestimmen kann. Ein solches Verfahren ist bislang nicht entwickelt worden. Daher kann der Vergleich der Triazinbelastungen nur unter Vorbehalt erfolgen.

Im Vergleich mit den untersuchten natürlichen Huminstoffen weisen die synthetischen Huminstoffsysteme ein signifikant höheres Bindungspotential für kovalent gebundene Atrazinrückstände auf. Sie sind zur Bildung der 4-5fachen Menge an mit mAb K1F4 detektierbaren

gebundenen Rückständen befähigt. Der synthetisch dargestellte Huminstoff vermag offenbar die strukturellen Bedingungen im höherem Maße zu erfüllen, welche nötig sind, um die Bindung von Xenobiotika zu vollziehen. Möglicherweise spielt dabei ein höherer Gehalt an nukleophilen phenolischen Gruppen bei HS100 und FS101 die entscheidende Rolle. Dies muß jedoch offen bleiben, bis entsprechende Strukturinformationen der Synthese-ROS und den Hohlohseehuminstoffen vorliegen. Da die gewählten synthetischen Huminstoffe frei von Stickstoff sind, können Amin-Funktionen bei der Bildung kovalent gebundener Triazinrückstände nicht ausschließlich maßgebend sein. Diese könnten sich allerdings auf die Bildung adsorptiv gebundener Rückstände auswirken.

4.2.2. Bewertung der „Direktpolymerisationsstrategie“

Nach dem Prinzip der Direktpolymerisation wurden Modellschubstanzen für gebundene Rückstände in wässriger Lösung synthetisiert, die Atrazin (HS100A) bzw. Terbutylazin (HS100T) enthält. Diese wurden in destilliertem Wasser aufgelöst, mit verdünnter Natronlauge auf pH 7 eingestellt und mit unterschiedlichen Immunoassays untersucht. Die Verhältnisse sind schematisch in Abbildung 77 dargestellt.



Abbildung 77: Bewertungsschema für die durch Direktpolymerisation erhaltenen gebundenen Rückstände

4.2.2.1. Quantifizierung der gebundenen Rückstände durch Elementaranalyse

Die CHN-Elementaranalyse der Modellschubstanzen wies signifikante Mengen an Stickstoff im Polymer nach (Kapitel 3.3.2.2.). Da Hydrochinon und die wässrige Natriumcarbonat-Lösung keinen Stickstoff enthalten, kommt dafür lediglich das Triazin in Frage. Rechnet man die N-Gehalte auf die Triazine hoch, so lässt sich abschätzen, in welchen Mengen Atrazin bzw. Terbutylazin in das Polymer eingebaut wurde.

Es ergeben sich für die Modellschubstanz HS100A $BR_{D,CHN}=0,80$ Gew.-% gebundenes Atrazin, sowie für HS100T $BR_{D,CHN}=1,28$ Gew.-% Terbutylazin. Diese Rechnung vernachlässigt strukturelle Modifikationen, die Einfluß auf Molekulargewichte haben und ist als Näherung

zu verstehen. Ein Ergebnis dieser Untersuchungen ist daher bereits, dass synthetische Modellsubstanzen so konzipiert werden können, dass sie keine Stickstoff enthaltenden funktionelle Gruppen besitzen und zur einfachen Berechnung der Gehalte gebundener Rückstände nach Elementaranalyse herangezogen werden können. Bei natürlichen Huminstoffen, die häufig einen beträchtlichen Anteil an stickstoffhaltigen Verbindungen wie z.B. Aminosäuren eingebunden haben, sind der Stickstoffuntergrund respektive das Signal-Rausch-Verhältnis höher und dadurch eine derartige Rechnung mit großen Fehlern behaftet.

4.2.2.2. Berechnung gebundener Rückstände durch Enzymimmunoassay

Die gebundenen Triazinrückstände wurden mit verschiedenen kompetitiven ELISAs bestimmt. Aus den detektierten Signalen lassen sich die gebundenen Triazinrückstände je DOC-Einheit Modellhuminstoff (BR) berechnen nach:

$$BR_{D,ELISA} = \frac{HS_{geb} - HS_{Kontrolle}}{MS} \quad (Gleichung 26)$$

mit:

BR _{D, ELISA} :	„Bound residues“: gebundene Triazinrückstände [ng Triazinäquivalentkonzentration / mg DOC]
HS _{geb} :	Messsignal der beladenen Modellschubstanz [µg/L TEC]
HS _{Kontrolle} :	Messsignal der Kontrolle („Huminstoff-Störeffekte“) [µg/L TEC]
MS:	Konzentration der Modellschubstanz [mg DOC]

In Kapitel 3.3.2.3.2. sind die ELISA-Ergebnisse der Modellschubstanzen HS100A und HS100T mit den ELISAs auf der Basis des pAb AS46 sowie mAb K4E7 dargestellt. Mit Gleichung (26) wurden die gebundenen Triazinrückstände berechnet und in Abbildung 78 und Abbildung 79 dargestellt. Sie geben die Ergebnisse für das rein rechnerische Verfahren ohne Inhibition mit BSA wieder.

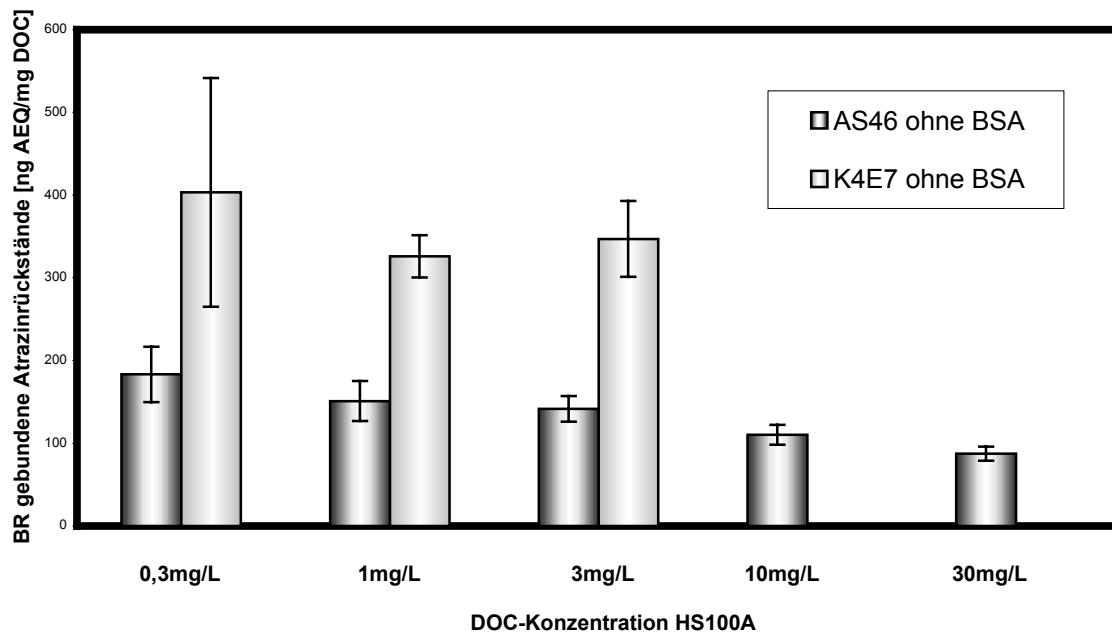


Abbildung 78: Gebundene Atrazinrückstände HS100A mit pAb AS46 und mAb K4E7 (Angaben der Vertrauensbereiche der t -Verteilung für $P=95\%$; $f=3$)

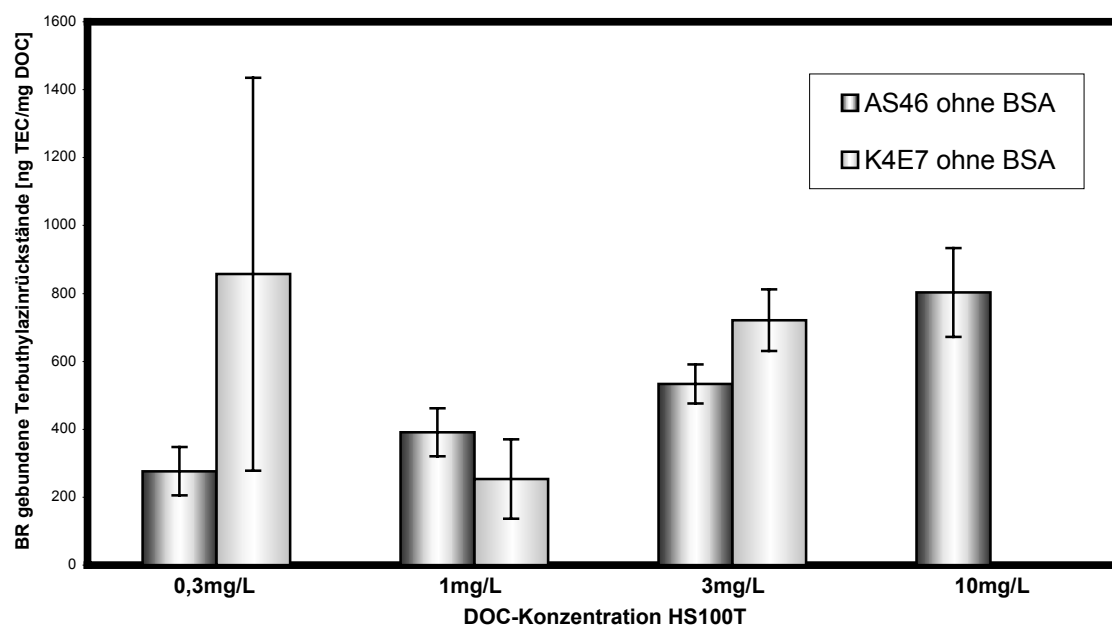


Abbildung 79: Gebundene Terbuthylazinrückstände HS100T mit pAb AS46 und mAb K4E7 (Angaben der Vertrauensbereiche der t -Verteilung für $P=95\%$; $f=3$)

Die berechneten Werte sind in den unterschiedlichen Konzentrationen starken Schwankungen unterworfen. In den unterschiedlichen Verdünnungen werden teilweise signifikant abweichende BR-Werte beobachtet. Auch werden durch die unterschiedlichen Antikörper differie-

rende Quantitäten an gebundenen Rückständen detektiert. Aus den Messwerten lässt sich kein eindeutiger Trend ablesen. Die vorliegenden Schwankungen müssen grundsätzlich einer Problematik zugeschrieben werden, die diesen Substanzen innewohnt.

Dieses rechnerische Verfahren zur Diskriminierung unspezifischer Bindung von Huminstoffen durch Differenzbildung wurde ergänzt durch ein zweites Verfahren mit der experimentellen Inhibition der unspezifischen Signale durch Serumalbumin als Blockierungsreagenz (Kapitel 3.3.2.3.3.). Die Untersuchung der Modellschubstanzen HS100A und HS100T mit verschiedenen kompetitiven ELISAs führte zu den in Abbildung 80 und Abbildung 81 dargestellten, in $BR_{D,ELISA}$ umgerechneten Ergebnissen.

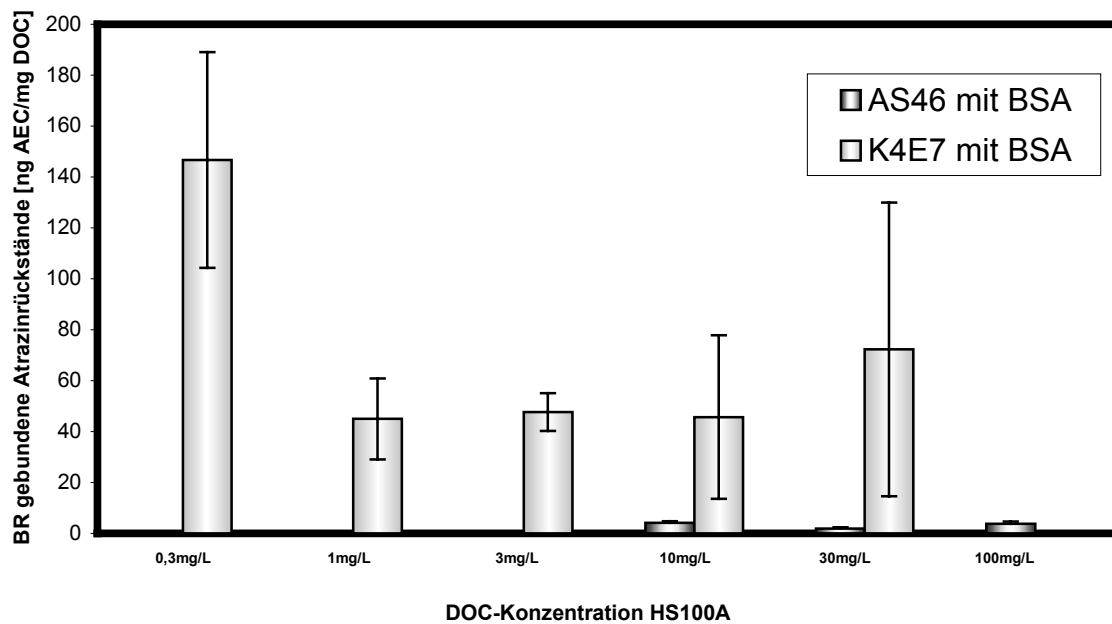


Abbildung 80: Gebundene Atrazinrückstände HS100A mit pAb AS46 und mAb K4E7 (Enzymtracer versetzt mit 1% (w/v) BSA; Angaben der Vertrauensbereiche der t -Verteilung für $P=95\%$; $f=3$)

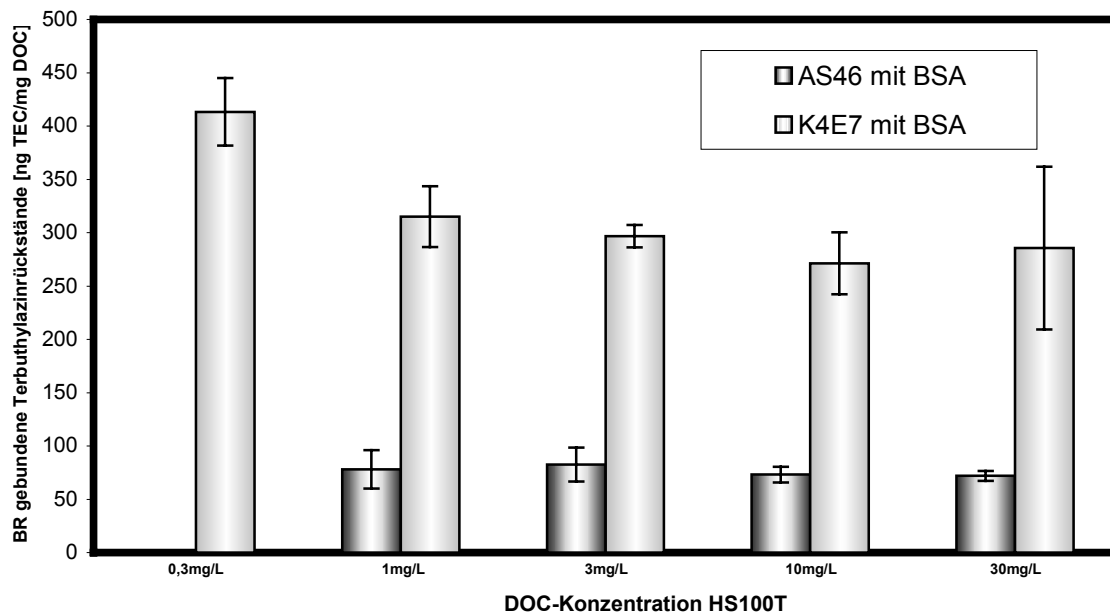


Abbildung 81: Gebundene Terbutylazinrückstände HS100T mit pAb AS46 und mAb K4E7 (Enzymtracer versetzt mit 1% (w/v) BSA; Angaben der Vertrauensbereiche der *t*-Verteilung für $P=95\%$; $f=3$)

Die beiden Immunglobuline (K4E7 und AS46) detektieren in einem erheblichen Maße unterschiedliche Mengen BR. Das Antiserum erkennt selbst bei höheren Konzentrationen des HS100A kaum BR. Das ist ein nicht erwartetes Ergebnis, da beide Antikörper durch Immunisierung mit ähnlichen Immunogenen gewonnen wurden. Außerdem führt die Zugabe des Serumalbumins zu einer erheblichen Reduktion der detektierbaren BR.

Der mAb K1F4 erkennt hingegen signifikant mehr gebundene Rückstände als die Antikörper AS46 und K4E7, wie Abbildung 82 zeigt.

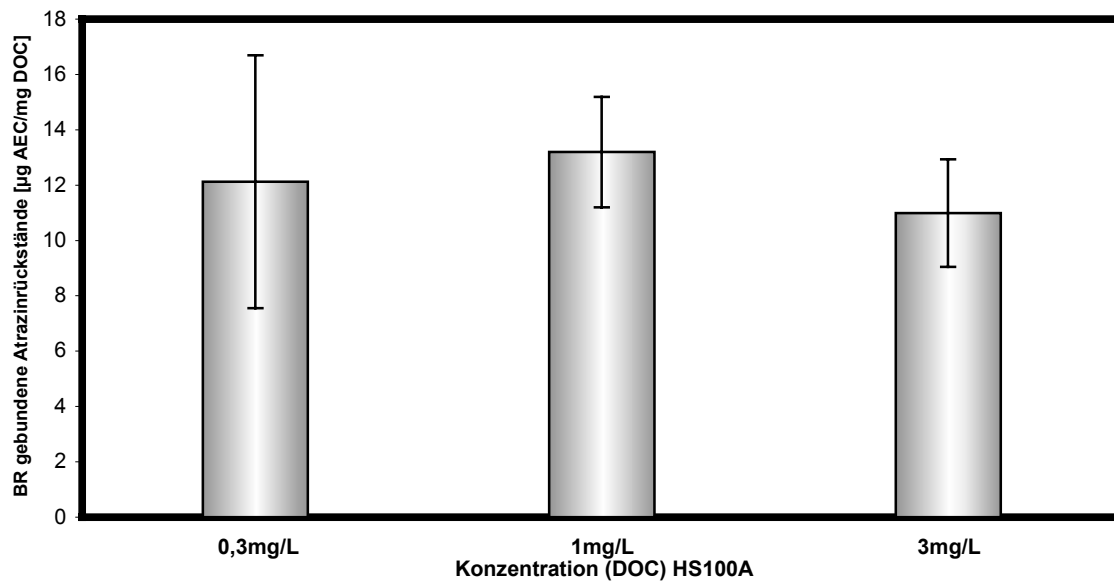


Abbildung 82: Gebundene Atrazinrückstände mit mAb K1F4 (Enzymtracer versetzt mit 1% (w/v) BSA; Angaben der Vertrauensbereiche der t-Verteilung für $P=95\%$; $f=2$)

Angeichts der großen Schwankungsbreiten, die bei diesen Messungen auftreten, erschien es ratsam, den Median als Durchschnittswert für BR anzugeben, da dieser weniger anfällig für Ausreißer ist. Die Tabelle 52 faßt die danach geordneten Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen zusammen.

Tabelle 52: HS100A-BR und HS100T-BR bestimmt durch ELISA

Antikörper:		pAb AS46	mAb K4E7	pAb AS46	mAb K4E7	mAb K1F4
BSA-Inhibition:		Nein	Nein	Ja	Ja	Ja
HS100A	Median BR [ng/mg]	142	347	4	48	12100
	Spannweite:	87,5 - 183,3	326,0 - 403,3	1,9 - 4,2	45,0 - 146,7	11000-13200
HS100T	Median BR [ng/mg]	463	721	76	297	n.b.
	Spannweite:	276,7 - 803,1	254,0 - 856,7	71,9 - 82,7	271,3 - 413,3	n.b.

Abhängig vom eingesetzten Antikörper und Verfahren wurden unterschiedliche Quantitäten zwischen 4 und 12100ng/mg DOC an gebundenen Rückständen bestimmt. Die detektierte Menge variiert also sehr stark. Dieses Ergebnis unterstreicht die Vermutung, dass bei der Polymerreaktion eine strukturelle Veränderung des Atrazins bzw. Terbutylazins stattgefunden

haben dürfte. Unveränderte Analyten hätten ähnliches Verhalten zeigen müssen wie die mitgeführten Standardreihen. Allgemein wird beim rein rechnerischen Verfahren deutlich mehr BR bestimmt als bei dem BSA-Inhibitionsverfahren.

4.2.2.3. Zusammenführung der Ergebnisse

Die „Direktpolymerisation“ stellt ein einfaches und schnelles Verfahren zur Darstellung einer Modellsubstanz mit gebundenen Triazinrückständen dar. Es wurde mit Hydrochinon eine diskrete organische Substanz in einem alkalischen, oxidativen Medium in Gegenwart von Triazinen zu Makromolekülen polymerisiert. Der Ansatz erlaubte die Darstellung eines Materials mit hohem Beladungsgrad. Die einpolymerisierten Triazinmengen konnten unter Nutzung der Elementaranalyse bestimmt werden, da die synthetischen Modelle bei Abwesenheit von Triazinen keinen Stickstoff enthalten. Sie lagen bei 8 µg/mg „Atrazin“ im HS100A, sowie 12 µg/mg „Terbuthylazin“ im HS100T.

Die Analyse mit verschiedenen Enzymimmunoassays stellt neben der Elementaranalyse eine zweite quantitative Analysenmethode dar. Ähnlich wie bei der „Inkubationsstrategie“ werden die vorliegenden gebundenen Strukturen beim Modellhuminstoff HS100A durch den mAb K1F4 signifikant besser erkannt als durch K4E7 und AS46. Daher können auch hier ähnliche Strukturen wie beim Immunogen des K1F4 angenommen werden. Es liegt nahe, dass die Triazine durch nukleophile Substitution des Chloratoms an das Huminstoffgerüst gebunden werden. Das verringerte Erkennungsvermögen von pAb AS46 und mAb K4E7 kann mit einer bedeutend geringeren Kreuzreaktion mit den vorliegenden chlor-substituierten Strukturen erklärt werden. Beim HS100A wie auch beim HS100T erkennt der mAb K4E7 die nicht-extrahierbaren Rückstände geringfügig besser als der pAb AS46. Das macht den Charakter des K4E7 als eher gruppenspezifischen Antikörper im Vergleich mit dem pAb AS46 deutlich. Letzterer ist eher ein selektiver Antikörper mit geringeren Kreuzreaktionen auf strukturell verwandte Triazine. Wenn Informationen über die Paratopregion der jeweiligen Antikörper verfügbar wären, bestünde die Möglichkeit, mit diesen unterschiedlichen Nachweispotentialen mehr über die Nah- und Fernstruktur der gebundenen Rückständen an den Huminstoffen in Erfahrung zu bringen.

Beide Analysenmethoden ergaben, dass der Beladungsgrad der Modellhuminsäure HS100T mit Triazinen höher ist als beim HS100A. Das ist insofern erstaunlich, da Terbuthylazin im Vergleich zu Atrazin schlechter löslich ist und die Löslichkeit der Triazine in der Reaktionslösung ein entscheidender Parameter für die Einbindung der Triazine durch Direktpolymerisation ist. Da die Synthese nicht wiederholt durchgeführt wurde, ist das Verfahren möglicherweise großen Schwankungen unterworfen. Die mit HS100A vergleichbare Beladung mit Triazinen lässt vermuten, dass auch beim HS100T kovalente Einbindung ins Modellhuminstoffgerüst über Substitution des Chloratoms erfolgt.

G. Bertin [124] stellte ebenfalls Modellsubstanzen für gebundene Atrazinrückstände her. Allerdings ging er hierbei vom Monomer Brenzcatechin aus und führte die Polymerisation bei neutralen pH-Werten aus. Die mittels Elementanalyse erzielten Ergebnisse entsprachen einer Einpolymerisierung von 77 µg/mg Atrazin bei pH 6, bzw. von 37 µg/mg bei pH 7. Diese Werte liegen signifikant höher als die der „Direktpolymerisationsstrategie“. Allerdings erhebt sich die Frage, ob Modellsubstanzen bei der Synthese im neutralen oder leicht sauren Milieu die gleichen physikochemischen Eigenschaften haben wie jene aus der Reaktion im alkalischen Milieu. Die in Abschnitt 2.2.6.1. beschriebenen Reaktionsmechanismen der Bildung von Modellsubstanzen aus Hydrochinonderivaten [z.B. 110] laufen nur unter alkalischen Bedingungen ab.

Der Ansatz der „Direktpolymerisation“ ist nicht allgemein auf andere PSM und Umweltschadstoffe übertragbar, da hierfür eine reaktive funktionelle Gruppe vorhanden sein muß. Sind mehrere reaktive Positionen im zu untersuchenden Molekül verfügbar, kann die kovalente Bindung über mehrere, unterschiedliche Stellen erfolgen. Dies erschwert die weiteren Untersuchungen. Im Falle von Triazinen ist eine Limitierung gegeben durch die Löslichkeit der Analyten in der Reaktionslösung. Ein großer Teil der Triazine setzt sich nicht mit dem Polymer um, sondern verbleibt als Niederschlag in der gesättigten Lösung. Damit sind größere Beladungen und eine Variation über breite Konzentrationsbereiche nicht möglich. Diese sind für die Untersuchung mit spektroskopischen Methoden wie FTIR, ¹³C- und ¹H-NMR-Spektroskopie unumgänglich.

4.2.3. Bewertung der „Monomerenstrategie“

Zur Überwindung der beschriebenen Probleme wurden durch „Monomerenstrategie“ die Modellschubstanzen BQ310A und BQ400A mit definierter Struktur der gebundenen Rückstände synthetisiert. Sie wurden in entionisiertem Wasser aufgelöst, mit verdünnter Natronlauge auf pH 7 eingestellt und mit unterschiedlichen Immunoassays untersucht. Die Verhältnisse sind schematisch in Abbildung 83 dargestellt.

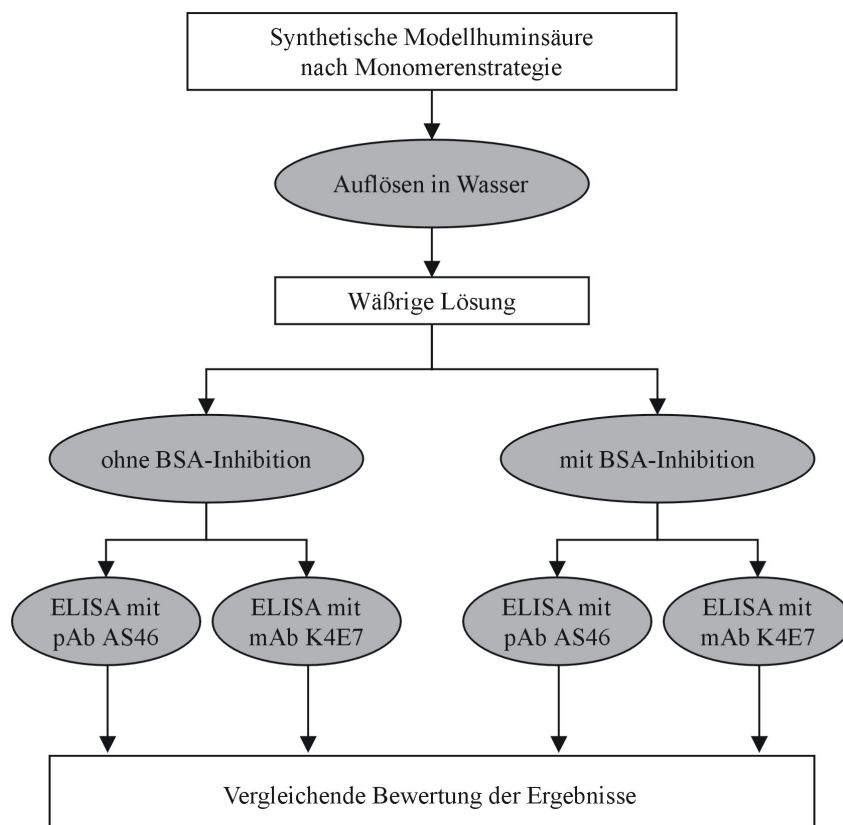


Abbildung 83: Bewertungsschema für die durch „Monomerenstrategie“ erhaltenen gebundenen Rückstände

4.2.3.1. Quantifizierung gebundener Rückstände durch Elementaranalyse

Die Elementaranalyse weist in den Verbindungen BQ310A und BQ400A signifikante Gehalte an Stickstoff nach. Eine homogene Copolymerisation in das Huminstoffmodell vorausgesetzt, kann aus der Einwaage an Edukten (p-Benzochinon und Triazinderivat) abgeschätzt werden, welcher Stickstoffgehalt theoretisch auftreten sollte.

Es ergaben sich für BQ310A theoretische Stickstoffgehalte $N_{\text{theo}}=1,13\%$ und für BQ400A $N_{\text{theo}}=0,54\%$. Durch diese Werte ist der Stickstoffgehalt nach oben begrenzt. Diese theoretischen Werte sind mit den Meßwerten aus der Elementaranalyse (BQ310A: 1,51%; BQ400A:

0,45%) vergleichbar, was darauf hinweist, dass sich Triazine in den Polymeren tatsächlich gleichmäßig verteilen.

Aus den Daten der Elementaranalyse wurde ferner die Quantität an gebundenen Triazinrückständen (BR) abgeschätzt. Für BQ310A wurden BR=4,65 Gew.-% sowie für BQ400A BR=1,15 Gew.-% „Atrazin“ bestimmt. Zum Vergleich: Für HS100A aus der Direktpolymerisation wurden 0,80 Gew.-% bestimmt.

4.2.3.2. Quantifizierung gebundener Rückstände durch Enzymimmunoassay

Die Modellsubstanzen BQ310A und BQ400A wurden durch kompetitive ELISAs mit den Antikörpern AS46 und K4E7 untersucht. Die Kontrollsubstanz BQ125 erzeugt im ELISA ein Messsignal, das auf unspezifische Bindung der Huminstoffmodelle an die Antikörper zurückzuführen ist. Sie darf gegenüber den gebundenen Rückständen nicht vernachlässigt werden, da sonst eine Überschätzung der Atrazinkonzentration die Folge wäre. Wie bei der „Direktpolymerisationsstrategie“ wurden daher durch eine Differenzrechnung die unspezifischen Signale rechnerisch eliminiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 84 bzw. Abbildung 85 dargestellt.

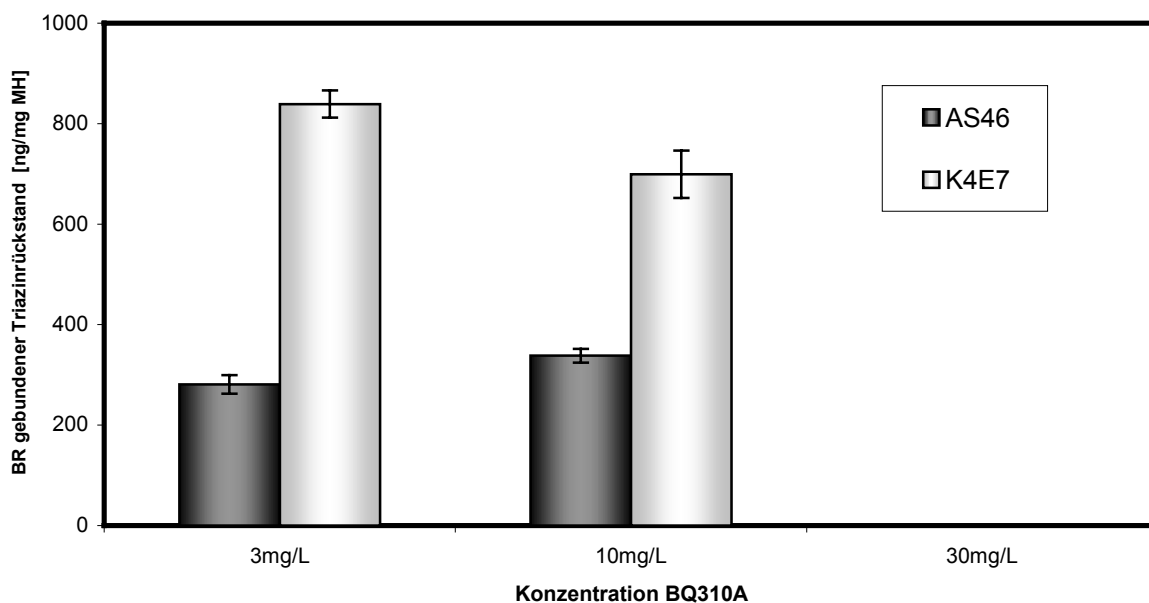


Abbildung 84: Gebundene Triazinrückstände BR - BQ310A (Angaben der Vertrauensbereiche der t-Verteilung für $P=95\%$; $f=3$)

Der ELISA bestätigt, dass sich die Modellverbindung BQ310A durch eine hohe Beladung mit einem Derivat des Atrazins auszeichnet. Sowohl das Antiserum AS46 als auch der mAb K4E7 sind in der Lage, bei Konzentrationen der Modellsubstanz von 3mg/L und 10mg/L Atrazinäquivalente zu detektieren (K4E7: 769ng/mg Modellhuminstoff; AS46: 310ng/mg Modellhuminstoff). Der K4E7 unterstreicht hierbei seine Fähigkeit, nicht-extrahierbare Rück-

stände sensitiver als der AS46 detektieren zu können. Das korrespondiert mit den Kreuzreaktionen der monomeren Substanz **1**, die eine höhere Kreuzreaktion mit dem K4E7 (2,93%) im Vergleich mit AS46 (1,22%) aufweist.

Für die gebundenen Rückstände am BQ400A ergibt sich ein ähnliches Bild. Nach der eingesetzten Struktur des Triazinmonomers Cl-Diol **2** war eine deutlich reduzierte Fähigkeit der Antikörper zur Bestimmung der nicht-extrahierbaren Rückstände zu erwarten. Die experimentellen Daten bestätigen diese Annahme, wie Abbildung 85 zeigt.

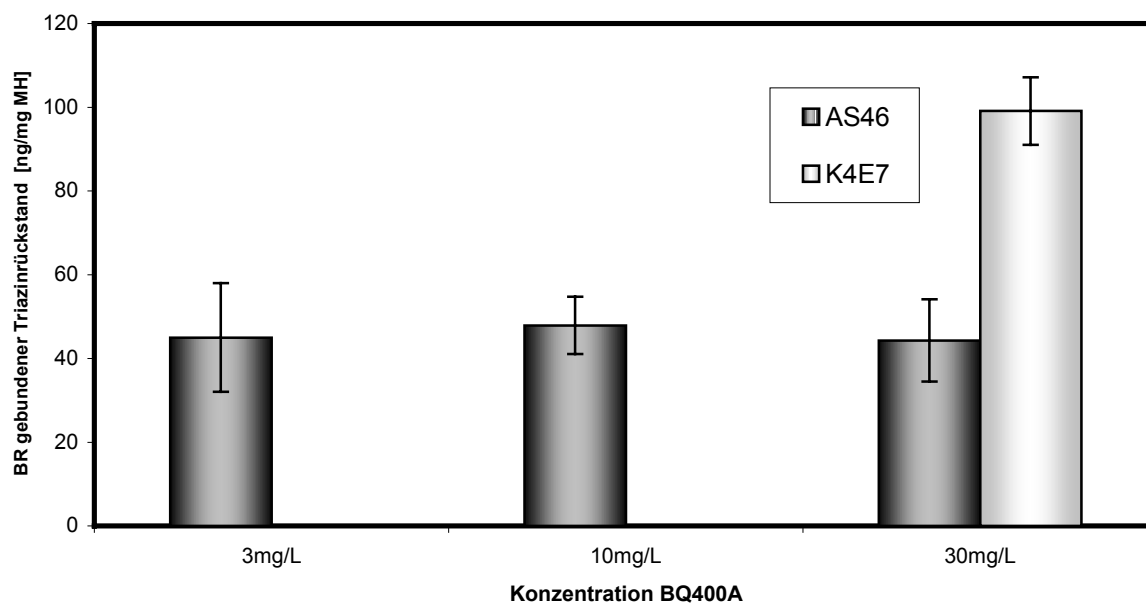


Abbildung 85: Gebundene Triazinrückstände BR - BQ400A (Angaben der Vertrauensbereiche der *t*-Verteilung für $P=95\%$; $f=3$)

Erstaunlicherweise ist aber auch beim BQ400A der Antikörper K4E7 besser in der Lage, die gebundenen Rückstände zu detektieren als der Antikörper AS46, obwohl die Kreuzreaktion beim Monomer **2** niedriger war. Insgesamt ist die Vorhersage der Kreuzreaktion schwierig, da eine Systematik nicht zu erkennen ist. Unter Umständen ist der mAb K4E7 insgesamt weniger anfällig auf sterische Effekte am Substrat und kann daher die gebundenen Rückstände besser erkennen. Das kann einerseits mit der Raumerfüllung der Immunglobuline zusammenhängen oder mit einem erhöhten Anteil an basischen Aminosäuren, durch die die elektronischen Abstoßungen verringert und die Affinität zu den Antikörpern erhöht werden. Dafür spricht, dass die unspezifische Bindung an Huminstoffe beim K4E7 stärker ausgeprägt ist.

Störungen im ELISA durch andere Analyten oder Matrixsubstanzen addieren sich nicht einfach zum Analytsignal. Die rechnerische Diskriminierung der unspezifischen Bindung ist nur in 1. Näherung korrekt. Daher sollte auch die experimentelle Inhibition des „Huminstoff“-Signals unternommen werden. Die Huminstoffe sollten „in situ“ durch eine adequate Probenvorbereitung der Probe mit 1% BSA unterdrückt werden, und so eine Bindung an die Anti-

körper verhindert werden. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 86 sowie Abbildung 87 dargestellt.

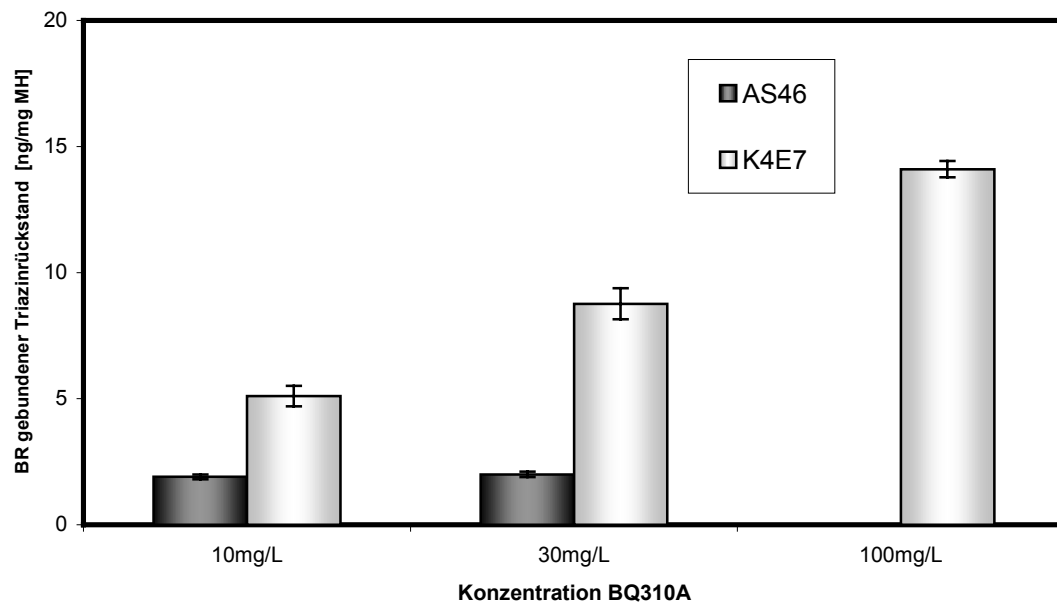


Abbildung 86: Gebundene Triazinrückstände BR-BQ310A mit pAb AS46 und mAb K4E7 (Enzymtracer versetzt mit 1% (w/v) BSA (Angaben der Vertrauensbereiche der *t*-Verteilung für $P=95\%$; $f=3$))

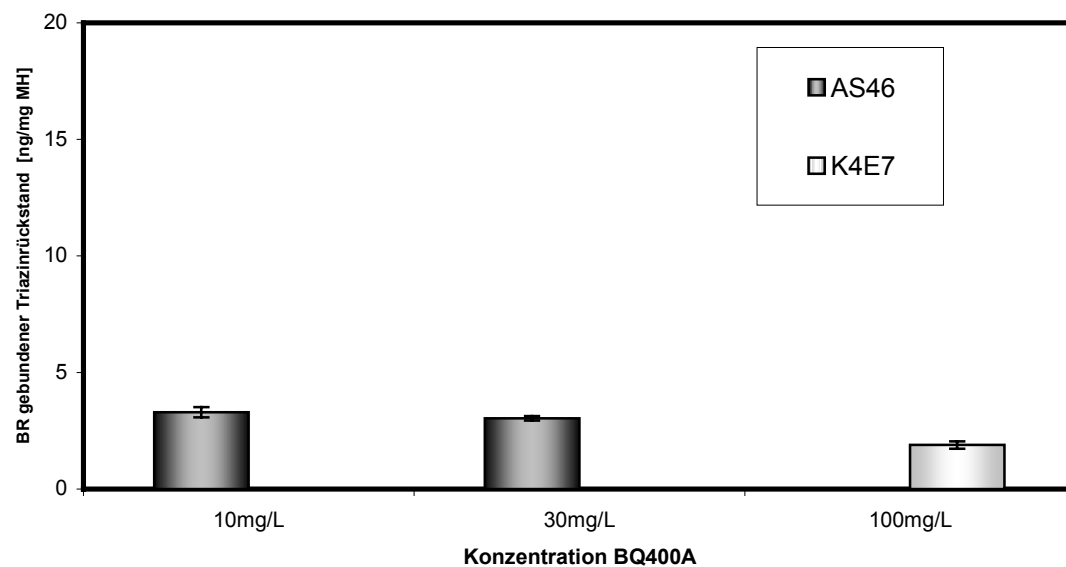


Abbildung 87: Gebundene Triazinrückstände BR-BQ400A mit pAb AS46 und mAb K4E7 (Enzymtracer versetzt mit 1% (w/v) BSA (Angaben der Vertrauensbereiche der *t*-Verteilung für $P=95\%$; $f=3$))

Die Tabelle 53 fasst die ELISA-Ergebnisse zusammen.

Tabelle 53: Durch ELISA bestimmte gebundene Atrazinrückstände an BQ310A und BQ400A

Antikörper:		pAb AS46	mAb K4E7	pAb AS46	mAb K4E7
BSA-Inhibition:		Nein	Nein	Ja	Ja
BQ310A	Median BR [ng/mg]	310	769	2,0	8,8
	Spannweite:	(281-338)	(699-839)	(2,0)	(5,1-14,1)
BQ400A	Median BR [ng/mg]	45,0	99,1	2,1	1,9
	Spannweite:	(44,3-47,9)	(99,1)	(2,0-2,2)	(1,9)

Insgesamt ist der mAb K4E7 zum Nachweis von gebundenen Triazinen besser geeignet als der pAb AS46. Die Zugabe von globulärem BSA führt zwar in allen betrachteten Fällen zur Reduktion der unspezifischen Bindung der Modellhuminstoffe, jedoch werden durch beide Antikörper nur noch in geringen Konzentrationen gebundene Triazine nachgewiesen.

4.2.3.3. Zusammenführung der Ergebnisse

Das als „Monomerenstrategie“ bezeichnete Verfahren erlaubt die Synthese von Modellsubstanzen mit gebundenen Triazinen. Durch Elementaranalyse wurden in BQ310A $BR_{CHN}=46,5\mu\text{g/mg}$, sowie für BQ400A $BR_{CHN}=11,5\mu\text{g/mg}$ „Atrazin“ bestimmt. Der kompetitive Enzymimmunoassay detektierte abhängig vom verwendeten Antikörper bis zu $0,8\mu\text{g}$ Atrazinäquivalente je mg Modells substanz (BQ310A) bzw. bis zu $0,1\mu\text{g/mg}$ bei BQ400A.

Anhand dieser Ergebnisse lassen sich nach der Gleichung 27 für die gebundenen Rückstände die Kreuzreaktivitäten berechnen:

$$CR_{\text{geb.R.}} = \frac{BR_{AK}}{CHN} * 100\% \quad (\text{Gleichung 27})$$

mit:

$CR_{\text{geb.R.}}$: Kreuzreaktivität der gebundenen Rückstände [%]

BR_{AK} : Gebundene Rückstände bestimmt durch ELISA [$\mu\text{g/mg}$ Modells substanz]

CHN : Gewichtsanteil gebundene Rückstände am Gesamtpolymer bestimmt durch Elementaranalyse [$\mu\text{g/mg}$ Modells substanz]:
bei BQ310A: $46,5\mu\text{g/mg}$
bei BQ400A: $11,5\mu\text{g/mg}$

Die Tabelle 54 beschreibt die Ergebnisse.

Tabelle 54: Berechnete CR-Werte für die Modellhuminstoffe der BQ-Serie

CR	pAb AS46	mAb K4E7	pAb AS46	mAb K4E7
<i>BSA-Inhibition:</i>	Nein	Nein	Ja	Ja
<i>BQ310A</i>	0,67%	1,65%	0,004%	0,019%
<i>BQ400A</i>	0,39%	0,86%	0,018%	0,017%

Der Modellhuminstoff BQ310A weist CR-Werte von 0,67% (AS46) bzw. 1,65% (K4E7) auf, d.h. die gebundenen Triazine werden um Faktor 100 schlechter von den Antikörpern erfasst als Atrazin. Das zur Synthese des BQ310A eingesetzte Edukt N-Diol **1** zeigt Kreuzreaktionen von 1,22% (AS46) bzw. 2,93% (K4E7) (Kapitel 3.3.3.4.1). Im Vergleich verringert sich die Kreuzreaktivität bei beiden Antikörpern auf etwa die Hälfte des Triazinmonomers N-Diol **1**, die Werte liegen aber weiterhin in der Größenordnung.

Im Fall des BQ400A hingegen werden die Kreuzreaktionen deutlich erhöht und um Größenordnungen höhere CR-Werte für die Modells substanz im Vergleich mit dem Edukt Cl-Diol **2** bestimmt. Für das Cl-Diol **2** wurden lediglich CR-Werte von 0,027% (AS46) bzw. 0,005% (K4E7) bestimmt (Kapitel 3.3.3.4.1).

Diese scheinbar widersprüchlichen Daten erschweren die Interpretation. Durch Bindung der Triazinmonomere an makromolekulare Modells substenzen ist eine Verringerung der Erkennung durch sterische Hinderung und elektronische Abstoßung der Immunglobuline vorstellbar. Warum es im Fall des BQ400A zu einer signifikanten Erhöhung der CR-Werte kommt, ist nicht ersichtlich. Möglich ist das Vorliegen von Multivalenz. Liegt pro Huminstoffmolekül eine Vielzahl von gebundenen Triazinen vor, so folgt ein kooperativer Effekt, bei dem die Avidität erhöht wird.

Die Zugabe von BSA führt zu einer rapiden Erniedrigung der CR-Werte, wie Tabelle 54 zeigt. Gebundene Triazine werden nur noch in Spurenkonzentrationen detektiert.

Insgesamt gestattet die „Monomerenstrategie“ die Synthese von Substanzen mit gebundenen Rückständen, deren Eigenschaften und Quantitäten den Erfordernissen angepasst werden können. Durch Steigerung der Einwaage an Triazinderivaten sollte sich eine ganze Reihe an Modells substenzen mit abgestuften Konzentrationen an gebundenen Rückständen erzeugen lassen. Das Verfahren lässt sich nach entsprechender Adaption auch auf weitere Umweltkontaminanten erweitern.

4.2.4. Übergeordnete Bewertung der Kalibrationsmaterialien für gebundene Triazine

In der vorliegenden Arbeit wurden synthetische Modellsubstanzen als „Grundgerüst“ für Standardmaterialien für gebundene Rückstände eingesetzt und erfolgreich Addukte mit nicht-extrahierbaren Triazinrückständen gebildet.

P. Pfortner et al. [92] wählten als „Grundgerüst“ einen Huminstoff, der aus einem Boden bei Speyer isoliert wurde. E. Simon [86, 95] und P. Ulrich [91] verwendeten einen Bodenhuminstoff aus Buchendorf. Auch käufliche Huminstoffe von der Fa. Roth und Fa. Aldrich kamen hier zum Einsatz. Der Einsatz natürlicher Huminstoffe liegt zwar nahe, man nimmt jedoch in Kauf, dass jede Charge, auch am identischen Ort beprobt, zu unterschiedlichen Zeiten (z.B. Jahreszeitlich bedingt), voneinander stark abweichende Eigenschaften aufweisen können. Auch die Lagerung ist problematisch, da die Substanzen Alterungsprozessen unterworfen sind. Die Huminstoffe sind damit nur begrenzt verfügbar. Es können ferner Grundkontaminationen mit gebundenen Rückständen vorliegen.

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Substanzen simulieren die Eigenschaften der Huminstoffe und weisen gegenüber natürlichen Huminstoffen eine Reihe von Vorteilen auf. So kann leicht eine Kontrollsubstanz ohne gebundene Rückstände dargestellt werden und sie können überall und zu jedem Zeitpunkt verfügbar gemacht werden. Außerdem ist theoretisch eine unbegrenzte Menge der Modellsubstanzen synthetisierbar, wobei die Substanzen präparativ leicht zugänglich sind. Damit ist die Reproduzierbarkeit der Materialien gewährleistet. Die vorliegenden Ergebnisse belegen, daß Hydrochinon und p-Benzochinon als Ausgangsmaterialien für die Modellsubstanzen hervorragend geeignet sind. Für lange Reaktionszeiten, wie sie die „Direktpolymerisationsstrategie“ erfordert, ist Hydrochinon empfehlenswert. Für kurze Reaktionszeiten wie bei der „Monomerenstrategie“ hat sich p-Benzochinon als geeignet erwiesen.

Einen ähnlichen Ansatz verfolgte A. Dankwardt [23] mit dem Einsatz des Polysaccharids Sepharose als Huminstoffsubstitut. Sepharose zeigt jedoch teilweise ganz andere Eigenschaften als natürliche Huminstoffe, beispielsweise bezüglich der Polydispersität.

Werden Triazine kovalent gebunden, so führt dies unausweichlich zur Strukturmodifikation. Die Struktur der synthetisierten gebundenen Rückstände muß mit jener von natürlich vorkommenden möglichst identisch sein. In Abbildung 88 sind Beispiele aus der Literatur zitiert, welche Beispiele für Standardmaterialien für gebundene Rückstände darstellen.

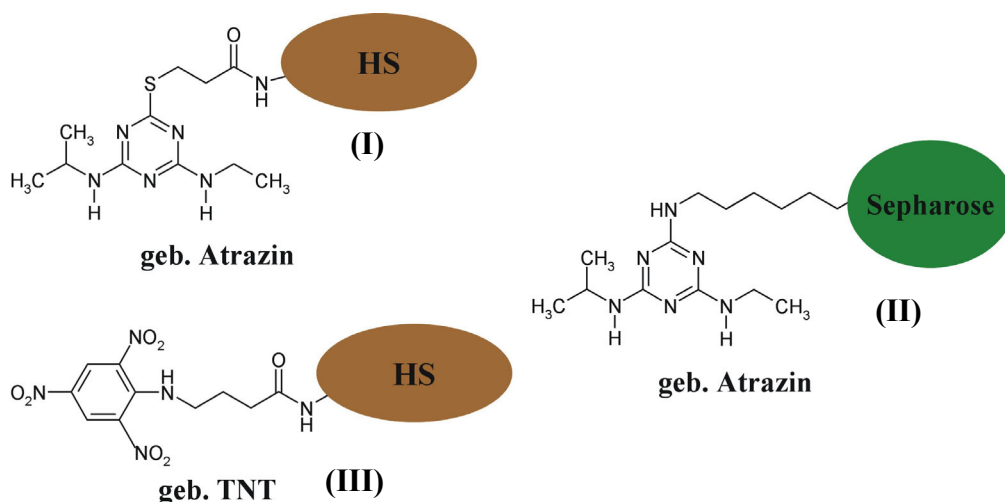


Abbildung 88: Beispiele für Kalibrationsmaterialien für Huminstoff-gebundene Rückstände

(I) und (II) stellen Strukturen für gebundene Triazinrückstände dar. Bei (I) wurde ein Chloratom am aromatischen Triazinring durch eine Thiolgruppe substituiert, bei (II) durch eine Aminogruppe. (I) simuliert die kovalente Einbindung des Atrazins nach der Konjugation mit Glutathion. In Frage kommen neben Thiol- und Aminfunktionen auch phenolische Gruppen, die ebenfalls in der Lage sind, das Chloratom nukleophil zu substituieren. (III) behandelt einen anderen Analyten, das TNT. Dieses trägt für gewöhnlich an der Verknüpfungsstelle eine Methylgruppe, die nun durch eine Aminfunktion ersetzt wurde. Eine derartige Struktur ist unter natürlichen Bedingungen unwahrscheinlich, was eine Schwäche dieser Modellverbindung ist. Gebundene TNT-Rückstände entstehen bevorzugt durch reduktive Aminierung und anschließende Einbindung der freien Aminofunktionen.

Ferner wurden die Analyten bei den aufgeführten Strukturen über eine Spacergruppierung an den Huminstoff gebunden, die mehrere Kohlenstoffkerne lang ist, vermutlich, um die gebundenen Rückstände stärker auf der Huminstoffoberfläche zu exponieren. Eine solche Spacergruppe tritt bei natürlich vorkommenden gebundenen Rückständen jedoch nicht auf. Daher wurde in dieser Arbeit die Einführung einer Spacergruppe vermieden. Bei der Inkubations- und Direktpolymerisationsstrategie werden die Triazine vielmehr durch Reaktion der reaktiven funktionellen Gruppen auf „natürliche“ Art eingebunden. Vorhersage der Struktur ist so jedoch nicht zweifelsfrei möglich. Bei den durch „Monomerenstrategie“ synthetisierten Substanzen wurden zwei Strukturen ausgewählt, die in der Natur als gebundene Rückstände vorstellbar sind. Die Struktur des gebundenen Triazins im Modellhuminstoff BQ310A resultiert formal aus der Umsetzung der freien Aminogruppe des Phase-I-Metaboliten Desethylatrazin mit einem chinoiden System. Die Struktur BQ400A resultiert aus der nukleophilen Substitution des Chloratoms durch ein aromatisches Amin. Tabelle 55 faßt die wesentlichen Merkmale der drei Strategien zusammen.

Tabelle 55: Charakteristische Merkmale der verschiedenen Strategien

	„Inkubationsstrategie“	„Direktpolymerisationsstrategie“	„Monomerenstrategie“
<i>Zeitaufwand für Darstellung</i>	Hoch (8 Wochen)	Niedrig (10 Tage)	Niedrig (20 Stunden); inkl. Monomerensynthese hoch
<i>Synthetisierbare Menge</i>	Gering	Theo. unbegrenzt	Theo. unbegrenzt
<i>Struktur geb. Rückstand</i>	Unbekannt (Chlorsubstitution angenommen)	Unbekannt (Chlorsubstitution angenommen)	Bekannt
<i>Beladung mit Triazinen</i>	Eher gering; abhängig vom Huminstoff	Hoch	Sehr hohe Beladung möglich
<i>Variierbarkeit der Beladung</i>	Begrenzt	Begrenzt	Ja
<i>Schwierigkeit der Synthese</i>	Gering	Gering	Hoch

Die „Inkubationsstrategie“ benötigt eine lange Reaktionszeit bei der Inkubation. Die Polymerisationsreaktionen der Direktpolymerisations- und die „Monomerenstrategie“ dagegen laufen in einer schnellen Reaktion ab. Die „Direktpolymerisationsstrategie“ ist hierbei durch eine einfachere Synthesevorschrift gekennzeichnet als die „Monomerenstrategie“, da im letzteren Fall vor der Polymerisation Triazin-Monomer-Addukte synthetisiert werden müssen. Jedoch kann bei der „Monomerenstrategie“ die Struktur des gebundenen Rückstands vor der Polymerisation festgelegt werden, während bei der Direktpolymerisation und der „Inkubationsstrategie“ die Strukturen nicht eindeutig bestimmt werden können.

Bei der „Monomerenstrategie“ besteht ferner der Vorteil, dass die Quantität der gebundenen Rückstände über einen großen Bereich variierbar ist. Die Triazin-Monomer-Addukt werden quantitativ in das Polymergerüst eingebaut.

4.2.5. Bewertung des Enzymimmunoassays für die Analytik gebundener Triazine

Der Enzymimmunoassay stellt ein kraftvolles analytisches Werkzeug zur Detektion von gebundenen Triazinrückständen dar und liefert Informationen über die Quantität von nicht-extrahierbaren Rückständen. Durch den Einsatz unterschiedlicher Antikörper mit verschiedenen Erkennungsmustern wurde nachgewiesen, daß bei den Inkubations- und Direktpolymerisationsversuchen die Bindung der Triazine hauptsächlich über eine kovalente Bindung durch Substitution des Chloratoms erfolgt.

Allerdings weisen die Enzymimmunoassays ein hohes Potential für systematische Fehler auf. Bei Proben mit hohen Huminstoffkonzentrationen traten Störungen auf, die auf unspezifische

Bindung der Huminstoffe an die Antikörperbindungsstellen zurückzuführen sind. Durch derartige Effekte wird die Belastung mit den Analyten überschätzt.

Die Störeffekte der Huminstoffe bei ELISAs mit dem mAb K1F4 sind wesentlich größer als bei ELISAs mit dem pAb AS46. Dies ist erstaunlich, da in vorangegangenen Studien mit verschiedenen Antikörper gezeigt wurde, daß der mAb K1F4 und allgemein monoklonale Antikörper kaum anfällig auf Fulvinsäurematrices sind, während polyklonale Antikörper hohe unspezifische Bindung zeigen [184]. In der vorliegenden Arbeit wurde für die untersuchten Huminstoffe exakt das Gegenteil beobachtet, nämlich niedrige Störeffekte durch die Huminstoffe beim polyklonalen Antikörper AS46 und relativ hohe Störeffekte beim monoklonalen Antikörper K1F4. Möglicherweise hängt dies mit unterschiedlichen Testbedingungen des ELISAs zusammen. Der grundlegenden Verallgemeinerung, daß monoklonale Antikörper stets über höhere Spezifität verfügen, muß widersprochen werden.

Die unspezifische Bindung an Huminstoffe lässt sich durch experimentelle Suppression oder rechnerische Subtraktion beseitigen. Die Zugabe von Serumalbumin führt stets zur signifikanten Reduktion der detektierten Menge an gebundenen Triazinrückständen. Da die beiden Verfahren unterschiedliche Werte liefern, müssen systematische Fehler vorliegen. Das rechnerische Verfahren ohne Inhibition des unspezifischen Huminstoffsignals führt im Falle der Modellsubstanzen zu Summenwerten, die sich aus den Signalen der gebundenen Rückstände und den Signalen der Kontrollhuminstoffe zusammensetzen. Derartige Summenparameter können bei ELISAs nur näherungsweise durch Differenzbildung auseinandergerechnet werden. Bei Verwendung dieses Verfahrens sind daher Fehler von vornherein inherent. Das Verfahren mit experimenteller Inhibition der Huminstoffsignale kann dem beschriebenen Nachteil ausweichen, indem das Huminstoffsignal nicht rechnerisch, sondern „in situ“ unterdrückt wird. Allerdings ist es nicht immer möglich, das Huminstoffsignal vollständig mit Rinderserumalbumin zu unterdrücken. Möglicherweise kann die Erhöhung der Konzentration oder die Verwendung anderer Blockierungsmittel das Problem beheben. Jedoch besteht die Gefahr, dass durch Zugabe von Blockierungsreagenzien nicht nur die Huminstoffe einer Detektion entzogen werden, sondern auch die Huminstoff-gebundenen Rückstände. Diese Modellvorstellung ist in Abbildung 89 illustriert.

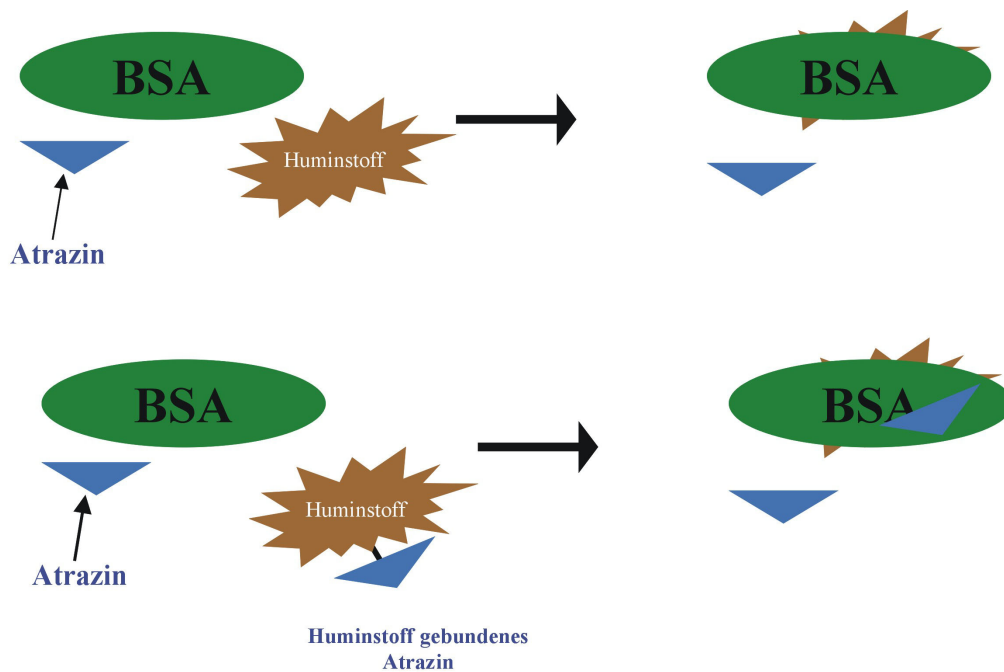


Abbildung 89: Modellvorstellung zur Bindung der Huminstoffe an Rinderserumalbumin (BSA)

In diesem Modell werden durch die Zugabe des Proteins BSA polare Substanzen wie Huminstoffe gebunden und in der globulären Struktur eingeschlossen. Gleichzeitig wird Atrazin von BSA nicht gebunden. Während Atrazin direkt ohne störende Matrixeffekte der Huminstoffe bestimmt werden kann, könnten Huminstoff-gebundene Triazine ebenso inhibiert werden. Die gebundenen Triazine zeigen stark reduzierte Atrazinäquivalente und Kreuzreaktion nach Zugabe von BSA. Daher liegt der Verdacht nahe, dass nur ein Teil der gebundenen Rückstände detektiert werden kann.

Da das in der Standardreihe mitgeführte Atrazin durch Serumalbumin nicht inhibiert wird, ist eine durch BSA begünstigte Inhibition ein Indiz auf strukturelle Einbindung des Moleküls ins makromolekulare Huminstoffgerüst.

4.3. Ausblick

Die Akzeptanz von Enzymimmunoassays wird entscheidend davon mitgetragen, dass sich die Anwender ihre Methoden einer strengen Validerung unterziehen. Das gilt für die Entwicklung von ELISAs auf der Basis von neuen Antikörpern gegen Umweltkontaminanten (z.B. Phenylharnstoffherbizide, Sulfonylharnstoffe oder Haloether), aber auch für andere neuartige Verfahren, die die spezifische Antikörper-Antigen-Reaktion nutzen (z.B. ANDREA-Immunoassay). Hierzu ist auch der Immunfiltrations-Schnelltest zu zählen, der voraussichtlich mit geringen Modifikationen auf andere PSM oder Schadstoffe adaptiert werden kann.

Die synthetisierten Modellsubstanzen stehen nun als Standards zur Verfügung, um andere Analysenmethoden für gebundene Rückstände zu kalibrieren. Das Verfahren der „Monomerenstrategie“ lässt sich auch auf andere Substanzen anwenden. Es wäre zu evaluieren, ob eine Kopplung an p-Benzochinonderivate besser geeignet ist als die eingesetzten Hydrochinonderivate. Auch eine Optimierung der Synthesewege für höhere Ausbeuten wäre wünschenswert.

5. Experimenteller Teil

5.1. Verwendetes Material

5.1.1. Geräte

Bezeichnung	Firma (Ort)
Mikrotiterplatten-Photometer DEELUX AMP 400 COM	DEELUX, Gödensdorf
Mikrotiterplatten-Waschautomat AMW II TC	DEELUX, Gödensdorf
Software Mikrowin KIN	DEELUX, Gödensdorf
Kreisschüttler KS 125 basic	IKA Labortechnik, Staufen
Schalenaufsatz AS125.3 für Kreisschüttler	IKA Labortechnik, Staufen
Pipette Eppendorf Reference, fix (200µL)	Eppendorf, Hamburg
Pipette Eppendorf Research, variabel (0,5-10µL)	Eppendorf, Hamburg
Pipette Eppendorf Research, variabel (10-100µL)	Eppendorf, Hamburg
Pipette Eppendorf Research, variabel (200-1000µL)	Eppendorf, Hamburg
Pipette Eppendorf Varipette 4720	Eppendorf, Hamburg
Pipette Eppendorf Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlage Nanopure	Millipore, Eschborn
Microprocessor pH-Meter pH96	WTW, Berlin
pH-Elektrode Typ E50-1,5	WTW, Berlin
Spectrophotometer DR/2010	Hach, Willich
Gefriertrocknungsanlage Hetosicc CD4	Heto, Stockholm
Zentrifuge Typ Mikro-Rapid/K	Hettich, Tuttlingen
Analysenwaage MC1 Research RC210D	Sartorius, Göttingen
Mettler Waage P1200	Mettler Toledo, Giessen
Drehschieber-Vakuumpumpe RD4	Vacuubrand, Wertheim
Vortex REAX 1DR	Heidolph, Schwabach

5.1.2. Antikörper

Bezeichnung	Typ	Wirt	Bezugsquelle
K1F4	monoklonal	Maus	Prof. Hock, Weihenstephan
K4E7	monoklonal	Maus	Prof. Hock, Weihenstephan
K1A11	monoklonal	Maus	Prof. Hock, Weihenstephan
AS46	polyklonal	Kaninchen	Sension, Augsburg
AS47	polyklonal	Kaninchen	Sension, Augsburg
Anti-Maus IgG	polyklonal	Ziege	Sigma, Steinheim
Anti-Kaninchen IgG-Peroxidase Conjugate	monoklonal	Maus	Sigma, Steinheim

5.1.3. Enzymtracer

Bezeichnung	Firma, Ort
Enzymtracer ET tert-Butyl	Sension, Augsburg
Enzymtracer ET2d	Sension, Augsburg

5.1.4. Chemikalien

Sofern in der Tabelle nicht anders vermerkt, wurden die Chemikalien in der Spezifikation „pro Analyse“ (p.A.) eingesetzt.

Bezeichnung	Firma
Aceton für die organische Spurenanalyse	E. Merck, Darmstadt
p-Benzochinon zur Synthese	E. Merck, Darmstadt
Citronensäure Monohydrat	E. Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Serva, Heidelberg
Ethylacetat für die organische Spurenanalyse	E. Merck, Darmstadt
Hexan für die organische Spurenanalyse	E. Merck, Darmstadt
Hydrochinon zur Synthese	E. Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Fluka, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka, Deisenhofen
Methanol für die organische Spurenanalyse	E. Merck, Darmstadt
Natriumazid	Fluka, Deisenhofen
Natriumcarbonat wasserfrei	Fluka, Deisenhofen
Natriumchlorid	Fluka, Deisenhofen
tri-Natriumcitrat Dihydrat	E. Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Fluka, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat	Fluka, Deisenhofen
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Fluka, Deisenhofen
Natriumhydroxid	E. Merck, Darmstadt
Penicilin-G Kaliumsalz	Riedel-de Haën, Seelze
Perhydrit-Tabletten	E. Merck, Darmstadt
ortho-Phosphorsäure 85%	Riedel-de Haën, Seelze
Rinderserumalbumin (Fraktion V)	Sigma, Steinheim
Salzsäure, rauchend 37%	Fluka, Deisenhofen
Schwefelsäure, konzentriert	Fluka, Deisenhofen
Sorbinsäure Kaliumsalz	Fluka, Deisenhofen
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (freie Base)	Sigma, Steinheim
Tween 20	E. Merck, Darmstadt

5.1.5. Standardsubstanzen

Bezeichnung	Charge/Lot	Reinheit	Firma
Ametryn	0027X	98,2%	Riedel-de Haën, Seelze
Atrazin	63200	99,0%	Riedel-de Haën, Seelze
Desethylatrazin	9308X	99,9%	Riedel-de Haën, Seelze
Hydroxyatrazin	0075X	94,7%	Riedel-de Haën, Seelze
Prometryn	70450	99,7%	Riedel-de Haën, Seelze
Propazin	9307X	99,5%	Riedel-de Haën, Seelze
Simazin	9344X	99,3%	Riedel-de Haën, Seelze
Terbuthylazin	53060	99,1%	Riedel-de Haën, Seelze
Terbutryn	0053X	98,7%	Riedel-de Haën, Seelze

5.1.6. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Firma, Ort
Sep-Pak Classic Cartridges (360mg Trägermaterial)	Waters, Milford, MA (USA)
EIA/RIA-Mikrotiterplatte (F-Form; Bindungskapazität hoch)	Greiner, Frickenhausen
Abdeckplatten für EIA/RIA-Mikrotiterplatten	Greiner, Frickenhausen
PS-Halterahmen weiß für EIA-Strips	Greiner, Frickenhausen
Strips 1*8 (F-Form; Bindungskapazität hoch)	Greiner, Frickenhausen
Varitips S	Eppendorf, Hamburg
Combitips 2,5mL	Eppendorf, Hamburg
Combitips 5mL	Eppendorf, Hamburg
Standartips 20µL	Eppendorf, Hamburg
Standartips 100µL	Eppendorf, Hamburg
Standartips 1000µL	Eppendorf, Hamburg
Eppendorftube 1,5mL	Eppendorf, Hamburg
Eppendorftube 0,5mL	Eppendorf, Hamburg
Adsorberharz Amberlite XAD-8	E. Merck, Darmstadt
Kationenaustauscherharz Dowex 50W (Gegenion: H ⁺)	BioRad, Richmond, VA(USA)
Einmalküvetten 1,5mL halbmikro	Brand, Wertheim
Einmalpasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim
Einmal-Injektionskanülen (dünnwandig)	Braun, Melsungen
4mL Braunglasprobenfläschen (12mm)	WGA, Düsseldorf
Silikon Polytetrafluorethylen (PTFE)-Septum 12mm	Zinsser Analytik, Frankfurt
12mm Polypropylen (PP)-Kappen für Probenfläschen	Supelco, Bellefonte, PA(USA)

5.2. Reinigung der Glasgeräte

Sämtliche mit dem Probenmaterial in Berührung kommenden Glasgeräte werden mit heißem Wasser, entionisiertem Wasser, Aceton „für die organische Spurenanalyse“ und n-Hexan „für die organische Spurenanalyse“ gespült, getrocknet und verschlossen aufbewahrt. Unmittelbar vor der Benutzung werden sie mit Aceton und n-Hexan gespült.

5.3. Probennahme, -lagerung und Feldstudien Immunfiltration

Die zu untersuchenden aquatischen Proben werden jeweils in gereinigte 100 mL-Glasgefäße überführt. Die Untersuchung von Wasserproben mit Immunfiltrationsschnelltest SensoCheck TR500 erfolgt direkt nach der Probennahme unter Feldbedingungen. Zur Bestimmung von Triazinen durch den Immunfiltrationsschnelltest werden die verschiedenen Operatoren erst kurz vorher in die Funktionsweise und Handhabung des Tests eingeweiht, um die Robustheit und Zuverlässigkeit des Tests evaluieren zu können. Die SensioScreen TR500-Tests werden kühl gelagert und kurz vor der Verwendung auf Umgebungstemperatur gebracht. Auf jedem SensioScreen-Förmchen mit fünf Kavitäten wurde zweimal die identische Wasserprobe untersucht, so daß von jeder Probe eine Doppelbestimmung vorlag. Nach Abstoppen der Substratreaktion wurde die Farbintensität der Probenkavitäten von drei Personen unabhängig voneinander abgeschätzt und notiert. Dabei wurde die Farbintensität der Probe mit denen der gleichzeitig untersuchten Standards verglichen.

Für die Bestimmung mit konventionellen Mikrotiterplatten-ELISAs werden die identischen Proben bis zur endgültigen Analyse bei 4°C gelagert. Sie wurden ohne jede weitere Probenvorbereitung einer Untersuchung mit dem Mikrotiterplatten-ELISA unterzogen.

5.4. Arbeitsvorschriften

5.4.1. Enzymimmunoassays

5.4.1.1. Darstellung des Enzymtracers ET2d („Isopropyltracer“)

In einem 1,5mL Eppendorftube werden 1mg „Atrazinderivat“ (2-Hexancarbonsäureamino-4-Chlor-Isopropylamino-6-Chlor-1,3,5-Triazin), 1,7mg N-Hydroxysuccinimid und 6,2mg DCC in 130µL DMF gelöst und 18h bei RT im Dunkeln inkubiert. Der Überstand der Reaktionslösung wird dann in 2mL einer 130mmol/L (10,92g/L) Natriumhydrogencarbonat mit 2mg Peroxidase (1100U/mg) pipettiert und weitere 3h bei RT inkubiert. Isoliert wird der Enzymtracer mittels Säulenchromatographie mit einer PD-10 Sephadex G-25M-Säule. Als mobile Phase wird PBS-Puffer (pH 7,6) eingesetzt. (siehe Abschnitt 5.4.1.2.2.) Es werden Fraktionen zu je 500µl genommen und die Aktivität durch Enzymimmunoassay geprüft. Die aktiven Frakti-

onen werden vereinigt und 1:5 in Stabilisatorlösung (SENSION, Augsburg) verdünnt. Schließlich wird 0,5% (v/v) Bronidox-Lösung hinzugegeben und der Enzymtracer bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

5.4.1.2. Ansatz von Puffern und Lösungen

5.4.1.2.1. Carbonatpuffer

Zum Ansatz eines 50mmol/L Carbonatpuffers (pH 9,6) werden 1,70g/L (16mmol/L) Natriumcarbonat und 2,86g/L (34mmol/L) Natriumhydrogencarbonat in entionisiertem Wasser aufgelöst, der pH-Wert überprüft, falls nötig eingestellt und auf die entsprechende Wassermenge aufgefüllt.

5.4.1.2.2. Phosphatpuffer

Zum Ansatz eines 80mmol/L PBS-Phosphatpuffers (pH 7,6) werden 1,38g/L (10mmol/L) Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat und 12,46g/L (70mmol/L) di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat zusammen mit 8,5g/L Natriumchlorid in entionisiertem Wasser aufgelöst, der pH-Wert überprüft, falls nötig eingestellt und auf die entsprechende Wassermenge aufgefüllt.

5.4.1.2.3. PBS-Waschpufferkonzentrat und PBS-Waschpuffer

Zur Zubereitung von PBS-Waschpuffer-Konzentrat (15-fach; 120mmol/L) werden 2,07g/L (15mmol/L) Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat und 18,69g/L (105mmol/L) di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat zusammen mit 12,75g/L Natriumchlorid in entionisiertem Wasser aufgelöst, mit 0,05% (v/v; 3,75mL/L) Tween 20 versetzt und auf die entsprechende Wassermenge aufgefüllt. Zur Herstellung von gebrauchsfertigem PBS-Waschpuffer (1-fach) wird 1:15 in entionisiertem Wasser verdünnt und gemischt.

5.4.1.2.4. PBS-Substratpuffer A

Zum Ansatz eines 139mmol/L PBS-Substratpuffers (pH 5,5) werden 0,97g/L (7mmol/L) Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat und 23,50g/L (132mmol/L) di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat in entionisiertem Wasser aufgelöst, mit 282mg/L (3mmol/L) Perhydrit versetzt, der pH-Wert überprüft, falls nötig eingestellt und auf die entsprechende Wassermenge aufgefüllt.

5.4.1.2.5. Citrat-Substratpuffer B

Zum Ansatz eines 200mmol/L Citrat-Substratpuffers (pH 4,0) werden 21,02g/L (100mmol/L) Citronensäure Monohydrat, 29,41g/L (100mmol/L) tri-Natriumcitrat Dihydrat und 100mg/L (0,67mmol) Sorbinsäure-Kaliumsalz in entionisiertem Wasser aufgelöst, mit 282mg/L

(3mmol/L) Perhydrit versetzt, der pH-Wert überprüft, falls nötig eingestellt und auf die entsprechende Wassermenge aufgefüllt.

5.4.1.2.6. Chromogenlösung

Zur Herstellung der Chromogenlösung werden 288mg/L (1,2mmol/L) Tetramethylbenzidin, 12mg/L Penicilin G und 275µL/L (8,0mmol/L) o-Phosphorsäure (85%) in einer 10%igen (v/v) wäßrigen Dimethylsulfoxidlösung angesetzt. Es empfiehlt sich, Tetramethylbenzidin und Penicilin G zunächst in Dimethylsulfoxid zu lösen und dann mit der entsprechenden Menge Wasser zu verdünnen.

5.4.1.2.7. Substrat-Chromogen-Lösung

Zur Bereitung der Substrat-Chromogen-Lösung werden je ein Substratpuffer und die Chromogenlösung unmittelbar vor ihrer Verwendung im Verhältnis 2 Teile Substratpuffer zu 1 Teil Chromogenlösung miteinander vermischt.

5.4.1.2.8. Stop-Lösung

Zum Ansatz einer 1molaren Stop-Lösung werden 20mL (18mol/L) konzentrierte Schwefelsäure (96%) vorsichtig zu 340mL entionisiertem Wasser hinzugegeben und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen.

5.4.1.2.9. Triazinstandardlösungen

Zum Ansatz von Standardlösungen von Triazinherbiziden werden jeweils 1mg/mL-Stammlösungen in Dimethylsulfoxid angesetzt. Es werden für Triazine jeweils Standards mit den folgenden acht Konzentrationen angesetzt; Eine Überschußlösung mit 10000µg/L und weiterhin Lösungen mit den Konzentrationen 10µg/L, 3µg/L, 1µg/L, 0,3µg/L, 0,1µg/L, 0,03µg/L und 0,01µg/L. Zur Bereitung der Standardlösungen mit Terbutylazin wird ebenfalls eine Überschußlösung mit 10000µg/L angesetzt und weiterhin sieben Lösungen mit den Konzentrationen 10µg/L, 3µg/L, 1µg/L, 0,3µg/L, 0,1µg/L und 0,03µg/L. Von jedem Standard werden 10mL oder 20mL Lösung angesetzt. Wasser wird vorgelegt und die entsprechenden Mengen an Triazinlösung hinzupipettiert. (Tabelle 56)

Tabelle 56: Arbeitsanweisung zur Herstellung von Triazin-Standards

Konzentration Standard	Verdünnung in Wasser
1g/L	-
10000µg/L	1:100 Verdünnung von 1g/L-Standard
100µg/L	1:100 Verdünnung von 10000µg/L-Standard
10µg/L	1:10 Verdünnung von 100µg/L-Standard
3µg/L	3:100 Verdünnung von 100µg/L-Standard
1µg/L	1:100 Verdünnung von 100µg/L-Standard
0,3µg/L	1:10 Verdünnung von 3µg/L-Standard
0,1µg/L	1:10 Verdünnung von 1µg/L-Standard
0,03µg/L	1:100 Verdünnung von 3µg/L-Standard
0,01µg/L	1:100 Verdünnung von 1µg/L-Standard

5.4.1.2.10. Pufferlagerung für Enzymimmunoassay

Sämtliche Puffer- und Standardlösungen werden bis zu ihrer Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Die Chromogenlösung muß zusätzlich unter Lichtausschluß aufbewahrt werden. Die Stop-Lösung und das PBS-Waschpufferkonzentrat kann bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

5.4.1.3. Coating der EIA-Platten

5.4.1.3.1. Coating mit Antiserum AS46 und AS47

Zum Coating der Mikrotiterplatten mit Antiserum AS46 oder AS47 wird die Mikrotiterplatte mit 1,65µg/mL Antiserum-Lösung in Carbonatpuffer inkubiert. Hierzu wird eine Stammlösung (6,6mg/100µL) in 30mL Carbonatpuffer (pH 9,6) auf die entsprechende Konzentration herunterverdünnt und 300µL in jede Kavität pipettiert. Inkubation der Mikrotiterplatten erfolgt über Nacht bei 4°C. Danach wird die Platte dreimal mit 300µL PBS-Waschpuffer (1-fach) je Kavität mit einem Mikrotiterplatten-Waschautomat gewaschen. Überschüssiger Puffer wird im letzten Waschschrift entfernt.

Das gleiche Verfahren wurde für den Antikörper AS47 angewendet. Hierfür stand eine 5,2mg/100µL Stammlösung mit AS47 zur Verfügung.

5.4.1.3.2. Coating mit Antikörper K1F4 und K4E7

Zum Coating der Mikrotiterplatten mit Antikörper K1F4 oder K4E7 wird die Mikrotiterplatte zunächst mit 5µg/mL Anti-Maus IgG (aus Ziege) in Carbonatpuffer inkubiert. Hierzu wird eine 3,2mg/mL Stammlösung in 30mL Carbonatpuffer auf die entsprechende Konzentration herunterverdünnt und 300µL in jede Kavität pipettiert. Inkubation der Mikrotiterplatten er-

folgt über Nacht bei 4°C. Danach wird die Platte dreimal mit 300µL PBS-Waschpuffer je Kavität mit einem Mikrotiterplatten-Waschautomat gewaschen.

Die vorgecoatete Platte wird mit einer 1µg/mL-Lösung des entsprechenden Antikörpers gecoatet. Eine 1mg/100µL-Stammlösung wird in 30mL PBS-Puffer vermischt und 300µL der Antikörperlösung in jede Kavität pipettiert. Die Mikrotiterplatten werden 2h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wird die Platte dreimal mit 300µL PBS-Waschpuffer je Kavität mit einem Mikrotiterplatten-Waschautomat gewaschen.

5.4.1.4. Enzymtraceransatz

Für den Enzymimmunoassay mit Antikörper AS46, AS47 und K4E7 wird jeweils aus der 1:5 vorverdünnten Lösung mit Enzymtracer ET2d (ET „Isopropyl“) eine Endverdünnung von 1:10000 bis 1:40000 in 5mL PBS-Puffer je Mikrotiterplatte angesetzt. Für den EIA mit Antikörper K1F4 wird der 1:5 vorverdünnte „tert-Butyltracer“ in einer Endverdünnung von 1:10000 in 5mL PBS-Puffer je Platte angesetzt. Für huminstoffhaltige Proben wird dem PBS-Puffer vor der Zugabe des jeweiligen Enzymtracers 1% (w/v) Rinderserumalbumin hinzugegeben.

5.4.1.5. Immunreaktion

Man pipettiert jeweils 200µL Standard- bzw. Probenlösung in die Kavitäten. Alle Standard- und Probenlösungen müssen Raumtemperatur aufweisen. Anschließend werden je 50µL der entsprechenden Enzymtracer in PBS-Pufferlösung hinzugefügt. Danach wird eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Danach wird die Platte dreimal mit 300µL PBS-Waschpuffer je Kavität mit einem Mikrotiterplatten-Waschautomat gewaschen.

Für die Atrazinbestimmung mit Antikörper AS46 werden acht Standardkonzentrationen 0.01µg/L, 0.03µg/L, 0.1µg/L, 0.3µg/L, 1µg/L, 3µg/L, sowie ein Überschußstandard (10000µg/L) und ein Nullstandard (dest. Wasser) verwendet. Bei der Vermessung von Terbutylazin bzw. der Verwendung des Antikörpers K1F4 wird an Stelle des 0,01µg/L-Standards eine 10µg/L Standardlösung verwendet.

5.4.1.6. Enzymreaktion

Pro Kavität werden 250µL Substrat-Chromogenlösung, die auf Raumtemperatur erwärmt wurde hinzupipettiert. Die Reaktion wird nach etwa 5-45 Minuten bei Feststellung einer intensiven Blaufärbung der negativen Kontrollproben durch Zugabe von 50µL 1molarer Schwefelsäure abgestoppt. Es tritt eine Farbänderung von blau nach gelb ein, deren Absorption bei 450nm im Mikrotiterplatten-Photometer bestimmt wird.

5.4.2. Evaluierung von Substratpufferlösungen

Zur Überprüfung der Aktivität von Peroxidase bei unterschiedlichen pH-Werten werden zwei verschiedene Lösungen angesetzt. Lösung A besteht aus 200mmol/L Citrat- bzw. PBS-Puffer mit pH-Werten zwischen 3,0 und 8,0, sowie 282mg/L (3,15mmol/L) Wasserstoffperoxid aus Perhydrit. Lösung B besteht aus 25,2mg (0,11mmol/L) 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 5mL Dimethylsulfoxid. Lösung A und B werden im Verhältnis 20:1 gemischt und je 200µL in Cavitäten von Mikrotiterplatten gefüllt. Dann werden 50µL einer stark verdünnten Peroxidase-Lösung in jede Cavität einpipetiert und nach erfolgter Substratreaktion mit 2 molarer Schwefelsäure abgestoppt. Die Absorption bei $\lambda = 450\text{nm}$ wird im Photometer gemessen.

5.4.3. Festphasenextraktion

Die mit 360mg C18-gebundenen Siliciumpartikeln (endcapped) gefüllten Sep-Pak Classic Festphasenkartuschen (Fa. Waters) wurden mit 3mL Methanol „für die organische Spurenanalyse“, 3mL Ethylacetat „für die organische Spurenanalyse“, 3mL Methanol „für die organische Spurenanalyse“ und 2mL entionisiertem Wasser konditioniert. Für jedes Lösungsmittel oder jede Probenlösung wird eine gereinigte 10mL-Glasspritze gefüllt, mit der Kartusche verbunden und senkrecht durch die Säule gepresst. Bei der Konditionierung der Säule wird eine Flußrate von etwa 10-20mL/min eingehalten.

Vor der Beladung des Säulenmaterials mit der Probe wird der pH-Wert der Lösung mit einem zuvor kalibrierten pH-Meter überprüft, und falls nötig, mit 0,1N Natronlauge auf pH 7 eingestellt. Die Säulen werden unmittelbar nach der Konditionierung per Hand mit 10mL der zu untersuchenden Probe beladen, wobei eine Flußrate von 8-10mL/min möglichst genau eingehalten wird. Danach wird die Festphase gespült. Sofern nicht anders aufgeführt, wurde ein Spülvolumen von 5mL entionisiertem Wasser angewendet. Danach wird an die Kartusche Wasserstrahlvakuum angelegt, um restliches Wasser von der Säule zu vertreiben. Schließlich erfolgt Elution mit 2*2mL Ethylacetat.

Die Lösung wird bei Raumtemperatur und Normaldruck oder einem gemäßigten Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft, und der Rückstand in exakt 2000µL aufgenommen. Die Proben werden bis zu ihrer Vermessung in verschraubbaren 4mL-Braunglasprobengläsern mit Polytetrafluorethylendichtungen bei 4°C aufbewahrt.

5.4.4. Darstellung von „Atrazin“ 14

In einem 1000mL Dreihalskolben mit Rückflußkühler, Tropftrichter und Tieftemperaturthermometer werden 16,0g (86,8mmol) Cyanurchlorid in 200ml Dichlormethan „zur Synthese“ gelöst und im Eis/Kochsalz-Bad auf mindestens 0°C gekühlt. 7,4mL (86,8mmol) Isopropylamin werden mit 80mL entionisiertem Wasser vermischt und unter Kontrolle der Temperatur im Verlauf von etwa 1 Stunde zur Reaktionslösung zugetropft. Die Temperatur darf hierbei

nicht über 5°C steigen. 24,0g (173,5mmol) Kaliumcarbonat werden in 80mL destilliertem Wasser gelöst, vorgekühlt und unter Kontrolle der Temperatur (<5°C) zur Lösung getropft. Die Reaktionsmischung wird 1 Stunde weiter gerührt und danach das Eisbad entfernt. Dann werden 6,9mL (86,8mmol) 70%ige Ethylaminlösung in 20mL Wasser hinzugefügt und unter Rückfluß 3 Stunden gekocht. Es wird über Nacht bei RT gerührt und der auftretende Niederschlag abgesaugt. Die organische Phase vom Filtrat wird abgetrennt, zweimal mit 50mL Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und fitriert. Das Produkt wird bei 4°C auskristallisiert, und nach erneuter Filtration die Rohprodukte vereinigt und aus Methanol umkristallisiert.

„Atrazin“ (2-Chlor-4-Ethylamino-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin) **14**:

Ausbeute: 15,6g (72,3mmol; 83,3%)

MS (EI; 70eV): 217(24, $M(^{37}\text{Cl})^+$), 215(62, $M(^{35}\text{Cl})^+$), 202(33, $M(^{37}\text{Cl})^+-\text{CH}_3$), 200(100, $M(^{35}\text{Cl})^+-\text{CH}_3$), 173(31), 158(10), 138(13), 132(14), 92(20), 68(25), 58(46), 43(28)

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6,20 (s (br), 1H); 5,37 (d? (br), 1H); 4,17 (sept?, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), $J=6,64\text{Hz}$; 3,44 (quar, 2H, CH_2CH_3), $J=6,93\text{Hz}$; 1,23 (d, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), $J=6,64\text{Hz}$; 1,18 (t?, 3H, CH_2CH_3), $J=6,93\text{Hz}$ (Überlagerung der aliphatischen Signale)

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3259, 2973, 1622, 1554, 1405, 1347, 1305, 1168, 1129, 806

5.4.5. Darstellung von „Cl-Dimethoxy“ **15**

In einem 50mL Rundkolben werden 5,5g (25mmol) **14** mit 4,2g (25mmol) 2,5-Dimethoxyanilin in 25mL entionisiertem Wasser suspendiert und unter Rückfluß zum Sieden erhitzt, wobei eine klare Lösung entsteht. Das Ende der Reaktion (hier: 4 Stunden) wird durch Dünnschichtchromatographie in Dichlormethan : Aceton (9:1) festgestellt. Das Reaktionsgemisch wird abgekühlt und zur Neutralisation der entstehenden Salzsäure 2,78g (25mmol) Natriumcarbonat-Lösung in Wasser zugegeben. Ausfallende Produkt wird abfiltriert und aus Methanol umkristallisiert.

„Cl-Dimethoxy“ (2-(2',5'-Dimethoxyphenylamino)-4-Ethylamino-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin) **15**:

Ausbeute: 7,0g (21,6mmol; 86,4%)

MS (EI; 70eV): 332(28, M^+), 317(8, $M^+-\text{CH}_3$), 301(100, $M^+-\text{OCH}_3$), 285(8), 259(14), 217(7), 189(13), 163(9), 138(8), 96(8), 68(10), 43(14)

*¹H-NMR (200MHz, MeOH-*d*₄):* δ [ppm] = 8,18 (s (br), 1H, Ar-H_{ortho}); 6,87 (d, 1H, Ar-H_{meta}), $J=8,79\text{Hz}$; 6,52 (dd, 1H, Ar-H_{para}), $J=2,93\text{Hz}$, $8,79\text{Hz}$; 4,17 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), $J=6,96\text{Hz}$;

3,85 (s, 3H, OCH₃_{meta}); 3,76 (s, 3H, OCH₃_{ortho}); 3,40 (quar, 2H, CH₂CH₃), J=7,14Hz; 1,22 (d, 6H, CH(CH₃)₂), J=6,78Hz; 1,17 (t?, 3H, CH₂CH₃), (Überlagerung der aliphatischen Signale)

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 2970, 1577, 1516, 1477, 1425, 1216

5.4.6. Darstellung von „Cl-OI“ 2

30mL absolutes Dichlormethan wird in einem 100mL Stickstoffkolben mit einem Trockeneis / Aceton-Gemisch auf -78°C gekühlt und im Argonstrom entgast. 4,54mL (47,1mmol) Bortribromid wird im Argonstrom hinzugegeben und ein Tropftrichter mit 3g (9,4mmol) **15** in 40mL abs. Dichlormethan aufgesetzt. Es wird ein Calciumchloridrohr aufgesetzt und das Reaktionsprodukt langsam unter Rühren zugetropft. Nach Zugabe wird der Tropftrichter und das Kühlbad entfernt und das Reaktionsgemisch langsam auf RT erwärmt. Der Niederschlag in der Reaktionsmischung verschwindet und es entsteht eine klare rot-braune Lösung. Der Verlauf der Reaktion wird mit DC (Aceton : Dichlormethan 1:1) geprüft. Nach Verschwinden des Edukts (hier: 2 Stunden) wird die Reaktionsmischung vorsichtig in 40mL gekühltes entionisiertes Wasser gegeben und 30 Minuten gerührt. Nach Filtration des Niederschlags wird die organische Phase abgetrennt, und die wässrige Phase an Natriumchlorid gesättigt und vorsichtig mit Natronlauge auf pH 5-6 eingestellt. Die resultierende Lösung wird ausgiebig mit Dichlormethan extrahiert, und schließlich die organischen Phasen vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wird das Rohprodukt im Vakuum getrocknet und einer Säulenchromatographie mit Kieselgel 60 (40-63µm) unterworfen. Laufmittel ist Aceton : Dichlormethan 50:50. Das Produkt mit Retentionsfaktor R_f=0,41 wird gesammelt, erneut eingengt und aus Acetonitril umkristallisiert.

„Cl-OI“ (2-(2',5'-Dihydroxyphenylamino)-4-Ethylamino-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin) **2**:

Ausbeute: 100mg (0,3mmol; 3,5 %)

MS (EI/Direkteinlaß; 70eV): 304(27, M⁺), 302(100, M⁺-2H), 287(36, M⁺-2H -CH₃), 259(9), 245(10), 231(7), 217(8), 189(8), 181(8), 96(6), 68(6), 58(6), 43(23)

¹H-NMR (200MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 7,16 (s (br), 1H, Ar-H_{ortho}); 6,69 (d, 1H, Ar-H_{meta}), J=8,61Hz; 6,40 (dd, 1H, Ar-H_{para}), J=2,93Hz, 8,61Hz; 4,14 (m, 1H, CH(CH₃)₂), J=6,78Hz; 3,37 (quar, 2H, CH₂CH₃), J=7,14Hz; 1,19 (d, 6H, CH(CH₃)₂), J=6,78Hz; 1,17 (t?, 3H, CH₂CH₃), (Überlagerung der aliphatischen Signale)

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3407, 2973, 1586, 1504, 1343, 1187, 808

5.4.7. Versuch der Darstellung von „N-Dimethoxy“ 7

In einem 1000mL Dreihalskolben mit Rückflußkühler, Tropftrichter und Tieftemperaturthermometer werden 20,0g (108,5mmol) Cyanurchlorid in 300ml Dichlormethan gelöst und im

Eis/Kochsalz-Bad auf mindestens 0°C gekühlt. Der Lösung werden 30,0g Kaliumcarbonat in 200mL Wasser hinzugefügt. 9,3mL (108,4mmol) Isopropylamin in 20mL Dichlormethan werden unter Kontrolle der Temperatur im Verlauf von etwa 1 Stunde zur Reaktionslösung hinzugetropft. Die Temperatur darf hierbei nicht 5°C übersteigen. Die Reaktionsmischung wird 1 Stunde weiter gerührt und danach das Eisbad entfernt. Dann werden 16,6g (108,4mmol) 2,5-Dimethoxyanilin in 40mL Dichlormethan hinzugefügt und unter Rückfluß 3 Stunden gekocht. Nach Abkühlen wird die wäßrige Phase abgetrennt, einmal mit 10mL Dichlormethan gewaschen und die organischen Phasen vereinigt. Diese wird dreimal mit etwa 100mL Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und fitriert. Das Filtrat wird einer Untersuchung mit GC-MS zugeführt.

„N-Dimethoxy“ (2-Chlor-4-(2',5'-Dimethoxyphenylamino)-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin) **7**:

MS (EI; 70eV) = 325(10, $M(^{37}\text{Cl})^+$); 323(30, $M(^{35}\text{Cl})^+$); 308(11, $M^+-\text{CH}_3$), 294(35, $M(^{37}\text{Cl})^+-\text{OCH}_3$), 292(100, $M(^{35}\text{Cl})^+-\text{OCH}_3$), 250(14), 189(4), 163(10), 147(4), 68(4), 43(6)

2,4-Dichlor-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin **5**:

MS (EI; 70eV) = 208(8), 206(10), 195(8), 193(60), 191(100), 94(30), 88(6), 69(10), 62(8)

Propazin **8**:

MS (EI; 70eV) = 231(20), 229(63), 216(25), 214(100), 189(10), 187(30), 174(20), 172(65), 152(15), 100(19), 68(21), 58(50)

2,4-Disopropylamino-6-(2,5-Dimethoxyphenylamino)-1,3,5-Triazin **9**:

MS (EI; 70eV) = 346(10), 315(100), 273(12), 231(6), 189(18), 68(5)

5.4.8. Darstellung von „N-Dimethoxy“ **7**

In einem 1000mL Dreihalskolben mit Rückflußkühler, Tropftrichter und Tieftemperaturthermometer werden 20,0g (108,5mmol) Cyanurchlorid in 250ml Dichlormethan gelöst und im Eis/Kochsalz-Bad auf mindestens 0°C gekühlt. Der Lösung werden 30,0g Kaliumcarbonat in 200mL Wasser hinzugefügt. Dann werden 16,6g (108,4mmol) 2,5-Dimethoxyanilin in 75mL Dichlormethan unter Kontrolle der Temperatur im Verlauf von etwa 1 Stunde zur Reaktionslösung hinzugetropft. Die Temperatur darf hierbei nicht über 5°C steigen. Die Reaktionsmischung wird 1 Stunde weiter gerührt und danach das Eisbad entfernt. Dann werden 9,3mL (108,4mmol) Isopropylamin in 20mL Dichlormethan hinzugefügt und unter Rückfluß 3 Stunden gekocht. Nach Abkühlen wird die wäßrige Phase abgetrennt, einmal mit 25mL Dichlormethan gewaschen und die organischen Phasen vereinigt. Diese wird dreimal mit etwa 60mL Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und fitriert. Das Filtrat wird auf etwa die Hälfte einrotiert und das Produkt bei 4°C auskristallisiert. Das Kristallisat wird einer Säulenchromatographie mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Aceton}$ (9:1) über Kieselgel 60 (Partikeldurchmesser: 40-63µm) unterworfen und die entsprechenden Fraktionen mit Produkt ($R_f=0,63$) vereinigt.

Schließlich wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und im Vakuum getrocknet.

„N-Dimethoxy“ (2-Chlor-4-(2',5'-Dimethoxyphenylamino)-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin) **7**:

Ausbeute: 19,24g (59,4mmol; 54,8%)

MS (EI; 70eV) = 325(10, $M(^{37}\text{Cl})^+$); 323(30, $M(^{35}\text{Cl})^+$); 308(11, $M^+-\text{CH}_3$), 294(35, $M(^{37}\text{Cl})^+-\text{OCH}_3$), 292(100, $M(^{35}\text{Cl})^+-\text{OCH}_3$), 250(14), 189(4), 163(10), 147(4), 68(4), 43(6)

$^1\text{H-NMR}$ (200MHz, MeOH-d_4), δ [ppm] = 8,04 (s (br), 1H, $\text{Ar-H}_{\text{ortho}}$); 6,91 (d, 1H, $\text{Ar-H}_{\text{meta}}$), $J=8,88\text{Hz}$; 6,59 (dd, 1H, $\text{Ar-H}_{\text{para}}$), $J=3,01\text{Hz}$, 8,88Hz; 4,21 (sept?, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), $J=6,54\text{Hz}$; 3,86 (s, 3H, $\text{OCH}_3_{\text{meta}}$); 3,76 (s, 3H, $\text{OCH}_3_{\text{ortho}}$); 1,25 (d, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), $J=6,54\text{Hz}$

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3408, 1573, 1523, 1489, 1217, 803

5.4.9. Darstellung von „N-Monool“ **11**

In einem 50mL Rundkolben mit Stickstoffhahn werden 20mL Acetonitril p.A. mit Argon entgast und unter Rühren 12g (80mmol) Natriumiodid und 6,47g (20 mmol) „N-Dimethoxy“ **7** hinzugegeben. Der Suspension wird dann portionsweise 10,1mL (80mmol) Chlortrimethylsilan hinzugefügt. Die Reaktion wird für 48 Stunden unter leichtem Rückfluß zum Sieden erhitzt. Die Reaktionsmischung wird mit 20mL entionisiertem Wasser gequenscht und nach kurzem Rühren zwei Mal mit Ether ausgeschüttelt. Die Etherphasen werden vereinigt und mit 10% (w/v) Natriumthiosulfat-Lösung gegengeschüttelt, um gebildetes Iod zu entfernen. Danach wird noch zwei Mal mit Wasser ausgeschüttelt. Die Etherphase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird einer Säulenchromatographie mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Aceton}$ (9:1) über Kieselgel 60 (Partikeldurchmesser: 40-63 μm) unterworfen und die entsprechenden Fraktionen mit Produkt ($R_f=0.36$) vereinigt. Schließlich wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und im Vakuum getrocknet.

„N-Monool“ 2-Chlor-4-(2'-Methoxy-5'-Hydroxyphenylamino)-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin **11**:

Ausbeute: 0,65g (2,1mmol; 10,5 %)

MS (EI; 70eV): 311(8, $M(^{37}\text{Cl})^+$), 309(23, $M(^{35}\text{Cl})^+$), 294(5, $M^+-\text{CH}_3$), 280(37, $M(^{37}\text{Cl})^+-\text{OCH}_3$), 278(100, $M(^{35}\text{Cl})^+-\text{OCH}_3$), 236(25), 175(12), 121(11), 68(11), 43(14)

$^1\text{H-NMR}$ (200MHz, MeOH-d_4): δ [ppm] = 7,83 (s (br), 1H, $\text{Ar-H}_{\text{ortho}}$); 6,81 (d, 1H, $\text{Ar-H}_{\text{meta}}$), $J=8,79\text{Hz}$; 6,47 (dd, 1H, $\text{Ar-H}_{\text{para}}$), $J=2,93\text{Hz}$, 8,79Hz; 4,12 (sept?, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), $J=6,59\text{Hz}$; 3,82 (s, 3H, OCH_3); 1,24 (d, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), $J=6,59\text{Hz}$

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3393, 1582, 1526, 1489, 1439, 1387, 802

Nebenprodukte:

2-Iod-4-Isopropylamino-6-(2,5-Dimethoxyphenylamino)-1,3,5-Triazin **12**:

MS (EI; 70eV) = 415(34), 400(15), 384(100), 342(6), 204(12), 189(16), 163(15), 68(18)

2-Iod-4-Isopropylamino-6-(2-Hydroxy-5-Methoxyphenylamino)-1,3,5-Triazin **13**:

MS (EI; 70eV) = 401(22), 370(100), 328(5), 244(12), 190(6), 175(18), 68(17)

5.4.10. Darstellung von „N-Diol“ **1**

30mL absolutes Dichlormethan werden in einem 100mL Stickstoffkolben mit einem Trockeneis/Aceton-Gemisch auf -78°C gekühlt und im Argonstrom entgast. 6,25mL (mmol) Bromtribromid werden im Argonstrom hinzugegeben und ein Tropftrichter mit 3g (9,3mmol) „N-Dimethoxy“ **7** in 40mL abs. Dichlormethan aufgesetzt. Es wird ein Calciumchloridrohr aufgesetzt und das Reaktionsprodukt langsam unter Rühren zugetropft. Nach Zugabe wird der Tropftrichter und das Kühlbad entfernt und das Reaktionsgemisch langsam auf RT erwärmt. Der Niederschlag in der Reaktionsmischung verschwindet und es entsteht eine klare rotbraune Lösung. Der Verlauf der Reaktion wird mit DC (Aceton : Dichlormethan 1:1) geprüft. Nach Verschwinden des Edukts (hier: 2 Stunden) wird die Reaktionsmischung vorsichtig in 40mL gekühltes entionisiertes Wasser gegeben und 30 Minuten gerührt. Der ausfallende Niederschlag wird mit wenig Wasser gewaschen, unter vermindertem Druck getrocknet und einer Säulenchromatographie mit Kieselgel 60 (40-63 μm) unterworfen. Laufmittel ist Aceton : Dichlormethan 30:70. Das Produkt mit Retentionsfaktor $R_f=0,28$ wird gesammelt, eingengt und aus Acetonitril umkristallisiert.

„N-Diol“ (2-Chlor-4-(2',5'-Dihydroxyphenylamino)-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin) **1**:

Ausbeute: 150mg (0,5mmol; 5,4 %)

MS (EI/Direkteinlaß; 70eV): 297(30, $\text{M}^{(37}\text{Cl})^+$), 295(100, $\text{M}^{(35}\text{Cl})^+$), 293(20, M^+-2H), 280(42, M^+-CH_3), 278(85, M^+-OH), 260(8), 235(18), 218(6), 175(30), 150(18), 104(6), 80(8), 68(8), 58(11)

$^1\text{H-NMR}$ (200MHz, $\text{MeOH-}d_4$): δ [ppm] = 7,46 (s (br), 1H, Ar- H_{ortho}); 6,76 (d, 1H, Ar- H_{meta}), $J=8,79\text{Hz}$; 6,55 (dd, 1H, Ar- H_{para}), $J=2,75\text{Hz}$, $8,79\text{Hz}$; 4,26 (sept?, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), $J=6,59\text{Hz}$; 1,29 (d, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), $J=6,59\text{Hz}$

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3258, 1630, 1578, 1537, 1510, 1453, 1423, 1394, 1232, 1007

5.4.11. Darstellung von „N-3,4-Dimethoxy“ **17**

In einem 1000mL Dreihalskolben mit Rückflußkühler, Tropftrichter und Tieftemperaturthermometer werden 20,0g (108,5mmol) Cyanurchlorid in 250ml Dichlormethan gelöst und im Eis/Kochsalz-Bad auf mindestens 0°C gekühlt. Der Lösung werden 30,0g Kaliumcarbonat in 200mL Wasser hinzugefügt. Dann werden 16,6g (108,4mmol) 3,4-Dimethoxyanilin in 75mL

Dichlormethan unter Kontrolle der Temperatur im Verlauf von etwa 1 Stunde zur Reaktionslösung hinzugetropft. Die Temperatur darf hierbei nicht über 5°C steigen. Die Reaktionsmischung wird 1 Stunde weiter gerührt und danach das Eisbad entfernt. Dann werden 9,3mL (108,4mmol) Isopropylamin in 20mL Dichlormethan hinzugefügt und unter Rückfluß 3 Stunden gekocht. Nach Abkühlen wird die wäßrige Phase abgetrennt, einmal mit 25mL Dichlormethan gewaschen und die organischen Phasen vereinigt. Diese wird dreimal mit etwa 60mL Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und fitriert. Das Filtrat wird auf etwa die Hälfte einrotiert und das Produkt bei 4°C auskristallisiert. Das Kristallisat wird einer Säulenchromatographie mit CH₂Cl₂/Aceton (9:1) über Kieselgel 60 (Partikeldurchmesser: 40-63µm) unterworfen und die entsprechenden Fraktionen mit Produkt (R_f=0,41) vereinigt. Schließlich wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und im Vakuum getrocknet.

„N-3,4-Dimethoxy“ (2-Chlor-4-(3',4'-Dimethoxyphenylamino)-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin) **17**:

Ausbeute: 10,2g (31,5mmol; 29,1%)

MS (EI; 70eV) = 325(35, M(³⁷Cl)⁺); 323(100, M(³⁵Cl)⁺); 310(35, M(³⁷Cl)⁺-CH₃), 308(100, M(³⁵Cl)⁺-CH₃), 292(4), 281(7), 266(12), 178(24), 163(35), 135(21), 104(23), 68(25), 58(18), 43(32)

¹H-NMR (200MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7,42 (s (br), 1H, Ar-H); 4,19 (sept?, 1H, CH(CH₃)₂), J=6,58Hz; 3,89 (s, 3H, OCH₃ meta); 3,88 (s, 3H, OCH₃ para); 1,25 (d, 6H, CH(CH₃)₂), J=6,64Hz; (breite aromatische Signale zwischen δ=6,8 und 7,2ppm)

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3258, 1630, 1578, 1537, 1510, 1453, 1423, 1394, 1232, 1007

5.4.12. Synthese von Modellsubstanzen für Huminstoffe aus Hydrochinon

5.4.12.1. Darstellung von HS100 (Modellsubstanz für Huminsäuren)

Einer Lösung von 15g (141,5mmol) wasserfreies Natriumcarbonat in 200mL entionisiertem Wasser werden 5g (45,4mmol) Hydrochinon hinzugefügt und die Lösung in einem offenen Becherglas bei Raumtemperatur unter Rühren stehen gelassen. Das Hydrochinon wird durch Einwirken von Luftsauerstoff über einen Zeitraum von zehn Tagen oxidiert. Die Lösung wird mit 2M Salzsäure auf pH 2 angesäuert, wobei sich sofort ein schwarzer Niederschlag bildet. Man läßt die Lösung 2 Stunden stehen und zentrifugiert die ausgefallene „Huminsäure“ von der Mutterlauge ab. Der Niederschlag wird viermal in 0,1M Salzsäure aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Schließlich wird bis zur vollständigen Neutralisation der Waschlösung mit dest. Wasser gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wird gefriergetrocknet. Man erhält eine schwarze, leicht metallisch schimmernde Substanz. (HS100)

Ausbeute: 1,2g (24%, auf Hydrochinon bezogen)
Elementaranalyse: gefunden C (54,00%); H (3,51%); N (< NG); O (44,55%)
IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3397, 1718, 1620, 1200, 824

5.4.12.2. Darstellung von FS101 (Modellsubstanz für Fulvinsäuren)

Die bei der Darstellung der Modellhuminsäure HS100 gemäß Kapitel 5.4.12.1. erhaltene Mutterlauge und die Waschflüssigkeiten werden vereinigt, im Rotationsverdampfer auf etwa 50-60mL eingedampft, filtriert und dreimal mit 30mL Diethylether ausgeschüttelt. Gelöster Ether wird im Vakuum entfernt und die wäßrige Phase auf eine 30cm lange Säule mit einem Innendurchmesser von 3cm gegeben, die das lipophile Adsorberharz Amberlite XAD-8 enthält. Die „Fulvinsäure“ wird auf dem Trägermaterial zurückgehalten. Mit 0,2M Natronlauge wird die dunkelbraun gefärbte Fulvinsäure eluiert. Das Eluat wird auf eine 20cm lange Säule (Innendurchmesser 3cm) mit dem Kationenaustauscherharz Dowex 50W (Gegenion: H⁺) gegeben und mit Wasser eluiert. Das Eluat wird am Rotationsverdampfer auf etwa 50mL eingeeengt und gefriergetrocknet. Man erhält eine kristalline, braune Substanz. (FS101)

Ausbeute: 300mg (6%, auf Hydrochinon bezogen)
Elementaranalyse: C (50,71%); H (3,67%); N (< NG); O (47,50%)
IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3397, 1715, 1620, 1200 cm⁻¹

5.4.12.3. Darstellung von HS100A (Modellsubstanz für Atrazinbeladene Huminsäuren)

Zur Darstellung einer atrazinbeladenen Modellsubstanz werden 250mg (1,16mmol) Atrazin in 200mL Wasser suspendiert. Der gesättigten Atrazinslösung werden 15g (141,5mmol) wasserfreies Natriumcarbonat und 5g (45,4mmol) Hydrochinon hinzugefügt. Der weitere Syntheseverlauf entspricht dem gleichem Verfahren wie für die Darstellung der Huminsäure HS100 in Kapitel 5.4.12.1. beschrieben.

Ausbeute: 250mg (5%, auf Hydrochinon bezogen)
Elementaranalyse: C (52,67%); H (3,56%); N (0,26%); O (43,12%)
IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3432, 1719, 1620, 1203, 824

5.4.12.4. Darstellung von HS100T (Modellsubstanz für Terbutylazinbeladene Huminsäuren)

Zur Darstellung einer atrazinbeladenen Modellsubstanz werden 250mg (1,16mmol) Atrazin in 200mL Wasser suspendiert. Der gesättigten Atrazinslösung werden 15g (141,5mmol) wasserfreies Natriumcarbonat und 5g (45,4mmol) Hydrochinon hinzugefügt. Der weitere Syntheseverlauf entspricht dem gleichem Verfahren wie für die Darstellung der Huminsäure HS100 in Kapitel 5.4.12.1. beschrieben.

Ausbeute: 250mg (5%, auf Hydrochinon bezogen)
Elementaranalyse: C (51,32%); H (3,18%); N (0,40%); O (43,56%)
IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3422, 1719, 1619, 1210, 823

5.4.13. Synthese von Modellsubstanzen für Huminstoffe aus p-Benzochinon**5.4.13.1. Darstellung von BQ-125 (Modellsubstanz für Huminsäuren)**

In einem Becherglas werden 2g (18,5mmol) p-Benzochinon in 100mL entionisiertem Wasser suspendiert und 30 Minuten gerührt. Danach erfolgt Zugabe einer Lösung von 15g (141,5mmol) Natriumcarbonat in 100mL entionisiertem Wasser. Es setzt sofortige schwärzgrün Färbung der Reaktionsmischung ein. Die Lösung wird 20 Stunden bei RT an der Luft gerührt und dann filtriert, dreimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt, mit 2 molarer Schwefelsäure auf pH 1 angesäuert und der auftretende Niederschlag abzentrifugiert. Das Zentrifugat wird verworfen und der Rückstand je zwei Mal mit 0,2 molarer Schwefelsäure und Wasser gewaschen. Der gewaschene Rückstand wird lyophilisiert und gewogen.

Ausbeute: 163mg (8,2%; bezogen auf Einwaage p-Benzochinon)

Elementaranalyse: C (54,21%); H (3,33%); N (< NG)

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3400, 1717, 1623, 1494, 1455, 1202, 823

5.4.13.2. Darstellung von BQ310A (Modellsubstanz für Atrazinbeladene Huminsäuren)

Versuchsdurchführung erfolgt wie unter Abschnitt 5.4.13.1., allerdings werden im ersten Schritt neben 2g (18,5mmol) p-Benzochinon noch 100mg (0,34 mmol) (VI) hinzugefügt.

Ausbeute: 353mg (16,8%; bezogen auf Einwaage Edukte)

Elementaranalyse: C (57,56%); H (3,19%); N (1,51 %)

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3436, 1722, 1629, 1452, 1199, 819

5.4.13.3. Darstellung von BQ-400A (Modellsubstanz für Atrazinbeladene Huminsäuren)

Versuchsdurchführung erfolgt wie unter Abschnitt 5.4.13.1., allerdings werden im ersten Schritt neben 1g (9,3mmol) p-Benzochinon noch 20mg (0,07 mmol) (VI) hinzugefügt.

Ausbeute: 87mg (7,9%; bezogen auf Einwaage Edukte)

Elementaranalyse: C (54,83%); H (3,38%); N (0,45%)

IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3408, 1722, 1630, 1452, 1201, 821

5.5. Gefahrenhinweise für verwendete Chemikalien

Im folgenden sind Hinweise für den sicheren Umgang mit den in dieser Arbeit verwendeten gefährlichen Stoffe und Zubereitungen nach §4a Gefahrstoffverordnung (GefStV) bzw. nach den Regeln für Sicherheit und Gesundheitsschutz beim Umgang mit Gefahrstoffen im Hochschulbereich (GUV 19.17) sowie zu ihren gesundheitlichen Gefahren und ihrer Entsorgung aufgeführt [253, 254, 255].

- **Aceton:** CAS-Nr.: 67-64-1



Gef.-Sym.: F 'Leichtentzündlich'

R-Sätze: 11

S-Sätze: 2-9-16-23-33

MAK-Wert: 500 mL/m³; 1200 mg/m³

Allgemeine Sicherheitsratschläge: Behälter, Anlage oder Apparatur dicht geschlossen halten. An der Austritts- oder Entstehungsstelle absaugen. Raumlüftung. Zündquellen fernhalten. Anlageteile, Apparaturen und Behälter erden. Direkten Kontakt mit Augen, Haut oder Kleidung vermeiden. Schutzkleidung tragen. Bei Atemschutz: Gasfilter, Filtertyp AX

Gesundheitliche Gefahren: Wirkt narkotisierend. Mäßig schleimhautreizend. Kontakt mit dem Auge führt zu schweren Hornhautschäden.

Entsorgung: Rückstände in den Sammelbehälter für halogenfreie organische Lösungsmittel geben. Abfallschlüssel: 070704

- **p-Benzochinon:** CAS-Nr.: 106-51-4



Gef.-Sym.: T+ 'Sehr giftig'; N 'Umweltgefährlich'

R-Sätze: 23/25-36/37/38-50

S-Sätze: 26-28.1-45-61

MAK-Wert: 0,45mg/m³

Allgemeine Sicherheitsratschläge: Staubbildung vermeiden. An der Austritts- oder Entstehungsstelle absaugen. Gute Raumlüftung. Direkten Kontakt mit Augen, Haut oder Kleidung unbedingt vermeiden. Dichte Schutzkleidung tragen. Bei Atemschutz: Partikelfilter in Kombination mit Gasfilter Filtertyp A.

Gesundheitliche Gefahren: Giftig beim Einatmen und Verschlucken. Reizt die Haut, Augen und Atmungsorgane.

Entsorgung: Rückstände in den Sammelbehälter für halogenfreie organische Lösungsmittel geben. Abfallschlüssel: 070704

• **Bortribromid:**

CAS-Nr.: 10294-33-4

**Gef.-Sym.:** T+ 'Sehr giftig'; C 'Ätzend'**R-Sätze:** 14-26/28-35**S-Sätze:** S1/2-9-26-28.6-36/37/39-45**MAK-Wert:** 10mg/m³

Allgemeine Sicherheitsratschläge: Behälter, Anlage oder Apparatur stets dicht geschlossen halten. An der Austritts- oder Entstehungsstelle absaugen. Sehr gute Raumlüftung. Direkten Kontakt mit Augen, Haut oder Kleidung unbedingt vermeiden. Dichte Schutzkleidung tragen. Bei Atemschutz: Gasfilter, Filtertyp B, ggf. in Kombination mit Partikelfilter.

Gesundheitliche Gefahren: Verursacht schwere Verätzungen. Reizt die Atmungsorgane. Bewirkt auf Haut- oder Schleimhautgewebe in Abhängigkeit von Konzentration und Einwirkungsdauer zunehmend Entzündungen und Nekrosen. Besonders gefährdet sind die Augen durch Hornhautverätzungen oder Perforation. Hustenreiz, Entzündung der oberen Atemwege bis zu Ödemen. Erstickungsgefahr! Beim Verschlucken Lebensgefahr. Toxische Wirkung auf Leber, Nieren.

Entsorgung: In geeigneter Apparatur vorsichtig (Starke Wärmeentwicklung!) unter Rühren in 10%ige NaOH eintropfen. Anschließend Rückstände in den Sammelbehälter (Hg-, Tl-, As-, Se-, Be-freie wässrige Lösungen) geben.

• **Dichlormethan:**

CAS-Nr.: 75-09-2

**Gef.-Sym.:** Xn 'Gesundheitsschädlich'**R-Sätze:** 40**S-Sätze:** 2-23-24/25-36/37**MAK-Wert:** 100mL/m³ (Luft)

Allgemeine Sicherheitsratschläge: Möglichst nur in geschlossener Anlage oder Apparatur einsetzen. Behälter, Anlage oder Apparatur stets dicht geschlossen halten. An der Austritts- oder Entstehungsstelle absaugen. Sehr gute Raumlüftung. Zündquellen fernhalten. Direkten Kontakt mit Augen, Haut oder Kleidung unbedingt vermeiden. Dichte Schutzkleidung tragen. Bei Atemschutz: Gasfilter, Filtertyp AX (nur bei reinem Dichlormethan; im Gemisch mit anderen Lösungsmitteln ist Atemschutz nur mit umgebungsluftunabhängigen Atemschutzgeräten möglich.).

Gesundheitliche Gefahren: Kann zu Reizungen der Haut, Augen und Atemwege und zu unspezifischen Vergiftungserscheinungen führen wie Kopfschmerzen, Schwindel, Benommenheit, Übelkeit, Erbrechen, Husten, Atembeschwerden und Bewusstlosigkeit.

Entsorgung: Rückstände in den Sammelbehälter für halogenhaltige organische Lösungsmittel geben. Abfallschlüssel: 070703

- **Dimethylsulfoxid:** CAS-Nr.: 67-68-5

Gef.-Sym.: -
R-Sätze: -
S-Sätze: 24/25
MAK-Wert: 160 mg/m³

Allgemeine Sicherheitsratschläge: Behälter, Anlage oder Apparatur dicht geschlossen halten. An der Austritts- oder Entstehungsstelle absaugen. Raumlüftung. Zündquellen fernhalten. Anlageteile, Apparaturen und Behälter erden. Direkten Kontakt mit Augen, Haut oder Kleidung vermeiden. Schutzkleidung tragen.

Gesundheitliche Gefahren: Erzeugt auf Haut und Schleimhäuten Rötungen und Juckreiz

Entsorgung: Rückstände in den Sammelbehälter für halogenfreie organische Lösungsmittel geben. Abfallschlüssel: 070704

- **Ethylacetat:** CAS-Nr.: 141-78-6



Gef.-Sym.: F 'Leichtentzündlich'
R-Sätze: 11
S-Sätze: 2-16-23-29-33
MAK-Wert: 400 mL/m³; 400 mg/m³

Allgemeine Sicherheitsratschläge: Behälter, Anlage oder Apparatur stets dicht geschlossen halten. An der Austritts- oder Entstehungsstelle absaugen. Gute Raumlüftung. Zündquellen fernhalten. Anlageteile, Apparaturen und Behälter erden. Direkten Kontakt mit Augen, Haut oder Kleidung vermeiden. Schutzkleidung tragen. Bei Atemschutz: Gasfilter, Filtertyp A

Gesundheitliche Gefahren: Wirkt narkotisierend, bei höheren Dosen kann Atemlähmung eintreten. Schleimhautreizend.

Entsorgung: Rückstände in den Sammelbehälter für halogenfreie organische Lösungsmittel geben. Abfallschlüssel: 070704

- **n-Hexan:** CAS-Nr.: 110-54-3



Gef.-Sym.: F 'Leichtentzündlich'; Xn 'Gesundheitsschädlich'
R-Sätze: 11-48/20
S-Sätze: 2-9-16-24/25-29-51
MAK-Wert: 50 mL/m³; 180 mg/m³

Allgemeine Sicherheitsratschläge: Behälter, Anlage oder Apparatur stets dicht geschlossen halten. An der Austritts- oder Entstehungsstelle absaugen. Gute Raumlüftung. Zündquellen fernhalten. Anlageteile, Apparaturen und Behälter erden. Direkten Kontakt mit Augen, Haut

oder Kleidung vermeiden. Dichte Schutzkleidung tragen. Bei Atemschutz: Gasfilter, Filtertyp A

Gesundheitliche Gefahren: Gesundheitsschädlich. Narkotisierend. Schädigt das Nervensystem. Haut- und schleimhautreizend. Gefahr von Lungenödemen. Bei hohen Dosen kann der Tod eintreten.

Entsorgung: Rückstände in den Sammelbehälter für halogenfreie organische Lösungsmittel geben. Abfallschlüssel: 070704

• **Hydrochinon:** CAS-Nr.: 123-31-9



Gef.-Sym.: Xn 'Gesundheitsschädlich'
R-Sätze: 21/22-36/38
S-Sätze: 2-22-26-37
MAK-Wert: 2 mg/m³ (gemessen als Gesamtstaub)

Allgemeine Sicherheitsratschläge: Staubbildung vermeiden. An der Austritts- oder Entstehungsstelle absaugen. Raumlüftung. Direkten Kontakt mit Augen, Haut oder Kleidung unbedingt vermeiden. Dichte Schutzkleidung tragen. Bei Atemschutz: Filtertyp A, ggf. in Kombination mit Partikelfilter.

Gesundheitliche Gefahren: Wirkt lokal reizend auf Haut und Schleimhäute.

Entsorgung: Rückstände in den Sammelbehälter für halogenfreie organische Lösungsmittel geben. Abfallschlüssel: 070704

• **Methanol:** CAS-Nr.: 67-56-1



Gef.-Sym.: F 'Leichtentzündlich'; T 'Giftig'
R-Sätze: 11-23/25
S-Sätze: 1/2-7-16-24-45
MAK-Wert: 200 mL/m³; 260 mg/m³

Allgemeine Sicherheitsratschläge: Behälter, Anlage oder Apparatur stets dicht geschlossen halten. An der Austritts- oder Entstehungsstelle absaugen. Gute Raumlüftung. Zündquellen fernhalten. Anlageteile, Apparaturen und Behälter erden. Direkten Kontakt mit Augen, Haut oder Kleidung unbedingt vermeiden. Dichte Schutzkleidung tragen. Bei Atemschutz: Gasfilter, Filtertyp AX

Gesundheitliche Gefahren: Giftig. Narkotisierend. Schädigt das Zentralnervensystem. Haut- und schleimhautreizend. Aufnahme größerer Mengen führt zur Erblindung. Gefahr der Atemlähmung und Herzstillstand. Resorption toxischer Mengen durch die Haut möglich.

Entsorgung: Rückstände in den Sammelbehälter für halogenfreie organische Lösungsmittel geben. Abfallschlüssel: 070704

- **Modellsubstanzen für Huminstoffe** CAS-Nr.: -

Gef.-Sym.: Noch nicht vollständig geprüfter Stoff
R-Sätze: unbekannt
S-Sätze: unbekannt
MAK-Wert: unbekannt

Allgemeine Sicherheitsratschläge: Staubbildung vermeiden. An der Austritts- oder Entstehungsstelle absaugen. Raumlüftung. Direkten Kontakt mit Augen, Haut oder Kleidung vermeiden. Schutzkleidung tragen. Bei Atemschutz: Filtertyp A, ggf. in Kombination mit Partikelfilter.

Gesundheitliche Gefahren: unbekannt

Entsorgung: Kleinere Mengen mit viel Wasser fortspülen. Größere Mengen als organische Feinchemikalie der Entsorgung zuführen.

- **Natriumazid:** CAS-Nr.: 26628-22-8



Gef.-Sym.: T+ 'Sehr giftig'
R-Sätze: 28-32
S-Sätze: 1/2-28-45
MAK-Wert: 0.2 mg/m³

Allgemeine Sicherheitsratschläge: Staubbildung vermeiden. An der Austritts- oder Entstehungsstelle absaugen. Gute Raumlüftung. Von Säuren fernhalten. Direkten Kontakt mit Augen, Haut oder Kleidung vermeiden. Dichte Schutzkleidung tragen. Bei Atemschutz: Partikelfilter

Gesundheitliche Gefahren: Schleimhautreizungen nach Verschlucken im Mund, Rachen, Speiseröhre und Magen-Darmtrakt. Gefahr der Hautresorption. Systemische Wirkung: Herzkreislaufstörungen. Störungen des Zentralen Nervensystems. Durchfall. Müdigkeit. Toxische Wirkung auf Nieren. Mengen von 5-10 mg können den Sehnerv lähmen, tiefe Ohnmacht usw. hervorrufen (Wirkung beruht auf der Blockade des Cytochromoxydase-Systems).

Entsorgung: Kleinere Mengen vorsichtig in geeigneter Apparatur in heißem Wasser zersetzen (starke Stickstoffbildung!) und mit viel Wasser fortspülen; Größere Mengen als anorganische Feinchemikalie der Entsorgung zuführen. Abfallschlüssel: 160502

- **Natriumcarbonat:** CAS-Nr.: 497-19-8



Gef.-Sym.: Xi 'Reizend'
R-Sätze: 36
S-Sätze: 2-22-26

Allgemeine Sicherheitsratschläge: Staubbildung vermeiden. An der Austritts- oder Entstehungsstelle absaugen. Raumlüftung. Von Säuren fernhalten (CO₂-Entwicklung). Direkten Kontakt mit Augen, Haut oder Kleidung vermeiden. Schutzkleidung tragen. Bei Atemschutz: Partikelfilter

Entsorgung: Kleine Mengen (bis 1kg) mit viel Wasser wegspülen; Größere Mengen als anorganische Feinchemikalie der Entsorgung zuführen. Abfallschlüssel: 160502

• **Natriumhydroxid:** CAS-Nr.: 1310-73-2



Gef.-Sym.: C 'Ätzend'

R-Sätze: 35

S-Sätze: 1/2-26-37/39-45

MAK-Wert: 2 mg/m³ (gemessen als Gesamtstaub)

Allgemeine Sicherheitsratschläge: Staubbildung vermeiden. An der Austritts- oder Entstehungsstelle absaugen. Gute Raumlüftung. Direkten Kontakt mit Augen, Haut oder Kleidung unbedingt vermeiden. Dichte laugenfeste Schutzkleidung tragen. Bei Atemschutz: Partikelfilter

Gesundheitliche Gefahren: Wirkt stark ätzend auf die Haut, Augen und Schleimhäute. Führt zu tiefgreifenden Gewebeerstörungen.

Entsorgung: In geeigneter Apparatur vorsichtig (Starke Wärmeentwicklung!) mit Salzsäure neutralisieren, neutrale Kochsalzlösung mit viel Wasser wegspülen oder Rückstände in den Sammelbehälter für Laugen geben. Abfallschlüssel: 060299

• **ortho-Phosphorsäure, konzentriert:** CAS-Nr.: 7664-38-2



Gef.-Sym.: C 'Ätzend'

R-Sätze: 34

S-Sätze: 1/2-26-45

Allgemeine Sicherheitsratschläge: An der Austritts- oder Entstehungsstelle absaugen. Raumlüftung. Direkten Kontakt mit Augen, Haut oder Kleidung vermeiden. Schutzkleidung tragen. Bei Atemschutz: Partikelfilter Filtertyp P2.

Gesundheitliche Gefahren: Verursacht schwere Verätzungen. Reizt die Atmungsorgane. Bewirkt auf Haut- oder Schleimhautgewebe in Abhängigkeit von Konzentration und Einwirkungsdauer zunehmend Entzündungen und Nekrosen. Besonders gefährdet sind die Augen durch Hornhautverätzungen oder Perforation. Hustenreiz, Entzündung der oberen Atemwege bis zu Ödemen. Erstickungsgefahr! Beim Verschlucken konzentrierter Säuren Lebensgefahr.

Entsorgung: Rückstände in den Sammelbehälter für Säuren und schwermetallhaltige saure Lösungen geben. Abfallschlüssel: 060199

- **Salzsäure, konzentriert:**

CAS-Nr.: 7647-01-0



Gef.-Sym.: C 'Ätzend'

R-Sätze: 34-37

S-Sätze: 1/2-26-45

MAK-Wert: 5 mL/m³; 7 mg/m³ (Angaben für Chlorwasserstoff)

Allgemeine Sicherheitsratschläge: Behälter, Anlage oder Apparatur – insbesondere bei konzentrierter Säure - dicht geschlossen halten. An der Austritts- oder Entstehungsstelle absaugen. Bei konzentrierter Säure gute Raumlüftung. Direkten Kontakt mit Augen, Haut oder Kleidung unbedingt vermeiden. Dichte Schutzkleidung tragen. Bei Atemschutz: Gasfilter, Filtertyp T, evtl. auch B, ggf. in Kombination mit Partikelfilter.

Gesundheitliche Gefahren: Verursacht schwere Verätzungen. Reizt die Atmungsorgane. Bewirkt auf Haut- oder Schleimhautgewebe in Abhängigkeit von Konzentration und Einwirkungsdauer zunehmend Entzündungen und Nekrosen. Besonders gefährdet sind die Augen durch Hornhautverätzungen oder Perforation. Hustenreiz, Entzündung der oberen Atemwege bis zu Ödemen. Erstickungsgefahr! Beim Verschlucken konzentrierter Säuren Lebensgefahr.

Entsorgung: Rückstände in den Sammelbehälter für Säuren und schwermetallhaltige saure Lösungen geben. Abfallschlüssel: 060199

- **Schwefelsäure, konzentriert:**

CAS-Nr.: 7664-93-9



Gef.-Sym.: C 'Ätzend'

R-Sätze: 35

S-Sätze: 1/2-26-30-45

MAK-Wert: 1 mg/m³

Allgemeine Sicherheitsratschläge: Beim Verdünnen Säure stets in Wasser geben, niemals umgekehrt!!! Aerosolbildung vermeiden. An der Austritts- oder Entstehungsstelle absaugen. Raumlüftung. Direkten Kontakt mit Augen, Haut oder Kleidung strikt vermeiden. Dichte, säurefeste Schutzkleidung tragen. Bei Atemschutz: Partikelfilter

Gesundheitliche Gefahren: Verursacht schwere Verätzungen. Reizt die Atmungsorgane. Bewirkt auf Haut- oder Schleimhautgewebe in Abhängigkeit von Konzentration und Einwirkungsdauer zunehmend Entzündungen und Nekrosen. Besonders gefährdet sind die Augen durch Hornhautverätzungen oder Perforation. Hustenreiz, Entzündung der oberen Atemwege bis zu Ödemen. Erstickungsgefahr! Beim Verschlucken konzentrierter Säuren Lebensgefahr.

Entsorgung: Rückstände in den Sammelbehälter für Säuren und schwermetallhaltige saure Lösungen geben. Abfallschlüssel: 060199

- **Triazine (am Beispiel Atrazin):** CAS-Nr.: 1912-24-9



Gef.-Sym.: Xn 'Gesundheitsschädlich'
R-Sätze: 20/22-36-40-43
S-Sätze: 2-36/37-46
MAK-Wert: 2 mg/m³ (gemessen als Gesamtstaub)

Allgemeine Sicherheitsratschläge: Staubbildung vermeiden. An der Austritts- oder Entstehungsstelle absaugen. Raumlüftung. Direkten Kontakt mit Augen, Haut oder Kleidung vermeiden. Dichte Schutzkleidung tragen. Bei Atemschutz: Partikelfilter

Entsorgung: Rückstände in den Sammelbehälter für halogenhaltige organische Lösungsmittel geben. Abfallschlüssel: 070703

- **Wasserstoffperoxid:** CAS-Nr.: 7722-84-1



Gef.-Sym.: O 'Brandfördernd'; C 'Ätzend'
R-Sätze: 8-34
S-Sätze: 1/2-28-36/39-45
MAK-Wert: 1 mL/m³; 1.4 mg/m³

Allgemeine Sicherheitsratschläge: Behälter, Anlage oder Apparatur dicht geschlossen halten. Verunreinigungen fernhalten. An der Austritts- oder Entstehungsstelle absaugen. Raumlüftung. Direkten Kontakt mit Augen, Haut oder Kleidung vermeiden. Dichte Schutzkleidung tragen. Bei Atemschutz: Gasfilter, Filtertyp NO oder auch CO

Gesundheitliche Gefahren: Entwickelt Ätzwirkung auf Haut, Schleimhäute und Augen. Hautkontakt führt zur Ausbleichung. Verschlucken bewirkt starke Leibschmerzen, Übelkeit und Erbrechen. Bei großen Mengen Gefahr des Magendurchbruchs. Dämpfe/Aerosole verursachen Reizung von Augen/Atemwegen/Lungen.

Entsorgung: Kleinere Mengen vorsichtig in geeigneter Apparatur in heißem Wasser zersetzen (starke Sauerstoffbildung!) und mit viel Wasser fortspülen; Größere Mengen als anorganische Feinchemikalie der Entsorgung zuführen. Abfallschlüssel: 160502

6. Zusammenfassung

Pflanzenschutzmittel (PSM) sind ein integraler Bestandteil der modernen Landwirtschaft. Die weitläufige Applikation von PSM führt jedoch zu einer deutlichen Belastung des gesamten Ökosystems. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, ein detailliertes Monitoring durchzuführen.

In der Umweltanalytik finden in letzter Zeit immunochemische Analysenmethoden verstärkt Beachtung. Im Vergleich mit Methoden der instrumentellen Analytik ermöglichen sie bei niedrigen Kosten die Untersuchung einer großen Zahl von Proben. Die PSM-Analytik setzt geeignet validierte Analysenverfahren voraus. Bislang existieren jedoch keine verbindlichen Leitlinien zur Validierung von Immunoassays, was die Beurteilung und den Vergleich der erzielten Ergebnisse erschwert. Im Rahmen dieser Arbeit stand der Atrazinspezifische Enzymimmunoassay auf der Basis des polyklonalen Antikörpers AS46 in Kombination mit dem Enzymtracer ET Isopropyl zur Verfügung, der exemplarisch validiert wurde.

Es wurden die Parameter Genauigkeit, Sensitivität, Spezifität und Robustheit bestimmt. Es wurde gefunden, dass die Genauigkeit des Tests von der vorliegenden Matrix abhängt. In entionisiertem Wasser wurden im Bereich zwischen 0,02-3 µg/L Atrazin hinreichend genaue Werte bestimmt. In Oberflächenwasserproben verschiebt sich die untere Quantifizierungsgrenze durch Matrixeffekte, und es wurde ein Arbeitsbereich von 0,1-3µg/L erkannt. Eine hinreichend genaue Quantifizierung ist nur innerhalb dieses Bereichs möglich. Bei Über- bzw. Unterschreitung kann eine Überschätzung der Atrazinkonzentration nicht ausgeschlossen werden und von daher die häufig in der ELISA-Analytik anzutreffende Überschätzung der Atrazinbelastung Folge des Testformats sein. In Abhängigkeit von der betrachteten Matrix wurden Nachweisgrenzen zwischen 0,01µg/L und 0,021µg/L bestimmt. Da man jedoch nicht voraussagen kann, in welcher genauen Zusammensetzung die Matrix vorliegt, ist eine exakte Festlegung der Quantifizierungs- und Nachweisgrenze streng genommen nicht möglich. Sie dienen nur als Richtwerte bei der Interpretation von ELISA-Daten.

Der pAb AS46 ist nicht ausschließlich Atrazin-spezifisch. Er bindet auch strukturell verwandte Triazinherbizide. Das Chlor-s-triazin Propazin zeichnet sich sogar durch eine signifikant höhere Kreuzreaktion aus. Andere wichtige Vertreter dieser Substanzklasse, die ebenfalls stark vom Antikörper gebunden werden, sind Terbutylazin und Simazin. Im Falle von Huminstoffen trat ab DOC-Konzentrationen von 30mg/L signifikante unspezifische Bindung auf. Proben mit hohem Huminstoffgehalt, die sich im Enzymimmunoassay als schwach positiv herausgestellt haben, müssen daher mit einer etablierten instrumentellen Methode validiert werden. In einem pH-Bereich zwischen 3-11 wird die Quantifizierung nicht beeinträchtigt.

Mit dem validierten Enzymimmunoassay wurde das Oderflusssystem auf seine Belastung mit Triazinen geprüft. Im Juni 1999 sowie im Mai 2000 erfolgten Probennahmen und anschlie-

ßend Untersuchungen mit dem kompetitiven ELISA. Validierung der Ergebnisse erfolgte durch GC/MS.

Die Triazine erreichen in der Oder in den Applikationsmonaten der PSM recht hohe Konzentrationen. Punktuell wird sogar der Summengrenzwert der EU-Trinkwasserverordnung für PSM und Biozide überschritten. Atrazin wird zu einem beträchtlichen Teil über Tschechien eingetragen. Bereits an der tschechisch-polnischen Grenze bei Chalupki (OR01CH) wurden 0,21 µg/L (Juni 1999) und 0,31 µg/L (Mai 2000) Atrazinäquivalente bestimmt. In beiden Jahren befand sich die Maximalbelastung bei Opole an der oberen Oder (0,54 µg/L (Juni 1999) und 0,45 µg/L (Mai 2000), wo große Teile der landwirtschaftlich genutzten Saatflächen in Polen liegen. Besondere Beachtung verlangt die Barycz, ein Nebenfluß der Oder vor Glogow, welche sich an der Mündung als mit Triazinen (0,79 µg/L (Mai 2000)) belastet erwies. Die Barycz fließt durch die Milicz-Teiche in Schlesien nahe Wroclaw, die ein wichtiges Naturschutzgebiet in Europa darstellen. Aufgrund der ökotoxikologischen Relevanz des Atrazins sollten weitergehende Untersuchungen erfolgen.

Triazine bilden mit aquatischen und terrestrischen Huminstoffen gebundene PSM-Rückstände, was zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Belastung führt, da sich diese einer Untersuchung mit konventionellen Methoden entziehen. Enzymimmunoassays sind zur Quantifizierung dieser Rückstände geeignet, die Entwicklung entsprechender Methoden setzt jedoch das Vorhandensein von geeigneten Standardmaterialien zur Kalibration voraus. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Strategien zur Darstellung neuartiger Standardmaterialien evaluiert.

Die „Inkubationsstrategie“ beruht auf der Bereitung von synthetischen Mixturen mit natürlichen Huminstoffen bzw. synthetischen Modellsubstanzen und Triazinen. Inkubationslösungen mit definierten Ausgangskonzentrationen an Huminstoffen (DOC=0,3g/L) und Triazinherbiziden (100 µg/L) wurden angesetzt und nach 8 Wochen Inkubationszeit die freien Triazine von den Huminstoffen und gebundenen Rückständen mit Festphasenextraktion abgetrennt. Eingesetzt wurden natürliche Huminstoffe aus dem Hohlohsee im Nordschwarzwald und synthetische Modellsubstanzen für Huminstoffe, die aus Hydrochinon dargestellt worden waren. Letztere simulieren physikochemische Eigenschaften der Huminstoffe bezüglich der Polydispersität, Elementarzusammensetzung sowie Art und Quantität der funktionellen Gruppen. Die verwendeten Antikörper erweisen sich als prinzipiell in der Lage, die mit der Festphasenextraktion nicht-extrahierbaren Triazinrückstände zu detektieren. Der pAb AS46 beschränkt sich hierbei vermutlich auf die Detektion von adsorptiv gebundenem Schadstoff, während sich mit dem mAb K1F4 die Möglichkeit bietet, auch die kovalent durch Substitution des Chloratoms gebundenen Triazine zu detektieren. Dies ist auf die eingesetzten, unterschiedlichen Immunkonjugate für AS46 und K1F4 zurückzuführen.

Der Antikörper AS46 detektiert die höchsten Mengen an adsorptiv gebundenem Atrazin an der Huminsäure HO13HA (0,55ng/mg DOC Atrazin), jedoch fällt diese Menge, verglichen

mit der Konzentration in den Inkubationslösungen, gering aus. Der mAb K1F4 detektiert deutlich mehr gebundenes Atrazin und Terbutylazin. Die synthetisch dargestellten Huminstofffraktionen binden über 20ng Atrazin je mg DOC. Bei den natürlichen Huminstoffen lag dieser Wert bei 4-6ng/mg. Die kovalent gebundenen Anteile an Atrazin übersteigen die adsorptiv komplexierten Anteile um zwei Größenordnungen. Die EIA-Untersuchungen am Terbutylazin mit Antikörper K1F4 zeigen vergleichbare Tendenzen, dieses Triazinherbizid wird anscheinend jedoch weniger stark an die Huminstoffe gebunden. Insgesamt wurden durch die „Inkubationsstrategie“ jedoch nur niedrige Beladungen mit gebundenen Triazinrückständen realisiert.

Die „Direktpolymerisation“ stellt das zweite Verfahren zur Darstellung einer Modellsubstanz mit gebundenen Triazinrückständen dar. Mit Hydrochinon wird eine diskrete organische Substanz in einem alkalischen, oxidativen Medium zu Makromolekülen polymerisiert. Wird dem Ansatz ein Triazin hinzugefügt, wird dieses in das Polymergerüst einpolymerisiert. Einpolymerisierte Triazinmengen konnten unter Nutzung der Elementaranalyse bestimmt werden, da die synthetischen Modelle bei Abwesenheit von Triazinen keinen Stickstoff enthalten. Sie lagen bei 8µg/mg „Atrazin“ im HS100A bzw. 12µg/mg „Terbutylazin“ im HS100T.

Die Validierung dieser Ergebnisse erfolgte mit verschiedenen Enzymimmunoassays. Abhängig vom eingesetzten Antikörper und Verfahren wurden unterschiedliche Quantitäten zwischen 4 und 12100ng/mg DOC an gebundenen Rückständen bestimmt. Die durch ELISA detektierte Menge an gebundenen Rückständen variiert also sehr stark. Die „Direktpolymerisation“ ergab im Vergleich mit der „Inkubationsstrategie“ bei der Modellsubstanz HS100A eine um den Faktor 600 höhere Beladung.

Ähnlich wie bei der „Inkubationsstrategie“ werden die vorliegenden gebundenen Strukturen beim Modellhuminstoff HS100A durch den mAb K1F4 besser erkannt als durch mAb K4E7 und pAb AS46. Bei der „Inkubations-“, und „Direktpolymerisationsstrategie“ entstehen vermutlich gebundene Rückstände mit Strukturen ähnlich dem Immunogen des K1F4. Es wird angenommen, dass die Triazine durch nukleophile Substitution des Chloratoms in das Huminstoffgerüst eingebunden werden. Das verringerte Erkennungsvermögen von pAb AS46 und mAb K4E7 kann mit einer geringeren Kreuzreaktion mit den vorliegenden chlorsubstituierten Strukturen erklärt werden.

Dieser Ansatz ist nicht allgemein auf andere PSM und Umweltschadstoffe übertragbar, da hierfür eine reaktive funktionelle Gruppe vorhanden sein muß. Bei der vorliegenden Synthese besteht eine Limitierung durch die beschränkte Löslichkeit der Triazine in Wasser. Damit sind wesentlich größere Beladungen, wie sie für die Untersuchung mit spektroskopischen Methoden wünschenswert sind, nicht realisierbar.

Die „Monomerenstrategie“ beruht auf der Synthese eines Triazin-Monomer-Addukts mit definierter Struktur. Es wurden zwei Zielstrukturen synthetisiert. Die Triazinstruktur im Modellhuminstoff BQ310A resultiert formal aus der Umsetzung der freien Aminogruppe des Phase-I-Metaboliten Desethylatrazin mit einem chinoiden System. Die Struktur BQ400A re-

sultiert aus der nukleophilen Substitution des Chloratoms am Atrazin durch ein aromatisches Amin. Danach wurde in einer schnellen Polymerisationsreaktion mit p-Benzochinon das Triazin-„Monomer“ in einen Modellhuminstoff einpolymerisiert. Durch Elementaranalyse wurde die Quantität an gebundenen Triazinrückständen abgeschätzt. Für BQ310A wurden 46,5µg/mg, sowie für BQ400A 11,5µg/mg „Atrazin“ bestimmt. Dies übertrifft die mit „Direktpolymerisation“ erzielte Beladung. Mit Enzymimmunoassay wurde das Vorhandensein gebundener Rückstände validiert. Abhängig vom Antikörper wurden bis zu 0,8µg Atrazinäquivalente je mg Modellsubstanz BQ310A bzw. 0,1µg/mg bei BQ400A ermittelt. Bei der „Monomerenstrategie“ besteht der Vorteil, dass die Quantität der gebundenen Rückstände über einen großen Bereich variierbar ist. Durch Erhöhung der Triazin-Monomer-Adduktkonzentration sollte die Quantität an gebundenen Triazin gesteigert werden können, da die Addukte sehr gut in das Polymer eingebaut werden. Die „Direktpolymerisationsstrategie“ ist jedoch einfacher als die „Monomerenstrategie“, da im letzteren Fall vor der Polymerisation Triazin-Monomer-Addukte über mehrere Stufen synthetisiert werden müssen.

Huminstoffe können im ELISA unspezifisch an Antikörper binden und dadurch ein falsch-positives Signal erzeugen. Durch Zugabe von Rinderserumalbumin wird das unspezifische Huminstoffsignal experimentell inhibiert. Es wird jedoch vermutet, dass durch die Bindung der Huminstoffe an Blockierungsreagenzien nicht nur die Huminstoffe einer Detektion entzogen werden, sondern auch die Huminstoff-gebundenen Rückstände nicht mehr voll von den Antikörpern erkannt, das Signal drastisch reduziert und so nur ein Teil der gebundenen Rückstände erfasst wird.

Insgesamt stellt der Enzymimmunoassay ein wertvolles analytisches Werkzeug zur Detektion von gebundenen Triazinrückständen dar, das Informationen über das Bindungsverhalten von nicht-extrahierbaren Rückständen und ihre Quantität bietet. Allerdings besteht ein hohes Potential für systematische Fehler, weshalb mit ihm erhaltene Ergebnisse einer besonders strengen Validierung durch Resultate anders arbeitender Methoden bedürfen.

7. Literatur

- [1] B. Hock, C. Fedtke, R.R. Schmidt: Herbizide: Entwicklung, Anwendung, Wirkungen, Nebenwirkungen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1995)
- [2] Autorenkollektiv: Römpf Chemielexikon. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1989)
- [3] F.A. Gunther: Residue Reviews, Vol. 32, Springer-Verlag, Heidelberg (1970)
- [4] H. Gysin: International challenges in weed science. *Weed Science* 22 (1974) 5, 523-527
- [5] A. Gast, E. Knüsli, H. Gysin: Chlorazin (2-chloro-4,6-bis(diethylamino)-s-Triazine) as a phytotoxic agent. *Experientia* 11 (1955) 107-108
- [6] E. Knüsli: Herbicides with triazine bases. *Phytiat. Phytopharm.* 7 (1958), 81-92
- [7] I. Stephan, A. Schäffer: Ökotoxikologie und Umweltchemie II – Versuch VII ¹⁴C-Atrazin in Pflanzenzellkulturen. Lehrstuhl für Biologie V, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen (2001)
- [8] A. Gast, E. Fankhauser. Proceedings of the 8th British Weed Control Conference (1966) 485
- [9] V. Pacakova, K. Stulik, J. Jiskra: High-performance separations in the determination of triazine herbicides and their residues. *Journal of Chromatography A* 754 (1996), 17-31
- [10] B. Streit: Lexikon Ökotoxikologie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1991), 64, 623
- [11] W. Perkow: Wirksubstanzen der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel. Band 2, Verlag Paul Parey (1988) 2. Auflage
- [12] Umweltbundesamt: Daten zur Umwelt '97. Erich Schmidt Verlag, Berlin (1997) 6. Auflage, 73-78
- [13] Umweltbundesamt: Daten zur Umwelt 1992/93. Erich Schmidt Verlag, Berlin (1993) 5. Auflage, 62-63
- [14] U. Müller-Wegener, G. Milde: Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmittel im Grundwasser. In: K. Aurand, H. Althaus: Die Trinkwasserverordnung. Erich Schmidt Verlag, Berlin (1991) 3. Auflage, 310-317
- [15] Richtlinie des Rates vom 15. Juli 1980 über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (80/778/EWG), Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 229, 11-29 vom 30. 08. 1980

-
- [16] Bundesgesetzblatt vom 21. Mai 2001, Seite 959
- [17] Empfehlung des Bundesgesundheitsamtes zum Vollzug der Trinkwasserverordnung (TrinkWV) vom 22. Mai 1986 (BGBl. I, S.760), In: P. Dilly, M. Welsch: Trinkwasserverordnung: Leitfaden zur Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe. Wiss.-Verl.-Ges., Stuttgart (1992), 129-145
- [18] K.H. Domsch: Pestizide im Boden. VCH, Weinheim (1992), 252-269
- [19] Umweltbundesamt: Jahresbericht 1996. Berlin (1996), 104
- [20] G.H. Schmidt: Pestizide und Umweltschutz. Verlag Vieweg, Braunschweig (1986), 222
- [21] J.B. Weber: Fate and behaviour of herbicides in soils. *Applied Plant Science* 5 (1991), 28-41
- [22] M Grandet, L. Weil, K.-E. Quentin: Gaschromatographische Bestimmung der Triazin-Herbizide und ihrer Metabolite im Wasser. *Zeitschrift für Wasser- und Abwasser-Forschung* 21 (1988), 21-24
- [23] A. Dankwardt: Entwicklung und Anwendung von Immunoassays in der Rückstandsanalytik von Atrazin - Untersuchung von Regenwasser, Oberflächenwasser und gebundenen Rückständen. Dissertation, München (1994)
- [24] G.L. Lamoureux, B. Simoneaux, J. Larson : The Metabolism of Atrazine and Related 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)s-triazine in Plants. In: L.G. Ballantine, J.E. McFarland, D.S. Hackett: Triazine Herbicides Risk Assessment. ACS Symposium Series 683, American Chemical Society, Washington D.C. (1998)
- [25] H.O. Esser, G. Dupuis, E. Ebert, C. Vogel, G.J. Marco: s-Triazines. In: P.C. Kearney, D.D. Kaufman: Herbicides Chemistry, Degradation, and Mode of Action. Marcel Dekker, New York, Vol. 1 (1975) 2nd edition, 129-208
- [26] R.H. Shimabukuro, G.L. Lamoureux, D.S. Frear, J.E. Bakke: Metabolism of s-triazines and its significance in biological systems. In: A.S. Tahori: Pesticide Terminal Residues (Supplement to Pure and Applied Chemistry), Butterworth&Co, London (1971), 323-342
- [27] G.L. Lamoureux, L.E. Stafford, R.H. Shimabukuro, R.H. Zaylskie: Atrazine metabolism in sorghum. Catabolism of the glutathione conjugate of atrazine. *Journal of agricultural and food chemistry* 21 (1973) 6, 1020-1030
- [28] A.W. Naylor: Herbicide Metabolism in Plants. In: L.J. Audus: Herbicides. Academic, London, Vol. 1 (1976), 397-426
- [29] D.S. Frear, H.R. Swanson, F.S. Tanaka: N-Demethylation of substituted 3-phenyl-1-methylureas: isolation and characterization of a microsomal mixed-function oxidase from cotton. *Phytochemistry* 8 (1969) 11, 2157-2169

-
- [30] J.A. Gray, N.E. Blake, D.E. Stoltenberg: Increased Glutathione Conjugation of Atrazine Confers Resistance in a Wisconsin Vervetleaf (*Abutilon theophrasti*) Biotype. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 55 (1996) 157-171
- [31] G.H. Schmidt: Pestizide und Umweltschutz. Verlag Vieweg, Braunschweig (1986), 222-223
- [32] K.E. Quentin, M. Grandet, L. Weil: Pestizide und Trinkwasserversorgung. DVGW, Eschborn (1987), 7
- [33] G. Font, J. Manes, J.C. Molto, Y. Pico: Solid-phase extraction in multi-residue pesticide analysis of water. *Journal of Chromatography* 642 (1993), 135-161
- [34] J.W. Eichelberger, T.D. Behymer, W.L. Budde: EPA Method 525, Environmental Monitoring Systems Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, USA (1988)
- [35] W.A. Aue, P.M. Teli: Sampling of air pollutants with support-bonded chromatographic phases. *Journal of Chromatography* 62 (1971) 1, 15-27
- [36] W.A. Saner, J.R. Jadamec, R.W. Sager, T.J. Killeen: Trace enrichment with hand-packed CO:PELLODS guard columns and Sep-Pak C18 cartridges. *Analytical Chemistry* 51 (1979) 13, 2180-2188
- [37] U. Oehmichen, F. Karrenbrock, K. Haberer: Erfahrungen zur Analytik von Pflanzenschutzmitteln aus stark belasteten Oberflächengewässern. Gewässerschutz, Wasser, Abwasser 106 (Instrum. Anal. Pestiz. Wasser Böden) (1989), 110-135
- [38] H. Färber, K. Nick, H.F. Schöler: Determination of hydroxy-s-triazines in water using HPLC or GC-MS. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie* 350 (1994), 145
- [39] F. Mangani, F. Bruner: Sample enrichment and GC-MS determination of herbicides in water. *Chromatographia* 17 (1983) 7, 377-380
- [40] A. Di Corcia, M. Marchetti, R. Samperi: Rapid determination of simazine and atrazine in water at the parts per trillion (10^{12}) level. Extraction by a miniaturized Carbopack B trap followed by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 405 (1987), 357-363
- [41] B. Crathorne, M. Fielding, C.P. Steel, C.D. Watts: Organic compounds in water: analysis using coupled-column high-performance liquid chromatography and soft-ionization mass spectrometry. *Environmental science and technology* 18 (1984) 10, 797-802
- [42] A.M. Dietrich, D.S. Millington, Y.H. Seo: Specific identification of synthetic organic chemicals in river water using liquid-liquid extraction and resin adsorption coupled with electron impact, chemical ionization and accurate mass measurement gas chro-

- matography-massspectrometry analyses. *Journal of Chromatography* 436 (1988) 2, 229-241
- [43] G.C. Mattern, J.B. Louis, J.D. Rosen: Multipesticide determination in surface water by gas chromatography / chemical ionization / mass spectrometry / ion trap detection. *Journal/Association of Official Analytical Chemists* 74 (1991) 6, 982-986
- [44] A. Kraut-Vass, J. Thoma: Performance of an extraction disc in synthetic organic chemicals using gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 538 (1991) 2, 233-240
- [45] L.M. Davi, M. Baldi, L. Penazzi, M. Liboni: Evaluation of the membrane approach to solid-phase extractions of pesticide residues in drinking water. *Pesticide science* 35 (1992) 1, 63-67
- [46] U. Oehmichen, F. Karrenbrock, K. Haberer: Erfahrungen zur Analytik von Pflanzenschutzmitteln aus stark belasteten Oberflächengewässern. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie* 327 (1987), 715
- [47] F. Moja, E. Suigo, M.L. Roveda, C. Bezzi, G. Vignanti, U. Pellegatta, R. Rosso: Problems of environmental contamination: simultaneous analysis of four herbicides by HPLC. *Giornale italiano di chimica clinica* 13 (1988) 2, 145-149
- [48] J.C. Molto, Y. Pico, G. Font, J. Manes: Determination of triazines and organophosphorus pesticides in water samples using solid-phase extraction. *Journal of Chromatography* 555 (1991), 137
- [49] M.W. Brooks, J. Jenkins, M. Jimenez, T. Quinn, J.M. Clark: Rapid method for the determination of alachlor, atrazine and metalachlor in groundwater by solid-phase extraction. *Analyst* 114 (1989) 3, 405-406
- [50] S.A. Schuette, R.G. Smith, L.R. Holden, J.A. Graham: Solid-phase extraction of herbicides from well water for determination by gas chromatography – mass spectrometry. *Analytica chimica acta* 236 (1990) 1, 141-144
- [51] R.J. Bushway, H.L. Hurst, L.B. Perkins, L.Tian, C. Guiberteau Cabanillas, B.E.S. Young, B.S. Ferguson, H.S. Jennings: Atrazine, alachlor, and carbofuran contamination of wellwater in central Maine. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 49 (1992) 1, 1-9
- [52] Millipore Corporation - Waters Chromatography Division, Waters Sep-Pak Cartridge Care and Use Manual, PN 11188, Milford, USA (1990)
- [53] E.M. Thurman, M. Meyer, M. Pomes, C.A. Perra, A.P. Schwab: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Compared with Gas Chromatography/Mass Spectrometry for the Determination of Triazine Herbicides in Water. *Analytical chemistry* 62 (1990), 2043-2048

-
- [54] P.F. Landrum, S.R. Nihart, B.J. Eadle, W.S. Gardner: Reverse-Phase Separation Method for Determining Pollutant Binding to Aldrich Humic Acid and Dissolved Organic Carbon of Natural Waters. *Environmental science and technology* 18 (1984), 187-192
- [55] M.S. Young: A new Solid Phase Extraction Method for Determination of Triazine Herbicides and Metabolites in Aqueous Samples. *Waters column* 6 (1996) 1, 16-18
- [56] J. Aßhauer: Probleme bei der Analytik von Pflanzenschutzmitteln in Wässern. In: Gewässerschutz, Wasser, Abwasser 106 (Instrum. Anal. Pestiz. Wasser Boden) (1989), 62-81
- [57] A. Dankwardt, S. Pullen, B. Hock: Immunoassays: Applications for the Aquatic Environment, In: P.G. Wells, K. Lee, C. Blaise: Microscale testing in aquatic toxicology: advances, techniques, and practice. CRC Press LLC, Boca Raton, Boston (1998)
- [58] P. MacCarthy: Aquatic Humic Substances and Their Influence on the Fate and Treatment of Pollutants. In: I.H. Suffet, P. Mac Carthy: Aquatic Humic Substances: influences on fate and treatment of pollutants. Adv. Chem. Ser. 219, Denver, USA (1989), xvii
- [59] W.R. Fischer: Definitionen, Abgrenzungen und experimentelle Engpässe. In: F.H. Frimmel, G. Abbt-Braun: Refraktäre organische Säuren in Gewässern. VCH, Weinheim (1992), 5
- [60] F.K. Achard: *Neues chemisches Archiv (Crell's Chem. Annu.)* 2 (1786), 391-403
- [61] J.J. Berzelius: Lehrbuch der Chemie. Dresden, Leipzig (1839) 3. Auflage
- [62] J.J. Rook: Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *Water treatment and examination* 23 (1974) 2, 234-243
- [63] F.H. Frimmel: Einführung. In: F.H. Frimmel, G. Abbt-Braun: Refraktäre organische Säuren in Gewässern. VCH, Weinheim (1992), 1
- [64] W. Ziechmann: Huminstoffe und ihre Wirkungen. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1996)
- [65] W. Ziechmann: Huminstoffe: Probleme, Methoden, Ergebnisse. Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Basel (1980)
- [66] P. Scheffer, P. Schachtschabel: Lehrbuch der Bodenkunde. Ferdinand Enke Verlag (1989), 12. Auflage, 55-73
- [67] F.H. Frimmel: Characterization of Organic Acids in Freshwater: A Current Status and Limitations. In: E.M. Perdue, E.T. Gjessing: Organic Acids in Aquatic Ecosystems. John Wiley and Sons Ltd, New York (1990), 5-23

-
- [68] G.R. Aiken: Isolation and concentration technique for aquatic humic substances. In: G.R. Aiken, D.M. McKnight, R.L. Wershaw, P. MacCarthy: Humic Substances in Soil, Sediment and Water. Wiley, New York (1985), 363-385
- [69] G. Abbt-Braun, F.H. Frimmel, P. Lipp: Isolation of Organic Substances from Aquatic and Terrestrial Systems - Comparison of Some Methods. *Zeitschrift für Wasser- und Abwasser-Forschung* 24 (1991), 285-292
- [70] F.H. Frimmel, A. Gorenflo: Aufbereitung wässriger Lösungen durch Membranverfahren. Engler-Bunte-Institut Bereich Wasserchemie, Universität Karlsruhe (2002)
- [71] G. Abbt-Braun: Untersuchungen zur Struktur isolierter Huminstoffe: Allgemeine Charakterisierung und massenspektrometrische Bestimmungen. Dissertation, München (1987)
- [72] H.-R. Schulten: The three-dimensional structure of humic substances and soil organic matter studied by computational analytical chemistry. *Fresenius' Journal of analytical chemistry* 351 (1995), 62-73
- [73] S.U. Khan: Bound pesticide residues in soil and plants. *Residue Reviews* 84, (1982), 1-25
- [74] A. Dankwardt, D. Freitag, B. Hock: Approaches to the Immunochemical Analysis of Non-extractable Triazine Residues in Refractory Organic Substances (ROS) and Characterization of ROS. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 26 (1998) 3, 145-151
- [75] I. Scheunert: Transformation and Degradation of Pesticides in Soil. Chemistry of Plant Protection, Vol. 8, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1992), 23-75
- [76] S.U. Khan, H.A. Hamilton: Extractable and Bound (Nonextractable) Residues of Prometryn and Its Metabolites in an Organic Soil. *Journal of agricultural and food chemistry* 28 (1980), 126-132
- [77] L.-Z. Zhang, S.U. Khan, M.H. Akhtar, K.C. Ivarson: Persistence, Degradation, and Distribution of Deltamethrin in an Organic Soil under Laboratory Conditions. *Journal of agricultural and food chemistry* 32 (1984) 6, 1207-1211
- [78] P. Capriel, A. Haisch, S.U. Khan: Distribution and nature of bound (nonextractable) residues of atrazine in a mineral soil nine years after the herbicide application. *Journal of agricultural and food chemistry* 33 (1985), 567-569
- [79] A. Piccolo, I. Scheunert, R. Schroll: Supercritical Versus Normal Methanol Mass Extraction of ¹⁴C-Labelled Atrazin Bound to Humic Substances. *Fresenius Environmental Bulletin* 1 (1992), 627-631
- [80] P. Capriel, A. Haisch, S.U. Khan: Supercritical Methanol: An Efficacious Technique for the Extraction of Bound Residues from Soil and Plant Samples. *Journal of agricultural and food chemistry* 34 (1986), 70-73

-
- [81] D. Freitag, I. Scheunert, W. Klein, F. Korte: Long-Term Fate of 4-Chloroaniline-¹⁴C in Soil and Plant under Outdoor Conditions. A Contribution to Terrestrial Ecotoxicology of Chemicals. *Journal of agricultural and food chemistry* 32 (1984), 203-207
- [82] T.-S. Hsu, R. Bartha: Hydrolyzable and Nonhydrolyzable 3,4-Dichloroaniline-Humus Complexes and Their Respective Rates of Biodegradation. *Journal of agricultural and food chemistry* 24 (1976) 1, 118-122
- [83] B. Geva, C. Mordaunt, K.T. Semple, T.G. Pearce, K.C. Jones: Bioavailability of Nonextractable (Bound) Pesticide Residues to Earthworms. *Environmental Science and Technology* 35 (2001), 501-507
- [84] H.M. Lesan, A. Bhandari: Evaluation of Atrazine Binding to Surface Soils. Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research (2000), 76-89
- [85] J. Dec, J.-M. Bollag: Determination of covalent and noncovalent binding interactions between xenobiotic chemicals and soil. *Soil Science* 162 (1997) 12, 858-874
- [86] E. Simon: Entwicklung von Immunoassays für Sulfonylharnstoffherbizide und huminsäuregebundene Triazinherbizide. Dissertation, TU München (1998), 33
- [87] A. Hahn, F. Frimmel, A. Haisch, G. Henkelmann, B. Hock: Immunolabeling of atrazine residues in soil. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 155 (1991), 203
- [88] T. Giersch, G. Sohn, B. Hock: Monoclonal antibody-based immunolocalization of bound triazine residues in two aquatic macrophytes. *Analytical Letters* 26 (1993), 1831
- [89] A. Dankwardt, B. Hock, R. Simon, D. Freitag, A. Kettrup: Determination of Non-extractable Triazine Residues by Enzyme Immunoassay: Investigation of Model Compounds and Soil Fulvic and Humic Acids. *Environmental Science and Technology* 30 (1996), 3493-3500
- [90] A. Dankwardt, B. Hock: Bestimmung gebundener Triazinrückstände im Boden mit immunochemischen Methoden. *GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium* 39 (1995), 721-722
- [91] P. Ulrich, M.G. Weller, R. Niessner: Immunological determination of triazine pesticides bound to soil humic acids (bound residues). *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 354 (1996), 352-358
- [92] P. Pfortner, M.G. Weller, R. Niessner: Detection of bound nitroaromatic residues in soil by immunoassay. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 360 (1998), 781-783
- [93] M.G. Weller: Einsatz von Immunoassays in der Umweltanalytik. *GIT Labor-Fachzeitschrift* 4 (1998), 356-358

-
- [94] C. Achtnich, P. Pfortner, M.G. Weller, R. Niessner, H. Lenke, H.-J. Knackmuss: Reductive Transformation of Bound Trinitrophenyl Residues and Free TNT during a Bioremediation Process Analysed by Immunoassay. *Environmental Science and Technology* 33 (1999), 3421-3426
- [95] E. Simon, G. Henkelmann, M.G. Weller: Entwicklung und Anwendung von Immunoassays für das Screening von gebundenen Pflanzenschutzmittelrückständen in Ackerböden. Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau (1998)
- [96] W. Ziechmann: Über Modellreaktionen zur Bildung synthetischer Huminsäuren. I. Die Synthese von Huminsäuren im alkalischen Milieu. *Brennstoff-Chemie* 41 (1960), 289-320
- [97] Piria. *Annalen* 30 (1839), 167
- [98] W. Eller, K. Koch: Darstellung von Huminsäuren. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 53 (1920), 1469-1476
- [99] W. Herdering, A. Knöchel, F. Miller, K. Pranzas: Synthesis of Model Substances for Metal Specification in ROS-Material. In: F.H. Frimmel, G. Abbt-Braun: Symposium on Refractory Organic Substances in the Environment – ROSE: Abstracts of Oral and Poster Papers. Veröffentlichungen des Lehrstuhls für Wasserchemie und der DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe, Karlsruhe (1997), 115-117
- [100] H. Nimz: Das Lignin der Buche – Entwurf eines Konstitutionsschemas. *Angewandte Chemie* 86 (1974), 336
- [101] W. Flaig, U. Schobinger, H. Deuel: Umwandlungen von Lignin in Huminsäuren bei der Verrottung von Weizenstroh. *Chemische Berichte* 92 (1959) 8, 1973-1982
- [102] E.C. Shorey: The presence of some benzene derivatives in soils. *Journal of Agricultural Research* 5 (1916)
- [103] T.H. James, J.M. Snell, A. Weissberger: Oxidation Processes. XII. The Autooxidation of Hydroquinone and of the Mono-, Di- and Trimethylhydroquinones. *Journal of the American Chemical Society* 60 (1938), 2084
- [104] T.H. James, A. Weissberger: Oxidation Processes. XI. The Autooxidation of Durohydroquinone. *Journal of the American Chemical Society* 60 (1938), 98
- [105] H. Beyer, W. Walter: Lehrbuch der Organischen Chemie. Hirzel Verlag, Stuttgart (1991) 22. Auflage
- [106] H. Diebler, M. Eigen, P. Matthies: Kinetische Untersuchungen über die Bildung von p-Benzosemichinon aus Chinon und Hydrochinon in alkalischer Lösung. *Zeitschrift für Naturforschung* 16b (1961) 10, 629-637

-
- [107] S. Blois: Observation of the Semiquinone of Benziquinone. *The Journal of Chemical Physics* 23 (1955), 1351
- [108] W. Flaig, J.C. Salfield: Nachweis der Bildung von Hydroxy-p-benzochinon als Zwischenprodukt bei der Autooxydation von Hydrochinon in schwach alkalischer Lösung. *Naturwissenschaften* 47 (1960), 516
- [109] W. Flaig, J.C. Salfield: Zwischenstufen bei der Bildung von Huminsäuren aus Phenolen. 7th Intern. Congress of Soil Science, Madison, Wisconsin USA (1960), 648
- [110] H. Erdtman, M. Granath: Studies on Humic Acids. *Acta Chemica Scandinavica* 8 (1954), 811-816
- [111] W. Flaig: Chemische Untersuchungen an Humusstoffen. *Zeitschrift für Chemie* 4 (1964) 7
- [112] W. Flaig, J.C. Salfield, K. Haider: Zwischenstufen bei der Bildung von natürlichen Huminsäuren und synthetischen Vergleichssubstanzen. *Landwirtschaftliche Forschung XVI* (1963) 2
- [113] N. Grunwald: Synthese und Charakterisierung von Huminstoffmodellen mit unterschiedlichen Carboxylat- und Phenolatgruppengehalt auf Basis von p-Benzochinon. Diplomarbeit, Hamburg (2001)
- [114] W. Flaig: Generation of Model Chemical Precursors. In: F.H. Frimmel, R.F. Christman (eds.): Humic Substances and Their Role in the Environment. Wiley & Sons Ltd., S. Bernhard, Dahlem Konferenzen (1988), 75-92
- [115] F. Miller: Untersuchung und Vergleich natürlicher Refraktärer Organischer Säuren mit synthetischen Modellsubstanzen durch DPASV und TRFA. Diplomarbeit, Hamburg (1997)
- [116] F. Andreux, J.M. Portal, M. Schiavon, G. Bertin: Polymeric models of bound residues of pesticides: Current state of the art and perspectives. In: Autorenkollektiv: Study and Prediction of Pesticides Behaviour in Soils, Plants and Aquatic Systems, GSF-Institut für Ökologische Chemie, München (1990), 100-110
- [117] K. Haider, L.R. Frederick, W. Flaig: Reactions between amino acid compounds and phenols during oxidation. *Plant and Soil XXII* (1965), 49-64
- [118] S.P. Mathur, H.V. Morley: Incorporation of methoxychlor-¹⁴C in model humic acids prepared from hydroquinone. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 20 (1978) 2, 268-274
- [119] P. Adrian, E.S. Lahaniatis, F. Andreux, M. Mansour, I. Scheunert, F. Korte: Reaction of the soil pollutant 4-chloroaniline with the humic acid monomer catechol. *Chemosphere* 18 (1989) 7-8, 1599-1609
- [120] H. Suida, W. Suida: Über Anilidochinone. *Annalen der Chemie* 416 (1917), 113

- [121] H. Teutscher: Über die Einwirkung der isomeren Chlormethylaniline auf Benzo- und Toluchinon. *Annalen der Chemie* 416 (1917), 189-202
- [122] G.E. Parris: Covalent Binding of Aromatic Amines to Humates. 1. Reactions with Carbonyls and Quinones. *Environmental Science and Technology* 14 (1980) 9, 1099
- [123] K.T. van der Trenck, D. Hunkler, H. Sandermann Jr.. *Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences* 36C (1981), 714
- [124] G. Bertin, M. Schiavon, F. Andreux, J.M. Portal: Contribution to the Study of Nonextractable Pesticide Residues in Soils: Incorporation of Atrazine in Model Humic Acids prepared from Catechol. *Developments in geochemistry* 6 (1991), (Diversity Environ. Biogeochem.), 105-110
- [125] F.G. Andreux, J.M. Portal, M. Schiavon, G. Bertin: The binding of atrazine and its desalkylated derivatives to humic-like polymers derived from catechol. *The Science of the Total Environment* 117/118 (1992), 207-217
- [126] D. Voet, J.G. Voet: Biochemie. VCH, Weinheim (1994)
- [127] L. Styer: Biochemie. Spektrum Adad. Verlag, Heidelberg (1994) 2. korr. Nachdruck der völlig Neubearb. Auflage
- [128] F. Hammar: Antikörper- molekulare Präzisionswerkzeuge im Dienste des Menschen; In: H.J. Quadbeck-Seeger, A. Fischer: Die Babywindel und 34 andere Chemiegeschichten. Wiley-VCH, Weinheim (2000)
- [129] U. Obst, U. Bilitewski, B. Hock : Anwendung immunochemischer Methoden in der Wasseranalytik. In: H. Günzler, A.M. Bahadir, K. Danzer, W. Fresenius, R. Galensa, W. Huber, M. Linscheid, G. Schwedt, G. Tölg: Analytiker-Taschenbuch 18, Springer Verlag Berlin (1998)
- [130] A. Dankwardt: Immunochemical Assay in Pesticide Analysis. In: R.A. Meyers: Encyclopedia of Analytical Chemistry, Wiley, Chichester, Vol. 15 (2000), 6318-6344
- [131] C.P. Price: Immunochemistry. In: R.A. Meyers: Encyclopedia of Analytical Chemistry, Wiley, Chichester, Vol. 2 (2000), 1348-1374
- [132] M. B. Rittenberg, A. A. Armkraut: Immunogenicity of Trinitrophenyl-Hemocyanin: Production of Primary and Secondary Anti-hapten Precipitins. *Journal of Immunology* 97 (1966), 421-430
- [133] M.H. Goodrow, J.R. Sanborn, D.W. Stoutamire, S.J. Gee, B.D. Hammock: Strategies for Immunoassay Hapten Design. In: J.O. Nelson, A.E. Karu, R.B. Wong: Immunoanalysis of Agrochemicals – Emerging Technologies, ACS Symposium Series 586, ACS (1995)

-
- [134] R.O. Harrison, M.H. Goodrow, S.J. Gee, B.D. Hammock: Hapten Synthesis for Pesticide Immunoassay Development. ACS (1991)
- [135] K. Wilson, K.H. Goulding: Methoden der Biochemie. 3. Auflage. Stuttgart, Thieme Verlag. (1990)
- [136] T.G. Cooper: Biochemische Arbeitsmethoden. de Gruyter Verlag, Berlin (1981)
- [137] G. Köhler, C. Milstein: Countinuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 (1975), 495-497
- [138] D. S. Hage: Immunoassays. *Analytical Chemistry* 71 (1999), 294R-304R
- [139] J.R. Crowther: ELISA: Theory and practice. Humana Press, Totowa NJ (1995)
- [140] E.P. Diamandis, T.K. Christopoulos: Immunoassay. Adademic Press, San Diego (1996)
- [141] H. Strohbach: Kochbuch der immunologischen Analytik: Radioimmunoassay und verwandte Methoden. Thieme Verlag, Stuttgart (1994)
- [142] V. Pacakova, K. Stulik, J. Jiskra: High-performance separations in the determination of triazine herbicides and their residues. *Journal of Chromatography A* 754 (1996), 17-31
- [143] H. Strecker, H.G. Eckert: Radioimmunoassay – eine Revolution in der Analytik. *GIT Labor-Medizin* 2 (1978), 106-116
- [144] C.A. Janeway jr.: Immunologie. Spektrum Adademischer Verlag, Heidelberg (1997), 2. Auflage, 48
- [145] G. Scatchard. *Annals of the New York Academy od Sciences* 51 (1949), 660
- [146] D.W. Chan: Immunoassay: A practical guide. San Diego, Academic Press, USA (1987), 1-13
- [147] A. Voller, D.E. Bidwell: Chapter 6 - Enzyme Immunoassays. In: W.P. Collins: Alternative Immunoassays. John Wiley & Sons Ltd. (1985)
- [148] M. Weller: Strukturelle und kinetische Untersuchungen zur Entwicklung und Optimierung von Hapten-Enzymimmunoassays (ELISAs) am Beispiel de Bestimmung von Triazinherbiziden. Dissertation, TU München (1992)
- [149] J. Tölgyessy, S. Varga: Nuclear Analytical Chemistry II: Radioactive Indicators in Chemical Analysis. University Park Press, Baltimore USA (1972), 60-112
- [150] J. Ruzicka, J. Sary. *Talanta* 8 (1961), 228
- [151] J. Ruzicka, J. Sary. *Chem. Listy* 57 (1963), 1025

-
- [152] J. Ruzicka, J. Stry. *Atomic Energy Review* 2 (1964), 3
- [153] S.A. Berson, R.S. Yalow: Recent studies on insulin-binding antibodies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 82 (1959), 338-344
- [154] R. Levine, E.F. Pfeiffer: Radioimmunoassay: Methodology and Applications in Physiology and in Clinical Studies. Hormone and Metabolic Research, Supplement Series Volume No. 5, Georg Thieme Stuttgart (1974)
- [155] S.L. Jeffcoate: Chapter 2 - Advantages and limitations of traditional technology. In: W.P. Collins: Alternative Immunoassay. John Wiley & Sons Ltd. (1985)
- [156] Autorenkollektiv: Römpf-Lexikon. Thieme, Stuttgart (1990), 9. Auflage
- [157] A. Mayer, S. Neuenhofer: Lumineszenzmarker – mehr als nur eine Alternative zu Radioisotopen?. *Angewandte Chemie* 106 (1994), 1097-1126
- [158] A.M. Sidki, J. Landon: Chapter 11 – Fluoroimmunoassays and phosphoroimmunoassays. In: W.P. Collins: Alternative Immunoassay. John Wiley & Sons Ltd. (1985)
- [159] P.W. Atkins: Quanten – Begriffe und Konzepte für Chemiker. VCH, Weinheim (1993)
- [160] F. Kohen, M. Pazzagli, M. Serio, J de Boever, D. Vandekerckhove: Chapter 8 – Chemiluminescence and bioluminescence immunoassay. In: W.P. Collins: Alternative Immunoassay. John Wiley & Sons Ltd. (1985)
- [161] W.G. Wood, H. Fricke, J. Haritz, A. Gadow, H.S. Krausz, B. Tode, C.J. Strasburger: An evaluation of four different luminescence immunoassay systems: CELIA (chemiluminescent immunoassay), SPALT (solid-phase antigen luminescence technique), ILMA (immunoluminometric assay) and ILSA (immunoluminometric labelled second antibody). *J Clin Chem Clin Biochem* 22 (1984) 349-356
- [162] D.M. Kemeny: ELISA - Anwendung des Enzyme Linked Immunosorbent Assay im biologisch/medizinischen Labor. Gustav Fischer Verlag Stuttgart (1994)
- [163] V. Holland, B. Saunders, F. Rose, A. Walpole. *Tetrahedron* 30 (1974) , 3299-3302
- [164] H. Theorell. *Enzymologia* 10 (1941), 250
- [165] D. Keilin, T. Mann. *Proc. Royal Soc. Ser. B* 122 (1937), 119
- [166] H. Galatti, I. Pracht: Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H_2O_2 und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem* 23 (1985), 453-460
- [167] M.J. Rodriguez Maranon, R.B. van Huystee: Plant Peroxidases: Interaction between their prosthetic groups. *Phytochemistry* 35, (1994) 5, 1217-1225
- [168] E. Engvall, P. Perlmann: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-874 (1971)

-
- [169] B.K. Van Weemen, H.H.W.M. Schuurs: Immunoassay using antigen enzyme conjugates. *FEBS Lett.* 15, 232-236 (1971)
- [170] A. Brecht, J. Piehler, G. Lang, G. Gauglitz: A direct optical immunosensor for atrazine detection. *Analytica Chimica Acta* 311 (1995), 289-299
- [171] A. Brecht, G. Gauglitz, J. Polster: Biosensors Bioelectron. 8 (1993) 387-392
- [172] P.B. Daniels, K.J. Deacon, M.J. Eddowes, D.G. Pedley: Sensors Actuators 15 (1988), 11-18
- [173] U. Riß: Submonolayer-Ellipsometrie. *BioTec* 2 (1999) 40-43
- [174] G. Gauglitz, A. Brecht, G. Kraus, W. Nahm. *Sens. Act. B* 11 (1993), 21-27
- [175] R. Tünnemann: Synthese und spektroskopische Untersuchung Silica-gebundener Peptide und organischer Verbindungen und deren Anwendung in der Sensorik. Dissertation, Universität Tübingen (2000)
- [176] F. Schindler: Surface Plasmon Resonance – was steckt dahinter?. *LaborPraxis* 10 (2000), 38-40
- [177] U. Riß: Neuer immunologischer Test mit Laserlicht. *Biospektrum* 6 (1996), 53-55
- [178] P. Pfortner: Entwicklung von Enzymimmunoassay (ELISAs) zur Bestimmung von huminstoffgebundenen Nitroaromaten. Dissertation, TU München (1998), 16
- [179] S.H. Jenkins: Homogeneous Enzyme Immunoassay. *J Immunol Meth.* 150 (1992) 91-97
- [180] P. Ulrich, M.G. Weller, R. Niessner: Immunological determination of triazine pesticides bound to soil humic acids (bound residues). *Fresenius J Anal Chem.* 354 (1996), 352-358
- [181] D. Rodboard: Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clinical chemistry* 20 (1974) 10, 1255-1270
- [182] M. Vanderlaan, L. Stanker, B. Watkins: Immunochemical Techniques in Trace Residue Analysis. In: M. Vanderlaan: Immunoassays for trace chemical analysis: monitoring toxic chemicals in humans, food, and the environment. ACS Symposium Series 451, American Chemical Society, Washington DC, USA (1990)
- [183] R.A. Dudley, P. Edwards, R.P. Ekins, D.J. Finney, I.G.M. McKenzie, G.M. Raab, D. Rodboard, R.P.C. Rodgers: Guidelines for Immunoassay Data Processing. *Clin Chem* 31 (1985), 1264-1271
- [184] T. Ruppert, L. Weil, R. Nießner: Influence of Water Contents on an Enzyme Immunoassay for Triazine Herbicides. *Vom Wasser* 78 (1992), 387-401

- [185] K. Haberer, P. Krämer: Verfügbarkeit immunochemischer Nachweisverfahren für Pflanzenschutzmittel im Wasser. *Vom Wasser* 71 (1988), 231-244
- [186] S. Wüst, B. Hock: A Sensitive Enzyme Immunoassay for the Detection of Atrazine Based upon Sheep Antibodies. *Analytical Letters* 25 (1992) 6, 1025-1037
- [187] C. Wittmann: Entwicklung und Anwendung eines Enzymimmunoassays zur quantitativen Bestimmung von Atrazin und der Atrazinmetaboliten Desethylatrazin, Deisopropylatrazin und Hydroxyatrazin. Dissertation, TU München (1991)
- [188] T. Giersch: A New Monoclonal Antibody for the Sensitive Detection of Atrazine with Immunoassay in Microtiter Plate and Dipstick Format. *Journal of agricultural and food chemistry* 41 (1993), 1006-1011
- [189] S.J. Huber, B. Hock: Methods of Enzymatic Analysis. Weinheim (1986), 438-451
- [190] T. Giersch, B. Hock: Production of Monoclonal Antibodies for the Determination of s-Triazines with Enzyme Immunoassays. *Food and Agricultural Immunology* 2 (1990), 85-97
- [191] A. Dankwardt, Persönliche Mitteilung, Firma Sension, Augsburg (1998)
- [192] T. Giersch, K. Kramer, M.G. Weller, B. Hock: Improvement of a Monoclonal Antibody-based Immunoassay for the Determination of Terbutryn. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*. 21 (1993) 6, 312-315
- [193] P. Ulrich, M. Weller, L. Weil, R. Niessner: Optimierung der immunologischen Bestimmung von Triazin-Herbiziden im Wasser mit Hilfe unterschiedlicher Enzymtracer. *Vom Wasser* 76 (1991), 251-266
- [194] M.G. Weller, L. Weil, R. Niessner: Determination of triazine herbicides by ELISA – Optimization of enzyme tracer synthesis. *Fresenius' journal of analytical chemistry* 343 (1992), 51-52
- [195] A. Dankwardt, S. Pullen, S. Rauchalles, K. Kramer, F. Just, B. Hock: Atrazine Residues in soil two years after the atrazine ban – A comparison of enzyme immunoassay with HPLC. *Analytical Letters* 28 (1995) 4, 621-634
- [196] D.M. Kemeney: ELISA – Anwendung des Enzyme Linked Immunosorbent Assay im biologisch/medizinischen Labor. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1994)
- [197] M. Beggs, M. Novotny, S. Sampredro, J. Gordon, G. Osikowicz: A self-performing chromatographic immunoassay for the qualitative determination of human chorionic gonatrophin (hCG) in urine and serum. *Clin Chem*. 6 (1990), 1084-1087
- [198] E. Schneider, R. Dietrich, E. Märtlbauer, E. Usleber, G. Terplan: Detection of aflatoxins, trichothecenes, ochratoxins A and zearaleone by test strip enzyme immunoassay:

- A rapid method for screening cereals for mycotoxins. *Food and Agric Immunol* 3 (1991), 103-104
- [199] J.H. Skerritt: Field Immunoassays for Pesticide Residues. In: D.A. Kurtz, J.H. Skerritt, L. Stanker (eds.): New Frontiers in Agrochemical Immunoassay. AOAC International, Arlington VA, USA (1995)
- [200] A. Dankwardt, B. Hock: Rapid immunofiltration assay for the determination of atrazine in water and soil samples. *Biosensors & Bioelektronics* 8 (1993) 7/8, xx-xxi
- [201] A. Dankwardt, B. Hock: Immunchemischer Schnelltest zzum Nachweis von Atrazin in Wasserproben und Bodenextrakten. *GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium* 37 (1993), 839-844
- [202] A. Dankwardt, R. Schmutzer, P. Schneider, A. Knöchel, A.-K. Meyer, Yasukazu Tambo: Nachweis von Triazin-Herbiziden in Wasserproben mit Hilfe des SensioScreen TR500-Schnelltestsystems – Ergebnisse eines Screeningprogramms zur Untersuchung der Belastungssituation der Oder. *GWF – Wasser/Abwasser* 7-8 (2002), 592-596
- [203] ISO 8402:1994. Quality - Vocabulary.
- [204] EURACHEM: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to method Validation and Related Topics. LGC Ltd., Teddington (1998)
- [205] DIN 55350 Teil 13: Begriffe der Qualitätssicherung und Statistik. Begriffe zur Genauigkeit von Ermittlungsverfahren und Ermittlungsergebnissen (Juli 1987)
- [206] DIN 58936 Teil 1: Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin. Grundbegriffe (April 1989)
- [207] DIN 58936 Teil 2: Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin. Begriffe zur Qualität von Klassierungs-, Zähl- und Meßsystemen (April 1989)
- [208] W. Funk, V. Damann, G. Donnevert: Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie. VCH Weinheim (1992)
- [209] C. Gertz: Methodvalidierung und Bewertung von Analysenergebnissen. In: S. Kromidas: Qualität im analytischen Labor. VCH, Weinheim (1995), 181
- [210] L. Huber: Validation of Analytical Methods: Review and Strategy. *LC-GC International February* (1998), 96
- [211] C. Mouvet, S. Broussard, R. Jeannot, C. Maciag, R. Abuknesha, G. Ismail: Validation of commercially available ELISA microtiter plates for triazines in water samples. *Analytica Chimica Acta* 311 (1995), 331-339
- [212] C.R. Lipton, J.X Dautlick, G.D. Grothaus, P.L. Hunst, K.M. Magin, C.A. Mihaliak, F.M. Rubio, J.W. Stave: Guidelines for the Validation and Use of Immunoassays for

- Determination of Introduced Proteins in Biotechnology Enhanced Crops and Derived Food Ingredients. *Food and Agricultural Immunology* 12 (2000), 153-164
- [213] C.A. Mihaliak, S.A. Berberich: Guidelines to the Validation and Use of Immunochemical Methods for Generating Data in Support of Pesticide Registration. In: J.O.Nelson, A.E. Karu, R.B. Wong (eds.): ACS Symposium Series 586, Immunoanalysis of Agrochemicals – Emerging Technologies. American Chemical Society, Washington DC (1995), 288-300
- [214] M.C. Hayes, J.X. Dautlick, D.P. Herzog: Quality Control of Immunoassays for Pesticide Residues. In: D.A. Kurtz, J.H. Skeritt, L. Stanker (eds.): New Frontiers in Agrochemical Immunoassay. AOAC International, Arlington, VA, USA (1995)
- [215] ISO 3534-1:1993. “Statistics – Vocabulary and symbols – Part 1: Probability and general statistical terms”
- [216] AOAC International: AOAC Peer Verified Methods Program – Manual on policies and procedures. Arlington VA 22201-3301, USA
- [217] D. Rodboard: Statistical Estimation of the Minimal Detectable Concentration („Sensitivity“) for Radioligand Assays. *Analytical Biochemistry* 90 (1978), 1-12
- [218] J.F. Brady: Interpretation of Immunoassay data. In: J.O.Nelson, A.E. Karu, R.B. Wong (eds.): ACS Symposium Series 586, Immunoanalysis of Agrochemicals – Emerging Technologies. American Chemical Society, Washington DC (1995), 266-287
- [219] J. Rittenburg, J. Dautlick: Quality Standards for Immunoassay Kits. In: J.O.Nelson, A.E. Karu, R.B. Wong (eds.): ACS Symposium Series 586, Immunoanalysis of Agrochemicals – Emerging Technologies. American Chemical Society, Washington DC (1995), 301-307
- [220] ISO 11843-1:1997. Capability of detection – Part 1: Terms and definitions.
- [221] Nomenclature in evaluation of analytical methods, including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure and applied chemistry* 67 (1995), 1699-1723
- [222] L.H. Keith, W. Crummett, J. Jr. Deegan, R.A. Libby, J.K. Taylor, G. Wentler: *Analytical Chemistry* 55 (1983), 2210-2218
- [223] T. Ruppert, L. Weil, R. Niessner: Influence of Water Contents on an Enzyme Immunoassay for Triazine Herbicides. *Vom Wasser* 78 (1992), 387-401
- [224] A.-K. Meyer: The International Odra Project (IOP) – 2. Interim Report - Annual Report 1998. Hamburg (1998), 295 (ISBN 3-924330-26-3)
- [225] National Inspectorate of Environmental Protection: Methodological Instructions for evaluation of pollution of soils and underground water with petroleum products and other chemicals during land reclamation. Warschau (1995)

-
- [226] J. Namiesnik, J.F. Biernat: Studies of organic pollution of the Odra-System. In: A.-K. Meyer (eds.): The International Odra Project (IOP) – 2. Interim Report - Annual Report 1998. Hamburg (1998), 295
- [227] H. Galatti, I. Pracht: Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H_2O_2 und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin. *J Clin Chem Clin Biochem* 23 (1985), 453-460
- [228] J.T. Thurston, J.R. Dudley, D.W. Kaiser, I. Hechenbleikner, F.C. Schaefer, D. Holm-Hansen: Cyanuric Chloride Derivatives. I. Aminochloro-s-triazines. *Journal of the American Chemical Society* 73 (1951) 7, 2981
- [229] D.W. Kaiser, J.T. Thurston, J.R. Dudley, F.C. Schaefer, I. Hechenbleikner, D. Holm-Hansen: Cyanuric Chloride Derivatives. II. Substituted Melamines. *Journal of the American Chemical Society* 73 (1951) 7, 2984
- [230] T.-L. Ho, G.A. Olah: *Angew. Chem.* 88 (1976), 847
- [231] M.E. Jung, M.A. Mazurek, R.M. Lim: *Synthesis* (1978), 588
- [232] M.V. Bhatt, S.U. Kulkarni: Cleavage of Ethers. *Synthesis* (1983), 249
- [233] G.A. Olah, S.C. Narang, B.G. Balaram Gupta, R. Malhotra: Synthetic Methods and Reactions. 62. Transformations with Chlorotrimethylsilane/Sodium Iodide, a Convenient in Situ Iodotrimethylsilane Reagent. *J. Org. Chem.* 44 (1979) 8, 1247
- [234] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Auflage (1991), 119
- [235] E.H. Vickery, L.F. Pahler, E.J. Eisenbaum: Selective O-Demethylation of Catechol Ethers. Comparison of Boron Tribromide and Iodotrimethylsilane. *J. Org. Chem.* 44 (1979) 24, 4444
- [236] R. L. Burwell jr., *Chem. Rev.* 54 (1954) 615
- [237] J.F.W. McOmie, M.L. Watts, D.E. West: Demethylation of Aryl Methyl Ethers by Boron Tribromide. *Tetrahedron* 24 (1968) 2289
- [238] J.B. Press: Deethylation of Aryl Ethyl Ethers by Boron Tribromide. *Synthetic Communications* 9 (1979) 5, 407
- [239] P.G. Williard, C.B. Fryhle: Boron Trihalide-Methyl Sulfide Complexes as Convenient Reagents for Dealkylation of Aryl Ethers. *Tetrahedron Letters* 21 (1980), 3731
- [240] W. Gerrard, M.F. Lappert: Fission of Mixed Ethers by Boron Trichloride. *J. Chem. Soc.* (1952), 1486
- [241] R.J. Bushway, B. Perkins, L. Fukal, R.O. Harrison: Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and high-performance liquid chromatography for the analysis of

- atrazine in water from Czechoslovakia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 21 (1991), 365
- [242] M.C. Hayes, J.X. Daulick, D.P. Herzog: Quality Control of Immunoassays for Pesticide Residues. In: D.A. Kurth, J.H. Skeritt, L. Stanker (eds.): *New Frontiers in Agrochemical Immunoassay*. AOAC International Arlington, VA, USA (1995), 237-249
- [243] Coring System Diagnostix GmbH: Angebot für Envirogard Röhrchen ELISA-Test. Gernsheim (1999)
- [244] M.-C. Hennion: Application and validation of immunoassay for pesticide analysis. *Analisis Magazine* 26 (1998) 6, M149-M155
- [245] K.M. Lange, P. Neulen: *Duden – Lexikon der Allgemeinbildung: was jeder wissen sollte*. Mannheim, Dudenverlag (1993)
- [246] Anonymus: Empörung ohne Grenzen. *Süddeutsche Zeitung* 43 (2002), 2
- [247] Hensinki-Kommission (1997)
- [248] http://www.farm-hespeler.de/immobilien_7pl_landwirtschaft_08.htm
- [249] A. Dankwardt, E.M. Thurman, B. Hock: Terbutylazine and Deethylterbutylazine in Rain and Surface Water – Determination by Enzyme Immunoassay and Gas chromatography/Mass Spectrometry. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 25 (1997) 1, 5-10
- [250] A.A.C.U. Amador: Buried Pesticide Waste Hazard to Poland. *Waste Management & Research* 10 (1992), 387-398
- [251] J. Markiewicz-Stralkowska: Evaluation of the effect on the human health as a result of an incorrect management of pesticides in light of regular inspections and results of investigations by the Sanitary Department. *Materialy VII konferencji z cyklu "Ochrona Srodowiska"*, Report 10, Bydgoszcz, Poland (1986)
- [252] J. Namiesnik, J.F. Biernat: TP12: Studies of organic pollution of the Odra-System. In: A.-K. Meyer (ed.): *The International Odra Project (IOP) - 2. Interim Report - Annual Report 1998*. Universität Hamburg (1999), 295-317
- [253] U. Welzbacher: *Gefahrstoffe – Datenblätter, Vorschriften, Arbeitshilfen*. WEKA Fachverlag für technische Führungskräfte, Augsburg (1998)
- [254] Autorenkollektiv: *ChemG, GefStoffV, TRGS. Band 1-3*, Verlagsgesellschaft W.E. Weinmann mbH, Filderstadt (1998)
- [255] R. Kühn, K. Birett: *Merkblätter Gefährliche Arbeitstoffe*. Ecomed, Landsberg/Lech (1998)

Y. Tambo: Validierung eines Enzymimmunoassays und Entwicklung von Standardmaterialien für die Analytik freier und gebundener Triazinrückstände. Dissertation, Hamburg (2002)

Schlagwörter: Kompetitiver Enzymimmunoassay, Methodvalidierung, Triazine, Huminstoffe, gebundene Rückstände, synthetische Modellschubstanzen für Huminstoffe

Kurzzusammenfassung: Großflächiger Einsatz von Pflanzenschutzmitteln (PSM) wie Atrazin oder Terbutbthylazin führte zur Belastung der Ökosysteme. Aufgrund ihrer ausgesprochenen Spezifität und Sensitivität werden verstärkt immunchemische Methoden wie Enzymimmunoassays (EIA) für die Analytik von PSM und Umweltschadstoffen eingesetzt.

Aufgabe dieser Arbeit war die Prüfung des Oderflusssystems auf seine Belastung mit Triazinen mit Hilfe eines EIA. Für die Untersuchungen stand der Atrazinspezifische EIA auf der Basis des polyklonalen Antikörpers AS46 zur Verfügung. Es wurden die Parameter Genauigkeit, Sensitivität, Spezifität und Robustheit der Methode bestimmt und die Ergebnisse einer strengen Validierung unterworfen. Die Leistungsfähigkeit des Tests hängt von der vorliegenden Matrix ab und die häufig bei EIAs anzutreffende Überschätzung der Atrazinbelastung kann Folge des Testformats sein. Bei den im Juni 1999 sowie im Mai 2000 genommenen Proben zeigte sich, dass besonders die obere Oder mit Triazinen belastet ist. Punktuell wird sogar der Summengrenzwert der EU-Trinkwasserverordnung für PSM und Biozide überschritten. Atrazin wird zu einem beträchtlichen Teil über Tschechien nach Polen eingetragen.

Triazine bilden Huminstoff-gebundene Rückstände, was zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Belastung führt, da diese Rückstände durch die klassische PSM-Analytik nicht erfasst werden. EIAs sind zur Quantifizierung gebundener Rückstände geeignet, die Entwicklung derartiger Analysenmethoden setzt jedoch geeignete Standardmaterialien zur Kalibration voraus. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher neuartige Modelle für Huminstoff-gebundene Triazinrückstände synthetisiert und die darin enthaltenen Triazinanteile analytisch erfasst. Es wurden synthetische Modellschubstanzen für Huminstoffe aus Hydrochinon bzw. p-Benzochinon dargestellt. Sie simulieren physikochemische Eigenschaften der Huminstoffe bezüglich der Polydispersität, Elementarzusammensetzung sowie Art und Quantität der funktionellen Gruppen.

Die „Inkubationsstrategie“ beruht auf der Bereitung von Inkubationslösungen mit Huminstoffen bzw. synthetischen Modellschubstanzen und Triazinen. Durch die „Inkubationsstrategie“ wurden nur niedrige Beladungen mit gebundenen Triazinrückständen realisiert. Für die „Direktpolymerisationsstrategie“ wurden Triazine direkt mit Hydrochinon im alkalisch-oxidativen Medium umgesetzt und in die Modellschubstanz einpolymerisiert. Es wurde durch Elementaranalyse 8µg/mg einpolymerisiertes „Atrazin“ im Modell HS100A, sowie 12µg/mg „Terbutbthylazin“ im Modell HS100T gefunden. Es wird angenommen, dass Triazine durch nukleophile Substitution des Chloratoms gebunden werden. Wesentlich größere Beladungen sind aufgrund der limitierten Löslichkeit der Triazine in Wasser nicht realisierbar. Für die „Monomerenstrategie“ wurden zwei Triazin-Monomer-Addukte mit definierter Struktur des gebundenen Triazins synthetisiert. Diese wurden anschließend in einer schnellen Polymerisationsreaktion mit p-Benzochinon in einen Modellhuminstoff einpolymerisiert. Die Triazinstruktur im Modellhuminstoff BQ310A resultiert formal aus der Umsetzung der freien Aminogruppe des Phase-I-Metaboliten Desethylatrazin mit einem chinoiden System. Die Struktur am Modell BQ400A resultiert aus der nukleophilen Substitution des Chloratoms am Atrazin durch ein aromatisches Amin. Durch Elementaranalyse wurden am BQ310A 46,5µg/mg sowie am BQ400A 11,5µg/mg gebundenes „Atrazin“ bestimmt. Dies übertrifft die mit Direktpolymerisation erzielte Beladung. Durch Konzentrationserhöhung des Triazin-Monomer-Addukts sollte die Quantität an gebundenem Triazin gesteigert werden können, da die Addukte sehr gut in das Polymer eingebaut werden. Mit EIA wurde das Vorhandensein gebundener Rückstände validiert. Huminstoffe binden jedoch im EIA unspezifisch an Antikörper und erzeugen ein falsch-positives Signal. Durch Zugabe von Rinderserumalbumin (BSA) wird dieses Signal experimentell inhibiert. Die Bindung der Huminstoffe an BSA entzieht jedoch nicht nur die Huminstoffe einer Detektion, sondern teilweise auch die Huminstoff-gebundenen Rückstände.

Y. Tambo: Validation of an Enzyme Immunoassay and Development of Calibration Materials for the Analysis of Free and Bound Triazine Residues. Doctoral Thesis, Hamburg (2002)

Keywords: Competitive Enzyme Immunoassay, Method Validation, Triazines, Humic Substances, Bound Residues, Synthetic Model Substances for Humic Acids,

Short summary: Ecosystems are burdened by broad application of pesticides like Atrazine or Terbutylazine. Immunochemical methods like Enzyme Immunoassays (EIA) are used for the analysis of pesticides because of their remarkable specificity and sensitivity.

The task of this PhD-Thesis was to examine the contamination with triazines of the river Odra using EIA. For this purpose the Atrazine specific antibody AS46 was available. Accuracy, precision, sensitivity, specificity and ruggedness were determined and results were subjected to a demanding validation. Test performance depends on the matrix and common overestimation of Atrazine in EIA may be the result of the test format. Water samples, taken in June 1999 and May 2000, revealed that the upper Odra is contaminated with triazines. Partially the extreme value of the EU drinking water ordinance for the sum of pesticides and biocides is exceeded. A large amount of atrazine is displaced from the czech part of the Odra.

Triazines form humic bound residues. These residues cannot be analysed by classical analytical means and thus the concentration is being underestimated. EIAs have the ability to quantify bound residues, but the development of analytical methods demands suitable standard materials for calibration.

Within the scope of this work was the synthesis of new models for humic bound triazine residues and the quantitative analysis of the bound triazines. Model compounds were synthesized using hydroquinone or p-benzoquinone. They simulate properties of humic acids with regard to polydispersity, elementary composition as well as chemical functional groups.

The "incubation strategy" is based on the preparation of solutions with humic acids resp. synthetic model compounds and triazines. Using this strategy, only low charging with bound residues could be realized. For the "direct polymerization strategy" triazines were deployed directly with hydroquinone in alkaline and oxidative solution. Triazines were polymerized into model compounds. Elementary analysis indicated 8 µg/mg polymerized „Atrazine“ in model HS100A as well as 12 µg/mg „Terbutylazine“ in model HS100T. It is being assumed that triazines are bound via nucleophilic substitution of chlorine. Significant higher charging is not possible because of the limited solubility of triazines in water. For the "monomeric strategy" two triazine derivatives with defined structure were synthesized. They were subjected to a quick polymerization with p-benzoquinone. The structure of the triazine in model BQ310A results by conversion of the free amino function of the phase-I-metabolite Desethylatrazine with a quinoid system. The structure of model BQ400A results by nucleophilic substitution of chlorine of the Atrazine via an aromatic amine. Elementary analysis of BQ310A indicated 46,5 µg/mg as well as 11,5 µg/mg (BQ400A) bound „Atrazine“. This surpassed the charges that had been realized with "direkt polymerisation strategy". Triazine derivatives can easily be bound into the polymers, so quantity of bound triazines can be easily raised by elevation of triazine concentration.

Using EIA, the existence of bound residues was validated. Humic acids bind unspecific to antibodies and generate a false positive signal. Adding bovine serum albumine (BSA), this signal was suppressed successfully. But binding of humic acids towards BSA also detracts humic bound triazines for detection.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:

Yasukazu Tambo

Anschrift:

Heinrich-Barth-Straße 1

20146 Hamburg

e-Mail:

yasukazu.tambo@web.de

Geburtsdatum / -ort:

17. April 1973 in Hamburg

Staatsangehörigkeit:

Japanisch

Schulausbildung:

1979 – 1983

Grundschule Humboldt-Schule, Hamburg

1983 – 1992

Gymnasium Uhlenhorst-Barmbek, Hamburg

06 / 1992

Abitur

1980 – 1985

Grundschule Japanisches Institut in Hamburg e.V., Hamburg

1985 – 1988

Mittelschule Japanisches Institut in Hamburg e.V., Hamburg

03 / 1988

Abschluß der Japanischen Mittelschule (Junior Highschool)

Studium:

10 / 1992 – 09 / 1994

Grundstudium Diplom-Chemie, Universität Hamburg

09 / 1994 – 04 / 1998

Hauptstudium Diplom-Chemie, Universität Hamburg

Wahlpflichtfach: Technische und Makromolekulare Chemie

Studienschwerpunkte: Organische Chemie, Analytische Chemie

02 / 1996 – 07 / 1996

Schwerpunktarbeit bei Prof. Dr. Dr. W. Francke

Thema: „Identifizierung von polycyclischen aromatischen Verbindungen in Sedimenten“; Spurenanalytik organischer Substanzen unter Einsatz der Analysemethoden GC/MS, HPLC; Umfassende Darstellung der Schadstoffbelastung von Sedimenten der Elbe

06 / 1998 – 03 / 1999

Diplomarbeit bei Prof. Dr. A. Knöchel

Thema: „Untersuchung von gebundenen Triazinrückständen an aquatischen Huminstoffen und synthetischen Modellschubstanzen durch Enzymimmunoassay“; Quantifizierung von Pflanzenschutzmitteln mit spezifischen Antikörpern (In Zusammenarbeit mit der Fa. Sension GmbH)

03 / 1999

Abschluß als Diplom-Chemiker

Promotion:

seit 06 / 1999

Doktorarbeit bei Prof. Dr. A. Knöchel, Universität Hamburg

Thema: „Validierung eines Enzymimmunoassays und Entwicklung von Standardmaterialien für die Analytik freier und gebundener Triazinrückstände“; Untersuchung des Oderflußsystems auf Herbizide und Synthese von Modellverbindungen; Beitrag zur Etablierung einer schnellen und kostengünstigen Analyseverfahren für Pflanzenschutzmittel

Berufserfahrung:

11 / 1997 – 01 / 1998

05 / 1999 – 09 / 1999

10 / 1999 – 09 / 2002

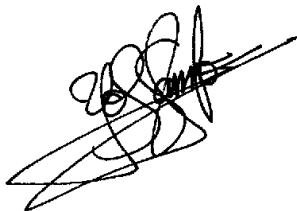
Ehrenamtliche Tätigkeit:

1991 – 1998

seit 1991

seit 1995

seit 2000



Hamburg, 21. November 2002

Studentische Hilfskraft im BMBF-Fördervorhaben:

„Internationales Oder-Projekt (IOP)“

Reinigung und Konservierung von Probenahmegefäßen; Vorbereitung von Sediment- und Bodenproben für die Bestimmung der Schwermetallgehalte

Wissenschaftlicher Mitarbeiter im BMBF-Fördervorhaben:

„Entwicklung geochemischer Methoden zur naturnahen Schadstoffdemobilisierung“

Vorbereitung und Teilnahme an Probenahmekampagne

Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Universität Hamburg:

Assistent im Nebenfachgrundpraktikum; Betreuung von Studenten, Leitung der Praktika inkl. Seminare und Kolloquien, Erstellung von Seminarunterlagen, Korrektur von Protokollen

Vorstandsmitglied der Schachgemeinschaft

Heinrich-Hertz und Uhlenhorst-Barmbek:

Kassenwart / Materialwart;

Organisation von Turnieren und Freizeiten;

Leiter von Jugendfahrten u.a.

Schachtrainer verschiedener Jugendgruppen

ausgebildeter Jugendgruppenleiter

Kassenwart des SC Schachelschweine e.V.

Wissenschaftliche Publikationen

Publikationen:

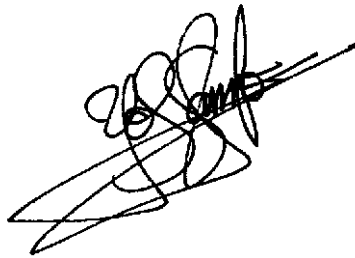
- S. Abbadi, B. Anders, K. Behrens, M. Cichon, B. Clausen, T. Kinzel, A. Knöchel, A.-K. Meyer, F. Miller, B. Runge, S. Staub, Y. Tambo: IOP-TP5 „Humic Acids – Teilprojekt 5“. In: A.-K. Meyer: The International Odra Project (IOP) – 2nd Interim Report – Annual Report 1998. BMBF-Förder-Nr. 02 WT9709, ISBN 3-924330-26-3, Eigenverlag der Universität Hamburg (**1999**), 115
- B. Anders, K. Behrens, M. Cichon, B. Clausen, T. Kinzel, A. Knöchel, A.-K. Meyer, F. Miller, B. Runge, S. Staub, Y. Tambo: The behaviour of heavy metal organometallic compounds as well as humic fractions of the Odra system – IOP-TP 5 „Huminstoffe“. In: A.-K. Meyer: The International Odra Project (IOP) – 3rd Interim Report – Annual Report 1999. BMBF-Förder-Nr. 02 WT9709, Eigenverlag der Universität Hamburg (**2000**), 69
- S. Abbadi, B. Anders, K. Behrens, M. Cichon, B. Clausen, T. Kinzel, A. Knöchel, U. Kristandt, A.-K. Meyer, F. Miller, H. Potgeter, B. Runge, S. Staub, Y. Tambo, D. Eifler, N. Taraschewski: Verhalten von Schwermetallen und Organometallverbindungen in Schwebstoffen, Sedimenten, Biofilmen und Huminfraktionen des Odersystems – Schlußbericht zum Teilprojekt 5 des Internationalen Oderprojekt. BMBF-Förder-Nr. 02 WT9709, ISBN 3-924330-55-7, Eigenverlag der Universität Hamburg (**2001**)
- Dankwardt, R. Schmutzer, P.-Schneider, A. Knöchel, A.-K. Meyer, Y. Tambo: Nachweis von Triazin-Herbiziden in Wasserproben mit Hilfe des SensioScreen TR500-Schnelltestsystems. *GWF-Wasser/Abwasser 143* (**2002**) 7-8, 592-596

Poster/Abstracts:

- Y. Tambo, A. Dankwardt, W. Herdering, B. Hock, A. Knöchel, K. Pranzas: Determination of Triazine Residues Bound to Aquatic Humic Substances and Synthetic Model Compounds by Enzyme Immunoassay. 37th IUPAC-Congress & 27. GDCh Tagung, Berlin (**1999**)
- A. Dankwardt, A. Knöchel, A.-K. Meyer, Y. Tambo: Untersuchungen zur Atrazinbelastung der Oder mit einem analytisch validierten Enzymimmunoassay auf der Basis des polyklonalen Antikörpers AS46. ANAKON, Konstanz (**2001**)

Eidesstattliche Versicherung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Es handelt sich um meinen ersten Promotionsversuch.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Yasukazu Tambo', written in a cursive, somewhat stylized manner.

Yasukazu Tambo
Hamburg, 21. November 2002