

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie
Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik
der Technischen Universität München

Entwicklung immunologischer, chromatographischer und massenspektrometrischer Methoden zur Bestimmung von Sulfonylharnstoffen

Petra Lilly Degelmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Michael Schuster

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner
2. Univ.-Prof. Dr. Peter Schieberle

Die Dissertation wurde am 28.09.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 23.11.2004 angenommen.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Q.-Z. ZHU, P. DEGELMANN, R. NIESSNER, D. KNOPP: *Selective Trace Analysis of Sulfonylurea Herbicides in Water and Soil Samples Based on Solid-Phase Extraction Using a Molecularly Imprinted Polymer*, Environ. Sci. Technol. **36** (2002) 5411-5420.

P. DEGELMANN, J. WENGER, R. NIESSNER, D. KNOPP: *Development of a Class-Specific ELISA for Sulfonylurea Herbicides (Sulfuron Screen)*, Environ. Sci. Technol. **38** (2004) 6795-6802.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit vom August 2001 bis Juli 2004 am Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn o. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner. Sie wurde durch ein Projekt der DFG finanziell gefördert.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Nießner danke ich insbesondere für das interessante und anspruchsvolle Arbeitsthema und die sehr guten Rahmenbedingungen am Institut für Wasserchemie, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Durch die vielseitige Ausrichtung des Instituts konnte ich auch über die Bioanalytik hinaus meinen analytischen Horizont erweitern.

Herrn PD Dr. Knopp möchte ich sehr herzlich für die intensive Betreuung meiner Arbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre während der letzten drei Jahre danken. Neben der fachlichen Unterstützung durch wertvolle Anregungen und Diskussionen habe ich insbesondere sein organisatorisches Talent geschätzt, das immer wieder Türen geöffnet hat.

Herrn Dr. Wenger von der Firma Syngenta (Basel) und Herrn Dr. Fritz von der Firma Bayer (Leverkusen) danke ich für die Bereitstellung von Substanzen zur Immunogendarstellung und von Sulfonylharnstoff-Standards.

Herrn Dr. Franek danke ich für die Durchführung von Fusionen zur monoklonalen Antikörpergewinnung und die freundliche Aufnahme während meines Aufenthalts in Brno.

Herrn Dr. Müller und Herrn Jürling vom Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie in Schmallenberg danke ich für die Zusammenarbeit bei den Messungen mit der Tandem-Massenspektrometrie und die interessante Zeit im Sauerland.

Herrn Prof. Dr. Spiteller und Herrn Zühlke vom Institut für Umweltforschung der Universität Dortmund danke ich für die schnelle und unkomplizierte Messung von Proben mittels LC-MS/MS.

Frau Dr. Marion Lackhoff vom Landesamt für Wasserwirtschaft und Herrn Dr. Thomas Letzel vom Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere der TU München danke ich für ihre freundliche Unterstützung bei der gemeinsamen Messkampagne. Marion danke zudem für die schöne gemeinsame Zeit am Institut für Wasserchemie.

Christine Sternkopf danke ich für zahlreiche REM-Messungen sowie die angenehme Zusammenarbeit. Herrn Langer danke ich für die Bestimmung von DOC-Werten. Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dubler (LMU) für die durchgeführten NMR-Messungen. Für die Herstellung von On-line-HPLC-Säulen danke ich außerdem Herrn Dollinger und Sebastian Wiesemann.

Sebastian Egger, der in seiner Zulassungsarbeit den Sol-Gel-Prozess optimiert hat, und den Praktikanten/innen Anna Zangl, Alexis Grimm, Maike Müller und Markus Luber sowie den Gaststudentinnen Katalin Hajnal und Valeria Tékus aus Ungarn, die mich bei der Optimierung von ELISA und IAC unterstützt haben, danke ich für ihre Mithilfe.

Der gesamten IWC-Mannschaft möchte ich für die entgegengebrachte Kollegialität und Hilfsbereitschaft danken. Mein besonderer Dank für die enge Zusammenarbeit gilt dabei meiner langjährigen Laborkollegin Diana Matschulat sowie meinen Kollegen Dr. Qing-Zhi Zhu, Dr. Anping Deng und Dr. Jaiping Lai, durch die ich zudem einen Einblick in die chinesische Kultur gewinnen konnte.

Darüber hinaus haben mich viele liebe Menschen in hervorragender Weise moralisch und praktisch unterstützt.

Vielen Dank!

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	1
1	Einleitung.....	1
2	Aufgabenstellung.....	6
II	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	7
1	Sulfonylharnstoffherbizide.....	7
1.1	Historische Entwicklung.....	7
1.2	Physikalisch-chemische Eigenschaften	7
1.3	Herstellung.....	12
1.4	Wirkung und Anwendung.....	14
1.4.1	Herbizide.....	14
1.4.1.1	Acetolactat-Synthase (ALS)	14
1.4.1.2	ALS-Hemmung durch Herbizide.....	15
1.4.1.3	Selektive Wirkung und Wirkkraft.....	16
1.4.1.4	Safener	17
1.4.2	Antidiabetika.....	17
1.4.2.1	Historische Entwicklung.....	17
1.4.2.2	Chemische Zusammensetzung.....	18
1.4.2.3	Wirkung	19
1.5	Reaktivität und Stabilität	19
1.5.1	Hydrolyse	19
1.5.2	Alkoholyse	21
1.5.3	Photolyse.....	22
1.5.4	Metabolisierung in Nutzpflanzen.....	22
1.5.5	Aktivierung von Proherbiziden.....	23
1.6	Ökologie und Toxikologie	24
1.6.1	Resistenzen.....	24
1.6.2	Persistenz	24
1.6.2.1	Sulfonylharnstoffe im Boden.....	24
1.6.2.2	Sulfonylharnstoffe im Wasser.....	26
1.6.2.3	Sulfonylharnstoffe in Lebensmitteln.....	27
1.6.3	Toxikologische Bedeutung	27
1.6.3.1	Humantoxikologie.....	27
1.6.3.2	Ökotoxikologie	29

1.7	Rechtliche Regelungen	30
1.7.1	Zulassung von Pflanzenschutzmitteln	30
1.7.2	Lebensmittelrechtliche Beurteilung von Herbizid-Rückständen.....	30
2	Analytik von Sulfonylharnstoffen	32
2.1	Probenahme und Probenvorbereitung	32
2.2	Chromatographische Methoden (GC/HPLC)	33
2.3	Massenspektrometrie (MS).....	35
2.4	Kapillarelektrophorese (CE).....	37
2.5	Immunoassays	38
3	Immunologische Methoden in der Analytik.....	40
3.1	Antikörper.....	40
3.1.1	Struktur	40
3.1.2	Gewinnung.....	41
3.1.3	Biosynthese.....	41
3.1.4	Polyklonale Antikörper	42
3.1.5	Monoklonale Antikörper.....	43
3.1.6	Rekombinante Antikörper.....	44
3.1.7	Künstliche Antikörper.....	44
3.2	Immunoassays	45
3.2.1	Entwicklung und Anwendungsgebiete	45
3.2.2	Prinzip, Durchführung und Optimierung.....	46
3.2.3	Auswertung.....	51
3.2.4	Affinitätskonstanten.....	52
3.2.5	Kreuzreaktivitäten.....	52
3.3	Immunoaffinitätschromatographie (IAC).....	54
3.3.1	Entwicklung und Prinzip	54
3.3.2	Antikörper-Analyt-Wechselwirkungen in der IAC	55
3.3.3	Trägermaterialien in der IAC.....	58
3.3.4	Immobilisierung der Antikörper	60
3.3.5	Anreicherung und Elution in der IAC.....	62
3.3.6	Anwendungen der IAC	63
4	MS und MS/MS	65
5	Sol-Gel-Glas – Technologie.....	68
5.1	Sol-Gel-Prozess	68
5.2	Immobilisierung von Antikörpern	70
5.3	Monolithen, Sphärische Partikel und Coatings	72
6	Molekular geprägte Polymere (MIPs)	74

III	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	77
1	Entwicklung und Charakterisierung eines breitbandigen anti-SU-Antikörpers.....	77
1.1	Haptenauswahl und Immunisierungsstrategie	77
1.2	Herstellung und Charakterisierung von Immunogenen, Coating-Antigenen und Tracern	77
1.2.1	Immunogene.....	77
1.2.2	Homologe Tracer und Coating-Antigene.....	80
1.2.3	Heterologe Tracer und Coating-Antigene.....	81
1.2.4	Charakterisierung der Kopplungsprodukte	83
1.3	Immunisierungsverlauf und Charakterisierung.....	85
1.3.1	Monoklonale Antikörperproduktion	85
1.3.2	Polyklonale Antikörperproduktion	90
1.4	ELISA-Entwicklung	94
1.4.1	Optimierung des direkten Testformates.....	95
1.4.1.1	Tracer	95
1.4.1.2	Konzentrationsverhältnisse	96
1.4.1.3	Blockreagenzien.....	96
1.4.1.4	Optimierte Testbedingungen.....	97
1.4.1.5	Matrixeinflüsse	99
1.4.1.6	Zeiteffekte	103
1.4.1.7	Reproduzierbarkeit.....	104
1.4.2	Optimierung des indirekten Testformates.....	105
1.4.2.1	Coating-Antigene.....	105
1.4.2.2	Konzentrationsverhältnisse	105
1.4.2.3	Blockreagenzien.....	107
1.4.2.4	Reproduzierbarkeit.....	108
1.5	Kreuzreaktivitäten.....	108
1.5.1	Sulfonylharnstoffherbizide.....	108
1.5.2	Strukturell verwandte Verbindungen.....	114
1.6	Affinitätskonstanten.....	116
2	Untersuchung von Realproben mittels klassenspezifischem direktem ELISA	118
2.1	Gespikte Oberflächenwässer.....	118
2.1.1	Probenbeschaffenheit	118
2.1.2	Kalibrierung	119
2.1.3	Matrixeffekte.....	119
2.1.4	Korrelation zwischen ELISA und HPLC.....	120

2.2	Realprobenscreening von Oberflächenwässern und Kläranlagenabläufen über einen Zeitraum von 6 Wochen	121
2.2.1	Wasserproben.....	121
2.2.2	Ergebnisse des Realprobenscreenings	122
2.3	Referenzanalytik.....	124
2.3.1	RP-SPE/HPLC-UV	124
2.3.1.1	Stabilität von SU-Standards.....	124
2.3.1.2	Solid-Phase-Anreicherung von SUs	125
2.3.1.3	LC-Bedingungen	128
2.3.1.4	Detektion mittels UV-Absorptionsmessung.....	128
2.3.2	Anreicherungsdisk/LC-MS.....	129
2.4	Teststabilität und Anwendung.....	130
3	Immunoaffinitätsanreicherung von Sulfonylharnstoffen	132
3.1	Antikörper-Aufreinigung.....	132
3.2	Herstellung und Charakterisierung von SGG-Adsorbentien.....	132
3.2.1	Herstellung von SGG-Monolithen.....	132
3.2.2	Herstellung von SGG-gecoateten Partikeln.....	135
3.3	Charakterisierung von SGG-Adsorbentien	138
3.3.1	Säulendimensionierung.....	138
3.3.2	Beladungs- und Elutionsbedingungen	138
3.3.3	Unspezifische Bindung	143
3.3.4	Kapazitäten	143
3.3.5	Wiederfindungen	146
3.3.6	Stabilität.....	146
4	Anwendung von anti-SU-SGG-Adsorbentien für die Off-line-Extraktion von Realproben	148
4.1	Anreicherung von SUs für die HPLC-UV-Detektion.....	148
4.1.1	Kalibrierung, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	148
4.1.2	Immunoaffinitätsextraktion von SUs aus Wasserproben.....	150
4.1.3	Immunoaffinitätsextraktion von Lebensmittelproben	155
4.2	Anreicherung von SUs für die LC-MS/MS.....	160
4.2.1	Massenspektrometrische Detektion der Sulfonylharnstoffe.....	160
4.2.2	Retentionszeiten und Fragmentierungen	160
4.2.3	Kalibrierung, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	164
4.2.4	Matrixeffekte	165
4.2.5	Anwendung auf Lebensmittelextrakte	166

4.3	HPLC-UV/DAD und LC-MS/MS im Vergleich	169
4.3.1	Arbeitsbereich	169
4.3.2	Wiederfindungen.....	169
4.3.3	Anwendungsmöglichkeiten.....	171
5	On-line-Anreicherung unter Verwendung von anti-SU-SGG-Adsorbent	173
5.1	On-line-Säulendimensionierung	173
5.2	Einfache IAC-Säulenschaltung.....	174
5.3	IAC/RP-SPE-Kombinationsschaltung	176
5.3.1	Aufbau und Zeitablauf	176
5.3.2	Ergebnisse	178
5.4	Weitere Optimierungsmöglichkeiten.....	179
5.5	Eignung von SGG-IAC-Adsorbent für die On-line-Anreicherung	180
IV	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	181
V	EXPERIMENTELLER TEIL	187
1	Geräte und Zubehör	187
1.1	Probenvorbereitung.....	187
1.2	Immunadsorbentpräparation	187
1.3	ELISA	188
1.4	HPLC-UV/DAD	188
1.5	LC-MS(/MS).....	188
1.6	Synthesen	189
2	Chemikalien und Reagenzien.....	190
3	Antikörper	192
4	Standards	193
5	Pufferlösungen.....	195
5.1	Enzym-Immunoassay.....	195
5.2	Immunadsorbent	196
5.3	Protein A-Aufreinigung	196
6	Probenvorbereitung.....	197
6.1	Extraktion nach POWLEY	197
6.2	Extraktion nach KLEIN/ALDER.....	197

7	Immunoassays	198
7.1	Direkter kompetitiver Immunoassay	198
7.2	Indirekter kompetitiver Immunoassay	199
8	SGG-Immunadsorber	200
8.1	Antikörperaufreinigung	200
8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	200
8.3	SGG-Immunosorbens-Herstellung	201
8.3.1	Gemahlene SGG-Monolithen	201
8.3.2	SGG-beschichtete Silikatpartikel.....	201
8.3.3	Lagerung und Regeneration der Immunadsorbersäulen	202
8.3.4	Herstellung von Blank-Säulen	202
8.4	Anreicherung von SUs mittels SGG-IAC	202
9	HPLC	203
9.1	SPE-Anreicherung für die HPLC	203
9.2	HPLC-Methoden für die UV/DAD-Detektion	204
9.3	HPLC-Methoden für die MS-Detektion	205
9.4	HPLC-Methoden für die Tandem-MS-Detektion.....	205
9.5	On-line-HPLC-UV/DAD.....	206
10	MS	208
11	Synthesen	209
11.1	Synthese des Bernsteinsäurederivates von Hapten 1 und Identifizierung der Carbonsäurederivate der Haptene 2 und 3	209
11.2	Synthese von Hapten-Protein-Konjugaten über NHS-Aktivester	210
11.3	Synthese von Coating-Antigenen über Sulfo-NHS-Ester	210
11.4	Synthese von Coating-Antigenen mittels Diazotierung	210
11.5	Synthese von Hapten-POD-Tracern	211
11.5.1	Homologer Tracer	211
11.5.2	Heterologer Tracer	211
11.6	Bestimmung der Kopplungsdichte mittels TNBS	211
11.7	Dünnschichtchromatographie	212
VI	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	213
VII	LITERATURVERZEICHNIS	217

I EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

1 Einleitung

Als Pestizide bezeichnet man alle zum Schutz von Nutz- und Kulturpflanzen eingesetzten chemischen Substanzen zur Bekämpfung von Schädlingen. Der Schutz der Kulturpflanzen erstreckt sich auf die Vermeidung von Fraßschäden durch Schnecken, Nagetiere, Insekten und deren Larven, auf die Abwehr von Parasiten sowie auf die Bekämpfung von Wildkräutern, die mit Nutzpflanzen um Wasser, Licht und Nährstoffe konkurrieren. Neben chemischen Pflanzenschutzmitteln (PSM) und Insektenlockstoffen werden auch sog. mechanische Methoden, wie das Einsammeln von Schnecken oder verschiedene Bodenbearbeitungstechniken zur Entfernung von Wildkräutern eingesetzt. Biologische Methoden sind die Begünstigung natürlicher Feinde von Schadorganismen, wie z.B. der Einsatz von *Coccinellidae* (Marienkäfern) bei der Bekämpfung von Blatt- und Schildläusen oder die Resistenzzüchtung. Ziel des integrierten Pflanzenschutzes ist es, alle Pflanzenschutzmaßnahmen optimiert zu verbinden, um den Einsatz von Pestiziden auf ein notwendiges Maß beschränken zu können, da deren Rückstände in Umwelt und Lebensmitteln problematisch sind [1].

Pestizide werden in die folgenden drei Hauptwirkgruppen eingeteilt: Insektizide zur Insektenbekämpfung, Fungizide zur Bekämpfung von Pilzen und Herbizide zur Unkrautbekämpfung. Von Bedeutung sind außerdem Akarizide gegen Milben, Nematizide zur Bekämpfung von Fadenwürmern, Molluskizide zur Bekämpfung von Schnecken und Rodentizide zur Bekämpfung von Nagetieren [2].

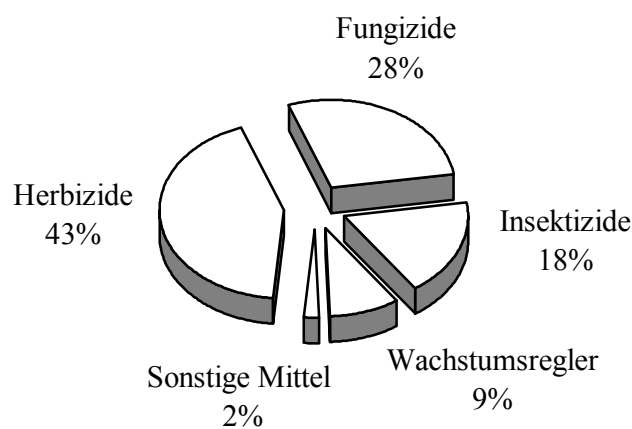


Abbildung 1: Marktanteile der verschiedenen Pestizidgruppen in der Bundesrepublik Deutschland: Inlandsabgabe an Wirkstoffen im Jahr 2003 [3].

Herbizide spielen auch weltweit mit einem Marktanteil von ca. 47% (2001) aller eingesetzten PSM eine bedeutende Rolle [4]. Sie werden anhand ihres Wirkungsbereichs in Totalherbizide, die zur Vernichtung der gesamten Vegetation, z.B. auf Gleisanlagen, eingesetzt werden und in Selektivherbizide eingeteilt, welche lediglich eine hohe Wirksamkeit gegen Schadpflanzen zeigen, die Nutzpflanze jedoch nicht schädigen und somit in Kulturpflanzenbeständen angewandt werden können. Die Ursachen für die Wirkungselektivität beruht auf Unterschieden in Morphologie, Anatomie oder Metabolismen von Kultur- und Unkrautpflanze. Nach ihrer Wirkweise unterscheidet man zwischen Kontaktherbiziden, die bei der Berührung mit Pflanzenteilen zu deren Absterben führen, und den systemischen Herbiziden, welche nach der Aufnahme in die Pflanze über Blätter (Blattherbizide) oder Wurzeln (Bodenherbizide) ihre Wirkung entfalten. Bezüglich des Anwendungszeitpunktes wird eine Unterteilung in Vorsaats-, Vorauf- und Nachaufherbizide getroffen. Voraufherbizide werden nach der Saat, vor dem Keimen und Auflaufen der Kulturpflanze appliziert, Nachaufherbizide danach [5, 6].

Die historischen Anfänge der Herbizid-Anwendung reichen bis ins 18. Jahrhundert zurück. Damals entdeckte man, dass Schwefelsäure eine pflanzenschädigende Wirkung zeigt [7]. Zunächst wurden insbesondere anorganische Salze, wie Eisen- und Kupfersulfate, zur Bekämpfung von Unkräutern herangezogen. Um 1900 erkannte man die herbizide Wirkung von Chloraten. Außerdem wurden Arsenate, Borate und Rhodanidsalze eingesetzt, die mittlerweile aufgrund ihrer Toxizität keine Bedeutung mehr haben. In den 30er Jahren entdeckte man mit Dinitro-o-kresol erstmals die pflanzenschädigende Wirkung einer organischen Verbindung. Weitere Dinitrophenole und Pentachlorphenole folgten. Die Markteinführung von chlorierten Phenoxy-carbonsäuren, wie beispielsweise 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), nach dem 2. Weltkrieg, ermöglichte eine selektive Bekämpfung dikotyler Unkräuter in monokotylen Getreidepflanzen. Ihre wachstumsstimulierende Wirkung führt dazu, dass der Stoffwechsel der Unkrautpflanze völlig unreguliert Nähr- und Reservesubstanzen verbraucht und diese dadurch schließlich abstirbt. Allerdings konnten sich in Folge auch Schadgräser, wie *Avena fatua* (Flughäfer) ausbreiten, welche wiederum ab 1946 mit speziellen Graminaziden, wie z.B. Triallat, die Biosynthese von langkettigen Fettsäuren hemmt, bekämpft wurden [4].

In den 50er Jahren wurden mit der Synthese der photosynthesehemmenden s-Triazine und Harnstoffe zwei neue Stoffklassen für die selektive Unkrautbekämpfung erschlossen. Im Jahr 1982 folgte die Markteinführung der hochselektiven und wirkungsstarken Herbizidklasse der Sulfonylharnstoffe (SUs) durch *DuPont* [8]. Ihre Wirkung beruht auf der Hemmung des Enzyms Acetolactat-Synthase (ALS), welches für die Biosynthese der Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin notwendig ist. Da bereits geringe Substanzmengen eine herbizide Wirkung zeigen, sind SUs auch im Hinblick auf die Vermeidung von möglichen PSM-Rückständen in Umwelt und Lebensmitteln interessant. Die Entwicklung hochaktiver

Selektivherbizide, deren Aufwandmenge gering ist und die daher wenig umweltbelastend sind, liegt weiterhin im Trend. So haben sich auch die SUs auf dem Markt etabliert und ihre Absatzmengen sind in den vergangenen Jahren in Deutschland leicht gestiegen (vgl. Tabelle 1). Aufgrund der geringen Aufwandmengen liegt ihr Anteil am gesamten Herbizidabsatz bei lediglich 1%. Dabei muss berücksichtigt werden, dass der Herbizideinsatz von Jahr zu Jahr wetterbedingten Schwankungen unterliegt.

Tabelle 1: Inlandsabsatz an Wirkstoffen in der Bundesrepublik Deutschland in den Jahren 1996 bis 2003 [3, 9-11].

Jahr	PSM [t]	Herbizide* [t]	SUs [t]	SU-Anteil an Herbiziden [%]
1996	35085	16541	53	0.3
1997	34648	16485	59	0.3
1998	38883	17267	74	0.4
1999	35402	15825	78	0.5
2000	35595	16610	78	0.5
2001	33663	14942	68	0.5
2002	34678	14328	69	0.5
2003	35755	15350	157	1.0

* Herbizide einschließlich Safener

Neben der Entwicklung neuer Hochleistungsherbizide, wird auch versucht, phytotoxische Naturstoffe und deren synthetische Nachbildungen als Herbizide einzusetzen. Zur Erhöhung der Kulturpflanzenverträglichkeit von Herbiziden werden zudem vermehrt sogenannte Safener oder Antidote beigemischt [5]. Heute sind mehr als 30 experimentell bestätigte herbizide Wirkorte bekannt, von denen etwa 19 wirtschaftlich interessant sind. Aus pflanzenphysiologischer Sicht sind diese Targets überwiegend in den Chloroplasten der Pflanzenzelle lokalisiert. Da sich chemische Zusammensetzung und Wirkklassen von Herbiziden sehr unterschiedlich gestalten, ist eine Auswahl der Hauptklassen in Tabelle 2 nochmals zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 2: Auswahl wichtiger Herbizidklassen im Überblick [4, 7].

Wirkmechanismus	Stoffklasse	Beispielsubstanz
Hemmung der Photosynthese		
(Photosystem II)	Triazine	Atrazin
	Uracile	Bromacil
	Benzothiadizole	Bentazon
	Harnstoffe	Isoproturon
Hemmung der Biosynthese von Aminosäuren		
▪ <i>Acetolactat-Synthase-Inhibitoren</i>	Sulfonylharnstoffe	Amidosulfuron
	Imidazolinone	Imazaquin
▪ <i>Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase-Inhibitoren</i>		Glyphosat
▪ <i>Glutamin-Synthetase-Inhibitoren</i>		Glufosinat
Hemmung der Fettsäure-Biosynthese		
▪ <i>Acetyl-Coenzym-A-Carboxylase-Inhibitoren</i>	Aryloxypropionate	Fenoxaprop
	Cyclohexenone	Clethodium
▪ <i>Inhibitoren der Biosynth. langkettiger FS</i>	Thiolcarbamate	Triallat
Hemmung der Zellteilung		
	Chloracetanilide	Acetochlor
	Dinitroaniline	Trifluralin
Hemmung der Cellulose-Biosynthese		
	Diverse Strukturen	
Herbizide mit Pflanzen-Hormonwirkung		
	Pyridincarbonsäure	Diflufenzopyr

Rechtlich gesehen, bildet die Richtlinie 91/414/EWG die europäische Rechtsgrundlage für das Inverkehrbringen von PSM. Es soll in erster Linie gewährleistet werden, dass kein PSM, das in der EU in Verkehr gebracht wird, schädliche Wirkungen auf die Gesundheit von Mensch und Tier oder unannehmbare Auswirkungen auf die Umwelt hat. Einzelne Grenzwerte sind in einzelstaatlichen Regelungen, wie der deutschen Trinkwasserverordnung [12] und der Rückstands-Höchstmengeverordnung [13] geregelt. Für Trinkwasser gilt, einzelne PSM-Rückstände betreffend, der Grenzwert von 100 ng/L. Die Summe aller enthaltenen Pestizide darf außerdem den Summengrenzwert von 500 ng/L nicht übersteigen. Bei Lebensmitteln gelten für einzelne Substanzen verschiedene Grenzwerte. Für SU-Rückstände liegen die Grenzwerte zwischen 0.01 bis 0.05 mg/kg.

Weltweit befinden sich über 800 PSM-Wirkstoffe auf dem Markt. In Deutschland sind derzeit über 240 Wirksubstanzen in mehr als 900 Produkten, die einer speziellen Zulassung bedürfen, im Handel erhältlich. Bei dieser Vielzahl an Verbindungen ist eine umfassende

Analytik und Rückstandskontrolle äußerst schwierig. In der Regel muss eine Auswahl an möglichen Inhaltsstoffen getroffen werden, auf deren Vorhandensein dann gezielt geprüft wird. Wie der sog. „Nitrofen-Skandal“ im Jahr 2002 zeigte, kann nie ausgeschlossen werden, dass einzelne Verbindungen sich noch im Verkehr befinden, obwohl sie bereits, wie im Fall von Nitrofen, seit 1988 in der EU verboten waren [14].

In der Rückstandsanalytik von PSM werden Multi-Methoden eingesetzt, die darauf zielen, ein möglichst breites Spektrum an Analyten gleichzeitig zu erfassen. Etablierte Methoden basieren häufig auf der gaschromatographischen Messung vorgereinigter Extrakte. Die gesuchten Pestizide müssen allerdings ausreichend flüchtig sein, damit sie für die Gaschromatographie (GC) zugänglich sind. Sulfonylharnstoffherbizide, für die in der vorliegenden Arbeit Analysemethoden entwickelt wurden, können mittels GC nur nach vorausgegangener Derivatisierung bestimmt werden. Das bisher am häufigsten beschriebene Verfahren zur Analyse von SUs ist die HPLC-UV-Detektion. Bei dieser Methode müssen jedoch komplexe Lebensmittelmatrices einer relativ aufwändigen Probenvorbereitung unterzogen werden, da die Probenextrakte weitgehend von Matrixbestandteilen befreit werden müssen. Weniger stark vorgereinigte Extrakte sind im Fall einer massenspektrometrischen Detektion, speziell bei Tandem-MS-Messungen, notwendig. Daher und aufgrund ihrer hohen Nachweissicherheit gewinnt die Massenspektrometrie (MS) zunehmend an Bedeutung in der Spurenanalytik. Um die Probenaufarbeitung zu rationalisieren, werden zudem vermehrt On-line-Methoden entwickelt, die es über eine Säulenschaltung ermöglichen, flüssige Proben oder Probenextrakte direkt in die Apparatur zu injizieren, die Analyten auf einer entsprechenden Adsorberphase anzureichern und dann direkt ins analytische LC-System zu eluieren.

2 Aufgabenstellung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, immunologische, chromatographische und massenspektrometrische Methoden zur Anreicherung und Bestimmung von Sulfonylharnstoffherbiziden zu entwickeln.

Es sollten zunächst gruppenselektive Antikörper hergestellt werden, die möglichst viele SUs erkennen (sog. Breitbandantikörper). Dafür wurde mit drei verschiedenen Molekülstrukturen immunisiert, da die Wahrscheinlichkeit, dass vom Immunsystem Antikörper mit unterschiedlichen Querempfindlichkeiten gebildet werden, steigt, wenn die Analytmoleküle in verschiedenen Orientierungen präsentiert werden. Die Synthese der drei unterschiedlichen Immunogene und die Herstellung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern war Gegenstand der Arbeit.

Die gewonnenen Antikörper sollten Anwendung im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und in Immunadsorbern für die Anreicherung von SUs aus wässrigen Matrices und Lebensmittelextrakten finden. Es war Zielsetzung, die Einsetzbarkeit des entwickelten Immunadsorbers für Off- und On-line-Anreicherungen in der Flüssigchromatographie (LC) sowie die Kombinierbarkeit mit der Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) aufzuzeigen. Für die Immobilisierung der Antikörper war Sol-Gel-Glass als Trägermaterial vorgegeben. Begleitend galt es, ein entsprechendes Säulenschaltssystem für die On-line-LC-Analytik von SUs und ein massenspektrometrisches Detektionsverfahren zu entwickeln. Schließlich sollten die entwickelten Methoden für verschiedene Wasser- und Lebensmittelproben validiert werden.

II THEORETISCHE GRUNDLAGEN

1 Sulfonylharnstoffherbizide

Die zur Wirkgruppe der Acetolactat-Synthase-Inhibitoren gehörenden Sulfonylharnstoffherbizide stellen eine Herbizidklasse mit rund 30 verschiedenen Einzelverbindungen dar. Ihre große Bedeutung, besonders im Getreideanbau (bei Weizen, Reis, Mais), ist vor allem auf ihre selektive Wirkung gegen dikotyle Unkräuter und ihre hohe Wirksamkeit bei geringer Anwendungsdosis zurückzuführen. Durch die Entwicklung neuer Synthesewege wurden strukturell sehr unterschiedliche SUs gewonnen und für neue Anwendungen, wie z.B. den Kartoffelanbau, erschlossen [15].

1.1 Historische Entwicklung

Seit ihrer Entdeckung durch LEVITT im Jahr 1975 sind die Sulfonylharnstoffherbizide ein Hauptforschungsgebiet für viele Hersteller von Agrochemikalien. Anfang der 80er Jahre wurden die beiden SUs Chlorsulfuron und Sulfometuron-methyl erstmalig von *DuPont* eingeführt. Später folgte Metsulfuron-methyl, das in seiner herbiziden Wirkung gegenüber Chlorsulfuron in der Kontrolle von Veilchen und Knöterichgewächsen überlegen ist, jedoch nicht in seiner Aktivität gegen Kettenlabkraut. Bis heute haben weltweit insgesamt acht Firmen etwa 30 SUs registrieren lassen: *BASF*, *BayerCropScience*, *DuPont*, *ISK*, *Monsanto*, *Nissan*, *Syngenta* und *Takeda* [16]. Die Entwicklung neuer SUs führte zu einer Vielfalt von Produkten mit speziellen Wirkspektren und Anwendungsgebieten. Darunter befinden sich auch Kombinationspräparate, die bis zu zwei SUs gleichzeitig enthalten oder mit Herbiziden anderer Wirkklassen vermischt sind. In Deutschland sind derzeit 33 Präparate registriert, die insgesamt 15 verschiedene SUs enthalten (Stand Juli 2004). Zudem wurden in letzter Zeit mehrere neue SUs für den deutschen Markt zugelassen. Zu diesen neueren SUs zählen beispielsweise Imazosulfuron und Sulfosulfuron [17].

1.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften

SUs sind schwach polare, nicht flüchtige Verbindungen, die in Reinform als weiße oder farblose Salze vorliegen. Ihre Schmelzpunkte liegen im Bereich von 145-205°C [18, 19]. In Lösung reagieren sie schwach sauer mit pKs-Werten zwischen 3.5 und 5.2. Ihre Löslichkeit in Wasser und organischen Lösungsmitteln ist abhängig vom pH-Wert [20]. Eine Übersicht über die physikalischen Eigenschaften ausgewählter SUs ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Physikalische Eigenschaften der Sulfonylharnstoffherbizide [18-20].

Substanz	Schmp. [°C]	Dampfdruck [nPa]**	pKs	Löslichkeit in H ₂ O [g/L]**		Verteilungs- koeffizient (log P _{O/W})	
				pH 5	pH 7	pH 5	pH 7
Azimsulfuron	170	4	3.6	0.072	1.05	4.43	0.043
Chlorimuron-ethyl	185-187	0.49	4.2	0.011	1.20	2.51	0.36
Chlorsulfuron	174-178	3	3.6	0.300	27.9	-	-
Cinosulfuron	145	0.1	4.5	0.082	3.70	-	-0.20
Flupyrsulfuron- methyl-Natrium	-	< 1	4.9	0.060	0.60*	-0.02	-1.20*
Metsulfuron-methyl	162	11	3.8	0.550	2.80	0.00	-1.85
Nicosulfuron	172-173	< 0.8	4.6	0.400	120	-0.36	-1.77
Primisulfuron-methyl	203	< 1	5.1	0.001	0.07	-	0.20
Prosulfuron	155	< 35	3.8	0.087	4.00	1.50	-0.21
Rimsulfuron	-	1500	4.0	0.135	7.30	-	-1.47
Sulfometuron-methyl	203-205	7.3×10^{-5}	5.2	0.008	0.07	1.18	-0.51
Sulfosulfuron	201-202	30.5	3.5	0.018	1.63	0.73	-0.77
Thifensulfuron-methyl	171	7.5	4.0	0.220	2.24	0.52	-1.57
Triasulfuron	188-189	2100	4.6	0.032	8.15	1.10	-0.59
Tribenuron-methyl	141	36000	5.0	0.050	0.30*	-	-0.44

Schmp. = Schmelzpunkt

* bei pH 6

** bei 20°C

Die Grundstruktur aller SUs bildet das Sulfonylharnstoff-Gerüst (R₁-SO₂-NH-CO-NH-R₂). Die substituierten Reste R₁ und R₂ können unterschiedliche Struktur aufweisen. In der Regel ist der Substituent R₂ jedoch ein Triazin- oder Pyrimidin-Derivat. Der Substituent R₁ ist entweder aliphatischer, aromatischer oder auch heterocyclischer Natur. In Tabelle 4 sind alle in dieser Arbeit einbezogenen SUs aufgeführt.

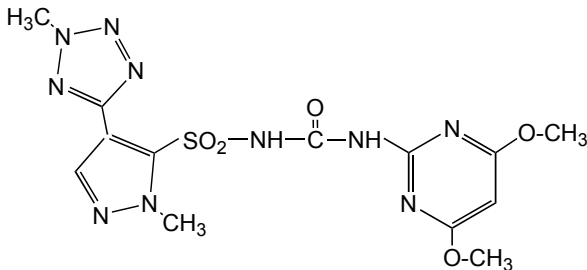
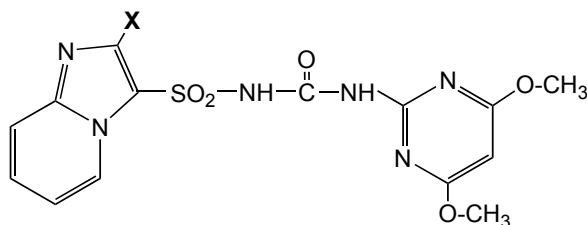
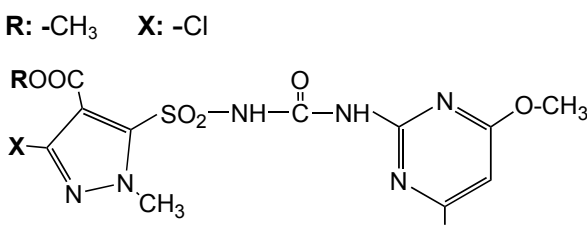
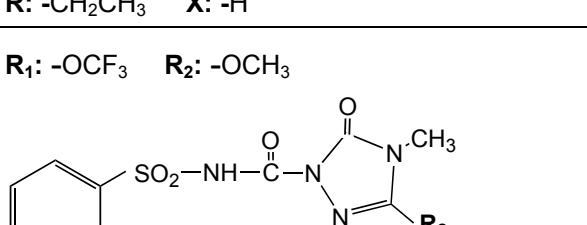
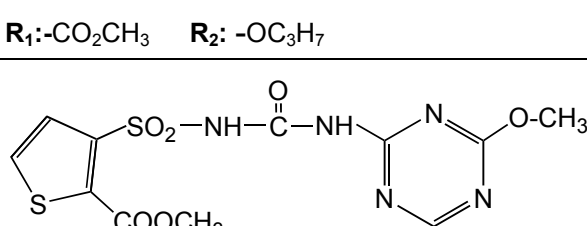

Tabelle 4: Sulfonylharnstoffherbizide [21].

Name	Abkürzung	Struktur	M_r [g/mol]		
<i>Sulfonylharnstoffe mit Triazin-Ring</i>					
		R_1 R_2 R_3			
Chlorsulfuron	CLS	-Cl	-OCH ₃	-CH ₃	357.8
Cinosulfuron	CIS	-OCH ₂ CH ₂ CH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	413.4
Ethametsulfuron-methyl	ESM	-COOCH ₃	-OCH ₂ CH ₃	-NH-CH ₃	410.4
Metsulfuron-methyl	MSM	-COOCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	381.4
Prosulfuron	PRS	-CH ₂ CH ₂ CF ₃	-OCH ₃	-CH ₃	419.4
Triasulfuron	TRS	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OCH ₃	-CH ₃	401.8
Tribenuron-methyl	TBM			395.4	
Triflusulfuron-methyl	TFSM			478.4	
Iodosulfuron-methyl	ISM			507.3	

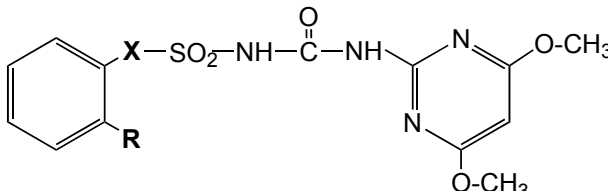
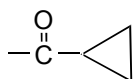
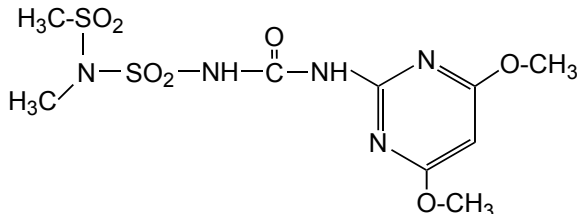
Fortsetzung Tabelle 4:

Name	Abkürzung	Struktur	M_r [g/mol]
<i>Sulfonylharnstoffe mit Pyrimidin-Ring</i>			
		R_1 R_2 R_3	
Chlorimuron-ethyl	CIE	-CH ₂ CH ₃ -OCH ₃ -Cl	414.8
Oxasulfuron	OXS		406.4
Primisulfuron-methyl	PRSM	-CH ₃ -OCHF ₂ -OCHF ₂	468.3
Sulfometuron-methyl	SMM	-CH ₃ -CH ₃ -CH ₃	364.4
Mesosulfuron	MSS		503.5
<i>Pyridylsulfonylharnstoffe</i>			
		R	
Flazasulfuron	FLS	-CF ₃	407.3
Nicosulfuron	NIS	-CO-N(CH ₃) ₂	410.4
Rimsulfuron	RIS	-SO ₂ -CH ₂ CH ₃	431.4
Flupyr-sulfuron-methyl-Natrium	FLSM		487.4

Fortsetzung Tabelle 4:

Name	Abkürzung	Struktur	M_r [g/mol]
<i>Sulfonylharnstoffe mit Heterocyclen</i>			
Azimsulfuron	AZS		424.4
Imazosulfuron	IMS	X: -Cl 	412.8
Sulfosulfuron	SUS	X: -SO₂C₂H₅ 	470.5
Halosulfuron-methyl	HSM	R: -CH₃ X: -Cl 	434.8
Pyrazosulfuron-ethyl	PSE	R: -CH₂CH₃ X: -H 	414.4
Flucarbazon	FLU	R₁: -OCF₃ R₂: -OCH₃ 	418.3
Propoxycarbazon	PROP	R₁: -CO₂CH₃ R₂: -OC₃H₇ 	398.4
Thifensulfuron-methyl	THI		387.4

Fortsetzung Tabelle 4:

Name	Abkürzung	Struktur	M_r [g/mol]	
<i>Benzyl-, Anilin- und Phenoxy-Sulfonylharnstoffe</i>				
				
		R	X	
Bensulfuron-methyl	BSM	-COOCH ₃	-CH ₂ -	410.4
Cyclosulfamuron	CSM		-NH-	421.4
Etoxsulfuron	ETOX	-OCH ₂ CH ₃	-O-	398.4
<i>Sulfonamido-Sulfonylharnstoffe</i>				
Amidosulfuron	AMS		369.4	

1.3 Herstellung

Für die Herstellung von Sulfonylharnstoffen werden hauptsächlich zwei Synthesemethoden angewandt (vgl. Abbildung 2) [21]. Ein Weg ist die Umsetzung von Arylsulfonamiden mit Isocyanaten oder Phenylcarbamaten. Phenylcarbamate werden beispielsweise bei der Herstellung von Halosulfuron-methyl und Flupyrsulfuron-methyl eingesetzt. Die zweite Methode ist die Reaktion von Arylaminen mit Arylsulfonylisocyanaten (z.B. bei Chlorsulfuron, Sulfometuron-methyl und Thifensulfuron-methyl) bzw. Phenyl-N-Phenylsulfonylcarbamaten (z.B. zur Herstellung von Etoxsulfuron).

Für die Gewinnung der aufgeführten Vorstufenprodukte sind oft mehrere Syntheseschritte notwendig. Um nur ein Beispiel näher auszuführen, wird die Synthese von Sulfometuron-methyl im Folgenden umfassend dargestellt (Abbildung 3). Man setzt dabei Saccharin im sauren Milieu mit Ethanol zum entsprechenden Sulfonamid um. Durch Phosgenierung unter Verwendung des Hilfsisocyanats Butylisocyanat, wird das benötigte Arylsulfonyl-

isocyanat gewonnen. In der Endstufe wird das Sulfonylisocyanat mit dem entsprechenden Aminoheterocyclus umgesetzt [5].

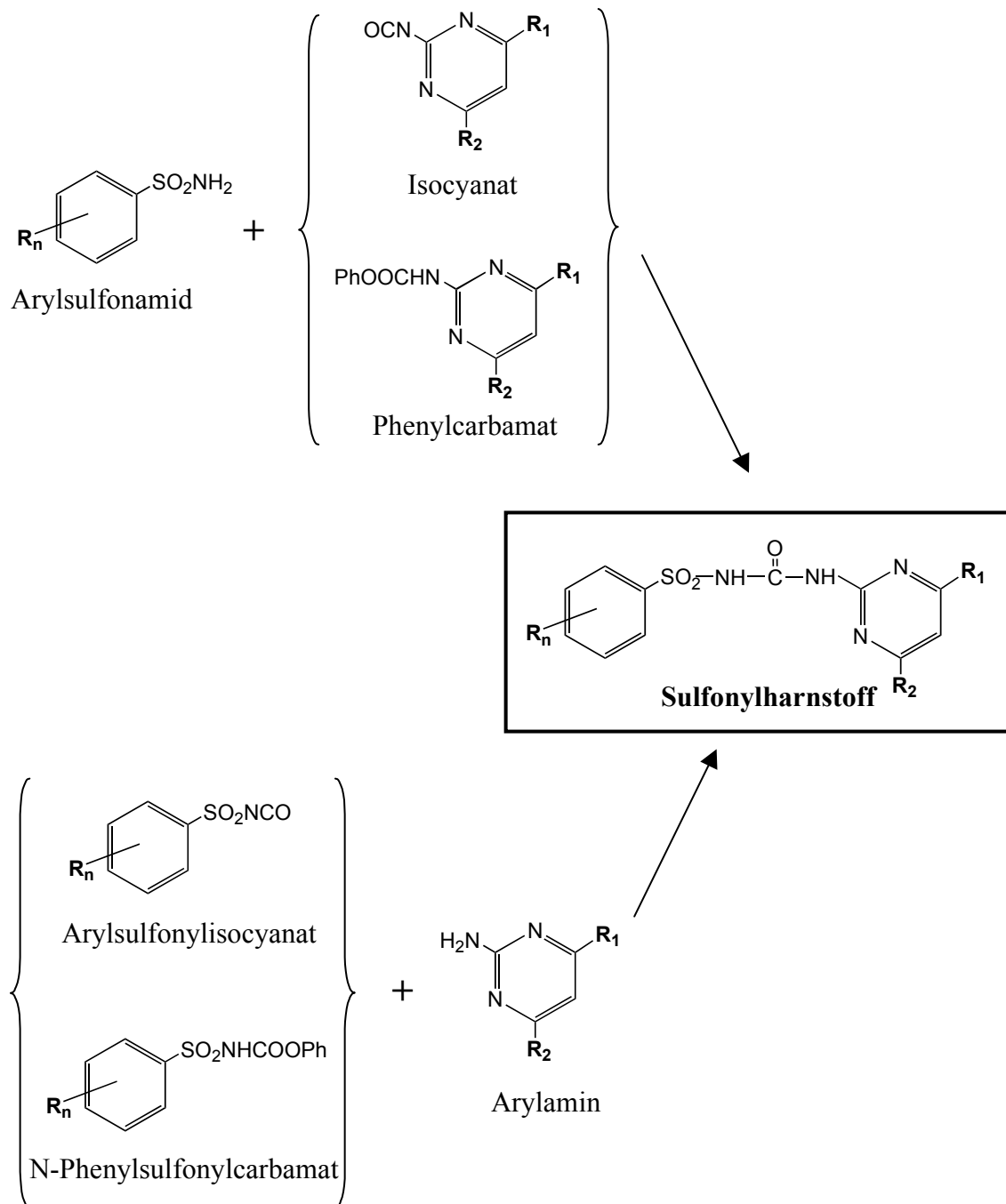


Abbildung 2: Hauptsynthesewege zur Herstellung von SUs [21].

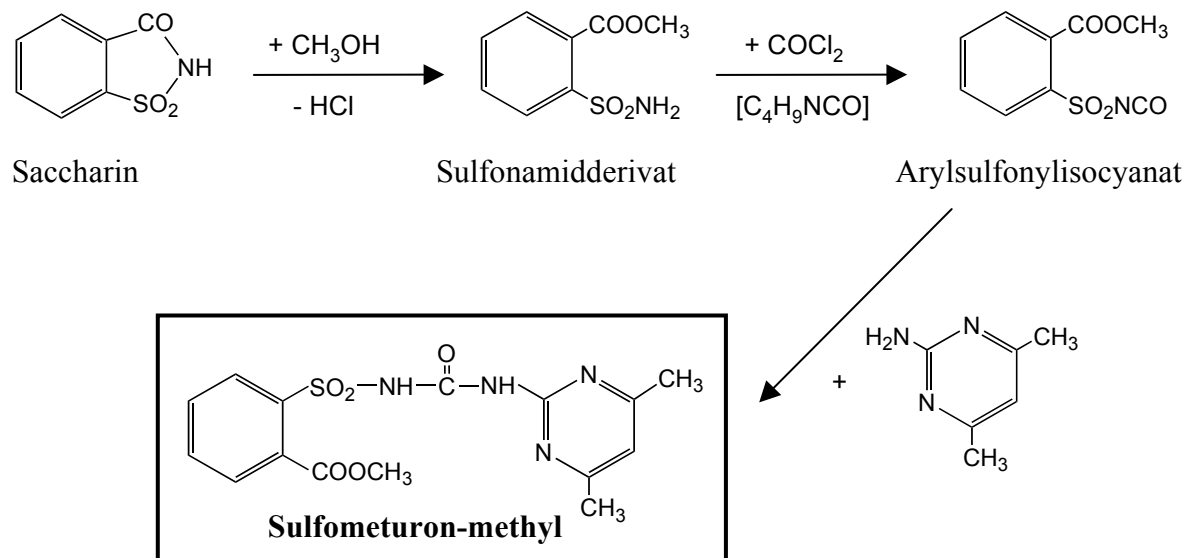


Abbildung 3: Synthese von Sulfometuron-methyl [5].

1.4 Wirkung und Anwendung

1.4.1 Herbizide

1.4.1.1 Acetolactat-Synthase (ALS)

Acetolactat-Synthase (ALS) steht, ausgehend von Pyruvat und 2-Oxobutyrat, am Beginn der Syntheseketten zu den verzweigten Aminosäuren Valin (Val), Leucin (Leu) und Isoleucin (Ile). Zwei physiologische Reaktionen werden von der ALS katalysiert. Während die Kondensationsreaktion von zwei Molekülen Pyruvat zur Bildung von 2-Acetolactat und CO_2 führt, entstehen aus Pyruvat und 2-Oxobutyrat die Kondensationsprodukte Acetohydroxybutyrat und CO_2 . Diese Stoffwechselwege kommen in Pflanzen und Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilzen und Algen vor, nicht jedoch im Organismus von Säugtieren. Das Enzym, das für die Biosynthese von verzweigten Aminosäuren notwendig ist, ist ein Flavoprotein, das FAD (Flavin-Adenin-Dinucleotid) als prosthetische Gruppe enthält. Außerdem besitzt es die für seine Aktivität notwendigen Cofaktoren Thiaminpyrophosphat sowie ein di- oder trivalent gebundenes Metall. Das aus Pflanzen- oder Hefezellen isolierte Enzym besteht aus einem einzigen Polypeptidtyp (ca. 60 kDa) und kommt in der Gegenwart von Pyruvat als Oktamer oder Tetramer (ca. 240 kDa) vor [22].

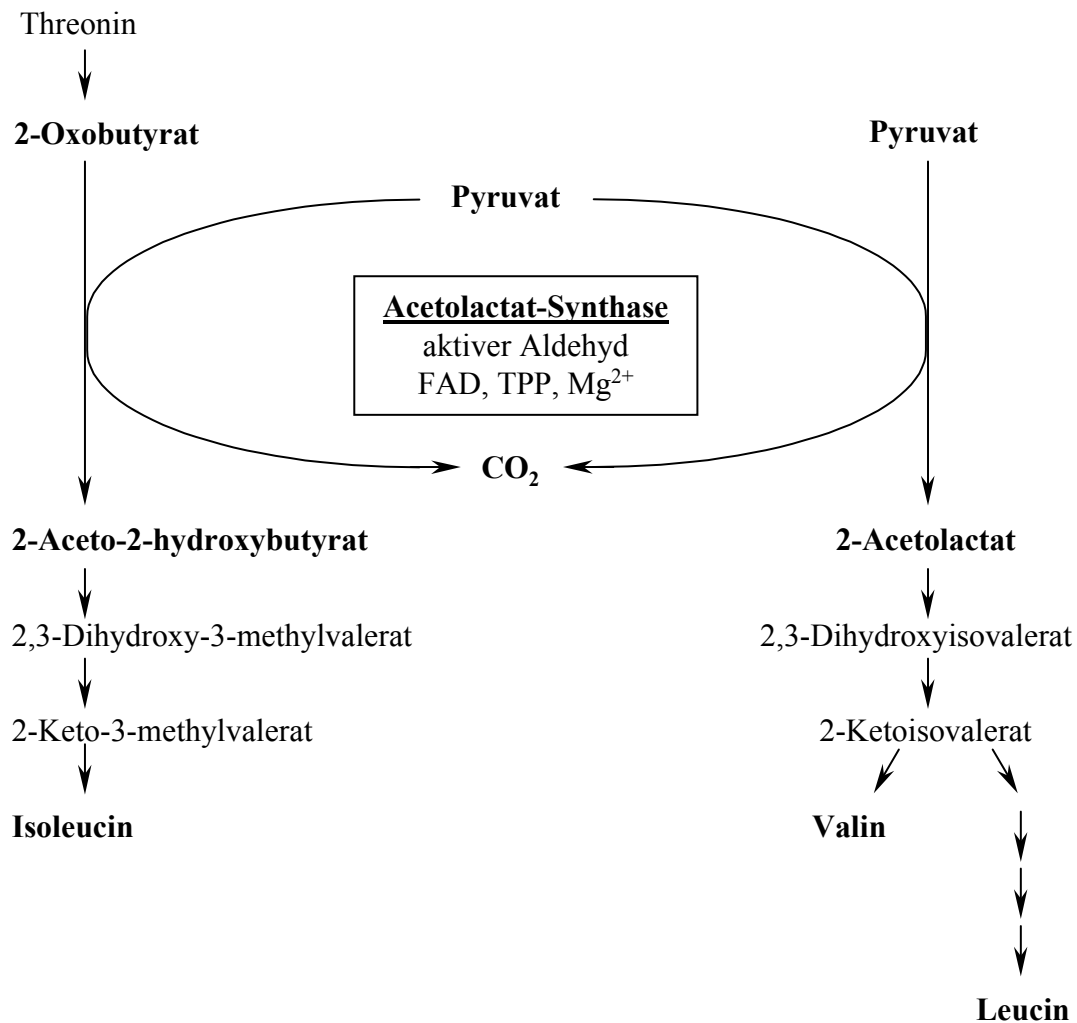


Abbildung 4: Biosyntheseweg zu den verzweigten Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin [7, 23].

1.4.1.2 ALS-Hemmung durch Herbizide

ALS-hemmende Herbizide können von sehr unterschiedlicher Molekülstruktur sein. Neben den SUs sind in dieser Wirkgruppe vor allem Imidazolinone, Triazolpyrimidinsulfonamide und Pyrimidinylcarbonsäure-Herbizide von Bedeutung [23]. Die ALS-Hemmer binden relativ langsam an das Enzym („slow binding“-Hemmstoff). So wird die volle Wirksamkeit erst nach 1-2 h erreicht. Man nimmt an, dass die ALS eine Bindungstasche besitzt, die außerhalb des funktionellen ALS-Reaktionszentrums liegt („extraneous site“), an welche die Hemmstoffe binden.

Die Hemmung der ALS in vivo führt primär zur Akkumulation von 2-Oxobutyrat und nach dessen Transaminierung auch von 2-Aminobutyrat. Pyruvat wird nicht angereichert, da es im Intermediärstoffwechsel in vielfältiger Weise metabolisiert werden kann. Dies führt dazu, dass die Konzentration der drei Aminosäuren Val, Leu und Ile in den meristemati-

schen Pflanzengewebe auf etwa 50% erniedrigt wird. In den anderen Pflanzengewebe ist eine Verarmung dieser Aminosäuren jedoch nicht erkennbar, da die Protein-Hydrolyse durch ALS-Hemmer gleichzeitig gesteigert wird. Die Herbizidwirkung kann zudem durch die gleichzeitige Anwendung von Val, Leu und Ile verhindert werden, da die Pflanze die benötigten Aminosäuren auch von außen aufnehmen kann und sie nicht zwingend selbst produzieren muss [7].

Die ALS-Hemmung zieht eine Reihe von Veränderungen bezüglich der Inhaltsstoffe und Biosyntheseraten in der Pflanze nach sich. So wird 5-8 h nach der Herbizid-Anwendung die DNA-Synthese um 80% gehemmt und die Mitose gestoppt. Nach 25-30 h sind außerdem RNA-Synthese und Atmung um etwa ein Drittel vermindert. Eine weitere Folge ist die starke Hemmung des Stofftransports von Saccharose, Aminosäuren und anderen Produkten, die in den Blättern gebildet werden. Damit reichern sich diese Stoffe in den Blättern an. Während die genauen Zusammenhänge von Ursache und Wirkung einzelner Folgen der ALS-Hemmung noch nicht ausreichend geklärt sind, kann jedoch zusammenfassend festgestellt werden, dass es infolge der ALS-Hemmung zu einer allgemeinen Stoffwechsel-Entgleisung kommt, die letztlich dazu führt, dass die Unkrautpflanze geschädigt wird und abstirbt. Die Kulturpflanze bleibt dann unbeschadet, wenn sie den Wirkstoff so schnell abbauen kann, dass keine ALS-Hemmung eintritt.

1.4.1.3 Selektive Wirkung und Wirkkraft

Die selektive Wirkung der SUs begründet sich also auf der unterschiedlichen Fähigkeit von Pflanzen diese zu metabolisieren. Der Einsatz von SUs kommt damit nur bei Kulturpflanzen in Frage, die die Herbizide schnell in unwirksame Metaboliten abbauen. Innerhalb der Herbizidgruppe der SUs gibt es strukturell ähnliche Verbindungen, die dennoch hinsichtlich ihrer biologischen Wirksamkeit sehr unterschiedlich sind. Durch Synthesen strukturverwandter Verbindungen konnten Herbizide mit neuem Selektivitätsmuster oder auch zum Teil günstigerem Umweltverhalten hergestellt werden.

Die hohe Effizienz der SUs, die zu geringen Einsatzmengen von 10 bis 100 g Herbizid pro Hektar führt, liegt in der hohen Wirksamkeit am Targetenzym ALS begründet. Es reichen 10 bis 100 nM für eine fast vollständige Enzymhemmung aus. Die volle Effektivität tritt jedoch erst nach 1 bis 2 h ein. Andere ALS-Inhibitoren, wie Triazolpyrimidinsulfonamide zeigen eine vergleichbare Wirksamkeit, wohingegen Imidazolinone eine etwa um das 10-fache geringere Wirkungskraft besitzen und daher in Anwendungsdosen vom 100 bis 1000 g pro Hektar eingesetzt werden. Hinsichtlich ihrer ALS-Hemmung ist die Wirkkraft der Imidazoline sogar nur um das 50- bis 100-fache niedriger als die der SUs. Durch eine höhere Aufnahmeeffizienz in die Pflanze und durch andere Bindungseigenschaften der Imidazole am ALS lässt sich die teilweise Kompensation der schwächeren Wirkung erklären [23].

1.4.1.4 Safener

SUs werden auch in Verbindung mit Herbizid-Safenern eingesetzt [24]. Safener sind Mittel, die dazu dienen, die phytotoxische Wirkung von applizierten Herbiziden bei Kulturpflanzen ganz oder weitgehend aufzuheben. Sie werden auch als Herbizid-Antidote bezeichnet. Ihr Einsatz zusammen mit SU-Herbiziden ist nicht zwingend notwendig, da die SUs selbst sehr selektiv wirkende Verbindungen darstellen. Trotzdem hat es sich in der Praxis oft als hilfreich erwiesen, sie bei bestimmten Anwendungen gemeinsam mit Safenern einzusetzen. So kann z.B. die Verträglichkeit von Bensulfuron-methyl in Reis durch Zusatz der Safener Fenclorim, Daimuron oder Dimepiperate verbessert werden. Safener werden bislang nur bei monokotylen Nutzpflanzen (Getreide, Mais, Reis) eingesetzt, für dikotyle Kulturen (Zuckerrübe, Baumwolle) konnten bislang keine marktfähigen Produkte entwickelt werden. Sie induzieren Enzymsysteme, die Herbizide schnell entgiften können. Zu diesen Enzymen gehören O-Glucosyltransferasen, Cytochrom-P-450-Monooxygenasen (MOG) und Glutathion-S-Transferasen (GST). Bei SUs besteht die Möglichkeit der Herbizidentgiftung in erster Linie durch MOG. Bei Chlorimuron-ethyl in Mais wurde aber auch eine Erhöhung der Metabolisierungsrate durch Stimulierung von Hydroxylierung, O-Glucosidierung und Glutathion-Konjugation durch die Substanz LAB 145138 nachgewiesen [7]. Neuere Safener schützen spezifisch nur eine Kultur gegen ein Herbizid. Es ist weitgehend anerkannt, dass die erhöhte Herbizidtoleranz von Kulturpflanzen durch Safener letztlich auf deren Regulation der Expression von Genen, die in den Herbizidmetabolismus involviert sind, zurückzuführen ist.

1.4.2 Antidiabetika

1.4.2.1 Historische Entwicklung

Der Einsatz von Sulfonylharnstoffen und Gliniden als oral anwendbare Antidiabetika wurde zufällig entdeckt [25]. Anfang der 1940er Jahre wurde in Frankreich erstmalig die synthetische Verbindung Sulfonamidothiodiazol als Chemotherapeutikum eingesetzt und dabei deren hypoglykämische (blutzuckersenkende) Wirkung erkannt. Die Substanz stimuliert die β -Zellen des Pankreas und erhöht somit die Insulinsekretion. 1956 wurde dann Sulfonylbutylharnstoff, auch Carbutamid genannt, als erstes orales Antidiabetikum von den Firmen *Boehringer Mannheim* und *Hoechst* auf den Markt gebracht. Kurz darauf folgte die Markteinführung von Tolbutamid und Chlorpropamid, welche im Gegensatz zu Carbutamid keine bakteriostatische Wirkung mehr besaßen, so dass eine Abtrennung der blutzuckersenkenden von der chemotherapeutischen Wirkqualität erreicht werden konnte.

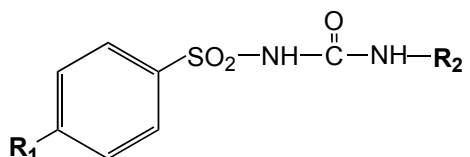
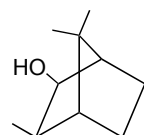
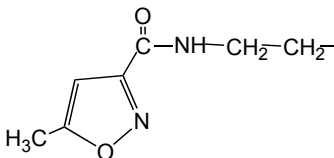
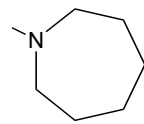
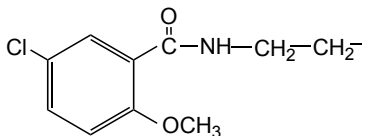
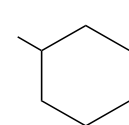
Die weitere Entwicklung der Sulfonylharnstoffe führte zu viel potenteren Mitteln, die in wesentlich geringeren Anwendungsmengen eingesetzt werden konnten. Während man die Sulfonylharnstoff-Antidiabetika der 1. Generation, wie z.B. Tolbutamid, in Tagesdosen

von 0.5 bis 3.0 g einsetzen musste, sind die Präparate der 2. Generation bereits im Milligramm-Bereich wirksam. Beim Wirksamkeitsvergleich gibt die sog. ED₃₀-Dosis diejenige Wirkstoffmenge an, die in mg pro kg Körpergewicht notwendig ist, um den Blutzucker um 30% zu senken. Bis heute wurden über 20 000 verschiedene Substanzen mit Sulfonylharnstoffstruktur synthetisiert, wovon in Deutschland sieben verschiedene Sulfonylharnstoffderivate als Antidiabetika im Handel sind. Bei allen sieben Vertretern ist die Sulfonylamidgruppe mit einer Carbamoylgruppe zur typischen Sulfonylharnstoffgruppe verknüpft.

1.4.2.2 Chemische Zusammensetzung

Während Carbutamid eine für die chemotherapeutische Wirksamkeit essentielle Amino-Gruppe als R₁-Rest enthielt, wurde diese in der Weiterentwicklung zum Tolbutamid durch eine Methylgruppe ersetzt (vgl. Tabelle 5).

Tabelle 5: Sulfonylharnstoff-Antidiabetika [26].

Name	Struktur	Tagesdosis [mg]	ED ₃₀ * [mg/kg KG]	
				
	R₁	R₂		
Tolbutamid	-CH ₃	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	500-3000	25
Glibornurid	-CH ₃		12.5-75	0.374
Glisoxepid			2-16	0.052
Glibenclamid			1.75-14	0.032

* Notwendige SU-Menge zur Senkung des Blutzuckers um 30%

Die Variation des R_1 -Restes, z.B. durch Einführung einer Acylaminoalkylgruppe, führt zu einer Erhöhung der Lipophilie des Gesamtmoleküls und damit zu einer deutlichen Wirkungssteigerung, die bei Glibenclamid, Glisoxepid oder Glibornurid niedrigere Tagesdosen erforderlich macht [26]. Durch Variation des R_2 -Restes konnte ebenfalls eine Wirkungssteigerung erzielt werden, insbesondere durch Einführung eines cycloaliphatischen oder eines N-heterocyclischen Restes. Veränderungen am Molekül durch Variation von R_1 und R_2 führen aber nicht zu einer wesentlichen Erweiterung des Wirkspektrums, sondern beeinflussen lediglich die Wirkstärke. Alle Sulfonylharnstoff-Antidiabetika sind lipophile Substanzen und daher bei neutralem oder physiologischem pH-Wert in wässrigem Milieu schlecht oder gar nicht löslich. Bei leicht alkalischem pH-Wert, wie er beispielsweise im Dünndarm vorherrscht, sind sie jedoch unter Salzbildung löslich.

1.4.2.3 Wirkung

Bei Diabetespatienten ist in erster Linie der Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel nicht ausreichend durch Insulin reguliert. Dies führt zu erhöhten Blutglucosespiegeln, die ohne Behandlung eine Reihe von Stoffwechselstörungen zur Folge haben. Etwa 5-10% der Patienten leiden an der Typ-I-Diabetes, einer Krankheitsform, die nur durch zugeführtes Insulin kompensiert werden kann, da die Bauchspeicheldrüse kein eigenes Hormon mehr bereitstellt. Nach heutigem Kenntnisstand liegt die Ursache dafür in der autoimmunen Zerstörung von insulinproduzierenden β -Zellen, die bei entsprechender genetischer Veranlagung durch Virusinfektionen ausgelöst wird. Bei der weitaus häufigeren Typ-II-Diabetes sind die β -Zellen oft noch jahrelang partiell funktionsfähig, wenngleich unzureichend reguliert. Sulfonylharnstoffe bewirken, dass die β -Zellen des Pankreas vermehrt Insulin freisetzen. Sie eignen sich daher nur zur Mobilisierung des endogenen Insulins bei Typ-II-Diabetikern [27].

1.5 Reaktivität und Stabilität

1.5.1 Hydrolyse

SU-Herbizide werden in wässrigen Lösungen sowie im Boden hydrolytisch gespalten. Es wurde festgestellt, dass die Hydrolyseraten in sterilen Bodenproben, in denen kein mikrobieller Abbau mehr stattfinden kann, geringer sind als in den entsprechenden nativen Bodenproben. Damit konnte bewiesen werden, dass sowohl chemische als auch mikrobielle Abbaumechanismen vorliegen können. BERGER ET AL. zeigten, dass die Abbauewege von SUs in wässrigen Pufferlösungen maßgeblich vom pH-Wert der Lösung bestimmt werden. Die Hydrolyse von 12 SUs lief bei pH-Werten unter 6.2 und über 10.2 am schnellsten ab. Unabhängig vom pH-Wert folgte die Hydrolyse einer Reaktionskinetik pseudoerster Ordnung. Außerdem spielte die Temperatur eine wesentliche Rolle [28, 29].

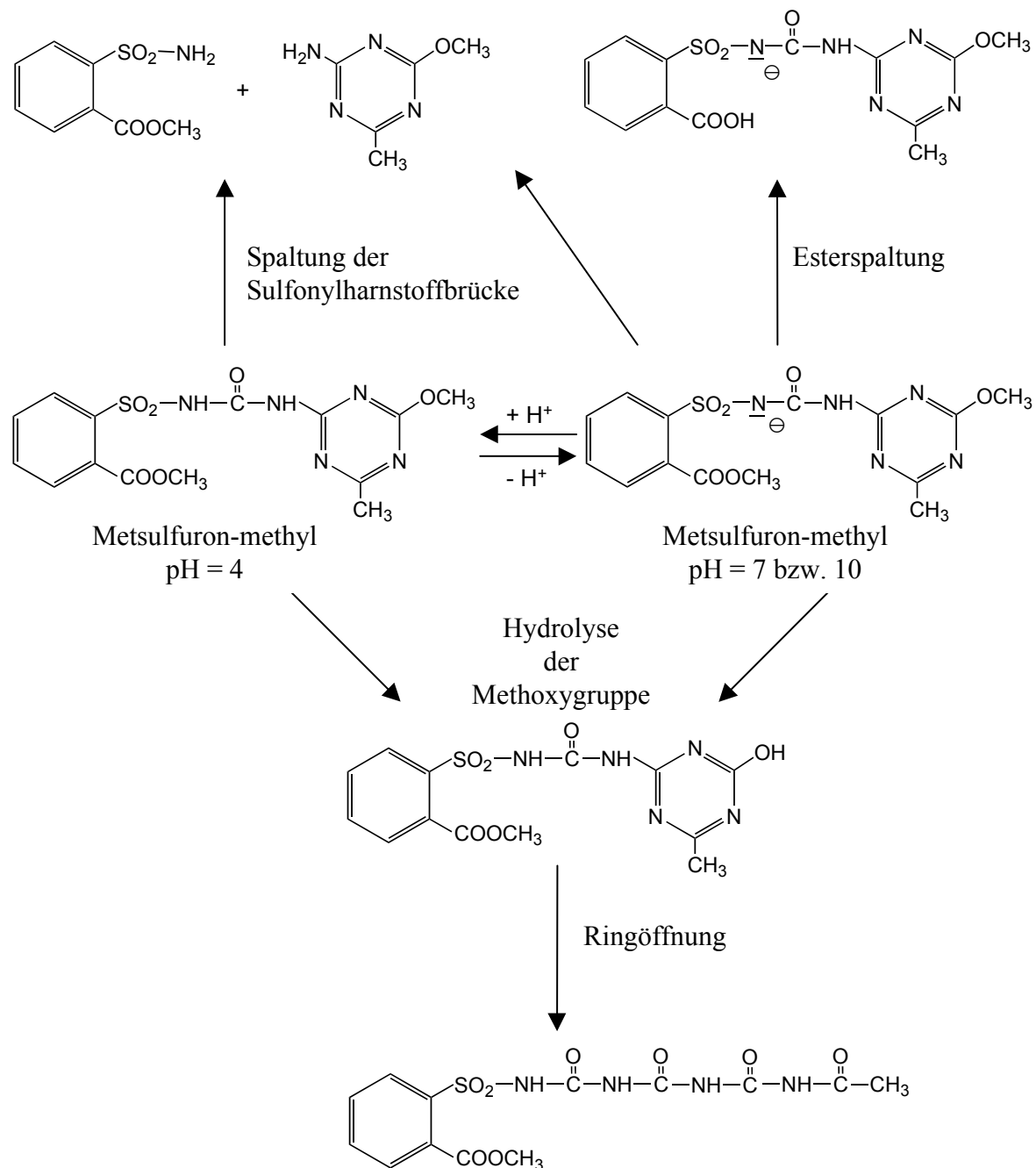


Abbildung 5: Hydrolysewege von SUs am Beispiel von Metsulfuron-methyl [28].

In saurem Milieu liegt die Sulfonylharnstoffbrücke der Herbizide protoniert vor. In dieser Form können SUs über Brückenspaltung in einen Sulfonamidrest und einen Amino-pyrimidin- bzw. Aminotriazinrest hydrolysiert werden (vgl. Abbildung 5). Andererseits kann das SU-Gesamtmolekül auch über eine Hydrolyse der Methoxy-Substituenten am Pyrimidin- bzw. Triazinring zur entsprechenden Hydroxyverbindung reagieren. Bei SUs, die Triazinderivate enthalten, wie beispielsweise MSM, Chlorsulfuron, Triasulfuron und

Prosulfuron [30], kommt es zu einer irreversiblen Ringöffnung des Triazins. Bei den entsprechenden Pyrimidinderivaten konnte eine Ringöffnung nicht beobachtet werden. Die erhaltenen Hydrolyseprodukte können über Demethylierungen und Decarboxylierungen weiter abgebaut werden.

In neutraler und alkalischer Lösung liegen SUs in ihrer anionischen Form vor. Im Gegensatz zur sauer katalysierten Hydrolyse, kommt es bei pH-Werten > 10 zur reversiblen Esterspaltung, die speziell bei Thifensulfuron-methyl Bedeutung hat (vgl. Abbildung 8). Außerdem tritt bevorzugt die nukleophile Substitution der Methoxygruppe des Triazin- bzw. Pyrimidinringes durch eine OH-Gruppe auf, die aber auch im Säuren stattfindet. Daneben kommt es ebenfalls zur Brückenspaltung und zur Ringöffnung am Triazin.

Bei der Hydrolyse von Rimsulfuron und Flupyr-sulfuron-methyl-Natrium, zwei SUs mit substituierten Pyridin- (R_1) und Pyrimidin-Resten (R_2), wurden außerdem Hauptmetabolite gefunden, die aus einer Kontraktion der Sulfonylharnstoffbrücke und einer anschließenden Molekülumlagerung entstanden sind [31, 32]. Dies zeigt, dass die Struktur der SUs ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Hydrolyse nimmt.

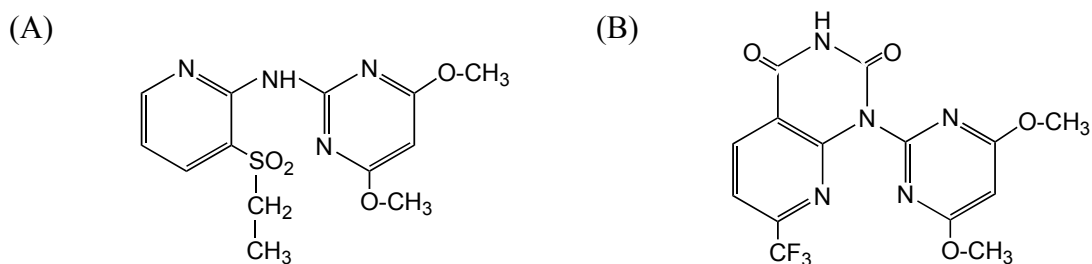


Abbildung 6: Hauptmetabolit von (A) Rimsulfuron bei pH 8.1 und (B) Flupyr-sulfuron-methyl-Natrium bei pH 7 bis 9.

1.5.2 Alkoholyse

Bei der Alkoholyse eines SUs entsteht bei der SU-Brückenspaltung neben einem Amino-heterocyclus ein Sulfonylcarbammat, anstatt eines Sulfonylamids (vgl. Hydrolyse) [33]. Die Abbaurrate wird dabei durch die Struktur des Herbizides und die Verzweigung des Alkohols bestimmt. So nimmt sie in der Reihe Chlorimuron-ethyl $>$ Chlorsulfuron \approx Bensulfuron-methyl $>$ Metsulfuron-methyl sowie in der Abfolge primärer $>$ sekundärer $>$ tertiärer Alkohol ab. Reaktionen mit dem Polyalkohol Glucose konnten nicht festgestellt werden. In Phenol konnten erst bei höheren Temperaturen (50°C) geringe Abbauraten erreicht werden.

1.5.3 Photolyse

Neben chemisch und mikrobiell induzierter Hydrolyse findet in der Natur auch photolytischer Abbau von SUs statt. Um das Umweltverhalten der Herbizide und ihrer Photolyseprodukte beschreiben zu können, werden zunehmend auch Studien zum Photoabbau von einzelnen SUs durchgeführt [34-38]. Als Photolyseprodukte findet man eine Vielzahl von Verbindungen, wobei als Hauptprozess bei deren Bildung die Spaltung der Sulfonylharnstoffbrücke angesehen wird [34, 36]. Neben den auch in wässriger Lösung auftretenden Folgereaktionen findet man Produkte, die durch Abspaltung von SO_2 entstehen. Durch Zusatz von TiO_2 als Katalysator konnte der Abbauweg von Cino- und Triasulfuron in der Photolyselösung weitgehend bis zu CO_2 und H_2O nachvollzogen werden, während sich der Triazinrest als persistent erwies [37].

1.5.4 Metabolisierung in Nutzpflanzen

Die selektive Wirkung von kommerziell erhältlichen SU-Herbiziden ist auf ihre unterschiedlichen Abbauewege in Nutzpflanze und Unkrautpflanze zurückzuführen. Mittlerweile wurden für mindestens zwölf wichtige Kulturpflanzen, einschließlich Weizen, Gerste, Hafer, Mais, Reis, Soja, Zuckerrüben, Kartoffeln und Tomaten, SU-Herbizide entwickelt. Jedes dieser Herbizide richtet sich gegen ein spezielles Spektrum von Unkräutern [17]. Die einzelnen SUs können dabei in jeder Kultur- und Unkrautpflanze unterschiedlichsten enzymgesteuerten Metabolismen unterliegen. Erkenntnisse über den Metabolismus in Pflanzen gewinnt man üblicherweise mittels Anwendungsversuchen von ^{14}C -markierten SUs. Die am häufigsten auftretenden Abbaureaktionen sind dabei die selektive Ester-spaltung (z.B. Thifensulfuron-methyl in Soja), die aromatische nukleophile Substitution durch Homoglutathion (hGSH) (z.B. Chlorimuron-ethyl in Soja) [39], die selektive aromatische und aliphatische Hydroxylierung (Chlorsulfuron in Weizen und Mais) [40], die oxidative O-Demethylierung (z. B. Pyrazosulfuron in Reis) [39, 41] und die Konjugation an Glucose (z.B. Triasulfuron in Weizen, Nicosulfuron und Primisulfuron-methyl in Mais) [17]. Die O-Glucosylierung kann an unterschiedlichen Positionen des SU-Moleküls erfolgen. Primisulfuron-methyl wird in Mais primär über eine Hydroxylierung der 5-Position des Pyrimidinringes und der anschließenden Konjugation an Glucose zum inaktiven O-Glycosid metabolisiert. Daneben findet in Mais aber auch eine Hydroxylierung am Phenylring mit anschließender Konjugation an Glucose statt, wie sie auch bei Metsulfuron-methyl, Chlorsulfuron und Triasulfuron in Weizen beobachtet wurde [17].

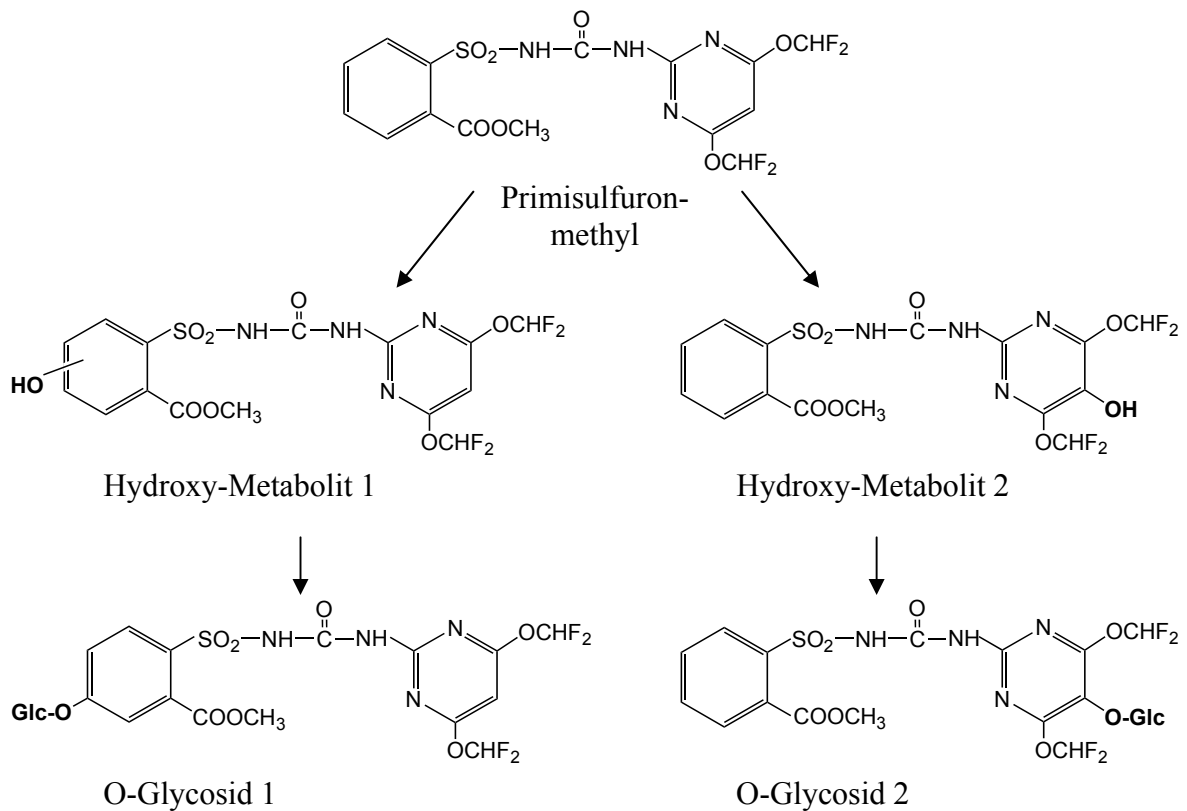


Abbildung 7: Metabolische Inaktivierung von Primisulfuron-methyl in der Maispflanze (*Zea mays*) [17].

Der Abbau von SUs zu inaktiven Metaboliten in der Nutzpflanze vollzieht sich sehr schnell. Für eine sinnvolle Anwendung liegen die Halbwertszeiten i. d. R. unter 6 h. In der Sojapflanze wird beispielsweise Chlorimuron-ethyl mit einer Halbwertszeit von 1 bis 3 h zu 75% in ein hGSH-Konjugat und zu 25% in ein Carbonsäurederivat metabolisiert, die beide gegenüber ALS inaktiv sind und damit keine herbizide Wirkung mehr zeigen. Thifensulfuron-methyl wird in Soja über eine Spaltung des am Thiophenring lokalisierten Methylesters zur Carbonsäure abgebaut. Die Halbwertszeit für diese Reaktion liegt bei 4 bis 6 h, was den Einsatz des Herbizides für Sojapflanzen ebenfalls möglich macht. Met-sulfuron-methyl hingegen wird in der Sojapflanze nicht metabolisiert und schädigt folglich die Pflanze [39]. Die Wirkung von SUs in Nicht-Zielpflanzen ist im Allgemeinen jedoch relativ gering und vergleichbar mit anderen Herbiziden [42].

1.5.5 Aktivierung von Proherbiziden

Neben der Inaktivierung von SUs auf metabolischem Weg wurden auch Aktivierungsreaktionen von inaktiven SU-Vorstufen in der Nutzpflanze beobachtet. Die Proherbizide DPX-H6564 und DPX-L8747 von *DuPont* werden in zweikeimblättrigen Unkräutern metabolisch in ihre aktive, ALS-inhibierende Form überführt. Die Sojapflanze hingegen ist

nicht in der Lage, diese Vorstufen ebenfalls in die aktive Form zu überführen und zeigt damit Toleranz gegenüber den Verbindungen. Daraus resultiert eine durch Aktivierung von Proherbiziden entstandene Selektivität [17].

1.6 Ökologie und Toxikologie

1.6.1 Resistenzen

Im Vergleich zu allen anderen Herbizid-Wirkgruppen wurden gegenüber ALS-inhibierenden Herbiziden weltweit bisher die meisten resistenten Unkräuter beobachtet [43]. Die Anzahl der ALS-Herbizid-resistenten Unkrautspezies liegt mittlerweile bei über 70. Durch verschiedene Punktmutationen im ALS-codierenden Gen können Unkrautpflanzen Resistenzen gegenüber Herbiziden erwerben und damit dem hohen Selektionsdruck der Herbizide ausweichen. Dies kann einerseits ungewollt bei der wiederholten Anwendung eines Herbizides in der gleichen Kultur geschehen, andererseits wird dieser Mechanismus auch bewusst genutzt, um gentechnisch veränderte, resistente Nutzpflanzen herzustellen, die durch ihre Resistenz erst für die Anwendung von ALS-Inhibitoren zugänglich gemacht werden. Auf diese Weise wurden z.B. SU-resistente Tabakpflanzen erzeugt [44].

In der Praxis versucht man unerwünschte Herbizidresistenzen dadurch zu unterbinden, dass man Mischungen von Herbiziden verschiedener Wirkmechanismen einsetzt und den Selektionsdruck für resistente Biotypen verringert. Dies geschieht durch den Einsatz von Herbiziden, die eine geringe Persistenz im Boden zeigen und deren Anwendungsmengen gering sowie deren Anwendungsperioden kurz sind. Außerdem wird ein Wechsel der Fruchtfolge sowie des angewandten Herbizides propagiert [45]. Die Auswirkungen auf das Ökosystem, der als Reaktion auf den Einsatz von Herbiziden entwickelten Resistenzen von Unkräutern einerseits, und der Verwendung von herbizidtoleranten Nutzpflanzen andererseits, sind nicht abschließend geklärt und werden derzeit kontrovers diskutiert [46].

1.6.2 Persistenz

1.6.2.1 Sulfonylharnstoffe im Boden

Da SUs schwache Säuren mit pKs-Werten zwischen 3 und 5 sind, dominiert in den meisten Oberflächengewässern und Böden von neutralem und schwach alkalischem pH-Wert, ihre anionische, am Sulfonamidstickstoff deprotonierte Form [47]. Ihre Adsorption an Bodenbestandteile mit negativ geladener Oberfläche, wie z.B. Tonmineralen, ist folglich herabgesetzt. Daneben spielt der Gehalt an organischen Bestandteilen im Boden eine Rolle, da die Adsorptionsneigung mit zunehmendem organischen Anteil erhöht ist. Neben der Bodenbeschaffenheit ist der Hauptfaktor für das Adsorptionsverhalten jedoch der pH-Wert. Die Adsorption von SUs steigt mit sinkendem pH-Wert [48, 49]. Aufgrund der herabge-

setzten Adsorption in neutralen und schwach alkalischen Böden und der steigenden Wasserlöslichkeit der SUs mit steigendem pH-Wert, ist bei Regenwetter die Gefahr der Auswaschung aus dem Boden und des Transports in Oberflächen- und Grundwasser gegeben. Der Übergang in Luft spielt aufgrund der geringen Flüchtigkeit der Verbindungen keine Rolle. Für Anwender von SUs kann es jedoch durch Inhalation versprühter Pflanzenschutzmittel zu signifikanten Expositionen über die Luft kommen [50].

Im Boden erfolgt der Abbau von SUs primär über chemische Hydrolyse und durch mikrobiellen Abbau sowie zu einem geringen Teil auch photolytisch [51, 52]. Die chemische Hydrolyse (vgl. Kapitel 1.5.1) und Photolyse (vgl. Kapitel 1.5.3) wurden bereits dargestellt. Die bedeutende Rolle des mikrobiellen Abbaus von SUs im Boden wurde experimentell anhand vergleichender Untersuchungen an sterilen und nichtsterilen Böden gezeigt. Dabei stellte sich heraus, dass der Anteil des Abbaus durch Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Bodenart zwischen 50% und 91% liegen kann [53]. Die Abbauraten korrelieren mit der vorhandenen (aktiven) Biomasse im Boden. In tieferen Bodenschichten nimmt die Abbauintensität ab [54].

Während SUs in sterilen Böden an der Sulfonylharnstoffbrücke hydrolytisch gespalten werden, sind in nichtsterilen Böden, je nach Beschaffenheit der Mikroflora, eine Vielzahl von Abbauwegen und resultierenden Abbauprodukten möglich [55]. Am mikrobiellen Pestizidabbau sind primär Bakterien aus der Gruppe der Eubakterien und der Actinomyceten sowie zahlreiche Pilze beteiligt [7]. Speziell bei der Actinomyces-Subspezies *Streptomyces griseolus* konnte der Abbau von Sulfonylharnstoffen durch Hydroxylierung, O-Dealkylierungsreaktionen und Esterspaltung nachgewiesen werden [56]. Die Metabolisierung wird dadurch induziert, dass bei SU-Präsenz lösliches Cytochrom P450 freigesetzt wird. Bodenpilze der Spezies *Aspergillus* und *Penicillium* katalysieren die hydrolytische Spaltung der Sulfonylharnstoffbrücke und die OH-Substitution der Methoxygruppe am Triazinring [53, 57].

Es ist allgemein anerkannt, dass ein Großteil der im Boden vorhandenen enzymatischen Aktivität aus extrazellulären Enzymen von Mikroorganismen stammt. Zu diesen Enzymen gehören Phosphomono- und Phosphodiesterasen, Katalase, verschiedene Oxidasen und Hydrolasen, Urease, Proteinase sowie Carboxy- und Arylesterasen. Diese extrazellulären Aktivitäten sind auch beim Pestizidabbau im Boden von Bedeutung. So wird die auffallend geringe Persistenz von Thifensulfuron-methyl in nichtsterilen Böden auf dessen schnelle Metabolisierung zur inaktiven Thifensulfuronsäure durch Bakterien zurückgeführt. Katalysiert wird die Umsetzung vermutlich durch extrazelluläre Carboxyesterase, die aus Actinomyces sowie anderen Bakterien stammt. Man nimmt an, dass Thifensulfuron-methyl durch sterisch begünstigte Zugänglichkeit als bevorzugtes Substrat erkannt wird [58].

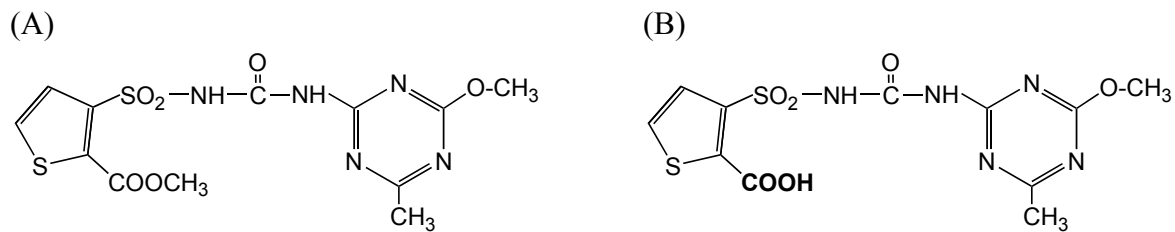


Abbildung 8: Metabolisierung von (A) Thifensulfuron-methyl zur (B) Thifensulfuronsäure.

Wie in Versuchen mit am Sulfonyl- bzw. Thiophenring ^{14}C -markierten SU-Verbindungen gezeigt werden konnte, werden diese durch Mikroorganismen u.a. auch zu CO_2 mineralisiert. Einzelne SUs werden dabei in der gleichen Mikroflora unterschiedlich stark mineralisiert. Metsulfuron-methyl wurde beispielsweise innerhalb von 126 Tagen zu 40% mineralisiert, Chlorsulfuron hingegen zu weniger als 4%. Die Mineralisation ist hier offensichtlich durch den Chlor-Substituenten am Sulfonylrest herabgesetzt [59].

Die Randbedingungen, die den Abbau von SUs allgemein begünstigen, wirken sich auch positiv auf die mikrobielle Aktivität aus. So beschleunigen höhere Feuchtigkeit und Temperatur beide Abbauarten [60]. Der pH-Wert des Bodenspielt auch für den mikrobiellen Abbau eine bedeutende Rolle. So überwiegt beispielsweise bei Triflursulfuron-methyl in sauren Böden der chemische Abbau, wohingegen in basischen Böden der Abbau durch Mikroorganismen dominiert [61].

1.6.2.2 Sulfonylharnstoffe im Wasser

Der Eintrag von SUs in Oberflächen- und Grundwasser ist aufgrund der Mobilität der Substanzen insbesondere in neutralen und basischen Böden möglich und kann vor allem durch Niederschläge im Anschluss an die Anwendung auftreten. Durch die geringen Anwendungsmengen und den relativ schnellen Abbau der SUs sind höhere Belastungen bzw. Grenzwertüberschreitungen in der Umwelt bei sachgerechter Anwendung zwar relativ unwahrscheinlich [62], es liegen jedoch auch nur wenige detaillierte Rückstandsdaten dazu vor. BATTAGLIN ET AL. publizierten Untersuchungsergebnisse aus dem Jahr 1998 zur SU-Belastung von Grund- und Oberflächenwasser im mittleren Westen der USA im Anschluss an deren Hauptanwendungszeitraum. Hier wurden 129 Flusswasserproben auf zwölf verschiedene SUs untersucht, wobei für Nicosulfuron in 67 Proben, für Chlorimuron-ethyl in 41 Proben, für Halosulfuron-methyl in sieben, Prosulfuron in sechs, Sulfometuron-methyl in zwei Fällen und Thifensulfuron-methyl in einem Fall Belastungen nachgewiesen werden konnten (Überschreitung der Bestimmungsgrenze von 10 ng/L). Im Mittel (Median) aller Proben lagen die Gehalte der einzelnen SUs jedoch unter oder bei 10 ng/L. Einzelproben wiesen jedoch maximale SU-Summenwerte von bis zu 304 ng/L

auf. In 25 untersuchten Grundwasserproben wurden bei zwei Proben Nicosulfuron in einer maximal detektierten Konzentration von 16 ng/L nachgewiesen. Damit wurde der in Europa für Trinkwasser geltende Grenzwert von 100 ng/L in den Umweltproben lediglich in Einzelfällen überschritten [63].

Das Abbauverhalten von SUs in Wasser ist in erster Linie von Temperatur und pH-Wert abhängig [64]. DINELLI ET AL. zeigten, dass einzelne SUs dabei sehr unterschiedliche Persistenz aufweisen. In Wasser von 25°C und pH-Werten von 6.5 bis 7.5, konnten maximale Halbwertszeiten von zwölf Tagen für Rimsulfuron und von sieben Tagen für Thifensulfuron-methyl beobachtet werden. Die maximalen Halbwertszeiten von Prosulfuron und Primisulfuron-methyl hingegen lagen mit 330 und 399 Tagen bei den gleichen Versuchsbedingungen signifikant höher. Die Abbauwege entsprechen den bereits im Boden beschriebenen (vgl. II 1.6.2.1) [65, 66].

1.6.2.3 Sulfonylharnstoffe in Lebensmitteln

Die Rückstandsmenge im Erntegut behandelter Kulturpflanzen hängt von zahlreichen Faktoren ab, wobei neben den Aufwandmengen vor allem die Applikationsbedingungen, die Art der Aufnahme und die Verteilung in der Pflanze eine Rolle spielen. Bei sachgerechtem Einsatz von SUs im Pflanzenbau sind aufgrund der guten Abbaubarkeit bis zum Erntetermin geringe bis keine Rückstände in pflanzlichen Lebensmitteln zu erwarten. Sulfonylharnstoffe werden über Blätter und Wurzeln von Nutz- und Schadpflanzen aufgenommen und relativ schnell in alle Pflanzenteile transportiert. Aufgrund ihrer selektiven Wirkung entfalten sie in der Schadpflanze ihre systemische Wirkung, wohingegen sie in der Nutzpflanze vollständig in unwirksame und nicht rückstandsrelevante Metaboliten abgebaut werden (vgl. II 1.5.4). Bei einigen Verbindungen läuft dieser Mechanismus jedoch nur unvollständig ab (Nicosulfuron) oder es entstehen rückstandsrelevante Hauptmetaboliten (Propoxycarbazon-Natrium), die analytisch erfasst werden und bei der Rückstandsdefinition zur Höchstmengenfestsetzung einbezogen sind [67]. Als primäre Ursache für Rückstände von SUs in Lebensmitteln ist primär der unsachgemäße Einsatz, wie Überdosierung oder das Nichteinhalten von vorgeschriebenen Wartezeiten von der Anwendung bis zur Ernte, denkbar. SU-Rückstände in tierischen Lebensmitteln spielen aufgrund deren geringer Persistenz kaum eine Rolle.

1.6.3 Toxikologische Bedeutung

1.6.3.1 Humantoxikologie

SUs sind im Vergleich zu herkömmlichen Herbiziden toxikologisch relativ positiv zu beurteilen. Aufgrund der niedrigen Aufwandmengen, die für das Erzielen einer Wirkung notwendig sind, sind auch unerwünschte Nebenwirkungen auf den Säugerorganismus deutlich reduziert. Bei Exposition werden sie im Allgemeinen im Organismus schnell

absorbiert und verteilt. Eine Akkumulation in bestimmten Körperregionen findet nicht statt. Der Hauptanteil der meisten SU-Herbizide bzw. deren Metaboliten wird relativ schnell (innerhalb von 24 bis 48 h), spätestens jedoch nach 96 h über den Urin, und zu geringerem Teil auch über die Faeces, ausgeschieden [68-74]. Die Metabolisierungsrate ist bei den einzelnen Verbindungen unterschiedlich groß. Radioaktiv markiertes Thifensulfuron-methyl wurde bei Metabolismusstudien an Ratten hauptsächlich unverändert wieder ausgeschieden, wohingegen beispielsweise Prosulfuron nur bis zu 30% unmetabolisiert in den Exkrementen vorlag und seine Metabolite, die aus Hydroxylierungs- und O-Demethylierungsreaktionen hervorgegangen sind, dominierten [71, 73].

Tabelle 6: Toxikologie von Sulfonylharnstoffen [68-74].

Sulfonyl- harnstoff	LD₅₀ oral [mg/kg]	LD₅₀ Inh.⁺ [mg/L]	Zielorgan	ADI* [mg/kg KG/d]	AOEL* [mg/kg KG/d]
Azimsulfuron	> 5000	> 5.94	Leber, Magen, Lymphsystem, Knochenmark	0.1	0.2
Flupyralsulfuron- methyl-Na	> 5000	> 5.8	Leber, Stoffwechsel	0.035	0.08
Metsulfuron- methyl	> 5000	> 5	Leber, Stoffwechsel	0.22	0.7
Prosulfuron	986	> 5.4	Leber, Herz, Blutbild	0.02	0.06
Sulfosulfuron	> 5000	> 3.0	Nieren, Harntrakt	0.24	1.00
Thifensulfuron- methyl	> 5000	> 7.9	Stoffwechsel	0.01	0.07
Triasulfuron	> 5000	> 5.3	Leber, Nieren, Blutbild	0.01	0.3

* Sicherheitsfaktor: 100

⁺ Inhalation

Toxikologisch relevant sind hauptsächlich die Ausgangssubstanzen selbst, zum Teil aber auch einzelne Metaboliten. Einige Daten zur Toxizität in der Ratte sind in Tabelle 6 für sieben SUs zusammenfassend dargestellt. Die akute Toxizität bei oraler Aufnahme ist mit LD₅₀-Werten, die im g/kg KG-Bereich liegen, gering. Kritischer ist jedoch die Aufnahme über die Atemwege. Die LD₅₀-Werte bei Inhalation liegen im Bereich > 3 bis 8 mg/L. In der Praxis spielt dieser Aufnahmeweg kaum eine Rolle, da die Verbindungen nicht flüchtig

sind. Als Folge von SU-Intoxikationen treten als häufigste Symptome Leberschäden und Stoffwechselstörungen mit Gewichtszunahme auf. Bei einzelnen Verbindungen wurden zudem schädigende Effekte auf Herz, Blutbild, Harntrakt (Nieren, Blase, Harnröhre), Magen, Lymphsystem oder Knochenmark festgestellt.

Die aufgeführten Herbizide zeigten kein gentoxisches Potential und waren i.d.R. auch nicht kanzerogen. Bei 18 Monate dauernden Studien zur Karzinogenität von Flupyrsulfuron-methyl-Natrium bei Mäusen wurden jedoch Lebertumore festgestellt [69]. Auch bei Untersuchungen mit Sulfosulfuron über einen längeren Zeitraum zeigten sich vereinzelt Karzinome bei der Maus und der Ratte [72]. Es gilt jedoch als gesichert, dass dies aufgrund anatomischer Unterschiede für den Menschen keine Relevanz hat [75].

1.6.3.2 Ökotoxikologie

Die Vogeltoxizität der in Tabelle 6 aufgeführten SUs ist mit LD₅₀-Werten von ca. 2000-2500 mg/kg KG etwa doppelt so hoch wie die Säugertoxizität. Ihre akute Fischtoxizität liegt mit LD₅₀-Werten von > 100 mg/L oder höher in einem Bereich, der in der Praxis kaum Relevanz haben dürfte. Eine Bioakkumulation von SUs in Fischen findet praktisch nicht statt. Studien zur Toxizität an verschiedenen Wasserpflanzen zeigten, dass SUs, wie Metsulfuron-methyl und Sulfosulfuron, in anwendungsrelevanten Mengen keinen großen Einfluss auf das Wachstum von Wasserpflanzen haben [76, 77]. Empfindlicher auf SUs reagieren verschiedene Algenarten. So ist die Aufnahme und Akkumulation von SUs, besonders von Chlorsulfuron, durch die Frischwasseralge *Chlorella fusca* stark vom pH-Wert abhängig und bei pH 5.0 signifikant erhöht. Offenbar können SUs die Algen-Zellmembran in undissozierter Form leichter durchdringen und werden durch einen Ionenfang-Mechanismus akkumuliert [78, 79].

Auf Mikroorganismen des Bodens, die an der Kohlenstoff- und Stickstoff-Mineralisation beteiligt sind, zeigen SUs weitgehend keine Wirkung. Mikroorganismen sind vielmehr selbst maßgeblich an der Metabolisierung der Herbizide beteiligt (vgl. II 1.6.2.1) [80]. BLAIR ET AL. beobachteten jedoch, dass Sulfometuron-methyl und Chlorsulfuron auf einige Bakterienstämme im Minimalmedium bakteriostatisch wirken, nicht jedoch bei einem Überangebot an Nährstoffen. Die Enterobakterien *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* besitzen drei unterschiedliche Isoenzyme von ALS, die auf verschiedenen Genen codiert sind und von denen ein Isoenzym inhibiert werden kann [48].

1.7 Rechtliche Regelungen

1.7.1 Zulassung von Pflanzenschutzmitteln

Pflanzenschutzmittel unterliegen in den meisten Ländern einem bestimmten Zulassungssystem durch staatliche Institutionen. Damit sind im Allgemeinen auch gesetzgebende Maßnahmen zum Umgang mit Pflanzenschutzmitteln, ihrer Anwendung und der Kontrolle von Rückständen verbunden. In der Europäischen Union ist mit der 1991 in Kraft getretenen Richtlinie des Rates 91/414/EWG [81] die Zulassung von Pflanzenschutzmitteln in den einzelnen EU-Mitgliedsstaaten harmonisiert worden. Für die Zulassung von Pflanzenschutzmitteln in Deutschland ist seit August 2002 das *Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)* zuständig. Die Zulassungsbehörde prüft den von Herstellern, Vertreibern oder Importeuren von Pflanzenschutzprodukten eingereichten Antrag in Zusammenarbeit mit drei Bewertungsbehörden. Zu diesen zählen die *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA)*, welche die Wirksamkeit, Pflanzenverträglichkeit und den Nutzen von Pflanzenschutzmitteln testet. Das *Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)* beurteilt die eingereichten Unterlagen hinsichtlich der Gesundheit des Menschen und der Vermeidung gesundheitlicher Schäden durch Belastung des Bodens. Das *Bundesumweltamt* fungiert als Einvernehmensbehörde im Hinblick auf die Vermeidung von Schäden durch Belastungen des Naturhaushaltes sowie durch Pflanzenschutzmittelabfälle. Eine Zulassung für ein Produkt wird in der Regel für zehn Jahre erteilt und muss dann neu beantragt werden [82].

1.7.2 Lebensmittelrechtliche Beurteilung von Herbizid-Rückständen

In der Bundesrepublik Deutschland gibt es bereits seit 1966 Höchstmengen für Rückstände von Pflanzenschutzmitteln in und auf Lebensmitteln [83]. Die derzeit gültige Rechtsgrundlage, in der Höchstmengen an Pflanzenschutzmittel-Rückständen für Lebensmittel festgelegt sind, ist die Rückstands-Höchstmengenverordnung (RHmV) [13]. Dort sind für einzelne SUs Grenzwerte von 0.1 mg/kg (Chlorsulfuron), 0.2 mg/kg (Nico-, Prosulfuron) oder 0.5 mg/kg (Flupyr-, Metsulfuron-methyl, etc.) in pflanzlichen Lebensmitteln festgelegt. Insgesamt sind Grenzwerte für zwölf SUs hinsichtlich pflanzlicher Lebensmittel festgesetzt, für tierische Lebensmittel besteht aufgrund der geringen Relevanz keine Regelung. Außerdem gilt in Deutschland laut Trinkwasserverordnung (TrinkwV) [12] der Grenzwert von 0.1 µg/L für einzelne Pflanzenschutzmittel und deren Hauptmetaboliten in Trinkwasser. In der Summe dürfen nur 0.5 µg/L an Wirkstoffen im Trinkwasser enthalten sein.

Zur Risikobewertung und Festsetzung von Grenzwerten für Fremdstoffe in Lebensmitteln werden die von Expertengruppen von *WHO* und *FAO* nach bestimmten Konventionen

festgelegten ADI-Werte (Accceptable Daily Intake) herangezogen. Dieser Wert beschreibt die Kontaminationsmenge eines Stoffes, die aufgrund von toxikologischen Daten unter Einbeziehung eines Sicherheitsfaktors (i.d.R. 100) als duldbare tägliche Aufnahmemenge pro kg Körpergewicht gilt. Das *BfR* legt nach demselben Prinzip entsprechende Werte für Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffe fest, die sich in einzelnen Fällen auch unterscheiden können. Auf der Basis der ADI-Werte werden zudem Trinkwasser-Leitwerte berechnet, welche die gesundheitlich lebenslang duldbare Höchstkonzentration des betreffenden Wirkstoffs im Trinkwasser widerspiegeln [84].

Die *Europäische Kommission* veröffentlicht außerdem Leitlinien für die Festlegung von Höchstmengen. Kriterien für eine Risikoabschätzung sind dabei Daten zu Aufnahme und Metabolismus in relevanten Pflanzen und landwirtschaftlichen Nutztieren, vorhandene Rückstandsanalysemethoden, weitreichende toxikologische Studien auch unter Einbeziehung von Metaboliten und die Bioverfügbarkeit von extrahierbaren und nichtextrahierbaren gebundenen Rückständen. Einheitliche europäische Grenzwerte gibt es bislang allerdings nicht.

2 Analytik von Sulfonylharnstoffen

Die klassische Pestizidanalytik basiert weitgehend auf GC-Multi-Methoden, zunehmend gewinnen aber auch LC-MS-Methoden an Bedeutung [85]. SUs sind für die GC-Analytik aufgrund ihrer geringen Flüchtigkeit und thermischen Labilität nicht direkt zugänglich und erfordern daher eine vorausgehende Derivatisierung. Die zentrale Rolle in der SU-Analytik spielen bis heute HPLC-Methoden mit UV- oder Photoleitfähigkeits-Detektion, wenn auch die massenspektrometrische Detektion deutlich an Bedeutung gewinnt. Daneben werden auch kapillarelektrophoretische und immunologische Methoden eingesetzt. Generell wird die Entwicklung von Multi-Methoden, die eine oder mehrere Substanzklassen gleichzeitig erfassen, angestrebt.

2.1 Probenahme und Probenvorbereitung

Auf Pestizide werden schwerpunktmäßig Umwelt- und Lebensmittelproben untersucht. Als Matrices kommen daher vor allem Wasser, Böden und pflanzliche Lebensmittel in Betracht. Rückstände persistenterer Pestizide spielen auch in tierischen Lebensmitteln eine Rolle. Die vorliegende Arbeit behandelt ausschließlich Wasser und pflanzliche Lebensmittel als Matrix, da hier für SU-Rückstände Grenzwerte bestehen und sie damit der Überwachung unterliegen.

Eine repräsentative Probenahme ist die Voraussetzung für ein Analyseergebnis, das die Gegebenheiten in einer zu kontrollierenden Einheit widerspiegelt. In der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG [86] sind die genauen Bedingungen, die bei der Probenahme von Lebensmitteln zu beachten sind, beschrieben. Vereinfacht wiedergegeben, sollten von kleinstückigem Material mindestens 1 kg zum Probenhomogenisat verarbeitet und bei großstückigem Material mindesten 10 Einzelstücke zur Herstellung der Laborprobe herangezogen werden. In der Regel greift man dabei auf das Sektorverfahren zurück, so dass je ein Viertel von mindestens 10 Früchten oder Pflanzen homogenisiert wird. Für die Entnahme von Wasserproben ist nach der Europäischen Norm EN 25667-2 zu verfahren [87].

Während bei Wasserproben oftmals die Anreicherung der Herbizide im Vordergrund steht, ist bei Lebensmittelproben zusätzlich die Minimierung von Matrixbestandteilen ein Hauptziel der Probenaufarbeitung. Bei Wasserproben werden daher vor allem Festphasen-Anreicherungen (SPE) durchgeführt, bei Boden- und Lebensmittelproben erfolgt zunächst ein Extraktionsschritt. Der erhaltene Extrakt kann dann mittels verschiedenster Aufreinigungs- und Anreicherungsverfahren bearbeitet werden. Bei SUs findet man neben der klassischen Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) vor allem SPE-Methoden. Die SPE hat den

Vorteil, dass sie mit wesentlich geringeren Mengen an organischen Lösungsmitteln auskommt, und dass sie sowohl off-line mittels Arbeitsstationen (z.B. im 96-Well-Format) als auch on-line mittels Säulenschaltungen betreiben werden kann und somit eine Arbeitserleichterung durch Automation ermöglicht [88]. Neben RP18-Materialien werden für SUs auch Ionenaustauschermaterialien bzw. Mischmaterialien mit unpolaren Gruppen und Gruppen mit starker Ionenaustausch-Funktion (vorzugsweise Anionenaustauscher) herangezogen. Alternativen dazu sind Polystyrol-Divinylbenzol- oder Graphit-Kohlenstoff-Sorbentien [8, 89]. Restricted-Access-Materialien stellen eine Kombination aus Größenausschlussmechanismus und Umkehrphase dar und werden hauptsächlich für biologisches Probenmaterial verwendet, da sie sich hervorragend zur Proteinabtrennung eignen [90, 91]. Die Matrix-Festphasen-Dispersion (Matrix Solid-Phase Dispersion, MSPD) ist eine weitere Extraktions- und Aufreinigungsmethode, welche die Extraktion von Pestiziden aus homogen dispergierten Lebensmittelproben ermöglicht. Als Material dient weitporige Diatomeenerde (Kieselgur), auf welche die wässrige Probe aufgebracht wird und mit einem organischen Lösungsmittel eluiert werden kann [92, 93]. Es findet dabei eine Flüssig-Flüssig-Verteilung an der Oberfläche des relativ inerten Supportmaterials statt. Die Anwendung von neuen gruppenselektiven Materialien, wie Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) und Immunoaffinitätsadsorbentien für SUs, wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe publiziert [94].

Darüber hinaus hat sich die Extraktion mit überkritischen Lösungsmitteln (Supercritical fluid extraction, SFE) bei SUs als anwendbar erwiesen. Die Effizienz der Extraktion mit überkritischem CO₂ liegt etwa im Bereich der konventionellen Flüssig-Flüssig-Extraktion und liefert sehr saubere Extrakte [95, 96]. Auch mittels Mikrowellen-unterstützter Extraktion (Microwave-Assisted Extraction, MAE) [97] und einer Mischform aus kontinuierlicher Durchfluss-Flüssig-Flüssig-Extraktion und Membran-Flüssig-Extraktion der sog. „Continuous Flow Liquid Membrane Extraction“ (CFLME) [98] wurde gearbeitet. Diese Techniken sind bisher allerdings nicht weit verbreitet.

2.2 Chromatographische Methoden (GC/HPLC)

Für die GC-Analytik müssen SUs einer Derivatisierung unterzogen werden, um die notwendige Thermostabilität und Flüchtigkeit herzustellen. Als Derivatisierungsmethoden hat sich einerseits die Methylierung der Imingruppe der Sulfonylharnstoffgruppe mittels Diazomethan [99-101] und andererseits die Umsetzung mit Pentafluorbenzylbromid [102] als zweckmäßig erwiesen. Bei der Umsetzung mit Diazomethan entsteht je nach Reaktionsbedingungen das Monomethyl-Derivat oder das N,N'-Dimethyl-Derivat. Ziel ist es, die Bedingungen so zu steuern, dass man nur ein Hauptderivat in hohen Ausbeuten erhält, welches dann mittels Elektronen-Einfang-Detektor (ECD) oder Stickstoff-Phosphor-Detektor (NPD) detektiert wird. Die Umsetzung mit Pentafluorbenzylbromid geht mit der

Hydrolyse der SUs einher, so dass bei der nachfolgenden Analyse mittels ECD das entstandene *N,N'*-Bis(pentafluorbenzyl)-2-benzolsulfonamid bestimmt wird. Allerdings haben sich diese GC-Methoden nicht durchgesetzt, da sie nicht auf die gesamte Stoffklasse der SUs angewandt werden können [8]. Für die beiden Analyten Chlorsulfuron und Metsulfuron-methyl wurden GC-Methoden am häufigsten beschrieben.

Die HPLC-Analytik von SUs hat den Vorteil, dass die Analyten nach Voranreicherung direkt bestimmt werden können, ohne dass eine chemische Umsetzung erfolgen muss. Als stationäre Phasen können sowohl Normalphasen als auch Umkehrphasen dienen. Am weitesten verbreitet ist jedoch die Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung von C_8 -, Phenyl- oder C_{18} -Trennsäulen [8]. Als mobile Phase dient hier i.d.R. ein binäres Eluentensystem, das einen linearen Gradienten erzeugt. Als Eluenten werden Wasser oder Pufferlösungen in Mischung mit organischen Lösungsmitteln, wie Methanol oder ACN, eingesetzt. Die beiden Eluenten sind mit äquimolaren Mengen an Säure versetzt, damit die Analyten in ihrer protonierten Form vorliegen. Alle SUs haben ein Absorptionsmaximum im ultravioletten Bereich zwischen 220 und 232 nm und sind damit für die UV-Detektion geeignet. Allerdings erfordert die UV-Detektion eine gründliche Voraufreinigung und Anreicherung der Probe, da coeluiierende Matrixbestandteile, die ebenfalls im UV-Bereich absorbieren, die Messung stören können.

Daher wurde während der Anfangszeit der SU-Entwicklung vor allem der Photoleitfähigkeitsdetektor eingesetzt [85], der nach Untersuchungen von ZAHNOW eine erheblich bessere Selektivität und Sensitivität aufweist. Für Chlorsulfuron wurde eine 15-fach höhere Sensitivität [103] und für Sulfometuron-methyl sogar eine 50-fach höhere Sensitivität des Photoleitfähigkeitsdetektors [104] gegenüber einem UV-Detektor bei 254 nm berichtet. Durch seine Selektivität für Moleküle, die Schwefel-, Halogen-, Stickstoff- oder Phosphorverbindungen enthalten, können unerwünschte Signale durch Matrixbestandteile wirkungsvoll eliminiert werden [105]. Im Detektor wird das Eluat in zwei Hälften gesplittet. Die eine Hälfte fließt zur Bestimmung der Referenzleitfähigkeit durch einen Leitfähigkeitsdetektor, die andere Hälfte wird mit UV-Licht von 214 oder 254 nm bestrahlt. Dabei werden geeignete Probenmoleküle zu ionischen Bruchstücken zerlegt und die durch diese Ionen verursachte erhöhte Leitfähigkeit in der Messzelle registriert [106]. Mit diesem Verfahren konnte Sulfometuron-methyl in Wasser- und Bodenproben bis zu einer Nachweisgrenze von 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ detektiert werden [104]. In verschiedenen Pflanzen war das Herbizid bis zu einer Grenze von 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nachweisbar, in Fisch lag die Detektionsgrenze bei 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [107].

Die überwiegende Anzahl der HPLC-Methoden für SUs basiert jedoch auf der UV- oder Diodenarray-Detektion, deren Vorteil in der universelleren Anwendbarkeit liegt [108]. Außerdem hat die zunehmende Popularität von Umkehrphasen, die damit verbundene

Verwendung von wässrigen Eluenten und die Weiterentwicklung von Instrumenten durch Lösungsmittel- und Säulen-Schalttechniken, zu verbesserten chromatographischen Trennungen geführt. Dies eröffnete die Möglichkeit, die UV-Absorption zur Detektion heranzuziehen [109]. Neben zahlreichen Methoden zur Bestimmung von SUs in Wasser- und Bodenproben [110-114] wurden auch Anwendungen mit verschiedensten Lebensmittelmatrices beschrieben [115-120]. POWLEY ET AL. bestimmten neun verschiedene SUs mittels HPLC-UV in gespikten Oberflächenwasser- und Bodenproben. Zur Probenaufarbeitung wurden die SUs aus den Bodenproben extrahiert und anschließend mittels Festphasenextraktion (C₁₈-SPE) aufgereinigt; aus den Wasserproben wurden sie direkt mittels SPE angereichert. Die Nachweisgrenzen des Verfahrens lagen bei 1 µg/kg im Boden und 0.1 µg/L im Wasser. Die durchschnittlichen Wiederfindungen bewegten sich zwischen 70 und 120% mit relativen Standardabweichungen von < 20% [110]. Lebensmittel werden zunächst extrahiert und die Extrakte dann verschiedenen Aufreinigungs- und Anreicherungsschritten unterzogen. Neben der Flüssig-Flüssig-Extraktion sowie der Festphasenextraktion mittels RP18- und Anionenaustauscher-Materialien spielt hier die Festphasendispersion [121, 122] eine bedeutende Rolle. In der Regel sind mindestens zwei Aufreinigungsschritte notwendig, um Matrixeffekte soweit zu minimieren, dass eine UV-Detektion möglich ist. Von der *BBA* werden Mitteilungen zur Rückstandsanalytik neuer Pflanzenschutzmittelwirkstoffe veröffentlicht [117-119], die Methoden für verschiedenste Lebensmittel- und Umweltmatrices vorstellen, jedoch immer nur eine SU-Verbindung erfassen. ISHIMITSU ET AL. stellten eine HPLC-UV/DAD-Methode zur Bestimmung von Azim-, Flaza- und Halosulfuron-methyl in Getreide, Gemüse und Früchten vor [120]. Die Detektionsgrenzen lagen bei 0.01 mg/kg für Azim- und Halosulfuron und bei 0.02 mg/kg für Flazasulfuron. Nach Anreicherungen von Proben der Konzentration 0.05-0.5 mg/kg wurden Wiederfindungsraten zwischen 77.0 und 112.3% erzielt.

Für SUs in Wasserproben wurden zudem die Ionenchromatographie (IC) und die Ionenaarchromatographie (IPC), ebenfalls in Verbindung mit der UV-Detektion, eingesetzt. Die IPC verfügt über eine gute Trennleistung und erreicht Nachweisgrenzen von 15 bis 20 ng/L [123].

2.3 Massenspektrometrie (MS)

HPLC-Methoden haben den Nachteil, dass die Bestimmung von Retentionszeit und relativer Menge einer Verbindung nur eine begrenzte Information liefert, die keinerlei Aussage über die Molekülstruktur zulässt und somit die Identifizierung einzelner Substanzen erschwert. Mittels Kopplung von Hochleistungsflüssigchromatographie mit massenselektiven Detektoren erhält man Massenspektren, die sowohl zur Quantifizierung von Substanzen dienen, als auch Strukturinformationen liefern. Besonders die Tandem-Massenspektrometrie stellt durch ihre hohe Sensitivität und Selektivität eine Methode dar,

welche die strengen regulativen Anforderungen an die Zuverlässigkeit von Ergebnissen bezüglich der Identifizierung und Quantifizierung einer Verbindung erfüllen kann [8].

Da SUs polare Verbindungen sind, die sich gut ionisieren lassen, sind sie für die massenspektrometrische Detektion geeignet [124]. Als Ionisierungstechniken wurden anfänglich Thermosprayionisation und Fast Atom Bombardement eingesetzt. Vor der Entwicklung der Elektrosprayionisationstechniken war die quantitative Bestimmung von SUs mittels LC-MS jedoch nicht weit verbreitet. Heute wird ausschließlich die Atmospheric Pressure Ionisation (API) eingesetzt, die in den Varianten Elektrosprayionisation (ESI) und Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) zur Verfügung steht [125]. Bei beiden Techniken erfolgt die Ionisation in der Regel durch Aufnahme oder Abgabe von Protonen. Die beste Sensitivität und Selektivität für SUs erreicht man mit der ESI-Technik. Die meisten Methoden werden im Positiv-Ionen-Modus mit sauren LC-Eluenten durchgeführt. Unter diesen Bedingungen werden bevorzugt $[M+H]^+$ -Ionen gebildet und die Entstehung von unerwünschten Fragmenten oder Addukten minimiert. Aufgrund des Säure-Base-Verhaltens der SUs können bei pH-Werten von 6-7 auch negative $[M-H]^-$ -Ionen gebildet werden. Die Sensitivität ist im Negativ-Ionen-Modus aber oft geringer als im Positiv-Ionen-Modus.

Bei der Tandem-MS-Analytik von SUs sind Triple-Quadrupol-Massenspektrometer den Ioneneinfang-Massenspektrometern bei der Sensitivität überlegen, da Matrixeffekte wirkungsvoller unterdrückt werden können. Außerdem wurde beobachtet, dass zwei Elternionen- zu Tochterionen-Übergänge bei einigen SUs nicht zustande kommen, wenn Ioneneinfanggeräte im MS/MS-Mode verwendet werden. Auch Time-of-Flight (TOF)-Geräte könnten in der Zukunft eine größere Rolle in der SU-Analytik spielen, besonders wenn die Analytik von Metaboliten einbezogen werden soll [8].

Die hohe Selektivität der Tandem-MS erlaubt eine Reduzierung der Probenvorbereitungsschritte. Allerdings ist der Grad der möglichen Reduzierung nicht unumstritten, da stark matrixhaltige Proben zu einer Verunreinigung der Ionisationskammer führen können und damit die Empfindlichkeit der Messung stören [126]. Die Strategie der Probenverdünnung zur Matrixreduzierung ist in der Spurenanalytik durch die geringen Konzentrationen des Zielanalyten in der Probe begrenzt. Daher sind in der SU-Analytik Probenaufarbeitungsschritte wie Flüssig-Flüssig-Extraktion, Festphasenextraktion, Festphasendispersion oder auch Affinitätsextraktion notwendig.

Zur Anwendung der MS in Realproben sind in den letzten zehn Jahren zahlreiche Methoden veröffentlicht worden. Dabei wurden SUs insbesondere in Wasser- und Bodenproben mittels LC-MS [127-136] und LC-MS/MS [137-141] bestimmt, wobei fast ausschließlich mittels Elektrosprayionisation gearbeitet wurde. Mit LC-MS wurden Nachweisgrenzen von 0.05 bis 1.5 ng/L in verschiedenen Wasserproben [132] sowie von 0.1 µg/kg

in Bodenproben [127] erreicht. Unter Einsatz der LC-MS/MS-Technik konnte die Detektionsgrenze in Bodenproben auf 0.05 µg/kg herabgesetzt werden [137]. Im Bereich der Lebensmittelanalytik gibt es bisher erst wenige Anwendungsbeispiele. So untersuchten STRY ET AL. Baumwollsaat und -pflanzen auf Thifensulfuron-methyl und Tribenuron-methyl mit ESI-MS. Die SU-Anreicherung erfolgt dabei durch eine on-line gekoppelte Größenausschlusschromatographie. Mit dieser Methode wurde eine Nachweisgrenze von 6 µg/kg erzielt [142]. Mittels LC-MS/MS wurden für 13 SUs Nachweisgrenzen von 0.01 bis 0.05 mg/kg in verschiedenen Lebensmittel erreicht [8]. In der Multi-Methode von KLEIN ET AL. für 67 Pestizide, die 15 SUs miterfasst, erzielte man Nachweisgrenzen von 0.01 mg/kg [143]. Auch in der medizinischen und pharmazeutischen Analytik von Sulfonylharnstoff-Antidiabetika werden neben HPLC-UV-Methoden zunehmend LC-MS-Techniken angewandt [144, 145].

2.4 Kapillarelektrophorese (CE)

Die Kapillarelektrophorese ist eine Mikroseparationstechnik mit einer hohen Trennleistung, die auch zunehmend in der Spurenanalytik von Herbiziden Anwendung findet [146-148]. Die Trennung basiert hauptsächlich auf dem unterschiedlichen Verhältnis von Ladung zu Masse der einzelnen Analyten. Dabei können außergewöhnlich hohe theoretische Bodenzahlen von über 100 000 erreicht werden. Da aber sehr dünne und kurze Kapillaren mit einem Innenvolumen von ca. 5 µL verwendet werden, ist das Injektionsvolumen beschränkt, was zu einer relativ geringen Konzentrationsempfindlichkeit führt. Eine Spurenanalytik im umweltrelevanten Bereich kann somit nur mit Hilfe von Voranreicherungsmethoden oder sehr empfindlichen Detektoren, wie beispielsweise der Laserinduzierten Fluoreszenz (LIF) oder dem Flugzeit-Massenspektrometer, durchgeführt werden.

SUs können aufgrund ihrer Ionisierbarkeit mit Kapillarzonenelektrophorese (CZE) oder mizellarer elektrokinetischer Kapillarchromatographie (MEKC) analysiert werden. Es wurden mehrere Methoden zur Bestimmung von SUs in Wasser- [149-151], Boden- [152, 153] und Lebensmittelproben [154] publiziert. DINELLI ET AL. beschrieben die Bestimmung von neun SUs und deren Abbauprodukte bei Hydrolysestudien in Wasser mittels CE [149]. BERGER ET AL. führten ebenfalls Hydrolysestudien von zwölf SUs in Wasser- und Bodenproben mittels CZE durch und konnten dabei gleichzeitig fünf Metaboliten bestimmen. Die Trennung der zwölf SUs erfolgte während einer Migrationszeit von weniger als 20 Minuten. Die Nachweisgrenze des Verfahrens lag bei 100 ng/L in Wasser und 10 µg/kg im Sediment [150]. Ein Vergleich von HPLC und CE zur Bestimmung von ebenfalls zwölf SUs in verschiedenen Wasserproben zeigte, dass beide Methoden vergleichbare Daten liefern. Die Wiederfindungen bei der HPLC lagen zwischen 63 und 110%, bei der CE zwischen 55 und 121% [151]. KRYNITSKY ET AL. entwickelten eine MEKC-Methode zur Bestimmung von fünf SUs in verschiedenen Getreidearten [154]. Die MEKC-Messung der

Proben erfolgt dabei nach Extraktion der Lebensmittel und anschließender SPE-Aufreinigung. Die Nachweisgrenzen bewegten sich hier zwischen 0.02 und 0.04 mg/kg, die durchschnittliche Wiederfindung für die fünf Verbindungen lag zwischen 73 und 119%. Bei den meisten CE-Methoden wird die UV-Detektion eingesetzt. GARCIA ET AL. gelang die Kopplung der CE an massenselektive Detektoren unter Verwendung eines pneumatisch unterstützten Elektrospray-Interfaces. Dadurch war es möglich, acht Verbindungen innerhalb von 5 min zu trennen. Die Übertragung der Methode auf Realmatrices bedarf jedoch einer Verbesserung der Nachweisgrenzen [155, 156].

2.5 Immunoassays

Für die Sulfonylharnstoffe Chlorsulfuron [157-159], Triasulfuron [160-165], Metsulfuron-methyl [165-169] und Bensulfuron-methyl [170] wurden Immunoassays beschrieben. Der erste dieser immunochemischen SU-Tests wurde 1985 von KELLY ET AL. für den Wirkstoff Chlorsulfuron entwickelt. Zur Immunogendarstellung wurde aus Chlorsulfuron über eine Diazokopplung die entsprechende Diazoniumverbindung hergestellt und diese wiederum an KLH als Carrier gekoppelt. Mit dem resultierenden Immunogen wurden polyklonale Antikörper in Kaninchen hergestellt, die im indirekten ELISA mittels homologem BSA-Coating-Antigen auf Bodenproben angewandt wurden. Die resultierende Bestimmungsgrenze für Chlorsulfuron lag bei 0.4 µg/kg, die Kreuzreaktivität beschränkte sich auf strukturell sehr ähnliche Verbindungen wie Sulfometuron-methyl [157]. YAZYNINA ET AL. beschreiben die Herstellung eines selektiven polyklonalen Antikörpers ebenfalls für Chlorsulfuron unter Verwendung des 2-Chlorphenylsulfonamid-Fragments als Hapten [158]. Allerdings zeigte der resultierende Enzymimmunoassay lediglich eine Sensitivität von 1 µg/L.

SCHLAEPI ET AL. entwickelten einen auf monoklonalen Antikörpern basierenden, indirekt kompetitiven ELISA für Triasulfuron, der für wässrige Proben innerhalb eines Detektionsbereiches von 0.01 bis 1 µg/L und für Bodenproben bis zu einer Detektionsgrenze von 0.1 µg/kg angewandt werden kann. Als Haptene für die Generierung von drei verschiedenen monoklonalen Antikörpern wurden ein am Triazinring substituiertes Triasulfuron-derivat sowie ein derivatisierter Sulfonamid-Rest des Triasulfurons eingesetzt [161]. Ein automatisierter Chemilumineszenz-Assay für Triasulfuron, basierend auf magnetischen Partikeln, erzielte Nachweisgrenzen von 0.02 µg/L in Wasser und 0.05 µg/kg in Bodenproben [162]. GHILDYAL ET AL. konnten die Nachweisgrenze für Triasulfuron mittels eines auf polyklonalen Antikörpern beruhenden ELISAs auf 40 ng/L in Wasser und 20 ng/kg in Bodenproben herabsetzen. Allerdings war dafür eine Voranreicherung der Proben durch Immunextraktion notwendig [164].

Für Triasulfuron, Metsulfuron-methyl und Chlorsulfuron werden von der Firma *Strategic Diagnostics Inc.* unter dem Markennamen EnviroGard® kommerzielle ELISA-Test-Kits angeboten, die auf einem direkten kompetitiven Testsystem unter Verwendung von polyklonalen Antikörpern basieren und für Herbizidrückstände in Wasser ab ca. 25 bis 50 ng/L eingesetzt werden können. HALLOWAY ET AL. zeigten in einer Laborvergleichsstudie, in der gespikete Bodenproben auf die drei SUs untersucht wurden, dass ELISA-Tests in einem Bereich von 0.1 bis 1.0 µg/kg gut reproduzierbare Werte liefern [167]. Dass der kommerziell erhältliche Test für Triasulfuron auch auf Bodenproben angewandt werden kann, wurde vorher bereits von BRADY ET AL. publiziert. ELISA und LC-MS zeigten hier bei SPE-vorgereinigten Bodenextrakten eine gute Übereinstimmung der Messresultate ($r^2 = 0.88$, $n = 29$) [163].

Die Entwicklung eines indirekten Enzymimmunoassays für Metsulfuron-methyl unter Verwendung von polyklonalen Antikörpern mit einer Nachweisgrenze von 40 ng/L in Wasser wurde von SIMON ET AL. beschrieben [166]. Die Anwendung dieses Testsystems für Oberflächenwässer war direkt möglich, während für Abwässer aufgrund von Matrixeinflüssen eine 100-fache Verdünnung der Proben notwendig war [168]. Als Hapten fungierte ein Phenylsulfonamidderivat, welches auch bei der Herstellung von aviären Antikörpern aus Hühnereidottern Verwendung fand [169]. Der auf diesem IgY-Antikörper basierende indirekte ELISA erzielte eine Nachweisgrenze von 13 ng/L. Für das Herbizid Bensulfuron-methyl wurden zudem drei sensitive heterologe indirekte ELISAs mit Nachweisgrenzen von 30 ng/L bzw. 2 ng/L in Wasser entwickelt [170].

Die meisten der bisher aufgeführten Tests sind für einen einzigen Analyten spezifisch. Lediglich der anti-MSM-Antikörper von SIMON ET AL. [166] und der monoklonale anti-SU-Antikörper von KOLAR ET AL. [171] erkennen vier bis acht verschiedene SUs gleichzeitig. Der bislang einzige „Multi-Analyt-Immunoassay“ für Sulfonylharnstoffe, bei dem neun polyklonale Antikörper verschiedener Spezifität parallel auf einer mit einem Poly-Antigen beschichteten Mikrotiterplatte verwendet wurden, erreichte in formulierten Pestizidprodukten Nachweisgrenzen von 5 µg/kg [172]. Ein Teilaspekt der vorliegenden Arbeit war es, einen multi-spezifischen Antikörper mit möglichst breiter SU-Erkennung (klassenspezifisch) zu generieren und diesen unter anderem in einem SU-Screening-ELISA anzuwenden.

3 Immunologische Methoden in der Analytik

Immunologische Analysemethoden sind Verfahren, bei denen mit Hilfe von Antikörpern Targetmoleküle erfasst und bestimmt werden [173]. Vom Immunsystem des Säugerorganismus werden Antikörper gegen eindringende infektiöse Mikroorganismen gebildet. Antikörper können gegen eine enorme Anzahl möglicher Fremdstoffe (Antigene) produziert werden, solange diese eine bestimmte Mindestgröße aufweisen. Die Eigenschaft der Antikörper, Antigene zu binden, kann für analytische Zwecke genutzt werden. Dafür ist es notwendig, spezifische Antikörper herzustellen, die bestimmte Analyten oder Analytgruppen erkennen.

3.1 Antikörper

3.1.1 Struktur

Antikörper sind Glykoproteine, die auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet werden und von den sog. Plasmazellen gebildet werden [174]. Diese stammen von B-Lymphozyten ab, die durch Bindung eines fremden Moleküls an den Antigenrezeptor auf der Zelloberfläche, stimuliert worden sind. Antikörper besitzen dieselbe Bindungsspezifität wie die entsprechenden Antigenrezeptoren. Sie bestehen aus jeweils zwei leichten (ca. 25 kDa) und zwei schweren (ca. 55 kDa) Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken zu einem Y-förmigen Molekül (ca. 160 kDa) miteinander verbunden sind. Aus der räumlichen Anordnung der Ketten ergeben sich zwei variable N-terminale und eine konstante C-terminale Region. Die beiden variablen Regionen (F_v -Fragmente) enthalten sogenannte hypervariable Bereiche, die für die Antigenbindung verantwortlich sind. Die Abschnitte innerhalb der hypervariablen Bereiche, die die tatsächliche Bindungsstelle darstellen, werden als Paratop bezeichnet. Die konstante Region unterscheidet sich innerhalb einer Spezies kaum. Sie wird F_c -Fragment (crystallizable) genannt, da sie nach enzymatischer Abspaltung kristallisiert werden kann. Die verbleibenden beiden Reste des Antikörpers bezeichnet man als F_{ab} -Fragment (antigen binding) [175].

Antikörper lassen sich nach Struktur und Funktion in die fünf Klassen IgG, IgM, IgA, IgD und IgE einteilen [176]. Die einzelnen Klassen besitzen unterschiedliche Funktionen im Immunsystem, sind strukturell jedoch ähnlich aufgebaut und unterscheiden sich lediglich in der Zusammensetzung der schweren Ketten und der Valenz. IgG stellt den mengenmäßig größten Anteil an Immunglobulinen im Serum (8-16 mg/mL). Diese Antikörperklasse entstammt der sekundären Immunantwort, deren Bildung auf einen wiederholten Kontakt des Immunsystems mit einem bestimmten Antigen erfolgt. Da es

sich dabei um relativ stabile Proteine handelt, können sie in der immunologischen Diagnostik und Analytik genutzt werden.

3.1.2 Gewinnung

Die Generierung von spezifischen Antikörpern für analytische Zwecke erfolgt bisher zuverlässig nur in Säugetieren. Zwar können Antikörper oder Antikörperfragmente mittlerweile auch rekombinant in Bakterien oder Pflanzenzellen mittels antikörpercodierender Genfragmente aus Immunzellen hergestellt werden, doch ist diese Technik derzeit noch sehr aufwändig und entwicklungsbedürftig. Die Produktion von polyklonalen Antikörpern in Versuchstieren ist eine etablierte Technik, die jedoch weitgehend empirisch erfolgt [174]. Die Chance, brauchbare Antikörper zu erhalten, kann lediglich durch Variation des Immunogens, der Immunisierungstechnik und des Immunisierungsverlaufs beeinflusst werden, was die Notwendigkeit einer Vielzahl von Versuchen nach sich ziehen kann. Die Herstellung monoklonaler Antikörper mittels der Hybridomatechnik erfordert das Vorhandensein eines Tieres, das einen brauchbaren Antikörper produziert. Die erfolgreiche Zellfusion der antikörperproduzierenden Zellen und Krebszellen zu den Hybridomazellen unterliegt biologischen Wahrscheinlichkeiten, die unter Umständen nur mittels einer Vielzahl von Fusionen erreicht werden kann. Da es aber aufgrund der komplexen Struktur von Antikörpern bis heute nicht möglich ist, diese synthetisch herzustellen, haben sich Tierversuch und Hybridomatechnik fest etabliert.

3.1.3 Biosynthese

Das Immunsystem reagiert auf die Anwesenheit von Fremdstoffen mittels zellulärer und humoraler Immunreaktion [175, 177]. Für Erstere sind vor allem die T-Lymphozyten verantwortlich, deren Aufgabe darin besteht, infizierte Zellen abzuwehren, Fremdgewebe abzustößen und das zelluläre und humorale Immunsystem zu regulieren. Antikörper werden in der humoralen Immunreaktion von B-Lymphozyten hergestellt und zunächst membranständig auf der Zelloberfläche präsentiert (primäre Immunantwort). Jeder Lymphozyt kann nur eine Art von Antikörpern herstellen. Treffen nun erneut gleiche Immunogenmoleküle auf diese B-Lymphozyten, so werden die Fremdmoleküle von den Antikörpern spezifisch gebunden. Der B-Lymphozyt wird durch den Antigenkontakt mittels Unterstützung der T-Helfer-Zellen stimuliert, sich zu teilen. Die daraus entstandenen Plasmazellen übernehmen die Produktion der Antikörper, die ins Blut abgegeben werden (sekundäre Immunantwort). Sie sind kurzlebig und dienen der raschen Bekämpfung von Infektionen. Einige B-Lymphozyten werden jedoch zu langlebigen Gedächtniszellen und bieten einen jahrelangen Infektionsschutz für den Körper. Immunogene besitzen eine Vielzahl von verschiedenen Antigen determinanten (Epitopen), die unterschiedliche B-Lymphozyten mit spezifischen antigenbindenden Rezeptoren (Paratopen) zur Produk-

tion von jeweils einer bestimmten Art von Antikörpern anregen. Das Serum enthält somit unterschiedliche, sog. polyklonale Antikörper [174].

3.1.4 Polyklonale Antikörper

Polyklonale Antikörper erhält man aus dem Serum immunisierter Wirbeltiere. Meist werden dazu Mäuse, Kaninchen oder Schafe herangezogen. Die effektivste Methode eine Immunantwort hervorzurufen, ist die kontinuierliche Verabreichung des Antigens zusammen mit einem Adjuvans, welches als Immunstimulans fungiert. Hier hat sich das Freundschsche Adjuvans, welches aus einer Suspension abgetöteter Mycobakterien in einer Mineralöl-/Emulgatorlösung besteht, bewährt [174]. Die enthaltenen Bakterien regen das Immunsystem an, das hydrophobe Mineralöl bewirkt, dass sich das Immunogen, von der Injektionsstelle ausgehend, nur langsam im Körper verteilt, wobei ein Tensid als Emulgator dient [178]. Nach der Primärimmunisierung werden wiederholt Boosterimmunisierungen in Abständen von einigen Wochen durchgeführt, um ausreichende Antikörpertiter für die geplante Anwendung zu erreichen.

Bei der Planung des Immunisierungsverlaufs müssen die einzelnen Phasen der Immunantwort beachtet werden. Als erste Reaktion auf den Kontakt mit einem Antigen wird nach zwei bis drei Tagen die Freisetzung von IgM-Antikörpern beobachtet, deren Menge nach acht bis zehn Tagen ein Maximum erreicht und dann innerhalb von 14 Tagen wieder auf den Ursprungswert fällt. Diese als Pentamere auftretenden Antikörper verhalten sich bei jeder weiteren Boosterinjektion analog zum erstmaligen Antigenkontakt. Im Gegensatz dazu kann der Gehalt von IgG-Antikörpern im Blut durch wiederholte Antigengabe gesteigert werden. Die Produktion von IgG-Antikörpern beginnt etwa zwei bis drei Tage nach dem ersten Auftreten von IgM-Antikörpern und erreicht ihr Maximum nach etwa zwei bis drei Wochen. Ein Rückgang der Produktion erfolgt nur sehr langsam und durch wiederholten Antigenkontakt kann die IgG-Konzentration um ein Vielfaches gesteigert werden. Zweckmäßigerweise kontrolliert man den Titer des selektiven Antikörpers zwischen den Verstärkerimmunisierungen und führt die Immunisierungen solange fort, bis dieser nicht mehr gesteigert werden kann [175].

Der mehrmalige Kontakt mit dem Antigen führt neben der Konzentrationserhöhung auch zu einer Affinitäts- und Selektivitätssteigerung des Antikörpers [177]. Die Affinitätsreifung ist darin begründet, dass B-Gedächtniszellen die Antikörpermutanten mit einer höheren Affinität zum Antigen auf ihrer Oberfläche binden, verstärkt zur Vermehrung angeregt werden und sich letztlich durchsetzen. Die Mutationshäufigkeit der Gene, die die variablen Regionen der leichten und schweren Ketten der Antikörper codieren, ist gegenüber normalen Genen enorm gesteigert. Damit kann das Immunsystem wirkungsvoll gegen Fremdstoffe und pathogene Mikroorganismen reagieren.

3.1.5 Monoklonale Antikörper

Mittels der Hybridomatechnik, die 1975 erstmalig von KÖHLER und MILSTEIN [179] beschrieben wurde, können monoklonale Antikörper erzeugt werden. Dies geschieht durch die Fusion immunkompetenter, antikörperproduzierender Milzzellen mit schnell wachsenden Myelomzellen. Die dabei entstehenden hybriden Zellen (Hybridome) produzieren nach Klonierung in der Zellkultur unbegrenzt monoklonale Antikörper und vereinen die Eigenschaft des schnellen Wachstums der Myelomzellen und die Fähigkeit zur Antikörperproduktion der ursprünglichen Milzzellen. Die Antikörper entstammen der Zelllinie eines bestimmten B-Lymphozyten, der gegen ein einziges Epitop gerichtet ist [180]. Die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern ist zwar zeit- und kostenintensiv, man erhält aber einen praktisch unbegrenzten Vorrat an selektiven Antikörpern, was für die Kommerzialisierung immunologischer Testsysteme bedeutsam ist.

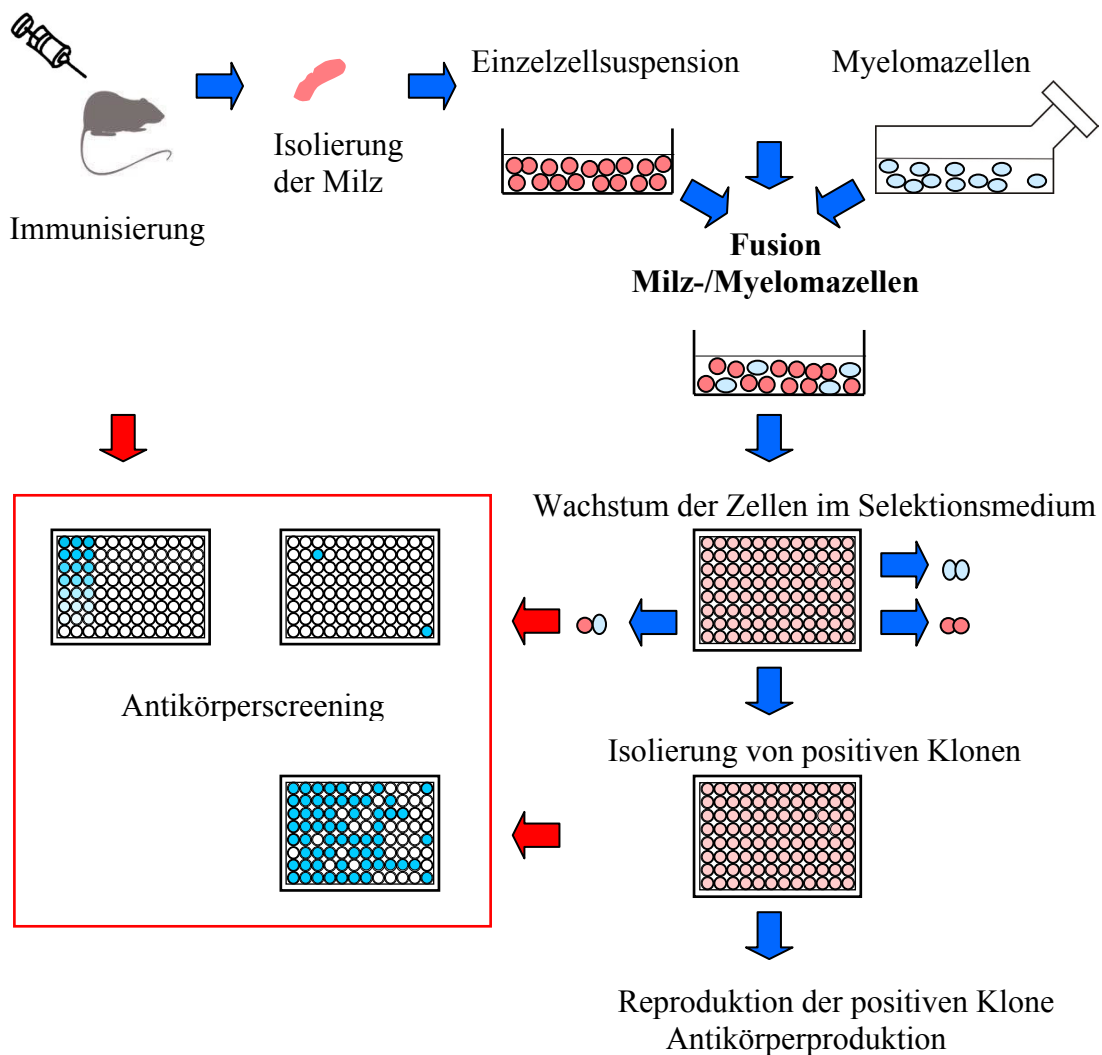


Abbildung 9: Monoklonale Antikörperproduktion [174].

Das Prozedere ist in Abbildung 9 dargestellt. Die Immunisierung erfolgt nach demselben Prinzip wie die Produktion polyklonaler Antikörper. Als Versuchstiere werden fast ausschließlich Mäuse herangezogen. Wenn ein ausreichender Antikörpertiter im Blut festgestellt wurde, wird den Tieren die Milz entnommen und daraus eine Einzelzellsuspension hergestellt. Unter Zugabe von Polyethylenglykol werden die Milzzellen mit Myelomazellen fusioniert und im Selektionsmedium vermehrt. Während der Klonierung durch Vereinzeln sind begleitende Tests auf Antikörpersekretion notwendig, um die gewünschten antikörperproduzierenden Klone selektieren zu können. Zellklone, die Antikörper mit gewünschten Eigenschaften produzieren, können in der Zellkultur vermehrt werden. Die Antikörper gewinnt man aus dem Zellkulturüberstand.

3.1.6 Rekombinante Antikörper

Insbesondere der Bedarf an humanen monoklonalen Antikörpern von gleichbleibender Qualität für die Therapie führte dazu, dass gentechnische Herstellungsverfahren an Bedeutung gewannen. Man erhält rekombinante Antikörper dadurch, dass man Lymphozyten-DNA isoliert und in Bakterien, Pflanzen- oder Säugetierzellen exprimiert [181]. Je nach Wirtsorganismus können komplette Antikörper oder bestimmte antigenbindende Fragmente hergestellt werden. Zwar muss zur Gewinnung der Lymphozyten, bzw. deren DNA, weiterhin immunisiert werden, es können jedoch bestimmte Funktionalitäten durch Isolierung einzelner Genabschnitte sowie deren Verknüpfung mit anderen Genabschnitten „designed“ werden. Dabei können auch DNA-Stücke verschiedener Spezies kombiniert werden, was bei der Herstellung von humanisierten Antikörpern für medizinische Anwendungen eine große Bedeutung hat. Weitere Vorteile dieser Technik liegen darin, dass durch Mutation einzelner Aminosäuren, Antikörperselektivitäten auch variiert werden können. Ferner kann man in kurzer Zeit relativ große Mengen an Antikörpern erhalten. Die sogenannte Phage-Display-Methode, bei der Antikörperfragmente auf der Oberfläche von Bakteriophagen exprimiert werden, wird im Zusammenhang mit dem Aufbau von Antikörperbibliotheken als zukunftsweisender Schritt gesehen. Das Ziel ist es letztlich, möglichst die gesamte Antikörpervielfalt einer Spezies in eine Genbibliothek zu übertragen und damit entsprechend nutzbar zu machen. Die erfolgreiche Nutzung der Technik setzt jedoch ein umfangreiches Wissen der biologischen Mechanismen auf molekularer Ebene voraus, das derzeit noch lückenhaft ist. Daher versucht man auch mittels Molecular Modeling die molekularen Eigenschaften von Antigenbindungsstellen genauer zu verstehen [182].

3.1.7 Künstliche Antikörper

Die Eigenschaft der selektiven molekularen Erkennung von Antikörpern auf synthetisch hergestellte Materialien zu übertragen, ist ein Ansatz, um die aufwändige Antikörper-

produktion zu umgehen. Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) sind Polymere, die aufgrund nichtkovalenter Wechselwirkungen in der Lage sind, Analyten sehr selektiv zu binden. Ihre Herstellung erfolgt durch Polymerisation verschiedener Monomere und Crosslinker in Gegenwart des Zielanalyten und eines Porogens. Durch nachfolgende Waschschrte wird der Analyt (Templat) herausgelöst. Die komplementär geprägten Strukturen bilden Bindungsstellen, die von den Analyten erneut besetzt werden können (vgl. auch Kapitel II 6).

Die Herstellung von Bindungsproteinen für einzelne Analyten, die ähnlich den Antikörpern eingesetzt werden können, ist ein weiterer Ansatz zur selektiven molekularen Erkennung. Man verwendet dafür künstliche Lipocaline, die eine starre β -Faltblattstruktur mit einigen variablen Bindungsschleifen aufweisen und in ihrem Aufbau den variablen Domänen von Antikörpern ähnlich sind. Analog zu den Antikörpern werden sie Anticaline genannt [183, 184].

3.2 Immunoassays

3.2.1 Entwicklung und Anwendungsgebiete

Als Pioniere beim Einsatz von Antisera in der Analytik gelten LANDSTEINER und VAN DER SCHEER, die in den 1930er Jahren bereits die Selektivität von Antikörpern zur Differenzierung von Molekülen nutzten [185]. Durch die Verwendung von Markern, deren Nachweis noch in kleinsten Mengen möglich war, wurde die Empfindlichkeit der Tests entschieden verbessert. YALOW und BERSON realisierten 1959 erstmals einen Immunoassay zur Bestimmung von Insulin im Humanserum unter Verwendung von mit ^{131}I radioaktiv markiertem Insulin [186]. Radioimmunoassays (RIA) leiteten den stark zunehmenden Einsatz immunologischer Nachweisverfahren im medizinischen Bereich ein, sie bargen jedoch auch Probleme bezüglich der Handhabung und Lagerung des radioaktiven Materials sowie der begrenzten Haltbarkeit von mit Radioisotopen markierten Substanzen. Durch den Einsatz von Enzymen als Label konnten ENGVALL und PERLMANN sowie VAN WEEMEN und SCHUURS 1971 diese Schwierigkeiten elegant lösen [187, 188]. Der Ausdruck ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) wurde durch die Anwendung von Enzymmarkern und das Adsorptionsvermögen von Proteinen, einschließlich Antikörpern, an festen Oberflächen geprägt.

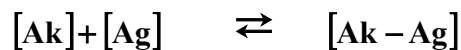
Von der Vielzahl eingesetzter Enzyme, sind die Meerrettichperoxidase und die alkalische Phosphatase am weitesten verbreitet. Der Charge-Transfer-Komplex, der durch Peroxidase in Kombination mit dem Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) gebildet wird, lässt sich bereits in Konzentrationen von 10^{-18} mol detektieren und erreicht damit Nachweisgrenzen, die noch unterhalb radioaktiver Marker liegen [189]. Der Substratumsatz zu

chromogenen Produkten wird photometrisch bestimmt. Es werden aber auch zunehmend Substrate eingesetzt, bei denen fluoreszierende oder lumineszierende Produkte aus der enzymatischen Reaktion hervorgehen. Anstelle von Enzymlabels können auch Luminophore (Luminol) oder Fluorophore (Rhodamin, Fluorescein) als Marker Verwendung finden, oder es kann eine auf Surface-Plasmon-Resonanz beruhende Detektion sogar ohne Label erfolgen.

Die Einführung der Hybridomatechnik durch KÖHLER und MILSTEIN [179], welche die Möglichkeit zur reproduzierbaren Produktion und zur Standardisierung von monoklonalen Antikörpern schuf, sorgte für einen weiteren Aufschwung bei den Immunoassays. Besonders in der medizinischen Diagnostik, wo sie zur Bestimmung von Proteinen, Hormonen, Viren und Medikamenten eingesetzt werden, haben sie sich früh etabliert. Erst zu Beginn der 1980er Jahre folgte der Einsatz in der Lebensmittel- und Umweltanalytik. Von HAMMOCK und MUMMA wurden die ersten Pestizid-Immunoassays entwickelt [190], denen bis heute zahlreiche Publikationen zu ELISA-Methoden für die Pestizidanalytik folgten [191, 192]; kommerzialisiert wurde davon jedoch nur eine begrenzte Anzahl [193, 194]. Auch für andere Lebensmittel- und Umweltkontaminaten, wie Mykotoxine (z.B. Aflatoxin, Ochratoxin) [195], Microcystine [196], Antibiotika [197] und PAHs [198, 199] wurden zahlreiche Tests entwickelt. Bei Lebensmitteln spielt neben mikrobiologischen Tests [200], die Bestimmung von Fremdproteinen für Allergietests (z.B. Soja-, Erdnuss-, Haselnussprotein) [201] sowie für die Bestimmung der Tierart (z.B. Rinderprotein) [202] eine Rolle. Auch wenn Immunoassays für lebensmittel- und umweltanalytische Zwecke bei weitem nicht den Stellenwert haben, wie in der medizinischen Diagnostik, bietet die Methode auch hier die Möglichkeit, mit erheblich geringerem Aufwand als konventionelle Analyseverfahren vergleichbare Resultate zu erzielen [203-205]. Allerdings ist dafür ein für den Zielanalyten selektiver und sensitiver Antikörper erforderlich, dessen Gewinnung sehr aufwändig sein kann. Immunoassays haben sich daher besonders in Bereichen etabliert, die das Screening einer großen Anzahl von Proben auf Einzelanalyten oder Analytgruppen erfordern.

3.2.2 Prinzip, Durchführung und Optimierung

Immunologische Nachweisverfahren basieren auf der Antigen-Antikörper-Reaktion, einer nichtkovalenten Assoziation zwischen Antigen (Ag) und Antikörper (Ak), die im thermodynamischen Gleichgewicht mit dem Massenwirkungsgesetz beschrieben werden kann. Das Verhältnis aus dem Komplex und dem Produkt der freien Reaktionspartner ergibt die Affinitäts- oder Bindungskonstante (K).



$$K = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[\text{Ak} - \text{Ag}]}{[\text{Ak}] \cdot [\text{Ag}]}$$

Gleichung 1

K:	Affinitätskonstante [L/mol]
k_a:	Assoziationskonstante der Immunkomplexes
k_d:	Dissoziationskonstante des Immunkomplexes
[Ak-Ag]:	Konzentration des Antigen-Antikörper-Komplexes [mol/L]
[Ak]:	Antikörperkonzentration [mol/L]
[Ag]:	Antigenkonzentration [mol/L]

Daraus folgt, dass im Gleichgewicht der Gehalt an Antigen durch das Verhältnis von gebundenem zu freiem Antigen bestimmt wird, wenn eine konstante Antikörperkonzentration vorliegt. Die Affinitätskonstante beschreibt somit die Stärke der Bindung eines Antikörpers an ein Antigen und ist für die erreichbaren Nachweisgrenzen des Assays von zentraler Bedeutung. Bei der Bindung können Coulomb- und Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrücken sowie hydrophobe Wechselwirkungen beteiligt sein (vgl. auch II 3.3.2). Diese nichtkovalenten Bindungskräfte sind wesentlich vom Abstand zwischen den interagierenden Gruppen bestimmt. Eine räumlich aufeinander abgestimmte Komplementärstruktur von antigener Determinante (Epitop) und der Bindungsstelle am Antikörper (Paratop) ist daher die Voraussetzung für eine stabile Bindung (Schlüssel-Schloss-Prinzip). Obige Gleichung basiert auf der Annahme einer monovalenten Wechselwirkung; das Zusammenwirken mehrerer Affinitäten (Avidität) durch Multivalenzen bei polyklonalen Antikörpern oder großen Antigenen wird dabei nicht berücksichtigt [175].

Es bestehen zahlreiche Testvarianten, die sich anhand von äußeren Merkmalen einteilen lassen. Beim heterogenen Immunoassay erfolgt eine Immobilisierung von Assaykomponenten an einer festen Phase, beim homologen Assay nicht. Dabei sind heterogene Tests, bei denen Mikrotiterplatten (MTP) als Festphase fungieren, am weitesten verbreitet (ELISA). Außerdem kann eine Klassifizierung anhand der verwendeten Markierungs- und Detektionsart erfolgen (vgl. II 3.2.1). Mechanistisch lassen sich Immunoassays in kompetitive und nichtkompetitive Tests einteilen. Findet eine Konkurrenzreaktion zwischen markierten und nicht markierten Analyten statt, so handelt es sich um einen kompetitiven Assay. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich der direkte und der indirekte kompetitive ELISA als Testformat verwendet, daher werden sie im Folgenden genauer beschrieben.

Beim direkten kompetitiven ELISA (vgl. Abbildung 10) wird zunächst der Antikörper auf der Oberfläche der MTP immobilisiert. Da die unspezifische Bindung des Antikörpers auf der Polystyrol-MTP durch Proteine im Serum oder Zellkulturüberstand erniedrigt sein kann, immobilisiert man oftmals vorher einen als Hilfsantikörper fungierenden anti-Kaninchen- bzw. anti-Maus-Antikörper auf der Platte, der den analytischen Antikörper spezifisch bindet und damit dessen gleichmäßige und stabile Bindung sicherstellt. Durch das Waschen der MTP zwischen den einzelnen Inkubationsschritten werden alle nicht gebundenen Antikörper entfernt. Es folgt die Analytzugabe, nach der gegebenenfalls vorinkubiert wird, um dem Analyten einen Vorsprung bei der Einstellung des Bindungsgleichgewichtes gegenüber dem Tracer, einem enzymmarkierten Analytmolekül, zu geben. Dann erfolgt mit der Tracerzugabe die eigentliche Konkurrenz um die Antikörperbindungsstellen zwischen Analyt und Enzymtracer. Nach Entfernung der ungebundenen Bestandteile durch erneutes Waschen folgt die Substratzugabe. In der Regel wird TMB als Substrat verwendet, das durch H_2O_2 unter Katalyse des Markerenzym Meerrettichperoxidase (POD) zu einem blauen Farbstoff reagiert. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von Schwefelsäure abgestoppt. Dabei wird die POD denaturiert und die blaue TMB-Radikalkation in das gelbe Diphenolchinondiimmoniumion umgesetzt, welches wesentlich stabiler ist und einen höheren Absorptionskoeffizienten aufweist [206]. Die Farbintensität des Produktes ist indirekt proportional zur Analytmenge.

Beim indirekten kompetitiven ELISA (vgl. Abbildung 11) wird zunächst ein proteingebundenes Analytmolekül, ein sog. Coating-Antigen, auf der MTP gebunden, da die direkte adsorptive Immobilisierung von kleinen Analyten (Haptenen) nicht möglich ist. Nach einem Waschschrift, bei dem nicht gebundene Coating-Antigene entfernt werden, erfolgt in der Regel ein Blockschrift, um nicht besetzte Bindungsstellen abzusättigen und damit eine mögliche unspezifische Adsorption zu unterbinden. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgt die Analyt- und Antikörperzugabe, welche die Konkurrenz um freie Antikörperbindungsstellen zwischen dem Analyten und dem Coating-Antigen einleitet. Nach Einstellung des Bindungsgleichgewichtes werden die analytgebundenen Antikörper durch Waschen entfernt. Die verbleibenden, an das Coating-Antigen gebundenen Antikörper, können mittels eines enzymmarkierten Sekundärantikörpers detektiert werden. Der Sekundärantikörper bindet an den F_c -Teil des analytspezifischen Antikörpers. Die Signalentwicklung erfolgt nach einem letzten Waschschrift mittels Substratzusatz analog zum beschriebenen direkten ELISA.

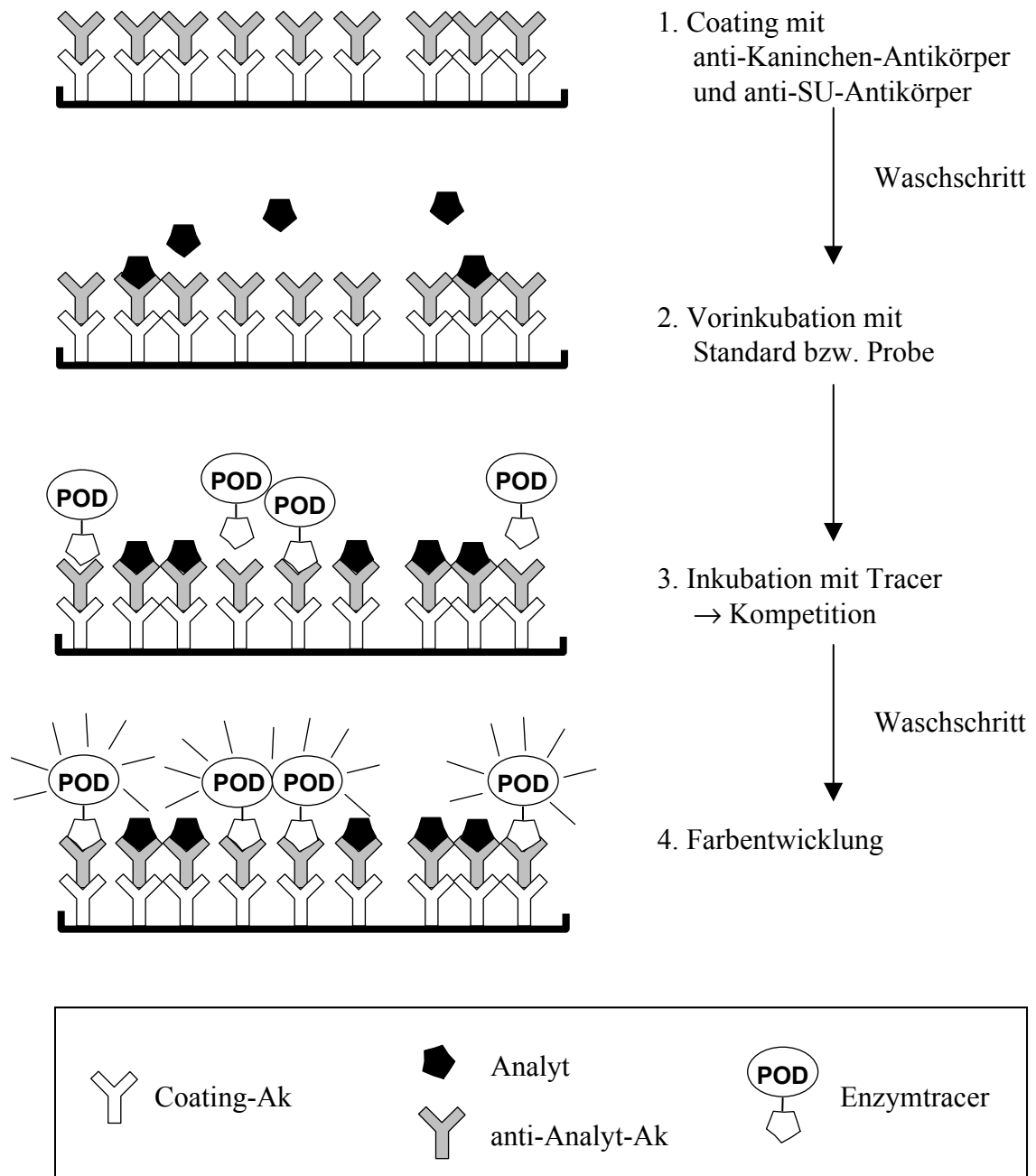


Abbildung 10: Prinzip des direkten kompetitiven ELISAs.

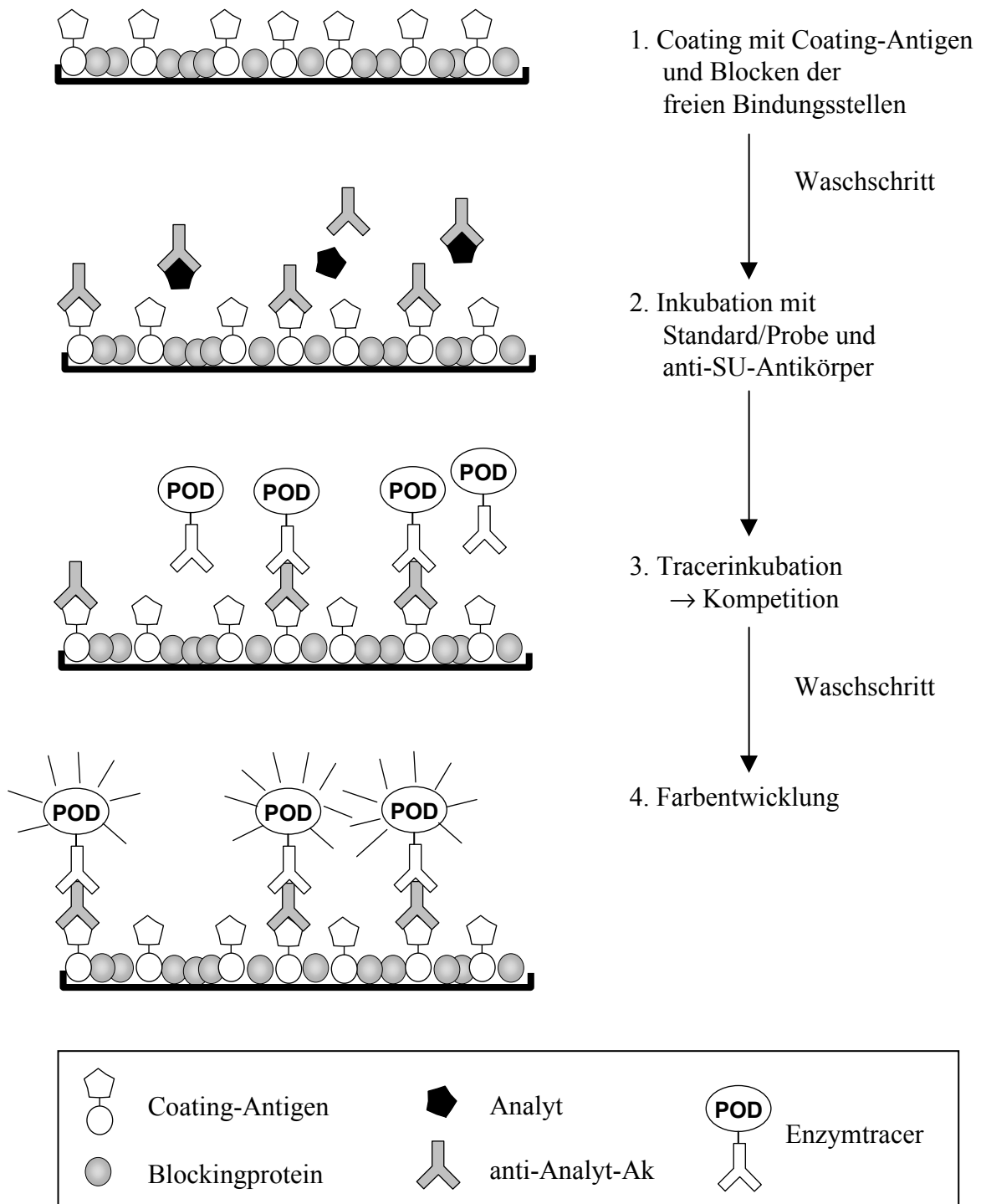


Abbildung 11: Prinzip des indirekten kompetitiven ELISAs.

3.2.3 Auswertung

Die Auswertung der ELISA-Rohdaten erfolgt durch eine halblogarithmische Auftragung der Analytkonzentration gegen die Absorptionsmesswerte. Es resultiert eine sigmoide Kalibrierkurve, die nach RODBARD durch folgende vier Parameter beschrieben werden kann: Der maximalen bzw. minimalen Absorption, dem Testmittelpunkt und der Steigung im Testmittelpunkt [207]. Sie dient zur Berechnung von Analytkonzentrationen aus den Messwerten.

$$Y = \frac{(A - D)}{\left[1 + \left(\frac{X}{X_0} \right)^B \right]} + D \quad \text{Gleichung 2}$$

Y:	Absorption [a.u.]
A:	Maximale Absorption (obere Asymptote) [a.u.]
D:	Minimale Absorption (untere Asymptote) [a.u.]
X:	Analytkonzentration [$\mu\text{g/L}$]
X₀:	Testmittelpunkt (50%-Wert) [$\mu\text{g/L}$]
B:	Steigung im Testmittelpunkt

Der Testmittelpunkt (IC₅₀) oder Wendepunkt der sigmoiden Kurve (Parameter X₀), gibt die Analytkonzentration bei 50% Inhibition wieder. Er dient zur Charakterisierung der Sensitivität des Testsystems. Der lineare Bereich der Kalibrierkurve um den Testmittelpunkt liefert den Messbereich, innerhalb dessen eine Quantifizierung möglich ist. Üblicherweise grenzt man ihn durch die Analytkonzentrationen bei 20% und 80% der Absorption ein. Der Bereich ist aber stark von der Form der Kalibrierkurve abhängig. Die Nachweisgrenze wird durch den Mittelwert des Blankwertes (Nullwertes einer unbelasteten Probe) abzüglich seiner dreifachen Standardabweichung definiert, die Bestimmungsgrenze, ab der eine Quantifizierung statistisch sinnvoll ist, abzüglich seiner sechsfachen Standardabweichung.

Um Kalibrierkurven mit abweichender Signalintensität vergleichen zu können, werden sie auf übereinstimmende obere und untere Asymptoten normiert. Die Normierungskalkulation beschreibt Gleichung 3.

$$Y_N = \frac{(Y - D)}{(A - D)} \cdot 100\% \quad \text{Gleichung 3}$$

Y_N:	Normierte Absorption [%]
-----------------------	--------------------------

3.2.4 Affinitätskonstanten

Die Affinitäts- oder Gleichgewichtskonstante einer Analyt-Antikörper-Bindung ist ein wichtiger Parameter zur Charakterisierung des Antikörpers, da sie Aufschluss über die maximale Empfindlichkeit im ELISA-Testsystem gibt. Sie liegt meist im Bereich von 10^4 bis 10^{10} L mol⁻¹ [175] und kann mittels verschiedener Methoden bestimmt werden. Eine etablierte Methode ist die Berechnung mit einer Scatchard-Transformation, bei der die Rohdaten meist in einem kompetitivem Radioimmunoassay gewonnen werden, indem man verschiedene bekannte Mengen an Antigen ins Verhältnis zu einer konstanten Konzentration an radiomarkiertem Antigen setzt [208]. Von WELLER wurde eine Methode zur Abschätzung der Affinitätskonstante anhand des kompetitiven ELISAs entwickelt [209]. Aus dem Massenwirkungsgesetz lässt sich ableiten, dass die Affinitätskonstante lediglich vom Testmittelpunkt abhängig ist, wenn Antikörper- und Tracerkonzentration in einer Grenzbetrachtung gegen Null gehen. Es gilt dann folgender Zusammenhang:

$$K = \frac{1}{X_0 \text{ (min)}} \quad \text{Gleichung 4}$$

K: Affinitätskonstante
X₀ (min): Minimaler Testmittelpunkt; Grenzbetrachtung bei [Ak] → 0 und [Tracer] bzw. [Coating-Antigen] → 0

Experimentell lässt sich dies durch sequentielle Verdünnung von Tracer- und Antikörperkonzentration bis zum minimalen Testmittelpunkt X₀ (min) erreichen. Bei sehr hohen Antikörperaffinitäten kann mit dieser Methode jedoch nur eine Mindestaffinität ermittelt werden, da sie durch die Nachweisstärke des Tracers begrenzt ist.

Andere Messverfahren zielen auf unterschiedliche physikalische Eigenschaften des Analyt-Antikörper-Komplexes und seiner Liganden ab. Neben spektroskopischen Methoden haben sich in den letzten Jahren besonders Sensorsysteme, die z.B. auf der Surface-Plasmon-Resonanz basieren, etabliert. Hier wird ein indirekter Assay auf einem Chip durchgeführt, bei dem die Affinitätskonstante der Coating-Antigen-Antikörper-Bindung über eine Brechungsindex-Messung anhand der Änderung der Schichtdicke ermittelt wird [210-212].

3.2.5 Kreuzreaktivitäten

Mit der Kreuzreaktivität lässt sich die Selektivität eines Antikörpers beschreiben. Man spricht allgemein dann von Kreuzreaktivität, wenn verschiedene Analyten eine Bindungsstelle desselben Antikörpers oder Rezeptors besetzen können und zu ihr eine messbare Affinität aufweisen. ABRAHAM definierte die Kreuzreaktivität (Crossreactivity, CR) als den Quotienten der Testmittelpunkte des Referenzanalyten X₀ (Referenz) und der kreuz-

reagierenden Substanz X_0 (Testsubstanz) [213]. Sie wird in Prozent angegeben (vgl. Gleichung 5). Die Auswahl des Referenzanalyten erfolgt willkürlich. Die Erstellung der Kalibrierkurven muss parallel auf einer MTP unter optimierten Bedingungen erfolgen, um repräsentative Werte für die Kreuzreaktivitäten zu erhalten.

$$\text{CR} = \frac{X_0 \text{ (Referenz)}}{X_0 \text{ (Testsubstanz)}} \cdot 100\% \quad \text{Gleichung 5}$$

- CR:** Kreuzreaktivität [%]
 X_0 (Referenz): Testmittelpunkt des Referenzstandards [$\mu\text{g/L}$]
 X_0 (Testsubstanz): Testmittelpunkt der Testsubstanz [$\mu\text{g/L}$]

Bei Verwendung von molaren Konzentrationen erhält man die entsprechende molare Kreuzreaktivität, die für die Diskussion von Struktur-Wirkungsbeziehungen von Bedeutung ist. Eine alternative Bestimmung der Kreuzreaktivität anhand der Affinitätskonstanten (K) beschrieben JOHNSTON und EISEN [214]:

$$\text{CR} = \frac{K \text{ (Testsubstanz)}}{K \text{ (Referenz)}} \cdot 100\% \quad \text{Gleichung 6}$$

- CR:** Kreuzreaktivität [%]
 K (Referenz): Affinitätskonstante des Referenzstandards [$\mu\text{g/L}$]
 K (Testsubstanz): Affinitätskonstante der Testsubstanz [$\mu\text{g/L}$]

BERZOFKY und SCHLECHTER unterscheiden zwischen zwei Arten der Kreuzreaktivität. Typ 1 entspricht der obigen Definition und wird als „tatsächliche Kreuzreaktivität“ bezeichnet. Typ 2 beschreibt zusätzlich die Heterogenität der Antikörperpopulation in polyklonalen Seren und wird als „Shared-Reactivity“ bezeichnet [215]. Damit wird der Tatsache Rechnung getragen, dass einzelne Antikörperpopulationen im polyklonalen Serum unterschiedliche Antigendeterminanten erkennen bzw. auch verschiedene Affinitäten zu einer Antigendeterminante aufweisen können und es damit zu Überlagerungen im Kreuzreaktionsmuster kommen kann.

Das Kreuzreaktionsmuster eines Antikörpers gibt damit dessen Fähigkeit wieder, verschiedene Analyten zu binden. Meist handelt es sich dabei um strukturell ähnliche Verbindungen. Beeinflusst wird die Erkennung durch sterische und elektronische Effekte von ganzen Molekülen oder einzelnen Molekülteilen. Werden vom Antikörper Molekülstrukturen erkannt, die bei verschiedenen Analyten vorliegen, so ist die Kreuzreaktivität in der Regel größer, als wenn das gesamte Analytmolekül zur Erkennung beiträgt.

Je nach Anwendung ist ein selektiver, monovalenter Antikörper oder ein breitbandiger, gruppenspezifischer Antikörper erwünscht. Für quantitative Immunoassays ist eine hohe Selektivität wünschenswert, da nur so sichergestellt werden kann, dass das Signal allein auf den Targetanalyten zurückzuführen ist. Allerdings finden auch gruppenspezifische Breitbandantikörper in Screeningassays Anwendung, die Summenparameter liefern. Von SPRINKS wurden beispielsweise Versuche zur gezielten Herstellung von multivalenten Antikörpern beschrieben [216].

3.3 Immunoaffinitätschromatographie (IAC)

3.3.1 Entwicklung und Prinzip

In der Biochemie ist seit den 1960er Jahren die Verwendung von Antikörpern zur immunoaffinitätschromatographischen Isolierung von Proteinen und Peptiden bekannt. Ab Mitte der 1980er Jahre wurde zunehmend von Anwendungen dieser Immunextraktionstechnik für die Rückstandsanalytik von kleineren Molekülen, wie Tierarzneimittelrückständen und Mycotoxinen in Lebensmitteln, berichtet. In den 1990er Jahren folgten schließlich erste Applikationen zur Anreicherung von Pestiziden aus Umweltmatrices [217-222].

Die Voraussetzung für die Herstellung von Immunadsorbentien ist, wie bei immunologischen Nachweismethoden, die Verfügbarkeit geeigneter Antikörper. Diese werden zunächst mittels Affinitätsmedien (v.a. Protein A oder G) aus dem Serum oder aus dem Zellkulturüberstand isoliert. Anschließend folgt die Bindung der Antikörper an ein geeignetes Trägermaterial. Gebräuchlich ist hier die kovalente Bindung an Agarose-, Cellulose- oder Acryl-Gele und Silikatmaterialien. Seit Anfang der 1990er Jahre ist außerdem eine Methode bekannt, bei der Biomoleküle nichtkovalent mittels der Sol-Gel-Technik in eine Glas-Matrix immobilisiert werden.

Das Funktionsprinzip der Immunoaffinitätschromatographie (vgl. Abbildung 12) beruht auf der reversiblen Bindung von Targetmolekülen an die immobilisierten Fängerantikörper. Durch anschließendes Waschen der Säule können Matrixbestandteile entfernt werden, so dass neben einer Anreicherung auch eine Voraufreinigung der Probe erzielt wird.

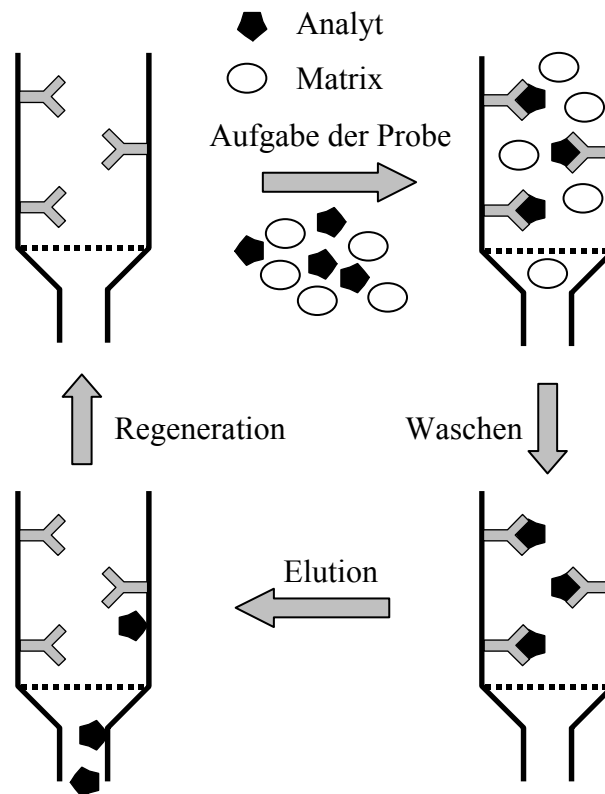


Abbildung 12: Prinzip der Immunoaffinitätschromatographie

Die Bindungskapazitäten der Adsorber können anhand der eingesetzten Antikörpermenge gesteuert werden. Die Desorption der gebundenen Analyten erfolgt mittels chaotroper Reagenzien, mizellarer Lösungen, immunselektiven, sauren bzw. basischen Puffern oder organischen Lösungsmitteln. Neben der einfachen Regenerierbarkeit sind Stabilität und Nutzungsdauer des Immunadsorbens von entscheidender Bedeutung.

3.3.2 Antikörper-Analyt-Wechselwirkungen in der IAC

Die Antikörper-Analyt-Wechselwirkungen sind in der IAC für die Bindung und Elution der Analyten von zentraler Bedeutung. Die vier auftretenden intermolekularen Wechselwirkungen sind elektrostatische Anziehung (Coulomb-Kräfte), Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräfte [175]. Coulomb-Kräfte wirken zwischen entgegengesetzt geladenen Gruppen, wie z.B. Amino- und Carboxylgruppen. Die Anziehungskraft (F) ist dem Quadrat des Abstandes zwischen den Ladungen umgekehrt proportional:

$$F \approx \frac{1}{(\epsilon \cdot d)}$$

Gleichung 7

- F:** Coulomb'sche Anziehungskraft zwischen zwei entgegengesetzt geladenen Teilchen [m kg s⁻¹]
- ε:** Dielektrizitätskonstante [A s V⁻¹ m⁻¹]
- d:** Abstand der punktförmigen Ladungen [m]

Damit nimmt die Anziehung erheblich zu, wenn Ladungen auf Antigen und Antikörper sich nähern. Lösungsmittel mit niedriger Dielektrizitätskonstante (ε) führen zudem zu einer Erhöhung der Bindungsenergie. Dabei weist Wasser eine sehr hohe Dielektrizitätskonstante von 80 auf, die durch Salzzusatz noch gesteigert werden kann. Organische Lösungsmittel besitzen eine niedrigere Dielektrizitätskonstante, wie beispielsweise ACN mit etwa 38 [223], welches eine gegenüber Wasser mehr als doppelt so große Bindungsenergie erzeugt. Coulomb-Kräfte haben eine relativ große Reichweite von bis zu 100 Å und sind neben den Van-der-Waals-Kräften primär für die Spezifität der Bindung verantwortlich.

Van-der-Waals-Kräfte sind induzierte Dipolwechselwirkungen zwischen unpolaren Gruppen. Obwohl es sich dabei um nur schwache elektrostatische Wechselwirkungen handelt, sind sie aufgrund ihrer Reichweite von 100 bis 1000 Å von Bedeutung [224]. Da ihre Anziehungskraft umgekehrt proportional zur siebten Potenz des Abstandes ist, steigt die Kraft rasch an, wenn sich die beteiligten Moleküle annähern.

$$F \approx \frac{1}{d^7}$$

Gleichung 8

- F:** Van-der-Waals-Kräfte [m kg s⁻¹]
- d:** Abstand der Moleküle [m]

Daneben können auch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen hydrophilen Gruppen (Hydroxyl-, Amino- oder Carboxylgruppen) an der Bindung zwischen Antigen und Antikörper beteiligt sein. Ihre Reichweite ist mit bis zu 5 Å sehr kurz und ihr Auftreten bei Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen dadurch begrenzt, dass im wässrigen Medium bevorzugt Wasserstoffbrücken zwischen den Proteinen und den umgebenden Wassermolekülen gebildet und damit die Protein-Protein-Wechselwirkungen inhibiert werden. Dennoch tragen sie nach dem Zustandekommen einer Bindung zwischen Antigen und Antikörper oft erheblich zu deren Gesamtbindungsstärke bei.

Hydrophobe Interaktionen gelten als sekundäre Bindungen, die dafür sorgen, dass bereits über primäre Bindungen, wie Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Kräfte, verknüpfte Proteinmoleküle, durch die Verdrängung von Wasser beträchtlich verstärkt werden [225]. Sie machen einen Großteil der Gesamtstärke von Antigen-Antikörper-Bindungen von schätzungsweise bis zu > 50% aus und treten zwischen hydrophoben Gruppen, wie den Seitenketten von Valin, Leucin und Phenylalanin, auf. Der resultierende Entropiegewinn wird durch die thermodynamisch vorteilhafte Wasserverdrängung aus der Bindungsstelle erzielt.

Eine weitere wichtige Interaktion erfolgt zwischen konjugierten π -Elektron-Systemen von aromatischen Analyten und Kationen im Bindungsbereich des Antikörpers. Diese Wechselwirkungen, die besonders bei Mehrsystemen wie PAHs eine große Bedeutung haben, können im Fall der Sulfonylharnstoffe insbesondere bei deren Benzylderivaten auftreten [226].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle Bindungsarten erst bei starker Annäherung der beiden Moleküle wirksam und durch die Wasserverdrängung zwischen den Proteinen verstärkt werden. Entscheidend ist dabei die möglichst große räumliche Komplementarität der Elektronenwolken an der Bindungsstelle des Antikörpers und an der Antigen-Bindungsstelle, die eine enge Annäherung ermöglicht. Je größer die Fläche ist, auf der Antigen und Antikörper zusammenpassen, desto größer ist die Anziehungskraft, vor allem wenn sich zusätzlich entgegengesetzte Ladungen und hydrophobe Gruppen genau gegenüberstehen. Man spricht auch vom Schlüssel-Schloss-Prinzip, welches bereits 1894 von FISCHER für Enzyme beschrieben wurde [227].

Da das Zusammenwirken der beschriebenen Bindungsmechanismen außerdem zeitabhängig ist, d.h. die Intensität der Bindung durch die langsame Ausbildung von sekundären Bindungskräften nach mehreren Stunden und Tagen noch zunehmen kann, ist es für die IAC von Vorteil, wenn die Kontaktzeiten möglichst kurz gehalten werden, um das Antigen mit möglichst sanften Methoden vom Antikörper lösen zu können. Für den ELISA bedeutet dies wiederum, dass bestimmte Mindestzeiten notwendig sind, um ein stabiles Bindungsgleichgewicht zu erzielen. Die physikalischen und chemischen Möglichkeiten, mit denen Antigen-Antikörper-Bindungen kontrolliert werden können, sind vielfältig und ihr Zusammenwirken noch nicht abschließend geklärt. Tabelle 7 gibt einen schematischen Überblick über die Wechselwirkungen. Die entsprechenden Auswirkungen auf das Anreicherungs- und Elutionsverhalten in der IAC werden in Kapitel II 3.3.5 beschrieben.

Tabelle 7: Wichtige Antigen-Antikörper-Bindungsarten und Möglichkeiten zu deren Beeinflussung durch das umgebende Medium [224].*

Wechselwirkung	Coulomb	Van-der-Waals	H-Brücken	Hydrophobe
Reichweite	mittel: 100 Å	100 –1000 Å	kurz: 1.5 –5 Å	kurz
Signifikanz für Bindungsspezifität	+++	++	+	-
Signifikanz für Bindungsstärke		++	+	++
Extremer pH-Wert	↓↓			
Ionenstärke ↑	↓		↑	
Oberflächenspannung ↓		↑ oder ↓		
Dehydratisierungsreagenzien ↑	↑	↑	↑	
Chaotrope Salze ↑	↓		↓↓	
Temperatur ↑	↓	↑ oder ↓	↑	
Reaktionszeit ↑		↑	↑	↑↑

* π -Elektron-Kation-Wechselwirkungen stellen eine weitere wichtige Antigen-Antikörper-Interaktion dar.

3.3.3 Trägermaterialien in der IAC

Für das Anwendungsspektrum von Immunadsorbentien sind neben der Eignung der Antikörper auch die Eigenschaften des Trägermaterials von Bedeutung. Neben einer effizienten Immobilisierungsmöglichkeit für den Antikörper, sollte das Immunosorbens mechanische, physikalische und chemische Stabilität bieten, gutes Fließverhalten aufweisen und keine unspezifische Bindung zu den Analyten zeigen. Besonders für On-line-Anwendungen ist zudem eine hohe Druckstabilität erforderlich [228].

Als Trägermaterial in der IAC werden traditionell vor allem Polysaccharide, wie Agarose oder Cellulose, eingesetzt [229]. Daneben finden auch synthetische Polymere, wie Polyacrylamide, Polymethacrylate und Polyethersulfone sowie deren Derivate (z.B. Hydroxyethylmethacrylat (HEMA)), breite Anwendung. Es wird mittlerweile eine Vielzahl von kommerziellen Produkten speziell für die IAC angeboten (vgl. Tabelle 8) [230]. Darunter finden sich Trägerbeads, die noch einer Aktivierungsreaktion unterzogen werden müssen, und solche, die bereits aktiviert bezogen werden können. Die Supports sind vor allem für die Off-line-Anreicherung geeignet, da sie bei hohen Flussraten bzw. hohem Druck nur

begrenzt stabil sind. Für On-line-Anwendungen wurden daher Supports auf der Basis von derivatisierten Silikaten (Kieselgelen), Glasträgern (Controlled Pore Glas (CPG)) [231], Polystyrol- oder Azlacton-Materialien entwickelt, die eine höhere Stabilität aufweisen. Die Anwendung von Antikörpern für die Anreicherung in der HPLC wird als High-Performance Immunoaffinity Chromatography (HPIAC) bezeichnet [219]. Ein relativ neues Material zur Immobilisierung von Antikörpern ist Sol-Gel-Glas [232, 233], welches auch im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde und auf das in Kapitel II 5 ausführlich eingegangen wird.

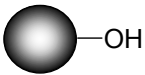
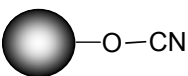
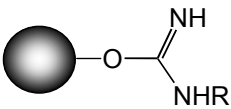
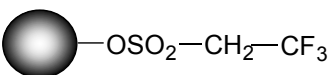
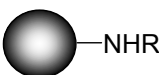
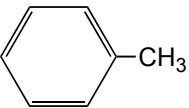
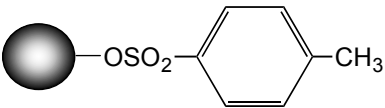
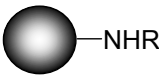
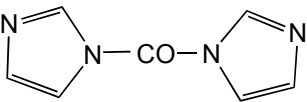
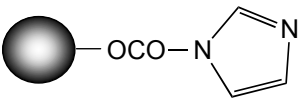
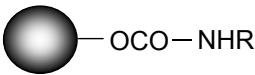
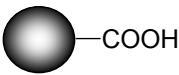
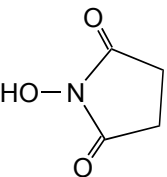
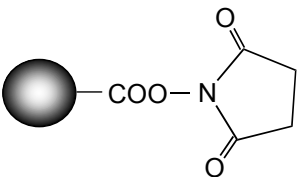
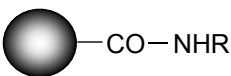
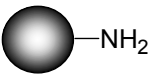
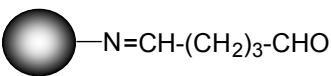
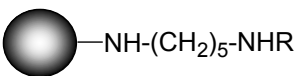
Tabelle 8: Wichtigste Trägermaterialien für die IAC.

Material	Struktur	Eigenschaften
Agarose (Sepharose)	β -D-Galactose und 3,6-Anhydro- α -L-Galactose, alternierend 1,3- und 1,4-verknüpft; Modifizierung durch Quervernetzung der Polysaccharidketten mit Epichlorhydrin oder Divinylsulfon möglich	hochporös, hydrophil, begrenzte Stabilität; nicht druckbeständig
Polyacrylamid	Acrylamide/N,N'-Methylen-Diacrylamid-Copolymere	hydrophil, stabil
Hydroxyethylmethacrylate (HEMA)	Hydroxyethylmethacrylat/Ethylendimethylmethacrylat-Copolymere	druckstabil, verschiedene Porengrößen generierbar
Copolymere mit Azlacton-Ketten	HEMA oder Silicagele mit Azlacton-Tentakeln an der Oberfläche	hydrophile Oberfläche; sterische Hinderung möglich
Copolymere mit Epoxy-Ketten	HEMA oder Silicagele mit Epoxid-Tentakeln an der Oberfläche	hydrophile Oberfläche; sterische Hinderung möglich
Modifizierte Silicagele	Einführung hydrophiler Oberflächen durch Umsetzung mit 3-Glycidyoxypropyl-trimethoxysilan	druckstabil, hydrophil modifiziert
Controlled Pore Glass (CPG)	Oberflächenmodifizierte Silica-Materialien, gewonnen aus Borsilikatgläsern nach Phasenseparation bei hohen Temperaturen und Auswaschen der Borsäurephase mit Säuren und anschließender Oberflächenbehandlung	einheitliche, monodisperse Porenverteilung; druckstabil

3.3.4 Immobilisierung der Antikörper

Für die Immobilisierung von Antikörpern wurden zahlreiche Methoden beschrieben. Weit verbreitet ist die kovalente Bindung von Antikörpern über deren freie Aminogruppen an das Trägermaterial [234, 235]. Die Supports werden dafür zunächst einer Aktivierungsreaktion unterzogen. Diese kann mittels Bromcyan, Sulfonylchlorid, N, N'-Carbonyldiimidazol, N-Hydroxysuccinimid oder Glutardialdehyd erfolgen:

Tabelle 9: Beispiele für Kopplungsreagenzien. (A) Bromcyan, (B) Tresylchlorid, (C) Tosylchlorid, (D) Carbonyldiimidazol, (E) N-Hydroxysuccinimid, (F) Glutardialdehyd. Aktivierte Trägermaterialien und Kopplungsprodukte der jeweiligen Reaktion mit Aminogruppen am Antikörper (R).

Kopplungsreagenz	Aktivierter Träger	Kopplungsprodukt
Reaktion mit Hydroxylgruppen am Trägermaterial 		
(A) CNBr		
(B) Cl-SO ₂ -CH ₂ -CF ₃		
(C) Cl-SO ₂ -  -CH ₃		
(D) 		
Reaktion mit Carboxylgruppen am Trägermaterial 		
(E) 		
Reaktion mit Aminogruppen am Trägermaterial 		
(F) CHO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CHO		

Die neu eingeführten funktionellen Gruppen ermöglichen eine Reaktion mit dem Antikörper und besitzen auch eine Spacerfunktion, die verhindert, dass sich die Antikörper bei der Kopplung gegenseitig sterisch behindern. Die Reaktion über Aminogruppen am Antikörper stellt eine sehr einfache Methode dar, hat aber den Nachteil, dass aufgrund der ungerichteten Kopplungsreaktion, bei der die Orientierung der Antikörper dem Zufall unterworfen ist, auch inaktive (z.B. Kopplung über die variable Domäne) und partiell aktive immobilisierte Antikörper auftreten. Daher wird die Ausgangsaktivität durch die Immobilisierung vermindert.

Antikörper oder Antikörperfragmente können auch durch eine gerichtete kovalente Bindung über weitgehend definierte Kopplungsstellen am Antikörper immobilisiert werden. Damit kann gesteuert werden, dass die eigentlichen Antigen-Bindungsstellen für die Antigenerkennung weiter zur Verfügung stehen und kaum Aktivität verloren geht. Die Aktivierung erfolgt hierbei über Divinylsulfon, Epoxide, Acetylbromid bzw. -iodid, Maleinsäureamid oder TNB-Thiol. Auch eine Kopplung mittels Sulfonylchlorid kann gerichtet erfolgen, wenn eine Bindung an die Thiolgruppen des Antikörpers forciert wird. Eine weitere Methode der gerichteten Immobilisierung ist eine Kopplung der Antikörper über ihre Kohlenhydratreste. Dafür werden diese Reste mittels Natriumperiodat oder unter milderer Bedingungen enzymatisch zu Aldehyden oxidiert, die dann mit aktiven Hydrazid- oder Aminogruppen am Trägermaterial reagieren können. Diese aldehydaktivierten Kohlenhydratreste können zudem durch Reaktion mit Biotin-Hydrazid nichtkovalent an Streptavidin-Träger immobilisiert werden.

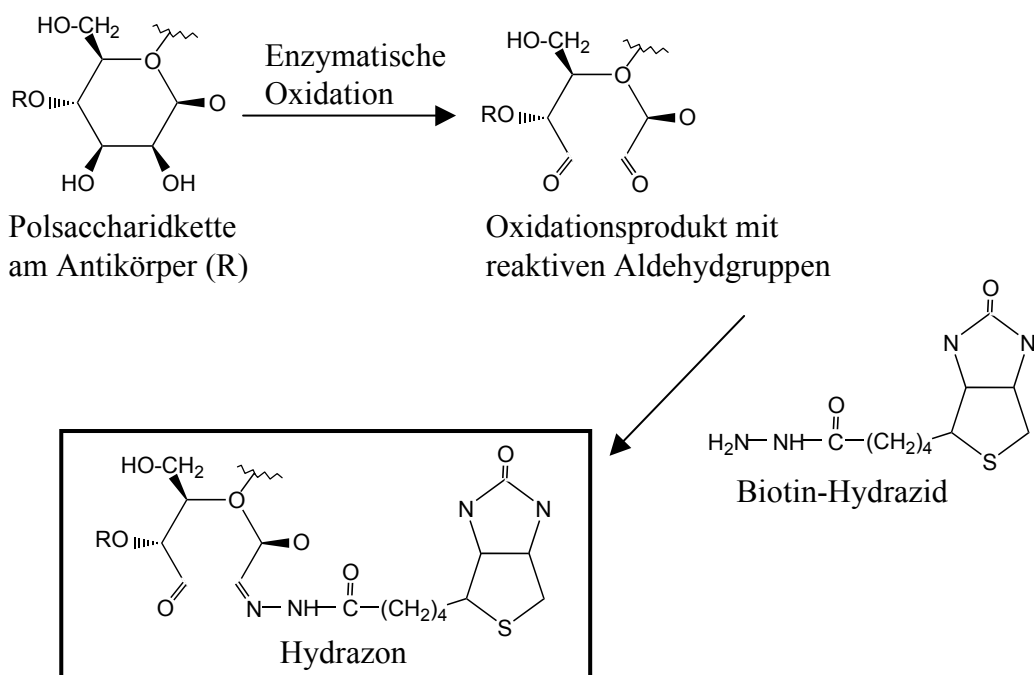


Abbildung 13: Gerichtete Immobilisierung von Antikörpern über Biotin-Hydrazid.

Ein weiteres Beispiel für eine nichtkovalente Immobilisierung stellt die Adsorption von Antikörpern an einen sekundären Liganden wie die Proteine A oder G dar [236]. Diese beiden Proteine werden aus der Zellwand von Bakterien gewonnen und besitzen die Fähigkeit, die F_c-Region vieler Antikörpertypen zu binden. Unter physiologischen Bedingungen ist diese Bindung relativ stabil, kann aber mit Elutionslösungen von niedrigem pH-Wert leicht gelöst werden.

3.3.5 Anreicherung und Elution in der IAC

Die vorausgehend beschriebenen Bindungseigenschaften von Antigen-Antikörper-Komplexen (vgl. II 3.3.2) belegen, dass die optimalen Bedingungen für diese Assoziation bei neutralem pH-Wert und geringer bis moderater Ionenstärke gegeben sind. Für die chromatographische Nutzung von Antikörpern ist die reversible Bindung der Antigene von zentraler Bedeutung. Dafür müssen Elutionsbedingungen geschaffen werden, die zur Dissoziation der Antigen-Antikörper-Bindung führen, jedoch den Antikörper nicht irreversibel schädigen, so dass eine Wiederbeladung der IAC-Säule möglich ist. Die geeigneten Elutionsbedingungen sind letztlich stark von den Eigenschaften der einzelnen Antikörper abhängig und müssen empirisch ermittelt werden. Neben der Art der Wechselwirkung spielt dabei vor allem die Affinitätskonstante eine Rolle. Da sie bei polyklonalen Antikörpern i.d.R. höher liegt als bei monoklonalen, benötigen erstere oftmals drastischere Elutionsbedingungen. Um einen hohen Anreicherungsfaktor zu erzielen, sollte das Elutionsvolumen zudem möglichst gering gehalten werden. Weiterhin hängt die Wahl des geeigneten Desorptionsmittels auch von den Eigenschaften des Antigens, besonders von dessen Ladung und Polarität, ab. Da die verschiedenen Einflussgrößen vielfältig und in der Summe nicht vorhersehbar sind, muss die Optimierung in der Praxis letztlich durch empirische Versuche erfolgen.

Als erfolgreiche Eluenten haben sich dabei Reagenzien erwiesen, die chaotrope Ionen, hohe Ionenstärken, denaturierende Agenzien oder organische Lösungsmittel enthalten bzw. einen extremen pH-Wert aufweisen [237, 238]. Außerdem wurden auch physikalische Elutionstechniken, wie Temperatur- [239] oder Druckerhöhung [240] sowie elektrophoretische Verfahren [237] erfolgreich eingesetzt.

Eine Änderung des pH-Wertes mittels Pufferlösungen beeinflusst vor allem die elektrostatischen Wechselwirkungen. Dort, wo die Reduktion des pH-Wertes auf 2 bis 3 nicht für eine Desorption ausreicht, spielen offenbar hydrophobe Wechselwirkungen eine wichtige Rolle. Eingesetzt werden für niedrige pH-Werte überwiegend Glycin/HCl-Puffer, Essig- und Propionsäure. Seltener finden Glycin/NaOH-Puffer oder Ethanolamin im pH-Bereich von 10 bis 11 Anwendung.

Die Anionen chaotroper Salze besitzen die Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen zu lösen und indirekt hydrophobe Wechselwirkungen zu schwächen. Ein vielfach eingesetztes destabilisierendes Reagenz ist Thiocyanat in hohen Konzentrationen (3 M). Allerdings kommt es dabei häufig zur Denaturierung des Antikörpers [241]. Die Stärke verschiedener chaotroper Anionen nimmt in der Reihenfolge $\text{SCN}^- > \text{J}^- > \text{ClO}_4^- > \text{Cl}^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{PO}_4^{3-}$ ab [238].

Eine sehr milde Elutionstechnik stellt die Veränderung der Ionenstärke dar. Sie ist in der Praxis jedoch meist zu ineffizient. Lediglich MgCl_2 und CaCl_2 zeigten ausreichende Effekte, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass hier eine Kombination von drei verschiedenen Einflüssen (erhöhte Ionenstärke, milder chaotroper Effekt, schwache Reduzierung des pH-Wertes) zusammentreffen. Eine Mischung aus MgCl_2 und Ethylenglykol wurde ebenfalls erfolgreich eingesetzt [242].

Denaturierende Agenzien, wie Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid, können bei Antikörpern hoher Affinität eine Desorption des Antigens bewirken, führen jedoch häufig auch zu dessen irreversibler Denaturierung.

Mischungen aus organischen Lösungsmitteln und Wasser sind oft dort das Mittel der Wahl, wo andere Elutionslösungen nicht zum Ziel geführt haben. Ihr Einfluss ist u.a. auf die Polaritätsänderung zurückzuführen, welche jedoch stark vom jeweiligen Antikörper-Antigen-System abhängig ist. Ethylenglykol und DMSO finden häufig Anwendung, da sie Proteine nur in sehr hohen Konzentrationen denaturieren [243]. Methanol oder ACN werden oft dort eingesetzt, wo sie auch bei der anschließenden HPLC-Analytik als mobile Phase dienen.

Letztlich führen jedoch oft nur Mischreagenzien, die gleichzeitig verschiedene Desorptionseffekte erzeugen, zum Ziel [244], besonders dann, wenn milde Bedingungen erwünscht sind. Berichtet wurde weiterhin auch von sog. Displacereaktionen [245-247], bei denen analytähnliche Moleküle mit hoher Affinität zum Antikörper die Bindungsstellen besetzen und dadurch die weniger affinen Analyten aus der Antikörperbindung verdrängt werden. Dies setzt jedoch Antikörper mit entsprechendem Affinitätsverhalten voraus und macht eine Regeneration des Trägers oft unmöglich.

3.3.6 Anwendungen der IAC

Wie immunologische Analysemethoden allgemein, so werden auch IAC-Applikationen schwerpunktmäßig im medizinischen Bereich eingesetzt [248-250]. Dennoch hat die Zahl der Anwendungen in der Lebensmittel- und Umweltanalytik in den letzten Jahren signifikant zugenommen [251, 252]. Wichtige Einsatzgebiete sind die Spurenanalytik von verschiedensten Pharmazeutika [253, 254], Anabolika und Dopingmitteln [255-258],

Hormonen [259] und endokrin wirksamen Substanzen [259] sowie von Tierarzneimittelrückständen [260]. Die klassischen Zielanalyten für die IAC von Lebensmittelproben sind vor allem Mykotoxine [261-263]. Zunehmend werden aber auch Supports für die Pestizid-anreicherung entwickelt [264-266]. Für die Analytik von Pestiziden in Umweltproben wurden bisher vor allem IAC-Säulen entwickelt, die polyklonale Antikörper enthalten, welche Atrazine und Phenylharnstoffe erfassen und kovalent an Sepharose- oder Silikat-Träger immobilisiert sind [267-275], wobei letztere auch für On-line-Anreicherungen geeignet sind. Für SUs wurden ebenfalls IACs mit kovalent an Agarose- bzw. Sepharose-Adsorbentien gekoppelten polyklonalen Antikörpern beschrieben. Diese wurden zur Anreicherung von Triasulfuron [276] und Chlorimuron-ethyl [277] aus Bodenproben verwendet. Ähnliche Applikationen sind auch für andere Umweltkontaminanten, wie PAHs [278-282], Dioxine und Furane [283] sowie Algentoxine [284] publiziert worden. IAC-Supports auf Sol-Gel-Glas-Basis setzte man ebenfalls erfolgreich zur Anreicherung von verschiedenen polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffverbindungen [285-289] und Triazin-Herbiziden [290] in Umweltproben sowie im Biomonitoring ein (vgl. auch Kapitel II 5).

Die Vorteile von immunochromatographischen Methoden liegen darin, dass sie gegenüber herkömmlichen SPE-Materialien eine höhere Selektivität für einzelne Verbindungen oder Analytgruppen aufweisen und daher Matrixbestandteile oft effektiver beseitigt werden können. Die Schwierigkeit der Methode liegt jedoch in der aufwändigen Produktion von geeigneten Antikörpern sowie deren höheren Empfindlichkeit gegenüber Umwelteinflüssen und Reagenzien. Da sich die IAC jedoch auch für die On-line-Kopplung an automatisierte chromatographische Systeme als geeignet erwiesen hat, ist sie besonders in Verbindung mit spezifischen Detektions- und Bestimmungsmethoden, wie der LC-UV oder LC-MS(/MS), ein interessantes Analysetool, welches den Zeitaufwand für die Probenvorbereitung stark reduziert [291-297]. In Kombination mit der Tandem-MS-Detektion kann dabei außerdem eine hohe Analysensicherheit erzielt werden [256, 258, 298].

4 MS und MS/MS

Die Massenspektrometrie ist ein molekulanalytisches Verfahren, bei dem Ionen aufgrund ihres Masse/Ladung-Verhältnisses getrennt werden. Bereits 1922 erhielt ASTON den Nobelpreis für den massenspektrometrischen Nachweis von 212 natürlich vorkommenden Isotopen. Dennoch wurden bis in die 1950er Jahre lediglich selbstentwickelte Massenspektrometer benutzt. Die größte Bedeutung der Massenspektrometrie lag zunächst in der Strukturaufklärung organischer Verbindungen, sie hat sich aber mittlerweile in vielen Bereichen der qualitativen und quantitativen Analytik, insbesondere in der Spurenanalytik, etabliert [173].

Die On-line-Kopplung der HPLC mit der Tandem-Massenspektrometrie kombiniert die Vorteile beider analytischer Messverfahren. Die flüssigchromatographisch ganz oder teilweise aufgetrennten Substanzen werden dabei direkt massenspektrometrisch verifiziert und quantifiziert. Dadurch wird eine hohe Selektivität erzielt und damit auch eine große Nachweissicherheit gewährleistet. Oftmals kann gleichzeitig auch die Nachweisgrenze erheblich verbessert werden. Die HPLC ist über das Interface mit dem Massenspektrometer gekoppelt. Sanfte Ionisierungstechniken, wie die chemische Ionisation, liefern nicht oder nur geringfügig fragmentierte Molekülonen bzw. Molekül-Adduktionen, wie $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ oder $[M-H]$. Für an die LC gekoppelten Systeme sind Sprayionisationsquellen wie Elektrospray (ESI), Thermospray (TSI) und die chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI) am weitesten verbreitet [299] und üblicherweise parallel am selben Spektrometer auswählbar. Aufgrund der leichten Protonierbarkeit von SUs im Sauren hat sich hier die Elektrosprayionisation im positiven ESI-Modus als besonders praktikabel erwiesen [8]. Die Ionisation erfolgt durch Einsprühen der Lösung über eine geheizte Kapillare, an deren Spitze eine Hochspannung von 2 bis 5 kV angelegt ist. Es bilden sich geladene Tropfen, die durch einen beheizten Stickstoffstrom verdampft werden, so dass die Ladungen auf ein immer kleineres Volumen konzentriert werden und es zur Ionenemission kommt. Die anschließende Massenauftrennung im MS-Analysator kann nach fünf verschiedenen Prinzipien erfolgen. Quadrupolmassenfilter trennen die Ionen im Hochfrequenzbereich eines Quadrupol-Stabsystems, elektrische Ionenfallen fangen die Ionen in einem elektrischen Feld zwischen Elektrodenzellen in zylindrischer oder hyperbolischer Form und Ionencyclotron-Resonanz-Zellen, auch magnetische Ionenfallen genannt, fixieren Ionen in einem homogenen Magnetfeld. Bei den beiden Letzteren können die Ionen so gesteuert werden, dass diese Kreisbahnen beschreiben, deren Umlauffrequenz von der Teilchenmasse abhängig ist. In Sektorfeldgeräten werden die Ionen hinsichtlich ihrer Ablenkung im kombinierten magnetischen und elektrischen Feld getrennt, in Flugzeit-Detektoren hingegen aufgrund ihrer Flugzeit bei konstanter Anfangsenergie.

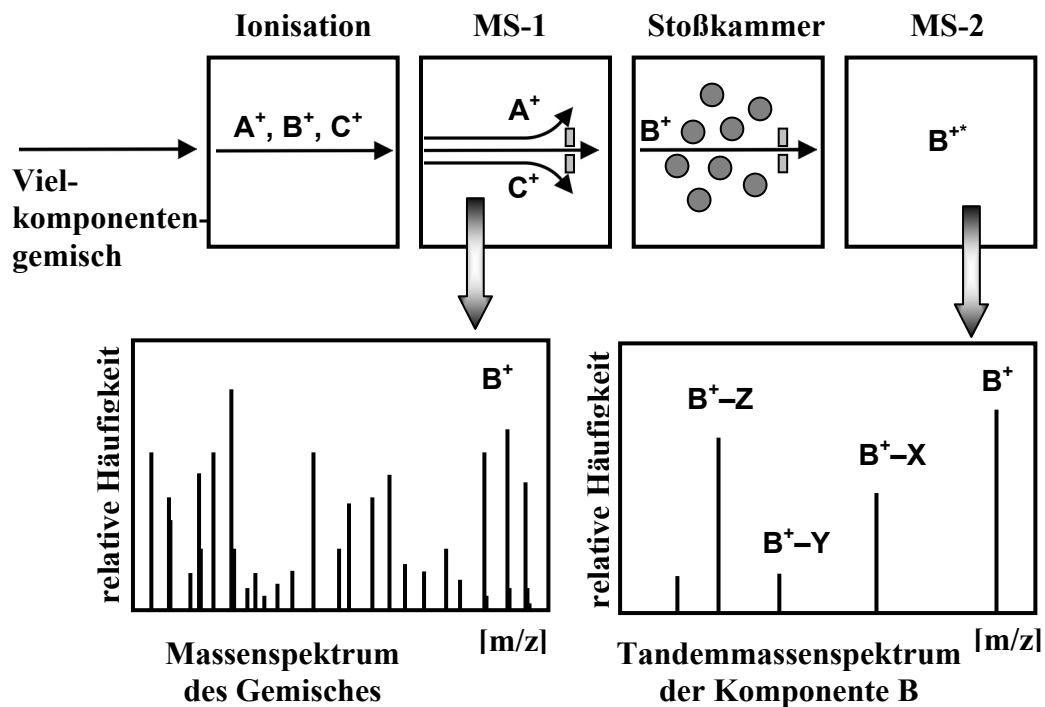


Abbildung 14: Prinzip der Tandem-MS [173].

Tandem-MS-Geräte bestehen aus zwei über ein Interface oder eine Stoßkammer seriell gekoppelte Massenspektrometer. Im ersten Massenspektrometer (MS-1) werden Molekülionen erzeugt. Das Interface ermöglicht die gezielte Fragmentierung von ausgewählten Molekülionenmassen durch Stoßaktivierung mit einem Inertgas (meist Argon oder Xenon), die dann im zweiten Massenspektrometer (MS-2) aufgrund ihrer Masse getrennt werden können. Der Fragmentierungsprozess ist unter der Bezeichnung CAD (Collision-Activated-Dissociation) oder CID (Collision-Induced-Dissociation) bekannt. Die serielle Kombination beider MS ermöglicht die Anwendung unterschiedlicher Betriebsarten zur Lösung konkreter Fragestellungen. Beim sog. Tochterionen-Scan werden zunächst mittels MS-1 die Zielkomponenten (Elternionen) abgetrennt und über die Stoßkammer, in der die entsprechenden Tochterionen gebildet werden, in MS-2 geleitet. Tochterionenspektren stellen demnach die Massenspektren der ausgewählten Elternionen dar. Experimente im Tochterionen-Modus können zur selektiven Untersuchung komplexer Probengemische auf bestimmte Komponenten herangezogen werden. Eine andere Betriebsart ist der sog. Elternionen-Scan, bei dem in MS-2 ein selektives Tochterion erfasst wird. Mit MS-1 werden dabei alle höheren Massen untersucht, aus denen das Tochterion entstanden sein könnte. Diese Experimente ermöglichen Rückschlüsse auf die Entstehung von Ionen und auf Fragmentierungsmuster. In der dritten Betriebsart, dem Neutralverlust-Scan, werden MS-1 und -2 so aufeinander abgestimmt, dass sie stets eine konstante Massendifferenz detektieren. So können Abspaltungen von Neutralteilchen, wie Wasser aus Alkoholen

$[M-18+H]^+$, CO_2 aus Carboxylgruppen, CO aus Aldehyden und von HX aus Halogeniden, erfasst werden. Die letzte Betriebsart, die hier Erwähnung finden soll, ist der sog. SRM-Modus (Selected Reaction Monitoring), bei dem ein Screening von charakteristischen Ionenpaaren aus MS-1 und -2 möglich ist, wenn das Fragmentierungsverhalten bekannt ist. Daraus ergibt sich eine besonders hohe Selektivität und Empfindlichkeit.

Die Tendenz in der Entwicklung von LC-MS/MS-Methoden geht dahin, dass versucht wird, die Anzahl der Probenvorbereitungsschritte zu minimieren, was zu „Dilute and shoot“-Methoden geführt hat, bei denen die Proben zur Beseitigung von Matrixeffekten lediglich verdünnt werden. Allerdings ist dies nur dort möglich, wo ausreichend hohe Analytkonzentrationen vorliegen und die Ionisation durch Matrixbestandteile nicht gestört wird [300]. Durch Fortschritte in der Gerätetechnik und dem Bestreben die Analysezeiten möglichst kurz zu halten, verliert die flüssigchromatographische Vortrennung von Targetsubstanzen z.T. an Bedeutung, da die erwünschte Selektivität oftmals auch durch die nachfolgende MS/MS-Detektion erreicht werden kann. Gerade in der medizinischen Diagnostik sind Analysezeiten von wenigen Minuten keine Seltenheit. Dennoch sind leistungsfähige Trenntechniken bei komplexeren Matrices notwendig. So werden in der klinischen Analytik beispielweise Restricted Access-HPLC-Festphasen eingesetzt, die speziell Proteine effizient abtrennen [91]. In der Umwelt- und Lebensmittelanalytik sind auch in Verbindung mit der MS oder MS/MS Probenvorreinigungs- und -anreicherungs-schritte oft unumgänglich, da sehr unterschiedliche und komplexe Matrices vorliegen und geringe Nachweisgrenzen erreicht werden müssen.

Für die Quantifizierung von Spurenkomponenten sind idealerweise Standardsubstanzen erforderlich, die mit stabilen Isotopen markiert wurden. Alternativ wird das Standard-Additionsverfahren oder eine Kalibrierung mit externen Standards angewandt. Allerdings ist es dabei nicht grundsätzlich gegeben, dass die relativen Intensitäten einzelner Ionen in einem Massenspektrum die relativen Konzentrationen der entsprechenden Analyten in der Probenlösung widerspiegeln, da das massenspektrometrische Signal entscheidend von der Gegenwart weiterer Elektrolyte, von Matrixkomponenten und coeluiierenden Inhaltstoffen beeinflusst wird [301].

5 Sol-Gel-Glas – Technologie

Seit Jahrhunderten werden Gläser und Keramiken durch die Reaktion von anorganischen Salzen und Oxiden bei über 1000°C hergestellt. Silikate, wie Quarzsand (SiO_2), sowie Aluminiumoxid (Al_2O_3 , Tonerde) und Aluminiumsilikate bilden dabei die wichtigsten Rohstoffe. Eine Kombination dieser Sintertechnik mit organischen Chemikalien oder gar Biomolekülen ist aufgrund deren begrenzter Thermostabilität nicht möglich. Die Sol-Gel-Technologie hingegen bietet die Möglichkeit der Herstellung von Glas- und Keramik-Materialien bei Raumtemperatur, was auch den Einschluss von Biomolekülen erlaubt. Sie basiert auf einer anorganischen Polymerisationsreaktion von Metall-Alkoxiden in Lösung. Als Ausgangsprodukte werden vorwiegend Übergangsmetall-Alkoxide sowie Si-, Al- oder B-Alkoxide eingesetzt [302]. Die erste Sol-Gel-Synthese wurde 1846 von EBELMEN beschrieben, der Tetraethoxysilan herstellte, indem er SiCl_4 mit Ethanol umsetzte und beobachtete, dass dieses bei längerem Stehen an der Luft gelierte [303]. Allerdings wurde die breite Einsatzmöglichkeit von Sol-Gel-Materialien erst ein Jahrhundert später erkannt.

Mitte der 1950er Jahre zeigte DICKEY erstmals anhand verschiedener Enzyme die Biokompatibilität von Sol-Gel-Material auf Silikatbasis. Einen Durchbruch auf diesem Gebiet gab es jedoch erst 1990 durch Entwicklungen von AVNIR ET AL. [304], die demonstrierten, dass Biomoleküle bei weitgehendem Erhalt ihrer biologischen Aktivität einpolymerisiert werden können. Die inkorporierte alkalische Phosphatase (ALP) lieferte damals Aktivitätsausbeuten von 30%. Daraufhin folgte in den letzten Jahren ein sprunghafter Anstieg von Entwicklungen im Bereich Biosensorik, -analytik und -katalyse [305]. Sol-Gel-Materialien finden außerdem eine breite technische Anwendung in funktionellen Werkstoffen [306], bei chemischen Sensoren [307-310] und Katalysatoren [311, 312] sowie in der Optik [313] und Elektrochemie [314, 315]. Die synthetischen Gläser werden zudem zur Modifizierung von Oberflächen durch Beschichtung [316-318] oder zur Herstellung von Fasern [319, 320] und Pudern [321] verwendet.

5.1 Sol-Gel-Prozess

Die Bezeichnung „Sol-Gel“ bezieht sich auf den Herstellungsprozess [322]. Dort entstehen bei simultan ablaufender Hydrolyse und Kondensation von Alkoxysilanen zuerst ein kolloiddisperses System, das Sol, welches sich im weiteren Verlauf zu einem dreidimensionalen Netzwerk, dem Gel, verknüpft (vgl. Abbildung 15). Während der Gelierung nimmt die Viskosität sprunghaft zu und es entsteht ein gallertartiger poröser Körper. Dieser erhält durch Alterung aufgrund von Lufttrocknung und durch fortgesetzte Polykondensation eine höhere Festigkeit, wobei die neuen Bindungen zu einer Schrumpfung des Gelkörpers (Synerese) führen. Beim Trocknen des Gels werden Wasser und

Alkohol aus den Poren entfernt und man erhält ein Xerogel [323]. Dabei führen die beim Verdunsten auftretenden Kapillarkräfte zu Brüchen im Material (Cracking). Um dieses einzuschränken, werden oft „Drying Control Chemical Additives“ (DCCA) wie Glycerin, Formamid oder Oxalsäure beigemischt. Eine weitere Möglichkeit stellt das Gefrier-trocknen dar. Hier werden Kapillarkräfte vermieden, die durch das direkte Entfernen der Flüssigkeit aus dem Gel entstehen und zum Porenkollaps führen. Allerdings schädigen dabei Wasserkristalle die Porenstruktur. Dieses Problem umgeht die superkritische Trocknung, die bei hohen Temperaturen und unter Druck abläuft. Hier muss zuerst das Wasser durch Alkohol oder Kohlendioxid ersetzt werden, da sich das Gel unter diesen Bedingungen im Wasser lösen würde. Die unter superkritischen Bedingungen getrockneten Materialien sind hochporöse Aerogele. Durch eine anschließende thermische Behandlung kann eine Dichtezunahme und Stabilisierung erreicht werden. Man spricht dann von Glasbildung.

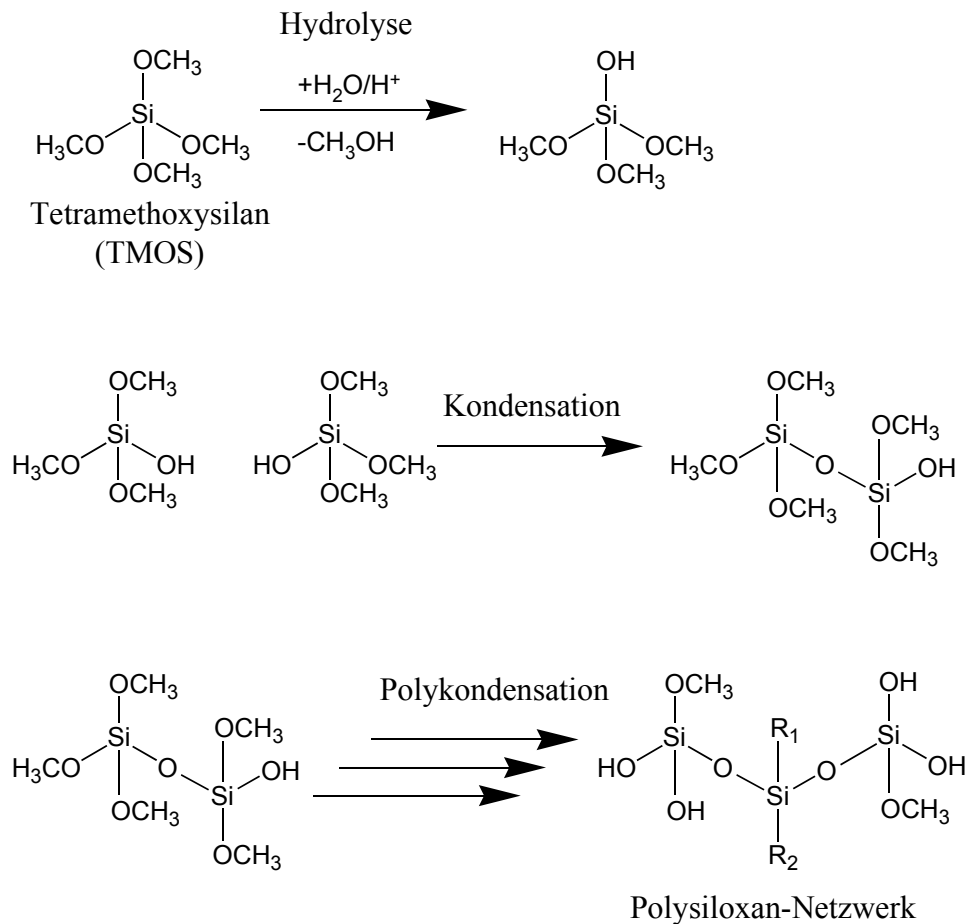


Abbildung 15: Sauer katalysierte Hydrolyse- und Polykondensationsreaktion von Tetramethoxysilan (TMOS).

Die Struktur des Sol-Gels kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Sowohl Säuren als auch Basen und ebenfalls basische Fluoridionen katalysieren die Hydrolyse- bzw. Kondensationsschritte [324, 325]. Alkoxygruppen sind stärkere Elektronendonatoren als Hydroxylgruppen und stabilisieren den bei der sauren Katalyse auftretenden positiv geladenen Übergangszustand. Folglich läuft der erste Schritt der Hydrolyse am schnellsten ab und liefert auch das Produkt, welches die höchste Kondensationsgeschwindigkeit aufweist. So entsteht ein offenes Netzwerk. Anschließend folgen weitere Hydrolyse- und Kondensationsschritte. Das entstehende Gel enthält fast ausschließlich Mikroporen. Im Gegensatz dazu führt der negativ geladene Übergangszustand bei basischer Katalyse zu stark vernetzten großen Sol-Partikeln, die sich später miteinander verknüpfen und größtenteils mesoporige Gele ergeben. Dieser Einfluss des Katalysators auf die Porengröße wurde auch in der Praxis nachgewiesen [326]. Dichte Xerogele besitzen Poren mit einem Durchmesser von 0.5-4 nm, die durch die dreidimensionalen Porenkanäle das Eindringen von Molekülen der molaren Masse von 2 bis 200 kDa erlaubt. Bei weniger dichten Xerogelen variiert der Porendurchmesser zwischen 2 und 20 nm und bei deren ursprünglichen Hydrogelen zwischen 4 und 100 nm, so dass noch größere Moleküle passieren können [327].

Als Maß für die durchschnittliche Kondensationsgeschwindigkeit dient die Gelierungszeit (t_{gel}). Sie ist umgekehrt proportional zur Kondensationsgeschwindigkeit und gibt die Dauer bis zur Entstehung des Gels an. Sie kann zwischen wenigen Zehntelsekunden und mehreren Tagen variieren und ist neben der Temperatur und dem eingesetzten Katalysator auch vom R-Wert abhängig. Der R-Wert gibt das molare Verhältnis von Wasser zu Alkoxy-silanverbindungen an. Das stöchiometrische Verhältnis zur vollständigen Hydrolyse ist 4:1. Da bei der Kondensation Wasser freigesetzt wird, ist aber auch ein geringerer R-Wert möglich. In der Regel nimmt die Gelierungszeit bei sehr hohen oder sehr niedrigen R-Werten ab, da entweder die Konzentration des Silans, aufgrund starker Verdünnung, oder die von Wasser zu gering ist. Auch die Alkoxygruppen des Silans haben durch sterische Effekte erheblichen Einfluss auf die Gelierungszeit, die bei langen oder verzweigten Alkylketten stark zunimmt [328].

Die hydrophobe Natur der Alkoxygruppen verlangt Solventien als Lösungsvermittler zwischen wässriger Phase und Silanen. Da bei der Hydrolyse Alkohol entsteht, kann in einigen Fällen eine mechanische Durchmischung aber schon ausreichen.

5.2 Immobilisierung von Antikörpern

In synthetische Sol-Gel-Gläser können unterschiedlichste Biomoleküle, wie RNA, DNA, Proteine, Enzyme, Antigene, Antikörper und auch ganze Zellen und Mikroorganismen immobilisiert werden [327]. Bei der Gelierung werden diese in den Poren des Netzwerks

eingeschlossen und erweitern die Eigenschaften des Materials. Um später das Auswaschen der eingeschlossenen Moleküle aus dem Xerogel (Leaching) zu vermeiden, ist die Kontrolle der Struktur und besonders der Porengröße von Bedeutung. Die relativ milden Reaktionsbedingungen gewährleisten den Erhalt der Aktivität von Biomolekülen. Eine Vielzahl an Publikationen befasst sich mit der Immobilisierung von Enzymen unter Beibehaltung ihrer Funktion [329-333].

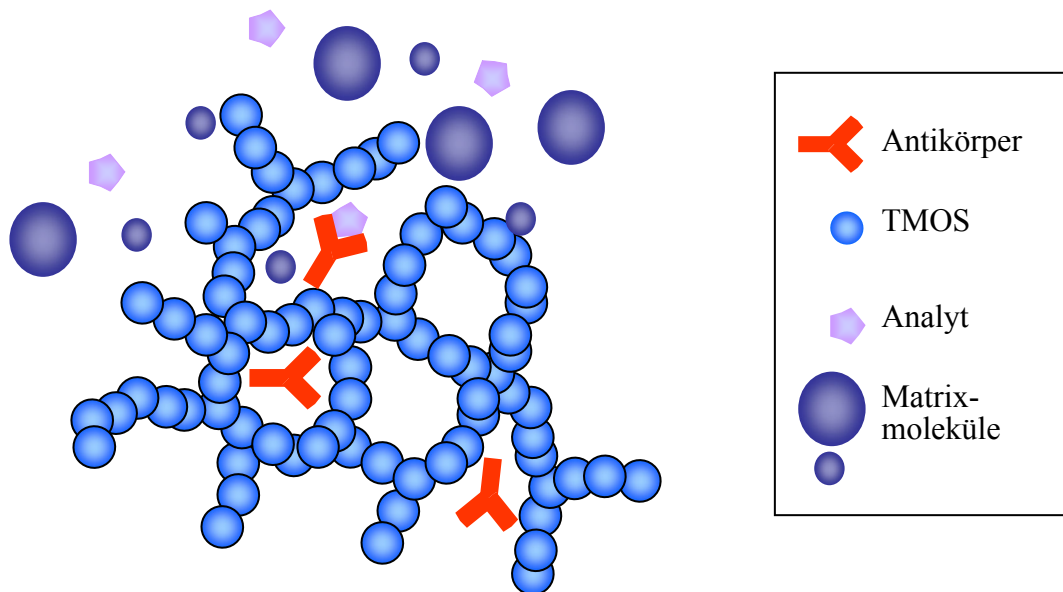


Abbildung 16: Immobilisierung von Antikörpern in Sol-Gel-Glas.

Die erste Immobilisierung eines Antikörpers in Sol-Gel-Glas beschrieben WANG ET AL. 1993 [334]. Bei diesen Experimenten war ein eingeschlossener anti-Fluorescein-Antikörper in der Lage Fluorescein zu binden und dessen Fluoreszenz zu unterdrücken. Ein interessanter Nebeneffekt der Sol-Gel-Immobilisierung war dabei, dass seine Affinität zu Fluorescein im eingebetteten Zustand abnahm, was hinsichtlich einer dadurch möglichen mildereren Elution positiv zu bewerten ist. Für die Immunextraktion sind hochaffine Antikörper weniger wünschenswert, da diese die Analyten so stark binden, dass diese nur durch drastische Bedingungen gelöst werden können, was eine Schädigung des Antikörpers zur Folge haben kann. Es folgte eine Reihe weiterer Publikationen zu in SGG immobilisierten monoklonalen und polyklonalen Antikörpern [232, 335-341]. Obwohl es sich um eine Technik handelt, bei der die Antikörper ungerichtet fixiert werden, sind die Aktivitätsverluste begrenzt. Im Xerogel sind Antikörper über einen längeren Zeitraum haltbar und widerstandsfähiger gegenüber Säuren, Basen, organischen Lösungsmitteln und anderen Matrixeinflüssen. Daher bietet die SGG-Immobilisierung eine gute Möglichkeit für die Herstellung von Immunadsorbentien für analytische Zwecke.

5.3 Monolithen, Sphärische Partikel und Coatings

Stabile Sol-Gel-Monolithen bedürfen einer Stabilisierung und Aushärtung bei hohen Temperaturen. Ihr Vorteil gegenüber herkömmlichen Gläsern besteht in ihrer Porosität und Durchlässigkeit für Flüssigkeiten, sowie einer enormen Stabilität. Dies nutzt man beispielsweise zur Herstellung von monolithischen Chromatographiesäulen oder Kapillarsäulen [342, 343] in HPLC, GC und CE [344-346]. Die Materialien zeichnen sich durch eine ausgezeichnete Separationsleistung aus und finden zunehmend Anwendung für analytische Trennungen. Biokompatible Xerogel-Monolithen haben den Nachteil, dass sie in Abhängigkeit des umgebenden Mediums Quellungen und Schrumpfungen unterliegen und somit nicht ausreichend in Chromatographiesäulen fixiert werden können. D.h., es besteht bei Schrumpfung des Materials die Gefahr, dass der Eluent am Monolithen vorbeifließt und damit keine Wechselwirkung von Analyt und Biomolekül stattfinden kann. Für die Herstellung von Immunadsorbentien auf Sol-Gel-Basis werden die Monolithen daher vermahlen und die Chromatographiesäulen mit dem Mahlprodukt befüllt [289]. Bei On-line-Anwendungen können sich daraus Probleme durch die Partikelgrößenverteilung bzw. der Druckinstabilität des Xerogels ergeben [297].

Die Herstellung sphärischer Sol-Gel-Partikel im μm -Maßstab wurde bereits 1968 von STÖBER ET AL. [347] beschrieben und ist im Hinblick auf chromatographische Anwendungen von besonderem Interesse. Zu den Haupttechniken, um derartig kleine und runde Partikel herstellen zu können, gehören Sprühverfahren, Emulsions-Phasen-Trennsysteme, mechanischer Abrieb und das Beschichten eines Kernteilchens. In Sol-Gel-Prozessen vielfach angewandte Methoden sind Hydrolysetechniken [348] im basischen und sauren Milieu oder die thermische Trennung von Komplexen [349], aus der ein gehärtetes sphärisches Sol-Gel-Gitter hervorgeht. Diese Techniken sind jedoch nicht biokompatibel, da relativ hohe Säure- oder Basekonzentrationen bzw. Temperaturen notwendig sind. Methoden der Partikelbildung mittels Wasser-Öl-Emulsionen [350] können ebenfalls das jeweilige Biomolekül in seiner Aktivität beeinträchtigen. Eine erfolgversprechende Methode stellt die Entwicklung eines biokompatiblen Zweiphasensystems dar, bei welcher der Aktivitätsverlust bei Enzymen oder Antikörpern gering ist und gleichzeitig runde SGG-Partikel von einem Durchmesser von ca. 10 bis 100 μm hergestellt werden können. Die Partikelgrößenverteilung ist dabei vom eingesetzten Tensid abhängig und kann beispielsweise unter Verwendung von Span[®] 80 auf den Bereich von 9 bis 14 μm Durchmesser eingegrenzt werden [351].

Für Anwendungen bei der On-line-Immunextraktion mittels HPLC stellt die Strategie der Beschichtung von druckstabilen, porösen Partikeln mit in Sol-Gel einpolymerisierten Antikörpern eine Alternative dar. REETZ ET AL. [352] beschreiben eine derartige Technik

für die Immobilisierung des Enzyms Lipase. Sie nutzten poröse Siran[®]-Träger, deren Poren mit dem wiederum porösen, bioaktiven Xerogel belegt wurden. Sol-Gel-Coatings finden über die in dieser Arbeit eingesetzte Methode der Beschichtung von Silikatpartikeln hinaus eine breite Anwendung. Es werden beispielsweise Sensoroberflächen für optische und chemische Sensoren sowie Biosensoren ge-coated. Darüber hinaus werden auch Microarrayoberflächen oder Fasern mit Sol-Gel-Coatings belegt [353, 354]. Die gebräuchlichsten Techniken sind dabei das Dip-Coating-Verfahren, bei dem das zu beschichtende Werkstück in die Sol-Gel-Lösung eintaucht und nach dem Herausziehen einen trocknenden Film hinterlässt, und das Spin-Coating-Verfahren, bei dem durch schnelle Rotation auf einer Scheibe ein fein verteilter Film auf dem Werkstück entsteht [355].

6 Molekular geprägte Polymere (MIPs)

MIPs, die auch als synthetische Antikörper bezeichnet werden, sind zunehmend in der Diskussion als selektive Phasen für die Solid-Phase-Extraktion (MISPE = Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction). Sie sind robuster als Biomoleküle und ihre Herstellung ist generell weniger aufwändig. Ziel ist die selektive Erkennung von Molekülen durch ein vorgepragtes synthetisches Polymer. Es wird dadurch erzeugt, indem sich die funktionalisierten Monomere aufgrund selektiver Wechselwirkungen um das Analytmolekül anordnen und in dieser Position durch anschließende Copolymerisation mit einem Crosslinker fixiert werden. Diesen Vorgang nennt man Prägung oder Imprinting. Nach Extraktion des Templats bleibt ein „Abdruck“ zurück, welcher bei Probenaufgabe den Analyten selektiv erkennt. Die geprägten Hohlraumstrukturen sind hinsichtlich der Selektivität mit biologischen Systemen durchaus vergleichbar. Die Affinitätskonstanten sind aber niedriger als bei Antikorpfern [356-359].

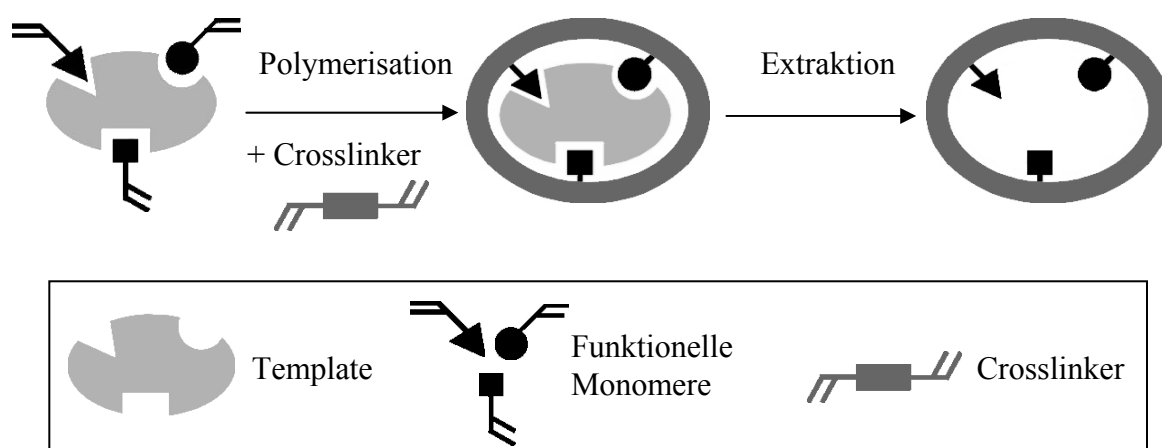


Abbildung 17: Molecular Imprinting.

MIPs bestehen i.d.R. aus Methacrylat- oder Silica-Materialien. Für die Herstellung von Methacrylat-Polymeren dient z.B. Methacrylsäure als funktionelles Monomer und Ethylenglycoldimethacrylat (EGDMA) als Vernetzer. Alternativ werden auch Acrylamide, Acrylamidosulfonsauren, Aminomethylacrylamide, Vinylpyridine, Vinylimidazole oder Vinylbenzoesauren als funktionelle Monomere zur Gewinnung poröser Methacrylate eingesetzt. Zugesezt werden außerdem ein als Porogen fungierendes Lösungsmittel und ein Reaktionsinitiator (z.B. N, N'-Azo-bis(isobutyronitril) (AIBN)) [360]. Das erhaltene Polymer wird für MISPE-Anwendungen durch Vermahlen und Sieben auf die gewünschte Partikelgrößen-Verteilung eingestellt, die i.d.R. zwischen 25 und 50 μm liegt. Obwohl Methacrylate bei weitem überwiegen, spielen auch Silica-Materialien aufgrund der großen

Zahl an verfügbaren funktionellen Silan-Monomeren eine Rolle [361, 362]. In diesem Zusammenhang werden auch Sol-Gel-Materialien mittels Imprinting für analytische Zwecke funktionalisiert [363, 364].

Anwendungsmöglichkeiten von MIPs liegen im Bereich künstlicher Antikörper [365, 366], in der Katalyse, Sensorik [367, 368] sowie Chromatographie [369-372]. Als Festphasen zur Anreicherung von Pflanzenschutzmitteln wurden bisher nur wenige MIPs hergestellt. Speziell für Triazine wurden jedoch mehrere MIP-Anwendungen publiziert [373-379]. In der eigenen Arbeitsgruppe wurde ein MIP mit Metsulfuron-methyl als Templat synthetisiert [380], und einem direkten Vergleich mit polyklonalen anti-SU-Antikörpern unterzogen [94]. Das MIP-Material erwies sich als extrem robust. Auch nach 200 Beladungs- und Elutionszyklen wurde keine wesentliche Veränderung der Performance beobachtet. Hinsichtlich der SU-Erkennung war es jedoch auf 5 Substanzen begrenzt.

III ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1 Entwicklung und Charakterisierung eines breitbandigen anti-SU-Antikörpers

1.1 Haptenauswahl und Immunisierungsstrategie

Ziel der Arbeit war es, Antikörper mit möglichst breiter Analyterkennung zu entwickeln. Dafür wurden drei Haptene ausgewählt, welche aufgrund ihrer Molekülstruktur ein Gesamtmolekül, sowie einen „rechten“ bzw. „linken“ Molekülteil repräsentieren. Die Verfügbarkeit in Frage kommender Haptenmoleküle war begrenzt, da die Sulfonylharnstoffe selbst keine endständigen Carbonsäure- oder Aminogruppen aufweisen, die für die Kopplung an Proteine zur Immunogendarstellung notwendig sind. Auch strukturhomologe Verbindungen sind kommerziell kaum erhältlich. Es wurden die in Abbildung 18 aufgeführten Verbindungen als Haptene - Hapten 1: 2-Methylester-phenyl-sulfonamid, Hapten 2: 2-[[[(4,6-Dimethoxy-2-pyrimidinyl)amino]carbonyl]amino]-sulf-onyl]-2-(carboxymethylbenzol)-4-[[methyl]amino]bernsteinsäure, Hapten 3: 6-(4-Methoxy-6-methyl-1,3,5,-triazinyl-2-amino)hexansäure - ausgewählt und zu den entsprechenden Immunogenen umgesetzt.

1.2 Herstellung und Charakterisierung von Immunogenen, Coating-Antigenen und Tracern

1.2.1 Immunogene

Antikörper werden in der Regel nur gegen Moleküle gebildet, die eine Molekülmasse von mindestens 5 kDa besitzen. Deshalb müssen die Haptene an Carrierproteine gebunden werden, um das Immunsystem stimulieren zu können. Da es für die Immunreaktion aus sterischen Gründen allgemein vorteilhaft ist, wenn zwischen Hapten und Proteincarrier ein Spacer eingeführt wird, wurde für Hapten 1 und 2 durch Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid jeweils ein C₄-Spacer-Derivat synthetisiert (vgl. Abbildung 19). Die Produkte wurden mittels NMR identifiziert und auf ihre Reinheit geprüft. Hapten 3 wurde von Dr. Franek (*VRI*, Brno, CZ) bereits als C₆-Spacer-Derivat zur Verfügung gestellt. Ein Spacer soll sterisch einfach gebaut sein, damit die räumlichen Strukturen und die elektronischen Eigenschaften des Haptens möglichst wenig beeinflusst werden. Der Vorteil der Kettenverlängerung liegt in der besseren Zugänglichkeit des Haptens am Carrier. Für die Auswahl des Proteincarriers ist dessen Immunogenität das Hauptkriterium, aber auch seine

Löslichkeit spielt eine Rolle. Es wurde KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) eingesetzt, welches beide Eigenschaften vereint [381].

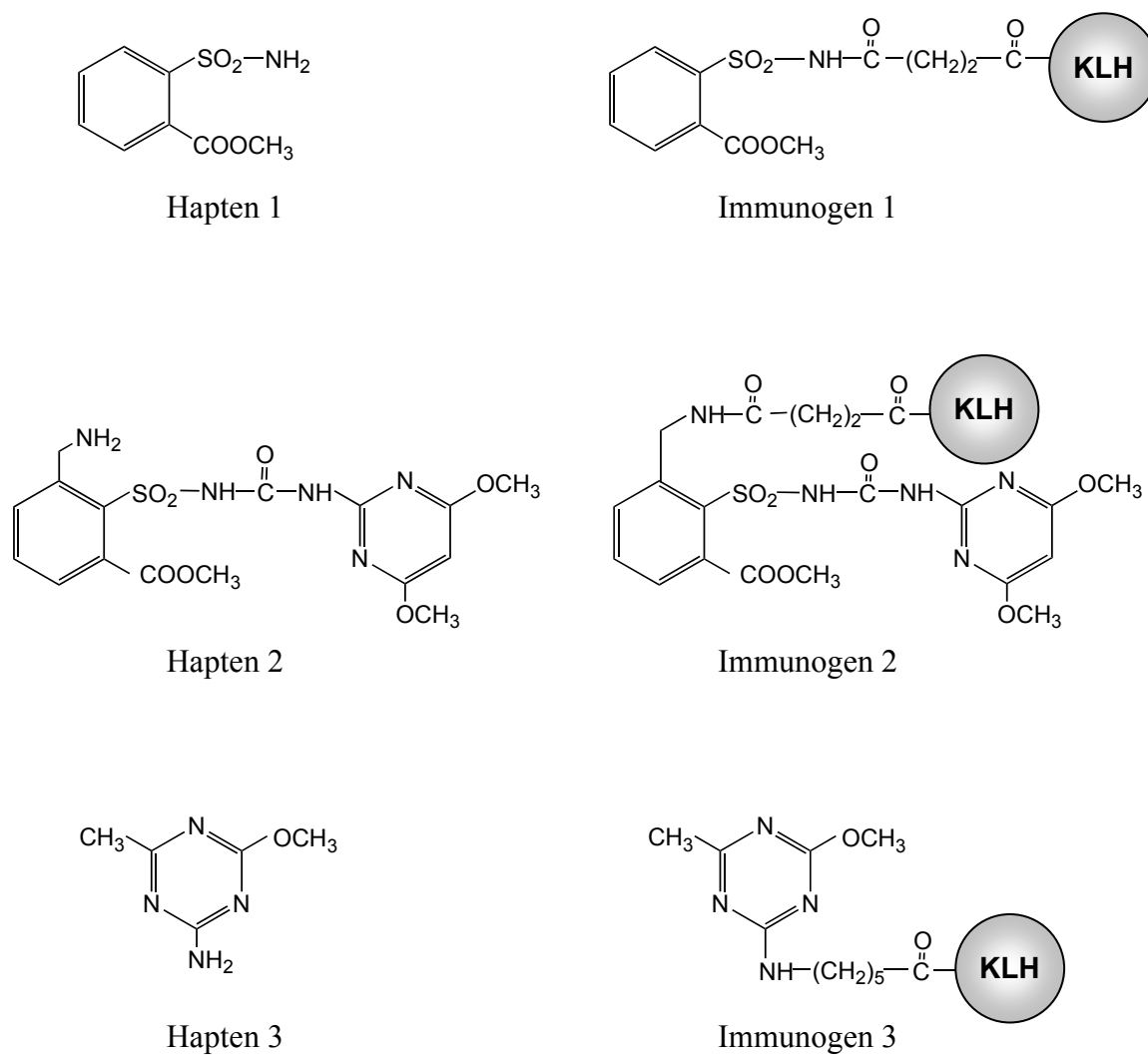


Abbildung 18: Haptene 1, 2 und 3 und die daraus synthetisierten Immunogene.
 Hapten 1: 2-Methylester-phenylsulfonamid. Hapten 2: 2-[[[(4,6-Dimethoxy-2-pyrimidinyl)amino]carbonyl]amino]sulfonyl]-2-(carboxymethylbenzol)-4-[[methyl]amino]bernsteinsäure. Hapten 3: 6-(4-Methoxy-6-methyl-1,3,5,-triazinyl-2-amino)hexansäure. KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin. M_r (Hapten 1): 215.2 g/mol. M_r (Hapten 2): 424.4 g/mol. M_r (Hapten 3): 140.1 g/mol.

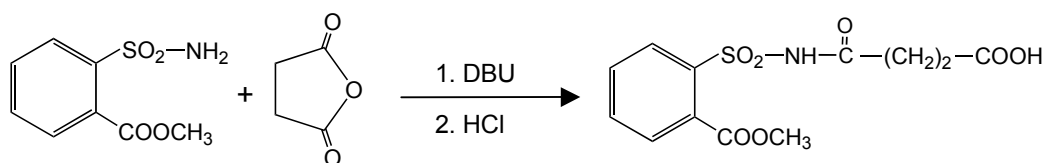


Abbildung 19: Umsetzung von 2-Essigsäuremethylester-phenylsulfonamid (Hapten 1) mit Bernsteinsäureanhydrid zu 1-[(2-Carbonsäuremethylester)-phenylsulfonyl]-monoamidobernsteinsäure. (DBU: 1,8-Diazobicyclo-(5,4,0)undec-7-en).

Die Kopplung der drei Hapten-Spacer-Moleküle am Carrierprotein erfolgte mittels der Aktivestermethode (Abbildung 20). Dabei wird die Carbonsäure am Spacer durch N-Hydroxysuccinimid in Anwesenheit von Carbodiimid aktiviert, so dass sie mit den räumlich zugänglichen ϵ -Aminogruppen der Lysin-Reste am Carrierprotein reagieren kann.

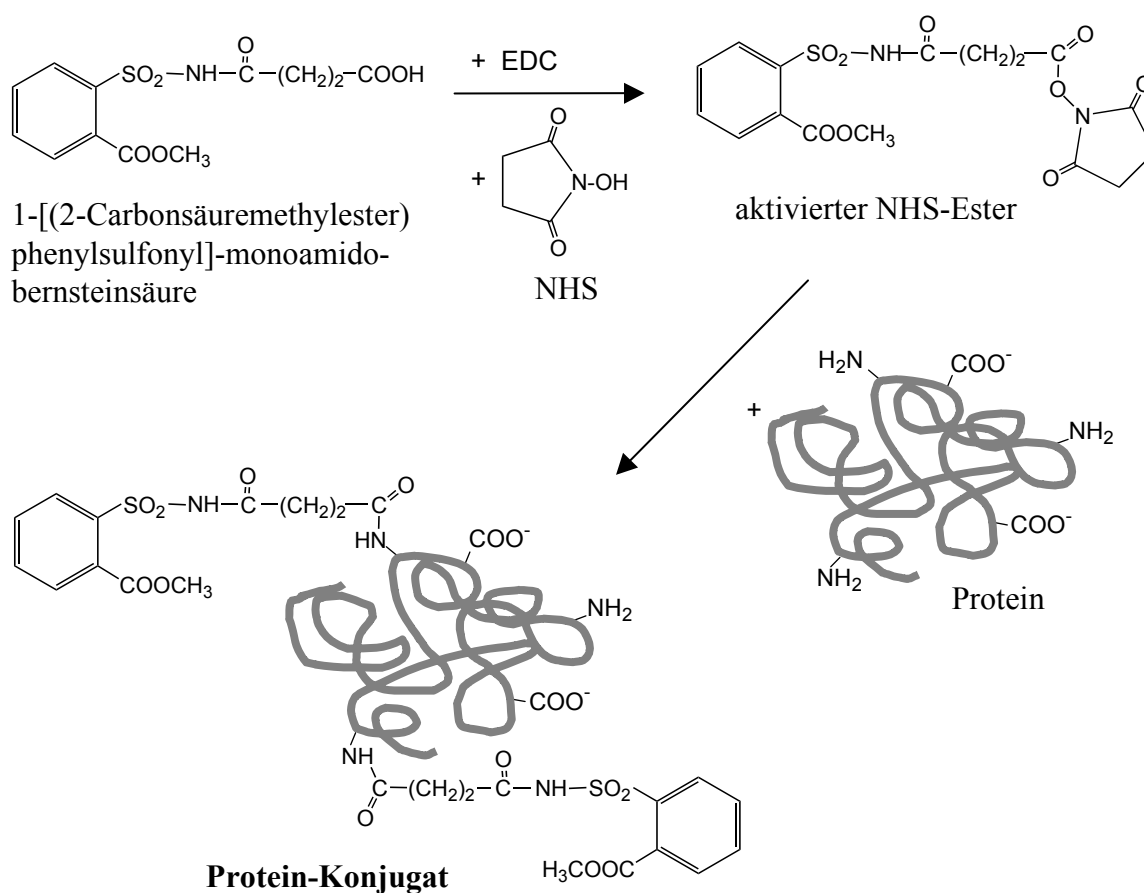


Abbildung 20: Herstellung der Proteinkonjugate mittels Aktivestermethode [382].

1.2.2 Homologe Tracer und Coating-Antigene

Für die späteren Antikörpertests im ELISA wurden außerdem analoge Kopplungen der Haptene an das Carrierprotein BSA (Bovine Serum Albumin, Rinderalbumin) und an das Enzym Meerrettichperoxidase (POD) durchgeführt (Abbildung 21).

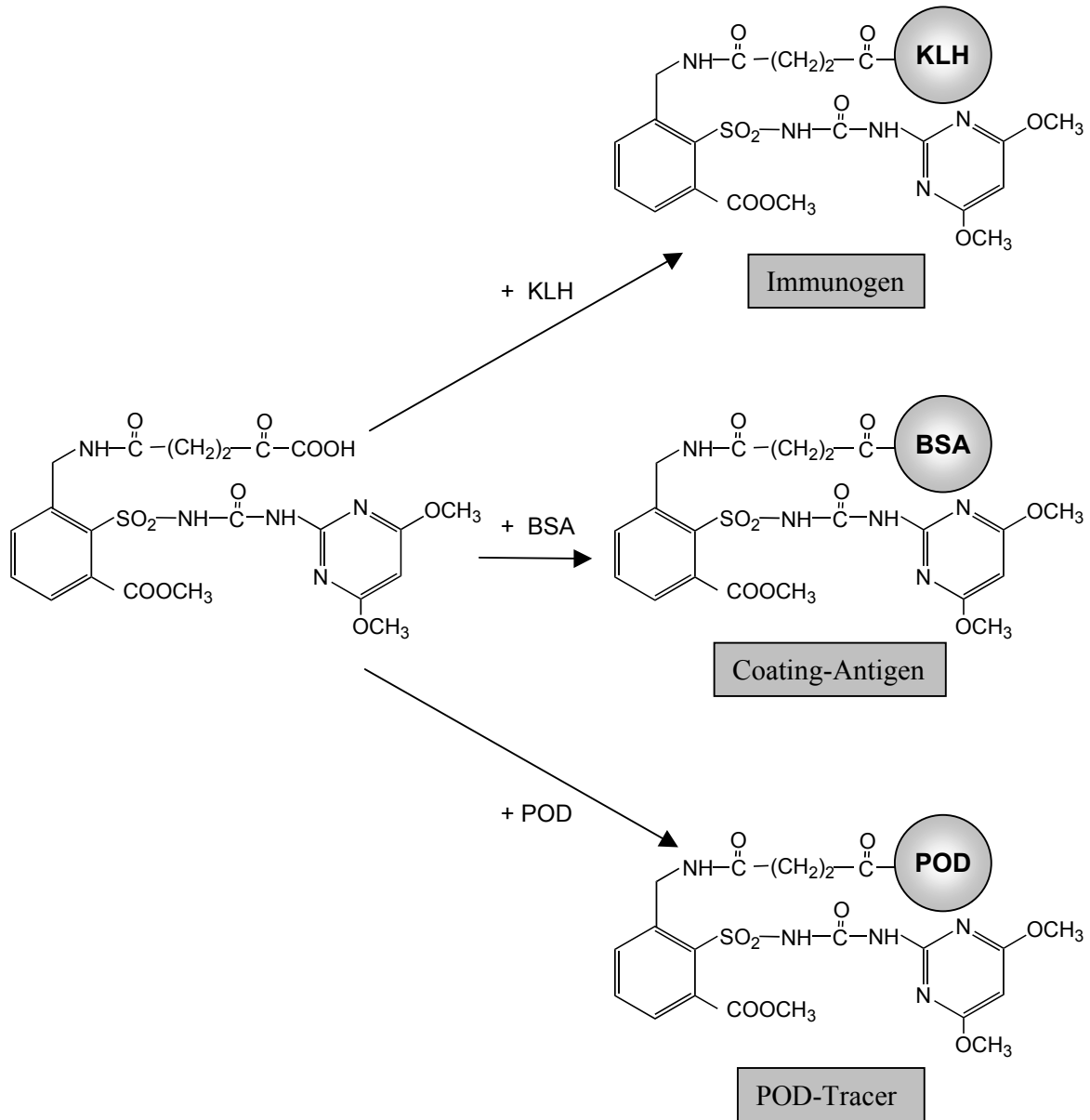


Abbildung 21: Synthese homologer Immunogene, Coating-Antigene und POD-Tracer am Beispiel des Haptens 2: Benzylamin von Mesosulfuron (Gesamtmolekül). KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin, $M_r = 3000$ kD. BSA: Bovine Serum Albumin, $M_r = 68$ kD, POD: Meerrettichperoxidase, $M_r = 44$ kD.

Das erhaltene Hapten-BSA-Konjugat diente als Coating-Antigen im indirekten ELISA, während das Hapten-Meerrettichperoxidase-Produkt im direkten ELISA als homologer Tracer fungierte. Bei Verwendung von polyklonalen Antikörpern muss sich das Trägerprotein des Coating-Antigens im Assay vom Carrierprotein des Immunogens unterscheiden, da in polyklonalen Seren immer auch Antikörper gegen das Trägerprotein vorliegen.

1.2.3 Heterologe Tracer und Coating-Antigene

Da insbesondere für das sehr breit kreuzreagierende Antiserum R03 (Kaninchen 03) in der Endphase der Immunisierung das Basissignal in beiden Testsystemen signifikant anstieg, wurden für Hapten 2 zudem strukturtherologe Tracer und Coating-Antigene synthetisiert. Für die Herstellung eines heterologen Tracers, der keine Spacerbrücke besitzt, wurde eine kommerziell erhältliche aktivierte Peroxidase (EZ-Link™ Plus Activated Peroxidase, Pierce) eingesetzt, die 1-3 mol aminoreaktiver Gruppen pro mol POD enthält und direkt mit der primären Aminogruppe am Benzylrest von Hapten 2 reagieren kann [383]. Analog zum homologen Tracer wurde das Reaktionsprodukt mittels Gelchromatographie aufgereinigt. Das Elutionsverhalten der beiden Tracer-Typen an der kommerziell erhältlichen Sephadex-PD-10-Gelsäule ist in Abbildung 22 dargestellt.

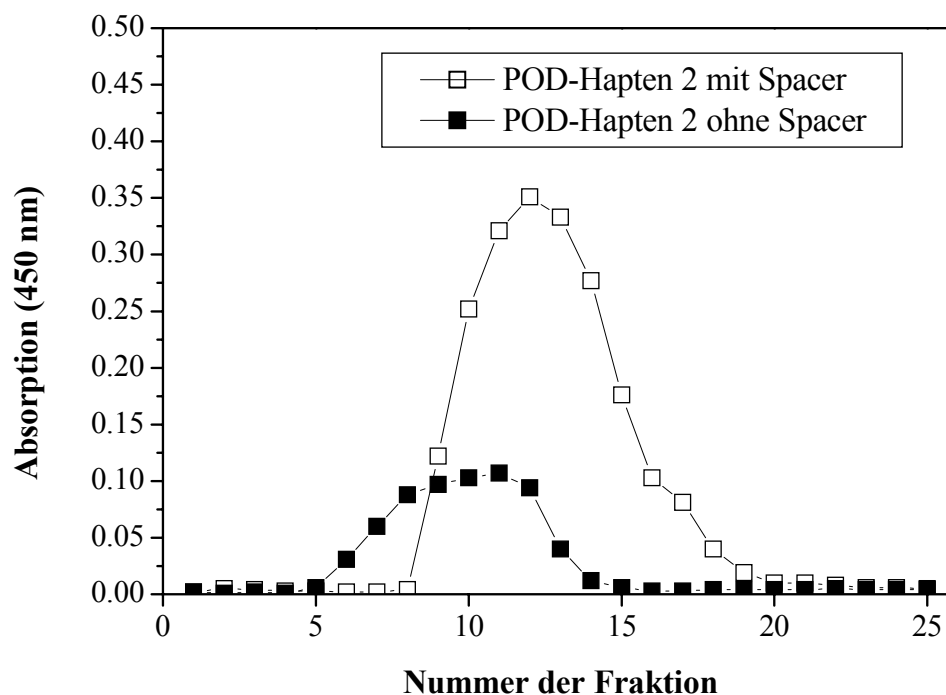


Abbildung 22: Gelchromatographie von homologem und heterologem Hapten 2-POD-Tracer an Sephadex-PD-10-Säulen. Bedingungen: Äquilibration und Elution: PBS-Puffer, Elutionsvolumen pro Fraktion: ca. 250 μ L. Eingesetzte POD-Menge: homolog 5 mg, heterolog 1 mg.

Zwei verschiedene heterologe Coating-Antigene wurden mittels einer durch EDC katalysierten Sulfo-NHS-Ester-Kopplung [384] und einer Diazokopplung hergestellt [385]. Für erstere Reaktion wurden am Carrierprotein (KLH) Carboxylgruppen durch EDC und Sulfo-NHS zu einem Sulfo-NHS-Ester aktiviert, welcher daraufhin mit der Aminogruppe von Hapten 2 reagiert (Abbildung 23). Bei der Diazotierungsreaktion hingegen wird zunächst die primäre Aminogruppe am Hapten mit Nitritlösung im Sauren zum Diazoniumkation umgesetzt, welches dann z.B. mit Tyrosingruppen am Protein zu diazotierten Toluolen reagiert. Der Nachteil dieser Nitrosierungsreaktion ist, dass das Diazoniumkation relativ instabil ist und die Nitrosierungsreaktion weitgehend ungerichtet abläuft, was auch zu Nitrosierungen am Protein führt und die Reproduzierbarkeit erschwert (Abbildung 24).

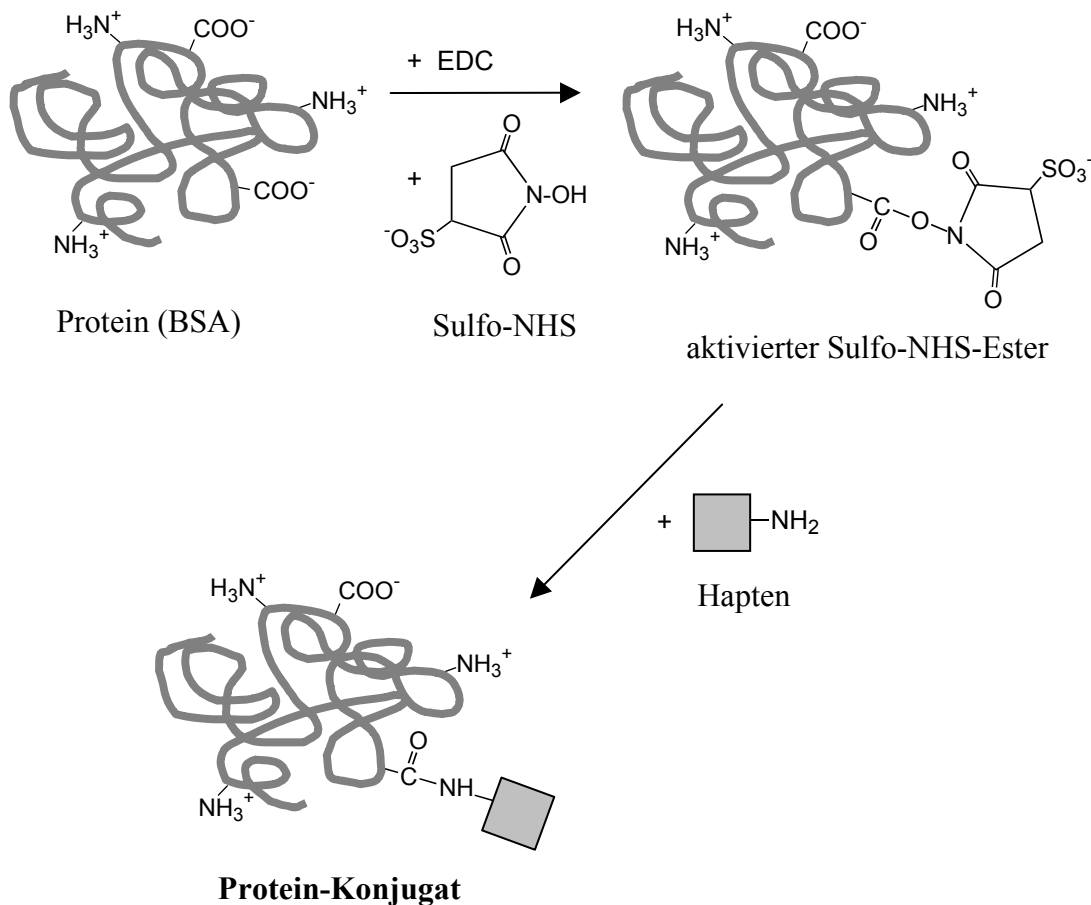


Abbildung 23: Sulfo-NHS-Ester-Kopplung zur Herstellung von Coating-Antigenen ohne Alkyl-Spacerbrücke (C_4 , C_6). Reaktion der Aminogruppe des Haptens mit Carboxylgruppen am Protein (BSA).

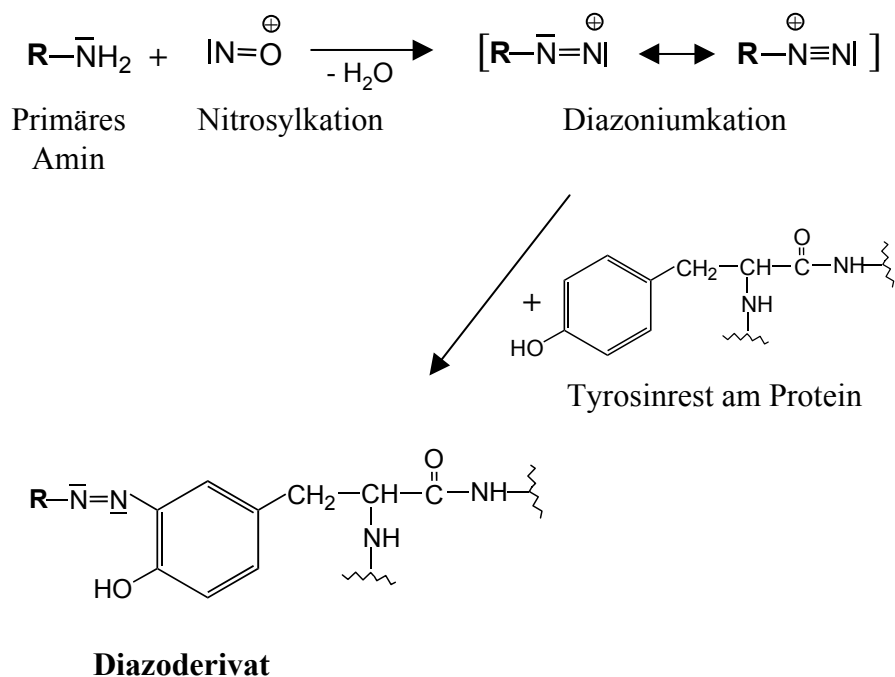


Abbildung 24: Diazotierungsreaktion zur Herstellung von Coating-Antigenen. Reaktion der Aminogruppe am Hapten mit Tyrosingruppen am Protein (BSA).

Zur Gewinnung alternativer Coating-Antigene wurden beide Reaktionen zudem unter Verwendung des antidiabetisch wirkenden Sulfonylharnstoffderivates 4-Amino-N-[(butylamino)carbonyl]-benzolsulfonamid (vgl. Abbildung 25) anstelle des Haptens durchgeführt. Diese Verbindung ist eine der wenigen SUs, die eine reaktionsfähige primäre aromatische Aminogruppe besitzt und damit ein resonanzstabilisiertes Diazoniumion bilden kann, welches einen entsprechenden Azofarbstoff als Produkt liefert.

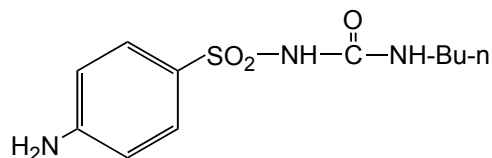


Abbildung 25: Struktur von 4-Amino-N-[(butylamino)carbonyl]-benzolsulfonamid. SU mit reaktionsfähiger endständiger Aminogruppe. $M_r = 271.3$ g/mol.

1.2.4 Charakterisierung der Kopplungsprodukte

Aufgrund des großen Kosten- und Zeitaufwandes bei der Durchführung von Immunisierungen ist es besonders bedeutsam, dass die Immunkonjugate zunächst charakterisiert werden. Insbesondere die Kopplungsdichte, welche die Anzahl der gebundenen Hapten-

moleküle pro Mol Carrierprotein wiedergibt, ist für eine erfolgreiche Immunisierung wichtig. Bei den eingesetzten Immunkonjugaten wurde die Kopplungsdichte mit drei verschiedenen Verfahren ermittelt. Bei der Methode nach HABEEB reagiert Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) mit freien Aminogruppen zu einem gefärbten Trinitrophenyl-Amino-Komplex, welcher photometrisch bestimmt werden kann. Eine elegante Möglichkeit stellt die MALDI-TOF-MS-Spektroskopie dar, die eine Bestimmung der absoluten Molmassen sowie die Massenverteilung von Biopolymeren ermöglicht. Aus der mittleren Molmasse des Hapten-Protein-Konjugates und der nicht konjugierten Verbindung kann die mittlere molare Kopplungsdichte berechnet werden. Jedoch eignet sich die Methode nicht für sehr große Moleküle, wie KLH ($M_r = 3000$ kD) und dessen Konjugate, daher wurden nur die BSA- und POD-Konjugate im Auftragslabor (Fa. *Anagnostec*, Luckenwalde) analysiert. Weiterhin wurden die Kopplungsdichten der drei BSA-Konjugate bei der Fa. *Agilent* mittels Protein-Chip-Technologie (Agilent Bioanalyser) im Rahmen einer Geräte-Vorführung ermittelt. Die Ergebnisse für die homologen Kopplungsprodukte sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Kopplungsraten der synthetisierten homologen Hapten-Protein-Konjugate. (A) Reaktion der freien Aminogruppen des Protein-carriers mit TNBS nach HABEEB. (B) MALDI-TOF-MS-Spektroskopie. (C) Protein Chip (Agilent Bioanalyser).

Gekoppelte Haptene /Mol Carrier	BSA- Konjugat ¹	KLH- Konjugat ²	POD- Konjugat ³
Hapten 1: Phenylsulfonamid- Rest	31 (A) 19 (B) 21 (C)	320 (A)	4 (B)
Hapten 2: Benzylamin von Mesosulfuron	29 (A) 25 (B) 28 (C)	280 (A)	4 (B)
Hapten 3: Triazin-Rest	33 (A) 40 (B)	400 (A)	2 (B)

Zahl der ϵ -Aminogruppen (Lysin) pro Mol Carrierprotein:

¹ BSA: 59 (30-35 stehen typischerweise für die Derivatisierung zur Verfügung)

² KLH: ~ 2000

³ POD: 2 stehen typischerweise für die Derivatisierung zur Verfügung

Die verschiedenen Bestimmungsmethoden führten zu realistischen Hapten-Kopplungsraten am Carrier. Da für die spätere Immunisierung lediglich ausschlaggebend ist, dass ausreichend viele Haptenmoleküle gekoppelt sind, ist der genaue Zahlenwert weniger relevant. Die erhaltenen Abweichungen der einzelnen Methoden bewegen sich zudem in einem

akzeptablen Bereich. Hinsichtlich der prozentualen Angabe der Hapten-Dichten, bei der die Anzahl der gekoppelten Haptene auf die Gesamtzahl der Aminogruppen am Carrier bezogen wird, ist zu beachten, dass für die Anzahl der Aminogruppen, insbesondere für KLH, in der Literatur stark abweichende Werte genannt werden. Bezieht man die Anzahl der gekoppelten Haptene pro Mol Carrier auf den Literaturwert von 2000 ϵ -Aminogruppen des Lysins, erhält man für die KLH-Konjugate, die zunächst zur Immunisierung herangezogen wurden, prozentuale Kopplungsraten von 16% bei Hapten 1-KLH, 14% bei Hapten 2-KLH, und 20% bei Hapten 3-KLH. Die in späteren Immunisierungen ebenfalls eingesetzten BSA-Konjugate zeigten Kopplungsraten von durchschnittlich 40% bei Hapten 1-BSA, 46% bei Hapten 2-BSA und 62% bei Hapten 3-BSA. Zur Berechnung wurde eine Anzahl von 59 ϵ -Aminogruppen des Lysin pro Mol BSA herangezogen.

Die Bindungsdichte der heterologen Kopplungsprodukte (vgl. III 1.2.3) wurde ebenfalls mittels MALDI-TOF-MS bestimmt. Die drei heterologen Coating-Antigene zeigten relativ geringe Kopplungsdichten von jeweils ca. 1-2% an BSA. Der heterologe Tracer Hapten 2-POD lieferte mit drei gekoppelten Haptenmolekülen pro Mol POD einen vergleichbaren Wert zu den homologen Kopplungsprodukten.

1.3 Immunisierungsverlauf und Charakterisierung

1.3.1 Monoklonale Antikörperproduktion

Mit der Zielsetzung der Produktion monoklonaler Antikörper in Zusammenarbeit mit der Fa. *Eurogentec* in Belgien wurden jeweils fünf Mäuse mit den KLH-Konjugaten 1, 2 und 3 immunisiert. Es handelte sich um weibliche Tiere des Inzuchtstammes BALB/c. Dafür wurden 30 μ g Proteinkonjugat mit Freundschem Adjuvans intraperitoneal injiziert. Nach der Primärimmunisierung erfolgten Boosterinjektionen gleicher Konzentration nach 21 und 42 Tagen. Vor der Immunisierung (Nullserum), am Tag 35 und am Tag 56 nach der Immunisierung wurden jeweils Blutproben entnommen und mittels direktem ELISA die Antikörpertiter getestet. Etwa sechs bis acht Wochen nach dem 2. Boost wurde ein finaler Boost injiziert, allerdings ohne Freundsches Adjuvans. Ca. vier Tage danach erfolgte die Entnahme der Milz und eine Fusion der Milzzellen mit Myelomazellen.

Aus Kostengründen wurden alle Seren und Zellüberstände im Rahmen dieser Arbeit selbst getestet. Die Fa. *Eurogentec* führte lediglich die Immunisierungen und die Fusionen durch. Die Blutseren bzw. Hybridomaüberstände wurden jeweils auf Trockeneis gelagert und über Nacht per Expressversand verschickt, damit sie möglichst zeitnah getestet werden konnten.

Bei allen Tieren konnte am 56. Tag der Immunisierung ein ausreichender Antikörpertiter im Blut festgestellt werden. Der Immunisierungsverlauf von einem Tier ist im Folgenden exemplarisch dargestellt. Die Verläufe waren bei allen Tieren sehr ähnlich.

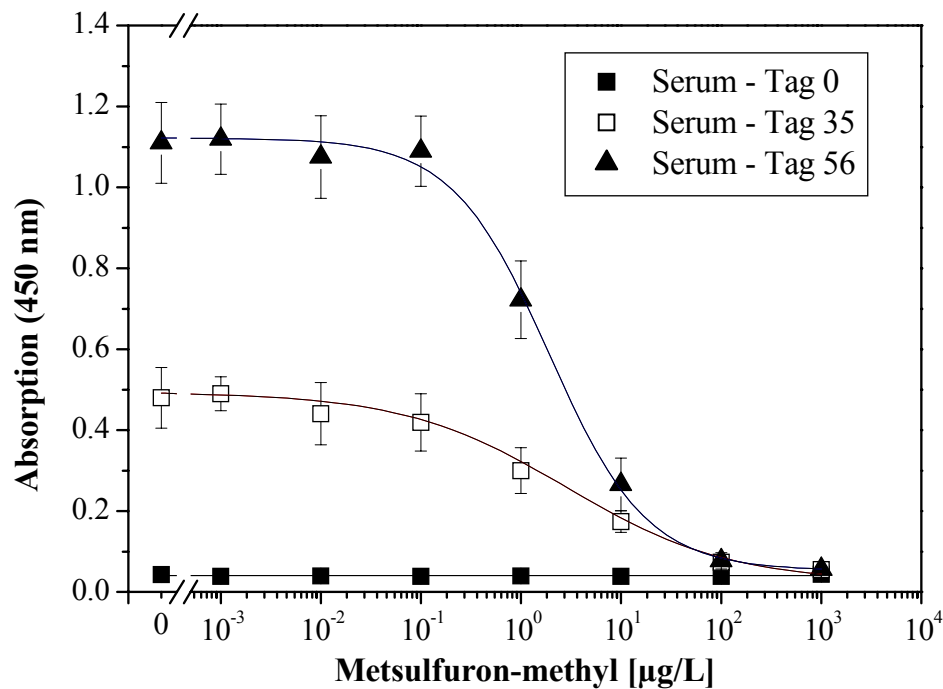


Abbildung 26: Immunsierungsverlauf Maus M05. Immunisierung mit Immuno- gen 2 (Derivat vom Benzylamin des Mesosulfurons). Testbeding- ungen: Direkter kompetitiver ELISA: Coating: 0.5 µg/mL Ziege-anti- Maus-IgG, Serum 1:4000, Tracer (POD-Hapten 2, homolog) 1:1000, Entwicklungszeit: 10 min. Spannweite: Median.

Soweit es die zur Verfügung stehende Menge an Mäuseserum erlaubte, wurden in diesem Stadium bereits Kreuzreaktivitätstests mit verschiedenen SUs durchgeführt, da bei der Auswahl der Tiere für die Fusion, die Zielsetzung einer breiten Kreuzreaktivität als Kriterium Berücksichtigung finden sollte (Abbildung 27). Für die Fusion wurde schließlich ein Tier ausgewählt, dass sowohl einen guten Antikörpertiter im Blut zeigte, als auch eine breite Kreuzreaktivität gegenüber SUs.

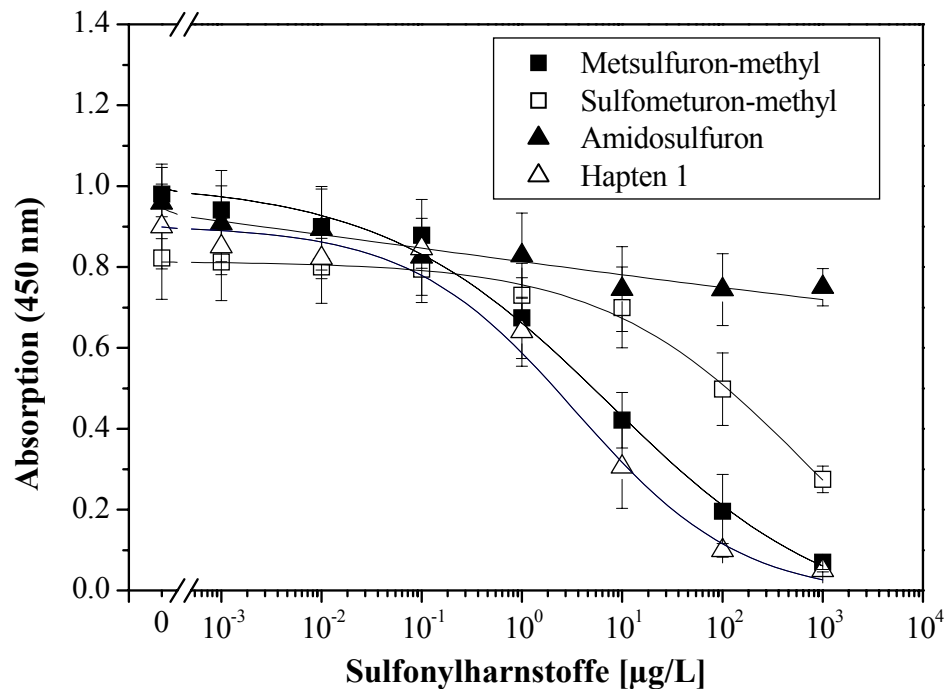


Abbildung 27. Kreuzreaktivitäten Serum Maus M01. Immunisierung mit Immunogen 1 (2-Essigsäuremethylester-phenylsulfonamid-Derivat). Testbedingungen vgl. Abbildung 26.

Das Testsystem für den direkten ELISA wurde anhand eines vorhandenen polyklonalen anti-MSM-Antikörpers, der in Kaninchen generiert worden war, optimiert und dann auf das Mausserum übertragen, indem mittels Checkerboard-Titrationen die optimalen Testkonzentrationen ermittelt wurden. Gegenüber dem Test mit polyklonalem Serum, musste lediglich der Coating-Antikörper Ziege-anti-Kaninchen-IgG durch Ziege-anti-Maus-IgG ersetzt werden. Die für die Mäuseseren optimierten Testbedingungen wurden für die Zellüberstände übernommen. Es wurden pro Fusion sechs bzw. zwölf Mikrotiterplatten mit je 96 Zellüberständen über Nacht getestet. Für den Test wurden je 30 µL Zellüberstand eingesetzt. Pro Testplatte diente eine verdünnte Serumprobe (Tag 56) als Positivkontrolle und eine verdünnte Nullserumprobe (Tag 0) als Negativkontrolle. Die Testung musste sehr zügig erfolgen, da die antikörperproduzierenden Klone möglichst schnell in frisches Zellmedium überführt werden müssen, um ein Absterben der Zellen zu vermeiden.

Abbildung 28 zeigt Mikrotiterplatten, gefüllt mit den Zellkulturüberständen in rosa gefärbtem HAT-Selektionsmedium vor der Testung und die entsprechenden Testplatten des direkten ELISA.

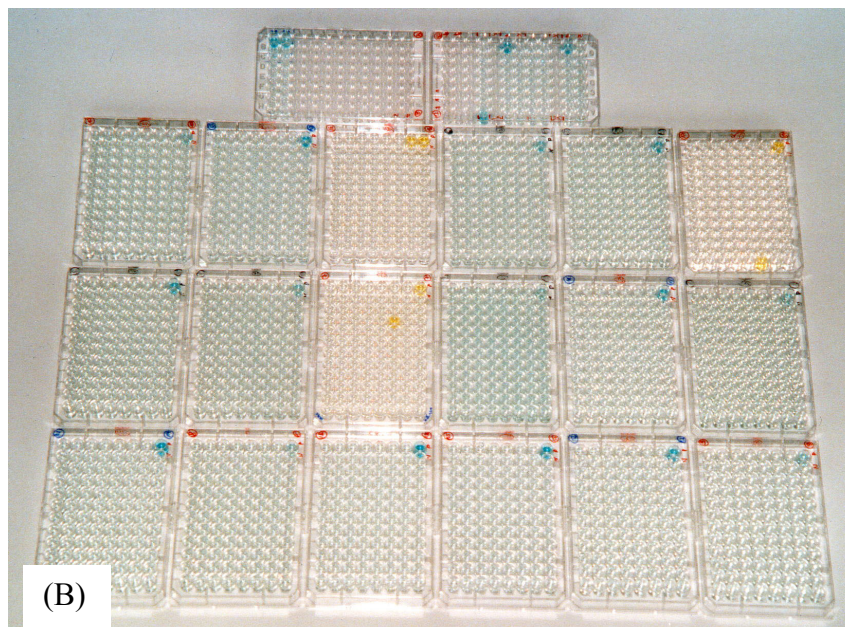
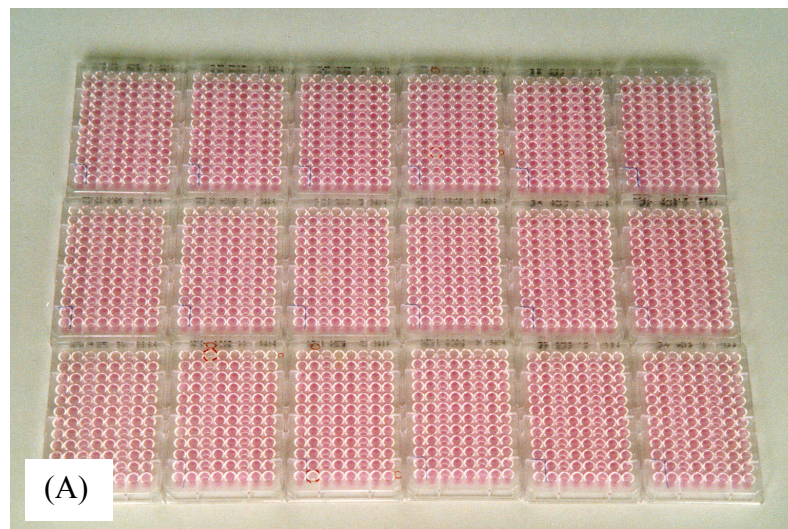


Abbildung 28: (A) Zellkulturüberstände vor der Testung auf vorhandene Antikörper. (B) Testplatten des direkten ELISAs. Negatives Testergebnis bei türkis gefärbten Mikrotiterplatten (Substrat: TMB) mit Positivkontrolle (stark gefärbte Kavität). Drei deutlich positive Klone auf gelb gefärbten Mikrotiterplatten (nach Abstoppen der Enzymreaktion mit Schwefelsäure). Getestet wurden hier 2 Fusionen: Immunogen 1 (6 Platten), Immunogen 2 (12 Platten).

Fünf bei der Fa. *Eurogentec* durchgeführte Fusionen (EGT 97/98/100) führten schließlich zu den vier im direkten ELISA positiv getesteten Zellüberständen EGT 97: ME23B10, EGT 100: MM10G12, MM11F1, MM1F9.

Mit der Wahl des direkten ELISAs als Testformat wurde ein Test gewählt, der an die Affinität der Antikörper höhere Anforderungen stellt als ein indirekter Test. Damit sollten bereits am Anfang Klone, die lediglich schwach affine Antikörper bilden, ausgeschlossen werden, da eine gute Affinität des Antikörpers eine Grundvoraussetzung für die spätere Anwendung in der Immunoaffinitätssäule darstellt.

Von den vier positiv getesteten Überständen erwiesen sich dennoch die zwei aus den Immunisierungen 1 und 3 stammenden Klone EGT 97: ME23B10, EGT 100: MM10G12 in weiteren Tests als nicht genügend affin (schwache Tracerbindung). Die beiden hochaffinen Subklone aus Immunisierung 3 wurden hinsichtlich ihrer Kreuzreaktivität getestet und erwiesen sich als nicht tauglich für die Anwendung auf ein breites Spektrum der SUs. Bei beiden monoklonalen Antikörpern konnte von 24 getesteten Sulfonylharnstoffen lediglich eine schwache Kreuzreaktivität mit Tribenuron-methyl festgestellt werden. Die beiden Antikörper zeigten aber eine gute Kreuzreaktion mit dem Hapten 3 (2-Amino-1,3,5-triazinderivat) und den beiden Triazinen Atrazin und Simazin. Die generierten monoklonalen Antikörper sind für eine Erfassung von SUs daher nicht geeignet. Denkbar wäre jedoch eine Anwendung für die Bestimmung von Triazin-Herbiziden. Der Testmittelpunkt X_0 lag im nicht optimierten Test bei ca. 1-2 $\mu\text{g/L}$ Atrazin bzw. Simazin.

Diese Ergebnisse hinsichtlich der Kreuzreaktivität waren aufgrund vorausgegangener Arbeiten von KOLAR ET AL. [171] nicht zu erwarten. Sie konnten mit dem aus Hapten 3 hergestellten Immunogenen einen monoklonalen Antikörper mit signifikanter Kreuzreaktivität gegenüber den 8 SUs Met-, Primi-, Thifensulfuron-, Tribenuron-methyl, sowie Cino-, Tria-, Chlor- und Prosulfuron gewinnen. Leider war das Hybridom instabil und stand daher für weitere Anwendungen nicht mehr zur Verfügung.

In Kooperation mit Dr. Franek, *VRI* Brno, CZ, wurden aber weitere Versuche zur Produktion von monoklonalen Antikörpern unternommen. Aufgrund der Ergebnisse, der zu diesem Zeitpunkt schon fortgeschrittenen, parallelen Immunisierungen von sechs Kaninchen mit den drei beschriebenen Immunogenen, wurde die Immunisierungsstrategie teilweise abgeändert. Da die polyklonalen Seren der Kaninchen nach Immunisierung mit Immunogen 3 ebenfalls lediglich mit Tribenuron-methyl, Atrazin und Simazin kreuzreagierten, wurde auf weitere Immunisierungen von Mäusen mit Immunogen 3 verzichtet. Neben der wiederholten Immunisierung von je zwei Mäusen (BALB/c) mit KLH-Hapten 1 und KLH-Hapten 2, wurden zwei Tiere mit einer Mischung aus KLH-Hapten 1/2 immunisiert. Zudem wurde je eine Maus mit dem jeweiligen BSA-Konjugat (BSA-Hapten 1 bzw. 2) und einer Mischung aus beiden BSA-Konjugaten immunisiert. Nach zwei Boosterinjektionen wurden die Titer der Mäuseseren getestet und die Tiere mit dem jeweils besten Antikörpertiter zur Fusion herangezogen. Es wurden insgesamt sechs Fusionen

durchgeführt, davon mussten zwei Versuche vorzeitig abgebrochen werden, weil die fusionierten Zellen schlechtes Wachstum zeigten. Bei zwei weiteren Fusionen konnte, trotz gutem Zellwachstum, keine Antikörperproduktion der Hybridomazellen nachgewiesen werden. Die anderen beiden Fusionen ergaben vier produzierende Klone, die jedoch aufgrund ihrer zu schwachen Affinität nicht die gewünschten Eigenschaften aufwiesen. Ein monoklonaler Antikörper konnte somit trotz aussichtsreicher Antikörpertiter im Serum der Tiere nicht generiert werden (vgl. auch III 1.3.2). Eine Übersicht über alle durchgeführten Versuche zur monoklonalen Antikörpergewinnung gibt Tabelle 11.

Tabelle 11: Übersicht über die durchgeführten Fusionen und deren Ergebnisse.

Immunisierung	Tiere	Fusionen	Positive Klone	Antikörper
KLH-Hapten 1 ^a	5	2	1	geringe Affinität gegenüber Tracer
KLH-Hapten 1 ^b	2	1	-	-
BSA-Hapten 1 ^b	1	1	2	geringe Affinität gegenüber Tracer
KLH-Hapten 2 ^a	5	2	0	-
KLH-Hapten 2 ^b	2	1	-	-
BSA-Hapten 2 ^b	1	1	0	-
Mischung: KLH-Hapten 1 + 2 ^b	2	2	2	geringe Affinität gegenüber Tracer
Mischung: BSA-Hapten 1 + 2 ^b	1	-	-	-
KLH-Hapten 3 ^a	5	1	3	2 mAk davon mit starker Affinität zum Tracer, geringe Kreuzreaktivität zu Tribenuron-me (1 von 24 getesteten SUs), Kreuzreaktion mit Atrazin, Simazin und Hapten 3

^a Durchführung: Fa. *Eurogentec*, Belgien

^b Durchführung: Dr. Franek, *VRI* Brno, CZ

1.3.2 Polyklonale Antikörperproduktion

Parallel zu den Versuchen zur monoklonalen Antikörperproduktion wurden sechs Kaninchen einer Mischrasse mit den KLH-Hapten-Konjugaten immunisiert. Es wurde 0.5 mg Immunogen 1, 2 bzw. 3, gelöst in einer Mischemulsion aus 0.5 mL steriler isotonischer Kochsalzlösung und 0.5 mL komplettem Freundschem Adjuvans intradermal an jeweils

zehn verschiedenen Stellen im Nacken- und Rückenbereich verabreicht. Nach der Primärimmunisierung wurden in einem Zeitraum von maximal 50 Wochen bis zu acht Boosterinjektionen unter Verwendung von inkomplettem Freundschem Adjuvans durchgeführt. Für die finale Blutung wurden den Kaninchen an drei aufeinander folgenden Tagen über die Ohrvene insgesamt ca. 100 mL Blut entnommen und die einzelnen Portionen gepoolt. Dann wurde das Blutserum abgetrennt und in 1-mL-Portionen in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Während des Immunisierungsverlaufes wurden die Kaninchenserum mittels direktem ELISA sowohl auf die Entwicklung des Antikörpertiters, als auch bereits auf deren Kreuzreaktivität getestet. Die Verläufe der Immunisierungen sind in den Abbildungen 29 bis 32 dargestellt. Auf die Kreuzreaktivitäten wird in Kapitel III 1.5 ausführlich eingegangen.

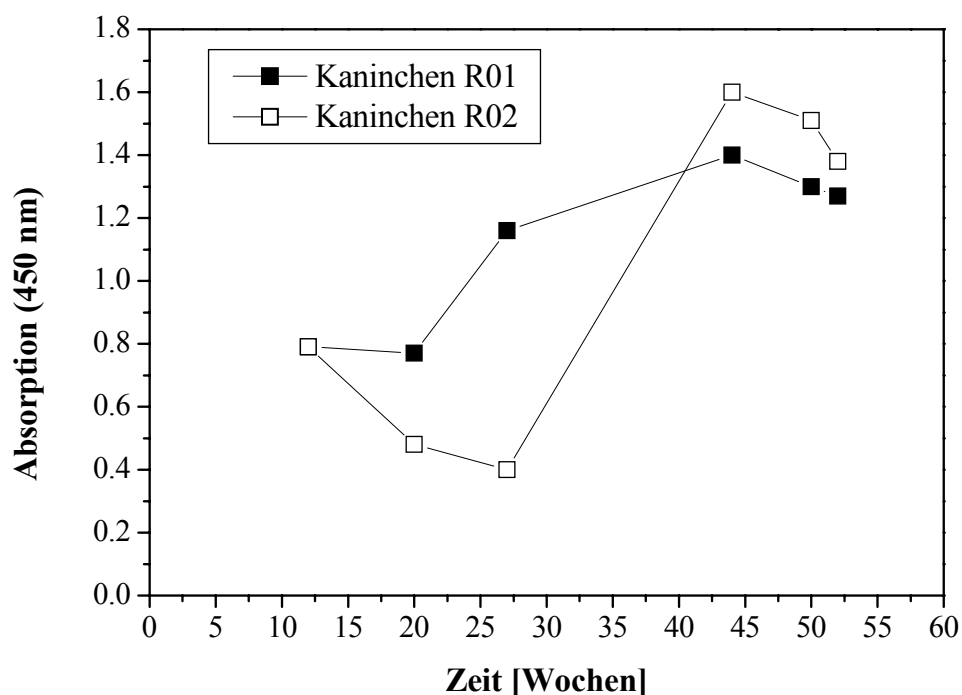


Abbildung 29: Immunisierungsverlauf von Kaninchen R01 und R02 (Hapten 1). Boosterinjektionen in Woche 8, 18, 27, 35, 44 und 50 nach der Erstimmunisierung (Woche 0).

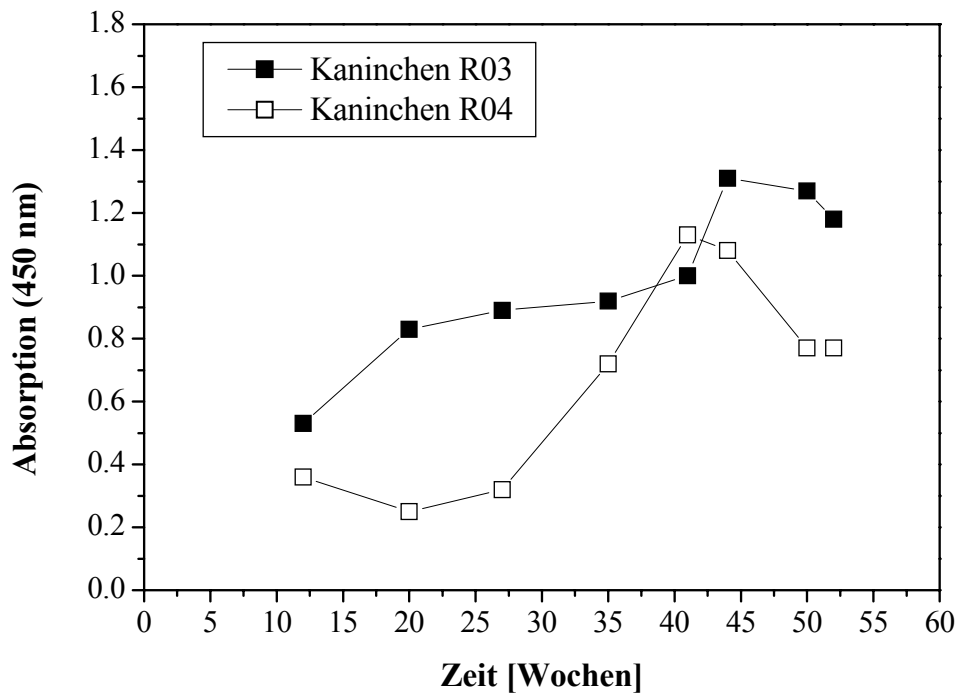


Abbildung 30: Immunisierungsverlauf von Kaninchen R03 und R04 (Hapten 2).
Immunisierung der Tiere in Woche 0, 8, 18, 27, 35, 44 und 50.

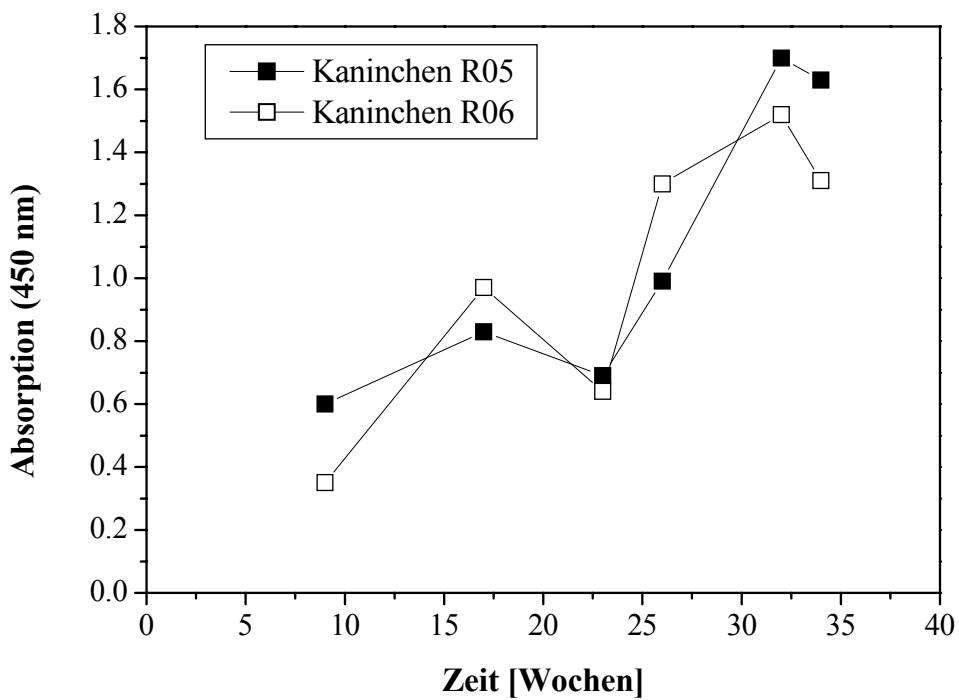


Abbildung 31: Immunisierungsverlauf von Kaninchen R05 und R06 (Hapten 3).
Immunisierung der Tiere in Woche 0, 9, 17, 21, 26 und 32.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurde zudem ein weiteres Kaninchen (R07) mit einer Mischung der drei vorhandenen Immunogene 1, 2 und 3 immunisiert (vgl. Abbildung 32). Es sollte geprüft werden, ob dadurch ein noch breiteres Kreuzreaktivitätsmuster des polyklonalen Serums erzielt werden kann. Die Antikörperproduktion gegen die drei einzelnen Immunogene wurde anhand der jeweiligen Titerentwicklung unter Verwendung der zugehörigen drei POD-Tracer im direkten ELISA regelmäßig überprüft.

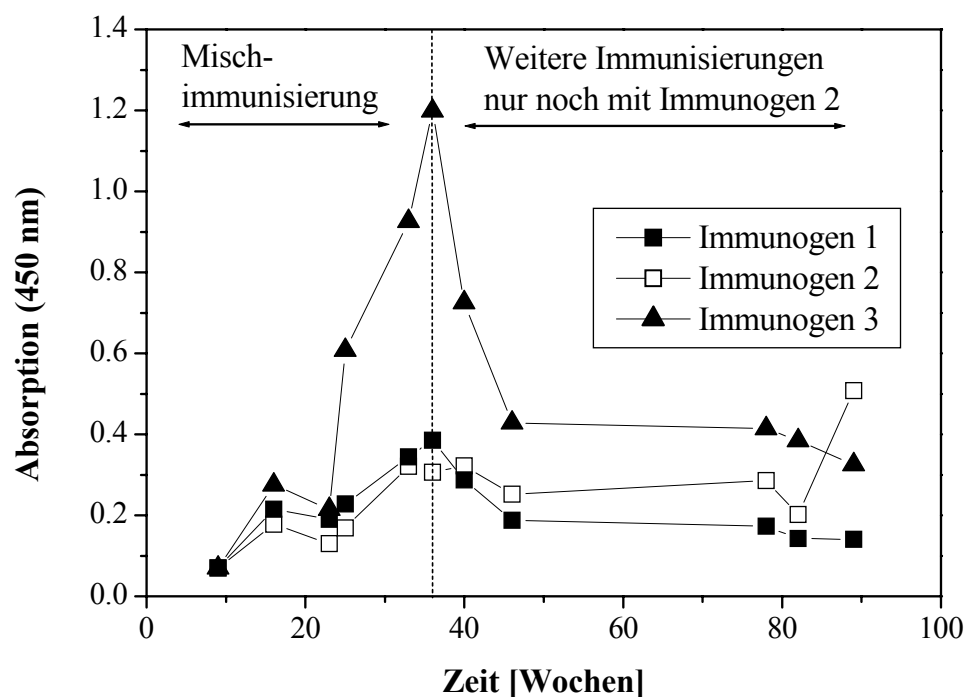


Abbildung 32: Immunisierungsverlauf der Mischimmunisierung mit den Immunogenen 1, 2 und 3 bei Kaninchen R07. Vergleich der Titerentwicklung anhand der Absorptionsintensität bzw. Bindung des jeweiligen POD-Tracers 1, 2 und 3 unter gleichen Messbedingungen auf einer ELISA-Platte. Messbedingungen: Serumverdünnung 1:1000, Tracerverdünnung: POD-Hapten 1/2 (mit Spacer) 1:10000, POD-Hapten 2 (ohne Spacer) 1:2000. Die verschiedenen Tracer-Konzentrationen wurden gewählt, um die durch die verschiedenen Synthesewege bedingten Konzentrationsunterschiede auszugleichen. Entwicklungszeit: 30 min. Die Anfangskonzentration von 0.07 Absorptionseinheiten entspricht der Absorption des Nullwertes.

Dabei zeigte sich im Verlauf dieser Immunisierung jedoch, dass die Konzentration der gegen Immunogen 3 (Triazinderivat) gerichteten Antikörper deutlich dominierte und damit die Gesamtaktivität bestimmte. Da die Kreuzreaktivitäten der Seren der vorausgehenden Immunisierungen mit Immunogen 3 (R05/06) gegenüber SUs sehr gering waren, und damit

bei einer Dominanz desselben kein breites Kreuzreaktivitätsmuster zu erwarten war, wurde ab der 36. Immunisierungswoche die Immunisierungsstrategie geändert. Fortan wurde lediglich mit Hapten 2 immunisiert, da dieses Hapten in den bisherigen Versuchen das breiteste Kreuzreaktivitätsmuster lieferte (vgl. pAk-R03). Dies erfolgte ab der 6. Boosterinjektion.

In Abbildung 32 ist ersichtlich, dass der Antikörpertiter gegen Immunogen 2 jedoch nur langsam ansteigt und insgesamt auch relativ niedrig bleibt. Es kann im ELISA lediglich mit einer Serumverdünnung von 1:1000 gearbeitet werden, während die Seren R01 bis 06 um das 10-fache verdünnt werden können. Es bleibt zu prüfen, ob bei einer Fortsetzung der Immunisierung, der Titer noch gesteigert werden kann. Das Kreuzreaktivitätsmuster von pAk-R07 der 11. Blutung, welche im Zeitrahmen dieser Arbeit auch die finale Blutung war, wird in Kapitel III 1.5 dargestellt. Es wurde unter Verwendung des spacerfreien POD-Hapten 2-Tracers ermittelt und mit den Seren pAk-R01 bis R06 verglichen.

1.4 ELISA-Entwicklung

Die Entwicklung eines klassenspezifischen ELISAs für SUs („Sulfuron Screen“) setzte zunächst einen ausreichend sensitiven und breitbandig mit SUs kreuzreagierenden Antikörper voraus. Ein monoklonaler Antikörper mit diesen Eigenschaften konnte trotz umfangreicher Bemühungen (vgl. Tabelle 11) nicht generiert werden. Von den sieben generierten polyklonalen Antikörperseren erwies sich pAk-R03 als besonders geeignet für die Anwendung in einem solches Testsystem. Auf der Basis dieses polyklonalen Antikörpers wurde daher zunächst ein ELISA entwickelt und seine Anwendbarkeit für Realproben geprüft.

In der Rückstandsanalytik finden vorwiegend kompetitive Immunoassays Anwendung, die je nach der Art des immobilisierten Immunreaktanden, als direktes oder indirektes Format eingesetzt werden. Das indirekte Testformat bietet den Vorteil, dass kein spezifischer Tracer hergestellt werden muss, da das anti-Kaninchen-IgG-POD-Konjugat kommerziell erhältlich ist. Beim direkten ELISA sind dagegen weniger Arbeitsschritte erforderlich und damit ist die Analysezeit kürzer. Allerdings ist das Testergebnis oft stärker zeitabhängig, da der Analyt direkt mit dem immobilisierten Antikörper reagiert und damit zeitversetzt aufgegebene Analyten das Ergebnis beeinflussen können. Welches Testformat für eine entsprechende Zielsetzung bessere Ergebnisse liefert, muss letztlich getestet werden und hängt u.a. auch davon ab, ob für das Testformat ein geeignetes Coating-Antigen bzw. ein geeigneter Tracer synthetisiert werden kann.

1.4.1 Optimierung des direkten Testformates

1.4.1.1 Tracer

Das direkte ELISA-Format wurde zunächst für die Prüfung von Zellüberständen verwendet, da damit der Erhalt positiver Testergebnisse durch schwach affine Antikörper minimiert werden kann. Der direkte Test ist somit ein „härterer“ Test als der indirekte, der auch schwächer affine Klone erfasst [209]. Dafür wurde ein homologer Tracer eingesetzt. Im Verlauf der Immunisierung wurde beim Screening der polyklonalen Seren in diesem Testsystem jedoch ein stark ansteigendes Basissignal festgestellt. Durch die Synthese eines heterologen Tracers konnte diese Problem gelöst werden.

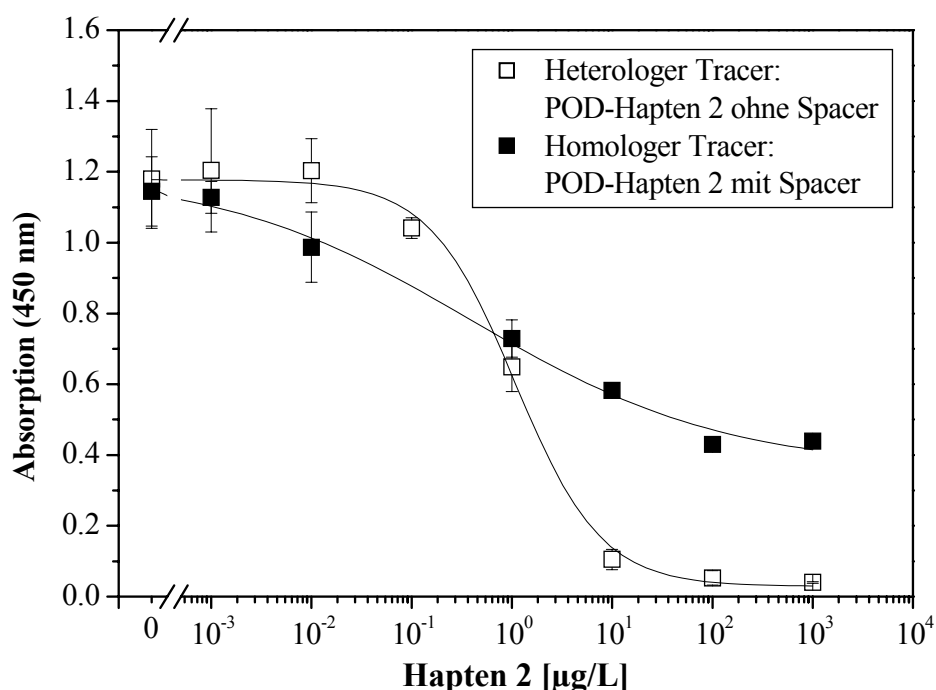


Abbildung 33: „Spacer Recognition“ bei Kaninchenserum R03 im direkten ELISA. Kurvenverlauf bei Verwendung eines POD-Tracers mit und ohne Spacer. Direkter ELISA: Coating: 0,5 µg/mL Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Serumverdünnung: 1:10000, Tracerverdünnungen POD-Hapten 2: a) Heterolog, ohne Spacer 1:2000 (Herstellungsansatz: 1 mg aktive POD); b) Homolog, mit Spacer 1:10000 (Herstellungsansatz: 5 mg POD), Entwicklungszeit: 15 min. Spannweite: Median.

Durch die Analogie von Tracer und Immunogen bezüglich der Bindungsstelle (Brücke), können unerwünschte Wechselwirkungen zwischen Tracer und Antikörper auftreten, da bei der Immunisierung auch Antikörper gebildet werden können, die die Bindungsregion erkennen („Spacer Recognition“) und dann zu einem erhöhten Basissignalsignal im ELISA führen. Da diese Effekte erst in der Endphase der polyklonalen Antikörperproduktion

auftraten, musste für den direkten Test ein neuer POD-Tracer synthetisiert werden, der keinen Spacer enthielt (Abbildung 33). Aufgrund des Fehlens einer reaktiven Carboxylgruppe am Hapten-Molekül, wurde eine kommerziell erhältliche, aktivierte Peroxidase (Pierce) eingesetzt, die pro Mol POD 1-3 Mol aminoreaktive Gruppen enthält, und somit direkt mit den Aminogruppen am Hapten reagieren kann.

1.4.1.2 Konzentrationsverhältnisse

Die Optimierung eines direkten ELISA-Systems erfolgt zunächst grundsätzlich durch die Variation von Antikörper- und Tracerkonzentration. Der Testmittelpunkt, als ein wesentliches Qualitätskriterium für einen Assay, lässt sich durch eine Reduzierung der Antikörper- und Tracerkonzentration bis zu einem bestimmten Punkt absenken. Dadurch erhöht sich die Sensitivität sowie die damit verbundene Nachweisgrenze des Testes. Da gleichzeitig jedoch für die Absorptionsmessung eine ausreichend hohe Farbentwicklung notwendig ist, ist eine Verdünnung von Tracer und Antikörper nicht unbegrenzt möglich. Mittels Vergleichsmessungen bei variierenden Tracer- und Antikörperkonzentrationen wurde der Assay auf eine Signalintensität von 1.0 Absorptionseinheiten und eine Farbentwicklungszeit von 15 Minuten optimiert. Sowohl für das Serum pAk-R03, als auch die hergestellte Tracerlösung erwiesen sich Verdünnungen von 1:10000 als optimal.

1.4.1.3 Blockreagenzien

Blockreagenzien besetzen freie Oberflächen auf der Mikrotiterplatte und dienen somit zur Unterdrückung der unspezifischen Bindung des Tracers an die MTP-Oberfläche. Wie vorausgehend erwähnt, wurde beim Einsatz eines homologen Tracers ein hohes Basis-signal von bis zu ca. 40% der Signalintensität beobachtet. Dieses Grundsignal konnte mit keinem der getesteten Blockreagenzien selektiv reduziert werden, da die maximale Absorption etwa im gleichen Verhältnis zum Basissignal reduziert wurde (Abbildung 34). Mittels eines heterologen Tracers konnte jedoch eine vollständige Inhibition auf ca. 5% erreicht werden. Für das Testsystem unter Verwendung eines heterologen Tracers wurde zudem gezeigt, dass Blockreagenzien nahezu keinen Einfluss auf den Kurvenverlauf hatten. Dies ermöglichte den Verzicht auf einen Blockingschritt im Testsystem.

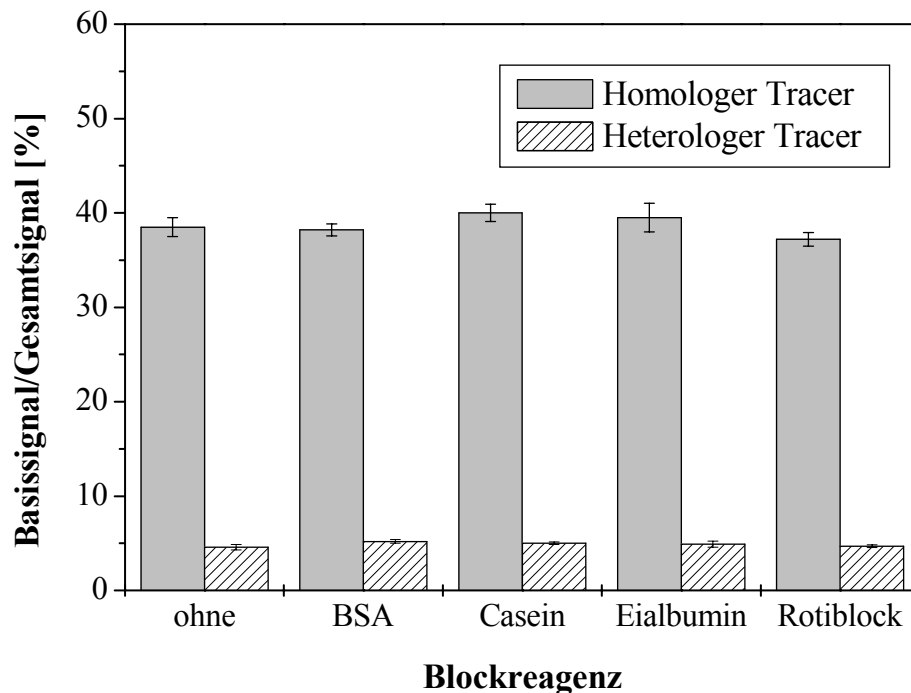


Abbildung 34: Einfluss verschiedener Blockreagenzien auf das Basissignal. Blockreagenzien: BSA, 2%ig (w/w), Casein 3%ig (w/w), Eialbumin 3%ig (w/w), Rotiblock® 1/10-Verdünnung (n = 3, 1 s). Direkter ELISA: Coating: 0.5 µg/mL Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Serum: 1:10000, Analyt: Metsulfuron-methyl, Tracer (POD-Hapten 2: heterolog, ohne Spacer) 1:2000, Entwicklungszeit: 15 min.

1.4.1.4 Optimierte Testbedingungen

Die optimierten Testbedingungen, die für die folgenden Untersuchungen eingesetzt wurden, sind zur Übersicht in Tabelle 12 zusammengefasst. Eine Kalibrierkurve für den Modellanalyten Mesosulfuron-methyl, welche unter optimierten Testbedingungen erstellt wurde, zeigt Abbildung 35. Es handelt sich dabei um den Analyten, für den der Antikörper pAk-R03 die höchste Sensitivität zeigte. Es konnte ein besonders niedriger Testmittelpunkt (X_0) von 0.05 µg/L erzielt werden und die Nachweisgrenze (LOD) lag bei 0.008 µg/L.

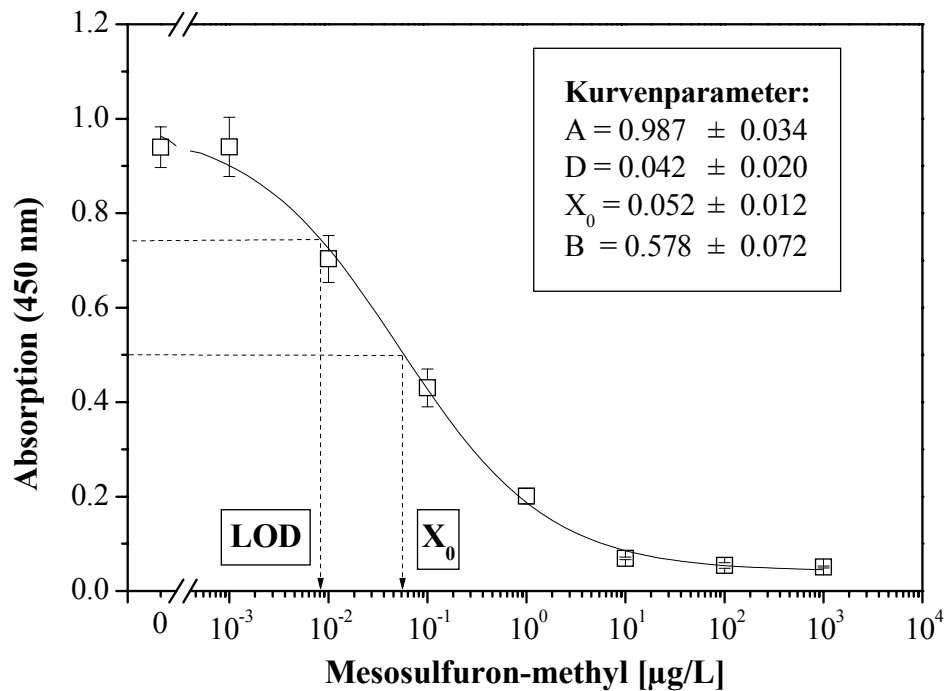


Abbildung 35: Optimierte Kalibrierkurve für Mesosulfuron-methyl im direkten ELISA ($n = 12$, 1 s). LOD = 0.008 $\mu\text{g/L}$. $X_0 = 0.05 \mu\text{g/L}$. Testbedingungen: vgl. Tabelle 12.

Tabelle 12: Optimierte Testbedingungen für den direkten kompetitiven klassenspezifischen SU-ELISA („Sulfuron Screen“).

Arbeitsschritt	Optimierung
Coating	Ziege-anti-Kaninchen-Ak, 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 250 μL , RT, ca. 15 h
Blocken	nicht notwendig
Antikörper	pAk-R03, 1:10000, 200 μL , 1 h
Standard bzw. Probe	200 μL , 30 Min Vorinkubation
Tracer	POD-Hapten 2 (ohne Spacer), 1:2000, 50 μL , 15 Min
Substrat	TMB/ H_2O_2 , Entwicklungszeit: 15 Min
Abstoppen	Schwefelsäure (5%), 100 μL

1.4.1.5 Matriceinflüsse

pH-Wert:

Da insbesondere Wasserproben einen sehr unterschiedlichen pH-Wert aufweisen können, wurde der Einfluss des pH-Wertes auf den direkten ELISA geprüft. Dafür wurden Standardreihen in Phosphatpuffern der pH-Werte 5.0 bis 9.0 hergestellt und im Vergleich zu Kalibrierreihen in bidest. Wasser (pH = 5.5) vermessen. Es konnte kein signifikanter Einfluss des Proben-pH-Wertes auf das Testergebnis festgestellt werden.

Huminsäuren:

Zunehmende Huminsäurekonzentrationen in der Probe führten im direkten ELISA zu einer Abnahme der maximalen Absorption, bei weitgehend gleichbleibendem Basissignal. Die deutlich reduzierte Gesamtabsorption führte zu einer Erhöhung des Testmittelpunktes und vor allem auch zu einer Reduzierung des Messsignals (Absorption).

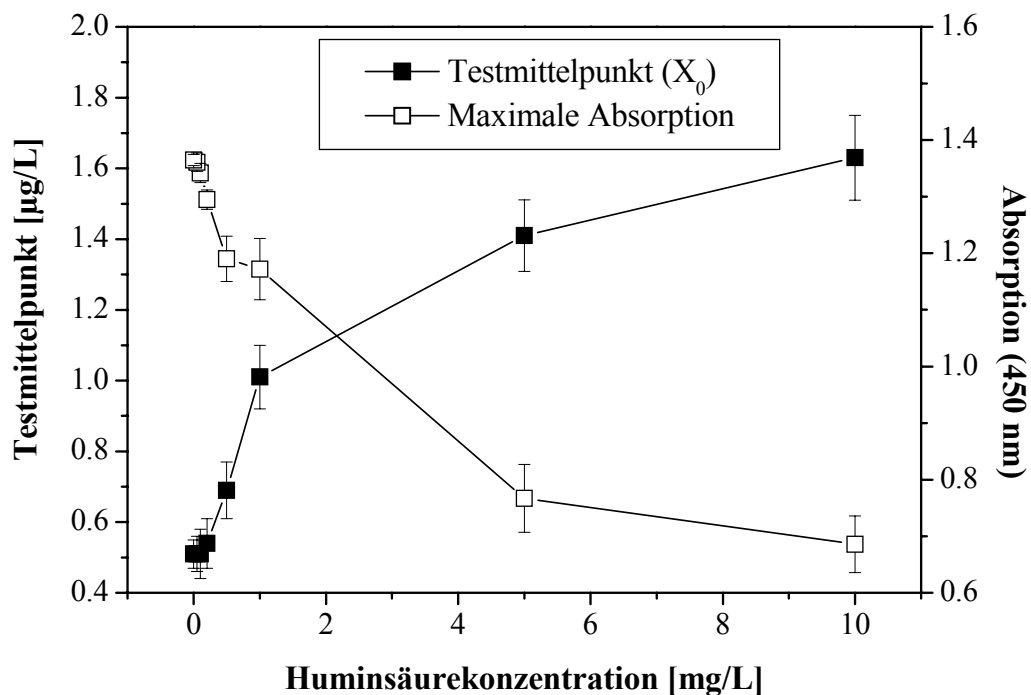


Abbildung 36: Einfluss von Huminsäuren auf den SU-ELISA (n = 3, 1 s). Testmittelpunkt und maximale Absorption der sigmoiden ELISA-Kalibrierung in Abhängigkeit von der Huminsäurekonzentration der Probe. Testbedingungen: vgl. Tabelle 12. Analyt: Metsulfuron-methyl.

Huminsäuren sind Abbauprodukte von natürlichem organischen Material, deren heterologe Struktur noch nicht vollständig geklärt ist. Sie bilden Heteropolykondensate mit Mol-

massen von 2 bis 50 kDa, welche sich aus einem polycyclischen, meist aromatischen Kern und locker gebundenen Polysacchariden, Proteinen, Phenolen und chelatbildenden Metallionen zusammensetzen, die wiederum über Carboxyl- und Carbonylgruppen an den Kern gebunden sind. Aufgrund ihrer Hydroxy- und Polyhydroxycarbonsäuren sind Huminsäuren stark sauer und liegen überwiegend als Salze vor [386]. In Gewässern können sie in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vorkommen. Im Allgemeinen liegen sie in Oberflächengewässern in Konzentrationen bis zu maximal 10 mg/L vor. Ausnahmen mit wesentlich höheren Konzentrationen sind humusreiche Moorwässer. Da Huminsäuren kolloidal im Wasser gelöst sind, werden sie durch Filtration nicht entfernt und können so das Testergebnis des ELISAs beeinflussen. Als Ursache der Huminsäureeffekte wird ihre überwiegend negative Oberflächenladung und die daraus resultierende Affinität gegenüber Proteinen mit positiver Partialladung angenommen [387]. Aufgrund von Interaktionen zwischen dem Antikörper bzw. dem POD-Tracer und Huminsäuremolekülen, werden diese in ihrer Bindung zum Analyten gehemmt, was wiederum ein geringeres Messsignal zur Folge hat (vgl. Abbildung 36).

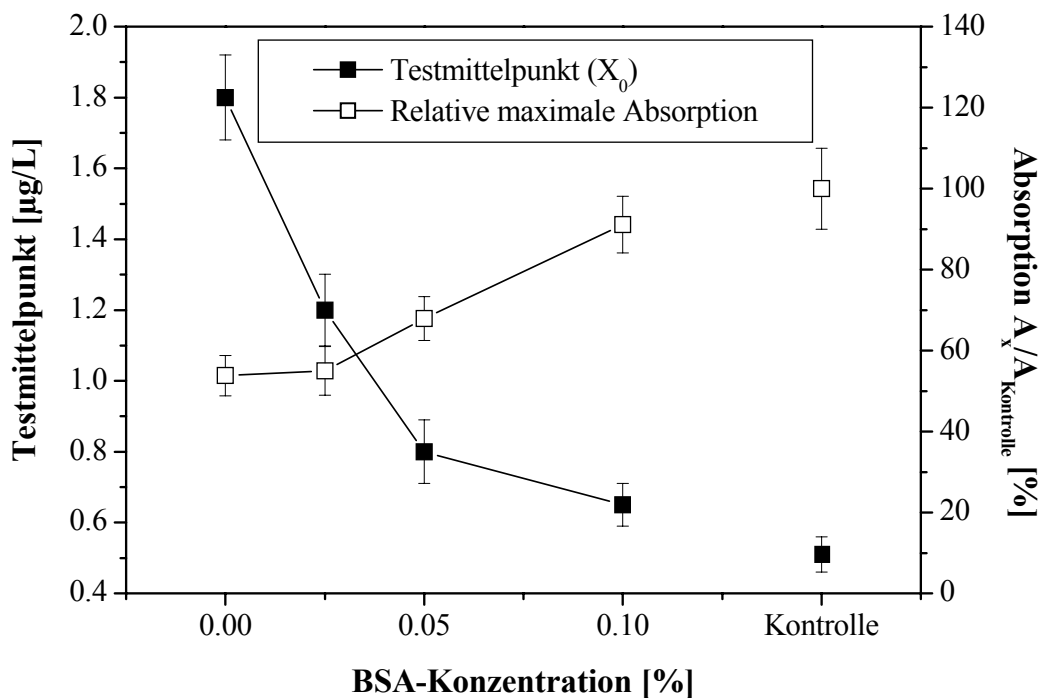


Abbildung 37: BSA-Einfluss auf den Huminsäureeffekt (n = 3, 1 s). Huminsäurekonzentration 10 mg/L. Testbedingungen: vgl. Tabelle 12. Analyt: Met-sulfuron-methyl. Vor der Standardzugabe wurden je 50 μL BSA-Lösung vorgelegt.

Da das Protein BSA aufgrund seiner Oberflächenladung die Tendenz zeigt, mit Huminsäuren zu interagieren [388], wurden Versuche zur Reduzierung der Huminsäureeffekte durch BSA-Zusatz während der Kompetitionsreaktion durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das Aufgeben von 50 μL 0.1%iger BSA-Lösung (w/w) auf die MTP vor der Standard- bzw. Probe-Zugabe die Störeffekte der Huminsäuren (Huminsäurekonzentration 10 mg/L) reduziert. Die Kontrollwerte wurden aus Standardreihen ohne Huminsäure- und BSA-Zusatz ermittelt, die parallel auf jeder MTP vermessen wurden

Lösungsmittelleffekte:

Lösungsmittelleffekte im ELISA sind hinsichtlich eines vorausgehenden Flüssigextraktionsschrittes zur SU-Extraktion aus Lebensmittelproben sowie der Auswahl des Lösungsmittels für die SU-Standards von Bedeutung. Lösungsmittelkontaminationen in Realwasserproben sind dagegen eher unwahrscheinlich.

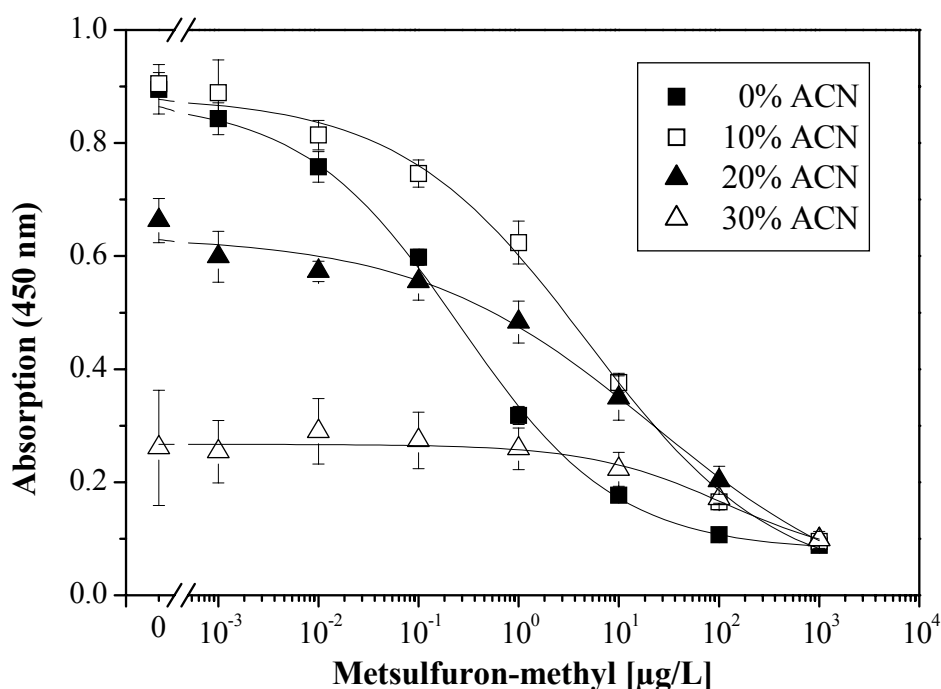


Abbildung 38: Kurvenverlauf des direkten SU-ELISAs bei unterschiedlichen ACN-Konzentrationen in der Probe ($n = 3$). Testbedingungen: vgl. Tabelle 12. Analyt: Metsulfuron-methyl. Die Standards wurden im Lösungsmittel gelöst. Spannweite: Median.

Es wurde festgestellt, dass bereits geringe ACN-Konzentrationen von 5 bis 10% einen Einfluss auf das Testergebnis zeigen. Durch geringe Methanolanteile (bis 15%) wurde der Testmittelpunkt ähnlich stark beeinflusst, wie durch geringe ACN-Anteile (Abbildung 39). Der Kurvenverlauf wurde jedoch insgesamt weniger stark beeinflusst, da die maximale

Absorption im Konzentrationsbereich $< 15\%$ nahezu gleich blieb (Abbildung 40). Daher wurde lediglich für die Herstellung der SU-Stammlösung (0.1 mg/mL) Methanol verwendet, die weiteren Verdünnungsschritte wurden mit bidest. Wasser durchgeführt.

Da die Lösungsmittelleffekte im ELISA auch für die späteren Elutionseigenschaften des pAk-R03 bei der Immunextraktion eine Tendenz aufzeigen, wurden hierzu zahlreiche Untersuchungen durchgeführt. Ähnlich wie beim Huminsäureeffekt, zeigt der Kurvenverlauf mit zunehmenden Lösungsmittelgehalten eine deutliche Reduzierung des maximalen Absorptionssignals, während das Basissignal kaum beeinflusst wird. Auch bei Ethanol und Dimethylsulfoxid wurden Effekte mit dieser Tendenz beobachtet. Da insbesondere Methanol und Acetonitril auch als mögliche Lösungsmittel bei der Immunextraktion von Bedeutung sind, standen diese in den folgenden Darstellungen im Mittelpunkt.

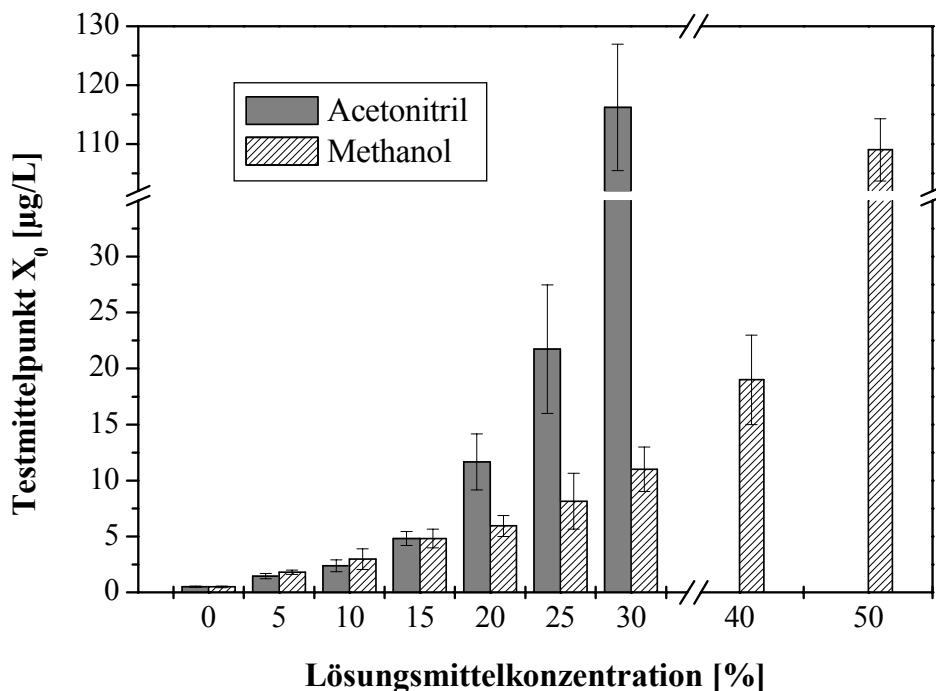


Abbildung 39: Einfluss von Acetonitril und Methanol auf die Sensitivität des direkten SU-ELISAs ($n = 3, 1 \text{ s}$). Testbedingungen: vgl. Tabelle 12. Analyt: Metsulfuron-methyl. Die Standards wurden im entsprechenden Lösungsmittel gelöst.

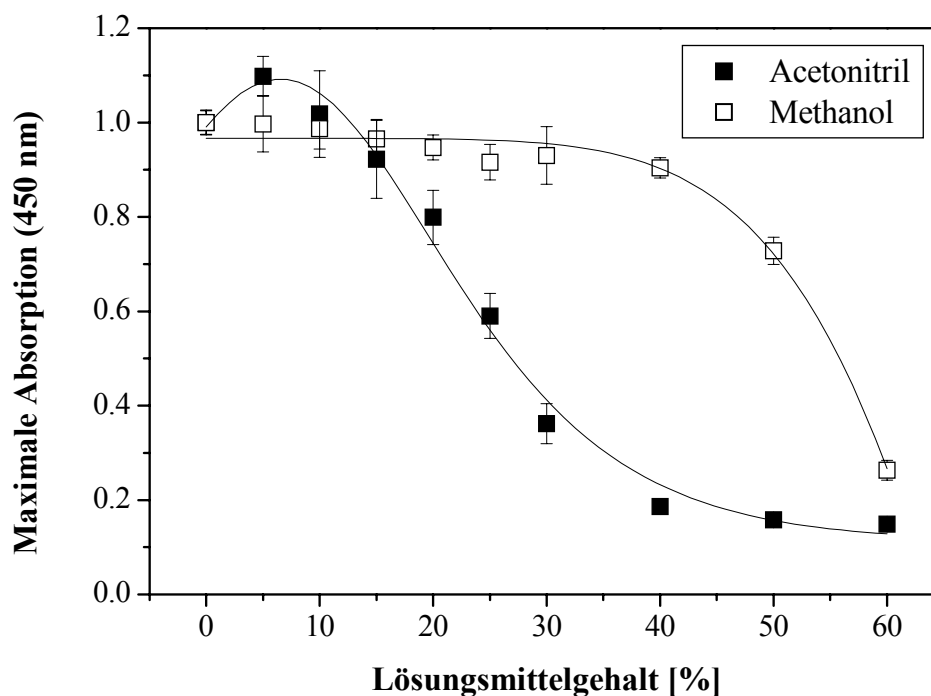


Abbildung 40: Abhängigkeit der maximalen Absorption im direkten SU-ELISA von der Konzentration an Acetonitril bzw. Methanol ($n = 3$, 1 s). Testbedingungen: vgl. Tabelle 12. Analyt: Metsulfuron-methyl. Die Standards wurden im Lösungsmittel gelöst.

1.4.1.6 Zeiteffekte

Beim direkten ELISA konkurrieren Hapten 2-POD-Tracer und Analyt um die Antikörperbindungsstellen. Da die Affinität des Antikörpers gegenüber dem Tracer und dem jeweiligen Analyten nicht genau gleich ist, wurde geprüft, ob das Testergebnis durch eine zeitlich versetzte Aufgabe der beiden Bindungspartner beeinflusst wird. Ein Zeitvorsprung des Tracers gegenüber dem Modellanalyten MSM um 10 Minuten führte dazu, dass der Analyt bei der anschließenden 15-minütigen Kompetition die gebundenen Tracermoleküle deutlich schlechter verdrängen konnte, obwohl die molaren Kreuzreaktivitäten von Hapten 2 und MSM mit 100% und 91% als sehr ähnlich getestet wurden. Offenbar ist die Affinität des Tracers auch durch das Spacermolekül bedingt, bzw. ist die Bindung des Tracers dadurch stärker, dass er tiefer in die Bindungstasche reicht. Um derartige Zeiteffekte zu umgehen, erwies sich eine 30-minütige Vorinkubation mit dem Analyten, gefolgt von einer 15-minütigen Kompetition, als vorteilhaft. Allerdings wurden hier für die Analyten Chlorimuron-ethyl und Mesosulfuron-methyl, die im Vergleich zum Hapten eine extrem hohe molare Kreuzreaktivität aufweisen (271% und 1246%, vgl. Tabellen 15, 17) gegenteilige Effekte beobachtet. So war die Farbentwicklung bei diesen beiden Analyten deut-

lich reduziert, da der Tracer diese nicht mehr entsprechend aus ihren Antikörperbindungen verdrängen konnte. Abhilfe wurde dadurch geschaffen, dass Tracer und Analyt vor dem Antikörperkontakt, also vor der Aufgabe auf die MTP, gemischt wurden.

1.4.1.7 Reproduzierbarkeit

Die Analysengenauigkeit hängt einerseits vom systematischen Fehler, der sog. Richtigkeit, und andererseits vom zufälligen Fehler, der sog. Präzision, ab. Ein direkter Vergleich der Extinktionen verschiedener MTP liefert kein zuverlässiges Kriterium zur Präzisionsbestimmung, da diese von Platte zu Platte durch äußere Einflüsse, wie Temperatur, Substratkonzentration oder Entwicklungszeit starken Schwankungen unterworfen sind. Deshalb muss jede MTP durch interne Standards, die den gleichen Bedingungen unterliegen wie die Proben, neu kalibriert werden.

Bei der Reproduzierbarkeit von ELISAs unterscheidet man zwischen der Intra- und der Inter-Assay-Reproduzierbarkeit. Erstere betrachtet die Werte einer MTP, bei letzterer vergleicht man die Werte verschiedener MTPs. Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit werden üblicherweise die Variationskoeffizienten der Testmittelpunkte oder der Nachweisgrenzen herangezogen. Der Variationskoeffizient des Testmittelpunktes ist naturgemäß niedrig, da die Kalibrierkurve im Testmittelpunkt ihre maximale Steigung und damit auch ihre höchste Genauigkeit besitzt. Umgekehrt weist die sigmoide Kurve an ihren asymptotischen Enden die größte Ungenauigkeit auf. Die Nachweisgrenze wird durch die dreifache (3 s) Standardabweichung vom Mittelwert der Absorption der Nullwerte (höchster Absorptionswert) angegeben.

Tabelle 13: **Inter-Assay-Variationskoeffizienten (VK) (n = 18, 1 s).** Direkter ELISA mit pAk-R03 und den drei Modellanalyten Chlorimuron-ethyl, Metsulfuron-methyl, Primisulfuron-methyl sowie Hapten 2 am Testmittelpunkt und an der Nachweisgrenze (LOD). Testbedingungen vgl. Tabelle 12. (s = Standardabweichung).

Modellanalyten	$X_0 \pm s$ [$\mu\text{g/L}$]	VK [%]	LOD $\pm s$ [$\mu\text{g/L}$]	VK [%]
Hapten 2	0.49 ± 0.10	20	0.07 ± 0.03	43
Chlorimuron-ethyl	0.21 ± 0.04	19	0.04 ± 0.02	50
Metsulfuron-methyl	0.44 ± 0.11	25	0.07 ± 0.04	57
Primisulfuron-methyl	0.80 ± 0.14	18	0.07 ± 0.03	43

Die ermittelten Intra-Assay-Variationskoeffizienten (n = 3) im Testmittelpunkt lagen durchweg unter 5% und an der Nachweisgrenze unter 25%. Als Inter-Assay-Variationen wurden Werte von max. 25% am Testmittelpunkt und zwischen 43% und 57% an der

Nachweisgrenze ermittelt (vgl. Tabelle 13). Die Ursachen für Intra-Assay-Variationen liegen bei Pipettier-, Verfahrens- und Messfehlern. Bei Inter-Assay-Variationen werden zudem Fehler durch Konzentrationsvariationen von Reagenzien, Temperaturunterschiede als auch Veränderungen von Standardlösungen über einen längeren Zeitraum mit einbezogen. Insgesamt lieferte das Testsystem damit eine akzeptable Reproduzierbarkeit.

1.4.2 Optimierung des indirekten Testformates

1.4.2.1 Coating-Antigene

Als Testformat wurde das von SIMON [389] beschriebene Verfahren adaptiert. In diesem indirekten ELISA-Format wurde unter Verwendung eines homologen Coating-Antigens ebenfalls ein erhöhtes Basissignal für die polyklonalen Seren aus der Endphase der Immunisierung erhalten. Daher wurden alternative Coating-Antigene hergestellt, die keine Spacerbrücke besitzen, um den „Spacer-Recognition“-Effekt zu minimieren. Es wurden Hapten 2 und das Antidiabetikum 4-Amino-N-[(butylamino)carbonyl]-benzolsulfonamid über eine Diazo- bzw. Sulfo-NHS-Aktivierungsreaktion an der Aminogruppe an BSA-Carboxylgruppen gekoppelt. Die beiden gewonnenen 4-Amino-N-[(butylamino)carbonyl]-benzolsulfonamid-BSA-Konjugate waren als Coating-Antigene nicht geeignet, da sie von keinem der sieben generierten polyklonalen Antikörper erkannt wurden. Das Sulfo-NHS-generierte Coating-Antigen Hapten 2-BSA lieferte im indirekten Testformat ohne Blockingschritt dennoch starke Basissignale mit Sockelwerten von ca. 25% für pAk-R04 und 65% für pAk-R03, bezogen auf die maximale Absorption. Das Diazoderivat von Hapten 2 als Coating-Antigen lieferte deutlich bessere Basissignale von nur ca. 10% für pAk-R04 und etwa 35% für pAk-R03 bei Signalintensitäten im Bereich von 0.6 bis 0.8 a.u. und wurde daher für den Einsatz im indirekten Test ausgewählt (vgl. Abbildung 41).

1.4.2.2 Konzentrationsverhältnisse

Zur Bestimmung der optimalen Konzentrationen im indirekten Testsystem wurden die Serumkonzentration und die Coating-Antigen-Konzentration auf einer Checkerboard-MTP gegeneinander aufgetragen. Als geeignete Coating-Antigen-Konzentration für das Diazo- und das Sulfo-NHS-Produkt wurden 5 bzw. 2 µg/mL ermittelt. Sowohl für pAk-R03 als auch pAk-R04 erwiesen sich Antiserumverdünnungen von 1:10000 als optimal. Der kommerzielle POD-gelabelte Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper, der als Tracer fungierte, wurde ebenfalls in der Verdünnung 1:10000 eingesetzt. Eine Beispielkurve des indirekten ELISAs zeigt Abbildung 41.

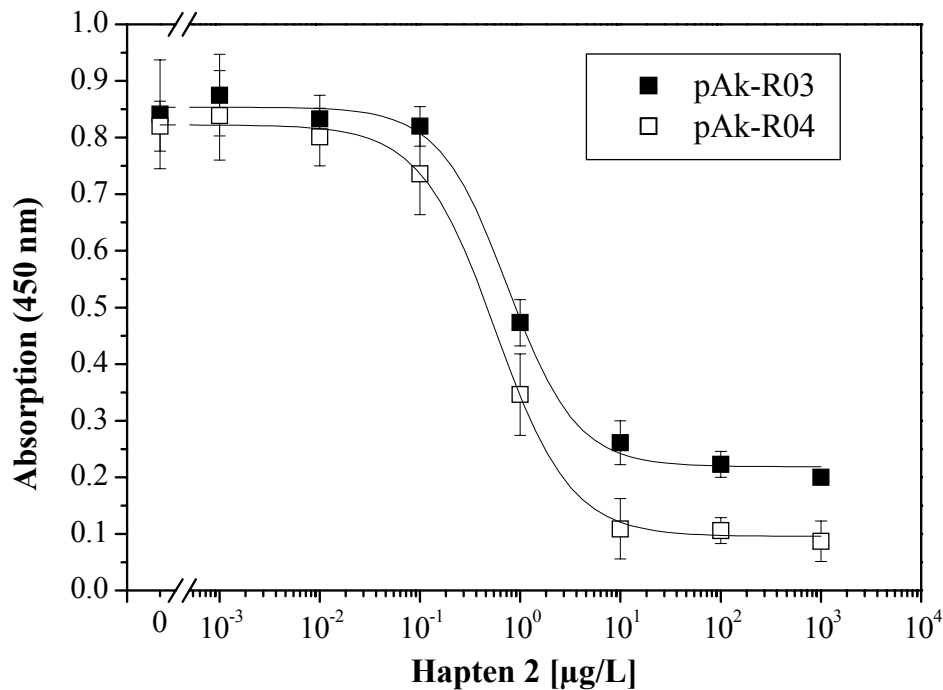


Abbildung 41: Kalibrierkurve des indirekten ELISAs (n = 6, 1 s). Testbedingungen: vgl. Tabelle 14. Analyt: Hapten 2. Testformat für Bestimmung der Kreuzreaktivitäten im indirekten Assay (vgl. III 1.5).

Tabelle 14: Optimierte Testbedingungen für den indirekten kompetitiven klassenspezifischen SU-ELISA.

Arbeitsschritt	Optimierung
Coating	Hapten 2-BSA-Konjugat (Diazoderivat, heterolog), 5 µg/mL, 200 µL, 4°C, ca. 15 h
Blocken	2% BSA, 300 µL, 1 h bei 37°C
Standard bzw. Probe	100 µL, 30 min Inkubation (zusammen mit Antikörper)
Antikörper	pAk-R03, 1:10000, 50 µL, 30 min Inkubation (vgl. Standard)
Tracer	ZAK-POD, 1:10000, 50 µL, 30 Min
Substrat	TMB/H ₂ O ₂ , Entwicklungszeit 20 bis 30 min
Abstoppen	Schwefelsäure (5%), 100 µL

1.4.2.3 Blockreagenzien

Um unspezifische Bindungen von Proteinen an die MTP-Oberfläche zu unterdrücken, wird im Testverlauf nach dem Coatingschritt ein Blockschritt eingefügt, bei dem Proteine auf die MTP-Oberfläche aufgebracht werden, welche die freien Bindungsstellen besetzen. Besonders beim pAk-R03 war eine Reduzierung des hohen Basissignals von etwa 65% bzw. 35% dringend notwendig. Der Einfluss der vier verschiedenen Blockreagenzien wurde für den indirekten ELISA unter Verwendung von pAk-R03 und pAk-R04 getestet und gegenübergestellt (vgl. Abbildung 42).

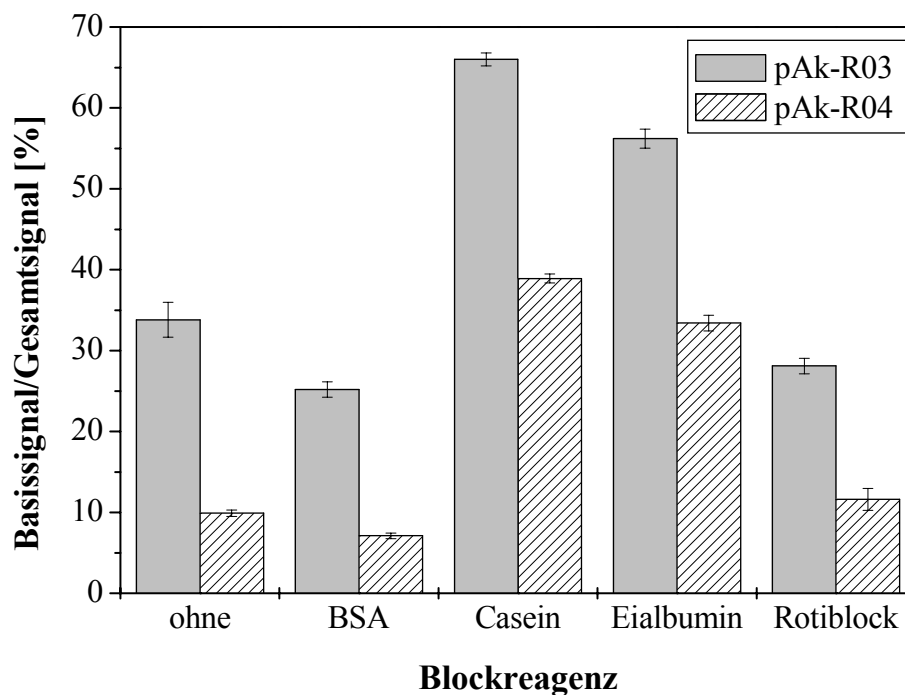


Abbildung 42: Einfluss verschiedener Blockreagenzien auf das Basissignal. Polyklonale Antikörper pAk-R03 und pAk-R04 im Vergleich (n = 3, 1 s). Blockreagenzien: BSA, 2%ig (w/w), Casein 3%ig (w/w), Eialbumin 3%ig (w/w), Rotiblock® 1/10-Verdünnung. Indirekter ELISA: Coating: 5 µg/mL Coating-Antigen (Hapten 2-Diazoderivat, heterolog), Serum: 1:10000, Analyt: Metsulfuron-methyl, Tracer (ZAK-POD) 1:10000, Entwicklungszeit: 20 min.

Während die eingesetzten Proteine Casein und Ovalbumin aus einem kettenförmigen Peptidgrundgerüst mit diversen Resten bestehen, ist BSA globulär strukturiert [390, 391]. Das kommerziell erhältliche Blockreagenz „Rotiblock“ besteht aus einem Polyelektrolyten, einem nichtionischen Tensid und PBS. Neben der räumlichen Struktur, die die Belegungsdichte beeinflusst, spielt für die Wirksamkeit eines Blockreagenzes auch die

Oberflächenladung eine wichtige Rolle. Durch entgegengesetzte Ladungen können beispielsweise unerwünschte Wechselwirkungen mit dem Antikörper herabgesetzt werden. Die Wahl des geeigneten Blockreagenzes ist aber nicht nur von der Reduktion des Sockelwertes, sondern auch von dessen Einfluss auf die Sensitivität des Immunoassays abhängig. So konnte bei den mit dem Sulfo-NHS-Derivat gecoateten Platten mittels der vier aufgeführten Blockreagenzien insbesondere deshalb keine Signalverbesserung erzielt werden, da die maximale Absorption durch alle Blockreagenzien ebenfalls deutlich reduziert wurde. Die vergleichsweise niedrigeren Ausgangssockelwerte beim Coating mit dem Diazo-Derivat (vgl. III 1.4.2.1) konnten durch einen zusätzlichen Block-Schritt mit BSA-Lösung (2%ig, w/w) auf ca. 7% (pAk-R04) und 25% (pAk-R03) reduziert werden.

1.4.2.4 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit des indirekten ELISAs wurde für pAK-R03 und den Modellanalyten Hapten 2 ermittelt. Am Testmittelpunkt lag der Intra-Assay-Variationskoeffizient bei $< 5\%$ ($n = 3$) und der Inter-Assay-Variationskoeffizient bei 24% ($n = 9$). Der erhaltene durchschnittliche Testmittelpunkt war dabei $0.78 \pm 0.18 \mu\text{g/L}$, die Nachweisgrenze $0.20 \pm 0.12 \mu\text{g/L}$. Der Intra-Assay-Variationskoeffizient ($n = 3$) an der Nachweisgrenze lag durchwegs unter 40% und die Inter-Assay-Variation ($n = 9$) bei 60% . Damit ist die Reproduzierbarkeit hier zwar etwas schlechter als beim direkten Format, jedoch innerhalb eines für Immunoassays üblichen Bereiches [389].

1.5 Kreuzreaktivitäten

1.5.1 Sulfonylharnstoffherbizide

Alle sieben hergestellten polyklonalen Kaninchenseren wurden im direkten ELISA auf ihre Kreuzreaktivitäten gegenüber 30 SUs getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 43 im Überblick als Matrix dargestellt. Als Bezugsgröße zur Bestimmung der Kreuzreaktivitäten wurde der Testmittelpunkt einer Kalibrierung mit dem entsprechenden Hapten herangezogen. Für die pAk-R01/02 diente folglich Hapten 1, für pAk-R03/04 Hapten 2 und für pAk-R05/06 Hapten 3 als Vergleichssubstanz, deren Kreuzreaktivität als 100%-Wert definiert wurde. Für das Serum pAk-R07, das aus der Mischimmunisierung stammte, die ab der 36. Woche allein mit Immunogen 2 fortgeführt wurde, wurde Hapten 2 als Vergleichssubstanz eingesetzt.

Die durch Immunisierung mit dem Triazinderivat gewonnenen Antikörper pAk-R05 und pAk-R06 kreuzreagierten lediglich schwach mit Tribenuron-methyl bzw. überhaupt nicht, wie dies auch bei den erhaltenen Klonen bei der monoklonalen Antikörperproduktion mit diesem Immunogen der Fall war (vgl. III 1.3.1). Die pAk-R01 und pAk-R02, die durch Immunisierung mit dem Benzylsulfonamiderivat hergestellt wurden, zeigten mit jeweils

vier SUs eine Kreuzreaktion. Bei den mit Hapten 2 immunisierten Tieren R03 und R04 zeigte pAk-R03 eine deutlich breitere Kreuzreaktivität. Das Serum des mischimmunisierten Kaninchens R07 lieferte ebenfalls eine relativ breite Erkennung von insgesamt neun SUs, mit z.T. hoher Sensitivität (gegenüber Jodosulfuron-, Primisulfuron- und Sulfometuron-methyl) und einem im Vergleich zu Serum R03 unterschiedlichen Selektivitätsmuster.

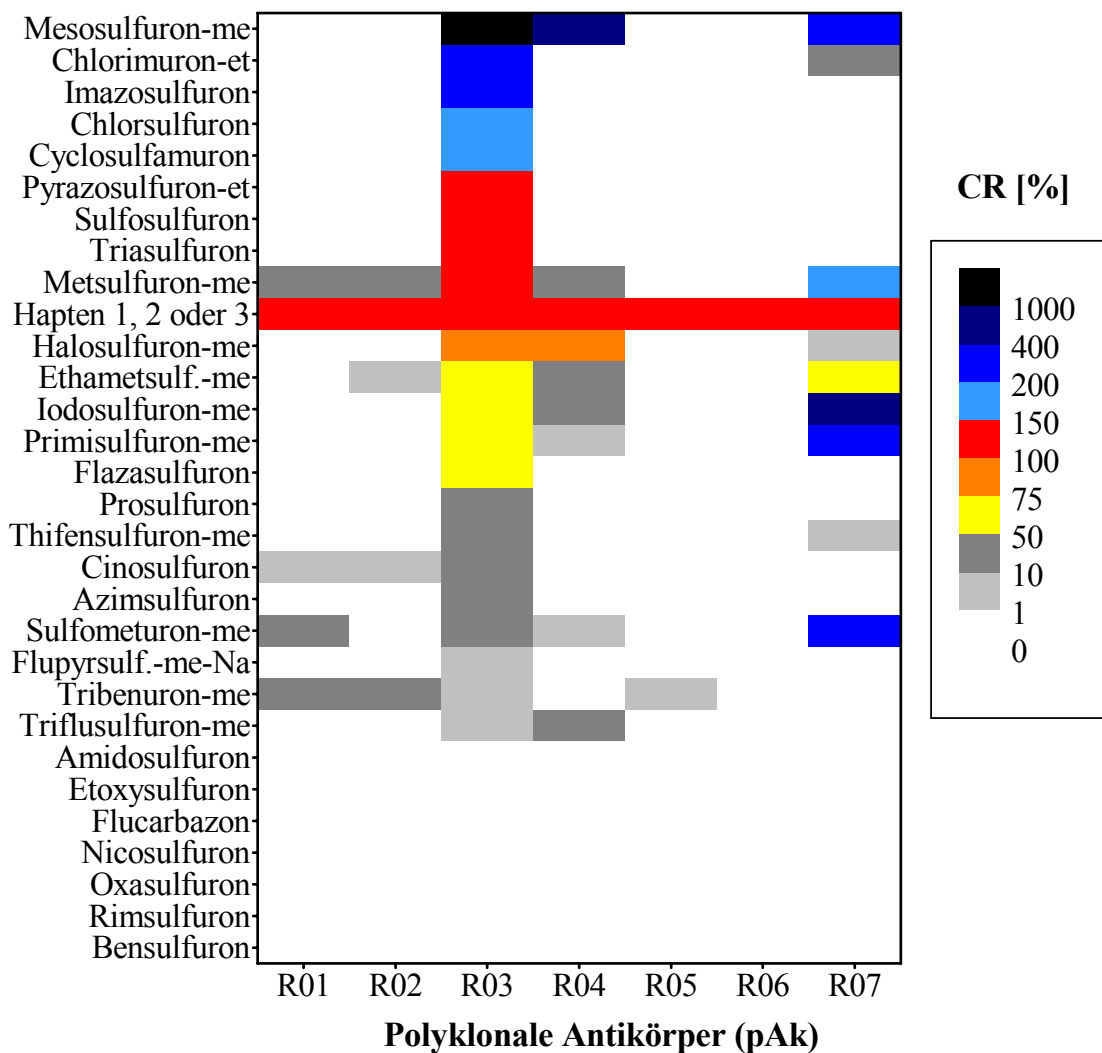


Abbildung 43: Matrixdarstellung der Kreuzreaktivitätsmuster der sieben hergestellten polyklonalen Antikörper pAk-R01 bis pAk-R07 gegenüber 30 SUs. CR = Kreuzreaktivität [%]. Berechnung: Gleichung 5, Kapitel II 3.2.5. Referenzsubstanzen: Haptene 1, 2 und 3 (CR = 100%).

Die breite Kreuzreaktivität von pAk-R03 gegenüber 19 SUs bei gleichzeitiger hoher Sensitivität ist außergewöhnlich. Zwar gilt es allgemein als einfacher, breitbandige Antikörper herzustellen, als solche, die nur eine Verbindung spezifisch erkennen, jedoch ist auch eine derart breite Kreuzreaktivität eher selten. In der Regel spricht man schon bei Kreuzreaktivitäten gegenüber 4 bis 10 Verbindungen von breiter Erkennung. Zudem zeigen derart breit reagierende Antikörper selten eine derart hohe Sensitivität, wie im vorliegenden Fall. Die SUs betreffend, beschreiben bisher lediglich zwei Veröffentlichungen die Herstellung von anti-SU-Antikörpern, die vier bis acht der Herbizide gleichzeitig mit einer Kreuzreaktivität über 10% erkennen [166, 171]. Auch die Ergebnisse der Immunisierung der Kaninchen R04 und R07 machen deutlich, dass es in Abhängigkeit vom eingesetzten Hapten gut möglich ist, pAk gegen mehrere SUs herzustellen. Die breite Erkennung von pAk-R03 ist offensichtlich auf eine individuelle Besonderheit in der Immunreaktion des Organismus des betreffenden Kaninchens zurückzuführen, die nicht ohne weiteres reproduzierbar scheint. Für eine statistisch gesicherte Aussage dazu wären jedoch Reihenimmunisierungen notwendig.

Aus akademischen Interesse wurden das breit kreuzreagierende Serum pAk-R03 und das unter gleichen Versuchsbedingungen hergestellte Serum pAk-R04 zusätzlich im indirekten Testformat auf Kreuzreaktivitäten getestet und mit dem direkten Format verglichen. Die Ergebnisse für pAk-R03/04 sind in Tabelle 15 und 16 zusammengefasst. Die im direkten Test mit pAk-R03 kreuzreagierenden 19 SUs lassen sich untergliedern in neun Herbizide, die im direkten ELISA eine höhere Affinität zu pAk-R03 aufweisen als Hapten 2 (CR = 100%), und in zehn Herbizide, deren Kreuzreaktivität zwischen 10 und 100% liegt. Außerdem wurde im direkten Format noch eine sehr geringe Kreuzreaktivität gegenüber weiteren drei SUs mit Werten von 1 bis 3% festgestellt. Auffällig ist auch die gegenüber dem Hapten 2 um mehr als das Zehnfache höhere Kreuzreaktivität von Mesosulfuron-methyl (CR = 1050%). Das liegt darin begründet, dass Hapten 2 ein Derivat des Mesosulfuron-methyls ist und somit die Strukturübereinstimmung der beiden Verbindungen am größten ist. Im indirekten Testformat wurden sogar insgesamt 24 SUs mit Kreuzreaktivitäten größer als 10% getestet. Davon zeigten 13 Verbindungen eine Kreuzreaktivität über 100% und elf Substanzen zwischen 10 und 100%. Dabei ergaben sich zwischen den beiden Assay-Formaten auch relativ große Abweichungen in der Sensitivität gegenüber einzelnen SUs. Der pAk-R04 zeigt in beiden Assays lediglich für Mesosulfuron-methyl eine höhere Kreuzreaktivität im Vergleich zum Hapten 2. Für fünf weitere SUs liegt die Kreuzreaktivität zwischen 10 und 100%, bei vier davon mit gleicher Tendenz in beiden Tests. Unterschiede bestehen für Triflursulfuron-methyl, das im direkten Test eine Kreuzreaktivität von 18% zeigt und im indirekten lediglich von 3%. Umgekehrt zeigt Sulfometuron-methyl im indirekten Test eine Kreuzreaktivität von 23%, im direkten Test hingegen von 7%.

Tabelle 15: Kreuzreaktivitäten (CR) von pAk-R03 gegenüber Sulfonylharnstoffherbiziden im direkten und indirekten ELISA. Testbedingungen: vgl. Tabellen 12 und 14. Berechnung: Gleichung 5, Kapitel II 3.2.5. Referenzsubstanz: Haptene 2 (CR = 100%).

Sulfonylharnstoffherbizid	direkter ELISA		indirekter ELISA	
	X ₀ [µg/L]	CR [%]	X ₀ [µg/L]	CR [%]
Mesosulfuron-methyl	0.05	1050	0.1	537
Chlorimuron-ethyl	0.2	277	0.3	285
Imazosulfuron	0.1	229	0.2	259
Chlorsulfuron	0.7	197	5.3	15
Cyclosulfamuron	0.3	153	1.1	57
Pyrazosulfuron-ethyl	0.2	144	0.8	158
Sulfosulfuron	0.4	128	0.5	103
Triasulfuron	0.5	110	0.2	328
Metsulfuron-methyl	0.5	101	0.8	107
Hapten 2	0.5	100	0.8	100
Halosulfuron-methyl	1.8	75	0.3	148
Ethametsulfuron-methyl	0.8	68	0.4	116
Iodosulfuron-methyl	0.5	66	0.6	110
Primisulfuron-methyl	0.8	60	0.4	221
Flazasulfuron	1.0	57	1.6	80
Prosulfuron	1.5	48	0.3	197
Thifensulfuron-methyl	1.4	33	6.5	12
Cinosulfuron	2.4	20	3.5	21
Azimsulfuron	3.0	16	1.3	40
Sulfometuron-methyl	8.2	16	0.5	162
Flupyrsulfuron-methyl-Na	13.1	3	23.5	2
Tribenuron-methyl	30.4	2	18.4	5
Triflusulfuron-methyl	73.4	1	1.1	60
Amidosulfuron	> 100	< 0.5	> 160	< 0.5
Etoxysulfuron	> 100	< 0.5	5.3	15
Flucarbazon	> 100	< 0.5	51.9	1
Nicosulfuron	> 100	< 0.5	0.8	77
Oxasulfuron	> 100	< 0.5	4.7	27
Rimsulfuron	> 100	< 0.5	1.2	65
Bensulfuron-methyl	n.r.	n.r.	9.7	8
Propoxycarbazon	n.r.	n.r.	> 160	< 0.5

n.r.: nicht reaktiv, keine Kreuzreaktion

Tabelle 16: Kreuzreaktivitäten (CR) von pAk-R04 gegenüber Sulfonylharnstoffherbiziden im direkten und indirekten ELISA. Testbedingungen: vgl. Tabellen 12 und 14. Berechnung: Gleichung 5, Kapitel II 3.2.5. Referenzsubstanz: Haptene 2 (CR = 100%).

Sulfonylharnstoffherbizid*	direkter ELISA		indirekter ELISA	
	X ₀ [µg/L]	CR [%]	X ₀ [µg/L]	CR [%]
Mesosulfuron-methyl	0.1	711	0.2	375
Hapten 2	0.6	100	0.6	100
Halosulfuron-methyl	2.3	77	0.8	73
Metsulfuron-methyl	3.2	23	3.4	19
Iodosulfuron-methyl	4.7	19	1.6	27
Triflusulfuron-methyl	3.3	18	21.8	3
Ethametsulfuron-methyl	2.9	14	1.0	57
Primisulfuron-methyl	7.0	8	23.8	2
Sulfometuron-methyl	11.8	7	2.8	23
Chlorimuron-ethyl	> 100	< 0.5	9.5	7
Thifensulfuron-methyl	> 100	< 0.5	16.2	3
Pyrazosulfuron-ethyl	n.r.	n.r.	99.4	0.5
Flupyrsulfuron-methyl-Na	n.r.	n.r.	60.9	0.9
Tribenuron-methyl	n.r.	n.r.	97.0	0.7

* Insgesamt wurden 30 Sulfonylharnstoffherbizide hinsichtlich der Kreuzreaktivität getestet (s. Tabelle 15). In beiden Testformaten negativ getestete Substanzen sind in der vorliegenden Tabelle nicht aufgeführt.

Direkter und indirekter kompetitiver Immunoassay sind mechanistisch ähnlich und sollten daher vergleichbare Testergebnisse liefern. Coating-Antigene sind im Gegensatz zu Tracern jedoch oft multivalent, d.h. die Protein-Hapten-Konjugate tragen an ihrer Oberfläche meist mehrere Haptene, da die Ausgangsproteine mehrere kopplungsfähige Gruppen besitzen und eine Monovalenz synthetisch schwer zu erzeugen ist. Die multivalenten Proteinkonjugate erlauben damit eine bivalente Bindung der Antikörper, die stärker ist, als die monovalente Bindung zum Analyten, was zu einer Diskriminierung der Letzteren führen kann. Bei POD als Tracerenzym ist eine bivalente Bindung hingegen aus sterischen Gründen nahezu ausgeschlossen, da sie nur zwei freie kopplungsfähige Aminogruppen besitzt. So lassen sich die Unterschiede zwischen den im indirekten und direkten Test ermittelten Kreuzreaktivitätsmuster u.U. erklären. Inwiefern strukturelle Unterschiede durch verschiedene Kopplungsreaktionen bei der Synthese von Tracer und Coating-Antigen ebenfalls eine Rolle spielen, kann nicht abschließend beurteilt werden.

Die Herleitung eines Zusammenhangs zwischen Strukturhomologien einzelner SUs und dem Kreuzreaktivitätsmuster des Antikörpers ist aufgrund seiner sehr breiten Erkennung

schwierig (vgl. Tabelle 4). Generell spielen sterische Übereinstimmungen, die Ladungsverhältnisse von einzelnen Atomen, die Hydrophobizität von einzelnen Molekülbereichen und deren Wasserstoffdonor- und -akzeptoreigenschaften für eine Wechselwirkung zwischen Antikörper und Analyt eine Rolle. Der rechte SU-Molekülteil ist scheinbar unabhängig von der Intensität der Kreuzreaktion, da sowohl Verbindungen mit Pyrimidin- als auch Triazinderivatresten sehr verschieden stark kreuzreagieren. Es ist lediglich auffällig, dass die beiden SUs Flucarbazon und Propoxycarbazon, deren rechter Molekülteil aus einem heterocyclischen 5-Ringsystem besteht, nicht kreuzreagieren. Auch den linken Molekülteil betreffend, werden von dem pAk-R03 sehr diverse Strukturen erkannt. Betrachtet man die räumliche Struktur des Haptens 2, so ist die Erkennung von der an den Carrier gebundenen Seite her unwahrscheinlich, falls der Erkennungsbereich nicht tief in die Bindungstasche des Antikörpers hineinragt und das Molekül komplett umschlossen wird. Folglich ist die in vielen SUs in ortho-Position vorkommende Methylcarbonsäuregruppe für die Antikörperbindung von untergeordneter Bedeutung. Demgegenüber liegen aber auch brückenerkennende Antikörper vor, wie vorausgehend gezeigt werden konnte.

Modifikationen an der Sulfonylharnstoffbrücke selbst, behindern die Antikörperbindung, wie die Beispiele Flupyr sulfuron-methyl-Natrium und Tribenuron-methyl zeigen. Positiv für die Erkennung ist auch eine direkte Verknüpfung der Sulfonylharnstoffbrücke mit einem Benzyl- oder 5-Ringsystem, ohne dass wie bei Bensulfuron-methyl und Ethoxysulfuron eine CH₂-Gruppe oder O-Atom dazwischen steht. Die bei Cyclosulfuron zwischen Sulfonylharnstoffbrücke und Benzylrest positionierte NH-Gruppe beeinträchtigt die Antikörpererkennung jedoch nicht. Die Notwendigkeit eines cyclischen Systems neben der Sulfonylharnstoffbrücke wird dadurch belegt, dass Amidosulfuron, der einzige getestete SU mit aliphatischem Substituenten, praktisch keine Kreuzreaktion zeigt.

Neben der Raumstruktur der Verbindungen, sind die Partialladungsverhältnisse von Bedeutung. Stark elektronegative Atome, wie Fluor (EN = 4.0), Sauerstoff (EN = 3.5), Chlor und Stickstoff (EN = 3.0), besitzen die Fähigkeit, innerhalb eines Moleküls Elektronen von Nachbaratomen anzuziehen. Die drei nach Mesosulfuron-methyl am stärksten kreuzreagierenden Verbindungen Chlorimuron-ethyl, Imazosulfuron und Chlorsulfuron besitzen jeweils ein elektronenziehendes Chloratom, ebenso wie Triasulfuron und Halosulfuron-methyl, die in der Rangfolge der höchsten Kreuzreaktivitäten an 8. und 10. Position stehen. Die Sulfonylharnstoffbrücke selbst kann durch die Deprotonierbarkeit am zur SO₂-Gruppe benachbarten N-Atom als negativ geladene Gruppe vorliegen, so dass Wechselwirkungen mit positiv geladenen Gruppen in der Antikörperbindungstasche bevorzugt sind. Hydrophobe Moleküloberflächen sind laut Modellstudien [392, 393] vor allem am Triazin- bzw. Pyrimidinrest, aber auch in Abhängigkeit von dessen Substituenten am Benzylring zu

erwarten. Außerdem müssen π -Elektron-Kation-Wechselwirkungen zwischen Benzylresten der Analyten und der Antikörperbindungstasche in Betracht gezogen werden [226].

Da polyklonale Seren zudem eine Mischung aus verschiedenen Antikörpern darstellen, muss man davon ausgehen, dass das erhaltene Kreuzreaktivitätsmuster nicht allein auf einen einzelnen Antikörper zurückzuführen ist, sondern ein Mischmuster aus zwei oder mehr Antikörpern wiedergibt. Dabei liegen aber auch in polyklonalen Seren selten mehrere Antikörper von hoher Sensitivität vor und man erhält durch die starke Verdünnung des Serums i.d.R. ein sog. „pseudomonoklonales“ Serum [394], da die enthaltenen, weniger sensitiven Antikörper durch Verdünnung ausgeschaltet werden. Beim vorliegenden Serum liegt die Vermutung sehr nahe, dass dennoch mehrere sensitive Antikörper nebeneinander vorliegen, da eine enorm breite Erkennung verschiedener Strukturen gegeben ist. Man könnte dies untersuchen, indem man das polyklonale Serums affinitätschromatographisch auftrennt und somit monoklonale Antikörperfraktionen erhält, die separat auf ihre Kreuzreaktivität getestet werden können. Dieser Weg wurde von GIRAUDI ET AL. beschrieben, die ein Testosteron-Antiserum fraktionierten und damit die Selektivität erhöhten [395]. Für die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bringt die Aufschlüsselung der Antiserumzusammensetzung jedoch keinen praktischen Nutzen.

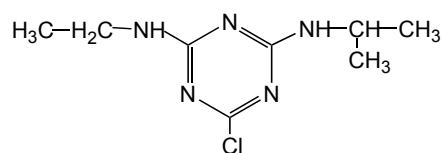
1.5.2 Strukturell verwandte Verbindungen

Aufgrund der breiten Erkennung von SUs durch pAk-R03 wurden die polyklonalen Seren hinsichtlich ihrer Kreuzreaktivitäten gegenüber weiteren, den SUs strukturell ähnlichen Verbindungen, wie 2 Triazinen (Atrazin, Simazin), 4 Phenylharnstoffherbiziden (Triflururon, Diflubenuron, Flufenoxuron, Monolinuron) und 4 Sulfonylharnstoffantidiabetika (Glipizid, Gliclazid, Glibenclamid, N1-(Butylcarbamoyl)-sulfonylamid) untersucht. Dafür wurde das direkte ELISA-Format herangezogen (vgl. Abbildung 44).

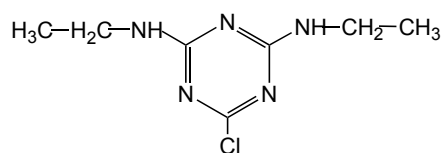
Dabei ergaben sich für Atrazin und Simazin Kreuzreaktivitäten von 0.2% und 3.0% für pAk-R05, respektive 1.0% und 2.0% für pAk-R06. Hier bestätigt sich wiederum das bei der monoklonalen Antikörperproduktion erzielte Ergebnis, wo ebenfalls die mit Hapten 3 gewonnenen Klone eine höhere Affinität zu den Triazinen Atrazin und Simazin zeigten, als zu SUs. Auch wenn die vorliegenden Daten von drei monoklonalen und zwei polyklonalen Antikörpern eine statistische Aussage nicht zulassen, so kann doch angenommen werden, dass bei Hapten 3 (Triazinderivat) die Wahrscheinlichkeit Antikörper zu gewinnen, die Triazine und nicht SUs erkennen, erhöht ist, auch wenn KOLÁR ET AL. mit dem gleichen Hapten Antikörper mit SU-Erkennung generieren konnten [171].

Weiterhin zeigten pAk-R03 und pAk-R04 eine geringe Kreuzreaktivität von 0.4% bzw. 0.6% gegenüber dem Phenylharnstoffherbizid Flufenoxuron. Alle anderen untersuchten Substanzen erwiesen sich als nicht reaktiv. Damit ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass

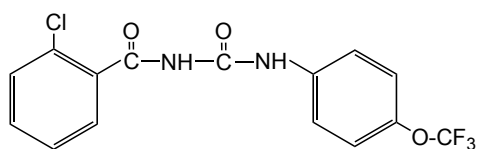
besonders bei pAk-R03, trotz seiner sehr breiten SU-Erkennung, über diese Substanzklasse hinaus nur geringe bis keine Affinitäten zu verwandten Verbindungen zu erwarten sind. Auch wenn eine abschließende Aussage hier nur nach noch umfangreicheren Tests strukturverwandter Substanzen getroffen werden kann, spricht für diese These, dass als Analyten bereits möglichst SU-ähnliche Verbindungen ausgewählt wurden.



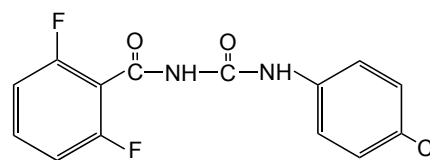
Atrazin



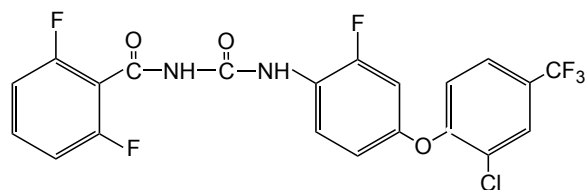
Simazin



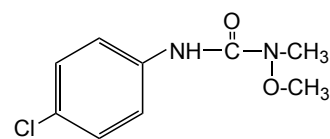
Triflumuron



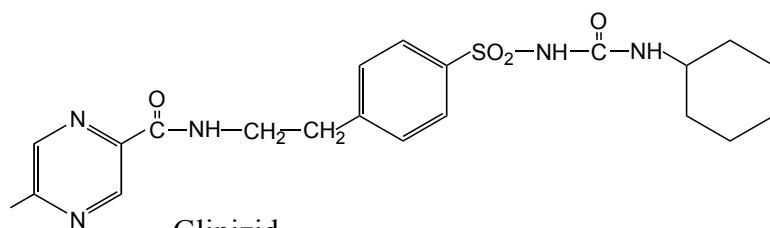
Diflubenzuron



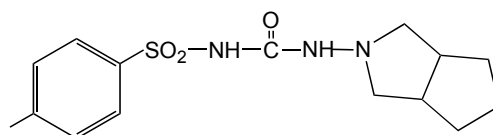
Flufenoxuron



Monolinuron



Glipizid



Gliclazid

Abbildung 44: Strukturen der auf Kreuzreaktionen untersuchten Verbindungen, soweit nicht bereits gezeigt. Glibenclamid (Struktur vgl. Tabelle 5), 4-Amino-N-[(butylamino)carbonyl]-benzolsulfonamid (Struktur vgl. Abbildung 25).

1.6 Affinitätskonstanten

Die Affinitätskonstante (Avidität) des eingesetzten Antiserums pAk-R03 kann durch eine Näherungsrechnung unter optimierten Testbedingungen aus dem Testmittelpunkt ermittelt werden (vgl. Kapitel II 3.2.4). Da die Testmittelpunkte der Modellanalyten Meso- und Metsulfuron-methyl im eingesetzten ELISA (Antiserumverdünnung 1:10000) auch bei weiterer Verdünnung des Antiserums nicht reduziert werden konnten, ist bewiesen, dass das Testsystem so optimiert wurde, dass die Affinitätskonstante des polyklonalen Antikörpers direkt aus dem Testmittelpunkt der jeweiligen Testsubstanz ermittelt werden kann. Die in Tabelle 17 aufgeführten massenbezogenen Affinitätskonstanten wurden anhand Gleichung 4 (vgl. II 3.2.4) unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors 0.8 (200 μ L Standard + 50 μ L Tracer) errechnet und mittels der Molekulargewichte der einzelnen SUS in die molaren Affinitätskonstanten umgerechnet. Für Mesosulfuron-methyl sind die Näherungskurven der Abhängigkeit der Testmittelpunkte von der Antikörperverdünnung bei zwei verschiedenen Tracerverdünnungen in Abbildung 45 exemplarisch dargestellt. Beide Kurven nähern sich mit zunehmender Antikörperverdünnung dem Grenzwert, welcher der Testmittelpunkt des optimierten Testes ist.

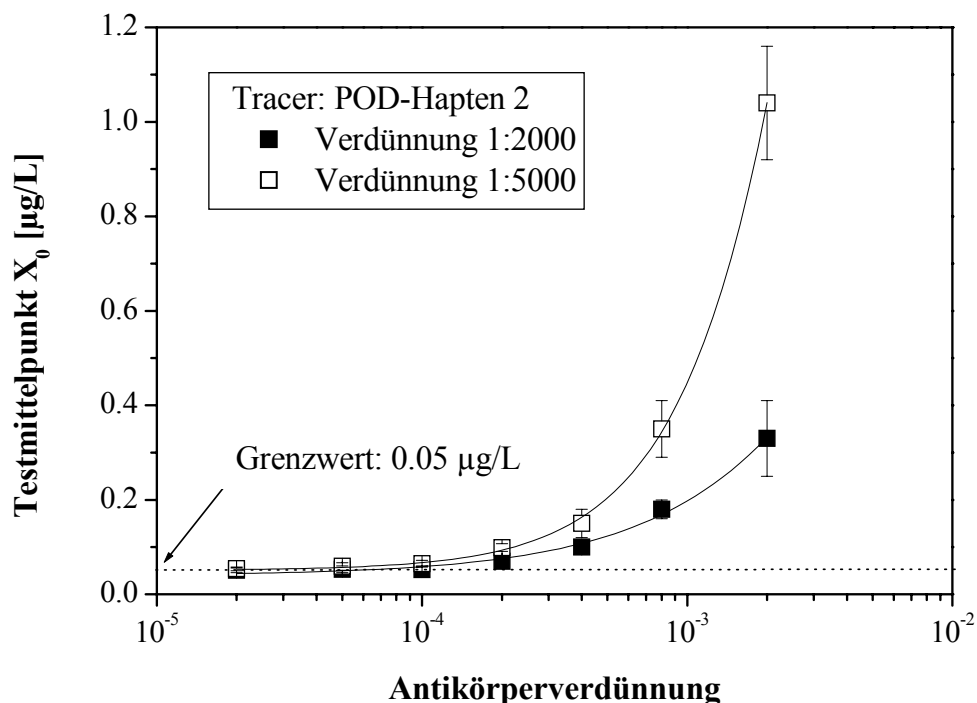


Abbildung 45: Bestimmung des Testmittelpunktes (Grenzwert) zur Berechnung der Affinitätskonstanten für das Antiserum pAk-R03 und den Analyten Mesosulfuron-methyl ($n = 6, 1 s$). Testbedingungen: vgl. Tabelle 12.

Tabelle 17: Affinitätskonstanten **K** sowie massenbezogene und molare Kreuzreaktivitäten (**CR_m**, **CR_{mol}**) des polyklonalen Antikörpers pAk-R03. Ermittelt im direkten ELISA. Testbedingungen: vgl. Tabelle 12. Molare Massen (SUs) vgl. Tabelle 4. M_r (Hapten 2) = 424.4 g/mol.

Sulfonylharnstoff	CR _m [%]	CR _{mol} [%]	K [L/g]	K [L/mol]
Mesosulfuron-me	1050	1246	2.5×10^7	1.3×10^{10}
Chlorimuron-et	277	271	6.3×10^6	2.6×10^9
Imazosulfuron	229	223	1.3×10^7	5.2×10^9
Chlorsulfuron	197	166	1.8×10^6	6.4×10^8
Cyclosulfamuron	153	152	4.2×10^6	1.8×10^9
Pyrazosulfuron-et	144	141	6.3×10^6	2.6×10^9
Sulfosulfuron	128	142	3.1×10^6	1.5×10^9
Triasulfuron	110	104	2.5×10^6	1.0×10^9
Metsulfuron-me	101	91	2.5×10^6	9.5×10^8
Hapten 2	100	100	2.5×10^6	1.1×10^9
Halosulfuron-me	75	77	6.9×10^5	3.0×10^8
Ethametsulfuron-me	68	66	1.6×10^6	6.4×10^8
Iodosulfuron-me	66	79	2.5×10^6	1.3×10^9
Primisulfuron-me	60	66	1.6×10^6	7.3×10^8
Flazasulfuron	57	55	1.3×10^6	5.1×10^8
Prosulfuron	48	47	8.3×10^5	3.5×10^8
Thifensulfuron-me	33	30	8.9×10^5	3.5×10^8
Cinosulfuron	20	19	5.2×10^5	2.2×10^8
Azimsulfuron	16	16	4.2×10^5	1.8×10^8
Sulfometuron-me	16	14	1.5×10^5	5.6×10^7
Flupyralsulfuron-me-Na	3	3	9.5×10^4	4.6×10^7
Tribenuron-me	2	2	4.1×10^4	1.6×10^7
Triflusulfuron-me	1	1	1.7×10^4	8.2×10^6
Amidosulfuron	< 0.5	< 0.4	< 1.3×10^4	< 4.6×10^6
Etoxysulfuron	< 0.5	< 0.5	< 1.3×10^4	< 5.0×10^6
Flucarbazon	< 0.5	< 0.5	< 1.3×10^4	< 5.2×10^6
Nicosulfuron	< 0.5	< 0.5	< 1.3×10^4	< 5.1×10^6
Oxasulfuron	< 0.5	< 0.5	< 1.3×10^4	< 5.1×10^6
Rimsulfuron	< 0.5	< 0.5	< 1.3×10^4	< 5.4×10^6

2 Untersuchung von Realproben mittels klassenspezifischem direktem ELISA

2.1 Gespikte Oberflächenwässer

2.1.1 Probenbeschaffenheit

Es wurden jeweils drei verschiedene Fluss- und Seewasserproben und eine Leitungswasserprobe für die Validierung des direkten Screening-ELISAs herangezogen. Die Proben wurden im Uferbereich von *Ammersee*, *Starnberger See* und *Wörthsee* sowie am Rande des Flussbettes von *Windach*, *Loisach* und *Isar* an ländlich gelegenen Stellen im Westen (Nähe Landsberg a. Lech) und Süden (Nähe Wolfratshausen) von München entnommen und bis zur Analyse unter Kühlung in braunen Glasflaschen (1L) aufbewahrt. Das Leitungswasser stammte aus der Hauswasserversorgung des Instituts für Wasserchemie. Die frischen Proben wurden einer kurzen sensorischen Analyse bezüglich Aussehen und Geruch unterzogen; sowie der pH-Wert und der gelöste organische Kohlenstoffgehalt (DOC) bestimmt. Das Leitungswasser wurde ohne Vorbehandlung eingesetzt, die Oberflächenwässer wurden über einen Glasfaserfilter gegeben, um sie von Partikeln größer 0.45 µm zu befreien.

Tabelle 18: Sensorik, pH-Wert, DOC-Gehalt der eingesetzten Wasserproben.

Wasserprobe	Aussehen	Geruch	pH-Wert	DOC [mg/L]
Leitungswasser	farblos, klar	geruchlos	7.6	< 0.10
<i>Isar</i>	farblos, klar	geruchlos	8.2	1.19
<i>Loisach</i>	farblos bis leicht trüb	geruchlos	7.9	2.01
<i>Windach</i>	farblos bis leicht trüb	geruchlos	8.0	2.52
<i>Ammersee</i>	farblos bis leicht trüb	geruchlos	8.1	2.76
<i>Starnberger See</i>	farblos bis leicht trüb	geruchlos	8.3	2.85
<i>Wörthsee</i>	farblos	geruchlos	7.9	1.56

Nach der Prüfung auf evtl. Anwesenheit von SUs, wurden diese sieben Realproben jeweils mit einem der drei Analyten Chlorimuron-ethyl, Metsulfuron-methyl oder Primisulfuron-methyl in einer Konzentration von 100, 200 bzw. 500 ng/L gespikt und dann direkt für den ELISA bzw. die SPE-Anreicherung zur Referenzanalytik mittels HPLC eingesetzt. Die drei Zielanalyten wurden ausgewählt, da sie Verbindungen mit einer hohen, mittleren und geringen Kreuzreaktivität repräsentieren. Die Quantifizierung von mehreren SUs neben-

einander ist nicht möglich, da die Affinität des pAk-R03 gegenüber einzelnen Verbindungen variiert und der relative Gehalt einzelner Komponenten in Realproben unbekannt ist.

2.1.2 Kalibrierung

Die Kalibrierkurven des direkten ELISA für Chlorimuron-ethyl, Primisulfuron-methyl und Metsulfuron-methyl wurden durch Vermessen der Standards in bidestilliertem Wasser im Konzentrationsbereich von 0 bis 100 µg/L ermittelt und sind in Abbildung 46 dargestellt.

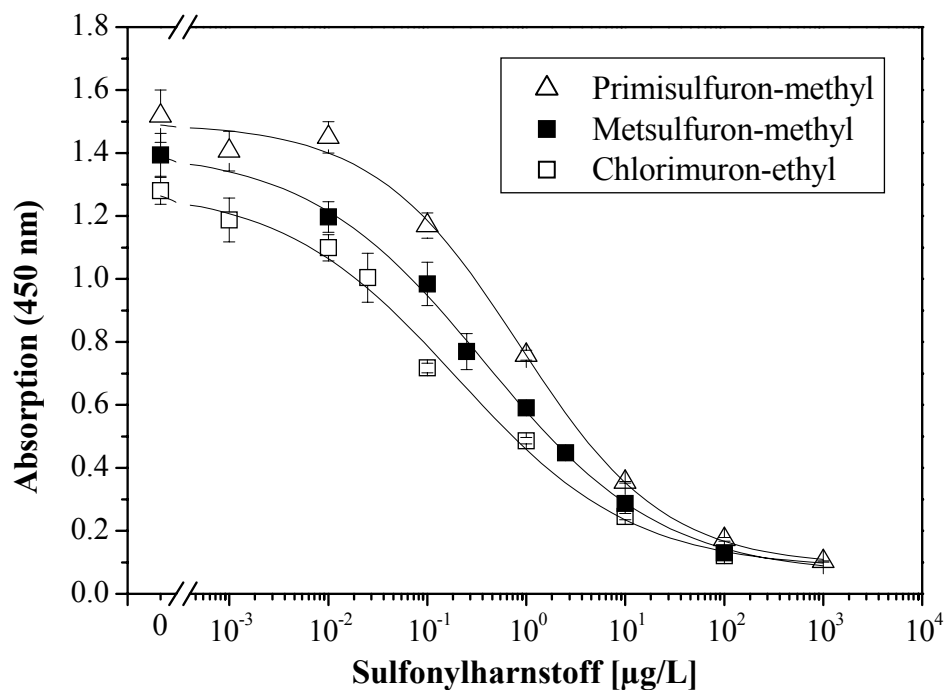


Abbildung 46: Kalibrierkurven der drei ausgewählten Sulfonylharnstoffe Chlorimuron-ethyl, Primisulfuron-methyl und Metsulfuron-methyl in bidestilliertem Wasser (n = 3, 1 s). Auf unabhängigen MTPs erstellt. Darstellung: Median, Spannweite. Bedingungen: vgl. Tabelle 12.

Zur Generierung von Kalibrier- und Messwerten für den Analyten Chlorimuron-ethyl, wurde die Standardprozedur leicht variiert. Aufgrund seiner hohen Affinität zum Antikörper war es notwendig, Tracer und Analyt vor der Aufgabe auf die MTP zu mischen, um Zeiteffekte auszuschließen.

2.1.3 Matrixeffekte

Zur Prüfung von Matrixeffekten wurden mittels gespikter Realproben erzeugte Kalibrierkurven mit der Kalibrierung in bidestilliertem Wasser verglichen. Wie in Abbildung 51 dargestellt, wurde in den eingesetzten Oberflächenwässern ein geringer Effekt festgestellt,

dessen Ursache hauptsächlich in der Auftragsreihenfolge der einzelnen Kalibrierungen auf die MTP begründet liegt, wie eine matrixfreie Vergleichsmessung zeigte.

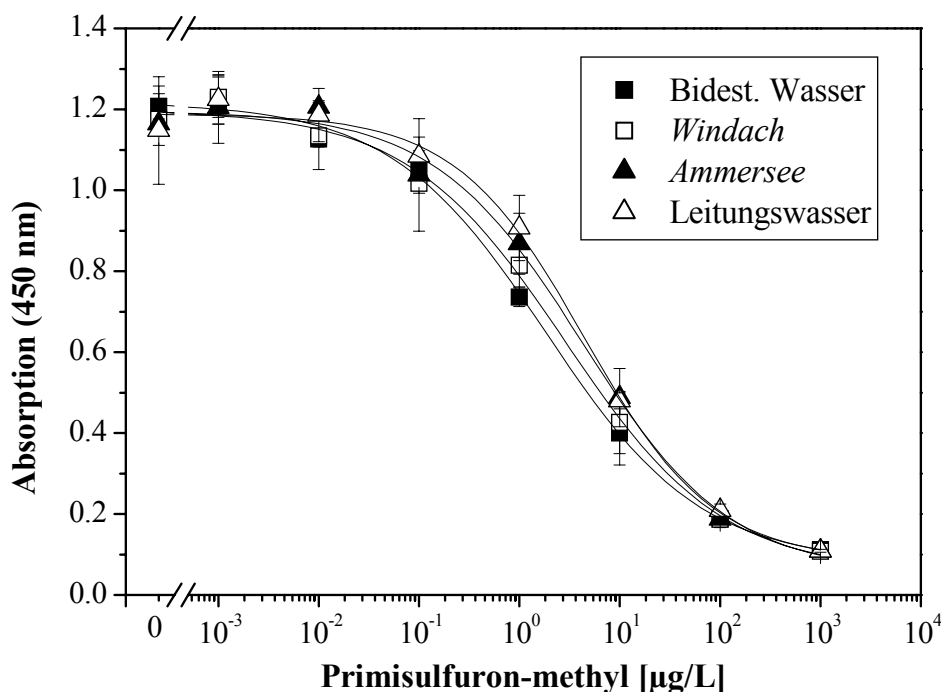


Abbildung 47: Matrixeffekte im direkten ELISA bei Oberflächenwässern mit einem geringen DOC-Anteil. Darstellung: Median, Spannweite. Bedingungen: vgl. Tabelle 12.

Bei den Realproben aus dem oberbayerischen Raum, die einen geringen DOC-Gehalt aufwiesen, war somit keine weitere Verdünnung der Proben notwendig, was eine hohe Sensitivität des Testes nach sich zog (vgl. auch III 2.4). Bei den unter III 2.2 beschriebenen Realproben (Oberflächenwässer und Kläranlagenablauf) aus dem Raum Unterfranken war jedoch eine Verdünnung 1:15 bis 1:30 notwendig, was die Sensitivität um den entsprechenden Faktor herabsetzte. Die Matrixeinflüsse sind hauptsächlich auf den Huminsäureeffekt zurückzuführen, wie durch Kontrolleexperimente mit verschiedenen Huminsäurekonzentrationen gezeigt werden konnte (vgl. III 1.4.1.5).

2.1.4 Korrelation zwischen ELISA und HPLC

Zur Kontrolle der ELISA-Ergebnisse wurden die gespikten Wasserproben parallel mittels HPLC nach RP-Anreicherung (Oasis[®] HLB) vermessen und die Korrelation der jeweiligen Resultate ermittelt. Dabei ergaben sich die Korrelationskoeffizienten $r^2 = 0.983$ für Chlorimuron-ethyl, $r^2 = 0.948$ für Metsulfuron-methyl und $r^2 = 0.982$ für Primisulfuron-methyl (jeweils $n = 21$), welche eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden

widerspiegeln. Die Ergebnisse für Metsulfuron-methyl, welche die größte Variation zeigten, sind im Folgenden exemplarisch dargestellt.

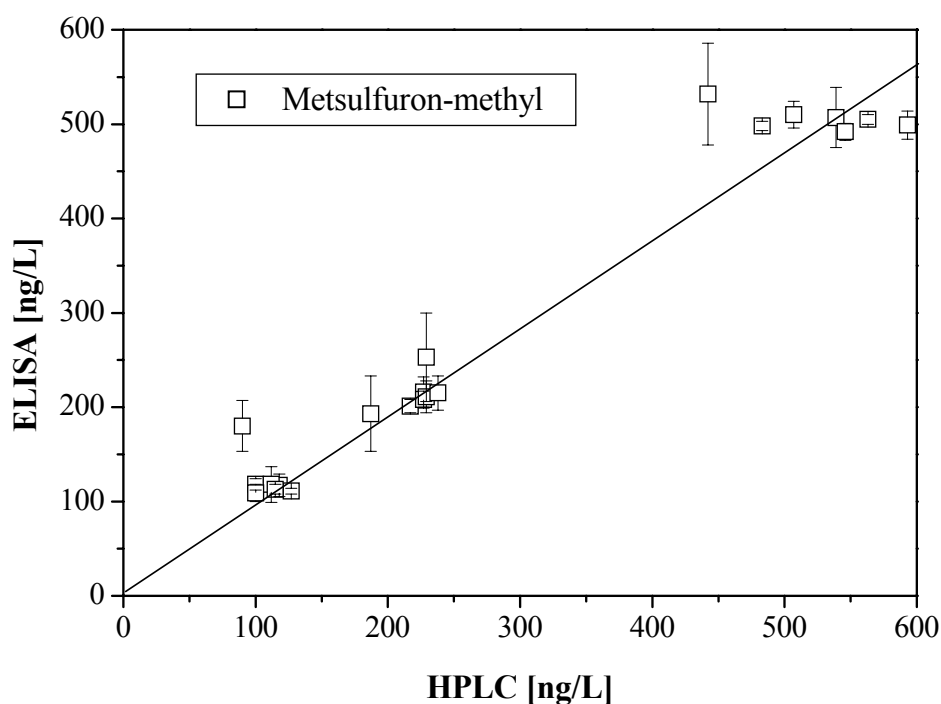


Abbildung 48: Vergleich der SU-Bestimmung von ELISA und HPLC in Leitungs- und Oberflächenwasser für dem Modellanalyten Metsulfuron-methyl ($n = 21$). Korrelationskoeffizient $r^2 = 0.948$.

2.2 Realprobenscreening von Oberflächenwässern und Kläranlagenabläufen über einen Zeitraum von 6 Wochen

2.2.1 Wasserproben

Im Rahmen einer sechswöchigen Messkampagne in Zusammenarbeit mit dem *Bayerischen Landesamt für Wasserwirtschaft* wurden Mischproben aus 2 Oberflächenwässern und 4 Kläranlagenabläufen aus dem Raum Unterfranken halbwöchentlich bzw. wöchentlich mittels direktem SU-ELISA auf die Präsenz von SUs gescreent. Die Probeentnahme wurde im Zeitraum vom 20. April bis 28. Mai 2004 durchgeführt, einem Zeitraum, in dem der Herbizideinsatz in der Landwirtschaft in dieser Region üblicherweise stattfindet, so dass ein möglicher Übertrag von Pestiziden in Gewässer hier am wahrscheinlichsten ist. Die Proben wurden im Raum Unterfranken aus den Flüssen Main und Schwarzach, sowie aus

den Abläufen, bzw. in einem Fall auch aus dem Zulauf, von 5 verschiedenen Kläranlagen der Region entnommen. Die Gegebenheiten an den einzelnen Kläranlagen-Standorten sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Es wurden jeweils Halbwochen- bzw. Wochenmischproben gezogen und untersucht.

Tabelle 19: Beprobte Kläranlagen und ihre Gegebenheiten.

Kläranlage	Größe [Einwohnerzahl]	Umgebung	Mischproben
A	18 000	viel Landwirtschaft	Zulauf, Ablauf
B	95 000	städtisch / Landwirtschaft	Ablauf
C	15 000	Landwirtschaft	Ablauf
D	6 000	viel Landwirtschaft	Ablauf
E	10 000	viel Landwirtschaft	Ablauf

Die Daten über Niederschläge während der Messkampagne wurden von der Wetterstation Würzburg zur Verfügung gestellt. Insgesamt war das Wetter während des Probenahmezeitraums relativ trocken. So fiel in der 1., 4. und 6. Messwoche kein Regen; in der 2. und 5. Messwoche wurden insgesamt nur 2.6 mm bzw. 0.8 mm Niederschlag gemessen. Lediglich in der 3. Woche der Probenahmen wurden Niederschlagsmengen von insgesamt 47.3 mm gemessen, wobei mehr als die Hälfte davon am 7. Mai fiel. Aufgrund dieser Wettersituation war eine Auswaschung von SUs aus Böden eher unwahrscheinlich. Der Zeitraum der schwerpunktmäßigen Pestizidanwendung in der Region lag für den Getreideanbau in den ersten beiden, für den Maisanbau in den letzten beiden Messwochen.

2.2.2 Ergebnisse des Realprobenscreenings

Bei keiner der 56 untersuchten Proben konnten mittels direktem ELISA Sulfonylharnstoffe nachgewiesen werden. Dies mag einerseits daran liegen, dass die Herbizidbehandlung aufgrund der günstigen Witterung in der Entnahmeregion zum Teil bereits vor der Messkampagne stattgefunden hat. Andererseits gab es in diesem Zeitraum nur wenige Niederschläge, so dass ein Ausspülen der Herbizide aus dem Boden eher unwahrscheinlich war. Außerdem muss bedacht werden, dass durch das Probenahmeverfahren auch eine Verdünnung stattfand, indem Mischproben mehrerer Tage oder einer Woche zusammengefasst wurden.

Bei den Untersuchungen wurde zudem festgestellt, dass das Testsystem gegenüber Matrixeffekten deutlich empfindlicher ist, als aufgrund der bisherigen Ergebnisse von gespikten Proben aus dem Raum Oberbayern angenommen werden konnte. Daher wurde der DOC-Gehalt der Proben der jeweiligen Entnahmestellen bestimmt und festgestellt, dass die

Werte des gelösten Kohlenstoffanteils in den gegebenen Proben entschieden höher waren (vgl. Tabelle 20). Durch Optimierungsversuche konnte ermittelt werden, dass bei den Oberflächenwässern eine Verdünnung von 1:15 und bei den Kläranlagenablauf- bzw. -zulaufproben eine Verdünnung von 1:30 notwendig ist, um signalinhibierende Matrixeffekte zu beseitigen. Dadurch erhöhte sich die Spanne der Nachweisgrenze des Testes für die 16 detektierbaren SUs von 8 bis 100 ng/L auf 0.12 bis 1.50 µg/L (1:15), respektive 0.24 bis 3.0 µg/L (1:30). Folglich konnte eine Einhaltung des Pestizidgrenzwertes laut Trinkwasserverordnung von 100 ng/L nicht mehr überprüft werden. Da dieser auf Oberflächenwässer ohnehin nicht anzuwenden ist, sind die vorliegenden Messergebnisse dennoch von praktischer Relevanz.

Tabelle 20: Charakterisierung der Proben: Sensorik, pH-Wert, DOC-Gehalt.

Wasserprobe	Aussehen	Geruch	pH-Wert	DOC [mg/L]
Schwarzach	farblos bis grünlich mit Schwebstoffen	geruchlos	8.2	4.40
Main	farblos bis grünlich mit Schwebstoffen	geruchlos	8.4	5.00
Kläranlage A: Zulauf	bräunlich, stark trüb	Fäkalgeruch	-	45.80
Kläranlage A: Ablauf	grünlich, trüb	schwach modrig	8.1	8.00
Kläranlage B: Ablauf	grünlich, trüb	schwach modrig	8.0	10.72
Kläranlage C: Ablauf	grünlich, trüb	schwach modrig	8.3	10.80
Kläranlage D: Ablauf	grünlich, trüb	schwach modrig	8.0	7.68
Kläranlage E: Ablauf	grünlich, trüb	schwach modrig	7.9	8.72

Zur Absicherung der ELISA-Ergebnisse wurden weiterhin 20 der 56 Proben mittels Immunadsorber (unter Verwendung des pAk-R03) angereichert und über HPLC-UV detektiert. Dabei konnte ebenfalls kein SU-Herbizid nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenzen (3-faches Grundrauschen) lagen hier in Abhängigkeit von der UV-Absorption der SUs zwischen 16 und 56 ng. Es wurden jeweils 250 mL Wasserprobe angereichert, die Adsorber mit 2 mL 40% ACN eluiert und davon 1 mL in die HPLC injiziert.

Dieses Ergebnis wurde für alle 56 Proben mittels Diskanreicherung und LC-MS abgesichert (vgl. III 2.3.2). Hierfür wurden die Proben durch eine Extraktion mittels Polyvinylbenzol-Disk im Sauren angereichert und die Extrakte im Negativ-Modus mittels MS vermessen. Auch hier konnten, bei Nachweisgrenzen von etwa 10 bis 100 ng/L SU in der Ausgangsprobe, keine SUs nachgewiesen werden.

2.3 Referenzanalytik

2.3.1 RP-SPE/HPLC-UV

2.3.1.1 Stabilität von SU-Standards

Aufgrund der leichten Hydrolysierbarkeit von SUs ist die Dauer der Stabilität von Standardlösungen für die Reproduzierbarkeit der SU-Analytik von Bedeutung. Daher wurde das Hydrolyseverhalten von 13 ausgewählten SUs in einem Lösungsmittelgemisch aus hochreinem ACN (HPLC-grade) und bidest. Wasser (50:50, v/v) ermittelt, welches zur Lösung der Standardsubstanzen diente.

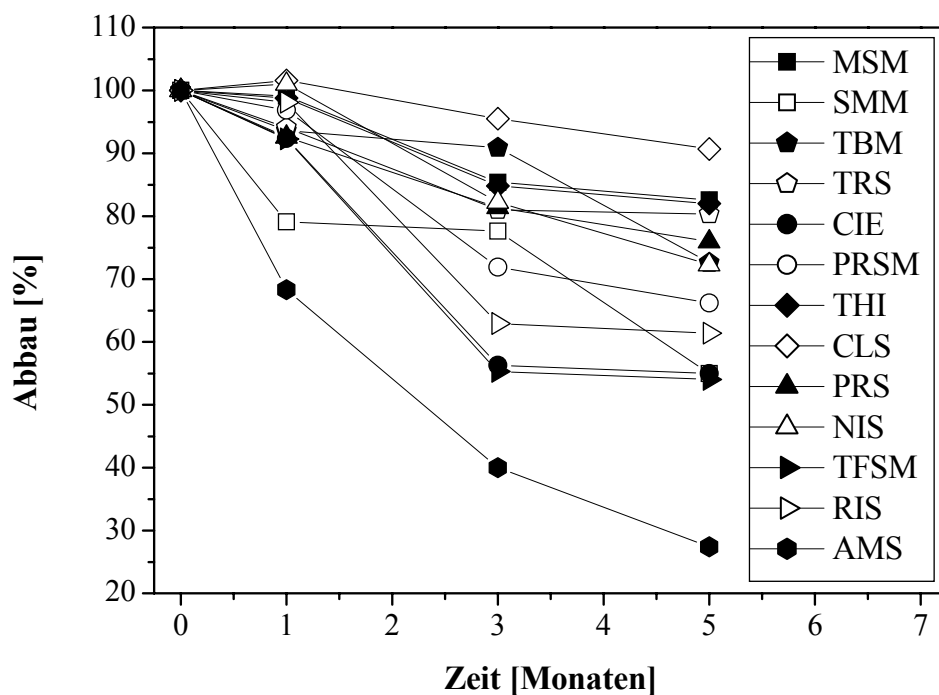


Abbildung 49: Hydrolyse von 13 ausgewählten SU-Standards bei Lagerung im Kühlschrank bei 4°C (n = 3). Anfangskonzentration als 100% definiert. Standardabweichungen (1 s) zwischen 2 und 14% (aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt).

Hierbei zeigte sich, dass die Mehrzahl der Substanzen über einen Zeitraum von einem Monat bei Lagerung im Kühlschrank (4°C) weitgehend stabil bleibt, jedoch insbesondere Amidosulfuron und Sulfometuron-methyl in dieser Zeitspanne bereits zu 32% bzw. 20% abgebaut werden. Da sich der Hydrolyseprozess daraufhin kontinuierlich fortsetzt, sollten die Standardlösungen mindestens monatlich neu hergestellt werden. Außerdem wurden

parallel zu den durchgeführten Versuchen stets externe Standardmessungen durchgeführt, um die Konzentrationen zu überprüfen und eventuellen Abbau einzelner Substanzen berücksichtigen zu können.

Weiterhin wurde die Stabilität der 13 vorausgehend beschriebenen SUs beim Einengen aus 60% ACN (v/v) bzw. 100% ACN im Stickstoff-Strom untersucht, da das Einengen des Immunadsorber-Eluats als möglicher Probenvorbereitungsschritt zur Aufkonzentrierung der Analyten geprüft werden sollte. Dabei stellte sich heraus, dass die Wiederfindungen beim Einengen der wässrigen ACN-Lösung bei fast allen Verbindungen bereits mindestens 20 bis 30% Verlust nach sich zogen, während die Wiederfindungen beim Einengen des reinen Lösungsmittels lediglich bei Amidosulfuron und Sulfometuron-methyl zu höheren Abbauraten von über 20% führten. Da das Einengen einer wasserhaltigen Lösung zudem sehr zeitaufwändig ist, ist stattdessen ein weiterer Aufkonzentrierungsschritt mittels RP-SPE im Analysenverlauf vorteilhafter.

2.3.1.2 Solid-Phase-Anreicherung von SUs

Die Anreicherung der polaren SU-Verbindungen mittels verschiedener Solid-Phase-Extraktionsmaterialien wurde geprüft, um einerseits alternative Anreicherungsverfahren vergleichen zu können und andererseits eine Referenzmethode zur Antikörperbindung zu etablieren. Getestet wurden zwei verschiedenen RP-Materialien auf Silica- bzw. Polymerbasis (LiChrolut[®] RP-18, Oasis[®] HLB) und zwei Mixed-Mode-Phasen (Oasis[®] MAX, StrataX[™]), die eine Mischphase aus RP-Material und Anionenaustauscher auf Polymerbasis darstellen, sowie ein Material aus graphitisierendem Kohlenstoff (Envi-Carb[®]). In der Literatur finden sich Studien zur Anwendbarkeit verschiedener SPE-Sorbentien für zahlreiche Analyten [396-398], dennoch ist im Einzelfall ein Materialtest unumgänglich. Die Wiederfindungen, die mit den fünf Materialien für bis zu 26 verschiedene SUs erzielt werden konnten, sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Für die Wiederfindungsversuche wurden zunächst die Beladungsbedingungen hinsichtlich des Proben-pH-Wertes optimiert. Dabei erwies sich ein Ansäuern der Probe auf pH 3 bis 4 für das RP18-Material (LiChrolut[®]) und den graphitisierten Kohlenstoff (Envi-Carb[®]) als zwingend notwendig, da hier die meisten Sulfonylharnstoffe nur nach vollständiger Protonierung vollständig retentiert werden konnten. Von den beiden Mixed-Mode-Phasen zeigte das Oasis[®] MAX-Material deutlich bessere Wiederfindungen nach Ansäuern der Probe, während der Unterschied in den Wiederfindungen bei der StrataX[™]-Phase weniger stark vom pH-Wert abhängig war. Hier führte das Ansäuern der Probe nur zu einer geringfügigen Verbesserung der Wiederfindungsraten. Für die Anionenaustauscher-RP-Mixed-Mode-Phase Oasis[®] MAX wird vom Hersteller ein Proben-pH-Wert von mindestens 2 pH-

Einheiten über dem pKs-Wert der zu untersuchenden Substanz empfohlen. Auch bei dem Copolymer Oasis[®] HLB zeigten angesäuerte Proben bessere SU-Wiederfindungen.

Tabelle 21: Wiederfindungen von 26 SUs mit 5 verschiedenen kommerziell erhältlichen SPE-Materialien (n = 3). Beladung der IAC-Säule mit jeweils 13 SUs von je 50 bzw. 100 ng in 10 mL bidest. H₂O bei optimierten Bedingungen bezüglich Proben-pH-Wert und Elutionsbedingungen. Flussrate: 3-5 mL/min.

Sulfonylharnstoff	Wiederfindung [%] ± Standardabweichung [%]				
	LiChrolut	Oasis HLB	Oasis MAX	StrataX	Envi-Carb
Amidosulfuron	-*	-	-	93.9 ± 15.2	-
Bensulfuron-me	101.8 ± 10.7	-	87.9 ± 0.5	89.6 ± 9.2	71.7 ± 3.4
Chlorimuron-et	89.8 ± 8.6	99.1 ± 4.4	79.5 ± 3.1	63.2 ± 12.3	32.0 ± 5.4
Chlorsulfuron	91.3 ± 16.9	106.6 ± 0.5	80.2 ± 0.9	87.7 ± 17.6	81.2 ± 6.4
Cinosulfuron	131.4 ± 7.6	127.7 ± 0.5	99.5 ± 2.4	104.1 ± 7.1	91.6 ± 4.5
Cyclosulfamuron	97.3 ± 6.7	106.1 ± 1.8	94.0 ± 2.5	24.7 ± 2.6	70.6 ± 5.3
Etoxysulfuron	84.9 ± 0.5	101.9 ± 5.9	87.8 ± 4.3	92.1 ± 9.8	109.0 ± 5.5
Flucarbazon	55.5 ± 12.5	121.6 ± 18.1	84.0 ± 6.1	93.7 ± 6.4	118.6 ± 12.9
Flupyr-sulf.-me-Na	146.5 ± 53.4	138.0 ± 35.0	154.9 ± 12.4	103.9 ± 5.5	119.0 ± 7.4
Imazosulfuron	9.2 ± 52.8	-	89.4 ± 4.7	81.5 ± 3.9	49.5 ± 4.7
Iodosulfuron-me	130.4 ± 12.2	117.5 ± 19.9	-	78.5 ± 5.3	35.1 ± 5.0
Metsulfuron-me	106.5 ± 28.5	122.1 ± 6.6	84.6 ± 5.8	109.9 ± 8.5	75.2 ± 4.5
Nicosulfuron	49.8 ± 12.0	103.0 ± 10.9	88.1 ± 1.9	102.7 ± 18.4	100.1 ± 6.0
Oxasulfuron	80.2 ± 9.5	95.8 ± 4.5	-	94.4 ± 2.5	23.5 ± 5.8
Primisulfuron-me	84.1 ± 9.1	96.1 ± 6.4	64.9 ± 5.7	77.1 ± 18.6	40.5 ± 7.7
Propoxycarbazon	111.7 ± 12.7	26.8 ± 37.9	94.9 ± 1.5	108.9 ± 5.2	70.2 ± 5.4
Prosulfuron	85.7 ± 21.2	107.2 ± 4.2	77.6 ± 2.5	82.3 ± 11.8	59.3 ± 5.1
Pyrazosulfuron-et	75.2 ± 37.0	117.8 ± 4.1	87.4 ± 7.5	100.1 ± 7.4	48.9 ± 22.3
Rimsulfuron	80.7 ± 22.6	87.5 ± 21.7	11.3 ± 9.9	40.9 ± 60.2	52.1 ± 14.4
Sulfometuron-me	80.9 ± 13.7	105.2 ± 0.5	86.7 ± 0.9	99.1 ± 13.7	92.7 ± 4.2
Sulfosulfuron	134.7 ± 4.6	103.2 ± 4.5	101.2 ± 9.2	91.8 ± 7.4	100.4 ± 4.3
Triasulfuron	70.0 ± 32.7	99.8 ± 4.0	89.0 ± 1.7	104.9 ± 13.3	96.5 ± 5.2
Thifensulfuron-me	81.5 ± 42.0	90.0 ± 2.2	79.9 ± 2.0	94.8 ± 13.6	83.5 ± 7.1
Triflusulfuron-me	87.4 ± 10.1	94.0 ± 1.6	77.6 ± 1.8	80.0 ± 17.9	5.0 ± 5.1
Tribenuron-me	126.5 ± 82.7	-	-	94.3 ± 46.4	19.2 ± 5.7

* Querstrich bedeutet, dass hier keine Bestimmung erfolgt ist.

Hinsichtlich der Elutionsbedingungen wurden Versuche mit MeOH, ACN, einem Aceton/Dichlormethan-Gemisch (3:2, v/v) sowie einem Dichlormethan/Methanol-Gemisch (8:2, v/v) durchgeführt, sowie das Elutionsvolumen variiert, um die optimierten Bedingungen zu ermitteln. Für die Elution von den RP-Materialien sowie für die StrataX™-Phase konnten wahlweise MeOH oder ACN eingesetzt werden. Für die Phase aus graphitisierem Kohlenstoff war ein Dichlormethan/Methanol-Gemisch (8:2, v/v) notwendig, da unter weniger drastischen Bedingungen keine Elution der SUs erfolgte. Für die Anionenaustauscher-RP-Mixed-Mode-Phase Oasis® MAX wurde mit 5%iger Ameisensäure (v/v) in MeOH eluiert.

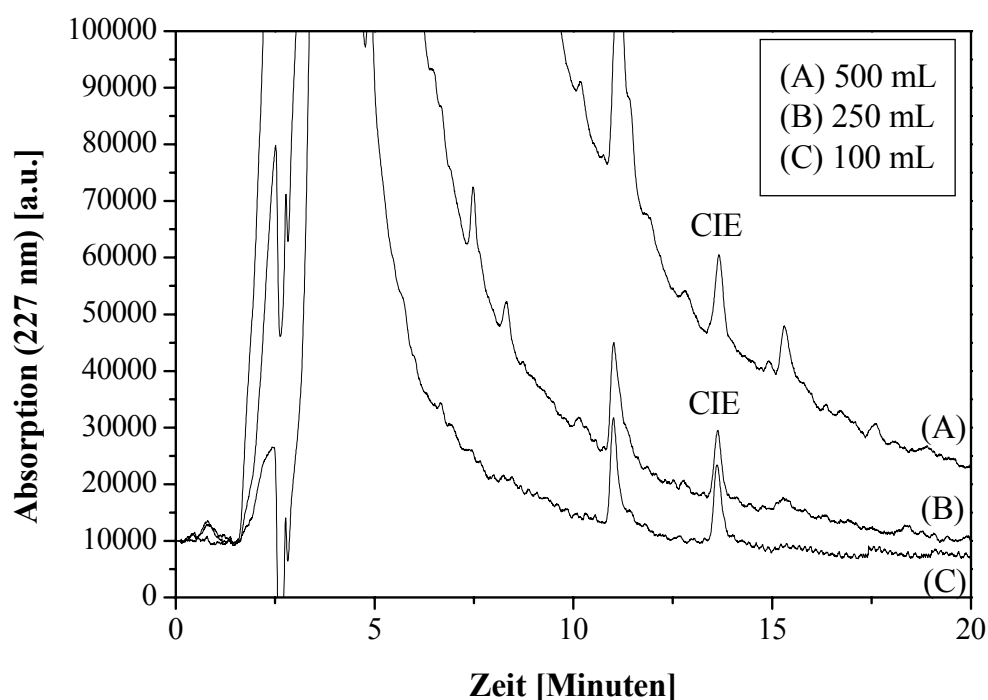


Abbildung 50: Matrixeffekte bei der Anreicherung von verschiedenen Probenvolumina Flusswasser. Isarwasser wurde mit 100, 200 und 500 ng/L Chlorimuron-ethyl (CIE) gespikt. Probenaliquote von 500, 250 bzw. 100 mL wurden entsprechend der Ausgangskonzentration mit Oasis® HLB angereichert. HPLC-UV/DAD: A: Wasser + 3 mM TFA, B: ACN + 3 mM TFA, isokratisch A/B 1:1 (v/v); RP-18-Prontosil, 3 µm; Injektionsvolumen 500 µL; c(SU) = 50 ng/mL; R_t (CIE) = 13.8 min.

Mit Ausnahme der Envi-Carb®-Kartuschen konnten alle SPE-Materialien ohne Auswirkung auf das Ergebnis mehrfach wiederverwendet werden. Jedoch zeigten übereinstimmend alle Phasen im Chromatogramm einen bzw. zwei Störpeaks bei einer Retentionszeit von ca. 27 bzw. 29 Minuten unter den gewählten HPLC-Bedingungen. Bei Realwasserproben wurden bei der UV-Detektion zudem Matrixeffekte sichtbar, da die Phasen neben

den polaren Analyten auch polare Matrixbestandteile binden, welche im Chromatogramm stören bzw. ein erhöhtes Basissignal verursachen können. Folglich ist die unspezifische Anreicherung mittels der genannten Methoden oft nur in Kombination mit anderen Aufreinigungsschritten, wie beispielsweise der Immunextraktion oder einer selektiven Detektion wie der Massenspektrometrie anwendbar. Die Eignung der einzelnen Materialien ist letztlich von der zur bestimmenden Verbindung abhängig, wobei die Oasis[®] HLB-Kartuschen, insgesamt gesehen, die besten Wiederfindungsergebnisse lieferten. Allerdings sind sie hinsichtlich des Matrixausschlusses bei Realproben gegenüber LiChrolut[®] RP-18 im Nachteil (vgl. Abbildung 68).

Beim Einsatz der Oasis[®] HLB-Anreicherung-HPLC-UV-Detektion als Referenzanalytik für den direkten ELISA für die drei Modellanalyten Chlorimuron-ethyl, Metsulfuron-methyl und Primisulfuron-methyl, wurde eine durchschnittliche Wiederfindung von 103% erzielt, allerdings bewegte sie sich in einem Bereich zwischen 80 und 120%.

2.3.1.3 LC-Bedingungen

Für die Off-line-HPLC-Messungen von angereicherten Proben wurde eine High-Volume Probeninjektion unter Verwendung einer 500- μ L-Probenschleife durchgeführt, um eine ausreichende Empfindlichkeit zu erreichen. Die mobile Phase wird mit Phosphorsäure oder Trifluoressigsäure (TFA) versetzt, damit die SUs in ihrer protonierten Form vorliegen und entsprechend besser mit dem RP18-Material der analytischen Säule wechselwirken können. Wegen des relativ großen Injektionsvolumens ist es notwendig, die Proben auf die HPLC-Fließmittelbedingungen (Lösungsmittelanteil, Säurekonzentration) einzustellen, um weitere Peakverbreiterungen zu vermeiden. Zur Trennung 13 verschiedener SUs in einem HPLC-Lauf ist ein Gradientenprogramm notwendig. Es wurde mit zwei unterschiedlichen Gradientensystemen in Abhängigkeit vom Elutionsmittel gearbeitet.

Von den zwei getesteten analytischen Säulen mit RP18-Material, lieferte die HPLC-Säule (250 x 4.6 mm) ProntoSIL 120-3-C₁₈-AQ, 3 μ m (Bischoff) gegenüber der HPLC-Säule LiChroCART[®] (250 x 4 mm) LiChrospher[®] 100, RP-18e, 5 μ m (Merck) die besseren Ergebnisse. Die erhöhte Trennleistung ist in erster Linie durch die kleinere Partikelgröße begründet, die zu höheren Bodenzahlen führt. Eine gewisse Silanolaktivität an der Phasenoberfläche kann zur Trennung polarer Verbindungen vorteilhaft sein, auch wenn es sonst meist unerwünscht ist. Bei der RP-18e-Phase sind die Silanolgruppen jedoch durch Endcapping deaktiviert, was sich hier möglicherweise zusätzlich negativ auswirkt.

2.3.1.4 Detektion mittels UV-Absorptionsmessung

Für die UV-Detektion wurde die Wellenlänge 227 nm gewählt, weil hier das Absorptionsmaximum der meisten Sulfonylharnstoffe liegt. Mittels Diodenarray-Detektion konnte die

Peakzuordnung und -reinheit über eine eigens erstellte Spektrendatenbank der SU-Spektren überprüft werden. Ausgewählte Spektren der drei Beispiel-SUs sind in Abbildung 51 dargestellt.

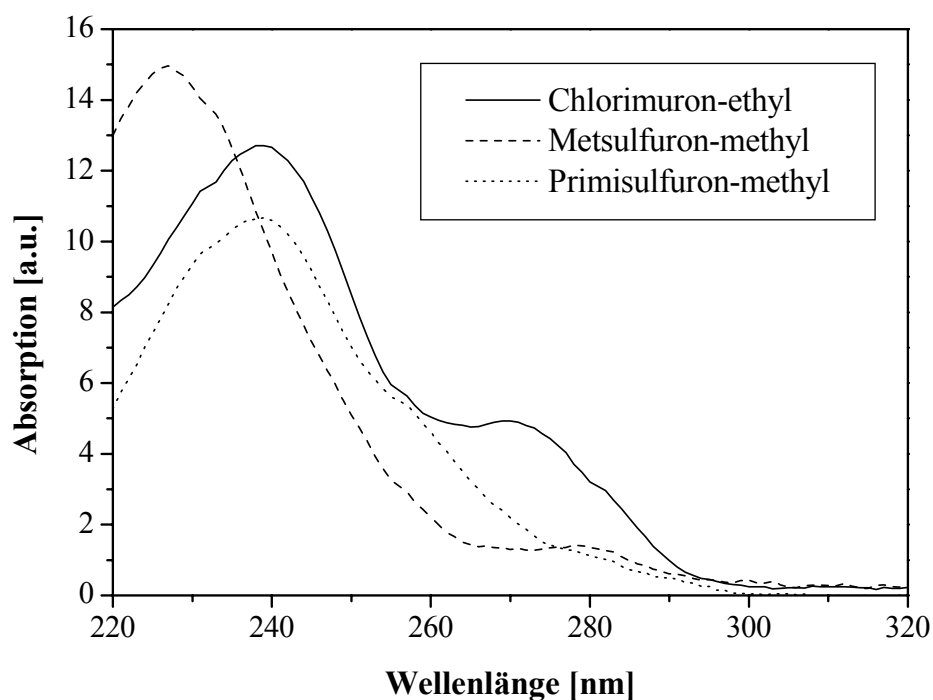


Abbildung 51: UV-Absorptionsspektren der Modellanalyten Chlorimuron-ethyl, Metsulfuron-methyl und Primisulfuron-methyl.

2.3.2 Anreicherungsdisk/LC-MS

Durch die freundliche Unterstützung von Frau Dr. Lackhoff (*Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München*) und Herrn Dr. Letzel (*Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere, TU München*), konnten die mittels ELISA vermessenen Proben aus Kapitel III 2.2 zusätzlich für das Screening auf SUs über eine Diskanreicherungssystem angereichert und mittel LC-MS vermessen werden. Für die Anreicherung der SUs im Sauren (pH = 4) wurde mit einem Horizon-SPE-DEX-System und Baker Bond Speedisk Extraction Disks auf Divinylbenzolbasis gearbeitet. Eluiert wurde mit Methanol. Der Anreicherungsfaktor betrug 1000. Die anschließenden Messungen wurden mit einem Agilent μ LC-MSD/SL 1100-System (Single-Quadrupol-Gerät) durchgeführt. Nach der Trennung an einer Zorbax SB-Phenyl Spezial-Säule (1 x 250 mm; 5 μ m Partikel, Agilent) wurden die SUs mittels Elektrospray-Ionisation eingebracht und im negativen Modus vermessen. Dabei ergaben sich für die 30 eingesetzten SUs Retentionszeiten zwischen 2.7 min (z.B. Azimsulfuron) und 39.8 min (Cyclosulfamuron). Die Standards und Proben wurden jeweils im Scan- und

im SIM-Modus vermessen. Alle Proben wurden auf die Anwesenheit der Molekülonen [M-H]⁻ aller 30 in dieser Arbeit behandelten SUs gescreent (vgl. Tabelle 4). Da keine Probe positiv getestet wurde, wurden keine Kalibrierungen erstellt. Die Nachweisgrenze der Methode in Abhängigkeit von der Intensität der erzielten Massen-Counts für einzelne Verbindungen, lag bei etwa 10 bis 100 ng/L SU in der Ausgangsprobe. Damit konnten durch eine weitere Methodik die negativen Testergebnisse von ELISA und IAC-HPLC-UV/DAD abgesichert werden.

2.4 Teststabilität und Anwendung

Das direkte ELISA-System erwies sich als stabiles System, bei dem die relative Standardabweichung der gemessenen Absorptionen von drei Bestimmungen jeder Standardkonzentration i.d.R. unter 5% lag. Der bereits erwähnte Zeiteffekt für Analyten hoher Kreuzreaktivität konnte durch das Mischen von Tracer und Analytlösung vor der Aufgabe auf die MTP behoben werden. Die ermittelten Testmittelpunkte für die Modellanalyten waren 0.21 ± 0.04 µg/L für Chlorimuron-ethyl, 0.44 ± 0.11 µg/L für Metsulfuron-methyl und 0.80 ± 0.14 µg/L für Primisulfuron-methyl, wobei die Inter-Assay-Variation bei 19%, 25% bzw. 18% (n = 18) lag. Der Arbeitsbereich, der als linearer Kurvenabschnitt im Bereich zwischen 20% und 80% der Inhibition festgelegt wurde, reichte von 0.08 bis 6 µg/L für Chlorimuron-ethyl, 0.08 bis 4 µg/L für Metsulfuron-methyl und 0.08 bis 6 µg/L für Primisulfuron-methyl. Die Nachweisgrenzen für die detektierbaren SUs wurden mittels der dreifachen Standardabweichung vom Nullwert berechnet und sind in Tabelle 22 zusammengefasst. Es konnten 16 SUs bei einer Konzentration, die den Grenzwert laut TrinkwV von 100 ng/L erreicht oder sogar darunter liegt, detektiert werden. Die Bestimmungsgrenze wurde aus der sechsfachen Standardabweichung des Nullwertes berechnet.

Die Reproduzierbarkeit der ELISA-Bestimmung war mit Variationskoeffizienten unter 20% für mehr als 90% der Messungen (n = 4) akzeptabel. Die höchste Standardabweichung, die für einen 100 ng/L SU enthaltende Probe ermittelt wurde, lag bei 27%. Auch die guten Korrelationswerte zwischen den ELISA- und HPLC-Ergebnissen der drei Testsubstanzen von $r^2 = 0.948$ (n = 21) und höher zeigten, dass der Test in der Praxis gut anwendbar ist. Allerdings muss einschränkend erwähnt werden, dass die aufgeführten Nachweisgrenzen lediglich für unverdünnte Proben gelten und Wasserproben mit höheren DOC-Gehalten verdünnt werden müssen. So war bei den in Kapitel III 2.2 beschriebenen Realproben eine Verdünnung von 1:15 bzw. 1:30 notwendig, was dazu führt, dass sich die Nachweisgrenzen auf Werte zwischen 0.12 und 1.50 µg/L bzw. 0.24 und 3.00 µg/L erhöhen. Der Trinkwasser-Grenzwert von 100 ng/L kann folglich auch für Mesosulfuron-methyl, den Analyten mit der höchsten Nachweisstärke, nicht mehr eingehalten werden. Das heißt, dass der Test bei Wasserproben mit höherem DOC-Gehalt auf Anwendungen beschränkt bleibt, die nicht die ursprünglich mögliche, hohe Sensitivität erfordern. Da für

Oberflächenwasser bzw. Kläranlagenablauf/-zulauf kein Grenzwert festgesetzt ist und mögliche Belastungen an SUs auch in dem nach Probenverdünnung detektierbaren Bereich von Interesse war, konnte der Screeningtest dennoch sinnvoll eingesetzt werden. Zwar wurden letztlich keine positiven Testergebnisse erhalten, was im Hinblick auf die Umweltbelastung durch SUs jedoch sehr positiv zu bewerten ist. Dass eine Anwendung ohne Sensitivitätsverluste durch Probenverdünnung durchaus möglich ist, zeigen zudem die Spiking-Versuche mit Oberflächenwässern aus dem oberbayerischen Raum. Außerdem ist die Anwendung auf Wasser mit Trinkwasserqualität, wie z.B. Leitungswasser ohne Einschränkung möglich, weil hier ohnehin keine hohen DOC-Werte vorliegen.

Tabelle 22: Detektierbare SUs mit Nachweisgrenzen von 0.1 µg/L und darunter. (A) Bei unverdünntem Einsatz der Probe (Oberflächenwasser, Umland München). Erhöhung der Nachweisgrenzen durch: (B) Notwendige Verdünnungen von 1:15 bei Flusswasserproben aus Unterfranken. (C) Notwendige Verdünnung von 1:30 bei Kläranlagenablauf- bzw. Kläranlagenzulaufproben.

	(A)	(A)	(B)	(C)
Sulfonylharnstoff	LOD [µg/L]	LOQ [µg/L]	LOD [µg/L]	LOD [µg/L]
Mesosulfuron-methyl	0.008	0.01	0.12	0.24
Chlorimuron-ethyl	0.04	0.06	0.6	1.2
Imazosulfuron	0.04	0.05	0.6	1.2
Cyclosulfamuron	0.04	0.05	0.6	1.2
Pyrazosulfuron-ethyl	0.06	0.07	0.9	1.8
Chlorsulfuron	0.04	0.06	0.6	1.2
Sulfosulfuron	0.06	0.07	0.9	1.8
Metsulfuron-methyl	0.07	0.08	1.05	2.1
Halosulfuron-methyl	0.07	0.09	1.05	2.1
Primisulfuron-methyl	0.07	0.08	1.05	2.1
Etametsulfuron-methyl	0.07	0.09	1.05	2.1
Triasulfuron	0.1	0.11	1.5	3.0
Iodosulfuron-methyl	0.1	0.12	1.5	3.0
Flazasulfuron	0.1	0.12	1.5	3.0
Prosulfuron	0.1	0.11	1.5	3.0
Thifensulfuron-methyl	0.1	0.12	1.5	3.0

LOD = Limit of detection (Nachweisgrenze)

LOQ = Limit of quantification (Bestimmungsgrenze)

3 Immunoaffinitätsanreicherung von Sulfonylharnstoffen

Die IAC stellt eine Form der Affinitätschromatographie dar, bei der die reversiblen Wechselwirkungen zwischen Antigen (Hapten bzw. Analyt) und Antikörper genutzt werden, um selektiv Zielanalyten anzureichern. Zunächst von der medizinischen Analytik ausgehend, findet die IAC mittlerweile auch zunehmend in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik Anwendung. Sie verbindet immunologische und traditionelle analytische Verfahren, indem die hohe Selektivität des Antikörpers mit der analytischen Genauigkeit konventioneller chromatographischer Methoden, wie der HPLC mit geeigneter Detektion, verknüpft wird. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine IAC-Kartusche zu entwickeln, die zur Off- und On-line-Anreicherung von SUs für die HPLC-UV/DAD und LC-MS/MS verwendet werden kann.

3.1 Antikörper-Aufreinigung

Vor der Immobilisierung wurden die polyklonalen Antiseren mittels Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose-Säulen aufgereinigt. Protein A wird aus *Staphylococcus aureus* gewonnen und bindet Antikörper reversibel über ihre F_c-Domäne. Der Proteingehalt der erhaltenen Elutionsfraktionen wurde mittels Micro-BCA-Assay und einer Kalibrierung mit BSA als Referenzprotein ermittelt, um die Einsatzmenge an Antikörper in den Immunadsorbern festlegen zu können. Dabei wurden durchschnittliche IgG-Mengen von 4.03 ± 0.60 mg pro mL Serum ($n = 12$, 1 s) erhalten. Es wurden i.d.R. IAC-Säulen mit einem IgG-Gehalt von 2 mg hergestellt. Allgemein geht man davon aus, dass maximal 10 bis 20% der IgG-Fraktion im polyklonalen Serum spezifische Antikörper sind.

3.2 Herstellung und Charakterisierung von SGG-Adsorbern

Für die Herstellung der IAC-Säulen werden die spezifischen Antikörper in einer geeigneten Matrix immobilisiert. Der klassische Weg ist die kovalente Bindung des Antikörpers an Adsorbentmaterialien. Das Einkapseln von Biomolekülen in Gläsern nach dem Sol-Gel-Verfahren bietet eine neue Möglichkeit zur schonenden Immobilisierung von Antikörpern. Erfahrungen dazu existieren weltweit bisher nur in wenigen Arbeitsgruppen.

3.2.1 Herstellung von SGG-Monolithen

Die Herstellung des Sol-Gel-Glases erfolgt über die saure Hydrolyse von Tetramethoxysilan (TMOS). Es bildet sich durch Kondensation und langsam voranschreitende Polykondensation ein Kieselgel, das schließlich ein dreidimensionales Netzwerk, das Kieselgel,

ausbildet. Bei der weiteren Kondensation unter Abgabe von Wasser und Methanol, auch Alterung genannt, findet der Übergang des Gels zum Xerogel (Glas) statt (Reaktionsverlauf s. Abbildung 15). Antikörper können mit dieser Methode schonend in dem porösen Glaskörper immobilisiert werden. Ihre Aktivität bleibt dabei weitgehend erhalten, da ein sehr geringer Säuregehalt für die Initialreaktion ausreicht.



Abbildung 52: Gefärbter SGG-Monolith. Farbstoff: Methylenblau B.

Da der Trocknungsverlauf bzw. der Alterungsprozess einen entscheidenden Einfluss auf die Gelstruktur nimmt, wurde dieser zunächst optimiert. Der Porengröße des porösen Materials kommt dabei die Schlüsselrolle zu. Die Antikörper sollen einerseits so in die Poren eingeschlossen sein, dass kein Antikörperverlust durch Leaching auftritt, andererseits dürfen die Antikörper sterisch nicht so „eingezwängt“ werden, dass eine Wechselwirkung von Analyt und Antikörper nicht mehr möglich ist. Es wurde ein gewisses Optimum bezüglich hoher Antikörperaktivität und vernachlässigbarem Proteinleaching der Säulen bei einem Trocknungsverlust von ca. $55 \pm 5\%$ für SGG-Monolithen festgestellt. Die Abhängigkeit des Proteinverlustes vom Trocknungsgrad wurde durch Waschen der monolithischen Säulen mit je 5 mL Wasser und 40% ACN (v/v) in 1-mL-Fractionen und der Bestimmung des IgG-Gehaltes mittels Bradford- und BCA-Protein-Assay nachgewiesen. Lediglich in den ersten 3 wässrigen sowie in den ersten 3 lösungsmittelhaltigen Fraktionen wurde Protein nachgewiesen. Es wurden sowohl Versuche mit immobilisiertem Rinder-IgG als auch mit dem von SIMON hergestellten anti-MSM-Antikörper [389] durchgeführt. Beide Adsorbententypen lieferten vergleichbare Ergebnisse. Daher wurden sie in Abbildung 53 zusammengefasst. Parallel wurden Blankadsorber ohne Protein hergestellt, da die Protein-Assays ein Background-Signal aufgrund anderer Reagenzien (u.a. auch durch TMOS) lieferten. Dieser „Proteinblindwert“ betrug $13.8 \pm 3.8 \mu\text{g}$ ($n = 10$) und wurde von allen Messergebnissen abgezogen. Für die relevanten Trocknungsgrade zwischen 50 und 60%, die auch eine hohe Antikörperaktivität ergaben, liegt der Proteinverlust durch Leaching bei etwa 20 μg , was bei 2 mg immobilisiertem IgG etwa 1% Leaching entspricht.

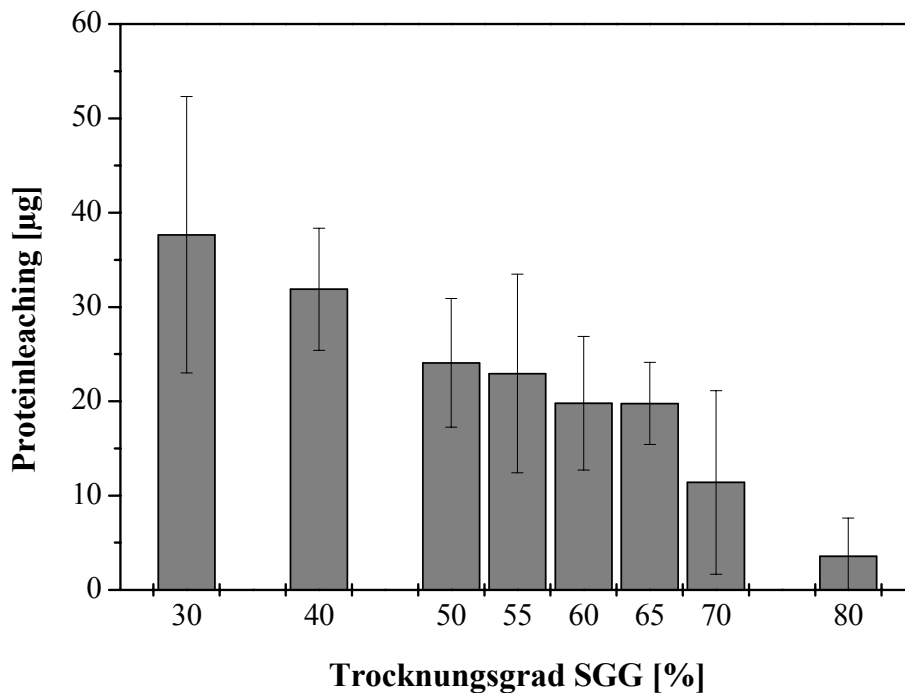


Abbildung 53: IgG-Leaching in Abhängigkeit des Trocknungsgrades des SGG-Monolithen (n = 6, 1 s). Immobilisiertes IgG: Rinder-IgG, anti-MSM-Ak, 2 mg. Proteinbestimmung: Bradford- und BCA-Assay. Kalibrierung mit BSA. Reagenzienblindwert von 13.8 ± 3.8 ng Protein (n = 10, 1 s) wurde abgezogen.

Dabei erwies sich Glycerin als Zusatz bei der Vorhydrolyse als positiv für die Adsorberkapazität. Das zu den sog. DCAs (Drying Control Additives) gehörende Reagenz verzögerte die Trocknung aufgrund seiner geringen Flüchtigkeit und trug damit zu einer Stabilisierung der Porenstruktur bei. Aufgrund seiner hohen Biokompatibilität ist es zudem für die Antikörperimmobilisierung hervorragend geeignet. Durch die verzögerte Alterung wird das rasche Zusammenfallen der gebildeten Poren („pore collapse“) im Sol-Gel verhindert, was einen positiven Effekt auf das eingekapselte Protein hat. Daneben wird ein Teil des Glycerins unter Ausbildung von Poly(glyceroxysiloxan)-Gruppen in das Silikatgerüst eingebaut, was als proteinstabilisierend angesehen wird [331].

Für die Herstellung von IAC-Säulen wird das SGG-Immunadsorbermaterial gemahlen, gesiebt und in Glassäulen gefüllt. Der fertiggestellte Immunadsorber kann sofort im Anschluss zur Anreicherung herangezogen werden. In der Regel wurde er jedoch zunächst auf Protein- bzw. Antikörperleaching getestet. Bei oben genannten Trocknungsbedingungen wurde sowohl mittels Bradford- und BCA-Assay als auch mittels ELISA und des Schnelltests ImmunoPure[®] Rabbit (Pierce) kein Antikörperleaching festgestellt.

Probleme mit Partikelabrieb aus dem gemahlenen SGG-Monolithmaterial machte es insbesondere im Hinblick auf eine spätere Anwendung im On-line-Betrieb notwendig, dass alternative Wege zur Stabilisierung des Materials gesucht wurden. Daher wurde ein druckstabiles, poröses Silikatmaterial so mit SGG beschichtet, dass möglichst viel des SGG-Materials in dessen schützende Poren eindringen konnte und dadurch der mechanische Abrieb vermieden wurde.

3.2.2 Herstellung von SGG-gecoateten Partikeln

Die druckstabilen, porösen Silikatpartikel, welche für das Sol-Gel-Coating-Verfahren eingesetzt wurden, stellte die Fa. *Grace* zur Verfügung. Im Rahmen der Zulassungsarbeit für Lehramtskandidaten von SEBASTIAN EGGGER, wurden drei verschiedene Grundmaterialien mit einer Partikelgröße im Bereich von 70-200 μm und drei verschiedenen Porendurchmessern (15, 150 und 250 nm) gegenübergestellt, das SGG-Coating-Verfahren optimiert und das erhaltene Immunadsorbermaterial charakterisiert [399]. Es wurde festgestellt, dass die Partikel mit einem Porendurchmesser von 250 nm am besten für die gewünschte Anwendung geeignet sind, daher wurde im folgenden stets mit Partikeln dieser Porengröße gearbeitet.

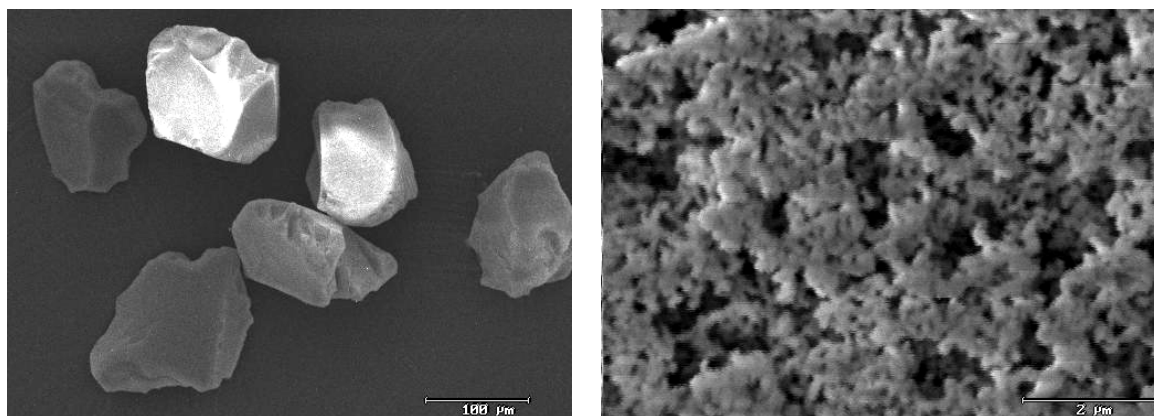


Abbildung 54: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen der eingesetzten Silikatpartikel: Partikeldurchmesser: 70 bis 200 μm , Porendurchmesser 250 nm.

Die optimierten Herstellungsbedingungen führten zu einem Verfahren, bei dem die gereinigte Antikörperlösung direkt mit einer bestimmten Menge an bidest. Wasser, Glycerinlösung (50%, v/v) und TMOS vermischt und anschließend mit den vorgereinigten Silikartikeln inkubiert wurde. Anschließend wurde kräftig geschüttelt, um das Sol-Gel gleichmäßig zu verteilen und der Ansatz in einem verschlossenen Gefäß für 24 Stunden stehen gelassen. Die Alterung, ohne Flüssigkeitsaustausch mit der Umgebung, soll dazu dienen, dass das zunächst noch flüssige Sol-Gel durch die Kapillarkräfte in die Poren gesogen wird, damit nur ein möglichst geringer Teil des Sol-Gels an der Oberfläche der Partikel verbleibt. Im Anschluss daran wurde das Sol-Gel an der Luft bis zu einem Trocknungsgrad von 30 bis 35% getrocknet, einer Waschprozedur unterzogen und in Off- bzw. On-line-Kartuschen gefüllt. Antikörperleaching konnte nach dieser Prozedur nicht mehr festgestellt werden.

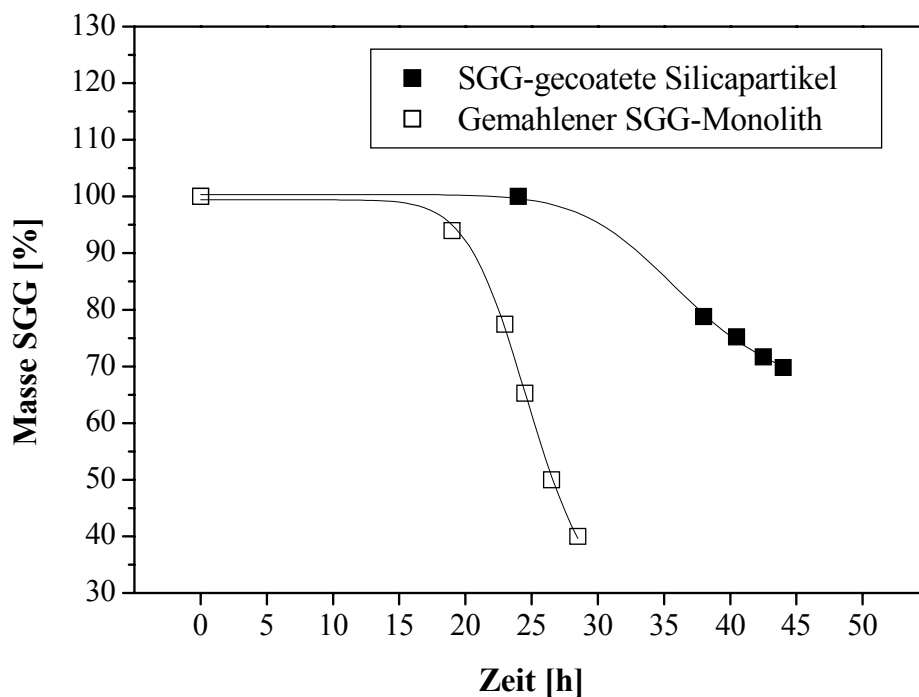


Abbildung 55: Trocknungsverlauf bei SGG-Monolithen und SGG-gecoateten Partikeln bis zum optimalen Endtrocknungsgrad. Verzögerung des Trocknungsstarts um 24 h beim SGG-Coating ist durch verschlossenes Gefäß bedingt. Trocknungsverlauf stark von Verdunstungsfläche (Gefäßgröße) abhängig.

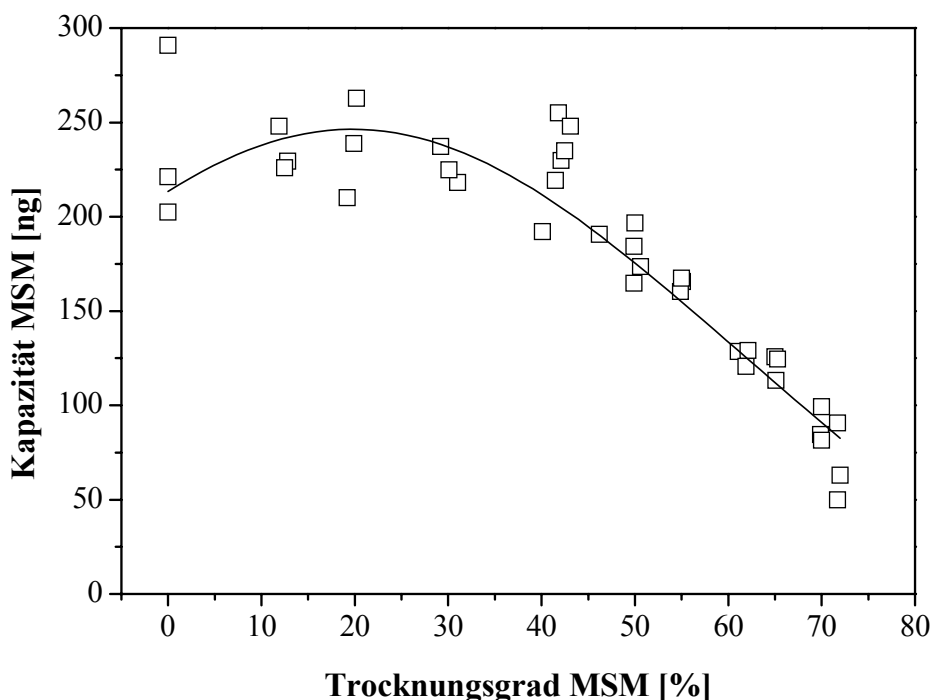


Abbildung 56: Abhängigkeit der Kapazität vom Trocknungsgrad bei SGG-gecoateten Partikeln [399]. Immobilisierter Antikörper: pAk-R04, 1.2 mg. Kapazitätsbestimmung: Adsorberüberladung mit 1 μg Metsulfuron-methyl (MSM). Messung: HPLC-UV/DAD.

Bei den Optimierungsversuchen wurden Rezepturparameter, wie der Wasseranteil, das molare Wasser/Alkoxysilan-Verhältnis (R-Wert) und der Einfluss des Glycerinzusatzes getestet. Das Ergebnis war, dass sich ein R-Wert von mindestens 14 oder höher positiv auf die Adsorberkapazität auswirkte, ein Glycerinzusatz jedoch keinen erkennbaren Einfluss auf die Kapazität zeigte. Offenbar spielt Glycerin durch die in diesem Verfahren ohnehin verzögerte Alterung nicht mehr die Rolle wie beim direkten Trocknen an der Luft, wie sie bei der Herstellung der Monolithen durchgeführt wurde. Dennoch wurde auch im Coating-Verfahren weiterhin Glycerin zugesetzt, um Brüche und Risse des Materials bei der Trocknung zu vermeiden.

Zudem wurde ein Waschverfahren zur Beseitigung von TMOS-Resten an der Materialoberfläche der Silikatpartikel entwickelt, das gleichzeitig den Antikörper nicht negativ beeinträchtigt. Bei Adsorbentien aus gemahlenem Monolithmaterial traten enorme Probleme durch Partikelverschmutzungen auf den HPLC-In-line-Filtern auf, die nicht von direkter Partikelverschmutzung der Probe stammen konnten, da alle Proben vor der Injektion über Spritzenfilter der Porung 0.45 μm bzw. 0.2 μm filtriert wurden. Es musste demnach angenommen werden, dass nicht umgesetzte TMOS-Monomere durch die ACN-Elution aus der

Säule gewaschen werden, dann in der HPLC durch das saure Eluentensystem hydrolysieren und schließlich polymerisieren. Mittels REM-Aufnahmen von Filteroberflächen konnte gezeigt werden, dass eine Waschprozedur mit 40% ACN, bidest. Wasser und Pufferlösungen im Ultraschallbad das Auftreten dieser, durch TMOS-Reste verursachten Partikelverunreinigungen beseitigt.

3.3 Charakterisierung von SGG-Adsorbieren

3.3.1 Säulendimensionierung

Die Säulendimensionierung der Adsorber für Off- bzw. On-line-Anreicherungen hat sich in den Untersuchungen als nicht relevant für die Wiederfindung gezeigt. Für die Off-line-Anreicherung wurden 3-mL-, 5-mL- und 8-mL-Glassäulen mit der gleichen Sorbensmenge befüllt und Wiederfindungsversuche durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass eine Verlängerung des Sorbensbettes bei den 3-mL- und 5-mL-Glassäulen keinen Einfluss auf das Wiederfindungsergebnis hat. Allerdings baut sich durch den geringeren Durchmesser ein größerer Rückdruck auf, der wiederum zu verstärktem Materialabrieb führt und daher eher negativ zu bewerten ist. Folglich wurden alle weiteren Off-line-Experimente in 8-mL-Glassäulen durchgeführt. Der Vergleich von On-line-Säulen der Dimension 60 x 4 mm mit Säulen der Dimension 10 x 10 mm ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (vgl. III 5.1). Die entsprechenden Edelstahlsäulen der Dimensionierung 10 x 10 mm und 20 x 10 mm wurden in der Werkstatt des Instituts für Wasserchemie speziell für diesen Zweck angefertigt.

3.3.2 Beladungs- und Elutionsbedingungen

Für die Beladung des Immunadsorbers ist die Flussrate von entscheidender Bedeutung, da zur Ausbildung einer ausreichend starken Bindung zwischen Antikörpern und Analyten eine bestimmte Kontaktzeit notwendig ist. Dies ist auf die Kinetik der Antikörper-Analyt-Wechselwirkung zurückzuführen, die relativ langsam ist und im Sol-Gel-Glas durch behinderte Diffusion zusätzlich verzögert wird. Daher sollte die Beladung des Adsorbers mit der Analytlösung bei möglichst geringen Flussraten von 1 bis 2 mL/min erfolgen.

Es wurde außerdem festgestellt, dass die Zugabe von NaCl zur Probenlösung in einer Konzentration von 100 mmol/L positive Auswirkungen auf die Wiederfindungsraten hat. Daher wurde bei allen Experimenten generell mit Salzzusatz gearbeitet. Die Erhöhung der Ionenstärke führt offenbar zu einer Erhöhung der Affinität des Antikörpers. Darüber hinaus wird in der Literatur von einem verbesserten Diffusionsverhalten von kleinen Molekülen in den Poren des Sol-Gel-Glases bei hohen Ionenstärken berichtet [400]. Mit einer weiteren Steigerung der Ionenstärke über 100 mmol/L hinaus, wurde keine wesentliche Verbesserung der Wiederfindungen erreicht.

Die Zielsetzung für die Elution ist, dass einerseits die gebundenen Analyten vollständig eluiert werden, andererseits aber auch die Elutionsbedingungen so schonend gewählt werden, dass der Antikörper vital bleibt und die Immunsäule mehrfach verwendet werden kann. Gleichzeitig sollte das erhaltene Eluat kompatibel mit der anschließenden HPLC-Analytik sein. Auf der Suche nach geeigneten Elutionsmitteln für den relevanten Antikörper pAk-R03 wurden ELISA-Screeningtests zur Aktivitätsprüfung durchgeführt. Dafür wurde der pAk-R03 direkt auf der MTP immobilisiert und nach einem Waschschrift mit dem jeweiligen Elutionsmittel bzw. mit PBS-Puffer als Referenz 30 Minuten inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift und einer 10-minütigen Tracerinkubation erfolgte die Farbentwicklung (vgl. Beschriftung Abbildung 57).

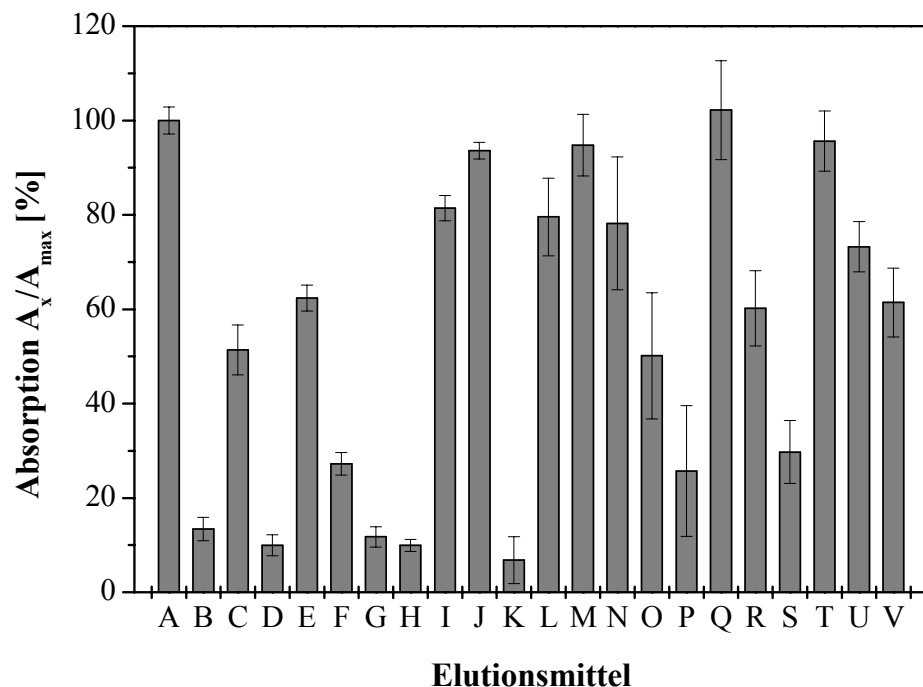


Abbildung 57: Einfluss verschiedener Elutionsmittel auf den Antikörper pAk-R03. Aktivitätsprüfung im modifizierten direkten ELISA ($n = 6$, 1 s). Elutionsmittel: (A) NaSCN 2.5 M. (B) NaSCN 5 M. (C) $MgCl_2$ 2.5 M. (D) $MgCl_2$ 5 M. (E) TFA 3 mM. (F) Essigsäure 0.2M. (G) Ameisensäure 0.2 M. (H-J) Glycinpuffer 0.1 M, pH 2, 3, 4. (K-P) Phosphatpuffer 0.1 M, pH 2, 3, 4, 10, 11, 12. (Q-S) MeOH (v/v) 50%, 60%, 70%. (T-V) ACN (v/v) 30%, 40%, 50%. Auswertung: Absorption A_x (Elutionspuffer) / maximale Absorption A_{max} (PBS-Puffer, 100%). Testbedingungen: Coating: pAk-R03 1:10000, 24 h; Inkubation: (1) Elutions-Puffer im Vergleich mit (2) PBS-Puffer, 200 μ L, 30 min; heterologer Tracer: POD-Hapten 2 (ohne Spacer) 1:2000, Entwicklung: 10 min.

Die Intensität der Absorptionsminderung im ELISA gibt allerdings nur einen Hinweis auf die Empfindlichkeit des entsprechenden Antikörpers gegenüber einem Elutionsreagenz. Weitere Experimente zum Elutionsverhalten, bei denen die Inkubation von Analyt- und Elutionslösung gleichzeitig erfolgt, könnten weiteren Aufschluss zu optimalen Reagenzien und Konzentrationsverhältnissen für die Elution geben. Derartige Elutionsscreenings mittels ELISA wurden bereits zahlreich publiziert [401-403]. Im direkten Format wurde hier i.d.R. nach der Analyt- und Elutionsmittellinkubation, die MTP gewaschen und dann der Tracer aufgegeben. Allerdings sind solche Tests nur dann erfolgreich, wenn die Dissoziationskinetik des Antikörpers sehr langsam erfolgt [209] und nicht bereits beim Waschschrift gebundener Analyt vom Antikörper gelöst wird. Mit dem gegebenen direkten Sulfuron Screen-ELISA erwiesen sich die Elutionstests als schwierig, da die Affinität von pAk-R03 zum heterologen Tracer viel höher war als die Affinität zu den SU-Analyten und es damit zu einer Gleichgewichtsverschiebung zugunsten des Tracers kam, was dazu führte, dass alle Signale erhöht waren, so dass selbst PBS-Puffer ein effizientes „Elutionsmittel“ vortäuschte. Dies entsprach allerdings nicht den Gegebenheiten in der IAC-Säule, wie entsprechende Versuche zum Elutionsvermögen beim Immunadsorber zeigten. Generell muss berücksichtigt werden, dass die Konzentrations- und Immobilisierungsverhältnisse im ELISA und im SGG-Immunadsorber sehr unterschiedlich sind, und daher die Ergebnisse durchaus beträchtlich differieren können.

Bei den Elutionsexperimenten am Immunadsorber selbst, erwies sich ein ACN/bidest. Wasser-Gemisch als das effizienteste Elutionsmittel, welches zudem HPLC-kompatibel war. Daher wurden weiterführende Experimente zur Optimierung der notwendigen Menge und Konzentration dieses Lösungsmittelgemisches durchgeführt. Allgemein gilt, dass die im SGG immobilisierten Antikörper weniger empfindlich gegen org. Lösungsmittel sind, als ohne Immobilisierung. Im vorliegenden Fall wurde der pAk-R03 durch 40% ACN nicht denaturiert. Während sich die meisten SUs in 2 bis 3 mL ACN (30-40%) vom Absorber eluieren ließen (vgl. Abbildung 58), erwies sich die Elutionseffizienz für einzelne SUs, wie Imazosulfuron, Cyclosulfamuron und Iodosulfuron-methyl als relativ gering (vgl. Abbildung 59). Für die ersten beiden Verbindungen lässt sich dies mit ihrer hohen Affinität zum Antikörper erklären. Zum Lösen dieser höher affinen Bindungen sind offensichtlich härtere Elutionsbedingungen erforderlich, als bei diesem Versuch gewählt. Zur vollständigen Elution von Mesosulfuron-methyl, der Verbindung mit der höchsten Bindungsaffinität, waren 80% ACN notwendig. Diese hohe Lösungsmittelkonzentration führte jedoch zur Denaturierung des Antikörpers. Wenn man den Immunadsorber mehrfach verwenden möchte, muss man letztlich Bedingungen finden, die zwar effizient die Analyt-Antikörper-Bindung lösen, aber die Proteinstruktur der Bindungstasche des Antikörpers nicht dauerhaft schädigen. Daher sind für die IAC Antikörper mittlerer bis niedrigerer Affinität wünschenswerter als sehr hoch affine. Für das Anwendungsspektrum des breitbandigen pAk-R03 bedeutet es außerdem, dass Verbindungen mittlerer Kreuzreaktivität

am optimalsten angereichert und vor allem auch wieder eluiert werden können. Bemerkenswert ist zudem, dass bei der MS/MS-Detektion einiger Verbindungen in den Eluatfraktionen 4 bis 10 (je 1 mL) noch geringe Konzentrationen nachweisbar waren. Bei der HPLC-UV-Detektion wurde dies aufgrund der geringeren Sensitivität nicht festgestellt. Um die Restmengen an SUs zwischen den einzelnen Bestimmungen sicher vom Adsorber zu eluieren, ist daher eine Konditionierung mit mindesten 5 - 10 mL ACN 30% notwendig.

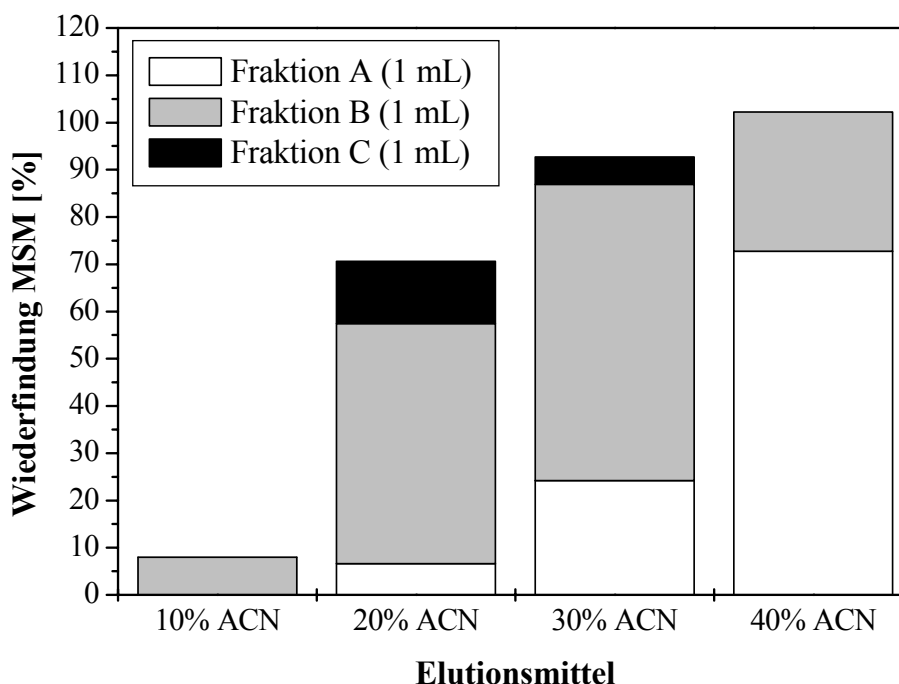


Abbildung 58: Elutionseffizienz bei verschiedenen ACN-Konzentrationen (v/v). Verteilung des Analyten Metsulfuron-me (MSM) auf die Fraktionen A, B, C (je 1 mL). Beladung: 100 ng MSM. Messung: HPLC-UV/DAD.

Auch im Hinblick auf eine On-line-Anreicherung ist ein möglichst geringer Anteil an organischem Lösungsmittel im Eluat wünschenswert, da hohe Lösungsmittelanteile einen weiteren Anreicherungsschritt mittels einer RP-Phase erschweren. Auch für die Off-line-Methode erfordern höhere ACN-Konzentrationen im Eluat einen weiteren Verdünnungsschritt, um die Anfangskonzentration des Zeitprogramms von 32% ACN für die HPLC-Analytik nicht zu übersteigen. Generell problematisch bei der Immunextraktion ist die relativ langsame Kinetik der Antikörper-Analyt-Bindung, die sich bei der Elution dahingehend bemerkbar macht, dass das Elutionsvolumen oft vergleichsweise groß ist und in der Spurenanalytik daher weitere Aufkonzentrierungsschritte nachgeschaltet werden müssen, um die Sensitivität der Methode zu steigern. Dies trifft besonders häufig bei der Elution „kleiner Moleküle“ mittels saurer Pufferlösungen zu, obwohl diese für „große Analyten“

(Proteine) oft erfolgreich eingesetzt werden. Dahingehende Versuche führten auch bei der Elution von SUs vom SGG-Adsorber zu keinem Erfolg.

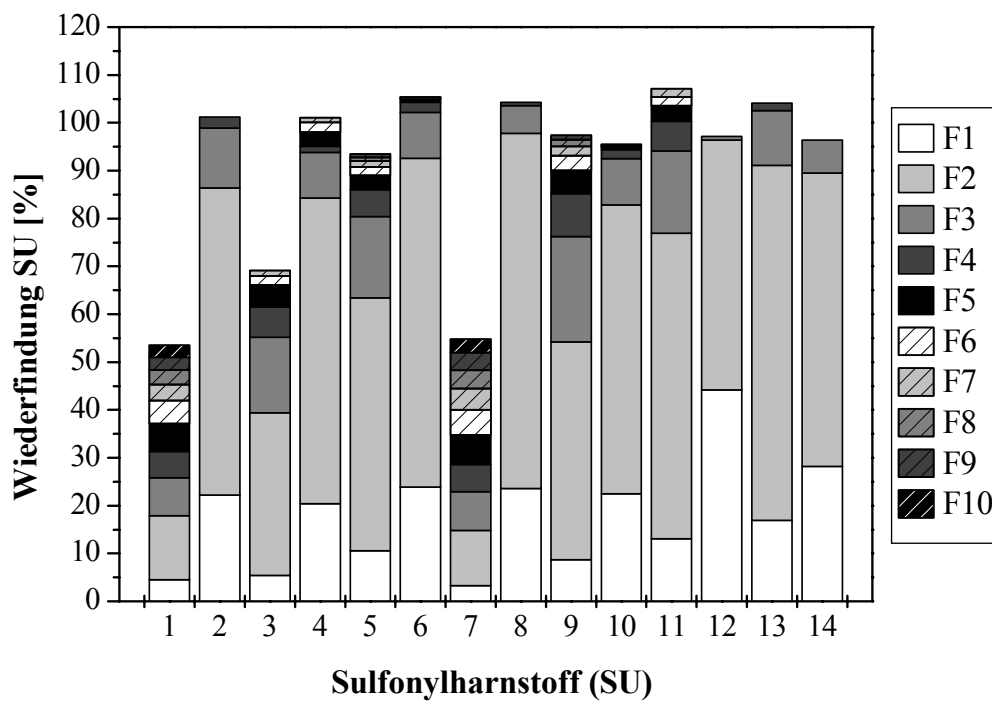


Abbildung 59: Elutionseffizienz von 10 mL 30% ACN (v/v). Elution in 1-mL-Fractionen (F1 bis F10). Parallele Bestimmung von 14 SUs: (1) Imazosulfuron. (2) Chlorsulfuron. (3) Cyclosulfamuron. (4) Pyrazosulfuron-et. (5) Sulfo-sulfuron-me. (6) Triasulfuron. (7) Iodosulfuron-me. (8) Prosulfuron. (9) Thifensulfuron-me. (10) Cinosulfuron. (11) Sulfometuron-me. (12) Tri-flusulfuron-me. (13) Etoxysulfuron. (14) Nicosulfuron. Beladung: jeweils 10 ng SU. Messung: LC-MS/MS.

Die optimierte Durchführung von Beladung und Elution lässt sich wie folgt skizzieren: Vor der Probenaufgabe wird der in Kochsalzlösung oder Puffer gelagerte Immunadsorber mit einem ACN/bidest. Wasser-Gemisch (30%, v/v) und reinem bidest. Wasser vorkonditioniert. Es folgt die Probenaufgabe mit moderater Geschwindigkeit (1-2 mL/min). Anschließend werden mit bidest. Wasser die nicht gebundenen Verbindungen von der Säule gewaschen. Die Analyten werden schließlich mit dem Gemisch aus ACN/bidest. Wasser (30%, v/v) eluiert und erneut konditioniert. Die Regeneration zwischen den einzelnen Beladungen erfolgte mit bidest. Wasser. Bei mehreren aufeinanderfolgenden Beladungszyklen ist eine Regeneration des Adsorbers in PBS-Puffer bei 4°C positiv für dessen Haltbarkeit.

3.3.3 Unspezifische Bindung

Zur Demonstration der Funktionstüchtigkeit der Sol-Gel-Glas-Immunsorber war es zwingend notwendig zu beweisen, dass die Bindung der Analyten an den Adsorber allein auf der spezifischen Antikörper-Analyt-Wechselwirkung beruht und unspezifische Bindungen von Analyten an das Immobilisierungsmaterial selbst ausgeschlossen werden können. Folglich wurden 4 verschiedene Blank-Adsorber-Typen hergestellt und parallel zu den anti-SU-Immunsorbern mit spezifischem Antikörper getestet. Typ I bestand aus reinem SGG, bei Typ II, III und IV waren Rinder-IgG bzw. polyklonale anti-BTX (Benzol-Toluol-Xylol) [404] und anti-Diclofenac-Antikörper [405] einpolymerisiert. Bei mehrfacher Beladung der 4 verschiedenen Blank-Adsorber-Typen aus mehrfachen Präparationen ($n = 3$) mit allen in dieser Arbeit eingesetzten SU-Standards, konnte in keinem Fall eine unspezifische Bindung an die SGG-Matrix bzw. die „Fremd-Antikörper“ festgestellt werden. Organische Modifier sollen zusätzlich die unspezifische Adsorption von Matrixbestandteilen unterdrücken. Auf den Zusatz von organischen Modifizieren zur Probe wurde jedoch verzichtet, da bereits eine Konzentration von 5% ACN (v/v) zu einer Verschlechterung der Wiederfindungsraten führte. Da auch ohne Modifier-Zusatz durchwegs saubere Chromatogramme erhalten wurden, konnte darauf verzichtet werden.

3.3.4 Kapazitäten

Die Kapazität steht im direkten Verhältnis zur einpolymerisierten Antikörpermenge und kann durch deren Steigerung erhöht werden. Ein Vergleich von Adsorbern mit unterschiedlichen IgG-Gehalten verdeutlicht dies:

Tabelle 23: Anfangskapazität für Metsulfuron-methyl (MSM). Immunsorber mit unterschiedlichem Gehalt an pAk-R03 ($n = 3$, 1 s). Ergebnisse von erster Beladung. Messung: HPLC-UV/DAD.

Gemahlener SGG-Monolith mit immobilisiertem pAk-R03			
IgG-Gehalt [mg]	1.6	2.0	2.4
Kapazität für MSM [ng]	465 ± 60	547 ± 66	784 ± 43
SGG-gecoatete Silikatpartikel mit immobilisiertem pAk-R03			
IgG-Gehalt [mg]	1.6	2.0	2.4
Kapazität für MSM [ng]	510 ± 27	578 ± 29	681 ± 44

Es wurden Durchbruchkurven von Adsorbern erstellt, die 2 mg spezifischen Antikörper pAk-R03 bzw. 2 mg unspezifisches Rinder-IgG oder keinen Antikörper enthielten. Beladen wurden die Säulen dafür jeweils mit 1-mL-Portionen der Konzentration 25 ng/mL an

MSM. Bei den beiden Blank-Säulen erfolgte nach einem kurzen Totvolumen der Durchbruch des Analyten, was beweist, dass adsorptive unspezifische Wechselwirkungen zwischen Analyt und Adsorbentmaterial vernachlässigbar gering sind. Beim spezifischen anti-SU-Immunadsorber erfolgte der Durchbruch erst nach der Aufgabe von ca. 350 ng MSM.

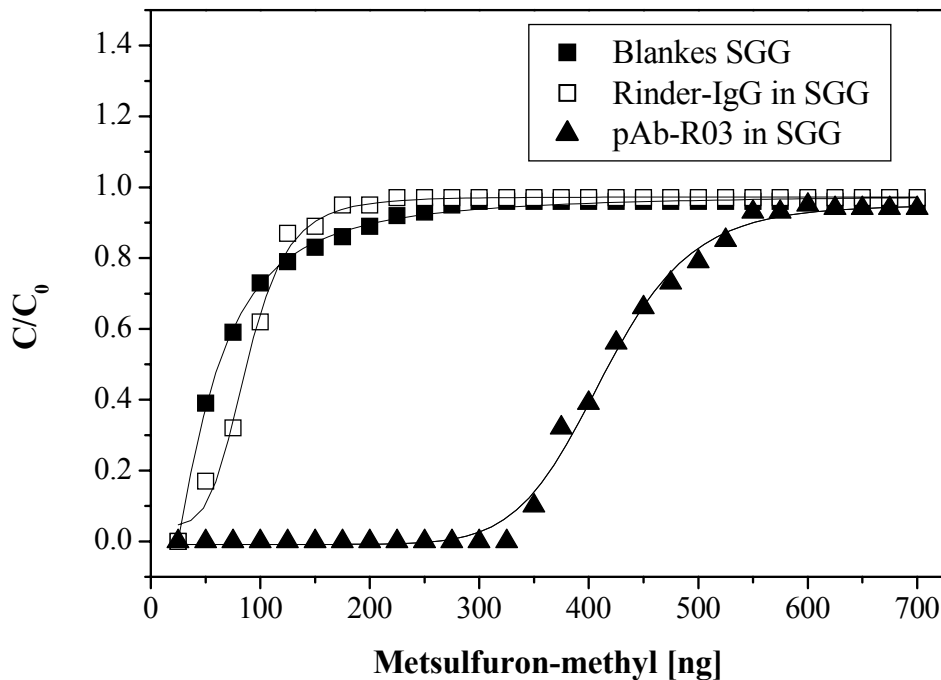


Abbildung 60: Durchbruchskurven von SGG-Immunadsorbentern. SGG-gecoatete Silikatpartikel mit 2 mg pAk-R03, 2 mg Rinder-IgG oder blankem SGG. Beladung: 25 ng/mL MSM, 1-mL-Portionen. Messung: HPLC-UV/DAD. Auswertung: C/C_0 = Konzentrationsverhältnis Elution/Aufgabe.

Die Kapazität für einzelne Verbindungen ist weiterhin abhängig von der Affinität des Antikörpers gegenüber dem jeweiligen Analyten und findet seinen Ausdruck in der Kreuzreaktivität. Daher wurden die Kapazitäten der standardisiert mit 2 mg pAk-R03 hergestellten anti-SU-Adsorber bei Überladung mit 1 μ g eines Analyten in Vergleich zur Kreuzreaktivität gesetzt. Bemerkenswert ist, dass die Anfangskapazität der Säulen, sowohl bei den gemahlten SGG-Monolithen, als auch bei den SGG-gecoateten Silikatpartikeln, relativ hoch ist und bei der zweiten Beladung schon auf etwa 60% der Ursprungskapazität abfällt, auf diesem Niveau jedoch über zahlreiche Beladungszyklen relativ stabil bleibt (vgl. Abbildung 61). Die im folgenden dargestellten Ergebnisse wurden durchweg mit Adsorbentern generiert, die das 2. bis 10. Mal benutzt wurden, um eine Vergleichbarkeit zu garantieren.

Tabelle 24: Kapazitäten der Immunadsorber für einzelne SUs ($n = 3$, 1 s). Adsorber: SGG-gecoatete Partikel, 2 mg pAk-R03, Ausgangskapazität ca. 600 ng MSM. Beladung: 1 μg SU, 2. bis 10. Beladung. Messung: HPLC-UV/DAD.

Sulfonylharnstoffherbizid	CR [%], direkter ELISA	Kapazität [ng]
Mesosulfuron-methyl	1050	459 \pm 65
Chlorimuron-ethyl	277	440 \pm 37
Imazosulfuron	229	402 \pm 26
Chlorsulfuron	197	391 \pm 31
Cyclosulfamuron	153	455 \pm 69
Pyrazosulfuron-ethyl	144	457 \pm 66
Sulfosulfuron	128	423 \pm 36
Triasulfuron	110	494 \pm 41
Metsulfuron-methyl	101	392 \pm 47
Halosulfuron-methyl	75	313 \pm 21
Ethametsulfuron-methyl	68	326 \pm 33
Iodosulfuron-methyl	66	267 \pm 19
Primisulfuron-methyl	60	321 \pm 40
Flazasulfuron	57	246 \pm 29
Prosulfuron	48	287 \pm 27
Thifensulfuron-methyl	33	208 \pm 12
Cinosulfuron	20	284 \pm 38
Azimsulfuron	16	212 \pm 19
Sulfometuron-methyl	16	323 \pm 24
Flupyralsulfuron-methyl-Natrium	3	143 \pm 18
Tribenuron-methyl	2	82 \pm 11
Triflursulfuron-methyl	1	211 \pm 25
Amidosulfuron	< 0.5	83 \pm 34
Etoxysulfuron	< 0.5	71 \pm 12
Flucarbazon	< 0.5	84 \pm 14
Nicosulfuron	< 0.5	108 \pm 26
Oxasulfuron	< 0.5	73 \pm 43
Rimsulfuron	< 0.5	98 \pm 14
Bensulfuron-methyl	n.r.	36 \pm 21
Propoxycarbazon	n.r.	< 11

Dabei zeigte sich, dass SUs mit einer Kreuzreaktivität von mehr als 16% Kapazitäten im Bereich von über 200 ng lieferten. Jedoch auch SUs mit sehr geringen Kreuzreaktivität im ELISA, konnten zu einem geringen Teil angereichert werden. In den anschließenden Wiederfindungsversuchen wurde bestätigt, dass eine hohe bereitgestellte Kapazität auch bei Verbindungen mit geringer Kreuzreaktivität zu besseren Wiederfindungen führt. Der Immunadsorber ist für eine Wirkstoffmenge von etwa 5 bis 300 ng einsetzbar. Daher ist eine entsprechend sensitive Detektion notwendig, um viele SUs gleichzeitig anreichern zu können.

3.3.5 Wiederfindungen

Um reduzierte Wiederfindungen zu vermeiden, sollte die maximale Bindungskapazität eines Immunadsorbers nicht vollständig ausgeschöpft werden. Wird dies berücksichtigt, so liegen die Wiederfindungsraten für mindestens 13 Verbindungen bei über 80% unter Idealbedingungen aus Wasser (vgl. III 4.3.2). Mit geringfügig erhöhten Wiederfindungen ist zu rechnen, wenn sehr kleine Probenvolumina verwendet werden bzw. die Analytkonzentration sehr gering ist, so dass man sich nahe am LOQ bewegt. Da die Wiederfindung außerdem vom Detektionsbereich und der Probenmatrix abhängt, wird in Kapitel III 4 auf einzelne Anwendungsbeispiele und die erzielten Wiederfindungen genauer eingegangen. Aufgrund der hohen Selektivität der Immunextraktion wurden bei Realwasserproben nahezu keine Matrixinterferenzen im Chromatogramm festgestellt. Damit ist diese Technik im Vergleich zu den herkömmlichen SPE-Kartuschen überlegen, die neben SUs auch Fremdstoffen unspezifisch anreichern, welche im Chromatogramm stören bzw. zu Überfindungen führen können. Daneben ist ein sachgerechter Einsatz, wie beispielsweise die Einhaltung eines relativ niedrigen Flusses von 1 bis 2 mL/min von Bedeutung.

3.3.6 Stabilität

Zur Stabilitätsprüfung wurde die Kapazität für MSM bzw. Triasulfuron in 20 bzw. 30 Beladungs-Elutions-Zyklen für Adsorber aus gemahlenem SGG-Monolithen sowie für SGG-gecoatete Partikel bestimmt. Alle Adsorber zeigten mit zunehmender Anzahl von Anwendungen eine Kapazitätsabnahme. Der Kapazitätspuffer wird somit bei zunehmender Zahl der Anwendungen reduziert, die Funktionsfähigkeit bleibt aber grundsätzlich erhalten.

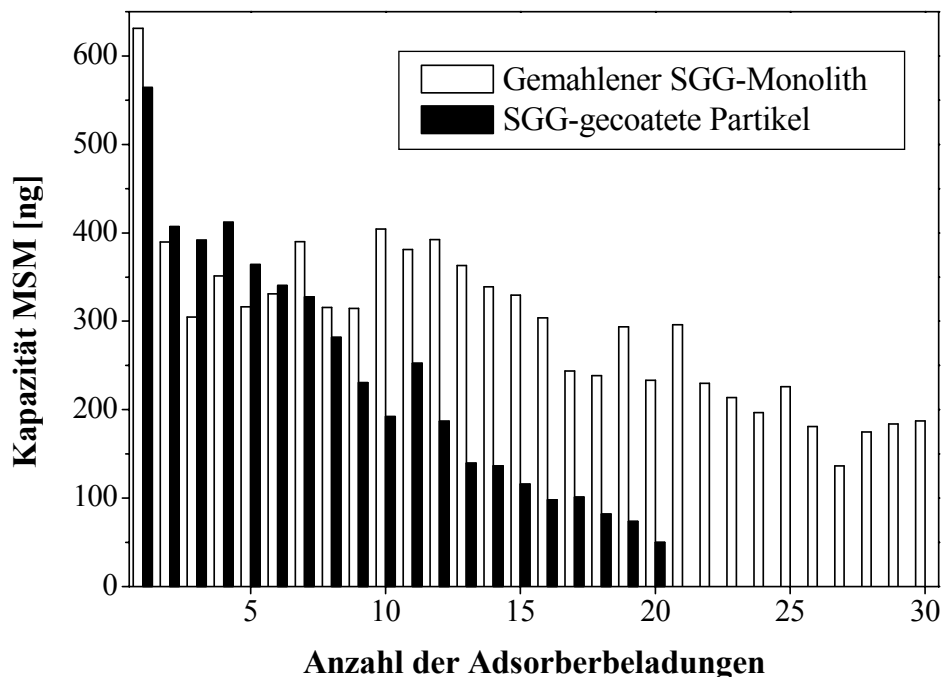


Abbildung 61: Stabilität des pAk-R03 nach 20 bzw. 30 Beladungs-Elutions-Zyklen in SGG-gecoateten Partikeln und gemahlenem SGG-Monolithen. Beladung: 1 μg MSM, 10 mL Wasser. Messung: HPLC-UV/DAD.

Die Wiederfindungsrate wurde bei einer durchschnittlich 20-fachen Verwendung des monolithischen Adsorbermaterials nicht beeinträchtigt, solange ein ausreichend großer Kapazitätspuffer von rund 50% eingehalten wurde. Die Adsorber aus SGG-gecoatetem Material wurden lediglich bis zu 12 Mal wiederverwendet. Die Selektivität blieb jeweils unter Verwendung verschiedenster Wasserproben erhalten. Allerdings hatte sie ihre Grenzen bei der direkten Aufgabe von Lebensmittelextrakten aus Kartoffeln und Getreide, die durch Flüssig-Flüssig-Extraktion gewonnen wurden und ohne einen weiteren Aufreinigungsschritt direkt auf den Immunadsorber gegeben wurden. Bei sachgerechter Lagerung in azidhaltiger Kochsalzlösung unter Kühlung (4 bis 7°C) sind die Antikörpersäulen mindestens 6 Monate haltbar. Durch die Lagerung bei optimalen Bedingungen hinsichtlich Temperatur und Ionenstärke lassen sich Antikörper auch zu einem gewissen Grad reaktivieren, was sich beispielsweise durch eine merklich verbesserte Kapazität nach einer Ruhephase über Nacht bemerkbar macht. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, sind Pausen zwischen den einzelnen Beladungen durchaus von Vorteil, weil damit der langsamen Umfaltung der Antikörperbindungstasche in die bindungsfähige Ausgangslage, was nach der Elution erfolgen muss, Rechnung getragen wird.

4 Anwendung von anti-SU-SGG-Adsorbieren für die Off-line-Extraktion von Realproben

4.1 Anreicherung von SUs für die HPLC-UV-Detektion

4.1.1 Kalibrierung, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Um das Bindungsverhalten einer möglichst großen Zahl von Analyten gleichzeitig testen zu können, wurden Untersuchungen mit insgesamt 26 SUs durchgeführt, die entsprechend ihrem Elutionsverhalten in zwei Gruppen eingeteilt wurden.

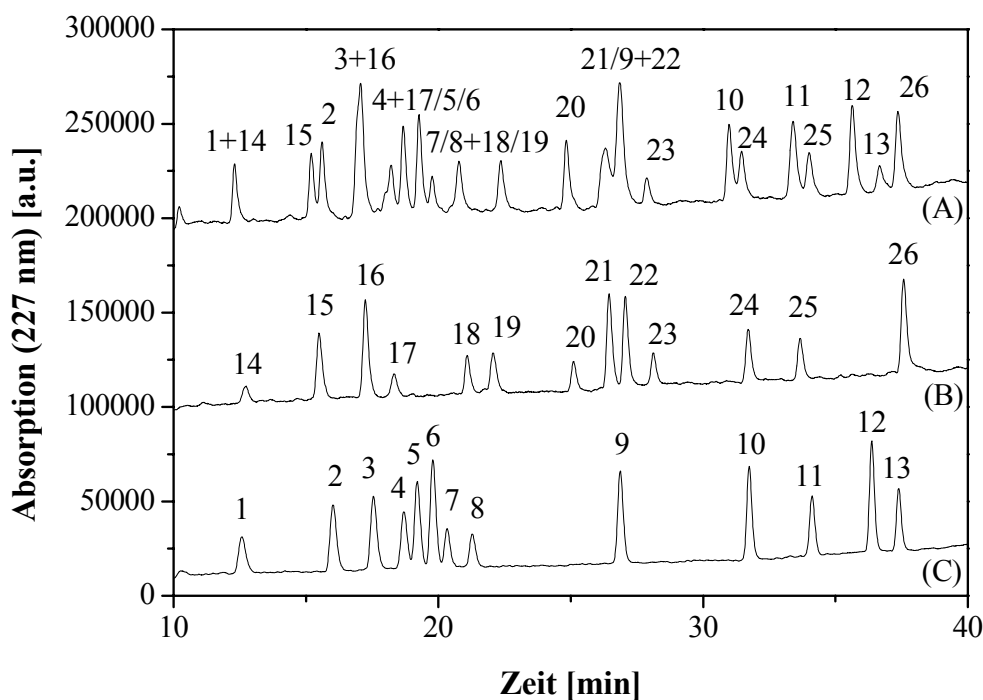


Abbildung 62: Chromatogramme der Standards. (A) Standardmix 3 (26 SUs). (B) Standardmix 2 (13 SUs). (C) Standardmix 1 (13 SUs). SUs: (1) Nicosulfuron. (2) Thifensulfuron-me. (3) Metsulfuron-me. (4) Sulfometuron-me. (5) Triasulfuron. (6) Chlorsulfuron. (7) Amidosulfuron. (8) Rimsulfuron. (9) Tribenuron-me. (10) Prosulfuron. (11) Chlorimuron-et. (12) Triflursulfuron-me. (13) Primisulfuron-me. (14) Halosulfuron-me. (15) Oxasulfuron. (16) Cinosulfuron. (17) Jodosulfuron-me. (18) Flupyrsulfuron-me-Na. (19) Flucarbazon. (20) Sulfosulfuron. (21) Propoxycarbazon. (22) Imazosulfuron. (23) Bensulfuron-me. (24) Pyrazosulfuron-et. (25) Etoxysulfuron. (26) Cyclosulfamuron. HPLC-Bedingungen: RP18-Phase Bischoff NC Prontosil 120-3-C₁₈-AQ. Elution A: Bidest. H₂O + 3 mM TFA, B: ACN + 3 mM TFA, Gradientensystem, 500- μ L-Probenschleife.

Eine vollständige chromatographische Trennung aller Substanzen in einem Lauf konnte nicht erreicht werden, da sich die Analyten sehr ähnlich sind. In Abbildung 62 sind die Chromatogramme des Summenstandards (Standardmix 3), sowie der beiden Standardmixe 1 und 2 dargestellt.

Die Quantifizierung der einzelnen SUs erfolgte über Kalibriergeraden, die anhand externer Standardmessungen bei vier verschiedenen Konzentrationen ermittelt wurden (vgl. Abbildung 63). Außerdem wurde spätestens nach jedem 5. bis 10. Chromatographielauf ein Kontrollstandard bekannter Konzentration vermessen, um die Stabilität des Systems fortlaufend zu überprüfen.

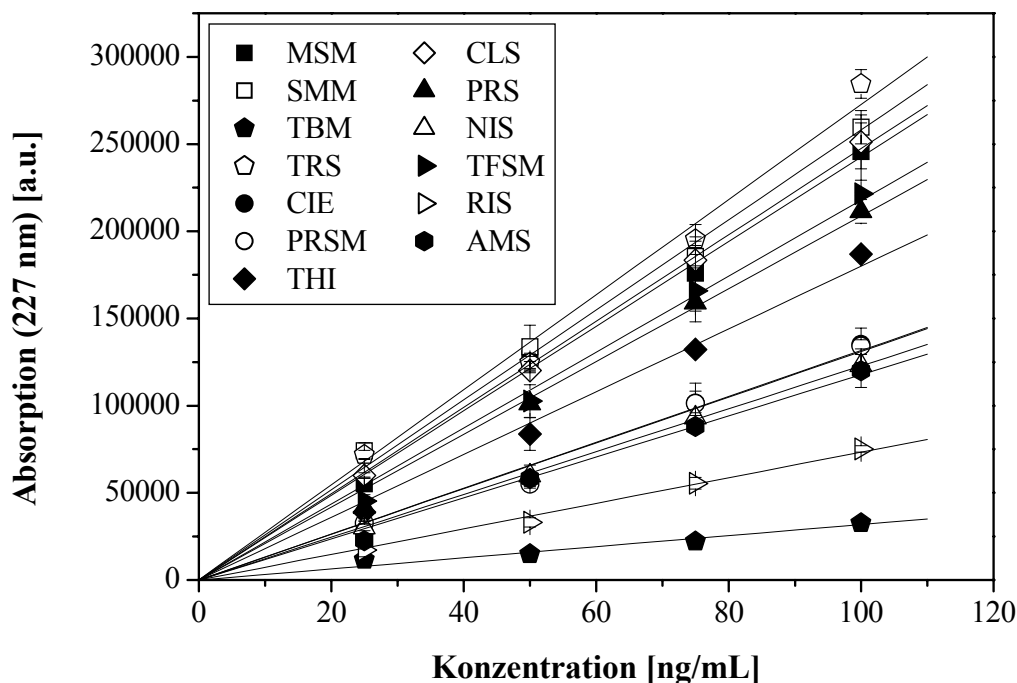


Abbildung 63: Kalibriergeraden zur Bestimmung der Konzentration von 13 ausgewählten SUs mittels HPLC-UV/DAD.

Je nach Absorptionsintensität der einzelnen SUs liegt die Nachweisgrenze (3-faches Grundrauschen) der HPLC-UV-Detektion bei etwa 2 bis 7 ng, die Bestimmungsgrenze (6-faches Grundrauschen) bei etwa 4 bis 14 ng.

Da bei der Off-line-Anreicherung mittels SGG-IAC mit mindestens 2 mL Elutionsmittel eluiert werden muss, um eine vollständige Elution zu erzielen, findet hier ein Verdünnungsschritt um dem Faktor 2 statt. Bei der Injektion (Probenschleife: 500 μ L) wird nochmals um den Faktor 2 „verdünnt“. Daher liegt die Bestimmungsgrenze des Verfahrens bei

ca. 16 bis 56 ng in Abhängigkeit vom UV-Absorptionsverhalten des SUs. Die Absorptionsintensität von etwa der Hälfte der Verbindungen liegt im oberen Bereich, so dass die Bestimmungsgrenze hier mit etwa 16 ng angesetzt werden kann. Bei einem Grenzwert von 100 ng/L müssen somit mindestens 100 bis 150 mL Wasserprobe angereichert werden. Die dargestellten Versuche wurden daher meist mit 100 mL Probenvolumen durchgeführt. Bei der On-line-Methode ist die erreichbare Nachweisgrenze mindestens um den Faktor 2 besser, da der gesamte adsorbierte Analyt auf die analytische HPLC-Säule eluiert wird und nicht, wie bei der manuellen Injektion, 50% über die Probenschleife verloren gehen.

4.1.2 Immunoaffinitätsextraktion von SUs aus Wasserproben

Die in diesem Kapitel beschriebenen Versuchsergebnisse wurden durchwegs mittels pAk-R03, immobilisiert in gemahlene SGG-Monolithen, generiert.

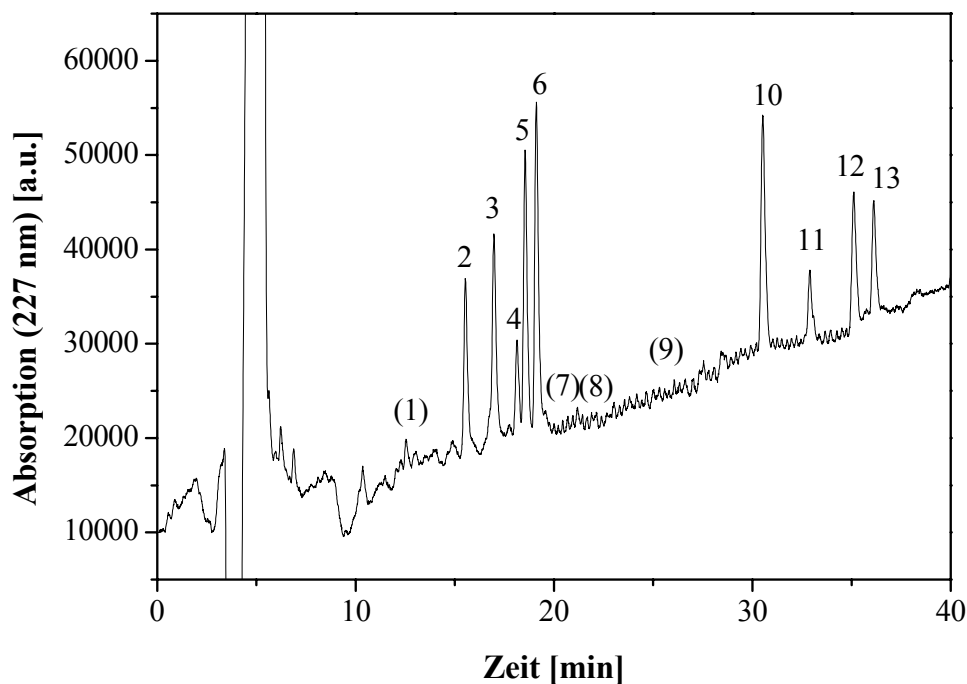


Abbildung 64: Chromatogramm der Off-line-SGG-IAC-Anreicherung von 100 mL Leitungswasser, gespikt mit 50 ng SU-Standardmix 1. Standardmix 1: (1) Nicosulfuron. (2) Thifensulfuron-me. (3) Metsulfuron-me. (4) Sulfometuron-me. (5) Triasulfuron. (6) Chlorsulfuron. (7) Amidosulfuron. (8) Rimsulfuron. (9) Tribenuron-me. (10) Prosulfuron. (11) Chlorimuron-et. (12) Triflusulfuron-me. (13) Primisulfuron-me. Messung: HPLC-UV/DAD; Gradientensystem, A: Bidest. H₂O, 3 mM TFA, B: ACN, 3 mM TFA; RP18-Prontosil, 3 µm; Injektion: 500 µL. Wiederfindungsraten vgl. Abbildung 65.

Abbildung 64 demonstriert ein Beispielchromatogramm nach Immunoaffinitätsanreicherung von 100 mL Leitungswasser, gespikt mit 100 ng Standardmix 1. Mittels pAk-R03 konnten 9 von 13 Standards angereichert werden. Insgesamt können 19 der 26 getesteten SUs angereichert werden, wie mit Standardmix 1 und 2 gezeigt werden konnte. Für 12 Standards werden Wiederfindungen von über 60% erreicht. Dabei bleibt zu berücksichtigen, dass die Kartuschen mit einer Beladungsmenge von insgesamt 1300 ng SUs deutlich überladen wurden. Der Versuch diente aber dazu einen schnellen Überblick über das Retentionsverhalten einer großen Gruppe an SUs zu erlangen.

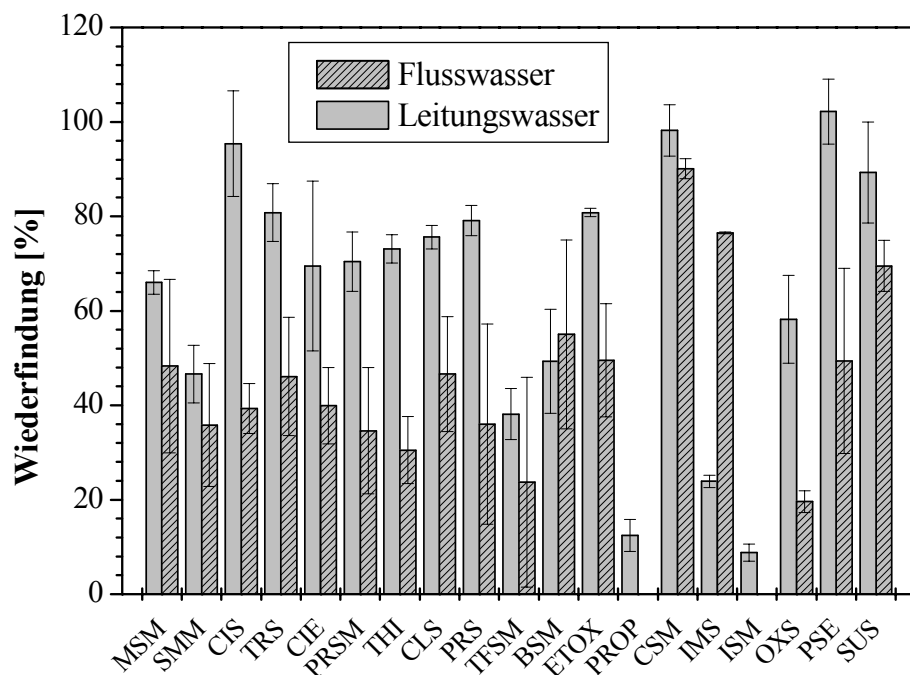


Abbildung 65: Wiederfindungsraten bei aufgestockten Leitungs- und Flusswasserproben (n = 3, 1 s). Es wurden jeweils 100 mL Probe mit Standardmix 1 bzw. 2 gespikt und mittels SGG-IAC (Antikörper: pAk-R03) angereichert. Exemplarisches Chromatogramm vgl. Abbildung 64.

Bei den untersuchten Fluss- und Seewasserproben waren in parallelen Versuchen die Wiederfindungen im allgemeinen niedriger, als bei den untersuchten Leitungswasserproben (Abbildung 65). Bei Wiederfindungsversuchen von SUs aus einer wässrigen Huminsäurelösung (10 mg/mL) wurden jedoch geringere Effekte festgestellt, als bei den Realproben. Bei diesen Huminsäurelösungen kam es zu einer Reduktion der Wiederfindungen um bis zu 10%. Die Ursache der relativ stark schwankenden Wiederfindungen im vorliegenden Versuch war daher hauptsächlich auf die Überladung der Säulen und deren Kapazitätsschwankungen zurückzuführen. Wenngleich auch Huminsäuren einen gewissen negativen

Einfluss zeigen können. Die Sol-Gel-Matrix schützt den Antikörper zwar vor den großen Matrixmolekülen, Wechselwirkungen von Huminsäuren mit den Analyten selbst, können dennoch auftreten.

Im Weiteren wurden 2 verschiedene RP-Phasen im Vergleich zur SGG-IAC anhand von gespikten Flusswasserproben untersucht. Wie Abbildung 66 zeigt, wurde mit SGG-IAC die beste Aufreinigung erzielt. Dies demonstriert den deutlichen Selektivitätsvorteil der IAC.

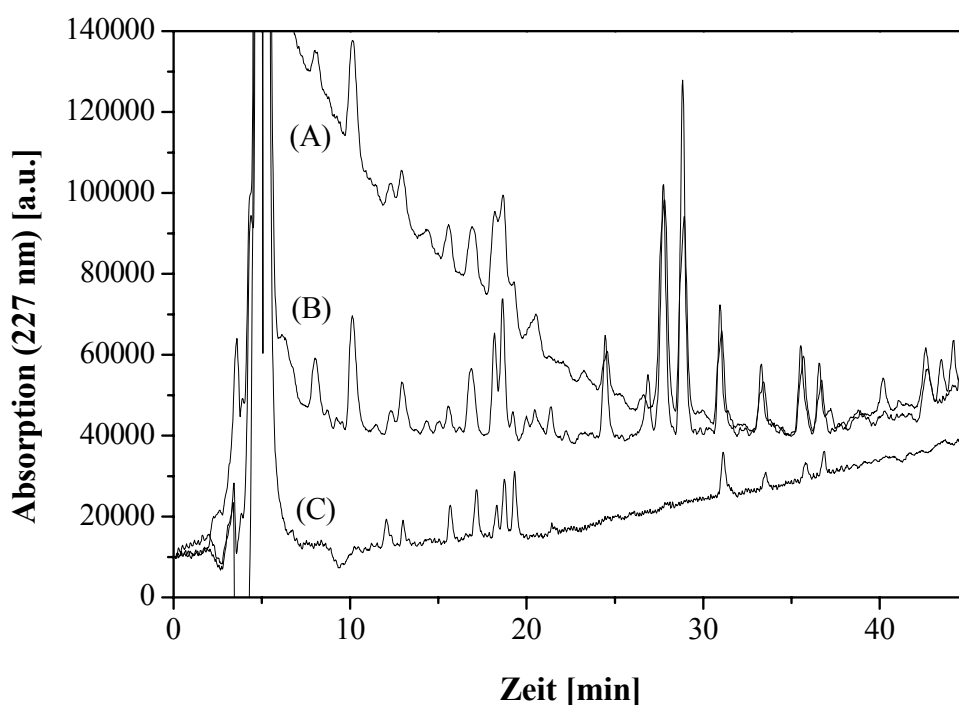


Abbildung 66: Selektivitätsvergleich der IAC mit zwei kommerziellen SPE-Phasen. (A) Oasis[®] HLB (Waters). (B) LiChrolut[®] (Merck). (C) SGG-IAC (pAk-R03, gemahlener Monolith). Aufreinigung von mit SUs (Standardmix 1, je 50 ng SU) gespiktem Flusswasser (100 mL Probe). Messung: vgl. Abbildung 64.

Weitere Versuche mit Wasserproben aus Fließgewässern (*Isar, Loisach, Windach*) und stehenden Gewässern (*Ammersee, Wörthsee*) wurden mit einem 6er-SU-Standardmix durchgeführt, um eine Überladung der Säulen (Übersteigen der Kapazität) auszuschließen. In diesem Standard wurden auch die Verbindungen Amidosulfuron, Rimsulfuron und Nicosulfuron einbezogen, die als Bestandteil von Standardmix 1 (13 Verbindungen) nicht auf der Immunadsorbersäule angereichert wurden. Es wurde deutlich (Abbildung 67), dass die sechs SUs aus allen Proben angereichert werden konnten, teilweise mit Wiederfindungsraten um 100%. Bei Bereitstellung einer ausreichend hohen Bindungskapazität können demnach auch Verbindungen angereichert werden, die eine offenbar schlechtere

Antikörper-Bindung zeigen. Dieser Befund steht im Einklang mit früheren Untersuchungen unter Verwendung von Antikörpern gegen polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe [406].

Niedrigere Wiederfindungen wurden für Amidosulfuron, Rimsulfuron, Nicosulfuron und Metsulfuron-methyl aus Seewasserproben gefunden. Wie vorausgehend erwähnt, sollte die Empfindlichkeit des pAk-R03 gegenüber höheren Huminsäurekonzentrationen, wie sie im ELISA beobachtet wurde, bei der IAC durch die Schutzfunktion der SGG-Matrix kaum eine große Rolle spielen. Dennoch wurde bei Kontrollversuchen zur SU-Anreicherung aus einer Huminsäurelösung (10 mg/mL) ebenfalls eine Reduktion der Wiederfindungen um bis zu 10% festgestellt. Auch die Wiederfindungen aus Fluss- und Seewasserproben waren niedriger als bei den gespikten bidest. Wasserproben. Allerdings ist die Streuung der Werte auch relativ hoch und die eingesetzten Proben zeigten eher niedrige DOC-Gehalte von 2 bis 3 mg/L. Zur Ursachenfindung bedarf es hier weiterer Untersuchungen. Hinsichtlich der Selektivität war die IAC für alle Wasserproben hervorragend geeignet. Es wurden durchweg sehr saubere Chromatogramme erhalten (Abbildung 68).

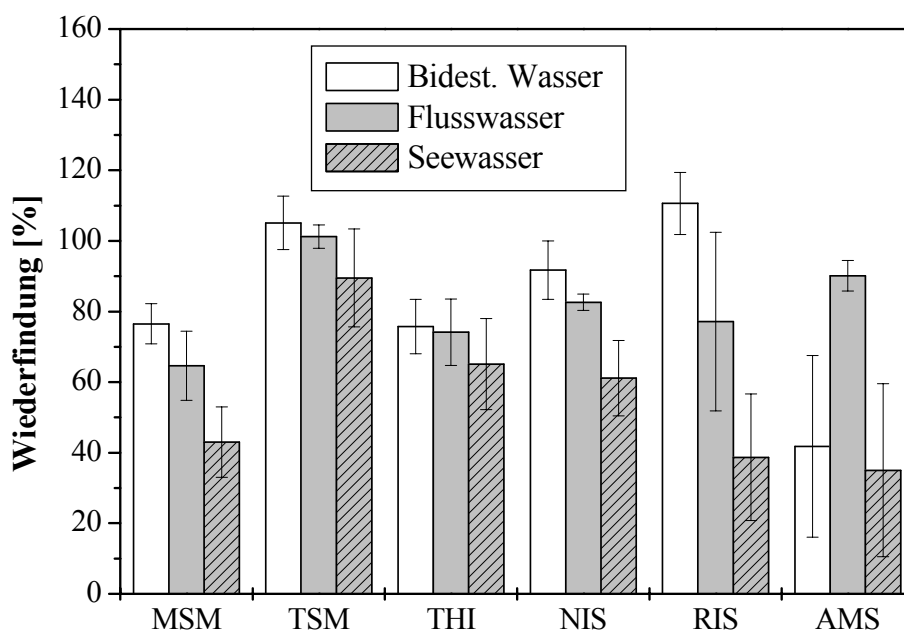


Abbildung 67: Matrixeffekte bei der Anreicherung von SUs aus verschiedenen Wasserproben: Wiederfindungen (n = 3, 1 s). Je 50 ng der 6 Standards wurden in 100 mL Wasserprobe auf die IAC-Säule (pAk-R03, gemahlener SGG-Monolith) gegeben. Messung: HPLC-UV/DAD. Exemplarische Chromatogramme in Abbildung 68.

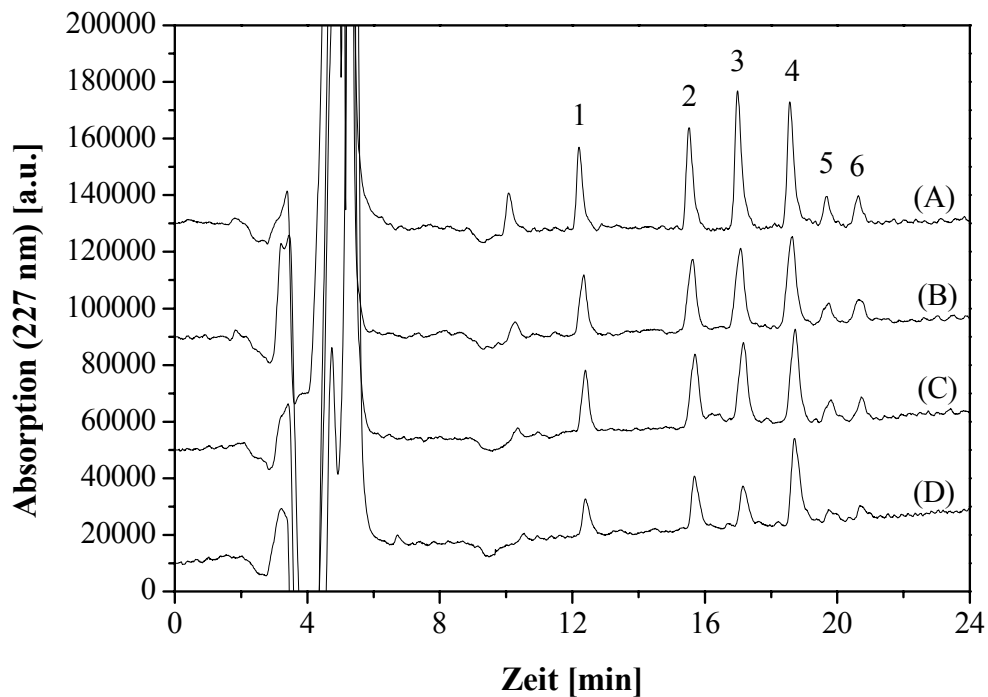


Abbildung 68: Matrixeffekte bei der Anreicherung von SUs aus verschiedenen Wasserproben: Chromatogramme: (A) Standardmix (keine Anreicherung). (B) Bidest. Wasser. (C) Flusswasser. (D) Seewasser. (1) Nicosulfuron. (2) Thifensulfuron-me. (3) Metsulfuron-me. (4) Triasulfuron. (5) Amidosulfuron. (6) Rimsulfuron. Je 50 ng der 6 Standards wurden in 100 mL Wasserprobe auf die IAC-Säule (pAk-R03, gemahlener SGG-Monolith) gegeben. Messung: HPLC-UV/DAD. Gradientensystem, A: Bidest. Wasser, 3 mM TFA, B: ACN, 3 mM TFA; RP18-Prontosil, 3 μm ; Injektion: 500 μL . Zugehörige Wiederfindungswerte vgl. Abbildung 67.

In diesem Zusammenhang wurde auch geprüft, ob eine pH-Abhängigkeit der Wiederfindung existiert. Dazu wurden Flusswasserproben mit dem Standardmix 1 aufgestockt. Neben dem Ausgangs-pH-Wert 8,0, wurden weitere pH-Werte von 4,0, 5,0, 6,0 und 7,0 mit einem Phosphatpuffer eingestellt. Signifikante Unterschiede in den Wiederfindungsraten konnten im geprüften pH-Bereich 4,0 bis 8,0 nicht ausgemacht werden (Abbildung 69).

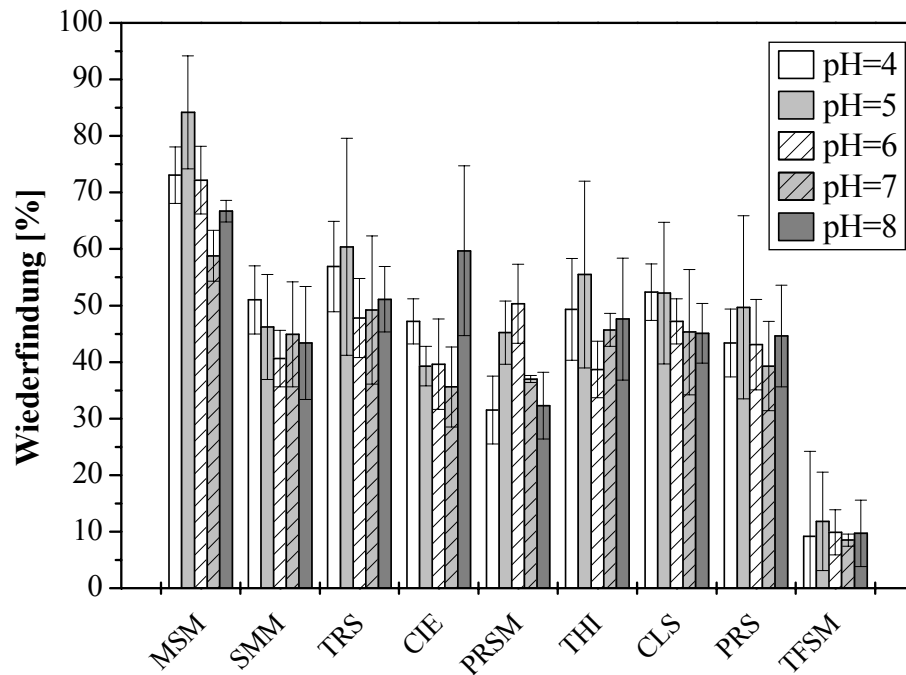


Abbildung 69: Einfluss des pH-Wertes auf die Wiederfindung bei der IAC ($n = 3$, $1 s$). Adsorber (pAk-R03, gemahlener SGG-Monolith). Probe: 50 ng Standardmix 1 in 10 mL Isarwasser, pH = 4, 5, 6, 7, 8. Keine Anreicherung von TBM, NIS, RIS, AMS (nicht dargestellt). Messung: HPLC-UV/DAD.

4.1.3 Immunoaffinitätsextraktion von Lebensmittelproben

Als Lebensmittelproben wurden 2 verschiedene Getreidearten und Kartoffeln ausgewählt, da bei diesen Pflanzen Sulfonylharnstoffe am häufigsten eingesetzt werden. Von den drei eingesetzten Lebensmittelmatrices war bekannt, welche Pestizide in der Vegetationsperiode der Pflanzen angewandt wurden. In Tabelle 25 sind diese detailliert aufgeführt.

Die Proben wurden zunächst in einem haushaltsüblichen Mixer zerkleinert und dann für Extraktions- und Festphasendispersionsexperimente herangezogen. Dafür wurden sie jeweils mit und ohne Aufstocken aufgearbeitet. In den Proben ohne SU-Zusatz konnten keine SUs festgestellt werden. Offenbar wurden die Herbizide während des Pflanzenwachstums bzw. bei der späteren Lagerung der Frucht abgebaut. Folglich konnten die unbelasteten Pflanzenmaterialien als Nullmatrix herangezogen werden.

Tabelle 25: Eingesetzte Lebensmittelproben. Die Pflanzen wurden während des Wachstums u.a. mit Metsulfuron-methyl und Thifensulfuron-methyl behandelt. Anbau in Oberfranken, Ernte 2003.

Probe	Art und Sorte	Behandlung während Wachstumsphase
LM-1	Sommergerste „Scarlet“	<i>Herbizide:</i> Concert (<i>DuPont</i>): Metsulfuron-methyl, Thifensulfuron-methyl; Basagran DP (<i>BASF</i>): Bentazon, Dichlorprop-P; Ralon Super (<i>DuPont</i>): Fluoxaprop-P-Ethyl, Mefenpyr-Diethyl; <i>Fungizid:</i> Stratego (<i>Bayer</i>): Trifloxystrobin, Propiconazol
LM-2	Hafer „Jumbo“	<i>Herbizide:</i> Concert (<i>DuPont</i>): Metsulfuron-methyl, Thifensulfuron-methyl; Basagran DP (<i>BASF</i>): Bentazon, Dichlorprop-P;
LM-3	Kartoffeln „Granada“	unbehandelt

Zur Flüssig-Flüssig-Extraktion von Sulfonylharnstoffen aus Lebensmitteln findet man in der Literatur verschiedenste Strategien. Die klassische Pestizid-Extraktion basiert auf der Extraktion der Rückstände mittels einer Aceton-Wasser-Mischung und dem anschließenden Ausschütteln mit Ethylacetat/Cyclohexan (1:1, v/v), welches aus Arbeitsschutzgründen als Dichlormethanersatz eingesetzt wird. Bei der Extraktion von polaren Verbindungen erwiesen sich jedoch Extraktionsmittel wie ACN oder MeOH als effizienter. Von Bedeutung ist außerdem ein ausreichend hoher Wasseranteil in der Extraktionsmischung. Da die Selektivität des Lösungsmittels für die Analyten die wichtigste Voraussetzung dafür ist möglichst viele Matrixbestandteile abzutrennen, wurden 3 verschiedene Extraktionsmethoden hinsichtlich ihres Matrixausschlusses geprüft (vgl. Tabelle 26). KLEIN und ALDER erhielten bei vergleichbaren Extraktionsexperimenten für die Matrices Tomaten, Orangen, Weizenmehl, Rosinen und Avocado Extraktionsrückstände von max. 38, 81, 52, 370 und 40 mg. Da sich die einzelnen Lösungsmittel hinsichtlich der Matrixextraktion nicht deutlich unterscheiden, wurde wie in der Literatur beschrieben, ebenfalls MeOH gewählt [143].

Tabelle 26: Extraktionsrückstände [mg] der drei ausgewählten Probenmatrixes mittels verschiedener Extraktionsmittel.

Matrix	Extrahierte Probenmenge [g]	Aceton-Wasser-Extrakt (2+1)	ACN-Wasser-Extrakt (2+1)	MeOH-Wasser-Extrakt (2+1)
Gerste	1.0	72	57	73
Hafer	1.0	81	75	87
Kartoffeln	1.0	49	52	62

Grundsätzlich muss beachtet werden, dass der Verteilungskoeffizient ($\log P_{O/W}$) der Sulfonylharnstoffe stark vom pH-Wert des Extraktionssystems abhängig ist. Niedrige Verteilungskoeffizienten, wie sie bei den SUs im Neutralen gegeben sind, führen zu einer höheren Wasserlöslichkeit. Bei saurem pH-Wert ist ihre Wasserlöslichkeit hingegen wesentlich geringer. POWLEY beschreibt eine einfache Extraktionsmethode mittels Phosphatpuffer bei pH 6.0, die zudem direkt mit der Immunextraktion kombiniert werden kann, während bei Extraktion mit organischen Lösungsmitteln zunächst der Lösungsmittelanteil entfernt werden muss, bevor der Extrakt auf den Immunadsorber gegeben werden kann. Veröffentlichungen zu neueren Multi-Rückstandsmethoden für Lebensmittel kombinieren den Flüssigextraktionsschritt i.d.R. mit der Festphasendispersion [143, 407, 408]. Grundsätzlich ist der Einsatz der Festphasendispersion direkt für das Lebensmittelhomogenisat möglich. Dafür vermengt man die mit Wasser vermischte Lebensmittelprobe direkt mit dem Festphasenmaterial, ohne dass eine Extraktion vorausgeht. Einige Experimente dazu führten bei den eingesetzten Matrixes jedoch zu reduzierten Wiederfindungen gegenüber der Kombination mit der Flüssigextraktion und wurden daher nicht weiter verfolgt. Gegenüber der von KLEIN und ALDER publizierten Methode, die verschiedenste Pestizidklassen erfasst, wurde aufgrund der starken pH-Abhängigkeit der Verteilungskoeffizienten der SUs eine Modifikation dahingehend vorgenommen, dass die Probenextrakte vor Aufgabe auf das ChemElut[®]-Material angesäuert wurden, wodurch die Tendenz in die organische Elutionsphase überzugehen erhöht wird. Die Histogramme in Abbildung 70 fassen den Ablauf der beiden angewandten Extraktionsmethoden im Überblick zusammen. Für die Herstellung von gespikten Blankextrakten wurden die Rohextrakte parallel in gleicher Weise behandelt.

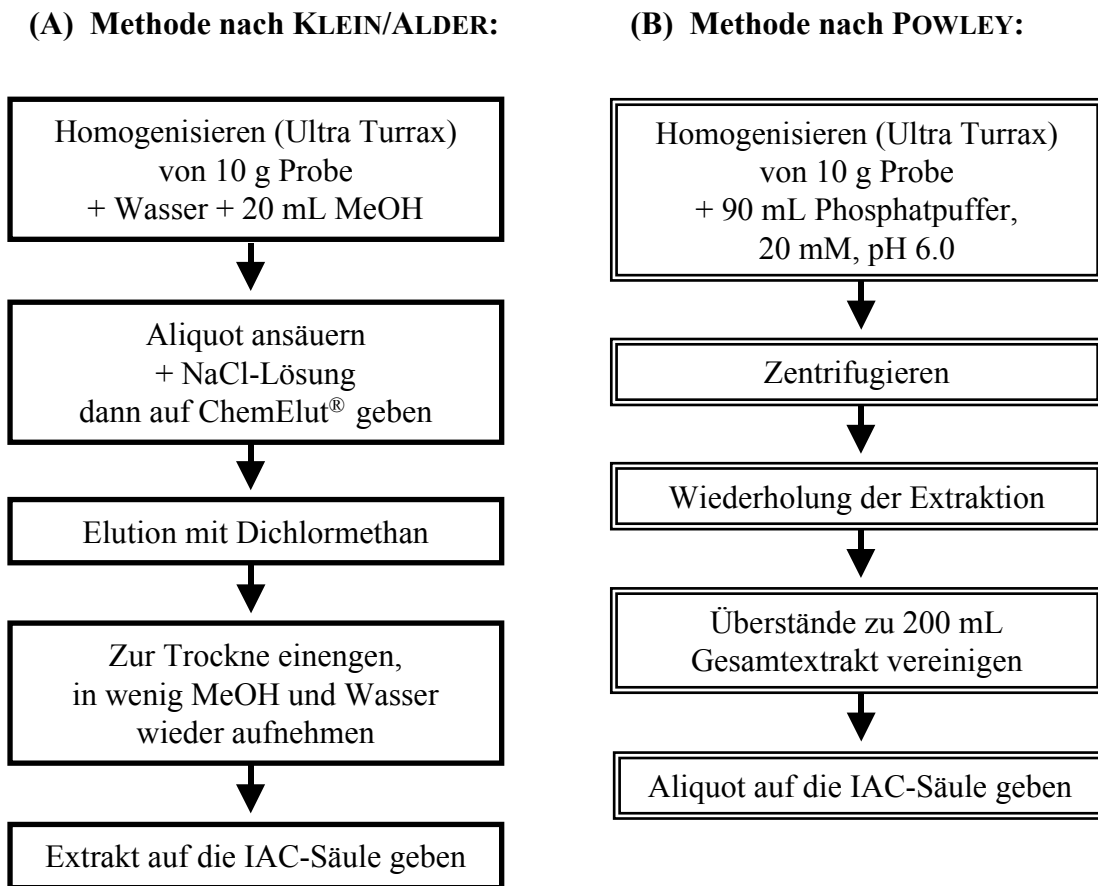


Abbildung 70: Extraktion von SUs aus Lebensmitteln nach (A) KLEIN/ALDER sowie (B) POWLEY.

Durch IAC aufgereinigte Kartoffelextrakte lieferten bei der Messung mit HPLC-UV/DAD saubere, leicht auswertbare Chromatogramme (vgl. Abbildung 71). Die Gersten- und Haferextrakte zeigten nach der Immunextraktion noch Störpeaks im Chromatogramm, so dass beispielsweise Metsulfuron-methyl nicht quantifiziert werden konnte. Für Getreideextrakte ist damit eine selektivere Detektionsmethode, wie sie z.B. die LC-MS/MS darstellt, notwendig. Die Wiederfindungsraten lagen für Triasulfuron bei allen drei Matrices über 90%, für Thifensulfuron-methyl jedoch unter 30%, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass bei der Aufreinigung über ChemElut® der Proben-pH-Wert nicht reduziert wurde (Optimum pH 3-4). In späteren Versuchen, bei denen die Probenextrakte mit LC-MS/MS vermessen wurden, konnten hier bessere Wiederfindungen erreicht werden (vgl. Tabelle 30).

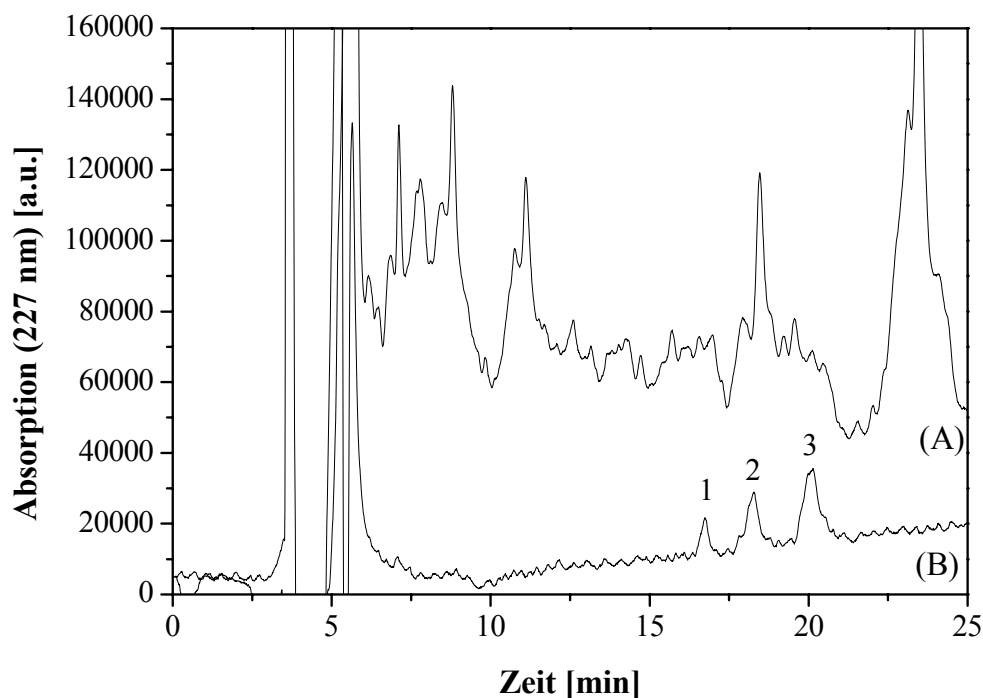


Abbildung 71: Chromatogramme von Kartoffelextrakten. 10 g Probe gespikt mit SUs (0.05 mg/kg): (1) Thifensulfuron-me. (2) Metsulfuron-me. (3) Triasulfuron. Probenvorbereitung: Extraktion nach KLEIN/ALDER mit anschließender (A) RP-SPE (Extrakt der RP-SPE (Oasis[®] HLB): Verdünnung 1:2) bzw. (B) IAC (unverdünnt). Messung: HPLC-UV/DAD.

Tabelle 27: Wiederfindungen von SUs aus Lebensmitteln (n = 3, 1 s). Probenvorbereitung: Extraktion nach KLEIN/ALDER mit anschließender IAC. Messung: HPLC-UV/DAD. Chromatogramm vgl. Abbildung 71.

Sulfonylharnstoff	Wiederfindung [%]		
	Kartoffel	Hafer	Gerste
Thifensulfuron-me	26.5 ± 6.3	17.4 ± 13.2	27.2 ± 3.8
Metsulfuron-me	51.7 ± 8.1	Matrixinterferenz	Matrixinterferenz
Triasulfuron	94.6 ± 4.0	90.2 ± 4.1	94.7 ± 8.8

4.2 Anreicherung von SUs für die LC-MS/MS

Da die Tandem-Massenspektrometrie in der Spurenanalytik allgemein und auch in der Pestizidanalytik im Besonderen an Bedeutung gewinnt, sind schnelle und effektive Methoden zur Probenanreicherung und -vorreinigung für diese Technik gefragt. Speziell für Lebensmittelmatrices, die hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung relativ hohe Anforderungen an die Probenvorbereitung stellen, sollte eine möglichst universell einsetzbar Methode entwickelt werden. Die grundsätzlich hohe Selektivität der Tandem-MS-Detektion ist alleine oft nicht ausreichend, es bedarf zusätzlich einer Anreicherung der SU-Analyten. Die LC-MS/MS-Messungen wurden in Kooperation mit Herrn Dr. Müller vom *Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie* durchgeführt.

4.2.1 Massenspektrometrische Detektion der Sulfonylharnstoffe

Für die LC-MS/MS von SUs, die im Sauren leicht protoniert werden können, bietet sich eine Messung im positiven Ionen-Modus an. Während mit der APCI-Technik oft effektiver Matrixeinflüsse reduziert werden können, ist die ESI⁺-Technik meist merklich sensitiver und wurde deshalb auch herangezogen. Zunächst muss der MS/MS-Response des eingesetzten Gerätes für jeden Analyten optimiert werden. Hierfür wird jeder Analyt-Standard einzeln in den HPLC-Eluentenstrom ohne Trennsäule injiziert. Im LC-MS-Modus des Instruments werden dann die Einstellungen für das Elektrospray-Interface so optimiert, dass man einen maximalen Response für die [M+H]⁺-Ionen erzielt. Dann werden die Parameter für die Kollisionszelle dahingehend optimiert, dass man für ein oder zwei charakteristische Tochterionen einen maximalen Response erzeugt. Dies kann automatisiert durchgeführt werden.

4.2.2 Retentionszeiten und Fragmentierungen

Bei der LC-MS/MS ist eine Basislinientrennung der Analyten im Chromatographieschritt nicht notwendig, wenn diese verschiedene Fragmentierungsmuster im Massenspektrometer aufweisen. Beim eingesetzten Gradientensystem wurden für die ausgewählten SUs Retentionszeiten zwischen 7 und 9 min erhalten (vgl. Abbildung 72).

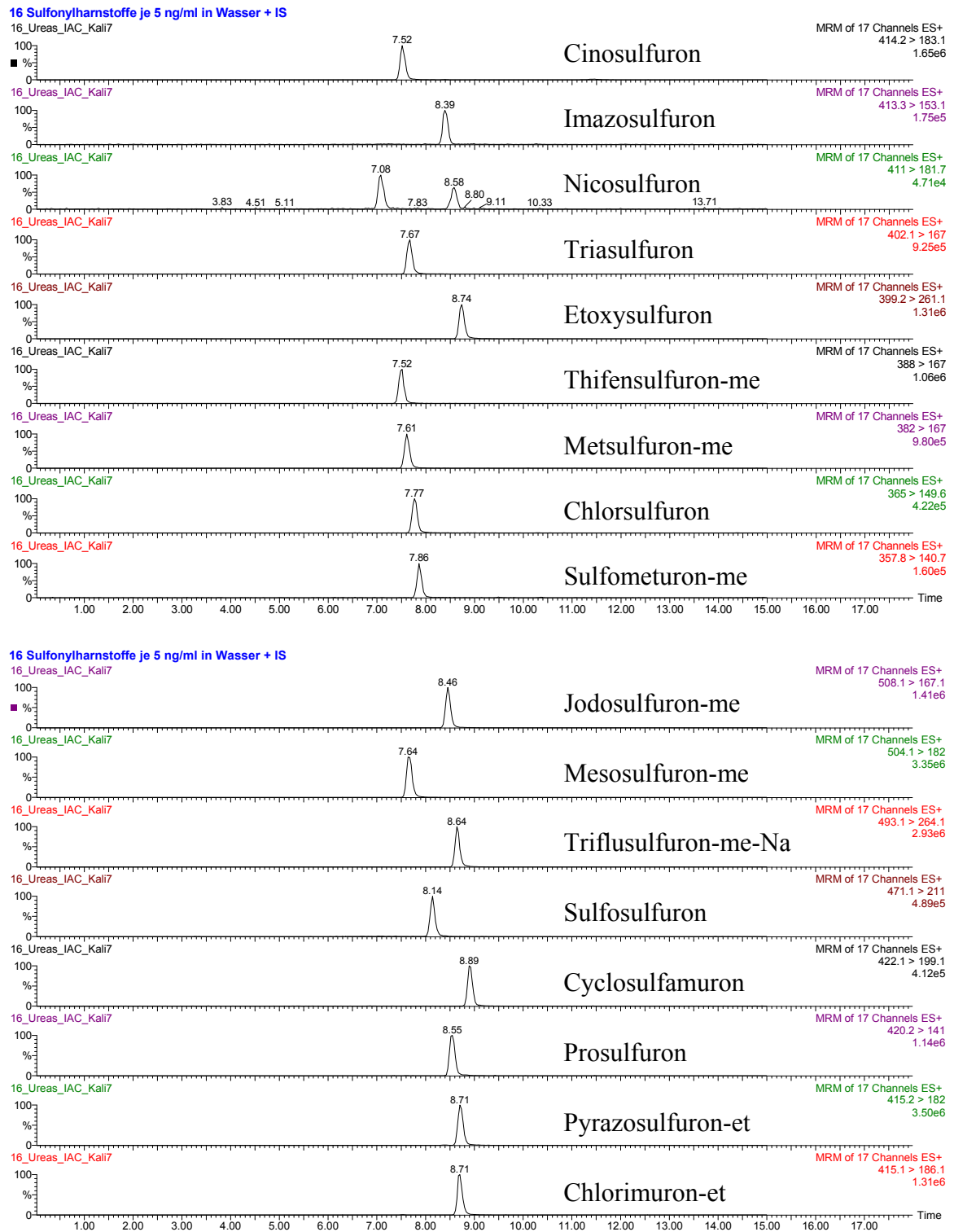


Abbildung 72: HPLC-ESI⁺-MS-Chromatogramm einer SU-Standardmischung. SUs vgl. Tabelle 28, je 5 ng/mL. Messung: LC-MS/MS.

Zunächst wurden die Fragmentierungsmuster für die 16 zu bestimmenden SUs und den internen Messstandard (IS) Mesosulfuron-methyl ermittelt (vgl. Tabelle 28). In der Regel wird für den Nachweis von Analyten bei Aufstockversuchen ein Analytion-Fragmentation-Übergang als ausreichend angesehen. Wenn jedoch keine Informationen über den Analytgehalt der Proben vorliegt, dann sind für eine Bestätigung des Ergebnisses üblicherweise zwei Analytion-Fragmentation-Übergänge gefordert.

Tabelle 28: Retentionszeiten und Fragmentierungen für 16 SUs und den Internen Messstandard (IS) Mesosulfuron-methyl bei der LC-MS/MS.

Sulfonylharnstoff	R _t [min]	PT [m/z]*	ST [m/z]**
Chlorimuron-ethyl	8.71	415.1 → 186.1	415.1 → 83.0
Imazosulfuron	8.39	413.3 → 153.1	413.3 → 232.0
Chlorsulfuron	7.86	357.8 → 140.7	357.8 → 167.0
Cyclosulfamuron	8.89	422.2 → 199.1	422.2 → 224.0
Pyrazosulfuron-ethyl	8.71	415.2 → 182.0	415.2 → 214.0
Sulfosulfuron	8.14	471.1 → 211.0	471.1 → 260.8
Triasulfuron	7.67	402.1 → 167.0	402.1 → 141.1
Metsulfuron-methyl	7.61	382.0 → 167.0	382.0 → 199.0
Iodosulfuron-methyl	8.46	508.1 → 167.1	508.1 → 141.0
Prosulfuron	8.55	420.2 → 141.0	420.2 → 167.0
Thifensulfuron-methyl	7.52	388.0 → 167.0	388.0 → 205.0
Cinosulfuron	7.52	414.2 → 183.1	414.2 → 215.1
Sulfometuron-methyl	7.77	365.0 → 149.6	365.0 → 199.0
Triflusulfuron-methyl	8.64	493.1 → 264.1	493.1 → 96.0
Etoxysulfuron	8.74	399.2 → 261.1	399.2 → 279.1
Nicosulfuron	7.08/8.58	411.0 → 181.7	411.0 → 213.0
Mesosulfuron-methyl (IS)	7.64	504.1 → 182.0	504.1 → 156.0

R_t = Retention time (Retentionszeit)

* PT = Primary transition (quantitativer Übergang)

** ST = Secondary transition (bestätigender Übergang)

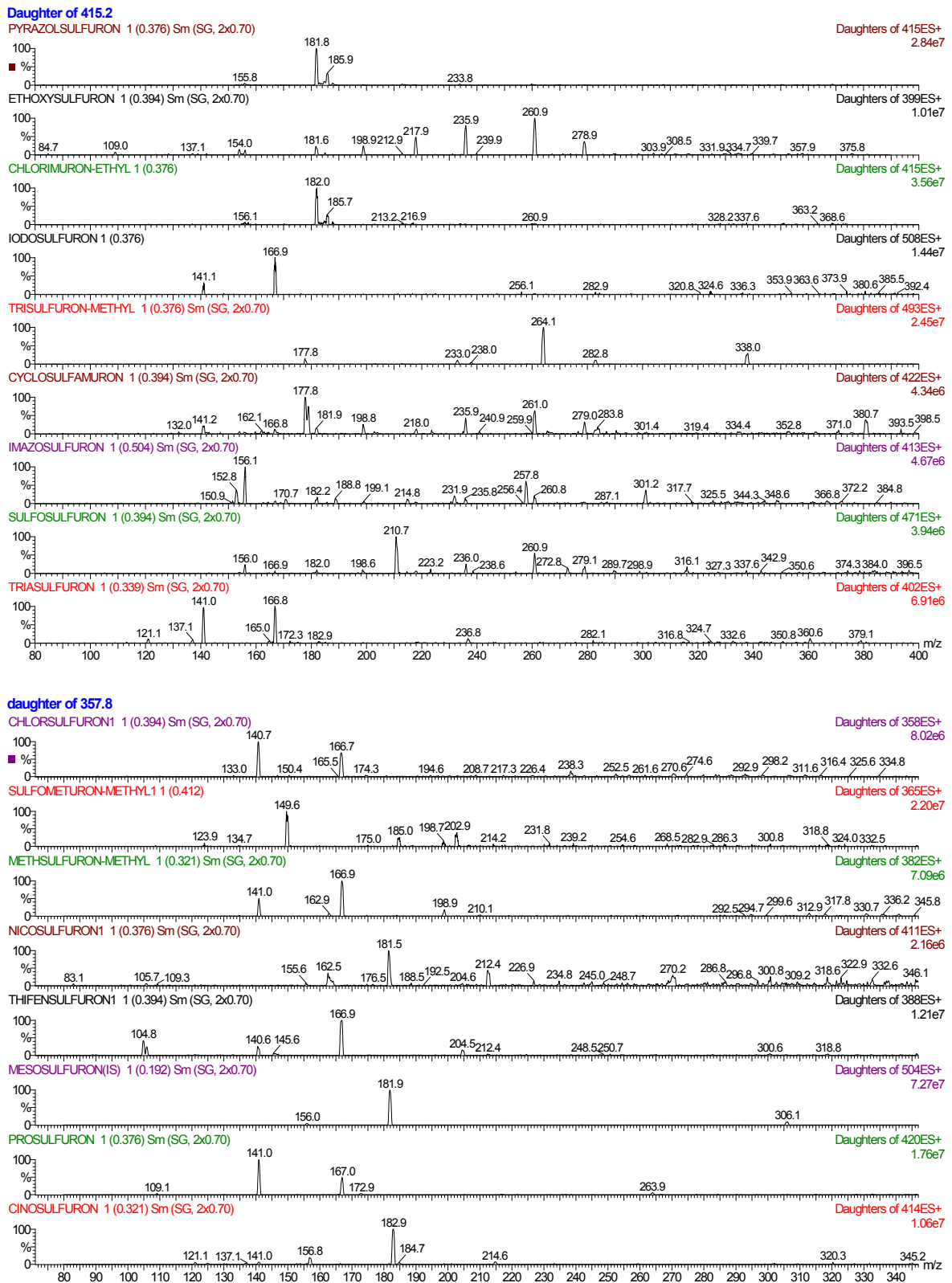


Abbildung 73: Tochterionenspektren: Fragmentierungsmuster von 16 SU-Analyten und dem internen Standard Mesosulfuron-methyl.

4.2.3 Kalibrierung, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Aufgrund einer hohen Nachweisempfindlichkeit der Methode, konnte der Kalibrierbereich bei einer Probenkonzentration von 0.1 bis 10 ng/mL gewählt werden. Die Korrelation aller erhaltenen linearen Kalibriergeraden war mit Werten von $r^2 > 0.99$ ($n = 32$) sehr gut. Die Nachweisgrenzen für die einzelnen Verbindungen, die als 3-faches Grundrauschen definiert sind, lagen dabei im Bereich von 0.14 bis 0.69 ng/mL und sind für die einzelnen Verbindungen in Tabelle 29 aufgeschlüsselt. Die Bestimmungsgrenzen (6-faches Grundrauschen) bewegten sich zwischen 0.31 und 1.38 ng/mL.

Tabelle 29: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der SUs bei den durchgeführten LC-MS/MS-Messungen. (A) Messprobe. (B) Methode nach KLEIN/ALDER, VF = 8. (C) Methode nach POWLEY, VF = 10.

Sulfonylharnstoff	(A) LOD [ng/mL]	(A) LOQ [ng/mL]	(B) LOQ [µg/kg]	(C) LOQ [µg/kg]	RHmV Grenzwert [µg/kg]
Chlorimuron-ethyl	0.28	0.56	4.4	5.6	
Imazosulfuron	0.45	0.91	7.3	9.1	
Chlorsulfuron	0.26	0.53	4.2	5.3	10
Cyclosulfamuron	0.38	0.75	6.0	7.5	
Pyrazosulfuron-ethyl	0.48	0.96	7.7	9.6	
Sulfosulfuron	0.15	0.35	2.8	3.5	
Triasulfuron	0.14	0.28	2.2	2.8	50
Metsulfuron-methyl	0.59	1.18	9.4	11.8	50
Iodosulfuron-methyl	0.17	0.34	2.7	3.4	
Prosulfuron	0.23	0.45	3.6	4.5	20
Thifensulfuron-methyl	0.31	0.63	5.0	6.3	50
Cinosulfuron	0.20	0.41	3.3	4.1	
Sulfometuron-methyl	0.14	0.27	2.2	2.7	
Triflusulfuron-methyl	0.19	0.38	3.0	3.8	50
Etoxysulfuron	0.15	0.31	2.5	3.1	
Nicosulfuron	0.69	1.38	11.0	13.8	20

LOD = Limit of detection (Nachweisgrenze)

LOQ = Limit of quantification (Bestimmungsgrenze)

VF = Verdünnungsfaktor der Aufarbeitungsmethode

Aus den ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in der Probenlösung ergaben sich unter Einbeziehung der beiden Extraktionsmethoden Nachweisgrenzen zwischen 1.1 und 5.5 µg/kg Lebensmittel für die Extraktion nach KLEIN/ALDER (Verdünnung 1:8) und zwischen 1.4 und 6.9 µg/kg Lebensmittel bei der Aufarbeitung nach POWLEY (Verdünnung

1:10). Die entsprechenden Bestimmungsgrenzen lagen bei 2.2 bis 11.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (KLEIN/ALDER) und 2.4 bis 13.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (POWLEY). In der Rückstands-Höchstmengenverordnung (RHmV) sind für 12 SUs Grenzwerte von 10, 20 bzw. 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ festgelegt. Für nicht zugelassene SUs gilt außerdem der Grenzwert 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Da die vorliegende Messmethode eine ausreichende Sensitivität für alle getesteten Verbindungen aufweist, ist sie zur Kontrolle der rechtlich vorgegebenen Rückstandshöchstmengen geeignet.

4.2.4 Matrixeffekte

Die Ionisationsausbeuten der MS/MS-Messung und damit auch die Steigung der Kalibrierungen differierte für einige SUs merklich. Daher wurden parallel zu den in bidest. Wasser erstellten Kalibrierungen, auch in allen vermessenen Extraktvarianten Kalibriergeraden erstellt und die veränderte Response in die Berechnung der Wiederfindungsraten einbezogen, so dass matrixbereinigte Ergebnisse erhalten wurden.

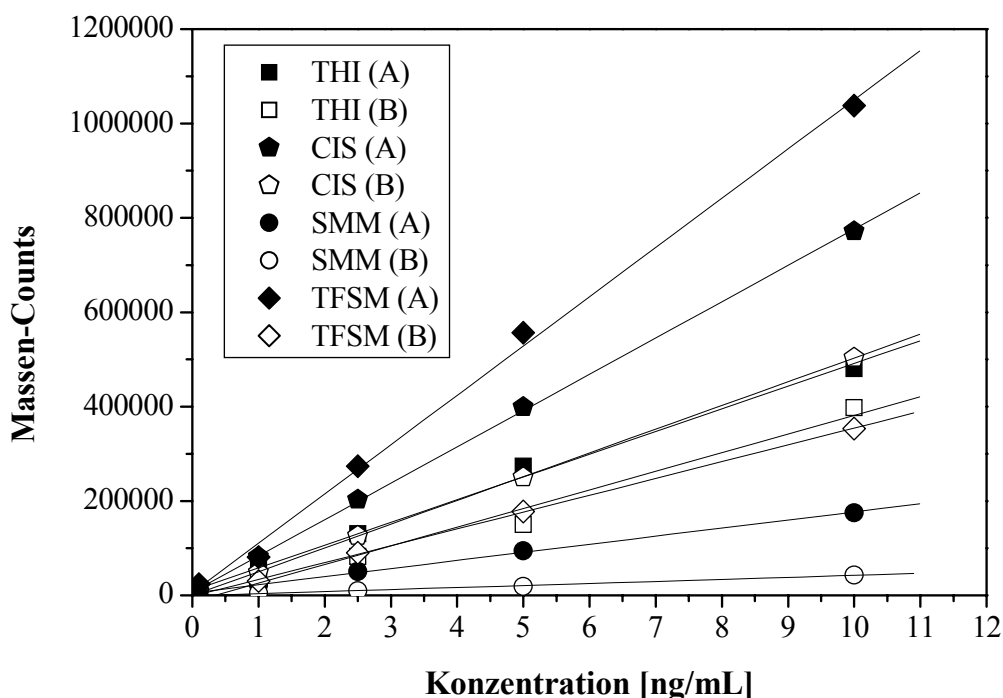


Abbildung 74: Matrixabhängigkeit der Kalibrierungen. (A) Standards in bidest. Wasser. (B) Standards in Matrix (Kartoffelextrakt). Messung: LC-MS/MS.

Für die meisten SUs lagen die Wiederfindungen in den drei Lebensmittelmatrices zwischen 70 bis 110% des in bidest. Wasser gemessenen Wertes. Von den vier in Abbildung 74 dargestellten SU-Verbindungen zeigten Thifensulfuron-methyl und Cinosulfuron eine

Response-Reduktion auf ca. 80% bei der Matrixkalibrierung. Wesentlich drastischer war der Matrixeffekt von Kartoffel bei Sulfometuron-methyl (ca. 20% Response in Matrix) und Triflursulfuron-methyl (ca. 40% Response in Matrix). Daneben wurden die Wiederfindungen von Chlorsulfuron ebenfalls stark beeinflusst (ca. 40%, nicht dargestellt). Bei Cyclosulfamuron trat ein so starker Effekt auf, dass die Ionisierung zum Teil völlig unterdrückt war und der Responsefaktor durch Matrixeinflüsse hier nicht einbezogen werden konnte. Interessanterweise war die Intensität des Matrixeffektes primär von der Substanz selbst abhängig. Der Einfluss der Kartoffel- und Getreidematrices untereinander war weniger drastisch und schwankte i.d.R. lediglich um 10 bis 20% zwischen den Kartoffel- und Getreideextrakten. Bei der Anwendung der Methode auf ein größeres Lebensmittelspektrum könnten hier allerdings größere Schwankungen auftreten.

Die eleganteste Möglichkeit Matrixeffekte auszuschließen und gleichzeitig Analytverluste bei der Probenvorbereitung zu erfassen, ist das Arbeiten mit einem Isotopenstandard. Isotopenstandards sind jedoch relativ teuer und zusätzlich ist es bei Multi-Methoden schwierig ein großes Spektrum an Stoffeigenschaften mit einem Standard abzudecken. Daher wurde lediglich mit einem internen Messstandard gearbeitet (Mesosulfuron-methyl), der nach der Aufarbeitung jeder Probe zugesetzt wurde. Mesosulfuron-methyl wurde deshalb ausgewählt, weil es für die IAC-Anreicherung aufgrund seiner schlechten Eluierbarkeit ohnehin nicht geeignet war.

4.2.5 Anwendung auf Lebensmittelextrakte

Es wurden die Wiederfindungen von 16 SUs in gespikten Lebensmittelproben (Kartoffel, Hafer, Gerste) bzw. in deren Extrakten bestimmt. Die Ergebnisse der einzelnen Aufarbeitungsmethoden sind in Tabelle 30 aufgeführt. Wiederfindungen von über 75% zeigten aus dem wässrigen Kartoffelextrakt nach POWLEY 13 SUs (C), aus dem Extrakt nach KLEIN/ALDER 11 SUs (A) und aus den gespikten Kartoffeln noch 10 SUs (B). Die Getreideproben lieferten allgemein niedrigere Wiederfindungsraten, wobei für Hafer aus den Extrakten je 10 SUs (A, C) und aus dem Lebensmittel 5 SUs (B) über 75% lagen. Bei gespiktem Gerstenextrakt wurden je nach Aufarbeitung für 6 SUs (C) bzw. 7 SUs (A) mit Wiederfindungen größer 75% erhalten und für die gespikten Gerstenproben lagen noch 5 SUs (B) darüber. Laut RHMV sind für Methoden zur Bestimmung von Pestizidrückständen Standardabweichungen unter 25% gefordert, die bis auf 8 der 144 durchgeführten Dreifachbestimmungen eingehalten werden konnten und z.T. deutlich darunter lagen.

Die SUs Tria-, Pro-, Cinosulfuron, Metsulfuron-methyl und Sulfometuron-methyl lieferten unabhängig von der Probenaufarbeitungsmethode und Matrix konstant gute Wiederfindungen. Durchgehend unbefriedigende Wiederfindungen von 50% und weniger wurden für Imazosulfuron, Cyclosulfamuron und Iodosulfuron-ethyl erhalten. Cyclosulfamuron betreffend liegt der Grund in dem sehr hohen Matrixeffekt bei der MS/MS-Messung. Die Ioni-

sierung der Substanz wurde so stark unterdrückt, dass eine Bestimmung des Responsefaktors bei der matrixabhängigen Kalibrierung nicht mehr möglich war. Die angegebenen Werte sind damit nicht matrixkorrigiert. Der Grund für die schlechten Wiederfindungen für Imazosulfuron und Iodosulfuron-ethyl liegt im Elutionsverhalten dieser Substanzen begründet (vgl. Abbildung 59). Außerdem ist zu erkennen, dass bei der Extraktion der SUs direkt aus dem Lebensmittel Verluste auftreten, die an den zusätzlichen Aufarbeitungsschritten oder der Extraktionseffizienz liegen können. Da die Verluste bei Getreide jedoch generell höher liegen als bei Kartoffel und sie bei verschiedenen SUs unterschiedlich ausgeprägt sind, ist das individuelle Extraktionsverhalten einzelner SUs als Hauptgrund wahrscheinlicher.

Tabelle 30: Wiederfindungen der IAC von 16 ausgewählten SUs aus gespikten Lebensmitteln (Kartoffel, Hafer, Gerste) und deren Extrakten (n = 3, 1 s). Extraktion nach KLEIN/ALDER: (A) Gespikte Extrakte (B) Gespikte Lebensmittel. Extraktion nach POWLEY: (C) Gespikte Extrakte.

Kartoffel	Wiederfindung [%]		
	(A)	(B)	(C)
Chlorimuron-ethyl	90.6 ± 26.4	69.4 ± 5.0	76.3 ± 12.4
Imazosulfuron	35.3 ± 14.7	22.4 ± 3.4	42.0 ± 8.5
Chlorsulfuron	96.6 ± 4.8	94.4 ± 11.2	90.7 ± 12.2
Cyclosulfamuron*	43.0 ± 9.5	27.2 ± 4.5	53.0 ± 11.3
Pyrazosulfuron-ethyl	80.7 ± 21.7	77.5 ± 2.9	85.0 ± 15.6
Sulfosulfuron	75.7 ± 6.5	61.6 ± 2.3	82.0 ± 14.1
Triasulfuron	95.6 ± 4.7	86.6 ± 11.8	100.6 ± 0.8
Metsulfuron-methyl	115.8 ± 19.6	103.6 ± 16.0	113.5 ± 30.3
Iodosulfuron-methyl	36.7 ± 24.8	26.7 ± 5.2	50.5 ± 12.0
Prosulfuron	69.5 ± 22.2	75.4 ± 4.4	91.1 ± 2.9
Thifensulfuron-methyl	98.7 ± 10.7	100.3 ± 11.4	86.0 ± 21.6
Cinosulfuron	89.7 ± 7.8	96.5 ± 7.0	83.5 ± 12.0
Sulfometuron-methyl	108.1 ± 5.5	83.9 ± 15.6	93.3 ± 20.9
Triflursulfuron-methyl	101.7 ± 19.6	104.8 ± 7.9	89.0 ± 11.3
Etoxysulfuron	72.3 ± 15.3	68.0 ± 4.5	96.5 ± 12.0
Nicosulfuron	105.0 ± 21.5	98.9 ± 1.6	88.9 ± 21.6

* Enorm starker Matrixeffekt bei MS/MS-Messung von Cyclosulfamuron. Matrixabhängige Kalibrierung war für diesen Analyten nicht möglich.

Fortsetzung Tabelle 30:

Hafer	(A)	(B)	(C)
Chlorimuron-ethyl	51.8 ± 14.0	28.5 ± 31.0	63.0 ± 4.5
Imazosulfuron	45.3 ± 37.8	6.2 ± 8.5	6.0 ± 8.0
Chlorsulfuron	75.8 ± 27.2	40.8 ± 4.5	90.8 ± 7.6
Cyclosulfamuron*	19.3 ± 17.4	4.2 ± 5.7	60.1 ± 5.7
Pyrazosulfuron-ethyl	78.5 ± 7.9	76.3 ± 23.3	90.5 ± 0.7
Sulfosulfuron	63.7 ± 21.4	54.8 ± 4.1	52.1 ± 7.1
Triasulfuron	88.3 ± 13.1	83.4 ± 3.5	102.2 ± 3.1
Metsulfuron-methyl	87.3 ± 22.5	93.8 ± 18.1	84.5 ± 0.5
Iodosulfuron-methyl	33.7 ± 26.2	4.8 ± 0.8	7.5 ± 0.7
Prosulfuron	80.9 ± 8.5	73.4 ± 27.4	90.0 ± 14.1
Thifensulfuron-methyl	58.6 ± 35.2	16.0 ± 1.4	50.7 ± 6.2
Cinosulfuron	86.0 ± 14.4	82.9 ± 8.3	86.1 ± 4.2
Sulfometuron-methyl	90.9 ± 14.6	53.6 ± 15.8	97.2 ± 2.1
Triflusulfuron-methyl	89.0 ± 11.5	77.9 ± 23.5	95.5 ± 3.5
Etoxysulfuron	80.7 ± 7.6	67.6 ± 24.3	90.5 ± 12.1
Nicosulfuron	83.2 ± 14.5	21.0 ± 2.8	75.9 ± 12.7
Gerste	(A)	(B)	(C)
Chlorimuron-ethyl	39.2 ± 20.9	20.7 ± 2.5	11.6 ± 0.7
Imazosulfuron	32.0 ± 23.7	18.3 ± 4.7	5.0 ± 1.4
Chlorsulfuron	104.0 ± 12.9	93.6 ± 5.7	64.2 ± 8.5
Cyclosulfamuron*	15.3 ± 11.8	15.6 ± 1.7	15.5 ± 4.9
Pyrazosulfuron-ethyl	67.2 ± 2.3	67.3 ± 1.0	71.1 ± 3.0
Sulfosulfuron	70.1 ± 9.5	32.7 ± 3.3	46.3 ± 7.1
Triasulfuron	98.2 ± 9.9	94.5 ± 0.6	97.3 ± 5.4
Metsulfuron-methyl	80.1 ± 9.8	95.5 ± 11.7	75.4 ± 7.3
Iodosulfuron-methyl	44.2 ± 32.0	11.8 ± 2.5	6.3 ± 1.4
Prosulfuron	84.1 ± 8.8	81.0 ± 1.6	83.0 ± 14.3
Thifensulfuron-methyl	74.2 ± 21.8	43.8 ± 11.3	28.8 ± 0.9
Cinosulfuron	82.3 ± 6.0	80.4 ± 7.5	81.2 ± 1.4
Sulfometuron-methyl	113.6 ± 6.5	73.0 ± 18.3	95.2 ± 12.6
Triflusulfuron-methyl	76.3 ± 2.9	67.1 ± 5.2	74.2 ± 2.8
Etoxysulfuron	64.3 ± 3.1	64.1 ± 4.5	90.5 ± 21.1
Nicosulfuron	74.3 ± 15.4	28.0 ± 9.1	55.5 ± 6.4

Zudem ist ein Matrixeffekt auf die Immunextraktion selbst zu erkennen. Getreidematrix führt gegenüber Kartoffelmatrix zu einer Reduzierung der Wiederfindungen. Ob Matrixbestandteile den Antikörper bzw. die Poren des SGG blockieren oder die SUs stärker an Bestandteilen der Getreidematrix haften, so dass keine Analyt-Antikörper-Wechselwirkung stattfinden kann, ist noch nicht geklärt.

Sowohl die Wasser- als auch Lebensmittelproben betreffend wäre eine genauere Untersuchung und Charakterisierung der Gegebenheiten im Sol-Gel-Glas wünschenswert, um z.B. Matrixeffekte besser erklären zu können. Hier könnten spektroskopische Methoden, wie beispielsweise NMR, zur Beschreibung von Materialeigenschaften beitragen. Untersuchungen der Antikörper-Analyt-Wechselwirkungen und des Dissoziationsverhaltens mittels Surface-Plasmon-Resonanz-Methoden könnten zudem wichtige Informationen für die Optimierung der Anwendung liefern.

4.3 HPLC-UV/DAD und LC-MS/MS im Vergleich

4.3.1 Arbeitsbereich

Die Anwendung der entwickelten Immunadsorber ist aufgrund ihrer Kapazität begrenzt. Ausgehend von rund 300 ng Bindungskapazität und Bestimmungsgrenzen von 16-56 ng (je nach UV-Absorptionsverhalten, in 2 mL Eluat) bei der IAC-HPLC-UV/DAD können lediglich 3 bis 6 SUs gleichzeitig angereichert werden. Da man den Kapazitätspuffer des Adsorbers jedoch nicht voll ausschöpfen sollte, um bessere Resultate zu bekommen, hat es sich in der Praxis bewährt, sich auf die Anreicherung von 3 SUs gleichzeitig zu beschränken. Damit ist die Kombination aus IAC und HPLC-UV/DAD für Multi-Methoden nicht geeignet, für die Bestimmung von 1 bis 3 SU-Verbindungen dagegen schon.

Durch den wesentlichen Sensitivitätsvorteil mit Bestimmungsgrenzen zwischen 0.3 und 1.4 ng/mL ist bei der LC-MS/MS eine Anreicherung von 10 ng je SU ausreichend, auch wenn man in diesem Sensitivitätsbereich mit mindestens 5 mL ACN 30% eluieren muss, um die SUs quantitativ vom Adsorber zu lösen. Folglich können bei einer Adsorberkapazität von 300 ng bis zu max. 30 SUs angereichert werden, wobei eine Kapazitätsauslastung von etwa 50% ideal ist. Somit wurde bei den beschriebenen Versuchen mit 16 SUs in diesem optimalen Auslastungsbereich gearbeitet.

4.3.2 Wiederfindungen

Die Wiederfindungsraten aus 10 mL bidest. Wasser bei etwa 50%iger Kapazitätspufferauslastung wurden sowohl mittels HPLC-UV/DAD als auch LC-MS/MS ermittelt und gegenüber gestellt (vgl. Tabelle 31). Für die HPLC-UV-Detektion wurden jeweils 3 SUs gleichzeitig angereichert, für die MS/MS ein Mix aus 16 SUs. Ein ausreichender Kapazi-

tätspuffer ist notwendig, da bei ausreichendem Antikörperüberschuss Affinitätsunterschiede gegenüber verschiedenen Verbindungen kaum noch eine Rolle spielen. Ist der Kapazitätspuffer zu gering, werden SUs mit höherer Affinität bevorzugt gebunden womit die Wiederfindung von Verbindungen niedrigerer Affinität abnimmt.

Die Korrelation der Wiederfindungen beider Methoden ist in einem akzeptablen Bereich ($r^2 = 0.7449$, $n = 48$). Für 12 SUs werden Wiederfindungen von 80% und höher erreicht. Die geringeren Werte bei der HPLC-UV-Detektion sind auf ihre geringeren Sensitivität bzw. auf das geringe Elutionsvolumen von 2 mL zurückzuführen. Auffallend sind auch hier die geringen Wiederfindungsraten für Imazosulfuron und Iodosulfuron-methyl (vgl. auch Tabelle 30). Außerdem ist wie vorausgehend erwähnt, Cyclosulfamuron mittels MS/MS-Detektion schwer zu erfassen. Dies trifft auch auf die Matrix Wasser zu. Möglicherweise könnten hier die Ionisierungsbedingungen noch optimiert werden.

Tabelle 31: Wiederfindung von 16 SUs unter idealen Bedingungen (Matrixfreie Probe: 10 mL bidest. H₂O, großer Kapazitätspuffer). (A) HPLC-UV/DAD, 5 ng/mL je SU in Ausgangsprobe, 3 SUs pro Anreicherung (n = 3, 1 s). (B) LC-MS/MS, 1 ng/mL je SU in Ausgangsprobe, 16 SUs pro Anreicherung (n = 3, 1 s).

Sulfonylharnstoff	Wiederfindung (A) [%]	Wiederfindung (B) [%]
Chlorimuron-ethyl	82.8 ± 6.3	103.7 ± 8.3
Imazosulfuron	26.6 ± 8.0	53.5 ± 9.5
Chlorsulfuron	95.2 ± 8.7	111.5 ± 5.8
Cyclosulfamuron	96.1 ± 4.1	66.8 ± 4.0
Pyrazosulfuron-ethyl	97.9 ± 11.9	100.7 ± 12.2
Sulfosulfuron	92.3 ± 3.4	88.7 ± 6.4
Triasulfuron	102.2 ± 4.1	101.5 ± 9.2
Metsulfuron-methyl	88.2 ± 9.4	115.7 ± 15.2
Iodosulfuron-methyl	23.8 ± 5.0	56.0 ± 6.9
Prosulfuron	88.2 ± 11.6	100.2 ± 13.1
Thifensulfuron-methyl	95.6 ± 5.0	97.4 ± 2.6
Cinosulfuron	82.6 ± 15.2	92.7 ± 3.3
Sulfometuron-methyl	89.9 ± 7.0	118.4 ± 4.7
Triflusulfuron-methyl	59.5 ± 3.1	86.8 ± 11.2
Etoxysulfuron	90.5 ± 7.6	97.8 ± 8.6
Nicosulfuron	86.6 ± 4.8	94.0 ± 4.3

4.3.3 Anwendungsmöglichkeiten

Wie die beschriebenen Anwendungsbeispiele zeigen, lässt sich der breit erkennende SU-Immunadsorber für die quantitative Anreicherung von mindestens 12 SUs einsetzen. Aufgrund der begrenzten Kapazität, die durch Einsatz größerer Antikörpermengen jedoch erhöht werden könnte, ist er besonders in Kombination mit der sehr sensitiven LC-MS/MS als Multi-Analyt-Adsorber anwendbar. Seine Selektivitätsvorteile gegenüber vergleichsweise unspezifischen RP-Phasen kommen bei der Aufreinigung von Wasserproben deutlich zum Tragen. Auch bei Kartoffelproben konnten sehr saubere Extrakte erhalten werden, die für die HPLC-UV-Detektion geeignet waren. Bei Getreideproben war jedoch auch in Verbindung mit der IAC eine selektivere Detektion, wie beispielsweise die LC-MS/MS notwendig, um einige SUs sicher bestimmen zu können. Dennoch trat hier ein gewisser Matrixeffekt bei der IAC auf, der zu reduzierten Wiederfindungen führte. Wie bereits erwähnt, wären hier Untersuchungen der Prozesse im SGG-Adsorber zur Ursachenklärung wünschenswert. Außerdem zeigten verschiedene SU-Analyten Wechselwirkungen zur Getreidematrix, die zu Extraktionsverlusten führten. Dennoch konnten auch in Gerste und Hafer je 4 bzw. 5 SUs mit hohen Wiederfindungen bestimmt werden.

Das Spektrum der erfassbaren SUs wird von der Erkennung und den Affinitätsverhältnissen des immobilisierten Antikörpers geprägt. Optimal für die Bindung und vor allem auch die problemlose Elution von Analyten ist eine mittlere Affinität des Antikörpers zu den Analyten. Im vorliegenden Fall konnte beispielsweise Mesosulfuron-methyl, die Verbindung mit der höchsten Affinitätskonstante, nicht eluiert werden, ohne dass der Antikörper denaturiert wurde. Weitere SUs mit hoher Affinitätskonstante wurden unter den gewählten Elutionsbedingungen nur langsam oder unzureichend eluiert (z.B. Imazosulfuron). Es konnte gezeigt werden, dass auch Analyten mit niedriger Affinitätskonstante ($< 5 \times 10^6$ L/mol) angereichert werden konnten, solange die bindungsfähigen Antikörper die Analyten mengenmäßig deutlich übersteigen. Dabei wurde ein Kapazitätspuffer von mindestens 50% der maximalen Bindungskapazität als optimal ermittelt.

Die Handhabung der bioaktiven Adsorber betreffend, müssen zwar einige Grundsätze (z.B. Lagerung: 4°C, in Pufferlösung) beachtet werden. Darüber hinaus ist die Benutzung der Säule mit andern SPE-Materialien vergleichbar. Ein grundsätzlicher Unterschied ist jedoch die geringe Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln.

Im Folgenden sind die Eigenschaften von Immunadsorbentien mit kommerziellen Reversed-Phase-Materialien und MIPs zusammenfassend gegenübergestellt.

Tabelle 32: Vergleich von Immunadsorbent, kommerziellen RP (C-18 bzw. Copolymer)- und MIP-Phasen

	IAC	RP	MIPs*
Selektionsprinzip	Antikörperaffinität	Polarität	Imprinting
Selektivität	hoch	begrenzt	mittel bis hoch
Handling	einfach	einfach	einfach
Stabilität	begrenzt	hoch	hoch
Wiederverwendung	10- bis 20-fach	Ein-Weg-Produkte; Wiederverwendung abhängig von Matrix	über 100-fach
Einsatzbreite	Substanz oder Substanzgruppe	gruppenübergreifend	Substanz oder Substanzgruppe
On-line-Anwendung	von Supportmaterial abhängig; SGG ist on-line-fähig	kommerzielle Produkte erhältlich	möglich
Herstellung	Antikörper: zeit- intensiv, teuer (mAk) Adsorberpräparation: einfach, schnell	etablierte Verfahren der Herstellerfirmen	zeitintensive Entwicklung
Verfügbarkeit	wenige kommerzielle Produkte (stark anwendungsbezogen)	breites Angebot kommerzieller Produkte	keine kommerziellen Produkte

* Die beschriebene Eigenschaften beziehen sich auf MIPs für MSM [94, 380].

Kommerzielle SPE- und IAC-Phasen sind i.d.R. für den Einmalgebrauch konzipiert, auch wenn sie in der Praxis durchaus oft mehrmals verwendet werden können. Da der SU-Immunadsorber auch on-line eingesetzt werden sollte, war eine mehrfache Verwendung erwünscht. Seine Stabilität war abhängig von der Herstellungsart des SGG-Adsorbentmaterials. Beide Adsorbenttypen (SGG-gecoatete Silikatpartikel, gemahlener SGG-Monolith) konnten mindestens 10 Mal verwendet werden. Das SGG-Coating auf einem porösen Silicaträger erwies sich aufgrund seiner Druckstabilität sowohl für Off- als auch On-line-Anwendungen als das geeignetere Material. Die On-line-Anwendung wird im folgenden Kapitel beschrieben.

5 On-line-Anreicherung unter Verwendung von anti-SU-SGG-Adsorbentien

Die On-line-Anreicherung bietet bei hohem Probenaufkommen eine Möglichkeit der Automatisierung von Probenaufarbeitungsschritten und damit auch der Zeit- und Kostensparnis. Bei der Etablierung eines Systems muss einerseits der rein apparative Teil, also das Schaltsystem und deren automatisierte Steuerung und Programmierung bedacht werden, und andererseits die chemischen bzw. im vorliegenden Fall auch biochemischen Abläufe an den Säulen, die vor der Automatisierung im Off-line-Betrieb bereits optimiert sein sollten. On-line-Kartuschen mit verschiedenen RP-Materialien werden bereits kommerziell angeboten, während On-line-IAC-Kartuschen bisher nicht erhältlich sind. Für die hier gezeigte On-line-Anwendung wurde ausschließlich SGG-gecoatetes Silikatmaterial mit immobilisiertem pAk-R03 eingesetzt.

5.1 On-line-Säulendimensionierung

Zunächst wurden Versuche zur Optimierung der Säulendimensionierung durchgeführt. Dafür wurden 2 On-line-Säulen von verschiedenem Format, aber etwa gleicher Sorbensmenge miteinander verglichen.

Tabelle 33: Eingesetzte Säulendimensionierungen.

Säulenformat	Innendurchmesser	Bettlänge	Bettvolumen
(A)	1.0 cm	1.0 cm	0.78 cm ³
(B)	0.4 cm	6.0 cm	0.75 cm ³

Es wurde festgestellt, dass die kürzere und dickere Säule etwas bessere Wiederfindungsergebnisse lieferte. Die Unterschiede waren aber nicht signifikant (< 5%). Möglicherweise erfolgt die Elution von der Immunoaffinitätssäule etwas effektiver, wenn der Elutionsweg kürzer ist. Bei langen Säulen kann es auch zu „Rebinding“-Effekten kommen, d.h. die Analyten binden auf ihrem Weg durch die Säule erneut an Antikörper und müssen damit wiederum dissoziieren. Da der Effekt jedoch nur sehr gering war und die Unterschiede die Schwankungsbreiten zwischen einzelnen Messungen kaum übertreffen, wären zur genaueren Klärung weitere Versuche mit größeren Dimensionierungsunterschieden zwischen den einzelnen Säulenformaten notwendig, um hier abschließende Aussagen treffen zu können. Für die aufgeführten Versuche wurde schließlich mit Säulen der Dimensionierung 1 x 2 cm gearbeitet, da diese genau die Sorbensmenge einer Präparation fassten und damit direkt mit der Off-line-Anreicherung vergleichbar waren. Die Edelstahl-Säulen wurden in der Werk-

statt des IWC eigens gefertigt und mit Hilfe einer HPLC-Pumpe mit dem in Puffer suspendierten Adsorbermaterial gefüllt.

Die Reversed-Phase-Materialien wurden ebenfalls in selbst hergestellte Vorsäulen aus Edelstahl (0.4 x 1 cm) gepackt. Für die On-line-Anwendung wurden die Materialien StrataX™, LiChrolut® und Oasis® HLB getestet, eingesetzt wurde schließlich Letzteres. Die Materialien wurden aus den Off-line-Kartuschen in die On-line-Säule umgefüllt. Dabei kam es darauf an, eine möglichst dichte Packung des Materials zu erreichen.

5.2 Einfache IAC-Säulenschaltung

Die einfachste Möglichkeit der On-line-Immunextraktion kann mittels der in Abbildung 75 dargestellten Apparatur erfolgen.

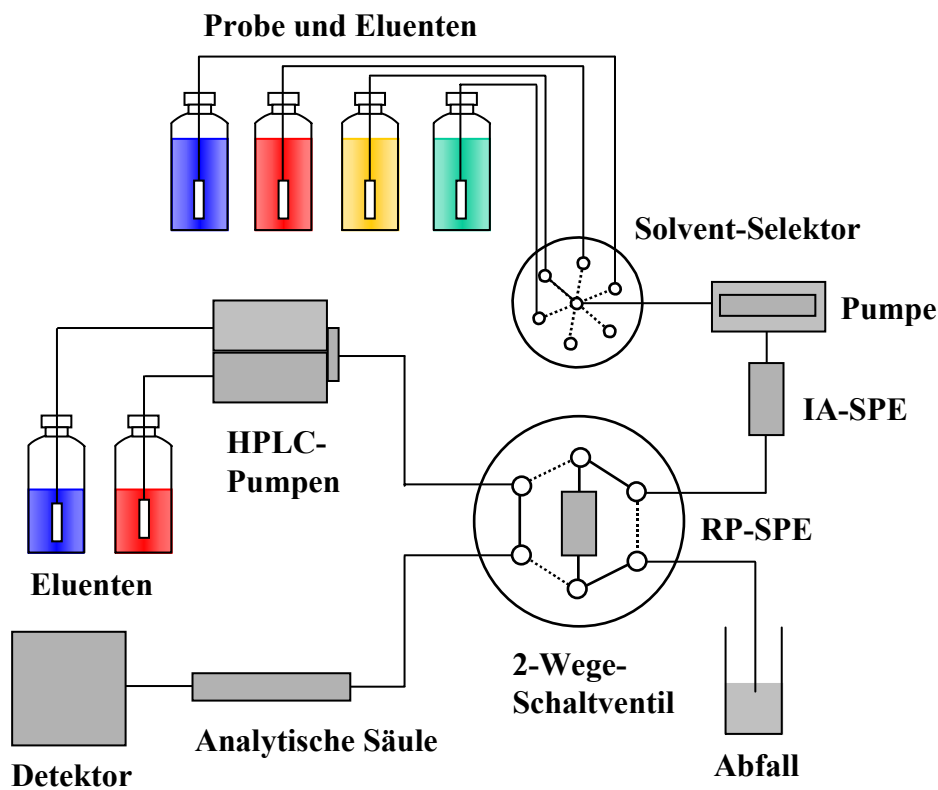


Abbildung 75: Aufbau einer einfachen On-line-Schaltung mit einem Schaltventil.

Dabei wird die IAC-Kartusche mit Hilfe einer HPLC-Pumpe und eines Solventselektors konditioniert, beladen und gewaschen. Parallel dazu wird die analytische Säule mit der mobilen Phase äquilibriert. Das 2-Wege-Schaltventil mit der IAC-Säule ist dafür in „Load“-Position geschaltet. Anschließend wird durch das Umschalten des Ventils in die „Inject“-Position die IAC-Kartusche in den Eluentenstrom eingebunden, so dass die Analyten im sog. „Backflush“ vom Immunsorber eluiert und direkt auf die analytische Säule geleitet werden. Der IAC-Eluent fungiert dabei gleichzeitig als mobile Phase für die analytische Trennung. Zur Zeitersparnis können die einzelnen Schritte im Ablauf so aufeinander abgestimmt werden, dass während der zweiten IAC-Beladung die vorausgehende Probe analytisch getrennt und detektiert wird.

In der Praxis ist eine einfache Säulenschaltung jedoch nur dann möglich, wenn es die Eigenschaften des Antikörpers, besonders hinsichtlich seines Elutionsverhaltens, zulassen. Zudem müssen die Elutionsbedingungen mit der nachfolgenden analytischen Trennung kompatibel sein. Eine effektive analytische Trennung der schwach polaren SUs mittels RP-Phase setzt beispielsweise für die meisten der SU-Verbindungen eine Protonierung mittels saurem Eluenten voraus. Da die Antikörper-Säule direkt in den Elutionsstrom geschaltet wird, darf der Eluent auf den Antikörper jedoch nicht denaturierend wirken, da sonst eine mehrfache Verwendung der IAC-Säule nicht möglich ist. Es wurde geprüft, inwieweit der vorliegende pAk-R03 säureempfindlich ist, da saure Pufferlösungen, wie z.B. Phosphatpuffer in Mischung mit ACN Eluenten sowohl für die IAC als auch die anschließende analytische RP-Chromatographie denkbar wären (vgl. auch Abbildung 57). In der Praxis kam diese apparativ einfachere Variante leider nicht in Frage, da für eine vollständige Elution der SUs der pH-Wert so stark erniedrigt werden musste, dass eine Denaturierung des Antikörpers eintrat und die IAC-Kartusche somit nicht mehr verwendbar war.

In diesem Zusammenhang kann, bedingt durch die relativ langsame Dissoziationskinetik der Antikörper-Analyt-Wechselwirkung, ein weiteres Problem auftreten. Eine kinetisch bedingte, verzögerte Elution der IAC-Kartusche führt dazu, dass ein relativ großes Elutionsvolumen notwendig ist, was zu Auflösungsproblemen bei der anschließenden analytischen Trennung führt. Daher ist in Abhängigkeit vom Elutionsverhalten des eingesetzten Antikörpers in der IAC oft die Nachschaltung eines weiteren Anreicherungsschrittes notwendig.

5.3 IAC/RP-SPE-Kombinationsschaltung

5.3.1 Aufbau und Zeitablauf

Aus diesen Gründen war die Entwicklung einer apparativ aufwändigeren On-line-Methode notwendig, bei der zwei seriell hintereinander geschaltete 2-Wege-Schaltventile zwei aufeinanderfolgende SU-Anreicherungsschritte ermöglichen.

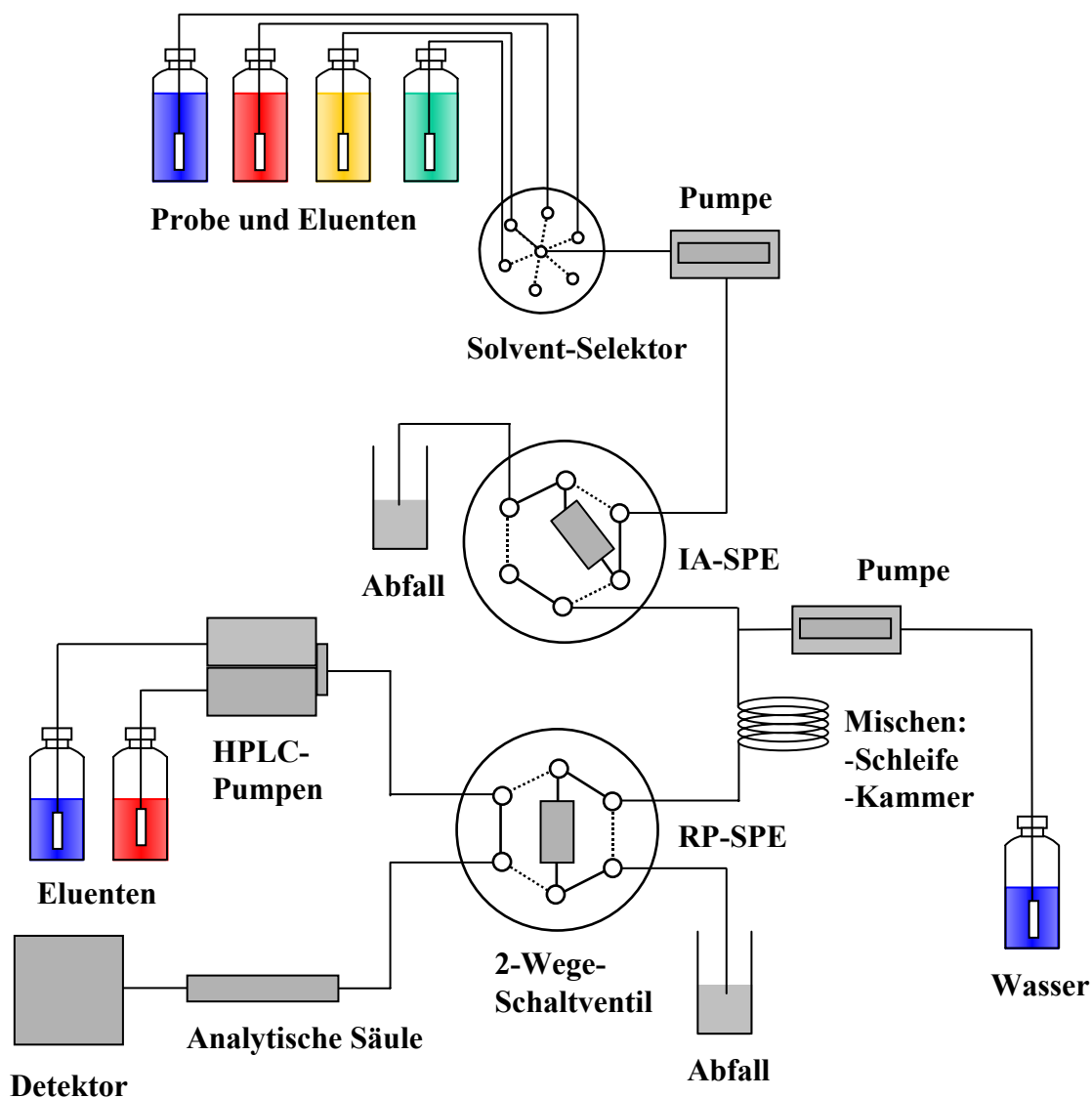


Abbildung 76: Aufbau der eingesetzten On-line-Schaltung mit zwei Schaltventilen und Mischschleife zur Wasserzumischung.

Die Analyse verläuft mittels dem in Abbildung 76 gezeigten Aufbau in folgender Reihenfolge: Genau wie beim einfacheren Schaltsystem, erfolgt zunächst die Konditionierung,

Anreicherung und das Waschen des Immunadsorbers über den Solvent-Selektor. Parallel wird wiederum die analytische RP-Phase äquilibriert. Beide 2-Wege-Schaltventile befinden sich dabei in Position 0 („Load“). Dann wird zur Elution der IAC-Kartusche Ventil B in Position 1 geschaltet, so dass die SUs mittels 30% ACN (v/v) eluiert werden und das Eluat zur nachgeschalteten RP-SPE-Kartusche weitergeleitet wird. Ein direktes Aufbringen des ACN-haltigen Eluats auf die RP-On-line-Vorsäule ist problematisch, da die Sulfonylharnstoffe bei ACN-Gehalten größer 5% nicht vollständig angereichert werden. Daher ist ein Zudosieren von Wasser zur Erniedrigung des ACN-Anteils vor der Aufgabe auf die RP18-Vorsäule mittels einer weiteren HPLC-Pumpe notwendig. Zur Verbesserung der RP18-Vorsäulen-Anreicherung durch SU-Protonierung wird das zudosierte Wasser zudem angesäuert. Als Mischvorrichtung zur Erzeugung eines turbulenten Flüssigkeitsstroms dienen ein „Mixing-T“ sowie ein „Mixing Coil“. Durch die eingestellte Flussstärke der Pumpe, die den Solvent-Selektor bedient und der Pumpe für die Wasserzumischung kann innerhalb von 12 Minuten der ACN-Anteil unter 5% gebracht werden und dabei direkt die RP-Vorsäulen beladen werden. Nach dem Beladen und Waschen der RP-Vorsäule wird diese schließlich in Position 1 („Inject“) geschaltet; die SUs werden damit in den Eluentenstrom der analytischen Trennung eluiert, getrennt und detektiert. Die einzelnen Schritte können im Ablauf so aufeinander abgestimmt werden, dass während der Chromatogrammdetektion einer Probe, die darauf folgende Probe bereits auf dem Immunadsorber angereichert wird. Der Ablauf des Zeitprogramms ist in Tabelle 34 nochmals im Überblick dargestellt.

Tabelle 34: Programmablauf der IAC/RP-SPE-On-line-Schaltung.

Zeit [min]	Ventil A (RP-SPE)	Ventil B (IA-SPE)	Ventil C Solvent- Selektor	Vorgang
0.3	Position 0	Position 0	Position 2	Konditionieren IAC-Säule
3.0			Position 3	Aufgabe der Probe auf IAC-Säule
13.0			Position 4	Waschen IAC-Säule <u>Parallel:</u> Konditionieren HPLC-Säule
18.0	Position 0	Position 1	Position 5	Elution IAC; Wasserzumischung
21.0	Position 0	Position 0	Position 2	Beladen RP-SPE; Wasserzumischung <u>Parallel:</u> Konditionieren IAC-Säule
31.0	Position 1	Position 0	Position 3 Position 4	Elution RP, HPLC-Trennung/Detektion <u>Parallel:</u> Aufgabe Probe 2, Waschen
56.0	Position 0	Position 1	Position 5	Elution der 2. Probe von IAC-Säule

Die RP-Vorsäule übernimmt in diesem Schaltsystem zwei Funktionen, sie schützt die IAC-Kartusche vor dem sauren Eluentensystem der analytischen Trennung und reichert die Analyten erneut an. Der hohe Grad an Automation spart zudem Arbeitskraft. Dennoch darf nicht unerwähnt bleiben, dass der On-line-Verdünnungsschritt zwischen IAC und RP-Vorsäule, der aufgrund der Stoffeigenschaften der SUs notwendig ist, einer aufwändigen Optimierung bedarf und das System deutlich komplizierter macht. Die Einführung eines derartigen Systems dürfte sich aber trotz der Entwicklungsarbeit besonders bei größeren Probenzahlen als effizient erweisen.

5.3.2 Ergebnisse

Mit der beschriebenen On-line-IAC/RP-SPE-HPLC-UV/DAD-Methode wurden Chromatogramme erhalten, die denen manuell injizierter Proben entsprachen. In Abbildung 77 ist ein Chromatogramm der Anreicherung von MSM dargestellt.

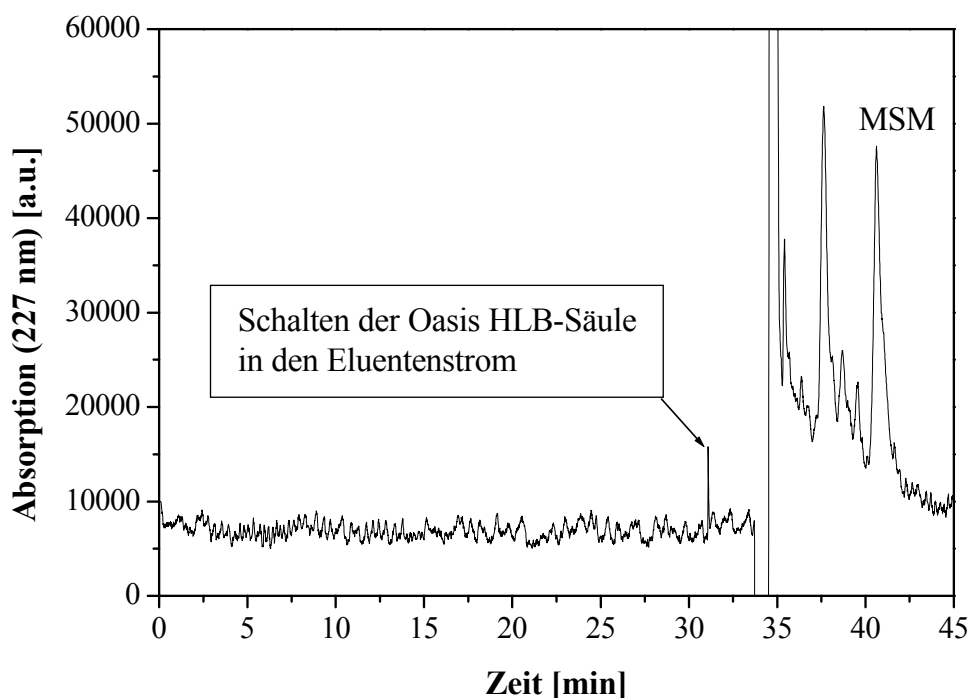


Abbildung 77: Chromatogramm der On-line-Anreicherung von 50 ng MSM mittels IAC/RP-SPE-Kombinationsschaltung und HPLC-UV/DAD-Detektion. Wiederfindung MSM: 54.3%.

Auffällig waren die drei Störpeaks am Anfang des Laufs, die wahrscheinlich von eingesetzten RP-Material (hier: Oasis[®] HLB) stammten. Sie interferierten jedoch nicht mit SU-Peaks und stellten daher kein Problem dar. Da im On-line-Betrieb das gesamte Proben-

volumen durch analytische Säule und Detektor fließt und kein Splitting durch die Injektionsschleife stattfindet, sollte sich die Nachweisstärke verdoppeln. Bei den vorliegenden Experimenten wurden allerdings nur relativ geringe Wiederfindungen von rund 50% erzielt. Durch Entnahme von Proben an verschiedenen Stellen des Systems, die anschließend off-line angereichert und vermessen wurden, konnte als Schwachstelle des Systems die Wasserzumischung zwischen RP-SPE und IAC-Säule ermittelt werden. Durch Variationen im Zeitablauf, wie z.B. der Dauer des Mischschrittes, oder in den Mischvolumina konnte jedoch keine Verbesserung erzielt werden. Auch bei der Anreicherung mehrerer SUs gleichzeitig lagen die Wiederfindungen im Bereich von ca. 50% (vgl. Abbildung 78).

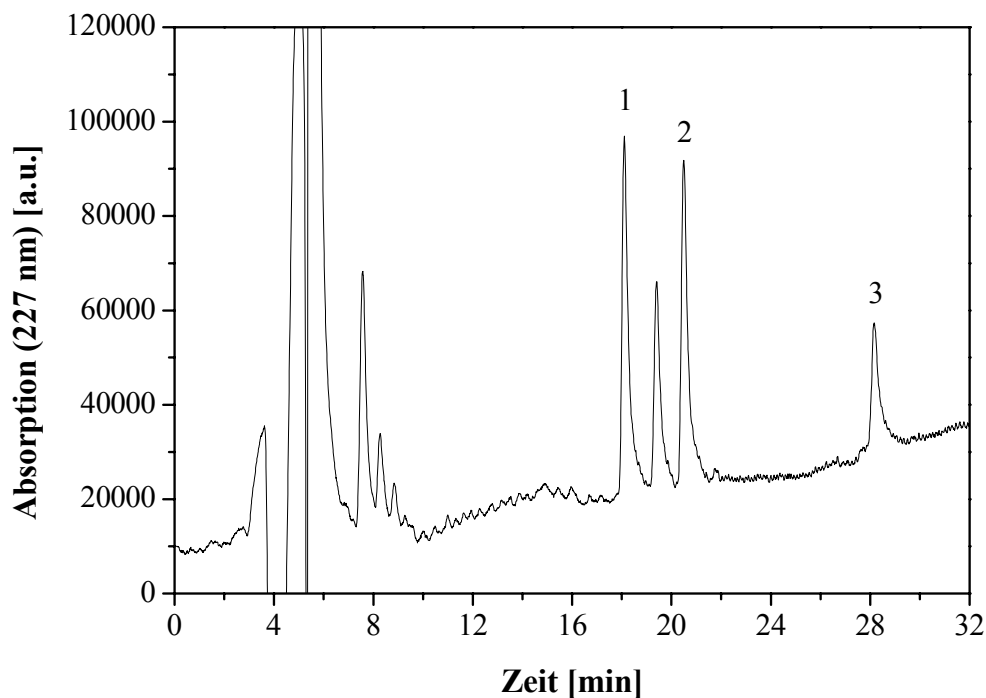


Abbildung 78: Chromatogramm der On-line-Anreicherung von je 100 ng (1) Cinosulfuron (Wiederfindung: 54.3%), (2) Chlorsulfuron (Wiederfindung 51.2%) und (3) Imazosulfuron (Wiederfindung: 45.5%) mit IAC/RP-SPE-Kombinationsschaltung und HPLC-UV/DAD-Detektion.

5.4 Weitere Optimierungsmöglichkeiten

Da die Wiederfindungsraten bei den vorgestellten Versuchen noch nicht zufriedenstellend sind, muss das bestehende System weiter optimiert werden. Aufgrund durchgeführter Versuche zur Lösung der beschriebenen Probleme wurde festgestellt, dass der Hauptteil des Analytverlusts beim On-line-Mischschritt auftritt. Die bisher verwendete einfache Mischschleife von 2 m Länge, welche zur Begünstigung eines turbulenten Flüssigkeits-

stromes verdrillt wurde, reicht offensichtlich nicht aus, um das IAC-Eluat (30% ACN) ausreichend mit Wasser zu verdünnen, so dass die anschließende RP18- bzw. RP-Polymerphasen-SPE ohne Durchbruch von SU-Analyten erfolgen kann. Auf dem Laborgerätemarkt werden sog. dynamische Hochdruck-Gradientenmischer angeboten. Dabei handelt es sich um Mischkammern mit Innenvolumina von etwa 100 bis 2500 μL , bei denen der Innenraum kontinuierlich aktiv gemischt bzw. gerührt wird. Mit einer derartigen apparativen Aufwertung des Systems sollten bessere Wiederfindungsraten erzielt werden können.

Außerdem muss bedacht werden, dass die Ursachen für die reduzierten Wiederfindungen im vorliegenden Fall grundsätzlich auf die polaren Eigenschaften der SUs zurückzuführen sind. Bei der Anwendung des in III 5.3.1 beschriebenen Schaltsystems auf weniger polare Analyten ist die RP-Anreicherung im zweiten Anreicherungsschritt einfacher, da ein Lösungsmittelanteil dann nicht zwingend zum Durchbruch von Analyten durch die On-line-RP-SPE führt. Dem Mischschritt kommt somit nicht mehr die Bedeutung bei, wie im gegebenen Fall bei polaren Substanzen. Eine Anwendung des aufgezeigten Systems auf Analyten geringerer Polarität ist daher einfacher. CICHNA ET AL. konnten bei einem ähnlichen Aufbau für Pyren zeigen, dass für unpolare Substanzen ein Mischschritt nicht notwendig ist, um IAC und RP-SPE seriell hintereinander zu schalten und eine quantitative Anreicherung zu erzielen [297].

5.5 Eignung von SGG-IAC-Adsorbern für die On-line-Anreicherung

Die eingesetzten SGG-gecoateten Silikatpartikel mit immobilisiertem pAk-R03 erwiesen sich für die On-line-Applikation als gut geeignet. Die anfangs auftretenden Probleme mit den wenig druckstabilen monolithischen SGG-Adsorbern, die zu Partikelabrieb und damit zu Rückdruckproblemen im HPLC-System führten, konnten durch die Coating-Strategie behoben werden. Die mehrmalige Verwendung der IAC-Säulen in Folge führt nicht zu einer merklichen Verschlechterung der Performance. Die On-line-IAC-Kartuschen konnten wie im Off-line-Betrieb mindestens 10 Mal verwendet werden, ohne dass der Antikörper inaktiviert wurde oder Rückdruckprobleme auftraten. Damit konnte gezeigt werden, dass Sol-Gel-basierte Immunadsorber auch im On-line-Betrieb eine gute Alternative zu kovalent gebundenen Antikörpersäulen darstellen. Nach erfolgter Optimierung der Herstellungsbedingungen lässt sich die Prozedur einfach reproduzieren. Die Handhabung erfolgt wie bei herkömmlichen On-line-SPE-Kartuschen, es bedarf nach Gebrauch lediglich einer kühlen Lagerung in Pufferlösung, um die Antikörper aktiv zu halten. Durch Experimente mit alternativen Silikatträgermaterialien, variierender SGG-Zusammensetzung und Herstellungsprozedur, könnte zukünftig versucht werden, den immobilisierten Antikörper länger stabil zu halten und die Einsatzdauer der Adsorber zu erhöhen.

IV ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Sulfonylharnstoffherbizide finden breite Anwendung in der Landwirtschaft. Die Leistungsfähigkeit der relativ jungen Herbizidklasse führt dazu, dass sie in vergleichsweise niedrigen Anwendungsmengen eingesetzt werden können. Darin begründet sich auch die Notwendigkeit sehr sensibler Methoden für die Spurenanalytik der Sulfonylharnstoffe in Umwelt- und Lebensmittelproben.

Während die klassische Pflanzenschutzmittelanalytik vor allem auf der Gaschromatographie mit diversen selektiven Detektoren basiert, zielen neuere Methoden auf die Flüssigchromatographie mit massenspektrometrischer Detektion. Diese erlaubt eine Erweiterung des erfassbaren Substanzspektrums und senkt gleichzeitig durch gesteigerte Selektivität und Sensitivität die Anforderungen an Probenaufarbeitungsschritte hinsichtlich Reinigung und Konzentrierung deutlich. Aufwändige Multi-Methoden zur Wirkstoffextraktion, die auf der Verwendung von Lösungsmitteln beruhen, sollen zudem durch lösungsmittelsparende Verfahren, wie beispielweise die Festphasenextraktion, ersetzt werden. Ein weiterer Trend ist die Effizienzsteigerung durch Miniaturisierung, Vereinfachung und Automation der klassischen Verfahren.

Aufgrund der komplexen Matrixzusammensetzung von Umweltproben und Lebensmitteln ist zur Erlangung von quantitativ zuverlässigen Analyseergebnissen im Spurenbereich oft auch für die LC-MS(/MS) eine selektive Anreicherung der Analyten notwendig. Die seit Anfang der 60er Jahre eingesetzten und fortwährend weiterentwickelten Multi-Methoden erfassen mittlerweile beinahe 400 Pflanzenschutzmittelwirkstoffe. Das in der Methodensammlung nach § 35 LMBG festgelegte und auf der DFG-Sammelmethode S19 basierende standardisierte Analyseverfahren wird zunehmend von modularen Methoden abgelöst, die je nach Zielsetzung für jeden Arbeitsschritt eine Reihe von Alternativen vorsehen. Insbesondere eine Reihe von sog. „Problemwirkstoffen“ lässt sich durch ihre Stoffeigenschaften nicht in die bestehenden Multi-Methoden integrieren. Dazu gehören auch die Sulfonylharnstoffe, die aufgrund ihrer Thermolabilität für die Gaschromatographie nicht direkt zugänglich sind und durch ihre Polarität bei saurem pH-Wert extrahiert werden müssen. Daher ist für diese Stoffklasse eine spezielle Methodik notwendig, die jedoch als Modul für ein Multi-Methoden-System angewandt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Immunoaffinitäts-Festphase entwickelt, die die klassenspezifische Anreicherung von Sulfonylharnstoffherbiziden ermöglicht. Daneben wurde ein ELISA-Screeningtest („Sulfuron Screen“) entwickelt, der als qualitativer Schnelldachweis von Sulfonylharnstoffherbiziden eingesetzt werden kann. Des Weiteren

wurde die Anwendbarkeit der beiden Methoden in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik gezeigt.

Grundvoraussetzung für die beiden immunologischen Analyseverfahren war zunächst die Herstellung eines spezifischen Antikörpers von möglichst breiter Kreuzreaktivität gegenüber Sulfonylharnstoffen, da das Anwendungsspektrum durch die Antikörpererkennung begrenzt ist. Ein für den Analyten Metsulfuron-methyl spezifisches polyklonales Serum stand zu Beginn des Projektes bereits zur Verfügung und konnte für Vorversuche genutzt werden. Die Immunisierungsstrategie zur Generierung eines SU-Breitbandantikörpers verfolgte die Zielsetzung, dem Immunsystem möglichst verschiedene und innerhalb der Herbizidklasse häufig vorkommende Repräsentanten von SU-Molekülteilen zu präsentieren. Dafür wurden 3 Haptene ausgewählt, die einen „rechten“ bzw. „linken“ Molekülteil der SUs sowie ein SU-Gesamtmolekül repräsentierten. Jeweils 2 Kaninchen wurden mit den 3 unterschiedlichen Immunogenen immunisiert. Ein weiteres Tier wurde mit einer Mischung der drei Immunogene immunisiert.

Für die Synthese der drei Immunogene war zunächst die Einführung einer Spacergruppe ins Ausgangsmolekül notwendig. Dies erfolgte durch Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid. Die dabei entstehende Carboxylfunktion am Ende der Spacergruppe konnte wiederum mittels der Aktivestermethode mit ϵ -Aminogruppen der Lysinreste verschiedener Proteine (KLH, BSA und POD) umgesetzt werden. Die Kopplungsprodukte der drei Haptene mit KLH dienten als Immunogene, mit BSA als Coating-Antigene im indirekten ELISA und mit POD als Tracer im direkten ELISA. Die zur Immunisierung dienenden KLH-Konjugate wiesen Haptenkopplungsdichten von 14 bis 20% auf und wurden den Kaninchen über einen Zeitraum von 34, 52 oder 84 Wochen verabreicht. Gleichzeitig wurden mehrere Mäuse mit der Zielsetzung der monoklonalen Antikörperproduktion immunisiert. Ausnahmslos alle Tiere produzierten Antikörper gegen die entsprechenden Haptene. Aus 11 Fusionen konnten lediglich 2 Klone gewonnen werden, die eine ausreichend starke Affinität zum Tracer zeigten. Die beiden gewonnenen monoklonalen Antikörper zeigten jedoch keine breite SU-Erkennung. Aus 24 getesteten SUs wurde lediglich eine geringe Kreuzreaktivität gegenüber Tribenuron-methyl festgestellt. Daneben reagierten sie zwar mit Atrazin, Simazin und dem Hapten, dies war aber für die gewünschte Anwendung ohne Bedeutung.

Unter den polyklonalen Kaninchenseren erwies sich pAk-R03 als außergewöhnlich breitbandig, mit Kreuzreaktivitäten gegenüber 19 Sulfonylharnstoffherbiziden. Dieses war somit optimal für den Einsatz in der Immunoaffinitätsanreicherung und für die Entwicklung eines klassenspezifischen ELISA geeignet.

Der klassenspezifische SU-ELISA („Sulfuron Screen“) kann als schneller Nachweis für eine ganze Gruppe von SUs eingesetzt werden, so dass anhand des Screeningergebnisses,

das eine Positiv-Negativ-Information liefert, entschieden werden kann, ob die aufwändigere Anreicherung für die HPLC oder Massenspektrometrie erforderlich ist. Es wurde ein direktes ELISA-System entwickelt und seine Anwendbarkeit mit gespikten Realwasserproben geprüft. Für die ELISA-Entwicklung war zunächst die Synthese eines neuen POD-Tracers ohne Spacerbrücke notwendig, da aufgrund von spacerspezifischen Antikörpern im polyklonalen Serum Spacererkennungseffekte („Spacer Recognition“) zu einem stark erhöhten Basissignal führten, die durch die Tracervariation beseitigt werden konnten. Das direkte ELISA-System erwies sich für 16 SUs als sehr sensitiv mit Nachweisgrenzen zwischen 8 und 100 ng/L je nach SU-Verbindung. Die Anwendbarkeit für verschiedene Oberflächenwässer, Kläranlagenabläufe sowie -zuläufe wurde gezeigt. Dabei traten teilweise Matrixeffekte auf, die durch ein 15- bis 30-faches Verdünnen der Probe beseitigt werden konnten. Bei einer Messkampagne in Zusammenarbeit mit dem *Bayerischen Landesamt für Wasserwirtschaft* konnte keine SU-Belastung der untersuchten Wässer festgestellt werden.

Für die Herstellung des Immunadsorbers wurde die IgG-Fraktion des Antiserums mittels Protein A chromatographisch gereinigt und dann in Sol-Gel-Glas immobilisiert. Einerseits wurden die erhaltenen biokeramischen Monolithen vermahlen und direkt als Adsorbentmaterial eingesetzt, andererseits wurde das antikörperhaltige Sol-Gel in Form eines Coatings auf druckstabile poröse Silikatpartikel aufgebracht. Erst dadurch war eine Online-Anwendung des Materials möglich, da sich gemahlene Monolithmaterial als wenig druckstabil erwies. Die beiden Adsorbervarianten wurden auf ihre Anreicherungseigenschaften für SUs aus verschiedenen Matrices, ihr Anwendungsspektrum und ihre Stabilität getestet. Mit 2 mg immobilisierten Antikörper pAk-R03 wurden Kapazitäten von 200 bis 460 ng für 20 SUs erreicht. Eine unspezifische Bindung von SUs an das SGG-Adsorbentmaterial wurde nicht festgestellt. Obwohl die Kapazität mit zunehmender Zahl der Beladungs- und Elutionszyklen abnimmt, bleiben die Adsorber funktionstüchtig, jedoch unter Berücksichtigung der entsprechend geringeren Kapazität. Eine 10- bis 15-fache Wiederverwendung ist deshalb möglich. Bei sachgerechter Lagerung in azidhaltiger PBS-Pufferlösung bei 4°C bleibt die Aktivität des immobilisierten Antikörpers mindestens 6 Monate erhalten. Bei niedrigeren Analytkonzentrationen und gleichzeitigem großem Kapazitätspuffer können auch niederaffine Verbindungen angereichert werden, wohingegen bei hohen Analytkonzentrationen vorzugsweise SUs mit hoher bis mittlerer Affinitätskonstante angereichert werden. Große Vorteile zeigte der Immunadsorber im Vergleich zu herkömmlichen kommerziellen SPE-Phasen hinsichtlich seiner Selektivität. Während bei RP-SPE-Anreicherung von Flusswasserproben bereits starke Matrixeffekte im Chromatogramm auftraten, war das Chromatogramm der Immunanreicherung frei von Störpeaks mit sauberer Basislinie. Deshalb ist eine Anwendung auf die Matrix Wasser problemlos möglich, auch in Verbindung mit der wenig selektiven UV/DAD-Detektion. Die Kombination der immunologischen Anreicherung mit selektiveren Detektionsmethoden,

wie der MS bzw. MS/MS bietet eine gute Möglichkeit auch schwierige Matrices, wie Lebensmittelproben, ausreichend sensitiv zu analysieren. Für Kartoffel- und Getreideproben wurden zwei verschiedene Extraktionsverfahren für SUs etabliert und mit der IAC kombiniert. Bei den LC-MS/MS-Messungen der Immunadsorber-Extrakte von Lebensmittelproben, die in Kooperation mit dem *Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie* durchgeführt wurden, konnten bis zu 12 von 16 getesteten SUs mit hohen Wiederfindungen von über 80% bestimmt werden. Zwar wurde hier ein Matrixeffekt bei den Getreideproben deutlich, dieser dürfte aber zu einem großen Teil auch auf Wechselwirkungen zwischen den Analyten und Matrixbestandteilen zurückzuführen sein.

Durch die On-line-Applikation ist zudem ein hoher Automatisierungsgrad möglich, der den Personalaufwand und damit die Analysekosten minimiert. Aufgrund der vergleichsweise langsamen Kinetik der Antikörperbindung und dem daraus resultierenden großen Elutionsvolumen sollte i.d.R. ein weiterer On-line-Anreicherungs-schritt nachgeschaltet werden. Im vorliegenden Fall diente der zweite „Schaltkreis“ aber vor allem dazu, den Antikörper vor dem sauren Eluenten im analytischen Strom zu schützen. Dies führt zwar zu einem komplexeren HPLC-System, dessen Etablierung sich aber insbesondere bei hohem Probenaufkommen als wirtschaftlich erweisen dürfte. Demgegenüber bietet die Off-line-Anwendung eine wesentlich höhere Flexibilität, da einzelne Anreicherungs- und Aufreinigungsschritte in beliebiger Reihenfolge kombiniert werden können. Sie ist bei Verwendung von entsprechenden Arbeitsstationen für die Festphasenanreicherung auch nur wenig arbeitsintensiv.

Bei der vorgestellten On-line-IAC/RP-SPE-HPLC-UV/DAD-Methode besteht hinsichtlich des On-line-Mischschrittes zwischen IAC- und RP-Anreicherung noch Entwicklungspotential. Aufgrund der Polarität der SU-Analyten ist eine Erniedrigung des ACN-Anteils des IAC-Eluenten auf unter 5% notwendig, um eine quantitative Retention bei der nachfolgenden RP-Anreicherung erreichen zu können. Durch den Einsatz eines dynamischen Gradientenmischers ließe sich die On-line-Wasserzumischung sehr wahrscheinlich effizienter gestalten und damit der Analytverlust zwischen IAC und RP-SPE minimieren. Bei einer Übertragung des Systems auf unpolare Analyten kann der Verdünnungsschritt auch ganz entfallen, weshalb eine Anwendung in diesem Bereich leichter realisierbar ist. Der On-line-IAC-Adsorber selbst ist für die On-line-Anwendung gut geeignet. Die verwendeten SGG-gecoateten Silikatpartikel haben sich als druckstabil erwiesen. Die Antikörperaktivität verhält sich wie vorausgehend für die Off-line-Anwendung beschrieben.

Als alternative Strategie könnte man auch mit einem On-line-Kartuscentransportsystem bei einmaliger IAC-Verwendung die Adsorber unter antikörperdenaturierenden Bedingungen direkt in den analytischen Strom eluieren. Damit würde zwar die Möglichkeit der Mehrfachverwendung verloren gehen, der Automationsgrad könnte jedoch durch die

Schaltung auf die nächste funktionstüchtige Kartusche erhalten bleiben. Der auftretende Kapazitätsverlust der Immunadsorber bei mehrmaliger Benutzung führt ohnedies zu der Frage, ob bei einer möglichen Vermarktung des Adsorbers, ein Einweg-Produkt anzustreben wäre, um gleichbleibende Eigenschaften garantieren zu können. Dies wäre aber vermutlich nicht die kostengünstigste und ressourcensparendste Variante.

Abschließend lässt sich feststellen, dass der entwickelte Immunadsorber für eine große Gruppe von bis zu 20 SUs einsetzbar ist und besonders als Festphase für die Off-line-Anreicherung ein einfach zu handhabendes, breit anwendbares Analysetool für die LC-MS/MS darstellt, das problemlos in Multi-Analysemethoden integriert werden kann. Durch den Einsatz von druckstabilen Silikatträgern, die mit einem bioaktiven Sol-Gel-Coating beschichtet wurden, konnten außerdem für die On-line-Anwendung geeignete Adsorber hergestellt werden. Für die Zukunft wäre neben der Entwicklung von weiteren Anwendungsmöglichkeiten auch eine detailliertere Charakterisierung des Sol-Gel-Immunadsorber-Materials auf molekularer Ebene wünschenswert, um den Herstellungsprozess weiter optimieren zu können.

V EXPERIMENTELLER TEIL

1 Geräte und Zubehör

1.1 Probenvorbereitung

Baker Bond Speedisk Extraction Disk	DVB-8068-06, Baker, Deventer, NL
Envi-Carb [®] SPE-Kartuschen	57088, Supelco, Bad Homburg
Ganzglas-Vakuumfiltrationsgerät 16309	Sartorius, Göttingen
LiChrolut [®] Fritten (PTFE), Porosität 10 µm	1.19891, 1.19827, Merck, Darmstadt
LiChrolut [®] Glassäulen 3, 5 und 8 mL	Merck, Darmstadt
LiChrolut [®] SPE-Kartuschen	1.02023, Merck, Darmstadt
Oasis [®] HLB SPE-Kartuschen, 1cc, 3cc	WAT094225/6, Waters, Eschborn
Oasis [®] MAX SPE-Kartuschen, 1cc	186000366, Waters, Eschborn
Parafilm M, 4 x 250 ft.	American Nat. Can, Greenwich, USA
Peristaltikpumpe ISM 726	Ismatec, Wertheim-Monfeld
pH-Meter, Piccolo plus, HI 1295	Neolab, Heidelberg
Reinstwasseranlage Milli Q plus 185	Millipore, Eschborn
Rotationsverdampfer Rotavapor RE 111	Buchi, Flawil, Schweiz
SPE-Arbeitssation Visiprep	Supelco, Bad Homburg
StrataX [™] SPE-Kartuschen	8BS100, Phenomenex, Aschaffenburg
Ultra Turrax [®] T25 basic	IKA, Staufen
Whatman Glasfaserfilter GF/C, Ø 4.7 cm	516F2311, Merck, Darmstadt
Zentrifuge EBA 3S	Hettich, Tuttlingen

1.2 Immunadsorberpräparation

Einmalküvetten 1.5 mL	Brand, Wertheim
HighTrap Protein A Säulen 1 mL	Amersham Pharmacia, Freiburg
Lyophilisator Lyovac GT2	Finn-Aqua, Helsinki
Mikropräzisionssieb, 32 µm	Fritsch GmbH, Idar-Oberstein
Reaktionsgefäße PP 1.5 mL	Brand, Wertheim
Röhre mit Verschluss (76 x 20 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Schall-Siebmaschine Analysette 28	Fritsch GmbH, Idar-Oberstein
Schüttler Reax 2	Heidolph, Schwabach
Thermoblock TB1	Biometra, Göttingen
UV-VIS-Spektrophotometer DU 650	Beckman Instruments, Fullerton, USA

1.3 ELISA

Delfia Platewasher, Typ 1296 026	Wallac ADL, Freiburg
Incubator/Shaker HT iEMS	Labsystems, Helsinki, Finland
8-Kanal-Pipetten, 20-300 µL	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatten, F-Form	Greiner, Frickenhausen
Orbital-Schüttler für MTP, EAS 2/4	SLT Labinstruments, Crailsheim
Origin 6.0, Datenverarbeitungssoftware	Microcal Inc., Northhampton, USA
Pipetten und Multipetten	Eppendorf, Hamburg
SLT Easy Reader 340 ATC	SLT Labinstruments, Crailsheim
ThermalSeal Film	Sigma-Aldrich, Steinheim

1.4 HPLC-UV/DAD

Column Prefilter (2 µm)	Alltech, Unterhaching
Controller SCL-6B	Shimadzu, Duisburg
Degasser DGU-14A	Shimadzu, Duisburg
HPLC-Säule (250 x 4.6 mm)	
Prontosil 120-3-C ₁₈ -AQ, 3 µm	Bischoff NC, Leonberg
HPLC-Säule LiChroCART [®] (250 x 4 mm)	
LiChrospher [®] 100, RP-18e, 5 µm	Merck, Darmstadt
Polypure II 4mm Spritzenfilter 0.45 µm	Alltech, Unterhaching
Pumpen LC-6A	Shimadzu, Duisburg
Pumpe Merck-Hitachi L 6000A	Merck, Darmstadt
Säulenofen CTO-10A	Shimadzu, Duisburg
Software Class-VP [™]	Shimadzu, Duisburg
Spritzenfilter 25 mm 0.2 µm PTFE	Alltech, Unterhaching
UV-VIS Detektor SPD-M6A	Shimadzu, Duisburg
Ventile FCV-2AH, 6-Port, 2-Position	Shimadzu, Duisburg
Ventil FCV-3AL, 7-Port, 6-Position	Shimadzu, Duisburg
Vorsäule C ₁₈ (4 mm L x 3 mm ID)	Phenomenex, Aschaffenburg

1.5 LC-MS(/MS)

Agilent µLC-MSD/SL 1100-System	Agilent, Waldbronn
HPLC-Säule Inertsil C ₁₈ (150 x 3.0 mm)	MZ-Analytical, Mainz
ODS 3, 5 µm	
MassLynx [™] 4.0 Software	Micromass, Milford, USA
Quadrupole MS/MS Ultima [™] Pt	Micromass, Milford, USA

Waters Alliance[®] HT 2795 LC
Zorbax SB-Phenyl Spezial-Säule
(1 x 250 mm), 5 µm

Waters, Eschborn
Agilent, Waldbronn

1.6 Synthesen

DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, 5 x 10 cm

1.16834, Merck, Darmstadt

Dialyseschlauch Sevaapor[®]

Serva, Heidelberg

Gelchromatographie-Säulen PD-10,

Sephadex G-25M

Amersham Pharmacia, Freiburg

¹H-NMR-Spektrometer, Bruker ARX 300

Bruker Instruments Inc., USA

Nuts, NMR-Auswertungssoftware, V 5.084

Acorn NMR, Livermore, USA

Slide-A-Lyzer[®] Dialyse-Cassette, 3-15 mL

Pierce, Rockford, USA

2 Chemikalien und Reagenzien

Acetonitril, Chromasolv [®] , gradient grade	34851 Riedel de Haen, Seelze
Acetonitril-d ₃ , Deuterierungsgrad min. 99.95%	1.13753, Merck, Darmstadt
Albumin Standard 2.0 mg/mL	23209, Pierce, Rockford, USA
Ameisensäure, p.a.	8.22254, Merck, Darmstadt
BCA-Test, MikroBCA [™] , Reagent A/B/C	23231/2/3, Pierce, Rockford, USA
Bernsteinsäureanhydrid	14089, Fluka, Buchs, Schweiz
Bovine Serum Albumin (BSA), Fraktion V	11930, Boehringer, Ingelheim
Chloroform-d, Deuterierungsgrad min. 99.8%	15,182-3, Sigma-Aldrich, Steinheim
Cyclohexan, p.a.	1.09666, Merck, Darmstadt
1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU)	13,900-9, Sigma-Aldrich, Steinheim
Dikaliumhydrogenphosphat, 99%	04248, Riedel-de-Haen, Seelze
N,N-Dimethylformamid, p.a.	1.03053, Merck, Darmstadt
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid	8.00907, Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid, p. a.	1.16743, Merck, Darmstadt
Di-(N-succinimidyl)-carbonat	43720, Fluka, Buchs, Schweiz
Dioxan, wasserfrei	1.03110, Merck, Darmstadt
Eialbumin, (Ovalbumin) Grade II	A-5253, Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure, 100%, p.a.	1.00063, Merck, Darmstadt
Ethanol, p.a.	1.00983, Merck, Darmstadt
N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC)	03449, Fluka, Buchs, Schweiz
Freundsches Adjuvans (inkomplett)	0638-60, Difco, Augsburg
Freundsches Adjuvans (komplett)	0639-60, Difco, Augsburg
γ-Globulin aus Rinderserum (Cohn Fr. II)	22550, Serva, Heidelberg
Glycerin, MicroSelect, ≥ 99.5%	49769, Fluka, Buchs, Schweiz
n-Hexan, LiChrosolv [®]	1.04391, Merck, Darmstadt
Huminsäure, Natriumsalz	7824, Roth, Karlsruhe
N-Hydroxysuccinimid, purum	804518, Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogencitrat, reinst	60214, Fluka, Buchs, Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat, reinst	60219, Fluka, Buchs, Schweiz
di-Kaliumhydrogenphosphat, reinst	04248, Riedel de Haen, Seelze
Kaliumhydroxid, Plätzchen, p.a.	30603, Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumsorbit	S-1751, Sigma-Aldrich, Steinheim
Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)	H-7017, Sigma-Aldrich, Steinheim
Meerrettichperoxidase (POD), Typ VI-A	P-6782, Sigma-Aldrich, Steinheim

Meerrettichperoxidase (POD), aktiviert	31488, Pierce, Rockford, USA
MES (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure)	M-8250, Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol, p.a.	1.06009, Merck, Darmstadt
Methanol, LiChrosolv [®]	1.04391, Merck, Darmstadt
N-Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonamid	D-2,800-0, Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat, p.a.	32319, Riedel-de-Haen, Seelze
Natriumazid, p.a.	S-2002, Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumcarbonat, wasserfrei, p.a.	6395, Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, Microselect	71376, Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumcitrat, p.a.	1.106448, Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, reinst	1.06345, Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	8.17034, Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat, p.a.	1.06329, Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat- Dihydrat, p.a.	71643, Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid, Plätzchen, p.a.	1.06495, Merck, Darmstadt
Natriumsulfat, wasserfrei, p.a.	1.06649, Merck, Darmstadt
Salzsäure, rauchend, 37%, p.a.	84422, Fluka, Buchs, Schweiz
Schwefelsäure, 98%, p.a.	1.00732, Merck, Darmstadt
Sorbinsäure, Kaliumsalz, p.a.	85520, Fluka, Buchs, Schweiz
Sulfo-NHS (N-Hydroxysuccinimid)	24510, Pierce, Rockford, USA
Tetramethoxysilan, p.a.	87680, Fluka, Buchs, Schweiz
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	1.08622, Merck, Darmstadt
2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure	P-2297, Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), für die Molekularbiologie	93362, Fluka, Buchs, Schweiz
Trifluoressigsäure, Uvasol [®]	1.08262, Merck, Darmstadt
TRIS, ultra pure	819623, ICN Biomedicals, USA
Tween 20	1.09280, Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid, 30%, reinst	1.08597, Merck, Darmstadt

3 Antikörper

Tabelle 35: Eingesetzte Antikörper im Überblick.

Bezeichnung	Typ	Tier, Label	Hersteller
anti-MSM-Ak	pAk	Kaninchen	Simon [389]
pAk-R01; pAk-R02	pAk	Kaninchen	Degelmann, diese Arbeit
pAk-R03; pAk-R04	pAk	Kaninchen	Degelmann, diese Arbeit
pAk-R05; pAk-R06	pAk	Kaninchen	Degelmann, diese Arbeit
pAk-R07	pAk	Kaninchen	Degelmann, diese Arbeit
mAk-M01; mAk-M02	mAk	Maus	Degelmann, diese Arbeit
anti-BTX-Ak	pAk	Kaninchen	Bayer [404]
anti-Diclofenac-Ak	pAk	Kaninchen	Deng [405]
anti-Kaninchen-IgG (H+L)	pAk	Ziege	31210, Pierce, Rockford, USA
anti-Maus-IgG (H+L)	pAk	Ziege	31160, Pierce, Rockford, USA
anti-Kaninchen-IgG-POD	pAk	Ziege, POD-Konjugat	31460, Sigma-Aldrich, Steinheim
anti-Maus-IgG-POD	pAk	Ziege, POD-Konjugat	A-4416, Sigma-Aldrich, Steinheim

4 Standards

Haptene:

- | | |
|--|-----------------------------|
| 1: 2-Methylester-phenylsulfonamid | Dr. Wenger, Syngenta, Basel |
| 2: 2-[[[(4,6-Dimethoxy-2-pyrimidyl)amino]-
carbonyl]amino]sulfonyl]-2-(carboxymethyl-
benzol)-4-[[methyl]amino]bernsteinsäure | Dr. Wenger, Syngenta, Basel |
| 3: 6,4-(Methoxy-6-methyl-1,3,5-triazinyl-
2-amino)hexansäure | Dr. Franek, VRI Brno, CZ |

Sulfonylharnstoffherbizide:

- | | |
|-------------------------------|---|
| Amidosulfuron | C 10162000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Azimsulfuron | L 10355000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Bensulfuron-methyl | C 10498000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Cinosulfuron | C 11668000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Chlorimuron-ethyl | C 11325000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Chlorsulfuron | C 11610000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Cyclosulfamuron | XA 11836500, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Ethametsulfuron-methyl | C 13222000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Ethoxysulfuron | 46300, Riedel-de-Haen, Seelze |
| Flazasulfuron | C 13655600, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Flucarbazon | Fa. Bayer, Monheim |
| Flupyrsulfuron-methyl-Natrium | L 13802500, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Halosulfuron-methyl | L 14059500, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Imazosulfuron | L 14283550, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Iodosulfuron-methyl | L 14343500, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Mesosulfuron-methyl | C 14913500, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Metsulfuron-methyl | C 15220000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Nicosulfuron | C 15515000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Oxasulfuron | C 15781500, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Primisulfuron-methyl | C 16288000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Propoxycarbazon | Fa. Bayer, Monheim |
| Prosulfuron | C 16546000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Pyrazosulfuron-ethyl | C 16611500, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Rimsulfuron | C 16815000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Sulfometuron-methyl | C 17009000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Sulfosulfuron | L 17009500, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |
| Thifensulfuron-methyl | C 17466000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg |

Triasulfuron	C 17648000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
Tribenuron-methyl	C 17662000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
Triflusulfuron-methyl	C 17851500, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg

Triazine:

Atrazin	C 103300, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
Simazin	C 16950000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg

Phenylharnstoffherbizide:

Diflubenzuron	C 12630000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
Flufenoxuron	C 13712000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
Monolinuron	C 15310000, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
Triflumuron	C 17844300, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg

Sulfonylharnstoff-Antidiabetika:

N1-(Butylcarbamoyl)-sulfonamid	S-385433, Sigma-Aldrich, Steinheim
Glibenclamid	G-0639, Sigma-Aldrich, Steinheim
Gliclazid	G-2167, Sigma-Aldrich, Steinheim
Glipizide	G-117, Sigma-Aldrich, Steinheim

5 Pufferlösungen

5.1 Enzym-Immunoassay

Carbonatpuffer (Coating-Puffer, pH 9.6)	1.59 g (15 mM) Na_2CO_3 2.93 g (25 mM) NaHCO_3 0.20 g (3 mM) NaN_3 ad 1 L bidest. H_2O
Phosphat-Kochsalz-Puffer (PBS, pH 7.6)	1.56 g (10 mM) NaH_2PO_4 , Dihydrat 12.46 g (70 mM) Na_2HPO_4 , Dihydrat 8.50 g (145 mM) NaCl ad 1 L bidest. H_2O
Stopplösung	5% H_2SO_4 (v/v) 0.01% Natriumdodecylsulfat (w/v)
Substratlösung (ELISA)	25 mL Substratpuffer 500 μL TMB-Lösung 100 μL H_2O_2 -Stammlösung
Substratpuffer (pH 3.8)	46.4 g (200 mM) $\text{KH}_2\text{-Citrat}$ 0.1 g K-Sorbat ad 1 L bidest. H_2O
TMB-Stammlösung	0.375 g 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin 5 mL DMSO 20 mL MeOH
Waschpuffer (PBS-Tween, pH 7.6)	5.9 g (34 mM) KH_2PO_4 , Dihydrat 65.3 g (311 mM) K_2HPO_4 , Dihydrat 51.0 g (873 mM) NaCl 30 mL Tween 20 ad 1 L bidest. H_2O
Wasserstoffperoxid-Stammlösung	3 mL 30% Wasserstoffperoxid ad 100 mL bidest. H_2O

5.2 Immunadsorber

Glycinpuffer (0.1 M, pH 2 bis 4)	7.51 g Glycin ad 1 L bidest. H ₂ O pH-Einstellung: 2 M HCl
Kochsalzlösung (100 mM)	5.8 g NaCl ad 1 L bidest. H ₂ O Konservierung: 0.02% NaN ₃
Phosphat-Kochsalz-Puffer (PBS, pH 2-12)	P-4415, Sigma-Aldrich, Steinheim 1 Tablette ad 200 mL bidest. H ₂ O (100 mM Phosphatpuffer, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl)
Phosphatpuffer (0.1 M, pH 2 bis 12)	17.8 g Na ₂ HPO ₄ (Dihydrat) ad 1 L H ₂ O 13.8 g NaH ₂ PO ₄ (Dihydrat) ad 1 L H ₂ O pH-Einstellung: Mischverhältnis bzw. H ₃ PO ₄ /NaOH-Zusatz (2M)

5.3 Protein A-Aufreinigung

Bindungspuffer TRIS-HCl (0.05 M, pH 8.6)	6.06 g TRIS ad 1 L bidest. H ₂ O pH-Einstellung: 2 M HCl
Elutionspuffer Natriumcitrat (0.1 M, pH 3.5)	29.4 g Natriumcitrat ad 1 L bidest. H ₂ O Konservierung: 0.02% NaN ₃
Neutralisationspuffer TRIS (1 M, pH 8.7)	121.1 g ad 1 L bidest. H ₂ O pH-Einstellung: 2 M HCl

6 Probenvorbereitung

Die Wasserproben wurden generell über Glasfaserfilter (Whatman GF/C) filtriert und dann direkt eingesetzt bzw. bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die Lebensmittelproben wurden mit einem haushaltsüblichen Mixer zerkleinert. Die Getreideproben wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt, das Kartoffelhomogenisat in Portionen bei -18°C tiefgefroren.

6.1 Extraktion nach POWLEY

Für die Extraktion nach POWLEY werden 10 g zerkleinerte Lebensmittelprobe in ein Zentrifugenglas eingewogen, mit 90 mL Phosphatpuffer (20 mM, pH 6.0) vermengt und 60 min im Kühlschrank stehen gelassen. Anschließend wird mit einem Ultra Turrax[®] homogenisiert, die Mischung zentrifugiert und der Überstand in einen Messkolben gegossen. Der Rückstand wird erneut mit 90 mL Phosphatpuffer aufgeschlämmt, homogenisiert und zentrifugiert. Die beiden Zentrifugate werden vereint und auf 200 mL aufgefüllt. Für die anschließende Anreicherung mittels Immunadsorber wird ein Aliquot von 20 mL eingesetzt.

6.2 Extraktion nach KLEIN/ALDER

Für die Extraktion nach KLEIN und ALDER werden 10 g Lebensmittel mit soviel Wasser versetzt, dass die Summe des natürlichen und addierten Wasseranteils ca. 10 g beträgt. Für Kartoffelproben (Wassergehalt ca. 70%) werden folglich 3 mL Wasser zugesetzt und für Getreideproben (Wassergehalt ca. 10%) 9 mL. Dann werden 20 mL Methanol zugesetzt und 2 min mit einem Ultra Turrax[®] Mixer dispergiert. Nach dem Zentrifugieren der Mischung wird ein 6-mL-Aliquot des Methanol-Wasserextraktes mit 2 mL NaCl-Lösung (20%, w/v) versetzt. Ein 5-mL-Aliquot davon wird auf eine ChemElut[®]-Säule von 5 mL Probenkapazität gegeben, 5 min äquilibriert und dann mit 16 mL Dichlormethan eluiert. Das erhaltene Eluat wird am Rotationsverdampfer bei 40°C vorsichtig zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in 100 µL Methanol im Ultraschallbad gelöst und mit ca. 5 mL bidest. H₂O versetzt, bevor er auf den Immunadsorber aufgegeben wird.

7 Immunoassays

7.1 Direkter kompetitiver Immunoassay

1. Coating :

Die Mikrotiterplatten (96 Flachboden-Wells mit hoher Bindungskapazität, Greiner, Frickenhausen) werden mit dem Ziege-anti-Kaninchen/Maus-IgG (NaCO₃-Puffer, pH 9.6) - **[0.5 ng/mL; 250 µL/Kavität]** - beschichtet, mit selbstklebender Folie verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Waschen I:

Die Mikrotiterplatten werden mit Kalium-Waschpuffer (pH 7.6; PBS-Tween) unter Verwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwashers gewaschen. Anschließend werden die MTP ausgeklopft, um Flüssigkeitsreste zu entfernen.

2. Serumzugabe:

Verdünntes Serum wird je nach Optimierung (Verdünnung: Kaninchenserum 1:10000; Mausserum 1:2000 - **[in PBS-Puffer; 200 µL/Kavität]** - zugegeben. Es wird eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Waschen II: vgl. oben

3. Standardzugabe:

Die Standard- und Probelösungen - **[0.001 µg/L bis 1000 µg/L; 200 µL/Kavität]** - werden zugegeben.

4. Tracerzugabe:

Nun wird ein Hapten-Meerrettichperoxidase-Konjugat in PBS-Puffer - **[1:10000 in PBS-Puffer; 50 µL/Kavität]** - zupipettiert und 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert.

Waschen III: vgl. oben

5. Enzymreaktion:

Es wird direkt vor der Zugabe frisch hergestellte Substratlösung (Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxid) zugegeben - **[25 mL Substratpuffer + 500 µL TMB + 100 µL H₂O₂; 200 µL/Kavität]**. Nach 5 bis 30 Minuten Inkubationszeit soll eine Blaufärbung eintreten.

6. Abstoppen:

Da bei längerer Inkubation das Substrat auch ohne die katalytische Wirkung des Tracers langsam umgesetzt wird, stoppt man die Enzymreaktion mit Schwefelsäure - **[5% in Wasser mit 0.01% SDS; 100 µL/Kavität]** - ab.

Die Absorptionsmessung erfolgt bei 450 nm in einem ELISA-Photometer. Zur Auswertung wird die RODBARD'SCHE Vier-Parameter-Funktion herangezogen.

7.2 Indirekter kompetitiver Immunoassay

1. Coating :

Die Mikrotiterplatten (96 Flachboden-Wells mit hoher Bindungskapazität, Greiner, Frickenhausen) werden mit dem Coating-Antigen (Hapten 2-BSA-Kojugat (Diazoderivat)) in Coating-Puffer (Natriumcarbonatpuffer, pH 9.6) - [**5 µg/mL; 200 µL/Kavität**] – beschichtet, mit selbstklebender Folie verschlossen und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Waschen I:

Die Mikrotiterplatten werden am darauf folgenden Tag mit K-Waschpuffer (pH 7.6; PBS-Tween) unter Verwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwashers gewaschen. Anschließend werden die Mikrotiterplatten ausgeklopft, um Flüssigkeitsreste zu entfernen.

2. Blocken:

Die nicht mit Coating-Antigen besetzten Bindungsstellen werden mit in PBS-Puffer (pH 7.6) gelöstem BSA - [**2% in PBS-Puffer; 300 µL/Kavität**] - geblockt. Hierzu werden die Mikrotiterplatten eine Stunde bei 37°C geschüttelt.

Waschen II: vgl. oben

3. Competition:

Die Proben bzw. Standardlösungen - [**0.001 µg/L bis 1000 µg/L; 100 µL/Kavität**] - und das in PBS-Puffer gelöste Kaninchen-Antiserum - [**1:10000 in PBS-Puffer; 50 µL/Kavität**] - werden nacheinander zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt.

Waschen III: vgl. oben

4. Tracerzugabe:

Nun wird ein Ziege-Anti-Maus-Antikörper - Meerrettichperoxidase - Konjugat (Pierce, Rockford, USA) in PBS-Puffer - [**1:10000 in PBS-Puffer; 150 µL/Kavität**] – zupipettiert und erneut eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert.

Waschen IV: vgl. oben

Enzymreaktion und Abstoppen:

vgl. V 7.1 Direkter kompetitiver Immunoassay

8 SGG-Immunadsorber

8.1 Antikörperaufreinigung

Ca. 2 mL Kaninchen-Rohserum werden mit 6 mL Bindungspuffer verdünnt und zur Aufreinigung und Aufkonzentrierung des Antikörpers über eine Protein-A-Säule gegeben. Dafür konditioniert und äquilibriert man zunächst die Protein-A-Säule mit 5 mL Elutionspuffer, gefolgt von 5 mL Bindungspuffer. Dann wird das verdünnte polyklonale Rohserum aufgegeben. Die Flussrate sollte 1 bis 2 mL/min nicht übersteigen. Die Serumaufgabe wird dreimal wiederholt, um die Antikörper-Ausbeute zu verbessern. Anschließend wird die Säule mit 5 mL Bindungspuffer nachgewaschen. Die Elution erfolgt mit Elutionspuffer. I. d. R. werden 5 bis 6 Fraktionen von jeweils 1 mL eluiert. Zu jeder Fraktion werden zur Neutralisation des pH-Wertes 200 μ L Neutralisationspuffer gegeben.

Zur Aufbewahrung wird die Protein-A-Säule mit 5 mL Elutionspuffer gereinigt und anschließend mit 5 mL 20%igem Ethanol (v/v) gespült. Sie wird im Kühlschrank bei 4°C gelagert und kann mehrfach wiederverwendet werden.

Die Proteinkonzentration in den einzelnen Elutionsfraktionen wird mit dem Micro-BCA-Assay (Pierce) bestimmt. Die Fraktionen werden gepoolt, evtl. auf eine bestimmte Konzentration eingestellt (IgG-Gehalt von ca. 2 mg/mL) und zur Herstellung des Immunsorbens verwendet (vgl.V 8.3).

8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde der kommerziell erhältliche BCA-Assay (Pierce) eingesetzt. In dem sehr sensitiven Test wird die Proteinkonzentration anhand der Bildung eines violetten Protein-Kupfer-Komplexes bestimmt. Die Messung der Farbintensität erfolgt photometrisch bei 562 nm.

Es werden 15 μ L Proteinlösung mit 385 μ L bidest. H₂O und 400 μ L Working-Reagent (laut Herstelleranweisung: 50 Teile Reagent A + 48 Teile Reagent B + 2 Teile Reagent C) vermischt und im Anschluss 20 Minuten bei 60°C inkubiert. Parallel wird eine Standardreihe mit dem Referenzprotein BSA (0; 0.125; 0.25; 0.5; 1; 2 mg/mL) angesetzt, die zur Kalibrierung des Testes dient. Nach der Inkubation werden die Reaktionslösungen im Wasserbad abgekühlt, 500 μ L davon mit 500 μ L bidest. H₂O verdünnt, in Küvetten gegeben und bei 562 nm gemessen. Die errechnete Proteinkonzentration wird als zu 100% aus IgG bestehend angenommen.

8.3 SGG-Immunsorbens-Herstellung

8.3.1 Gemahlene SGG-Monolithen

Zur Sol-Gel-Glas-Herstellung werden zunächst 1.7 mL Tetramethoxysilan (TMOS) und 0.1 mL Methanol in einem Polypropylengefäß vermischt und auf Eis gekühlt. Alle weiteren eingesetzten Lösungen werden ebenfalls auf Eis gekühlt. Zur Vorhydrolyse werden dann 0.3 mL Glycerin/H₂O (1:1, v/v), 0.25 mL eisgekühltes bidest. H₂O und 0.1 mL HCl (0.04 N) zugegeben. Die erhaltene Lösung wird mit einem Vortex-Schüttler gemischt und 25 min gekühlt, wobei eine weitere gründliche Durchmischung (bis 10 min alle 2 min, danach alle 5 min) erfolgen sollte. Die ursprünglich vorhandene Phasengrenze zwischen der TMOS-Lösung und Glycerin/bidest. H₂O sollte dabei nach ca. 10 min verschwinden und eine homogene, klare Lösung entstehen.

Die affinitätschromatographisch gereinigten und auf eine bestimmte Konzentration (ca. 2 mg/mL IgG) eingestellte Antikörperlösung wird in 1-mL-Portionen in Polypropylengefäße pipettiert und ebenfalls vorgekühlt. Zu 1 mL Antikörperlösung wird 1 mL des vorbereiteten Vorhydrolysats gegeben, zügig gemischt und die entstandene homogene Lösung rasch (innerhalb von 10 sec) in eine vorgewogene Glas-Petrischale (Durchmesser 5.5 cm) gegossen. Das schnell erstarrende Gel wird ca. 24 h offen im Kühlschrank zur Alterung gelagert. Nach einem Gewichtsverlust von 65 bis 70% wird das entstandene harte Glas (ca. 0.6 g) mittels eines Achatmörers zerkleinert. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass die entstehenden Partikel möglichst gleich groß sind und möglichst wenig Feinstaub entsteht. Das Material wird nass über ein Metallsieb (Maschenweite: 32 µm) gegeben. Die verbleibenden SGG-Partikel (> 32 µm) werden in eine 8-mL-LiChrolut[®]-Glassäule (mit zugehöriger PTFE-Fritte) gefüllt. Zum Abdecken des Sorbens wird ein Glasfaserfilter (Whatman GF/C) und eine PTFE-Fritte verwendet. Die Prüfung auf unerwünschtes Antikörperleaching der präparierten Immunadsorber, welches durch unzureichende Immobilisierung verursacht sein kann, erfolgt mittels ELISA. Nach der Konditionierung mit 10 mL TRIS-Puffer und Acetonitril/Wasser (1:1, v/v) ist das Immunsorbens einsatzbereit.

8.3.2 SGG-beschichtete Silikatpartikel

In einem 1.5-mL-Polypropylengefäß werden bei Raumtemperatur 295 µL TMOS, 400 µL Antikörperlösung, 50 µL bidest. H₂O und 50 µL Glycerinlösung (50%, v/v) 5 sec mittels Vortex-Schüttler intensiv gemischt und anschließend in ein Polypropylengefäß (76 x 20 mm) transferiert, in dem 0.6 g Silikatpartikel vorgelegt wurden. Dieses wird sofort fest verschlossen und per Hand kräftig geschüttelt. Die Wärmeentwicklung ist

gering und der Ansatz wird nicht gekühlt. Die Gelierungszeit beträgt ca. 15 min. Nach 24 h wird das Gefäß geöffnet und das Sol-Gel-Glas bei Raumtemperatur bis zum gewünschten Trocknungsgrad luftgetrocknet. Zur Beseitigung von Monomeren werden die Partikel nacheinander mit jeweils 5 mL H₂O, 5 mL wässriger Acetonitrillösung (40%, v/v) sowie 5 mL PBS im Ultraschallbad für 15 min unter Eiskühlung gewaschen. Nach jedem Waschschritt werden die beschichteten Partikel über ein 32- μ m-Analysesieb gespült. Anschließend werden die gewaschenen Partikel in Glassäulen (8 mL, mit PTFE-Fritten) bzw. HPLC-Kartuschen für die On-line-Anreicherung gefüllt.

8.3.3 Lagerung und Regeneration der Immunadsorbersäulen

Die Immunadsorbersäulen werden feucht bei 4°C in NaN₃-haltiger 100 mmol/L NaCl-Lösung gelagert.

Die Reinigung von stark verschmutzten Immunadsorbersäulen erfolgt durch Waschen mit je 5 mL Natriumacetatpuffer (200 mmol/L, pH 4.0) und anschließend SSC-Puffer (Saline Sodium Citrate, 200 mmol/L Natriumcitrat, 300 mmol/L NaCl), H₂O und H₂O/ACN (40:60, v/v). Falls aufgrund anhaltender starker Verfärbung des Immunosorbens die einmalige Reinigung nicht ausreicht, sollte der Zyklus wiederholt werden.

8.3.4 Herstellung von Blank-Säulen

Sogenannte Blank-Säulen sind Vergleichssäulen, die keinen spezifischen Antikörper enthalten und dem Nachweis dienen, dass keine unspezifische Adsorption der Analyten am Adsorbentmaterial auftritt. Deren Herstellung erfolgt analog zu Kapitel V 8.3. Dabei handelt es sich um reine SGG-Säulen (PBS-Pufferlösung plus SGG-Vorhydrolysat) oder aber um SGG-Säulen mit immobilisierten unspezifischen Proteinen, wie z.B. Rinder-IgG, polyklonalen anti-Diclofenac-Antikörpern [405] bzw. anti-BTX-Antikörpern [404].

8.4 Anreicherung von SUs mittels SGG-IAC

Die Immunadsorber werden für den Off-line-Betrieb vor dem Beginn der Anreicherung mit 5 mL H₂O/ACN (40:60, v/v), gefolgt von H₂O/ACN (95:5, v/v) konditioniert. Die Wasserproben bzw. Lebensmittelextrakte, die auf einen NaCl-Gehalt von 100 mmol eingestellt wurden, werden mittels einer Schlauchpumpe langsam (Flussrate: 1 mL/min) über die Säule gegeben. Nach der Anreicherung wird mit 5 mL 5%igem ACN gewaschen und dann mit dreimal 1 mL ACN 40% eluiert. Schließlich müssen die Proben noch auf die HPLC-Lösungsmittel-Bedingungen angepasst werden und können dann injiziert werden.

9 HPLC

9.1 SPE-Anreicherung für die HPLC

Neben Anreicherungen von SUs mit den selbst entwickelten Immunadsorbentien wurden auch Anreicherungen an verschiedenen SPE-Materialien durchgeführt. Dafür wurden die kommerziell erhältlichen SPE-Kartuschen Oasis[®] HLB und MAX (Fa. Waters), Envi-Carb[®] (Supelco), LiChrolut[®] (Merck) sowie StrataX[™] (Phenomenex) verwendet. Bei Oasis[®] HLB handelt es sich um ein Copolymer aus N-Vinylpyrrolidon und Divinylbenzol, bei Oasis[®] MAX um eine Mischphase, bei der die Oberfläche des HLB-Materials durch quartäre Aminogruppen (Dimethylbutylamin) mit starker Ionenaustauscherfunktion modifiziert ist. Eine weitere Mixed-Mode-Phase mit Anionenaustauscherfunktion stellt StrataX[™] dar, das aus einem oberflächenmodifizierten Styrol-Divinylbenzol-Copolymer besteht (PS-DVB). LiChrolut[®] ist RP18-Material auf Kieselgelbasis und Envi-Carb[®] besteht aus modifiziertem Kohlenstoff.

Tabelle 36: Anreicherung von SUs mittels verschiedener SPE-Materialien.

Material	Konditionieren	Probenaufgabe	Waschen	Elution
Oasis [®] HLB 1cc (30 mg)	1 mL MeOH, 1 mL H ₂ O ^{**}	Ansäuern [*] positiv für Wiederfindung	3 mL H ₂ O ^{**}	1 mL MeOH
Oasis [®] HLB 3cc (60 mg)	3 mL MeOH, 3 mL H ₂ O ^{**}	Ansäuern [*] positiv für Wiederfindung	5 mL H ₂ O ^{**}	2 mL MeOH
Oasis [®] MAX (30 mg)	1 mL MeOH, 1 mL H ₂ O ^{**}	Ansäuern [*] positiv für Wiederfindung	je 1 mL NH ₄ OH 2%ig, MeOH	1 mL HCOOH 5% in MeOH
StrataX [™] (30 mg)	1 mL MeOH, 3 mL H ₂ O ^{**}	Ansäuern [*] positiv für Wiederfindung	3 mL H ₂ O ^{**}	2 mL MeOH
LiChrolut [®] (500 mg)	5 mL ACN, 5 mL H ₂ O ^{**}	Ansäuern [*] notwendig	5 mL H ₂ O ^{**}	3 mL ACN
Envicarb [®] (60 mg)	4 mL ACN, 6 mL H ₂ O ^{**}	Ansäuern [*] notwendig	6 mL H ₂ O ^{**}	3 mL CH ₂ Cl ₂ / MeOH (80:20, v/v)

* Ansäuern der Probe auf pH 3 bis 4 mit Phosphatpuffer (0.1 M, pH 3.0) und Phosphorsäure 1% (v/v)

** H₂O steht für bidestilliertes Wasser

Für die Durchführung der Anreicherungen wurde sich weitgehend an die Vorgaben der Hersteller gehalten. Es wurden aber auch verschiedene Parameter, wie pH-Wert der

Proben, Elutionsmittel und -volumen variiert, um die optimalen Bedingungen für die Anreicherung und Elution von SUs zu ermitteln. Tabelle 36 gibt eine Übersicht über die Bedingungen der einzelnen Kartuschen, die für möglichst viele SUs die besten Wiederfindungsraten lieferten. Die Beladung erfolgte jeweils bei Flussraten von ca. 3-5 mL/min. Vor der Elution wurden die Kartuschen im schwachen Stickstoffstrom getrocknet, nach der Elution wurden die Eluate ebenfalls vorsichtig mit Stickstoff fast bis zur Trockene eingengt und anschließend entsprechend den HPLC-Fließmittelbedingungen rekonstituiert.

9.2 HPLC-Methoden für die UV/DAD-Detektion

Es wurde mit einem HPLC-UV/DAD-System bei einer Detektionswellenlänge von 227 nm gearbeitet. Die HPLC-Säule (250 x 4.6 mm) ProntoSIL 120-3-C₁₈-AQ, 3 µm (Bischoff NC) wurde zur Trennung der SUs eingesetzt. Die Temperatur des Säulenofens wurde auf 25°C eingestellt. Die Proben wurden vor der Injektion generell angesäuert (pH 3.0) und auf den Lösungsmittelanteil des Eluenten eingestellt. Bei Off-line-Betrieb wurde 1 mL Probe über eine 500-µL-Probenschleife ins System injiziert.

Isokratisch

Mobile Phasen: 60% A: Bideist. H₂O, 3 mM TFA
40% B: ACN, 3 mM TFA
Flussrate: 1 mL/min

Gradientensystem 1

Mobile Phasen: A: Bideist. H₂O, 3 mM TFA
B: ACN, 3 mM TFA
Flussrate: 0.8 mL/min
Gradient: 32% B linear bis 62% B in 40 min (Trennung)
62% B linear bis 90% B in 5 min (Säulenreinigung)
90% B linear bis 32% B in 10 min (Äquilibrierung)

Gradientensystem 2

Mobile Phasen: A: Phosphatpuffer, 20 mM, pH 3.0
B: ACN
Flussrate: 0.8 mL/min
Gradient: 32% B linear bis 50% B in 24 min (Trennung)
50% B linear bis 90% B in 5 min (Säulenreinigung)
90% B linear bis 32% B in 10 min (Äquilibrierung)

9.3 HPLC-Methoden für die MS-Detektion

Für die μ LC-MS wurde an einer Zorbax SB-Phenyl Spezial-HPLC-Säule (1 x 250 mm) mit 5 μ m Partikeln (Agilent) getrennt. Das Injektionsvolumen betrug 20 μ L.

Gradientensystem 3

Mobile Phasen: A: 10 mM Ammoniumacetat, pH 6.8
B: 95% MeOH (v/v)

Flussrate: 50 μ L/min

Gradient: 10% B linear für 2 min
10% B linear bis 30% B in 5 min
30% B linear bis 90% B in 20 min
90% B linear bis 80% B in 13 min
80% B linear bis 10% B in 2 min
10% B linear für 12 min

9.4 HPLC-Methoden für die Tandem-MS-Detektion

Die LC-MS/MS wurde im ESI-positiv-Modus betrieben. Für die chromatographische Trennung wurde die HPLC-Säule (150 x 3.0 mm) Inertsil C₁₈, 5 μ m (MZ-Analytical) eingesetzt. Die Säulentemperatur betrug 40°C. Zu den Proben wurde generell Mesosulfuron-methyl (10 ng/mL) als interner Messstandard addiert. Die Kalibriergeraden wurden in Wasser und in den verschiedenen Lebensmittelextrakten erstellt um Matrixeffekte zu kontrollieren. Das mittels Autosampler injizierte Probenvolumen betrug 30 μ L.

Gradientensystem 4

Mobile Phasen: A: Bidest. Wasser/ACN (90:10, v/v), 1% Ameisensäure (v/v)
B: ACN

Flussrate: 0.3 mL/min

Gradient: 0% B linear bis 92% B in 5 min
92% B 5 min konstant
92% B linear bis 0% B in 5 min

9.5 On-line-HPLC-UV/DAD

Für die On-line-Anreicherung von SUs wurden zwei verschiedene Schaltsysteme eingesetzt (vgl. III 5). Die verwendeten Schaltventile und Pumpen wurden über den Controller der HPLC-Anlage (Shimadzu) gesteuert. Da Ablauf und Funktion der beiden On-line-Schaltungen im Ergebnisteil dieser Arbeit bereits ausführlich beschrieben wurden, werden an dieser Stelle lediglich die Zeitprogramme der Controllersteuerung wiedergegeben.

Zeitprogramm 1 (On-line-IAC/HPLC-UV/DAD, isokratisch)

t [min]	Aktion	Parameter/Position	Erklärung
0.1	TFlow	1 mL/min	Fluss des analytischen HPLC-Eluenten
0.15	BConc	40%	Eluent B (ACN 40%, ohne Säure)
0.25	RV-B	0	Startposition Ventil B (IAC) Konditionieren der IAC-Säule
0.3	RV-C	2	Startposition Ventil C (Solvent-Selektor)
0.35	CFlow	1 mL/min	Fluss der Pumpe am Solvent-Selektor
3.0	RV-C	3	Probenaufgabe auf IAC-Säule
13.0	RV-C	4	Waschen der IAC-Säule
16.0	RV-B	1	Schalten der IAC-Säule in Elutionsstrom
18.0	RV-B	0	Konditionieren der IAC-Säule

Beim direkten Schalten der IAC-Säule in den analytischen Eluentenstrom ist es wichtig, dass das Eluentengemisch keine Säure enthält, da sonst eine Wiederverwendung des On-line-Immunadsorbers nicht mehr möglich ist. Da die meisten SUs für die analytische Trennung an RP18-Materialien protoniert vorliegen müssen, ist diese On-line-Anreicherungsvariante nur für einige wenige SUs geeignet (z.B. Triasulfuron).

Zeitprogramm 2 (On-line-IAC/RP-SPE-HPLC-UV/DAD, Gradientensystem)

t [min]	Aktion	Parameter/Position	Erklärung
0.1	TFlow	0.8 mL/min	Fluss analytische HPLC (Gradientenpumpen)
0.15	BConc	32%	Startkonzentration analytische HPLC
0.2	RV-A	0	Startposition Ventil A (RP-SPE)
0.25	RV-B	0	Startposition Ventil B (IAC)
0.3	RV-C	2	Startposition Ventil C (Solvent-Selektor)
0.35	CFlow	1 mL/min	Fluss der Pumpe am Solvent-Selektor
3.0	RV-C	3	Probenaufgabe auf IAC-Säule
13.0	RV-C	4	Waschen der IAC-Säule
18.0	RV-C	5	Elution der IAC-Säule

18.15	CFlow	0.5 mL/min	Flussverminderung für Elution
19.0	RV-B	1	Schalten der IAC-Säule in Elutionstrom
21.0	RV-C	2	Konditionieren der IAC-Säule
26.0	RV-B	0	Schalten von IAC-Säule in Ausgangsposition
31.0	RV-A	1	Elution der RP-SPE in analytischen Strom
31.15	BConc	32	Startkonzentration B (ACN) analytische HPLC
51.0	BConc	50	Gradient (linear in 20 min auf 50% B)
56.0	BConc	90	Reinigung der analytischen Säule
66.0	BConc	32	Äquilibrierung der analytischen Säule

Die 3. Pumpe (Merck-Hitachi), die zum Zumischen von Wasser zur Reduzierung des ACN-Anteils im IAC-Eluenten zwischen IAC und RP-SPE diente, wurde kontinuierlich bei 3 mL/min betrieben, da sie nicht extern ansteuerbar war. Die HPLC-Parameter entsprechen den vorausgehend beschriebenen.

10 MS

Für die Tandem-MS-Detektion wurde ein Quadrupol-Gerät Ultima™ Pt von Micromass verwendet. Die Messungen wurden im positiven Elektrospray-Modus unter Verwendung einer Z-Spray-Quelle von Micromass durchgeführt. Die optimierten Parameter der „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM)-Experimente im ESI⁺-Mode sind im Folgenden aufgelistet.

MS/MS-Parameter

Spannung der Elektrospray-Kapillarspitze	0.5 kV
Spannung der „Sample Cone“	60 V
Temperatur der Quelle	140°C
Desolvatisierungstemperatur	350°C
Stickstoffstrom für die Vernebelung	75 L/h
Stickstoffstrom für die Desolvatisierung	694 L/h
Stoßgas	Argon
Druck in der Stoßkammer	4.35 e ⁻³ mbar
Kollisionsenergie	20 eV
Massenscanbereich	80 bis 2000 Da
Massenscandauer	0.1 sec
Fragmentierungen	vgl. Tabelle 28
Multiplierspannung	650 V

11 Synthesen

11.1 Synthese des Bernsteinsäurederivates von Hapten 1 und Identifizierung der Carbonsäurederivate der Haptene 2 und 3

Zur Darstellung von 1-[(2-Carbonsäuremethylester)phenylsulfonyl]-monoamido-bernsteinsäure werden je 6 mmol Hapten 1 (2-Carbonsäuremethylester-phenylsulfonamid) und Bernsteinsäureanhydrid in 15 mL Dioxan gelöst. Zu dieser Mischung wird innerhalb von 30 min eine Lösung von 12 mmol DBU (1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-en) in 6 mL Dioxan zugetropft und anschließend 2 h bei RT gerührt. Nach dem Ansäuern des Reaktionsgemisches mit 2 N HCl auf pH 3.0, wird die Dioxanphase bis zur Trockene eingedampft. Der ölige Rückstand wird in Ethylacetat gelöst, in einen Schütteltrichter überführt und zweimal mit Wasser gewaschen. Die Ethylacetatphase wird über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel abdestilliert und das erhaltene Produkt in Ethanol umkristallisiert. Es wurden farblose bis weiße Kristalle erhalten, die mittels Dünnschichtchromatographie (DC), sowie ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektroskopie identifiziert wurden.

Hapten 1:

Ausbeute: C₁₂H₁₃O₇SN (M_r = 315,3 g/mol): 0.78 g (48%); **DC:** Laufmittelmischung aus Hexan/Ethylacetat/Ameisensäure (50:45:5, v/v), R_f = 0.84.

¹H-NMR (300 MHz): CD₃CN: δ [ppm] = 2.17 (s, 1H, NH), 2.47 (m, 2H, CH₂), 2.53 (m, 2H, CH₂), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 7.73 (m, 3H, Ar), 8.18 (m, 1H, Ar), 9.40 (s, 1H, COOH).

Die von Herrn Dr. Wenger (*Syngenta*, Basel) und von Herrn Dr. Franek (*VRI*, Brno, CZ) freundlicherweise zur Verfügung gestellten, bereits an Spacermoleküle gekoppelten Haptene 2 und 3, wurden ebenfalls mittels ¹H-NMR charakterisiert.

Hapten 2:

¹H-NMR (300 MHz): CDCl₃: δ [ppm] = 2.54 (m, 2H, (CH₂)₂), 2.7 (m, 2H, (CH₂)₂), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 4.0 (s, 6H, 2 OCH₃), 4.52 (m, 2H, CH₂), 5.79 (s, 1H, Ar), 6.95 (m, 1H, NH), 7.68 (m, 2H, Ar), 8.15 (s, 1H, NH), 8.27 (s, 1H, Ar), 10.64 (s, 1H, NH), 12.60 (s, 1H, COOH).

Hapten 3:

¹H-NMR (300 MHz): CDCl₃: δ [ppm] = 1.52 (m, 2H, (CH₂)₃), 1.74 (m, 4H, (CH₂)₃), 2.33 (s, 3H, CH₃), 2.41 (m, 2H, CH₂COOH), 3.49 (m, 3H, CH₂NH), 4.0 (s, 1H, OCH₃), 7.88 (s, 1H, NH).

11.2 Synthese von Hapten-Protein-Konjugaten über NHS-Aktivester

Zur Kopplung der drei verschiedenen Hapten-Spacer-Moleküle an Proteincarrier werden 0.2 mmol der jeweiligen Verbindung in 2 mL DMF gelöst und unter Rühren mit jeweils 0.8 mmol N-Hydroxysuccinimid (NHS) und N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird zunächst 1 h bei RT und anschließend 20 h bei 4°C gerührt. Dieses aktivierte Estergemisch wird nun tropfenweise zu einer Lösung von 40 mg Proteincarrier (KLH bzw. BSA) in 6 mL Boraxpuffer (pH 9.5) gegeben und 4 h unter Rühren inkubiert. Der Reaktionsansatz wird bei RT über Nacht weiter gerührt und dann gegen PBS-Puffer (1:10) und bidest. Wasser dialysiert. Die gereinigten Konjugate werden lyophilisiert und deren Kopplungsdichte bestimmt.

11.3 Synthese von Coating-Antigenen über Sulfo-NHS-Ester

30 mg Carrierprotein (BSA) werden in 10 mL Reaktionspuffer (0.05 M MES; 0.5 M NaCl; pH 6.0) gelöst, mit 2 mM EDC und 5 mM Sulfo-NHS versetzt und für 15 min bei RT unter Rühren inkubiert. Dann werden 45 µL 2-Mercaptoethanol zugegeben und die Reaktionslösung wird erneut 10 Minuten gerührt. 0.05 mM des Haptens werden in DMSO gelöst, zur Reaktionslösung gegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Diese Lösung wird anschließend dialysiert und lyophilisiert. Als Hapten wurde u.a. auch das Antidiabetikum N1-(Butyl-carbamoyl)-sulfonylamid eingesetzt.

11.4 Synthese von Coating-Antigenen mittels Diazotierung

0.05 mmol Hapten werden in 1.2 mL 0.1 N HCl gelöst und im Eisbad gekühlt. Die gekühlte Haptenlösung wird tropfenweise mit 1% NaNO₂-Lösung versetzt, bis freie salpetrige Säure nachweisbar ist. Der Nachweis erfolgt durch Farbreaktion mit 1% Stärkelösung, in der 8.3 g KI gelöst sind. Die Bildung des blauen Iod-Stärke-Komplexes zeigt die Freisetzung von Iod durch Reaktion mit freier salpetrige Säure und somit den Abschluss der Diazotierung an. Nach beendeter NaNO₂-Zugabe werden 0.44 mmol BSA in 1 mL Natriumcarbonatpuffer (0.2 M, pH 9.0) gelöst und ebenfalls gekühlt. Zur BSA-Lösung wird tropfenweise das diazotierte Amin gegeben. Die Reaktion erfolgt unter ständiger pH-Kontrolle. Gegebenenfalls wird mittels Zugabe von Na₂CO₃ erneut auf pH 9.0 eingestellt. Anschließend wird weitere 2 h unter Eiskühlung gerührt und die Reaktionslösung dann dialysiert und lyophilisiert. Als Hapten wurde u.a. auch das Antidiabetikum N1-(Butyl-carbamoyl)-sulfonylamid eingesetzt.

11.5 Synthese von Hapten-POD-Tracern

11.5.1 Homologer Tracer

Mittels der NHS-Aktivestermethode werden die drei verschiedenen Haptene an POD gekoppelt. Da die Hapten-Proteincarrier-Bindung homolog zur Hapten-POD-Bindung ist, spricht man von homologen Tracern. Dafür werden 0.2 mmol des entsprechenden Hapten-Spacer-Moleküls in 3 mL DMF gelöst und unter Rühren mit jeweils 0.8 mmol N-Hydroxysuccinimid (NHS) und N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei RT gerührt. 200 µL des aktivierten Estergemisches werden in vier Aliquoten zu einer Lösung aus 5 mg POD in 500 µL Boraxpuffer (pH 9.5) zupipettiert und 3 h unter Rühren inkubiert. Der Reaktionsansatz wird dann gelchromatographisch über Sephadex-PD-10-Säulen gereinigt. Hierfür werden die Säulen mit PBS-Puffer äquilibriert, dann die Reaktionslösung aufgegeben und die einzelnen Fraktionen in einer MTP gesammelt. Die Fraktionen mit der höchsten Absorption bei 405 nm werden vereinigt und bei 4°C gelagert.

11.5.2 Heterologer Tracer

Mittels der aminogruppenaktivierten POD von Pierce, die 1-3 mol aminoreaktive Gruppen pro mol POD enthält, können Haptene, die Aminogruppen enthalten, direkt an die POD gekoppelt werden, ohne dass die Einführung einer Spacerbrücke notwendig ist. Dafür wird zunächst 1 mg Hapten in 100 µL DMSO gelöst und mit 900 µL PBS gemischt. Dann wird die aktivierte POD in 100 µL bidest. Wasser gelöst und mit 500 µL der Haptenlösung versetzt. Im Anschluss daran werden zur Reaktionslösung sofort 10 µL Reaktionspuffer (5 M NaCNBH₃ in 1 N NaOH) gegeben und 1 h unter Rühren inkubiert. Nach Zugabe von 20 µL Quenchingpuffer (3 M Ethanolamin, pH 9.0) wird weitere 15 min gerührt. Das Reaktionsprodukt wird gelchromatographisch über Sephadex-PD-10-Säulen gereinigt und bei 4°C gelagert (vgl. V 11.5.1).

11.6 Bestimmung der Kopplungsdichte mittels TNBS

Zur Bestimmung der Kopplungsdichte mittels TNBS löst man 2.4 mg Hapten-Protein-Konjugat in 1 mL 1N NaOH. Pro Ansatz werden 0.3 mL dieser Lösung mit 0.3 mL 1 N HCl, 1.4 mL 4% NaHCO₃-Lösung und 1 mL 0,1% TNBS-Lösung gemischt. Die Reagenzienmischungen werden für 2 h bei 40°C inkubiert und anschließend mit jeweils 1 mL 10% SDS und 0.5 mL 1N HCl vermischt. Die Extinktion der Proben wird bei 335 nm photometrisch gemessen. Zur Berechnung der Kopplungsdichte wird die Extinktion der

Konjugate in Relation zu analog behandelten unkonjugierten Protein-Proben (KLH, BSA) gesetzt.

11.7 Dünnschichtchromatographie

Als stationäre Phase werden Kieselgel-DC-Platten der Firma Merck (20 x 20 cm, Nr. 1.05745) verwendet. Als mobile Phase dient eine Mischung aus Hexan/Ethylacetat/Ameisensäure (50:45:5, v/v). Die DC-Platten werden mit dem Laufmittel vorgewaschen und bei RT getrocknet. Die Probe wird in Ethanol gelöst und mittels einer Glaskapillare (1 μ L) aufgetragen. Nach Abdampfen des Ethanols wird die DC-Platte in eine mit Laufmittel gesättigte DC-Kammer gestellt. Die Detektion der Probenbanden erfolgt im UV-Licht. Aus dem Verhältnis der Laufstrecke des Analyten zur Laufmittelfront ergibt sich der R_f -Wert.

VI ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Obere Asymptote; maximale Absorption (Vierparameter-Funktion nach RODBARD)
ACN	Acetonitril
Ag	Antigen
ADI	Acceptable Daily Intake (tolerierbare tägliche Aufnahme)
Ak	Antikörper
ALS	Acetolactat-Synthase
B	Steigung im Testmittelpunkt (Vierparameter-Funktion nach RODBARD)
BBA	Biologische Bundesanstalt
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
BfR	Bundesamt für Risikobewertung
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
c	Konzentration
CE	Capillary Electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
CR	Cross-Reactivity (Kreuzreaktivität)
d	Tag
D	Untere Asymptote; minimale Absorption (Vierparameter-Funktion nach RODBARD)
DAD	Diodenarraydetektor
δ	Chemische Verschiebung
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDC	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid
ELISA(s)	Enzyme-linked Immunosorbent Assay(s) (Enzym-Immunoassay(s))
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
IA	Immunadsorber
IAC	Immunoaffinitätschromatographie
IE	Immunextraktion
IgG	Immunoglobulin G
IS	Interner Standard
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry

K	Affinitätskonstante
kDa	Kilodalton
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
kPa	Kilopascal
LC	Flüssigchromatographie
LD ₅₀	Letale Dosis (50% Wert)
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
log P _{O/W}	Verteilungskoeffizient n-Oktanol/Wasser
LOQ	Limit of Quantitation (Bestimmungsgrenze)
M	Molar
m	Mol
mAk	Monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted-Laser-Desorption Time-Of-Flight Mass-Spectrometry (matrixunterstützte Laser-Desorptions-Flugzeit-Massenspektrometrie)
MSPD	Matrix Solid Phase Dispersion (Festphasendispersion)
MHz	Mega-Hertz
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
N	Normal
n	Anzahl der für die Korrelationsberechnung verwendeten Datenpaare
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernmagnetische Resonanz)
p.a.	Zur Analyse (Chemikalienqualität)
pAk	Polyklonaler Antikörper
pAk-R03	Polyklonaler Antikörper, generiert in Kaninchen 03
PBS	Phosphate-Buffered Saline (Phosphat-Kochsalz-Puffer)
PEG	Polyethylenglykol
PflSchG	Pflanzenschutzgesetz
POD	Peroxidase aus Meerrettich
ppb	Parts per billion (z.B. µg/L)
ppm	1. Parts per million (z.B. mg/L) 2. Einheit der chemischen Verschiebung (NMR)
PS-DVB	Poly(divinyl)benzol-N-Vinylpyrrolidone-Copolymer
PSM	Pflanzenschutzmittel
r	Korrelationsfaktor
R _f	Relation to front (Relative Laufhöhe einer Substanz im Vergleich zur Lösungsmittelfront; Kenngröße in der Dünnschichtchromatographie)

RHmV	Rückstands-Höchstmengenverordnung
RP	Reversed-Phase
RT	Raumtemperatur
s	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SGG	Sol-Gel-Glas
SIM	Selected Ion Monitoring
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
SU(s)	Sulfonylurea(s), Sulfonylharnstoff(e)
t	Zeit
t _R	Retentionszeit
TFA	Trifluoressigsäure
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TrinkwV	Trinkwasser-Verordnung
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
UV/VIS	Ultraviolettes und sichtbares Licht
v/v	Volumen/Volumen-Mischverhältnis
w/w	Gewicht/Gewicht-Mischverhältnis
WHO	Weltgesundheitsorganisation
X ₀	Testmittelpunkt der sigmoiden ELISA-Kalibrierkurve
ZAK	Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper
ZAK-POD	Peroxidase-markierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper
ZAM	Ziege-anti-Maus-Antikörper
ZAM-POD	Peroxidase-markierter Ziege-anti-Maus-Antikörper

VII LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Der Brockhaus in fünfzehn Bänden, Band 11, F. A. Brockhaus GmbH, Mannheim 1997.
- [2] H.-D. BELITZ, W. GROSCH: Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer Verlag, Berlin 1992.
- [3] *BVL: Absatz von Pflanzenschutzmitteln in der Bundesrepublik Deutschland. Ergebnisse der Meldungen gemäß § 19 Pflanzenschutzgesetz für das Jahr 2003*, <http://www.bvl.bund.de/pflanzenschutz/Aktuelles/MeldPar19-2003.pdf>.
- [4] T. SEITZ, M. G. HOFFMANN, H. KRÄMER: *Herbizide für die Landwirtschaft*, Chem. Unserer Zeit **37** (2003) 112-126.
- [5] G. KEMPTER, A. JUMAR: Chemie organischer Pflanzenschutzmittel und Schädlingsbekämpfungsmittel, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1991.
- [6] G. EISENBRAND, P. SCHREIER: Römpp Lexikon Lebensmittelchemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1995.
- [7] B. HOCK, C. FEDTKE, R. R. SCHMIDT: Herbizide: Entwicklung, Anwendung, Wirkungen, Nebenwirkungen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1995.
- [8] C. R. POWLEY: *Sulfonylurea Herbicides*, in: Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals, P. W. Lee, H. Aizawa, A. C. Barefoot and J. J. Murphy (Hrsg.), 400-411, John Wiley & Sons Ltd., New York 2003.
- [9] H.-H. SCHMIDT: *Ergebnisse der Wirkstoffmeldungen für Pflanzenschutzmittel nach §19 des Pflanzenschutzgesetzes für das Jahr 1998 im Vergleich zu den Jahren 1996 und 1997*, Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. **52** (2000) 81-91.
- [10] H.-H. SCHMIDT, E. ALISCH: *Ergebnisse der Wirkstoffmeldungen für Pflanzenschutzmittel nach §19 des Pflanzenschutzgesetzes für die Jahre 1997 bis 1999 im Vergleich zu den Vorjahren*, Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. **53** (2001) 81-90.
- [11] K. SCHMIDT: *Ergebnisse der Wirkstoffmeldungen für Pflanzenschutzmittel nach §19 des Pflanzenschutzgesetzes für die Jahre 1999, 2000 und 2001 im Vergleich zu 1998*, Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. **55** (2003) 121-133.

- [12] *Verordnung zur Novellierung der Trinkwasserverordnung (TrinkwV)*, Vom 21.05.2001.
- [13] *Verordnung über Höchstmengen an Rückständen von Pflanzenschutzmitteln, Düngemitteln und sonstigen Mitteln in und auf Lebensmitteln und Tabakerzeugnissen (Rückstands-Höchstmengenverordnung - RHmV)*, Bekanntmachung der Neufassung vom 21.10.1999, BGBl. I S. 2082. Zuletzt geändert am 19.12.2003, BGBl. I S. 2755.
- [14] W. ZUMACH: *Nitrofen in Lebensmitteln - Versuch einer Bewertung*, Chem. Unserer Zeit **37** (2003) 127.
- [15] S. K. H. GEE, J. V. HAY: *Recent Developments in the Chemistry of Sulfonylurea Herbicides*, in: Chemistry of Plant Protection, J. Stetter (Hrsg.), 16-46, Springer Verlag, Berlin 1994.
- [16] M. H. RUSSELL, J. L. SALADINI, F. LICHTNER: *Sulfonylurea Herbicides*, Pesticide Outlook (2002) 166-173.
- [17] H. M. BROWN, J. C. COTTERMAN: *Recent Advances in Sulfonylurea Herbicides*, in: Chemistry of Plant Protection, J. Stetter (Hrsg.), 47-81, Springer Verlag, Berlin 1994.
- [18] M. E. SCHMUCKLER, A. C. BAREFOOT, D. A. KLEIER, D. P. COBRANCHI: *Vapor Pressures of Sulfonylurea Herbicides*, Pest Manag. Sci. **56** (2000) 521-532.
- [19] C. R. WORTHING, R. J. HANCE: The Pesticide Manual, The British Crop Protection Council, Farnham, UK 1991.
- [20] *INDUSTRIEVERBAND AGRAR: Wirkstoffe in Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln: Physikalisch-chemische und toxikologische Daten*, CD-Rom, Hrsg.: Chemie-Wirtschaftsförderungs-GmbH, Frankfurt am Main 2002.
- [21] K. HIRAI, A. UCHIDA, R. OHNO: *Major Synthetic Routes for Modern Herbicide Classes and Agrichemical Characteristics*, in: Herbicide Classes in Development, P. Böger, K. Wakabayashi and K. Hirai (Hrsg.), 179-289, Springer Verlag, Berlin 2002.
- [22] J. V. SCHLOSS: *Recent Advances in Understanding the Mechanism and Inhibition of Acetolactate Synthase*, in: Chemistry of Plant Protection, J. Stetter (Hrsg.), 3-14, Springer Verlag, Berlin 1994.

- [23] T. SHIMIZU, I. NAKAYAMA, K. NAGAYAMA, T. MIYAZAWA, Y. NEZU: *Major Synthetic Routes for Modern Herbicide Classes and Agrichemical Characteristics*, in: Herbicide Classes in Development, P. Böger, K. Wakabayashi and K. Hirai (Hrsg.), 1-41, Springer Verlag, Berlin 2002.
- [24] J. DAVIES, J. C. CASELEY: *Herbicide Safeners: A Review*, Pestic. Sci. **55** (1999) 1043-1058.
- [25] U. MEYER, A. SCHUHMAN, C. FRIEDRICH: *Geschichte der oralen Antidiabetika*, Pharm. Unserer Zeit **3** (2002) 242-250.
- [26] M. MARK: *Sulfonylharnstoffe und Glinide*, Pharm. Unserer Zeit **3** (2002) 252-262.
- [27] H. GLOMBIK: *Diabetes mellitus - neue Antidiabetika*, Nachrichten aus der Chemie **49** (2001) 1028-1037.
- [28] B. M. BERGER, M. MÜLLER, A. EING: *Quantitative Structure-Transformation Relationships of Sulfonylurea Herbicides*, Pest Manag. Sci. **58** (2002) 724-735.
- [29] A. K. SARMAH, R. S. KOOKANA, M. J. DUFFY, A. M. ALSTON, B. D. HARCH: *Hydrolysis of Triasulfuron, Metsulfuron-methyl and Chlorsulfuron in Alkaline Soil and Aqueous Solutions*, Pest Manag. Sci. **56** (2000) 463-471.
- [30] L. D. BRAY, N. E. HEARD, M. C. OVERMAN, J. D. VARGO, D. L. KING, L. J. LAWRENCE, A. W. PHELPS: *Hydrolysis of Prosulfuron at pH 5: Evidence for a Resonance-Stabilized Triazine Cleavage Product*, Pestic. Sci. **51** (1997) 56-64.
- [31] J. M. F. MARTINS, N. CHEVRE, L. SPACK, J. TARRADELLAS, A. MERMOUD: *Degradation in Soil and Water and Ecotoxicity of Rimsulfuron and its Metabolites*, Chemosphere **45** (2001) 515-522.
- [32] S. SINGLES KOCH, G. M. DEAN, D. M. KIRKPATRICK, B. C. MAYO, L.-P. A. D., A. C. BAREFOOT, F. Q. J. BRAMBLE: *Fate and Behavior of Flupyralsulfuron-methyl in Soil and Aquatic Systems*, Pestic. Sci. **55** (1999) 288-300.
- [33] J. SABADIE: *Behavior of Four Sulfonylurea Herbicides in the Presence of Hydroxy Compounds*, J. Agric. Food Chem. **48** (2000) 4752-4756.
- [34] A. K. BHATTACHERJEE, P. DUREJA: *Light-Induced Transformations of Tribenuron-methyl in Aqueous Solution*, Pestic. Sci. **55** (1999) 183-188.
- [35] A. PUSINO, I. BRASCHI, S. PETRETTO, C. GESSA: *Photodegradation of Herbicide Triasulfuron*, Pestic. Sci. **55** (1999) 479-481.

- [36] N. CHARFIK, M. MANSOUR, B. ELAMRANI, K.-W. SCHRAMM, A. KETTRUP, M. K. ELAMRANI: *Application of Coupled Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Photolysis Studies of the Herbicide Triflurosulfuron-methyl*, *Pest Manag. Sci.* **57** (2001) 527-530.
- [37] E. VULLIET, C. EMMELIN, J.-M. CHOVELON, C. GUILLARD, J.-M. HERRMANN: *Photocatalytic Degradation of Sulfonylurea Herbicides in Aqueous TiO₂*, *Appl. Catal. B: Environ.* **38** (2002) 127-137.
- [38] E. VULLIET, C. EMMELIN, J.-M. CHOVELON: *Influence of pH and Irradiation Wavelength on the Photochemical Degradation of Sulfonylureas*, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **163** (2004) 69-75.
- [39] H. M. BROWN, T. P. FUESLER, T. B. RAY, S. D. STRACHAN: *Role of Plant Metabolism in Crop Selectivity of Herbicides*, in: *Pesticide Chemistry*, H. Frehse (Hrsg.), 257-266, VCH Verlag, Weinheim 1990.
- [40] R. J. CREMLYN: *Agrochemicals*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK 1990.
- [41] M. S. YUN, I. S. SHIM, K. USUI: *Involvement of Cytochrome P-450 Enzyme Activity in the Selectivity and Safening Action of Pyrazosulfuron-ethyl*, *Pest Manag. Sci.* **57** (2001) 283-288.
- [42] T. T. OBRIGAWITCH, G. COOK, J. WETHERINGTON: *Assessment of Effects on Non-Target Plants from Sulfonylurea Herbicides Using Field Approaches*, *Pestic. Sci.* **52** (1998) 199-217.
- [43] P. J. TRANNEL, T. R. WRIGHT: *Resistance of Weeds to ALS-Inhibiting Herbicides*, *Weed Sci.* **50** (2002) 700-712.
- [44] L. L. SAARI, C. J. MAUVAIS: *Sulfonylurea Herbicide-Resistant Crops*, in: *Herbicide-Resistant Crops*, S. O. Duke (Hrsg.), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, USA 1996.
- [45] D. C. THILL, C. A. MALLORY-SMITH, L. L. SAARI, J. C. COTTERMAN, M. M. PRIMIANI, J. L. SLADINI: *Sulfonylurea Herbicide Resistant Weeds: Discovery, Distribution, Biology, Mechanism and Management*, in: *Herbicide Resistance in Weeds and Crops*, J. C. Caseley, G. W. Cussans and R. K. Atkin (Hrsg.), 114-135, Butterworth-Heinemann, Oxford, UK 1991.
- [46] G. MARSHALL: *Herbicide-Tolerant Crops - Real Farmer Opportunity or Potential Environmental Problem*, *Pestic. Sci.* **52** (1998) 394-402.

-
- [47] T. B. MOORMAN, K. E. KELLER: *Crop Resistance to Herbicides: Effects on Soil and Water Quality*, in: Herbicide-Resistant Crops, S. O. Duke (Hrsg.), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, USA 1996.
- [48] A. M. BLAIR, T. D. MARTIN: *A Review of the Activity, Fate and Mode of Action of Sulfonylurea Herbicides*, Pestic. Sci. **22** (1988) 195-219.
- [49] H. SEUNGHUN, L. L. S.: *Factors Controlling Sorption of Prosulfuron by Variable-Charge Soils and Model Sorbents*, J. Environ. Qual. **33** (2004) 1354-1361.
- [50] J. DEMEL, W. BUCHBERGER, H. J. MALISSA: *Multiclass/Multiresidue Method for Monitoring Widely Applied Plant Protecting Agents in Air During Field Dispersion Work*, J. Chromatogr. A **931** (2001) 107-117.
- [51] A. K. SARMAH, R. S. KOOKANA, A. M. ALSTON: *Fate and Behaviour of Triasulfuron, Metsulfuron-methyl, and Chlorsulfuron in the Australian Soil Environment: A Review*, Aust. J. Agric. Res. **49** (1998) 775-790.
- [52] A. K. SARMAH, J. SABADIE: *Hydrolysis of Sulfonylurea in Soils and Aqueous Solutions: A Review*, J. Agric. Food Chem. **50** (2002) 6253-6265.
- [53] E. M. BEYER, M. J. DUFFY, J. V. HAY, D. D. SCHLUETER: *Sulfonylureas*, in: Herbicide Chemistry, Degradation and Mode of Action, P. C. Kearney and D. D. Kaufman (Hrsg.), 117-189, Marcel Dekker Inc., New York, USA 1988.
- [54] J. K. LEE, F. FÜHR, J. W. KWON, K. C. AHN: *Long-Term Fate of the Herbicide Cinosulfuron in Lysimeters Planted with Rice over Four Consecutive Years*, Chemosphere **49** (2002) 173-181.
- [55] Y. LI, W. T. ZIMMERMAN, M. K. GORMAN, R. W. REISER, A. J. FOGIEL, H. P. E.: *Aerobic Soil Metabolism of Metsulfuron-methyl*, Pestic. Sci. **55** (1999) 434-445.
- [56] P. A. HARDER, D. P. O'KEEFE, J. A. ROMESSER, K. J. LETO, C. A. OMER: *Isolation and Characterization of Streptomyces griseolus Deletion Mutants Affected in Cytochrome P-450-Mediated Herbicide Metabolism*, Mol. Gen. Genet. **227** (1991) 238-244.
- [57] G. BOSCHIN, A. D'AGOSTINA, A. ARNOLDI, E. MAROTTA, E. ZANARDINI, M. NEGRI, A. VALLE, C. SORLINI: *Biodegradation of Chlorsulfuron and Metsulfuron-methyl by Aspergillus niger in Laboratory Conditions*, J. Environ. Sci. Health B **38** (2003) 737-746.

- [58] H. M. BROWN, M. M. JOSHI, A. T. VAN, T. H. CARSKI, J. J. DULKA, M. C. PATRICK, R. W. REISER, R. S. LIVINGSTON, J. DOUGHTY: *Degradation of Thifensulfuron-methyl in Soil: Role of Microbial Carboxyesterase Activity*, J. Agric. Food Chem. **45** (2001) 955-961.
- [59] S. M. ANDERSEN, P. B. HERTZ, T. HOLST, R. BOSSI, C. S. JACOBSEN: *Mineralisation Studies of ¹⁴C-Labelled Metsulfuron-methyl, Tribenuron-methyl, Chlorsulfuron and Thifensulfuron-methyl in one Danish Soil and Groundwater Sediment Profile*, Chemosphere **45** (2001) 775-782.
- [60] R. P. HULTGREN, R. J. M. HUDSON, G. K. SIMS: *Effects of Soil pH and Soil Water Content on Prosulfuron Dissipation*, J. Agric. Food Chem. **50** (2002) 3236-3243.
- [61] D. VEGA, J.-P. CAMBON, J. BASTIDE: *Triflusulfuron-methyl Dissipation in Water and Soil*, J. Agric. Food Chem. **48** (2000) 3733-3737.
- [62] E. HANTGE: *Herbizide in Gewässern und Kläranlagenablauf*, Wasser & Boden **50** (1998) 50-52.
- [63] W. A. BATTAGLIN, E. T. FURLONG, M. R. BURKHARDT, C. J. PETER: *Occurrence of Sulfonylurea, Sulfonamide, Imidazolinone and Other Herbicides in Rivers, Reservoirs and Ground Water in the Midwestern United States 1998*, Sci. Total Environ. **248** (2000) 123-133.
- [64] G. DINELLI, A. VICARI, A. BONETTI, P. CATIZONE: *Hydrolytic Dissipation of Four Sulfonylurea Herbicides*, J. Agric. Food Chem. **45** (1997) 1940-1945.
- [65] E. BEZEMER, S. RUTAN: *Study of the Hydrolysis of a Sulfonylurea Herbicide Using Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Mass Spectrometry by Three-Way Multivariate Curve Resolution - Alternating Least Squares*, Anal. Chem. **73** (2001) 4403-4409.
- [66] B. M. BERGER, N. L. WOLFE: *Hydrolysis and Biodegradation of Sulfonylurea Herbicides in Aqueous Buffers and Anaerobic Water-Sediment Systems: Assessing Fate Pathways Using Molecular Descriptors*, Environ. Toxicol. Chem. **15** (1996) 1500-1507.
- [67] W. STORZER: *Das Rückstandsverhalten neuer Herbizide in Kulturpflanzen*, Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. **54** (2002) 193-203.
- [68] A. HOLZMANN, J. PLEKAT: EU-Beurteilungsbericht Azimsulfuron (Band D 2), Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig 2000.

- [69] H. BRUNO, S. SCHAPER: EU-Beurteilungsbericht Flupyrsulfuron-methyl (Band D 29), Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig 2002.
- [70] H. BRUNO, J. PLEKAT: EU-Beurteilungsbericht Metsulfuron-methyl (Band D 8), Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig 2000.
- [71] H. BRUNO, S. SCHARPER: EU-Beurteilungsbericht Prosulfuron (Band D 37), Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig 2002.
- [72] H. BRUNO, S. SCHARPER: EU-Beurteilungsbericht Sulfosulfuron (Band D 40), Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig 2002.
- [73] M. ERDTMANN-VOURLIOTIS, S. SCHARPER: EU-Beurteilungsbericht Thifensulfuron-methyl (Band D 28), Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig 2002.
- [74] H. BRUNO, E. LESKE: EU-Beurteilungsbericht Triasulfuron (Band D11), Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig 2001.
- [75] C. E. HEALY, W. F. HEYDENS, M. W. NAYLOR: *Mammalian Toxicology Overview and Human Risk Assessment for Sulfosulfuron*, Regul. Toxicol. Pharm. **39** (2004) 310-324.
- [76] N. CEDERGREEN, J. C. STREIBIG, N. H. SPLIID: *Sensitivity of Aquatic Plants to the Herbicide Metsulfuron-methyl*, Ecotox. Environ. Safe. **57** (2004) 153-161.
- [77] J. DAVIES, J. L. HONEGGER, F. G. TAENCALLA, G. MEREGALLI, P. BRAIN, J. R. NEWMAN, H. F. PITCHFORD: *Herbicide Risk Assessment for Non-Target Aquatic Plants: Sulfosulfuron - a Case Study*, Pest Manag. Sci. **59** (2003) 231-237.
- [78] G. M. FAHL, L. KREFT, R. ALTENBURGER, M. FAUST, W. BOEDEKER, L. H. GRIMME: *pH-Dependent Sorption, Bioconcentration and Algal Toxicity of Sulfonyl-urea Herbicides*, Aquat. Toxicol. **31** (1995) 175-187.
- [79] C. SABATER, A. CUESTA, R. CARRASCO: *Effects of Bensulfuron-methyl and Cinosulfuron on Growth of Freshwater Species of Phytoplankton*, Chemosphere **46** (2002) 953-960.
- [80] R. F. DIETRICH, R. W. REISER, B. STIEGLITZ: *Identification of Microbial and Rat Metabolites of Triflusulfuron-methyl, a New Sugar Beet Herbicide*, J. Agric. Food Chem. **43** (1995) 531-536.

- [81] *Richtlinie des Rates vom 15.07.1991 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln (91/414/EWG)*, ABl. Nr. L 230 vom 19.08.1991.
- [82] *BBA: Die Zulassung von Pflanzenschutzmitteln in Deutschland*, http://www.bba.de/ap/ap_psm/psmzul.htm.
- [83] H.-P. THIER, H. FREHSE: Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1986.
- [84] *BfR: Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffe: ADI-Werte und gesundheitliche Trinkwasser-Leitwerte*, <http://www.bgvv.de/cm/218/pflanzenschutzmittel-wirkstoffe.pdf>.
- [85] H.-P. THIER, J. KIRCHHOFF: Manual of Pesticide Residue Analysis, Volume I + II, VCH Verlag, Weinheim 1992.
- [86] *Probenahmeverfahren zur Kontrolle der Einhaltung der zulässigen Höchstwerte (Maximum Residue Levels - MRLS) für Pestizidrückstände in und auf Erzeugnissen pflanzlichen und tierischen Ursprungs, L 00.00-7 (EG)*, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Beuth Verlag, Berlin 2002.
- [87] *Europäische Norm EN 25667-2, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlamm-Untersuchung, Band I*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2002.
- [88] M. C. HENNION: *Solid-Phase Extraction: Method Development, Sorbents, and Coupling with Liquid Chromatography*, J. Chromatogr. A **856** (1999) 3-54.
- [89] S. GUENU, M.-C. HENNION: *Evaluation of New Polymeric Sorbents with High Specific Surface Areas Using an On-Line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatographic System for the Trace-Level Determination of Polar Pesticides*, J. Chromatogr. A **737** (1996) 15-24.
- [90] R. A. M. VAN DER HOEVEN, A. J. P. HOFTE, M. FRENAY, H. IRTH, U. R. TJADEN, J. VAN DER GREEF, K.-S. BOOS, G. M. VARGA, L. E. EDHOLM: *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry with On-Line Solid Phase Extraction by a Restricted-Access C18 Precolumn for Direct Plasma and Urine Injection*, J. Chromatogr. A **762** (1997) 193-200.
- [91] S. SOUVERAIN, S. RUDAZ, J.-L. VEUTHEY: *Restricted Access Materials and Large Particle Supports for On-Line Sample Preparation: An Attractive Approach for Biological Fluids Analysis*, J. Chromatogr. B **801** (2004) 141-156.
- [92] F. E. AHMED: *Analyses of Pesticides and their Metabolites in Foods and Drinks*, Trends Anal. Chem. **20** (2001) 649-661.

- [93] S. A. BARKER: *Applications of Matrix Solid-Phase Dispersion in Food Analysis*, J. Chromatogr. A **880** (2000) 63-68.
- [94] Q.-Z. ZHU, P. DEGELMANN, R. NIESSNER, D. KNOPP: *Selective Trace Analysis of Sulfonylurea Herbicides in Water and Soil Samples Based on Solid-Phase Extraction Using a Molecularly Imprinted Polymer*, Environ. Sci. Technol. **36** (2002) 5411-5420.
- [95] T. BERGLOF, W. C. KOSKINEN, H. KYLIN: *Supercritical Fluid Extraction of Metsulfuron-methyl, Sulfometuron-methyl, and Nicosulfuron from Soil*, Int. J. Environ. Anal. Chem. **70** (1998) 37-45.
- [96] L. R. BETZ, G. A. ANDERSON, M. E. McNALLY: *Supercritical Fluid Extraction of Sulfonylureas from Aqueous Matrices*, J. Environ. Sci. Health B **34** (1999) 171-192.
- [97] E. A. HOGENDOORN, R. HULS, E. DIJKMAN, R. HOOGERBRUGGE: *Microwave Assisted Solvent Extraction and Coupled-Column Reversed-Phase Liquid Chromatography with UV Detection. Use of Analytical Restricted-Access-Medium Column for the Efficient Multi-Residue Analysis of Acidic Pesticides in Soils*, J. Chromatogr. A **938** (2001) 23-33.
- [98] J.-F. LIU, J.-B. CHAO, G.-B. JIANG: *Continuous Flow Liquid Membrane Extraction: A Novel Automatic Trace-Enrichment Technique Based on Continuous Flow Liquid-Liquid Extraction Combined with Supported Liquid Membrane*, Anal. Chim. Acta **455** (2002) 93-101.
- [99] I. AHMAD, G. CRAWFORD: *Trace Residue Analysis of the Herbicide Chlorsulfuron in Soil by Gas Chromatography-Electron Capture Detection*, J. Agric. Food Chem. **38** (1990) 138-141.
- [100] P. KLAFFENBACH, P. T. HOLLAND, D. R. LAUREN: *Analysis of Sulfonylurea Herbicides by Gas-Liquid Chromatography. 1. Formation of Thermostable Derivatives of Chlorsulfuron and Metsulfuron-methyl*, J. Agric. Food Chem. **41** (1993) 388-395.
- [101] P. KLAFFENBACH, P. T. HOLLAND: *Analysis of Sulfonylurea Herbicides by Gas-Liquid Chromatography. 2. Determination of Chlorsulfuron and Metsulfuron-methyl in Soil and Water Samples*, J. Agric. Food Chem. **41** (1993) 396-401.
- [102] E. G. COTTERILL: *Determination of the Sulfonylurea Herbicides Chlorsulfuron and Metsulfuron-methyl in Soil, Water and Plant Material by Gas Chromatography of their Pentafluorobenzyl Derivatives*, Pestic. Sci. **34** (1992) 291-296.

- [103] E. W. ZAHNOW: *Analysis of the Herbicide Chlorsulfuron in Soil by Liquid Chromatography*, J. Agric. Food Chem. **30** (1982) 854-857.
- [104] E. W. ZAHNOW: *Analysis of the Herbicide Sulfometuron-methyl in Soil and Water by Liquid Chromatography*, J. Agric. Food Chem. **33** (1985) 479-483.
- [105] A. E. SMITH: *A Review of Analytical Methods for Sulfonylurea Herbicides in Soil*, Intern. J. Environ. Anal. Chem. **59** (1995) 97-106.
- [106] V. R. MEYER: Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, Salle und Sauerländer Verlag, Frankfurt am Main 1999.
- [107] E. W. ZAHNOW: *Analysis of the Herbicide Sulfometuron-methyl in Fish and Green Plants by Liquid Chromatography*, J. Agric. Food Chem. **33** (1985) 1206-1208.
- [108] H. BERRADA, G. FONT, J. C. MOLTÓ: *Determination of Urea Pesticide Residues in Vegetable, Soil and Water Samples*, Crit. Rev. Anal. Chem. **33** (2003) 19-41.
- [109] A. C. BAREFOOT, J. C. STRAHAN, C. R. POWLEY, L. M. SHALABY: *Analytical Methods for Sulfonylureas in Environmental Samples*, Brighton Crop Protection Conference - Weeds **2** (1995) 707-712.
- [110] C. R. POWLEY, P. A. DE BERNARD: *Screening Method for Nine Sulfonylurea Herbicides in Soil and Water by Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection*, J. Agric. Food Chem. **46** (1998) 514-519.
- [111] G. C. GALLETTI, A. BONETTI, D. GIOVANNI: *High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Sulfonylureas in Soil and Water*, J. Chromatogr. A **692** (1995) 27-37.
- [112] J. L. BERNAL, J. J. JIMÉNEZ, A. HERGUEDAS, J. ATIENZA: *Determination of Chlorsulfuron and Tribenuron-methyl Residues in Agricultural Soils*, J. Chromatogr. A **778** (778) 119-125.
- [113] N. FONT, F. HERNÁNDEZ, E. A. HOGENDOORN, R. A. BAUMANN, P. VAN ZONEN: *Microwave-Assisted Solvent Extraction and Reversed-Phase Liquid Chromatography-UV Detection for Screening Soils for Sulfonylurea Herbicides*, J. Chromatogr. A **798** (1998)
- [114] J.-F. LIU, J.-B. CHAO, G.-B. JIANG, Y.-Q. CAI, J.-M. LIU: *Trace Analysis of Sulfonylurea Herbicides in Water by On-Line Continuous Flow Liquid Membrane Extraction-C18 Precolumn Liquid Chromatography with Ultraviolet Absorbance Detection*, J. Chromatogr. A **995** (2003) 21-28.

- [115] M. ZHOU, G.-Y. LI, S. A. WHALEN: *Determination of Metsulfuron-methyl and its Two Metabolites in Crops by Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection*, J. AOAC Int. **77** (1994) 1654-1659.
- [116] M. ZHOU, F. Q. BRAMBLE, T. J. DEVINE, G. I. NORWOOD: *Determination of Bensulfuron-methyl in Rice and Crayfish by Liquid Chromatography with a Column- and Eluate-Switching System and UV Detection*, J. AOAC Int. **79** (1996) 791-796.
- [117] R. FISCHER, R. HÄNEL, J. SIEBERS: *Rückstandsanalytik neuer Pflanzenschutzmittelwirkstoffe, 4. Mitteilung: Dimethenamid, Flufenacet, Flurtamone, Primisulfuron-methyl, Tebufenozid*, Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. **51** (1999) 105-114.
- [118] J. SIEBERS, R. FISCHER, R. HÄNEL: *Rückstandsanalytik neuer Pflanzenschutzmittelwirkstoffe, 6. Mitteilung: Azadirachtin (Neem), Carfentrazone, Fenhexamid, Flupyrsulfuron, Isoxaflutol*, Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. **52** (2000) 73-81.
- [119] R. HÄNEL, R. FISCHER, J. SIEBERS: *Rückstandsanalytik neuer Pflanzenschutzmittelwirkstoffe, 7. Mitteilung: Cinidon, Famoxadone, Florasulam, Iodosulfuron, Metconazol*, Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. **53** (2001) 1-10.
- [120] S. ISHIMITSU, A. KAIHARA, K. YOSHII, Y. TSUMURA, Y. NAKAMURA, Y. TONOGAI: *Simultaneous Determination of Azimsulfuron, Flazasulfuron and Halosulfuron-methyl in Grains, Seeds, Vegetables and Fruits by HPLC*, J. Health Sci. **48** (2002) 335-340.
- [121] A. R. LONG, L. C. HSIEH, M. S. MALBROUGH, C. R. SHORT, S. A. BARKER: *Isolation and Gas Chromatographic Determination of Chlorsulfuron in Milk*, J. Assoc. Off. Anal. Chemists **72** (1989) 813-815.
- [122] S. A. BARKER: *Matrix Solid-Phase Dispersion*, LC-GC Int. **5** (1998) 1-4.
- [123] I.-A. MÜLLER, U. WACHT: *Analytik von Sulfonylharnstoff-Herbiziden in Wasser mit der Ionenpaarchromatographie*, in: Vom Wasser, F. W. i. d. GDCh (Hrsg.), 305-320, VCH Verlag, Weinheim 1997.
- [124] L. J. MAREK, C. WILLIAM: *LC-MS Analysis of Polar Pesticides in Soil*, Am. Environ. Lab. **9** (1997) 26-28.
- [125] E. M. THURMAN, I. FERRER, D. BARCELÓ: *Choosing between Atmospheric Pressure Chemical Ionization and Electrospray Ionization Interfaces for HPLC/MS Analysis of Pesticides*, Anal. Chem. **73** (2001) 5441-5449.

- [126] S. D. RICHARDSON: *Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues*, Anal. Chem. **74** (2002) 2719-2742.
- [127] L. J. MAREK, W. C. KOSKINEN: *LC/MS Analysis of 4-Methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl-Containing Sulfonylurea Herbicides in Soil*, J. Agric. Food Chem. **44** (1996) 3878-3881.
- [128] A. DI CORCIA, C. CRESCENZI, R. SAMPERI, L. SCAPPATICCIO: *Trace Analysis of Sulfonylurea Herbicides in Water: Extraction and Purification by a Carbograph 4 Cartridge, Followed by Liquid Chromatography with UV Detection, and Confirmatory Analysis by an Electrospray/Mass Detector*, Anal. Chem. **69** (1997) 2819-2826.
- [129] M. RODRIGUEZ, D. B. ORESCAN: *Confirmation and Quantitation of Selected Sulfonylurea, Imidazolinone, and Sulfonamide Herbicides in Surface Water Using Electrospray LC/MS*, Anal. Chem. **70** (1998) 2710-2717.
- [130] G. D'ASCENZO, A. GENTILI, S. MARCHESE, A. MARINO, D. PERRET: *Multiresidue Method for Determination of Post-Emergence Herbicides in Water by HPLC/ESI/MS in Positive Ionization Mode*, Environ. Sci. Technol. **32** (1998) 1340-1347.
- [131] K. DOST, D. A. JONES, R. AUERBACH, G. DAVIDSON: *Determination of Pesticides in Soil Samples by Supercritical Fluid Chromatography - Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Mass Spectrometric Detection*, Analyst **125** (2000) 1751-1755.
- [132] A. DI CORCIA, M. NAZZARI, R. RAO, R. SAMPERI, E. SEBASTIANI: *Simultaneous Determination of Acidic and Non-Acidic Pesticides in Natural Water by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, J. Chromatogr. A **878** (2000) 87-98.
- [133] E. T. FURLOG, M. R. BURKHARDT, P. M. GATES, S. L. WERNER, W. A. BATTAGLIN: *Routine Determination of Sulfonylurea, Imidazoline, and Sulfonamide Herbicides at Nanogram-per-Liter Concentrations by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*, Sci. Total Environ. **248** (2000) 135-146.
- [134] B. H. CLOWERS, W. E. STEINER, H. M. DION, L. M. MATZ, M. TAM, E. E. TARVER, H. H. HILL: *Evaluation of Sulfonylurea Herbicides Using High Resolution Electrospray Ionization Ion Mobility Quadrupole Mass Spectrometry*, Field Anal. Chem. Technol. **5** (2001) 302-312.

- [135] E. AYANO, H. KANAZAWA, M. ANDO, T. NISHIMURA: *Determination and Quantitation of Sulfonylurea and Urea Herbicides in Water Samples Using Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Mass Spectrometric Detection*, Anal. Chim. Acta **507** (2004) 211-218.
- [136] R. CARABIAS-MARTINEZ, E. RODRIGUEZ-GONZALO, E. HERRERO-HERNANDEZ, J. HERNANDEZ-MENDEZ: *Simultaneous Determination of Phenyl- and Sulfonylurea Herbicides in Water by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with UV Diode Array or Mass Spectrometric Detection*, Anal. Chim. Acta **517** (2004) 71-79.
- [137] L. Y. T. LI, D. A. CAMPBELL, P. K. BENNETT, J. HENION: *Acceptance Criteria for Ultratrace HPLC-Tandem Mass Spectrometry: Quantitative and Qualitative Determination of Sulfonylurea Herbicides in Soil*, Anal. Chem. **68** (1996) 3397-3404.
- [138] B. KOPPEN, N. H. SPLIID: *Determination of Acidic Herbicides Using Liquid Chromatography with Pneumatically Electrospray Ionization Mass Spectrometric and Tandem Mass Spectrometric Detection*, J. Chromatogr. A **803** (1998) 157-168.
- [139] R. BOSSI, K. VEJRUP, C. S. JACOBSEN: *Determination of Sulfonylurea Degradation Products in Soil by Liquid Chromatography-Ultraviolet Detection Followed by Confirmatory Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, J. Chromatogr. A **855** (1999) 575-582.
- [140] A. LAGANÀ, G. FAGO, A. MARINO, V. M. PENAZZI: *Liquid Chromatography Mass Spectrometry Tandem for Multiresidue Determination of Selected Post-Emergence Herbicides after Soil Column Extraction*, Anal. Chim. Acta **415** (2000) 41-56.
- [141] F. HERNÁNDEZ, J. V. SANCHO, O. POZO, A. LARA, E. PITARCH: *Rapid Direct Determination of Pesticides and Metabolites in Environmental Water Samples at Sub- $\mu\text{g/L}$ Level by On-Line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry*, J. Chromatogr. A **939** (2001) 1-11.
- [142] J. J. STRY, J. S. AMOO, S. W. GEORGE, T. HAMILTON-JOHNSON, E. STETSER: *Coupling of Size-Exclusion Chromatography to Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for Determination of Trace Levels of Thifensulfuron-methyl and Tribenuron-methyl in Cottonseed and Cotton Gin Trash*, J. AOAC Int. **83** (2000) 651-659.
- [143] J. KLEIN, L. ALDER: *Applicability of Gradient Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry for the Simultaneous Screening of about 100 Pesticides in Crops*, J. AOAC Int. **86** (2003) 1015-1037.

- [144] P. R. TILLER, A. P. LAND, I. JARDINE, D. M. MURPHY, R. SOZIO, A. AYRTON, W. H. SCHAEFER: *Application of Liquid Chromatography - Mass Spectrometry Analyses to the Characterization of Novel Glyburide Metabolites Formed in Vitro*, J. Chromatogr. A **794** (1998) 15-25.
- [145] F. MAGNI, L. MARAZZINI, S. PEREIRA, L. MONTI, M. G. KIENLE: *Identification of Sulfonylureas in Serum by Electrospray Mass Spectrometry*, Anal. Biochem. **282** (2000) 136-141.
- [146] R. LOOS, R. NIESSNER: *Analysis of Atrazine, Terbutylazine and their N-Dealkylated Chloro and Hydroxy Metabolites by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Capillary Electrophoresis-Ultraviolet Detection*, J. Chromatogr. A **835** (1999) 217-229.
- [147] F. MENZINGER, P. SCHMITT-KOPPLIN, D. FREITAG, A. KETTRUP: *Analysis of Agrochemicals by Capillary Electrophoresis*, J. Chromatogr. A **891** (2000) 45-67.
- [148] D. T. EASH, R. J. BUSHWAY: *Herbicide and Plant Growth Regulator Analysis by Capillary Electrophoresis*, J. Chromatogr. A **880** (2000) 281-294.
- [149] G. DINELLI, A. VICARI, A. BONETTI: *Separation of Sulfonylurea Metabolites in Water by Capillary Electrophoresis*, J. Chromatogr. A **700** (1995) 195-200.
- [150] B. M. BERGER, N. L. WOLFE: *Multiresidue Determination of Sulfonylurea Herbicides by Capillary Electrophoresis for Hydrolysis Studies in Water and Sediments*, Fresenius J. Anal. Chem. **356** (1996) 508-511.
- [151] H. HICKES, M. WATROUS: *Multiresidue Method for Determination of Sulfonylurea Herbicides in Water by Liquid Chromatography with Confirmation by Capillary Electrophoresis*, J. AOAC Int. **82** (1999) 1523-1533.
- [152] G. DINELLI, A. VICARI, V. BRANDOLINI: *Detection and Quantitation of Sulfonylurea Herbicides in Soil at the ppb Level by Capillary Electrophoresis*, J. Chromatogr. A **700** (1995) 201-207.
- [153] H. J. MENNE, K. JANOWITZ, B. M. BERGER: *Comparison of Capillary Electrophoresis and Liquid Chromatography for Determination of Sulfonylurea Herbicides in Soil*, J. AOAC Int. **82** (1999) 1534-1541.
- [154] A. J. KRYNITSKY, D. M. SWINEFORD: *Determination of Sulfonylurea Herbicides in Grain by Capillary Electrophoresis*, J. AOAC Int. **78** (1995) 1091-1096.

- [155] F. GARCIA, J. HENION: *Fast Capillary Electrophoresis - Ion Spray Mass Spectrometric Determination of Sulfonylureas*, J. Chromatogr. A **606** (1992) 237-247.
- [156] A. J. KRYNITSKY: *Determination of Sulfonylurea Herbicides in Water by Capillary Electrophoresis and by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*, J. AOAC Int. **80** (1997) 392-400.
- [157] M. M. KELLEY, E. W. ZAHNOW, W. C. PETERSEN, S. T. TOY: *Chlorsulfuron Determination in Soil Extracts by Enzyme Immunoassays*, J. Agric. Food Chem. **33** (1985) 962-965.
- [158] E. V. YAZYNINA, A. V. ZHERDEV, S. A. EREMIN, V. A. POPOVA, B. B. DZANTIEV: *Development of Enzyme Immunoassays for the Herbicide Chlorsulfuron*, Appl. Biochem. Microbiol. **38** (2002) 14-19.
- [159] S. A. EREMIN, I. A. RAYABOVA, J. N. YAKOVLEVA, E. V. YAZYNINA, A. V. ZHERDEV, B. B. DZANTIEV: *Development of a Rapid, Specific Fluorescence Polarization Immunoassay for the Herbicide Chlorsulfuron*, Anal. Chim. Acta **468** (2002) 229-236.
- [160] J.-M. SCHLAEPPI, K. RAMSTEINER, W. MEYER: *Immunologisches Nachweisverfahren für Triasulfuron*, European Patent Office, EP 0463998, CH 1991.
- [161] J.-M. SCHLAEPPI, W. MEYER, K. A. RAMSTEINER: *Determination of Triasulfuron in Soil by Monoclonal Antibody-Based Enzyme Immunoassay*, J. Agric. Food Chem. **40** (1992) 1093-1098.
- [162] J.-M. SCHLAEPPI, A. KESSLER, W. FÖRY: *Development of a Magnetic Particle-Based Automated Chemiluminescent Immunoassay for Triasulfuron*, J. Agric. Food Chem. **42** (1994) 1914-1919.
- [163] J. F. BRADY, J. TURNER, D. H. SKINNER: *Application of a Triasulfuron Enzyme Immunoassay to the Analysis of Incurred Residues in Soil and Water Samples*, J. Agric. Food Chem. **43** (1995) 2542-2547.
- [164] R. GHILDYAL, M. KARLOFILLIS: *Polyclonal Antibody-Based ELISA for Triasulfuron*, Bull. Environ. Contam. Toxicol. **54** (1995) 647-653.
- [165] *EnviroGard: Triasulfuron/Metsulfuron-methyl Plate Kit (74700/74600)*, STRATEGIC DIAGNOSTICS INC., Newark, Delaware, USA 1998.
- [166] E. SIMON, D. KNOPP, P. BOU CARRASCO, R. NIESSNER: *Development of an Enzyme Immunoassay for Metsulfuron-methyl*, Food Agric. Immunol. **10** (1998) 105-120.

- [167] K. L. HOLLAWAY, R. S. KOOKANA, D. J. MCQUINN, M. R. MOERKERK, D. M. NOY, M. A. SMAL: *Comparison of Sulfonylurea Herbicide Residue Detection in Soil by Bioassay, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and HPLC*, Weed Res. **39** (1999) 383-397.
- [168] A. KNOPP, D. KNOPP, R. NIESSNER: *ELISA Determination of the Sulfonylurea Herbicide Metsulfuron-methyl in Different Water Types*, Environ. Sci. Technol. **33** (1999) 358-361.
- [169] E. WELZIG, H. PICHLER, R. KRŠKA, D. KNOPP, R. NIESSNER: *Development of a Enzyme Immunoassay for the Determination of the Herbicide Metsulfuron-methyl Based on Chicken Egg Yolk Antibodies*, Intern. J. Environ. Anal. Chem. **78** (2000) 279-288.
- [170] J. K. LEE, K. C. AHN, O. S. PARK, Y. K. KO, D.-W. KIM: *Development of an Immunoassay for the Residues of the Herbicide Bensulfuron-methyl*, J. Agric. Food Chem. **50** (2002) 1791-1803.
- [171] V. KOLÁR, A. DENG, M. FRÁNEK: *Production and Characterization of Generic Antibodies Against s-Triazine and Sulfonylurea Herbicides*, Food Agric. Immunol. **14** (2002) 91-105.
- [172] J. STRAHAN: *Development and Application of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for the Determination of Multiple Sulfonylurea Herbicides on the Same Microwell Plate*, in: Environmental Immunochemical Methods, J. M. Van Emon, C. L. Gerlach and J. L. Johnson (Hrsg.), 65-73, ACS Symposium Series, Washington, DC 1996.
- [173] K. H. CAMMANN: Instrumentelle Analytische Chemie, Spektrum Verlag, Heidelberg 2001.
- [174] E. LIDDELL, I. WEEKS: Antikörper-Techniken, Spektrum Verlag, Heidelberg 1995.
- [175] I. M. ROITT: Leitfaden der Immunologie, Blackwell, Berlin 1993.
- [176] H. REHM: Proteinchemie, Proteomics, Spektrum Verlag, Heidelberg 2000.
- [177] L. STREYER: Biochemie, Spektrum Verlag, Heidelberg 1991.
- [178] M. ERHARD, J. KELLNER, R. KÜHLMANN, U. LÖSCH: *Influence of Various Adjuvants on the Synthesis of Specific Antibodies of Chicken, Sheep, and Rabbit Following Immunization with a Hapten*, J. Vet. Med. A **38** (1991) 21-27.

- [179] G. KÖHLER, C. MILSTEIN: *Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity*, Nature **256** (1975) 495-497.
- [180] C. MILSTEIN: *Monoklonale Antikörper*, in: Immunsystem: Abwehr und Selbsterkennung auf molekularem Niveau, G. Köhler and K. Eichmann (Hrsg.), 88-97, Spektrum der Wissenschaft Verlag, Heidelberg 1988.
- [181] J. MAYNARD, G. GEORGIU: *Antibody Engineering*, Annu. Rev. Biomed. Eng. **2** (2000) 339-376.
- [182] K. Y. F. YAU, H. LEE, J. C. HALL: *Emerging Trends in the Synthesis and Improvement of Hapten-Specific Recombinant Antibodies*, Biotechnol. Adv. **21** (2003) 599-627.
- [183] A. SKERRA: *"Anticalins": A New Class of Engineered Ligand-Binding Proteins with Antibody-Like Properties*, Rev. Mol. Biotechnol. **74** (2001) 257-275.
- [184] S. SCHLEHUBER, A. SKERRA: *Tuning Ligand Affinity, Specificity and Folding Stability of an Engineered Lipocalin - A So-Called "Anticalin" - Using a Molecular Random Approach*, Biophys. Chem. **96** (2002) 213-228.
- [185] K. LANDSTEINER, J. VAN DER SCHEER: *Serological Differentiation of Steric Isomers*, J. Exp. Med. **18** (1928) 315-320.
- [186] R. S. YALOW, S. A. BERSON: *Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods*, Nature **184** (1959) 1648-1649.
- [187] E. ENGVALL, P. PERLMANN: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): Quantitative Assay of Immunoglobulin G*, Immunochemistry **8** (1971) 871-874.
- [188] B. K. VAN WEEMEN, A. H. W. M. SCHUURS: *Immunoassay Using Antigen-Enzyme Conjugates*, FEBS Lett. **15** (1971) 232-236.
- [189] T. PORSTMANN, S. T. KIESSING: *Enzyme Immunoassay Techniques. An Overview*, J. Immunol. Methods **150** (1992) 5-22.
- [190] B. D. HAMMOCK, R. O. MUMMA: *Potential of Immunological Technology for Pesticide Analysis*, in: Pesticide Analytical Methodology, J. Harvey and G. Zweig (Hrsg.), 321-351, American Chemical Society, Washington, DC 1980.
- [191] A. DANKWARDT: *Immunochemical Assays in Pesticide Analysis*, in: Encyclopedia of Analytical Chemistry, R. A. Meyers (Hrsg.), 6318-6344, John Wiley & Sons Ltd., Chichester 2000.

- [192] J. A. GABALDÓN, A. MAQUIEIRA, R. PUCHADES: *Current Trends in Immunoassay-Based Kits for Pesticide Analysis*, Crit. Rev. Food Sci. Nutri. **39** (1999) 519-538.
- [193] P. LEPOM: *Qualitätsanforderungen an alternative Analysenverfahren für Monitoring- und Überwachungsprogramme am Beispiel von Immunoassays*, in: Ermittlung atmosphärischer Stoffeinträge in den Boden, L. f. U. Baden-Württemberg (Hrsg.), 95-104, Engelhardt & Bauer Verlag, Karlsruhe 1996.
- [194] D. KNOPP, R. NIESSNER: *Einsatz von Immunoassays in der Umweltanalytik*, in: Ermittlung atmosphärischer Stoffeinträge in den Boden, L. f. U. Baden-Württemberg (Hrsg.), 95-104, Engelhardt & Bauer Verlag, Karlsruhe 1996.
- [195] J. L. RICHARD, K. FLEETWOOD: *Current Trends in Mycotoxin Analysis*, Food Safety Magazine **7** (2002) 18-21.
- [196] A. ZECK, A. EIKENBERG, M. G. WELLER, R. NIESSNER: *Highly Sensitive Immunoassay Based on a Monoclonal Antibody Specific for [4-Arginine]microcystins*, Anal. Chim. Acta **441** (2001) 1-13.
- [197] R. C. BEIER, L. H. STANKER: *Application of Immunoassay for Detection in Foods and Feed: A Review*, Recent Res. Dev. Agric. Food Chem. **4** (2000) 59-93.
- [198] P. P. McDONALD, R. E. ALMOND, J. P. MAPES, S. B. FRIEDMAN: *PAH RIS Soil Test - A Rapid, On-Site Screening Test for Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Soil*, J. AOAC Int. **77** (1994) 466-472.
- [199] D. KNOPP, R. NIESSNER: *Biomonitoring Based on Immunological Principles*, in: Solid Waste: Assessment, Monitoring and Remediation, I. Twardowska, H. E. Allen, A. A. F. Kettrup and W. J. Lacy (Hrsg.), 505-537, Elsevier Verlag, Heidelberg 2004.
- [200] D. Y. C. FUNG: *Predictions For Rapid Methods and Automation in Food Microbiology*, J. AOAC Int. **85** (2002) 1000-1002.
- [201] D. L. BRANDON, M. FRIEDMAN: *Immunoassays of Soy Proteins*, J. Agric. Food Chem. **50** (2002) 6635-6642.
- [202] G. GREMAUD, S. KARLEN, K. HULLINGER: *Analytical Methods for the Authentication of Meat and Meat Products: Recent Developments*, Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **93** (2002) 481-501.
- [203] H. A. MOYE: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, in: Chemical Analysis: Pesticide Residues in Foods, J. D. Winefordner (Hrsg.), 211-248, John Wiley & Sons, Inc., New York 1999.

- [204] B. HOCK, R. NIESSNER: Immunochemical Detection of Pesticides and their Metabolites in the Water Cycle, VCH Verlag, Weinheim 1995.
- [205] J. N. MILLER, R. NIESSNER, D. KNOPP: *Enzyme and Immunoassays*, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, H. Pelc, B. Elvers and S. Hawkins (Hrsg.), 27-54, Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2002.
- [206] P. D. JOSEPHY, T. ELING, R. P. MASON: *The Horseradish Peroxidase-Catalyzed Oxidation of 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine - Free Radical and Charge Transfer Complex Intermediates*, J. Biol. Chem. **257** (1982) 3669-3675.
- [207] R. A. DUDLEY, P. EDWARDS, R. P. EKINS, D. J. FINNEY, I. G. M. MCKENZIE, G. M. RAAB, D. RODBARD, R. P. C. RODGERS: *Guidelines for Immunoassay Data Processing*, Clin. Chem. **31** (1985) 1264-1271.
- [208] G. SCATCHARD: *The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions*, Ann. N. Y. Acad. Sci. **51** (1949) 660-672.
- [209] M. G. WELLER: *Strukturelle und kinetische Untersuchungen zur Entwicklung und Optimierung von Hapten-Enzymimmunoassays (ELISAs) am Beispiel der Bestimmung von Triazinherbiziden*, Dissertation, TU München 1992.
- [210] M. ADAMCZYK, J. A. MOORE, Z. YU: *Application of Surface Plasmon Resonance toward Studies of Low-Molecular-Weight Antigen-Antibody Binding Interactions*, Methods **20** (2000) 319-328.
- [211] W. M. MULLETT, E. P. C. LAI, J. M. YEUNG: *Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassays*, Methods **22** (2000) 77-91.
- [212] P. P. DILLON, S. J. DALY, A. J. KILLARD, R. O'KENNEDY: *Development and Use of Antibodies in Surface Plasmon Resonance-Based Immunosensors for Environmental Monitoring*, Intern. J. Environ. Anal. Chem. **83** (2003) 525-543.
- [213] G. E. ABRAHAM: *Solid-Phase Radioimmunoassay of Estradiol-17 β* , J. Clin. Endocr. Metab. **29** (1969) 866-870.
- [214] M. F. M. JOHNSTON, H. N. EISEN: *Cross-Reactions Between 2,4-Dinitrophenyl and Menadione (Vitamin K3) and the General Problem of Antibody Specificity*, J. Immunol. **117** (1976) 1189-1196.
- [215] J. A. BERZOFSKY, A. N. SCHECHTER: *The Concept of Crossreactivity and Specificity in Immunology*, Mol. Immunol. **18** (1981) 751-763.

-
- [216] C. A. SPRINKS: *Broad-Specificity Immunoassay of Low Molecular Weight Food Contaminants: New Paths to Utopia*, Trends Food Sci. Tech. **11** (2000) 210-217.
- [217] J. M. VAN EMON, C. L. GERLACH: *Environmental Monitoring and Human Exposure Assessment Using Immunochemical Techniques*, J. Microbiol. Meth. **32** (1998) 121-131.
- [218] J. M. VAN EMON, C. L. GERLACH, K. BOWMAN: *Bioseparation and Bioanalytical Techniques in Environmental Monitoring*, J. Chromatogr. B **715** (1998) 211-228.
- [219] D. S. HAGE: *Survey of Recent Advantages in Analytical Applications of Immunoaffinity Chromatography*, J. Chromatogr. B **715** (1998) 3-28.
- [220] V. PICHON, M. BOUZIGE, C. MIÈGE, M.-C. HENNION: *Immunsorbents: Natural Molecular Recognition Materials for Sample Preparation of Complex Environmental Matrices*, Trends Anal. Chem. **18** (1999) 219-235.
- [221] M. G. WELLER: *Immunochemical Techniques - A Critical Review*, Frese-
nius J. Anal. Chem. **366** (2000) 635-645.
- [222] N. DELAUNAY-BERTONICINI, V. PICHON, M.-C. HENNION: *Immunoextraction: A Highly Selective Method for Sample Preparation*, LC-GC Europe **11** (2001) 162-172.
- [223] H. P. LATSCHA, G. SCHILLING, H. A. KLEIN: Chemie-Datensammlung, Springer Verlag, Berlin 1990.
- [224] R. JEFFERIS, I. DEVERILL: *The Antigen Antibody Reaction*, in: Principles and Practice of Immunoassay, C. P. Price and D. J. Newman (Hrsg.), 1-18, Macmillan Publishers Ltd., Basingstoke, GB 1991.
- [225] C. J. VAN OSS: *Hydrophobic and Hydrophilic Interactions in Antigen-Antibody Binding*, Int. J. Bio-Chrom. **3** (1997) 1-8.
- [226] J.-L. PELLEQUER, B. ZHAO, H.-I. KAO, C. W. BELL, K. LI, Q. X. LI, A. E. KARU, V. A. ROBERTS: *Stabilization of Bound Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a π -Kation Interaction*, J. Mol. Biol. **302** (2000) 691-699.
- [227] E. FISCHER: *Einfluss der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme*, Ber. Dtsch. Chem. Ges. **27** (1894) 2985-2993.

- [228] A. SUBRAMANIAN: *Immunoaffinity Chromatography*, in: Affinity Chromatography, P. Bailon, G. K. Ehrlich, W.-J. Fung and W. Berthold (Hrsg.), 95-104, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey 2000.
- [229] J. W. EVELEIGH, D. E. LEVY: *Immunochemical Characteristics and Preparative Application of Agarose-Based Immunosorbents*, J. Solid-Phase Biochem. **2** (1977) 45-78.
- [230] D. STEVENSON: *Immunoaffinity Solid-Phase Extraction*, J. Chromatogr. B **745** (2000) 39-48.
- [231] M. SCHUSTER, E. WASSERBAUER, A. NEUBAUER, A. JUNGBAUER: *High Speed Immunoaffinity Chromatography on Supports with Gigapores and Porous Glass*, Bioseparation **9** (2001) 259-268.
- [232] J. ZÜHLKE, D. KNOPP, R. NIESSNER: *Sol-Gel Glass as a New Support Matrix in Immunoaffinity Chromatography*, Fresenius J. Anal. Chem. **352** (1995) 654-659.
- [233] R. ZUSMAN, I. ZUSMAN: *Gel Fibreglass as a New Support for Affinity Chromatography*, Biotechnol. Appl. Biochem. **21** (1995) 161-172.
- [234] E. HARLOW, D. LANE: Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988.
- [235] G. T. HERMANSON, A. K. MALLIA, P. K. SMITH: Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press, New York 1992.
- [236] W. SCHRAMM, S.-H. PAEK, G. VOSS: *Strategies for the Immobilization of Antibodies*, Immunomethods **3** (1993) 93-103.
- [237] M. L. YARMUSH, K. P. ANTONSEN, S. SUNDARAM, D. M. YARMUSH: *Immunoabsorption: Strategies for Antigen Elution and Production of Reusable Adsorbents*, Biotechnol. Prog. **8** (1992) 168-178.
- [238] M. L. YARMUSH, A. M. WEISS, K. P. ANTONSEN, D. J. ODDE, D. M. YARMUSH: *Immunoaffinity Purification: Basic Principles and Operational Considerations*, Biotechnol. Adv. **10** (1992) 413-446.
- [239] A. FARJAM, A. E. BRUGMAN, H. LINGEMAN, U. A. T. BRINKMAN: *On-Line Immunoaffinity Sample Pre-Treatment for Column Liquid Chromatography: Evaluation of Desorption Techniques and Operating Conditions Using an Anti-Estrogen Immuno-Precolumn as a Model System*, Analyst **116** (1991) 891-896.

- [240] S. SUNDARAM, C. M. ROTH, M. L. YARMUSH: *Pressure-Induced Dissociation of Antigen-Antibody Complexes*, Biotechnol. Prog. **14** (1998) 773-781.
- [241] M. U. FERREIRA, A. M. KATZIN: *The Assessment of Antibody Affinity Distribution by Thiocyanate Elution: A Simple Dose-Response Approach*, J. Immunol. Methods **187** (1995) 297-305.
- [242] V. C. W. TSANG, P. P. WILKINS: *Optimum Dissociating Condition for Immunoaffinity and Preferential Isolation of Antibodies with High Specific Activity*, J. Immunol. Methods **138** (1991) 291-299.
- [243] K. P. ANTONSEN, C. K. COLTON, M. L. YARMUSH: *Elution Conditions and Degradation Mechanisms in Long-Term Immunoabsorbent Use*, Biotechnol. Prog. **7** (1991) 159-172.
- [244] R. R. BURGESS, N. E. THOMPSON: *Advances in Gentle Immunoaffinity Chromatography*, Curr. Opin. Biotech. **13** (2002) 304-308.
- [245] A. FARJAM, G. J. DE JONG, R. W. FREI, U. A. T. BRINKMANN, W. HAASNOOT, A. R. M. HARMERS, R. SCHILT, F. A. HUF: *Immunoaffinity Pre-Column for Selective On-Line Sample Pre-Treatment in High-Performance Liquid Chromatography Determination of 19-Nortestosterone*, J. Chromatogr. A **452** (1988) 419-433.
- [246] W. HAASNOOT, R. SCHILT, A. R. M. HAMERS, F. A. HUF, A. FARJAM, R. W. FREI, U. A. T. BRINKMAN: *Determination of β -19-Nortestosterone and its Metabolite alpha-19-Nortestosterone in Biological Samples at the Sub Parts per Billion Level by High-Performance Liquid Chromatography with On-Line Immunoaffinity Sample Pretreatment*, J. Chromatogr. A **489** (1989) 157-171.
- [247] A. FARJAM, A. E. BRUGMAN, A. SOLDAAT, P. TIMMERMAN, H. LINGEMAN: *Immunoaffinity Pre-column for Selective Sample Pretreatment in Column Liquid Chromatography: Immunoselective Desorption*, Chromatographia **31** (1991) 469-477.
- [248] D. S. HAGE: *Affinity Chromatography: A Review of Clinical Applications*, Clin. Chem. **45** (1999) 593-615.
- [249] D. W. ROBERTS, M. I. CHURCHWELL, F. A. BELAND, J.-L. FANG, D. R. DOERGE: *Quantitative Analysis of Etheno-2'-Deoxycytidine DNA Adducts Using On-Line Immunoaffinity Chromatography Coupled With LC/ES-MS/MS Detection*, Anal. Chem. **73** (2001) 303-309.

- [250] J. W. SEN, H. R. BERGEN, N. H. H. HEEGAARD: *On-Line Immunoaffinity-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Identification of Amyloid Disease Markers in Biological Fluids*, Anal. Chem. **75** (2003) 1196-1202.
- [251] N. DELAUNAY, V. PICHON, M. C. HENNION: *Immunoaffinity Solid-Phase Extraction for the Trace-Analysis of Low-Molecular-Mass Analytes in Complex Sample Matrices*, J. Chromatogr. B **745** (2000) 15-37.
- [252] M.-C. HENNION, V. PICHON: *Immuno-Based Sample Preparation for Trace Analysis*, J. Chromatogr. A **1000** (2003) 29-52.
- [253] M. M. RHEMREV-BOOM, M. YATES, M. RUDOLPH, M. RAEDTS: *(Immuno)affinity Chromatography: A Versatile Tool for Fast and Selective Purification, Concentration, Isolation and Analysis*, J. Pharm. Biomed. Anal. **24** (2001) 825-833.
- [254] N. DELAUNAY-BERTONCINI, M.-C. HENNION: *Immunoaffinity Solid-Phase Extraction for Pharmaceutical and Biomedical Trace-Analysis - Coupling with HPLC and CE - Perspectives*, J. Pharm. Biomed. Anal. **34** (2004) 717-736.
- [255] L. A. V. GINKEL: *Immunoaffinity Chromatography, its Applicability and Limitations in Multi-Residue Analysis of Anabolizing and Doping Agents*, J. Chromatogr. **564** (1991) 363-384.
- [256] J. CAI, J. HENION: *On-Line Immunoaffinity Extraction-Coupled Column Capillary Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry: Trace Analysis of LSD Analogs and Metabolites in Human Urine*, Anal. Chem. **68** (1996) 72-78.
- [257] J. CAI, J. HENION: *Quantitative Multi-Residue Determination of β -Agonists in Bovine Urine Using On-Line Immunoaffinity Extraction-Coupled Column Packed Capillary Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, J. Chromatogr. B **691** (1997) 357-370.
- [258] L.-H. GAM, S.-Y. THAM, A. LATIFF: *Immunoaffinity Extraction and Tandem Mass Spectrometric Analysis of Human Chorionic Gonadotropin in Doping Analysis*, J. Chromatogr. B **792** (2003) 187-196.
- [259] J. ONORATO, J. D. HENION: *Evaluation of Triterpene Glycoside Estrogenic Activity Using LC/MS and Immunoaffinity Extraction*, Anal. Chem. **73** (2001) 4704-4710.
- [260] M. A. J. GODFREY: *Immunoaffinity Extraction in Veterinary Residue Analysis - A Regulatory Viewpoint*, Analyst **123** (1998) 2501-2506.

- [261] A. FARJAM, R. DE VRIES, H. LINGEMAN, U. A. T. BRINKMAN: *Immuno Precolumns for Selective On-Line Sample Pretreatment of Aflatoxins in Milk Prior to Column Liquid Chromatography*, Intern. J. Environ. Anal. Chem. **44** (1991) 175-184.
- [262] P. M. SCOTT: *Application of Immunoaffinity Columns to Mycotoxin Analysis*, J. AOAC Int. **80** (1997) 941-948.
- [263] R. SCHUHMACHER, R. KRŠKA, M. GRASSERBAUER, W. EDINGER, H. LEW: *Immunoaffinity Columns Versus Conventional Clean-up: A Method-Comparison Study for the Determination of Zearalenone in Corn*, Fresenius J. Anal. Chem. **360** (1998) 241-245.
- [264] J. F. LAWRENCE, C. MÉNARD, M.-C. HENNION, V. PICHON, F. LE GOFFIC, N. DURAND: *Evaluation of Immunoaffinity Chromatography as a Replacement for Organic Solvent Clean-up of Plant Extracts for the Determination of Triazine Herbicides by Liquid Chromatography*, J. Chromatogr. A **752** (1996) 147-154.
- [265] J. F. LAWRENCE, C. MÉNARD, M.-C. HENNION, V. PICHON, F. LE GOFFIC, N. DURAND: *Use of Immunoaffinity Chromatography as a Simplified Cleanup Technique for the Liquid Chromatographic Determination of Phenylurea Herbicides in Plant Material*, J. Chromatogr. A **732** (1996) 277-281.
- [266] S. B. REJEB, C. CLÉROUX, J. F. LAWRENCE, P.-Y. GEAY, S. WU, S. STAVINSKI: *Development and Characterization of Immunoaffinity Columns for the Selective Extraction of a New Developmental Pesticide: Thifluzamide, from Peanuts*, Anal. Chim. Acta **432** (2001) 193-200.
- [267] D. H. THOMAS, M. BECK-WESTERMEYER, D. S. HAGE: *Determination of Atrazine in Water Using Tandem High-Performance Immunoaffinity Chromatography and Reversed-Phase Liquid Chromatography*, Anal. Chem. **66** (1994) 3823-3829.
- [268] V. PICHON, L. CHEN, M.-C. HENNION, R. DANIEL, A. MARTEL, F. LE GOFFIC, J. ABIAN, D. BARCELÓ: *Preparation and Evaluation of Immunosorbents for Selective Trace Enrichment of Phenylurea and Triazine Herbicides in Environmental Waters*, Anal. Chem. **67** (1995) 2451-2460.
- [269] V. PICHON, L. CHEN, N. DURAND, F. LE GOFFIC, M.-C. HENNION: *Selective Trace Enrichment on Immunosorbents for the Multiresidue Analysis of Phenylurea and Triazine Pesticides*, J. Chromatogr. A **725** (1996) 107-119.

- [270] A. MARTIN-ESTEBAN, P. FERNANDEZ, C. CAMARA: *Immunsorbents: A New Tool for Pesticide Sample Handling in Environmental Analysis*, Fresenius J. Anal. Chem. **357** (1997) 927-933.
- [271] I. FERRER, M.-C. HENNION, D. BARCELÓ: *Immunsorbents Coupled On-line with Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization/Mass Spectrometry for the Part per Trillion Level Determination of Pesticides in Sediments and Natural Waters Using Low Preconcentration Volumes*, Anal. Chem. **69** (1997) 4508-4514.
- [272] I. FERRER, V. PICHON, M.-C. HENNION, D. BARCELÓ: *Automated Sample Preparation with Extraction Columns by Means of Anti-Isoproturon Immunsorbents for the Determination of Phenylurea Herbicides in Water Followed by Liquid Chromatography-Diode Array Detection and Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry*, J. Chromatogr. A **777** (1997) 91-98.
- [273] B. S. REJEB, N. FISCHER DURAND, A. MARTEL, B. LE POULENNEC, J. F. LAWRENCE, M.-C. HENNION, F. LE GOFFIC: *Development of Anti-Phenylurea Antibody Purification Techniques for Improved Environmental Applications*, Anal. Chim. Acta **376** (1998) 41-48.
- [274] P. B. CARRASCO, R. ESCOLA, M.-P. MARCO, J. M. BAYONA: *Development and Application of Immunoaffinity Chromatography for the Determination of the Triazinic Biocides in Seawater*, J. Chromatogr. A **909** (2001) 61-72.
- [275] L. E. VERA-AVILA, L. RANGEL-ORDONEZ, R. COVARRUBIAS-HERRERA: *Evaluation and Characterization of a Commercial Immunsorbent Cartridge for the Solid-Phase Extraction of Phenylureas from Aqueous Matrices*, J. Chromatogr. Sci. **41** (2003) 480-488.
- [276] R. GHILDYAL, M. KARIOFILLIS: *Determination of Triasulfuron in Soil: Affinity Chromatography as a Soil Extract Cleanup Procedure*, J. Biochem. Biophys. Methods **30** (1995) 207-215.
- [277] C. SHEEDY, J. C. HALL: *Immunoaffinity Purification of Chlorimuron-ethyl from Soil Extracts Prior to Quantitation by Enzyme-Linked Immunsorbent Assay*, J. Agric. Food Chem. **49** (2001) 1151-1157.

- [278] V. PICHON, E. AULARD-MACLER, H. OUBIHI, P. SASSIAT, M.-C. HENNION, M. CAUDE: *Supercritical-Fluid Extraction Coupled with Immunoaffinity Clean-Up for the Trace Analysis of Organic Pollutants in Different Matrices*, Chromatographia **46** (1997) 529-536.
- [279] M. BOUZIGE, V. PICHON, M.-C. HENNION: *On-Line Coupling of Immunosorbent and Liquid Chromatographic Analysis for the Selective Extraction and Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples at the ng/L Level*, J. Chromatogr. A **823** (1998) 197-210.
- [280] V. PICHON, M. BOUZIGE, M.-C. HENNION: *New Trends in Environmental Trace-Analysis of Organic Pollutants: Class Selective Immunoextraction and Clean-Up in One Step Using Immunosorbents*, Anal. Chim. Acta **376** (1998) 21-35.
- [281] M. BOUZIGE, V. PICHON, M.-C. HENNION: *Class-Selective Immunosorbent for Trace Level Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Complex Matrices, Used in Off-Line Procedure or On-Line Coupled with Liquid Chromatography and Diode Array Detections in Series*, Environ. Sci. Technol. **33** (1999) 1916-1925.
- [282] S. D. THOMAS, Q. X. LI: *Immunoaffinity Chromatography for Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Corals*, Environ. Sci. Technol. **34** (2000) 2649-2654.
- [283] W. L. SHELVER, G. SHAN, S. J. GEE, L. H. STANKER, B. D. HAMMOCK: *Comparison of Immunoaffinity Column Recovery Patterns of Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins/Polychlorinated Dibenzofurans on Column Generated with different Monoclonal Antibody Clones and Polyclonal Antibodies*, Anal. Chim. Acta **457** (2002) 199-209.
- [284] R. ARANDA-RODRIGUEZ, C. KUBWABO, F. M. BENOIT: *Extraction of 15 Microcystins and Nodularin using Immunoaffinity Columns*, Toxicon **42** (2003) 587-599.
- [285] M. CICHNA, P. MARKL, D. KNOPP, R. NIESSNER: *Optimization of the Selectivity of Pyrene Immunoaffinity Columns Prepared by the Sol-Gel Method*, Chem. Mater. **9** (1997) 2640-2646.
- [286] M. CICHNA, D. KNOPP, R. NIESSNER: *Immunoaffinity Chromatography of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Columns Prepared by the Sol-Gel Method*, Anal. Chim. Acta **339** (1997) 241-250.

- [287] J. ZÜHLKE, D. KNOPP, R. NIESSNER: *Determination of 1-Nitropyrene with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Versus High-Performance Column Switching Technique*, J. Chromatogr. A **807** (1998) 209-217.
- [288] B. SPITZER, M. CICHNA, P. MARKL, G. SONTAG, D. KNOPP, R. NIESSNER: *Determination of 1-Nitropyrene in Herbs After Selective Enrichment by a Sol-Gel-Generated Immunoaffinity Column*, J. Chromatogr. A **880** (1997) 113-120.
- [289] M. SCHEDL, G. WILHARM, S. ACHATZ, A. KETTRUP, R. NIESSNER, D. KNOPP: *Monitoring Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites in Human Urine: Extraction and Purification with a Sol-Gel Glass Immunosorbent*, Anal. Chem. **73** (2001) 5669-5676.
- [290] C. STALIKAS, D. KNOPP, R. NIESSNER: *Sol-Gel Glass Immunosorbent-Based Determination of s-Triazines in Water and Soil Samples Using Gas Chromatography with Nitrogen Phosphorous Detection System*, Environ. Sci. Technol. **36** (2002) 3372-3377.
- [291] U. A. T. BRINKMAN: *On-Line Sample Treatment For or Via Column Liquid Chromatography*, J. Chromatogr. A **665** (1994) 217-231.
- [292] M. DE FRUTOS: *Chromatography-Immunology Coupling, A Powerful Tool for Environmental Analysis*, Trends Anal. Chem. **14** (1995) 133-140.
- [293] H. IRTH, A. J. OOSTERKAMP, U. R. TJADEN, J. VAN DER GREEF: *Strategies for On-Line Coupling of Immunoassays to High-Performance Liquid Chromatography*, Trends Anal. Chem. **14** (1995) 335-361.
- [294] J. M. VAN EMON, V. LOPEZ-AVILA: *Immunoaffinity Extraction with On-Line Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, in: Environmental Immunochemical Methods, J. M. Van Emon, C. L. Gerlach and J. C. Johnson (Hrsg.), 74-88, American Chemical Society, Washington, DC 1995.
- [295] D. BARCELÓ, M.-C. HENNION: *On-Line Sample Handling Strategies for the Trace-Level Determination of Pesticides and their Degradation Products in Environmental Waters*, Anal. Chim. Acta **318** (1995) 1-41.
- [296] S. OUYANG, Y. XU, Y. H. CHEN: *Selective Determination of a Group of Organic Compounds in Complex Sample Matrixes by LC/MIMS with On-Line Immunoaffinity Extraction*, Anal. Chem. **70** (1998) 931-935.

- [297] M. CICHNA, P. MARKL, D. KNOPP, R. NIESSNER: *On-Line Coupling of Sol-Gel-Generated Immunoaffinity Columns with High-Performance Liquid Chromatography*, J. Chromatogr. A **919** (2001) 51-58.
- [298] M. L. NEDVED, S. HABIBI-GOUDARZI, B. GANEM, J. D. HENION: *Characterization of Benzodiazepine "Combinatorial" Chemical Libraries by On-Line Immunoaffinity Extraction, Coupled Column HPLC-Ion Spray Mass Spectrometry-Tandem Mass Spectrometry*, Anal. Chem. **68** (1996) 4228-4236.
- [299] W. R. LACOURSE: *Column Liquid Chromatography: Equipment and Instrumentation*, Anal. Chem. **74** (2002) 2813-2832.
- [300] J. HENION, E. BREWER, G. RULE: *Sample Preparation for LC/MS/MS: Knowing the Basic Requirements and the Big Picture of an LC/MS System Can Ensure Success in Most Instances*, Anal. Chem. News & Features (1998) 650A-656A.
- [301] M. HERDERICH: *Massenspektrometrische Techniken in der Lebensmittelanalytik*, Nachrichten aus der Chemie **49** (2001) 4-8.
- [302] J. LIVAGE: *Bioactivity in Sol-Gel Glasses*, C.R. Acad. Sci. Paris **322, II b** (1996) 417-427.
- [303] J. D. WRIGHT, N. A. J. M. SOMMERDIJK: Sol-Gel Materials: Chemistry and Applications, Taylor & Francis Books, London 2002.
- [304] S. BRAUN, S. RAPPORT, R. ZUSMAN, D. AVNIR, M. OTTOLENGHI: *Biochemically Active Sol-Gel Glasses: The Trapping of Enzymes*, Mater. Lett. **10** (1990) 1-8.
- [305] W. JIN, J. D. BRENNAN: *Properties and Applications of Proteins Encapsulated within Sol-Gel Derived Materials*, Anal. Chim. Acta **461** (2002) 1-36.
- [306] N. LAPIDOT, O. GANS, F. BIAGINI, L. SOSONKIN, C. ROTTMANN: *Advanced Sunscreens: UV Absorbers Encapsulated in Sol-Gel Glass Microcapsules*, J. Sol-Gel Sci. Technol. **26** (2003) 67-72.
- [307] O. LEV, M. TSIONSKY, L. RABINOVICH, V. GLEZER, S. SAMPATH, I. PANKRATOV, J. GUN: *Organically Modified Sol-Gel Sensors*, Anal. Chem. **67** (1995) 22A-30A.
- [308] L. YANG, S. S. SAAVEDRA: *Chemical Sensing Using Sol-Gel Derived Planar Waveguides and Indicator Phases*, Anal. Chem. **67** (1995) 1307-1314.

- [309] R. A. DUNBAR, J. D. JORDAN, F. V. BRIGHT: *Development of Chemical Sensing Platforms Based on Sol-Gel-Derived Thin Films: Origin of Film Age vs Performance Trade-Offs*, Anal. Chem. **68** (1996) 604-610.
- [310] J. LIN, C. W. BROWN: *Sol-Gel Glass as a Matrix for Chemical and Biochemical Sensing*, Trends Anal. Chem. **16** (1997) 200-211.
- [311] R. ABU-REZIQ, D. AVNIR, J. BLUM: *Catalytic Hydrogenolysis of Aromatic Ketons by Sol-Gel Entrapped Combined Pd-[Rh(cod)Cl]₂ Catalyst*, J. Mol. Catal. A: Chem. **187** (2002) 277-281.
- [312] F. GELMAN, J. BLUM, D. AVNIR: *One-Pot Sequences of Reactions with Sol-Gel Entrapped Opposing Reagents. Oxidations and Catalytic Reductions*, New J. Chem. **27** (2003) 205-207.
- [313] J.-L. R. NOGUES, P. B. HUNT: *Sol-Gel Methods Can Yield Complex, Economical Optics*, Laser Focus World **December** (1995) 90-93.
- [314] K. S. ALBER, J. A. COX: *Electrochemistry in Solids Prepared by Sol-Gel Processes*, Mikrochim. Acta **127** (1997) 131-147.
- [315] O. LEV, Z. WU, S. BHARATHI, V. GLEZER, A. MODESTOV, J. GUN, L. RABINOVICH, S. SAMPATH: *Sol-Gel Materials in Electrochemistry*, Chem. Mater. **9** (1997) 2354-2375.
- [316] S. B. KHOO, F. CHEN: *Studies of Sol-Gel Ceramic Film Incorporating Methylene Blue on Glassy Carbon: An Electrocatalytic System for the Simultaneous Determination of Ascorbic and Uric Acids*, Anal. Chem. **74** (2002) 5734-5741.
- [317] N. RUPCICH, A. GOLDSTEIN, J. A. BRENNAN: *Optimization of Sol-Gel Formulations and Surface Treatment for the Development of Pin-Printed Protein Microarrays*, Chem. Mater. **15** (2003) 1803-1811.
- [318] M. NOMURA, B. MEESTER, J. SCHOONMAN, F. KAPTEIJN, J. A. MOULIJN: *Improvement of Thermal Stability of Porous Titania Films Prepared by Electrostatic Sol-Spray Deposition (ESSD)*, Chem. Mater. **15** (2003) 1283-1288.
- [319] R. ZUSMAN, I. ZUSMAN: *Glass Fibers Coverd with Sol-Gel Glass as a New Support for Affinity Chromatography Columns: A Review*, J. Biochem. Biophys. Methods **49** (2001) 175-187.

- [320] J. YU, C. WU, J. XING: *Development of New Solid-Phase Microextraction Fibres by Sol-Gel Technology for the Determination of Organophosphorus Pesticide Multi-residues in Food*, J. Chromatogr. A **1036** (2004) 101-111.
- [321] J.-P. CHEN, LIN, W.-S.: *Sol-Gel Powders and Supported Sol-Gel Polymers for Immobilization of Lipase in Ester Synthesis*, Enzyme Microb. Technol. **32** (2003) 801-811.
- [322] D. AVNIR, L. C. KLEIN, D. LEVY, U. SCHUBERT, A. B. WOJCIK: Organo-Silica Sol-Gel Materials, John Wiley & Sons Ltd., New York 1998.
- [323] D. AVNIR: *Organic Chemistry within Ceramic Matrices: Doped Sol-Gel Materials*, Acc. Chem. Res. **28** (1995) 328-334.
- [324] M. M. COLLINSON: *Sol-Gel Strategies for the Preparation of Selective Materials for Chemical Analysis*, Crit. Rev. Anal. Chem. **29** (1999) 289-311.
- [325] B. DUNN, J. I. ZINK: *Probes of Pore Environment and Molecule-Matrix Interactions in Sol-Gel Materials*, Chem. Mater. **9** (1997) 2280-2291.
- [326] E. FRAMERY, P. H. MUTIN: *²⁹Si MAS-NMR Study of Silica Gels and Xerogels: Influence of the Catalyst*, J. Sol-Gel Sci. Technol. **24** (2002) 191-195.
- [327] I. GILL, A. BALLESTEROS: *Bioencapsulation within Synthetic Polymers (Part 1): Sol-Gel Encapsulated Biologicals*, TIBTECH **18** (2000) 282-296.
- [328] A. ZONTA: *Einschluß von Biokatalysatoren in hydrophoben Sol-Gel-Materialien*, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum 1995.
- [329] D. AVNIR, S. BRAUN, O. LEV, M. OTTOLENGHI: *Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol-Gel Materials*, Chem. Mater. **6** (1994) 1605-1614.
- [330] F. A. EL-ESSI, A. Z. ABU ZUHRI, S. I. AL-KHALIL, M. S. ABDEL-LATIF: *Spectrophotometric Determination of Enzymatically Generated Hydrogen Peroxide Using Sol-Gel Immobilized Horseradish Peroxidase*, Talanta **44** (1997) 2051-2058.
- [331] I. GILL, A. BALLESTEROS: *Encapsulation of Biologicals within Silicate, Siloxane, and Hybrid Sol-Gel Polymers: An Efficient and Generic Approach*, J. Am. Chem. Soc. **120** (1998) 8587-8598.
- [332] R. B. BHATIA, C. J. BRINKER, A. K. GUPTA, A. K. SINGH: *Aqueous Sol-Gel Process for Protein Encapsulation*, Chem. Mater. **12** (2000) 2434-2441.

- [333] M. T. REETZ, P. TIELMANN, W. WIESENHÖFER, W. KÖNEN, A. ZONTA: *Second Generation of Sol-Gel Encapsulated Lipases: Robust Heterogeneous Biocatalysts*, Adv. Synth. Catal. **345** (2003) 717-728.
- [334] R. WANG, U. NARANG, P. N. PRASAD, F. V. BRIGHT: *Affinity of Antifluorescein Antibodies Encapsulated within a Transparent Sol-Gel Glass*, Anal. Chem. **65** (1993) 2671 - 2675.
- [335] N. AHARONSON, M. ALTSTEIN, G. AVIDAN, D. AVNIR, A. BRONSHTEIN, A. LEWIS, K. LIEBERMANN, M. OTTOLENGHI, Y. POLEVAYA, C. ROTTMAN, J. SAMUEL, S. SHALOM, A. STRINKOVSKI, A. TURNIANSKY: *Recent Developments in Organically Doped Sol-Gel Sensors: A Microns-Scale Probe; Successful Trapping of Purified Polyclonal Antibodies; Solutions to the Dopant-Leaching Problem*, in: Better Ceramics Through Chemistry, VI, C. Sanchez, M. L. Mecartney, C. J. Brinker and A. Cheetham (Hrsg.), 519-530, Materials Res. Soc. Symp. Proc., New York 1994.
- [336] K. NAKANISHI, H. MUGURUMA, I. KARUBE: *A Novel Method of Immobilizing Antibodies on a Quartz Crystal Microbalance Using Plasma-Polymerized Films for Immunosensors*, Anal. Chem. **68** (1996) 1695-1700.
- [337] A. BRONSHTEIN, N. AHARONSON, D. AVNIR, A. TURNIANSKY, M. ALTSTEIN: *Sol-Gel Matrixes Doped with Atrazine Antibodies: Atrazine Binding Properties*, Chem. Mater. **9** (1997) 2632-2639.
- [338] T. SCHARNWEBER, D. KNOPP, R. NIESSNER: *Application of Sol-Gel Glass Immunoabsorbents for the Enrichment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) from Wet Precipitation*, Field Anal. Chem. Technol. **4** (2000) 43-52.
- [339] M. ALTSTEIN, A. BRONSHTEIN, B. GLATTSTEIN, A. ZEICHNER, T. TAMIRI, J. ALMOG: *Immunochemical Approaches for Purification and Detection of TNT Traces by Antibodies Entrapped in a Sol-Gel Matrix*, Anal. Chem. **73** (2001) 2461-2467.
- [340] M. ALTSTEIN, N. AHARONSON, G. SEGEV, O. BEN-AZIZ, D. AVNIR, A. TURNIANSKY, A. BRONSHTEIN: *Sol-Gel-Based Enzymatic Assay and Immunoassays for Residue Analysis*, Ital. J. Food Sci. **12** (2000) 191-206.
- [341] J. VAZQUEZ-LIRA, E. CAMACHO-FRIAS, A. PENA-ALVAREZ, L. E. VERA-AVILA: *Preparation and Characterization of a Sol-Gel Immunosorbent Doped with 2,4-D Antibodies*, Chem. Mater. **15** (2003) 154-161.

- [342] K. NAKANISHI, H. MINAKUCHI, N. SOGA, N. TANAKA: *Double Pore Silica Gel Monolith Applied to Liquid Chromatography*, J. Sol-Gel Sci. Technol. **8** (1997) 547-552.
- [343] N. ISHIZUKA, K. NAKANISHI, K. HIRAO, N. TANAKA: *Preparation and Chromatographic Application of Macroporous Silicate in a Capillary*, J. Sol-Gel Sci. Technol. **19** (2000) 371-375.
- [344] M. KATO, K. SAKAI-KATO, N. MATSUMOTO, T. TOYO'OKA: *A Protein-Encapsulation Technique by the Sol-Gel Method for the Preparation of Monolithic Columns for Capillary Electrochromatography*, Anal. Chem. **74** (2002) 1915-1921.
- [345] D. WANG, S. L. CHONG, A. MALIK: *Sol-Gel Column Technology for Single-Step Deactivation, Coating, and Stationary-Phase Immobilization in High-Resolution Capillary Gas Chromatography*, Anal. Chem. **69** (1997) 4566-4576.
- [346] Z. CHEN, K. UCHIYAMA, T. HOB0: *Chemically Modified Chiral Monolithic Silica Prepared by a Sol-Gel Process for Enantiomeric Separation by Micro High-Performance Liquid Chromatography*, J. Chromatogr. A **942** (2001) 83-91.
- [347] W. STÖBER, A. FINK, E. BOHN: *Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range*, J. Colloid Interf. Sci. **26** (1968) 62-69.
- [348] M. AIZAWA, S. KITAJIMA, M. OHSAWA, W. YANG: *Preparation of Spherical Hydrous Silica Oxide Particles under Acidic Condition via Sol-Gel Processing*, J. Sol-Gel Sci. Technol. **19** (2000) 329-332.
- [349] S. MANN, S. L. BURKETT, S. A. DAVIS, C. E. FOWLER, N. H. MENDELSON, S. D. SIMS, D. WALSH, N. T. WHILTON: *Sol-Gel Synthesis of Organized Matter*, Chem. Mater. **9** (1997) 2300-2310.
- [350] A. HIROSE, H. YAMASHITA, T. MAEKAWA: *Synthesis of Porous SiO₂ Spherical Particles by Sol-Gel Methods in W/O-Emulsion*, Anal. Sci. **10** (1994) 737-741.
- [351] M. A. TAIGE: *Immobilisierung von biochemischen Reagenzien in Sol-Gel-Kügelchen für die Analyse von cyanobakteriellen Toxinen*, Diplomarbeit, TU München 2004.
- [352] M. T. REETZ, A. ZONTA, J. SIMPELKAMP, W. KÖNEN: *In Situ Fixation of Lipase-Containing Hydrophobic Sol-Gel Materials on Sintered Glass - Highly Efficient Heterogenous Biocatalysts*, Chem. Commun. (1996) 1397-1398.

- [353] B. D. MACCRAITH, C. M. McDONAGH, G. O'KEEFFE, A. K. MCEVOY: *Sol-Gel Coatings for Optical Chemical Sensors and Biosensors*, Sensors Actuat. B: Chem. **29** (1995) 51-57.
- [354] B. C. DAVE, D. BRUCE, J. SELVERSTONE VALENTINE, J. I. ZINK: *Sol-Gel Encapsulation Methods for Biosensors*, Anal. Chem. **66** (1994) 1120A-1127A.
- [355] H. REUTER, M.-T. BRANDHERM: *Neue Dimensionen beim Sol-Gel-Prozeß*, Angew. Chem. **107** (1995) 1712-1713.
- [356] B. SELLERGREN: *Noncovalent Molecular Imprinting: Antibody-Like Molecular Recognition in Polymeric Network Materials*, Trends Anal. Chem. **16** (1997) 310-320.
- [357] A. KATZ, M. E. DAVIS: *Investigations into the Mechanisms of Molecular Recognition with Imprinted Polymers*, Macromolecules **32** (1999) 4113-4121.
- [358] B. SELLERGREN: *Polymer- and Template-Related Factors Influencing the Efficiency in Molecularly Imprinted Solid-Phase Extractions*, Trends Anal. Chem. **18** (1999) 164-174.
- [359] A. MARTIN-ESTEBAN: *Molecularly Imprinted Polymers: New Molecular Recognition Materials for Solid-Phase Extraction of Organic Compounds*, Fresenius J. Anal. Chem. **370** (2001) 795-802.
- [360] F. LANZA, B. SELLERGREN: *Method for Synthesis and Screening of Large Groups of Molecularly Imprinted Polymers*, Anal. Chem. **71** (1999) 2092-2096.
- [361] A. KATZ, M. E. DAVIS: *Molecular Imprinting of Bulk Microporous Silica*, Nature **403** (2000) 286-289.
- [362] H. ZHAO, K. L. NAGY, J. S. WAPLES, G. F. VANCE: *Surfactant-Templated Mesoporous Silicate Materials as Sorbents for Organic Pollutants in Water*, Environ. Sci. Technol. **34** (2000) 4822-4827.
- [363] F. L. DICKERT, O. HAYDEN: *Bioimprinting of Polymers and Sol-Gel Phases. Selective Detection of Yeast with Imprinted Polymers*, Anal. Chem. **74** (2002) 1302-1306.
- [364] S. MARX, A. ZALTSMAN, I. TURVAN, D. MANDLER: *Parathion Sensor Based on Molecularly Imprinted Sol-Gel Films*, Anal. Chem. **76** (2004) 120-126.

- [365] I. SURUGIU, B. DANIELSSON, L. YE, K. MOSBACH, K. HAUPT: *Chemiluminescence Imaging ELISA Using an Imprinted Polymer as the Recognition Element Instead of an Antibody*, Anal. Chem. **73** (2001) 487-491.
- [366] I. SURUGIU, J. SVITEL, L. YE, K. HAUPT, B. DANIELSSON: *Development of a Flow Injection Capillary Chemiluminescent ELISA Using an Imprinted Polymer Instead of the Antibody*, Anal. Chem. **73** (2001) 4388-4392.
- [367] D. KRIZ, O. RAMSTRÖM, K. MOSBACH: *Molecular Imprinting: New Possibilities for Sensor Technology*, Anal. Chem. News & Features (1997) 345A-349A.
- [368] M. JAKUSCH, M. JANOTTA, B. MIZAIKOFF, K. MOSBACH, K. HAUPT: *Molecularly Imprinted Polymers and Infrared Evanescent Wave Spectroscopy. A Chemical Sensors Approach*, Anal. Chem. **71** (1999) 4786-4791.
- [369] M. KEMPE, K. MOSBACH: *Molecular Imprinting Used for Chiral Separations*, J. Chromatogr. A **694** (1995) 3-13.
- [370] N. MASQUÉ, R. M. MARCÉ, F. BORRULL: *New Polymeric and Other Types of Sorbents for Solid-Phase Extraction of Polar Organic Micropollutants from Environmental Water*, Trends Anal. Chem. **17** (1998) 384-394.
- [371] L. I. ANDERSSON: *Molecular Imprinting: Developments and Applications in the Analytical Chemistry Field*, J. Chromatogr. B **745** (2000) 3-13.
- [372] O. BRÜGGEMANN, K. HAUPT, L. YE, E. YILMAZ, K. MOSBACH: *New Configurations and Applications of Molecularly Imprinted Polymers*, J. Chromatogr. A **889** (2000) 15-24.
- [373] J. MATSUI, Y. MIYOSHI, O. DOBLHOFF-DIER, T. TAKEUCHI: *A Molecularly Imprinted Synthetic Polymer Receptor Selective for Atrazine*, Anal. Chem. **67** (1995) 4404-4408.
- [374] T. TAKEUCHI, D. FAKUMA, J. MATSUI: *Combinatorial Molecular Imprinting: An Approach to Synthetic Polymer Receptors*, Anal. Chem. **71** (1999) 285-290.
- [375] B. BAJARNASON, L. CHIMUKA, O. RAMSTRÖM: *On-Line Solid-Phase Extraction of Triazine Herbicides Using a Molecularly Imprinted Polymer for Selective Sample Enrichment*, Anal. Chem. **71** (1999) 2152-2156.
- [376] J. MATSUI, K. FUJIWARA, S. UGATA, T. TAKEUCHI: *Solid-Phase Extraction with a Dibuthylmelamine-Imprinted Polymer as Triazine Herbicide-Selective Sorbent*, J. Chromatogr. A **889** (2000) 25-31.

- [377] I. FERRER, F. LANZA, A. TOLOKAN, V. HORVATH, B. SELLENGREN, G. HORVAI, D. BARCELÓ: *Selective Trace Enrichment of Chlorotriazine Pesticides from Natural Waters and Sediment Samples Using Terbutylazine Molecularly Imprinted Polymers*, Anal. Chem. **72** (2000) 3934-3941.
- [378] E. TUIEL, A. MARTIN-ESTEBAN, P. FERNANDEZ, C. PEREZ-CONDE, C. CAMARA: *Molecular Recognition in a Propazine-Imprinted Polymer and Its Application to the Determination of Triazines in Environmental Samples*, Anal. Chem. **73** (2001) 5133-5141.
- [379] F. CHAPUIS, V. PICHON, F. LANZA, B. SELLENGREN, M. C. HENNION: *Optimization of the Class-Selective Extraction of Triazines from Aqueous Samples Using a Molecularly Imprinted Polymer by a Comprehensive Approach of the Retention Mechanism*, J. Chromatogr. A **999** (2003) 23-33.
- [380] Q.-Z. ZHU, K. HAUPT, D. KNOPP, R. NIESSNER: *Molecularly Imprinted Polymer for Metsulfuron-methyl and Its Binding Characteristics for Sulfonylurea Herbicides*, Anal. Chim. Acta **468** (2002) 217-227.
- [381] J. R. HARRIS, J. MARKL: *Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH): A Biomedical Review*, Micron **30** (1999) 597-623.
- [382] G. T. HERMANSON: Bioconjugation Techniques, Academic Press, New York 1996.
- [383] B. PORSTMANN, T. PORSTMANN, E. NUGEL, U. EVERS: *Which of the Commonly Used Marker Enzymes Gives the Best Results in Colorimetric and Fluorimetric Enzyme Immunoassays: Horseradish Peroxidase, Alkaline Phosphatase, β -Galactosidase*, J. Immunol. Methods **79** (1985) 27-37.
- [384] Z. GRABAREK, J. GERGELY: *Zero-Length Crosslinking Procedure with the Use of Active Esters*, Anal. Biochem. **185** (1990) 131-135.
- [385] K. MEISENECKER: *Entwicklung eines Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay für die Stoffklasse der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe am Beispiel des Pyrens*, Diplomarbeit, Technischen Universität München 1992.
- [386] M. N. JONES, N. D. BRYAN: *Colloidal Properties of Humic Substances*, Adv. Colloid Interface Sci. **78** (1998) 1-48.
- [387] P. JANOS: *Separation Methods in the Chemistry of Humic Substances*, J. Chromatogr. A **983** (2003) 1-18.

- [388] P. PFORTNER, M. G. WELLER, R. NIESSNER: *Immunological Methods for the Detection of Nitroaromatic Residues Covalently Bound to Humic Acids*, Fresenius J. Anal. Chem. **360** (1998) 192-198.
- [389] E. SIMON: *Entwicklung von Immunoassays für Sulfonylharnstoffherbizide und huminsäuregebundene Triazinherbizide*, Dissertation, TU München 1998.
- [390] D. S. HORNE: *Casein Structure, Self-Assembly and Gelation*, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. **7** (2002) 456-461.
- [391] J. A. HUNTINGTON, P. E. STEIN: *Structure and Properties of Ovalbumin*, J. Chromatogr. B **756** (2001) 189-198.
- [392] G. HAMPRECHT, H. MAYER, K.-O. WESTPHALEN, H. WALTER: *Extended Summaries 9th International Congress of Pesticide Chemistry: New Fluoro Intermediates for Herbicidal Sulfonylureas*, Pestic. Sci. **55** (1999) 566-614.
- [393] T. J. HOU, Z. M. LI, Z. LI, J. LIU, X. J. XU: *Three-Dimensional Quantitative Structure - Activity Relationship Analysis of the New Potent Sulfonylureas Using Comparative Molecular Similarity Indices Analysis*, J. Chem. Inf. Comp. Sci. **40** (2000) 1002-1009.
- [394] A. J. SCHUETZ, M. WINKELMAIR, M. G. WELLER, R. NIESSNER: *Selection of Hapten Structure for Indirect Immunosensor Arrays*, Fresenius J. Anal. Chem. **363** (1999) 625-631.
- [395] G. GIRAUDI, C. BAGGIANI: *Strategy for Fractionating High-Affinity Antibodies to Steroid Hormones by Affinity Chromatography*, Analyst **121** (1996) 939-944.
- [396] N. C. DIAS, C. F. POOLE: *Mechanistic Study of the Sorption Properties of Oasis HLB and Its Use in Solid-Phase Extraction*, Chromatographia **56** (2002) 269-275.
- [397] M. C. CARNEIRO, L. PUIGNOU, M. T. GALCERAN: *Comparison of Silica and Porous Graphitic Carbon as Solid-Phase Extraction Materials for the Analysis of Cationic Herbicides in Water by Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis*, Anal. Chim. Acta **408** (2000) 263-269.
- [398] M. C. HENNION: *Graphitized Carbons for Solid-Phase Extraction*, J. Chromatogr. A **885** (2000) 73-95.
- [399] S. EGGER: *Herstellung und Charakterisierung von Sol-Gel-Glas-Coatings auf porösen Silikatträgern*, Zulassungsarbeit aus dem Fach Chemie, Studiengang Biologie/Chemie Lehramt am Gymnasium, TU München 2004.

-
- [400] C. SHEN, N. KOSTIC: *Sol-Gel Silica Glass Doped with Zinc Cytochrome C*, J. Am. Chem. Soc. **119** (1997) 1304-1312.
- [401] A. AGRAZ, C. A. DUARTE, L. COSTA, L. PEREZ, R. PÁEZ, V. PUJOL, G. FONTIRROCHI: *Immunoaffinity Purification of Recombinant Hepatitis B Surface Antigen from Yeast Using a Monoclonal Antibody*, J. Chromatogr. A **672** (1994) 25-33.
- [402] A. KUMMER, E. C. Y. LI-CHAN: *Application of an ELISA-Elution Assay as a Screening Tool for Dissociation of Yolk Antibody-Antigen Complexes*, J. Immunol. Methods **211** (1998) 125-137.
- [403] M. A. FIRER: *Efficient Elution of Functional Proteins in Affinity Chromatography*, J. Biochem. Biophys. Methods **49** (2001) 433-442.
- [404] K. BEYER: *Entwicklung und Charakterisierung eines Enzym-Immunoassays für die Analyten Benzol, Toluol und Xylol (BTX)*, Dissertation, TU München 1998.
- [405] A. DENG, M. HIMMELSBACH, Q.-Z. ZHU, S. FREY, M. SENGL, W. BUCHBERGER, R. NIESSNER, D. KNOPP: *Residue Analysis of the Pharmaceutical Diclofenac in Different Water Types Using ELISA and GC-MS*, Environ. Sci. Technol. **37** (2003) 3422-3429.
- [406] T. SCHARNWEBER: *Entwicklung von immunologischen Methoden für die Analytik von PAHs in Umweltproben*, Dissertation, TU München 2002.
- [407] M. ANASTASSIADES, S. J. LEHOTAY: *Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce*, J. AOAC Int. **86** (2003) 412-431.
- [408] W. SCHWACK, M. ANASTASSIADES, E. SCHERBAUM: *Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln: Multimethoden versus Wirkstoffvielfalt*, Chem. Unserer Zeit **37** (2003) 324-335.