

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie
Lehrstuhl für Analytische Chemie

**Entwicklung von online-Toxizitätstests für die
Wirkungsbezogene Analyse von Wasserinhaltsstoffen**

Philipp Stolper

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M.Schuster
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. R. Nießner
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Parlar

Die Dissertation wurde am 28.10.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 26.01.2009 angenommen.



Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Nießner, der mir die Möglichkeit gab, dieses sehr interessante Projekt am Institut für Wasserchemie durchführen zu können. Die gute Ausstattung der Laboratorien sowie die Bereitstellung von finanziellen Mitteln und nicht zuletzt sein Interesse an den Forschungsergebnissen trugen zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ein besonderer Dank gebührt Herrn PD. Dr. Michael G. Weller für die Betreuung im ersten Jahr der Arbeit. Die Tür stand jederzeit offen und jede Frage wurde bestmöglich beantwortet. Durch viele Diskussionen wurde so manches Problem eliminiert. Auch danke ich Herrn Prof. Dr. Dietmar Knopp herzlich für die Übernahme der Betreuung und die Hilfestellungen, die ich durch ihn bekam. Durch die Weiterführung der Diskussionen ergaben sich auch hier immer neue Aspekte, die Eingang in die Arbeit fanden.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes. Ein großes Dankeschön gilt den Partnern in Stuttgart, Herrn Prof. Dr. Till T. Bachmann und Herrn Dr. Holger Schulze sowie Frau Susanne Münch, die durch großzügige Bereitstellung von Proteinphosphatase-Fusionsproteinen große Teile der Arbeit erst ermöglicht haben.

Meinen Kollegen und Freunden am IWC danke ich für die angenehme Atmosphäre, die während meiner Zeit am Institut herrschte: Caroline Peskoller, Katrin Kloth, Markus Knauer, Carsten Kykal, Gabriele Hörnig, Matteo Carrara, Jimena Saucedo, Christine Beese und Susanna Mahler sowie allen, die hier nicht namentlich erwähnt wurden. Viele neue Erkenntnisse und Anregungen ergaben sich durch zahlreiche Gespräche, hier sei vor allem Herrn Christian Cervino gedankt.

Für das Herstellen diverser Einzelteile sowie der Realisierung des Messgerät-Umbaus danke ich Herrn Sebastian Wiesemann.

Meinen Praktikanten gebührt ein Dank für die Hilfe, die sie mir im Labor waren, insbesondere Frau Maria Rye-Johnson, Herrn Jan-Christof Wolf und Frau Cora Dunst.

Für die gute Einarbeitung in dieses komplexe Thema und in die dazu notwendigen Geräte danke ich Frau Susanne Fabel.

Frau Petra Kaiser danke ich für das schnelle Korrekturlesen der Arbeit und die Unterstützung während des Studiums.

Meinen Eltern danke ich für die stetige Unterstützung, die sie mir über meine gesamte Ausbildung hinweg zuteil werden ließen.

Meiner Frau Tamara, die mir immer zu Seite stand und da war, auch wenn es mal nicht so gut lief, gebührt ein ganz besonderer Dank.

Allen meinen Freunden danke ich für jede Unterstützung und das Ertragen meiner Launen, sowie das andauernde Interesse an meiner Arbeit.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Stolper, P., Fabel, S., Weller, M.G., Knopp, D., Niessner, R., *Whole-cell luminescence-based flow-through biodetector for toxicity testing*, Anal. Bioanal. Chem., 2008, 390, 1181-1187.

„Man muss das Unmögliche versuchen, um das Mögliche zu erreichen.“
Herrmann Hesse

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung und Problemstellung	1
II	Theoretische Grundlagen	5
1	Wirkungsbezogene Analytik	7
1.1	Prinzip	7
1.2	Strategien	10
1.2.1	Vorsäulenansatz	10
1.2.2	Toxicity Identification Evaluation	12
1.2.3	Nachsäulenansatz	13
1.3	Bestätigung der Effekte in der Wirkungsbezogenen Analytik	19
1.4	Wirkungsbezogene online-Detektionsmöglichkeiten in der HPLC	22
1.4.1	Enzyminhibitionsassays	23
1.4.2	Rezeptorbasierte Detektionssysteme	27
2	Nachsäulenreaktoren bei der Flüssigkeitschromatographie	31
2.1	Anforderungen an die Hydromechanik	31
2.1.1	Flüssigkeitstransport	32
2.1.2	Dispersion	33
2.1.3	Mischen	36
2.2	Gestrickte/gehäkelte/gewickelte Kapillarreaktoren	37
2.3	Gassegmentierte Reaktoren	39
3	Proteinphosphatasen	41
3.1	Bedeutung von Proteinphosphatasen	41
3.2	Inhibitoren	42
3.3	Enzymaktivitätstests	46
4	Leuchtbakterien	51
III	Ergebnisse und Diskussion	57
5	Auswahl der Targets für die Wirkungsbezogene Analyse	59
5.1	Indikator für Hepatotoxizität: Proteinphosphatase	59
5.1.1	Substrate	60
5.1.2	Inhibitoren	64

5.1.3	Stabilität des Enzyms	67
5.1.4	Zusammenfassung	69
5.2	Indikator für die Gesamttoxizität: Leuchtbakterium <i>Vibrio fischeri</i>	69
5.2.1	Medienwahl	69
5.2.2	Inhibitoren	74
5.2.3	Stabilität der Bakterien	76
5.2.4	Zusammenfassung	78
6	Aufbau der Fluidik	81
6.1	Pumpenwahl	82
6.2	Gassegmentierung des Flusses	83
6.3	Blasenfilter	85
6.4	Umbau des Lumineszenzdetektors	86
7	Wirkungsbezogene Analyse mit gassegmentiertem Bioinhibitionsdetektor	89
7.1	Proteinphosphatase	89
7.1.1	Aufbau	89
7.1.2	Optimierung des Enzymflusses	91
7.1.3	Fließinjektionsexperimente	98
7.1.4	Kopplung mit anderen Detektoren	100
7.1.5	Reproduzierbarkeit	101
7.1.6	Kalibrierkurven	103
7.1.7	Zusammenfassung	104
7.2	Leuchtbakterien	105
7.2.1	Aufbau	105
7.2.2	Fließinjektionsexperimente	106
7.2.3	Kopplung an die HPLC	110
7.2.4	Zusammenfassung	113
IV	Zusammenfassung und Ausblick	115
V	Experimenteller Teil	121
9	Geräte	123
9.1	Pumpen	123
9.2	Detektoren	123
9.3	Fluidik-Zubehör	123
9.4	Sonstiges	125

10	Chemikalien und Reagenzien	127
10.1	Verwendete Chemikalien	127
10.2	Proteine, Enzyme und Organismen.	128
10.3	Standardsubstanzen.	128
10.4	Pufferlösungen	129
11	Standardprozeduren	131
11.1	Ansetzen der Analytstandardlösungen	131
11.2	Herstellung der Targetlösungen	131
11.2.1	Leuchtbakterien	131
11.2.2	Proteinphosphatase	132
11.3	Durchführung der Mikrotiterplattentests	133
11.3.1	Proteinphosphatase	133
11.3.2	Leuchtbakterien	133
11.4	Bestimmung der Enzymaktivität.	134
11.5	Quantifizierung der Inhibitionsexperimente.	135
11.5.1	Mikrotiterplattentest	135
11.5.2	online-Detektor.	136
11.6	Modifikation der <i>fused-silica</i> Kapillaren	137
11.6.1	Aktivierung der Oberfläche	137
11.6.2	Modifikation der Oberfläche	138
12	Chromatographische Bedingungen	139
12.1	Trennung der Microcystine.	139
12.2	Trennung der Phenole.	139
13	Gassegmentierter Bioinhibitionsdetektor	141
13.1	Durchführung der Messungen.	141
13.1.1	online-Verfahren.	141
13.1.2	offline-Verfahren	142
13.1.3	Fließinjektionsanalyse	143
13.2	Signalauswertung mit Proteinphosphatase	144
13.3	Signalauswertung mit Leuchtbakterien.	145
VI	Anhang	147
14	Abkürzungen	149
15	Technische Zeichnungen	151
16	Literaturverzeichnis.	157



Teil I

Einleitung und

Problemstellung



Die Vielfalt an analytischen Methoden erlaubt die Erhebung umfassender struktureller und quantitativer Daten der chemischen Komponenten in einer Probe. Durch die oft große Anzahl an Komponenten ist es notwendig, eine Selektion zum Beispiel bezüglich biologisch relevanter Eigenschaften vornehmen zu können, um die großen Datensätze sinnvoll und zeitsparend auswerten zu können. Eine Fokussierung auf toxische Komponenten ist sowohl umweltrelevant als auch wichtig für die Öffentlichkeit, schließlich sollen möglichst wenig falsche Gefahrenmeldungen ausgegeben werden.

Toxikologische Untersuchungen von Gewässern werden häufig in Form von Toxizitätstests mit lebenden Organismen durchgeführt. Da die Tests mit der gesamten Probe durchgeführt werden, kann häufig keine stoffliche Zuordnung zu den toxischen Effekten hergestellt werden. Auch die Quantifizierung der Substanzen kann nur als halbquantitative Angabe in toxischen Äquivalenten angegeben werden, da in komplexen Proben eine Abschätzung der einzelnen Toxizitäten und deren Verhalten untereinander nicht eingerechnet werden kann.

Die Kopplung von biochemischen Prüfmethode, z. B. toxikologischen Tests, mit instrumentellen Verfahren eröffnet eine neue Dimension der Detektion in Form der Wirkungsbezogenen Analytik. Hier sollen Informationen der Einzelkomponenten wie Konzentration und Struktur mit deren Wirkung in Verbindung gebracht werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein biochemisches System entwickelt werden, mit dem diese Verknüpfung ohne zusätzliche Schritte in einem Arbeitsgang vollzogen werden kann. Dazu sollte nach einer chromatographischen Trennung die Detektion mit verschiedenen Detektoren durchgeführt werden. Einer dieser Detektoren sollte im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und optimiert werden. Dabei handelt es sich um einen biochemischen Reaktor (Biodetektor), der durch Einsatz verschiedener Zielstrukturen unterschiedliche toxikologische Eigenschaften von Probeninhaltsstoffen detektieren kann. Durch das parallele Aufnehmen mit unterschiedlichen Detektoren sollten Substanzen, die toxische Effekte im Biodetektor zeigen, erkannt und durch die Auswertung der anderen Detektorsignale auf die verursachende Struktur zurück geschlossen werden können.

Der Aufbau eines online arbeitenden Biodetektors stand im Vordergrund der Arbeit. Es sollte ein System konstruiert werden, in das ein Teil des Flusses nach einer chromatographischen Trennsäule kontinuierlich eingespeist wird. Am Ende der Fließstrecke durch das System sollten, ähnlich wie bei klassischen Detektoren, Chromatogramme aufgezeichnet werden können.

Es sollten verschiedene Targets für die Biodetektion etabliert werden, um unterschiedliche biologische Effekte der Analyten feststellen zu können. Dabei wurden zum einen Enzyme in Betracht gezogen, bei denen das in offline durchgeführten Enzyminhibitionstests gewonnene Wissen in ein online-System transferiert werden sollte. Um umfassende toxi-kologische Effekte erkennen zu können, sollte zum anderen ein System mit Leuchtbakte-rien als Indikator für allgemeine Toxizität aufgebaut werden.

Es wurden verschiedene Ansprüche an den neuen Detektor gestellt: Zum einen sollte die in der Chromatographie erzielte Trennung durch den Biodetektor nicht verschlechtert werden und die im Biodetektor erzielte Auflösung der von anderen Detektoren ähnlich sein. Dazu sollte die Technik der Flussegmentierung eingesetzt werden. Zum anderen sollten die Reaktoren im Mikromaßstab aufgebaut werden, um den Chemikalienverbrauch möglichst gering zu halten und so eine ökonomisch sinnvolle Detektionseinheit ergeben.

Der theoretische Teil dieser Arbeit zeigt den aktuellen Stand auf dem Gebiet der Wir-kungsbezogenen Analyse sowie die aktuell gebräuchlichen biochemischen Testverfahren mit Schwerpunkt auf Enzyminhibitions- und Leuchtbakterientests.

Teil II

Theoretische Grundlagen



1 Wirkungsbezogene Analytik

1.1 Prinzip

Eine besondere Herausforderung im Umweltmonitoring ist die Etablierung von schnellen und kostengünstigen analytischen Methoden [Rodriguez-Mozaz, 2005], da immer mehr gefährliche Stoffe in der Umwelt gefunden werden, die akute oder chronische toxische Wirkungen auf Flora und Fauna und somit auch auf den Menschen haben.

Meist werden in der Ökotoxikologie Einflüsse von Chemikalien auf die Umwelt in Labortests untersucht, da Messungen in Ökosystemen nicht möglich sind. Hierbei werden in der Regel Proben auf bekannte Schadstoffe hin untersucht und mit chemischer Analyse detektiert. Bei einer Risikoabschätzung muss jedoch bei der Modellierung auf Faktoren wie Bioakkumulation und kombinierte Effekte von verschiedenen Substanzen eingegangen werden [van der Hoeven, 2004].

Problematisch bei der Einstufung von Umweltproben bezüglich ihres Gefährdungspotentials ist die Tatsache, dass toxikologisch relevante Substanzen oft in sehr geringen Mengen vorliegen oder durch eine Substanz verschiedene Effekte hervorgerufen werden können. V. a. chronische Effekte, bedingt durch die kontinuierliche Anwesenheit kleinster Substanzmengen, sind oft schwer nachzuweisen und beruhen auf Schätzungen [van der Hoeven, 1997].

Eine weitere analytische Herausforderung stellt die Vielzahl an Chemikalien dar, die in Umweltproben vorhanden sind. Dabei erfolgt der Eintrag nicht nur aus industriellen Quellen. Es handelt sich auch um pharmazeutisch genutzte Stoffe sowie Haushaltschemikalien. Die Metabolisierungswege von Chemikalien in der Umwelt erweitern die stoffliche Vielfalt zusätzlich. Eine Risikoeinschätzung von Umweltproben durch das Testen jeder einzelnen Komponente ist nicht realisierbar.

Zur Bestimmung der toxikologischen Effekte von Substanzen oder ganzen Umweltproben wurden in der Vergangenheit und bis heute verschiedene Testorganismen eingesetzt. Zu diesen zählen v. a. Fische [Buikema, 1982], später auch Pflanzen, Mikroorganismen und wirbellose Tiere [Farré, 2003]. Zusätzlich existieren immer mehr elektrochemische, DNA-basierte, Biosensoren [Mascini, 2001], aber auch andere, auf molekularer Ebene ablaufende Testsysteme, basierend auf z. B. Antikörpern oder Enzymen [Rogers, 1995].

Problematisch bei allen Testsystemen ist die Tatsache, dass der Nachweis der toxischen Wirkung nur spezifische Relevanz gegenüber den eingesetzten Targetstrukturen zeigt und

so eventuell toxische Effekte gegen andere Targets nicht erkannt werden. Außerdem können durch diese Testsysteme keine Angaben zur chemischen Identität von toxischen Stoffen gemacht werden. Bei der Analyse von komplexen Proben, ohne vorherige Separation der Komponenten, können lediglich Summenparameter ermittelt und angegeben werden.

Ein neuer Ansatz ist die Wirkungsbezogene Analytik (WBA) [Hock, 2006]. Hier wird die Bestimmung von toxischen Parametern mit biologischen Testverfahren sinnvoll mit der chemischer Analytik verbunden. So kann eine Abschätzung der toxikologischen Gefährdung durch Probeninhaltsstoffe mittels effektorientierter Schadstoffidentifizierung (*Effect Directed Analysis*, EDA) [Brack, 2003] vorgenommen werden (Abbildung 1.1). Diese Kopplung von analytischer Chemie und Biotest wurde schon mehrfach in der Literatur beschrieben. Neben der Bezeichnung *Effect Directed Analysis* für diese Art der Analytik findet man auch die Bezeichnungen *Bioresponse-Linked Instrumental Analysis* (BLIA) [Bilitewski, 2000] oder *Toxicity Identification Evaluation* [Ankley, 1995]. Dabei ist Letzteres ein Verfahren, bei dem mehrere Methoden zur Anwendung kommen, wo hingegen in der WBA oft nur ein biochemisches Detektionsverfahren verwendet wird.

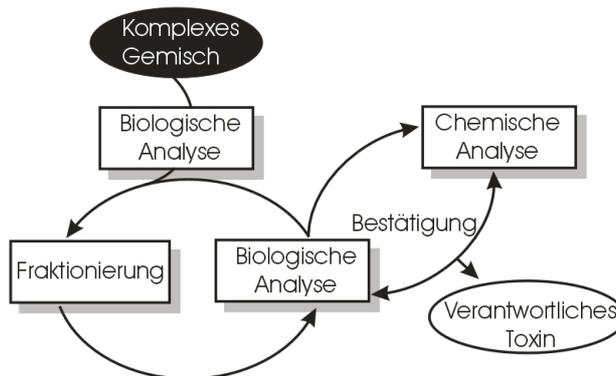


ABBILDUNG 1.1: Schematische Darstellung der WBA nach Brack [Brack, 2003].

Werden Biotests, wie oben erwähnt, auf molekularer Ebene durchgeführt, so können toxische Effekte zeitnah gemessen werden. Da bei diesen Tests – im Gegensatz zu Tests mit Organismen – nur ein Target vorliegt, kann zusätzlich zur Aussage über die Toxizität bestimmt werden, welche toxischen Mechanismen den Substanzen zugrunde liegen. Tabelle 1.1 zeigt Biotargets, die für die WBA auf molekularer Ebene eingesetzt werden. Alle Targets haben biologische Schlüsselrollen in Organismen inne. Vor allem bei der Bestimmung von akuter Toxizität ist eine möglichst zeitnahe Erkennung wichtig. Daher ist eine analytische Anwendung von Zielstrukturen, die eine Rolle bei der Entfaltung der giftigen Wirkung spielen, eine entscheidende Applikation. Solche einfachen Biotests können allerdings nicht den komplexen Metabolismus im menschlichen Körper nachzeich-

nen. Positive Testergebnisse geben allerdings Hinweise darauf, dass die Effekt-ursachenden Substanzen potentielle gefährliche Wirkungen auch auf den menschlichen Organismus haben können.

TABELLE 1.1: Biomolekulare Erkennungselemente für den Einsatz in der Wirkungsbezogenen Analyse mit humaner Relevanz nach Bilitewski *et al.* [Bilitewski, 2000].

Target	Beispiele	Biologische Funktion	Wechselwirkende Substanzen	Effekt
<i>Enzyme</i>				
	Acetylcholinesterase	Synapsen	Organophosphate, Carbamate	Neurotoxisch
	Kinasen, Phosphatasen	Signalübertragung	Chemotherapeutika, Tumorpromotoren, Immunosuppressoren	Wachstum, Entwicklung
	Proteinphosphatase 1 und 2A	Leberzellen	Microcystine	Hepatotoxizität
	Cytochromoxidase	Atmung	CN ⁻ , N ³⁻	Atmung, Zelltoxizität
<i>Ionenkanäle</i>				
	Ca ²⁺ -Kanal	Synapsen	Algentoxine	Neurotoxizität
	Na ⁺ -Kanal	Synapsen	Algentoxine	Neurotoxizität
<i>Transportproteine</i>				
	Hormonbindende Globuline	Hormontransport im Blut	Endokrine Disruptoren	Wachstum, Entwicklung, Reproduktion
<i>Rezeptoren</i>				
	Östrogenrezeptor	Zellkern	Endokrine Disruptoren	Wachstum, Entwicklung, Reproduktion
	Androgenrezeptoren	Zellkern	Endokrine Disruptoren	Wachstum, Entwicklung, Reproduktion
	Nikotinischer Acetylcholinrezeptor	Synapsen	Anatoxine (Rezeptorantagonist)	Neurotoxizität
<i>Nukleinsäuren</i>				
	DNA-Doppelstrang	Chromosomen	Intercalierende polyzyklische Aromaten	Gentoxizität
<i>Cytoskelett</i>				
	Tubulin	Zellteilung	Colchicin, Taxol	Zelltoxizität
<i>Ribosomen</i>				
	rRNA	Proteinsynthese	Ribotoxine	Zelltoxizität

1.2 Strategien

Zur Durchführung der WBA kann auf verschiedene Möglichkeiten zurückgegriffen werden. Die biochemische Erkennung kann entweder vor der physiko-chemischen Trennung in Form eines Vorsäulenansatzes erfolgen, oder als Nachsäulenansatz durchgeführt werden. Letztere Methode kann als offline-Messung durchgeführt werden oder automatisierbar als online-Messung, was technisch anspruchsvoller, jedoch oft zeitsparender und optimaler ist.

Die WBA von Schadstoffen in Umweltmatrizes basiert auf einer Reihe gut entwickelter Methoden: Extraktionen, Aufreinigung, Biotests, Fraktionierung und chemische Analyse bzw. Strukturaufklärung. Die Auswahl der Biotests wird durch die zu beantwortende Fragestellung festgelegt, so z. B. der Einsatz von Testbatterien beim Abdecken von breiten Wirkungsspektren oder die Verwendung von *Daphnia magna* bei der Bestimmung von neurotoxischen Insektiziden [Brack, 2006].

1.2.1 Vorsäulenansatz

Bei dem Vorsäulenansatz wird die Probe zunächst auf toxische Effekte hin untersucht. Dabei wird zuvor oft lediglich eine grobe Trennung der Substanzen aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften vorgenommen. Die Toxizitätstests werden anschließend mit den einzelnen Fraktionen durchgeführt.

Die sich aus den Tests ergebenden Summenparameter für die einzelnen Fraktionen in Bezug auf die Toxizität geben Aufschluss darüber, bei welchen dieser Fraktionen eine genauere Untersuchung mittels chemischer Analyse notwendig ist.

Im Folgenden soll anhand einiger Beispiele aus der Literatur die Methode „Vorsäulenansatz“ genauer vorgestellt werden.

Die Anwesenheit von Östrogenen und Xenoöstrogenen wurde durch einen indirekten *Enzyme-Linked Receptor Assay* (ELRA) mit Östrogenrezeptoren in Mikrotiterplatten (MTP) durchgeführt. Die strukturelle Aufklärung der Analyten erfolgte durch flüssigkeitschromatographische (LC), mit Massenspektrometrie (MS) gekoppelte Messungen (LC-MS) [Seifert, 1999].

Lee *et al.* präsentierten eine Möglichkeit zur Bestimmung von polyzyklischen Aromaten (PAH) aus Umweltproben [Lee, 2003]. Dabei wurden Leuchtbakterien vom Stamm GC2 (rekombinantes *Escherichia coli* (*E. coli*)) auf Glaskügelchen mithilfe einer Agar-Matrix in einem Polypropylenröhrchen immobilisiert. Dieses Teströhrchen wurde mit

einer Glasfaseroptik verbunden und in ein Reaktionsgefäß eingeführt, in dem Nährmedium vorhanden war und in das Proben eingespritzt werden konnten. Durch Messung der Lumineszenz im Teströhrchen konnten Inhibitionswerte ermittelt und toxische Effekte festgestellt werden. Bei positiv getesteten Proben konnten durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit UV-Detektion und Differentieller Refraktometrie die genauen Gehalte an PAHs bestimmt werden.

Ein anderer Ansatz basiert darauf, diejenigen Analyten mit ähnlichen biologischen Eigenschaften vorab anzureichern. Dabei wurden immobilisierte Biotargets wie Rezeptoren oder Enzyme (siehe Tabelle 1.1) verwendet [Brenner-Weiß, 2003]. Die Anreicherung erfolgte ansonsten in vergleichbarer Weise wie bei der Immunoaffinitätsanreicherung, bei der fixierte Antikörper Verwendung finden [Stevenson, 2000]. Da Antikörperbindungen keine biologischen Effekte bedingen, sondern Antikörper lediglich zur Unterscheidung von „eigenen“ und „nicht-eigenen“ Strukturen fähig sind, können diese nicht für die WBA eingesetzt werden. Durch die so erzielte Anreicherung wird eine Abreicherung der Matrix für spätere analytische Methoden erreicht.

Zur Bestimmung von Microcystinen in Algenblüten wurde ein Toxizitätstest vorgestellt, bei dem Feenkrebslarven (*Thamnocephalus platyurus*) als Target dienen. Dabei wurden die Algenzellen zur Probenvorbereitung lyophilisiert, aufgeschlossen, und mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert. Der Biotest erfolgte in der Art, dass je 10 Larven für 24 h einer Lösung (0.1 mg/mL) aus dem zuvor hergestelltem trockenen Algenextrakt ausgesetzt wurden. Anschließend erfolgte die Auswertung mikroskopisch durch das Auszählen der toten Larven (Larven, die sich nicht bewegten) [Keil, 2002]. Die Quantifizierung der Analyten wurde mit Hilfe von LC-Photodiodenarray (PDA)-Messungen durchgeführt. Die Identifizierung der Microcystine erfolgte mit *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation* (MALDI)- *Time of Flight* (TOF) Analyse [Fastner, 1999].

Kapillarelektrophoretische Immunoassays (CEIA) bieten eine Möglichkeit, die zwar nicht im Sinne der WBA sind, aber dennoch die Kombination von Analyttrennung und hochspezifischer Antikörpererkennung mit sensitiven Detektionsmöglichkeiten wie der laserinduzierten Fluoreszenzmessung ermöglichen [Goryacheva, 2007]. Um Urin auf Methadon, dessen Metaboliten sowie auf Amphetamine zu untersuchen, wurde von Thormann *et al.* ein auf Kapillarelektrophorese (CE) basierendes Verfahren vorgestellt [Thormann, 2000]. Nach der Vorinkubation von Probe und Antikörperlösung wurde ein fluorophormarkierter Tracer zugegeben und weiter inkubiert. Durch anschließende CE

konnte detektiert werden, ob Analyten vorhanden waren. Die chemische Aufklärung erfolgte durch CE-MS.

1.2.2 Toxicity Identification Evaluation

Eine besondere Form des Vorsäulenansatzes stellt die *Toxicity Identification Evaluation* (TIE) Methode dar, die vor allem Anwendung in der Sedimentanalytik [Carr, 2001] und damit verbunden in der Analytik von Porenwasser zur Qualitätsbestimmung von Sedimenten [Chapman, 2001] findet. Diese Methode wurde von der amerikanischen Umweltbehörde (EPA) vorgeschlagen und in Richtlinien festgehalten. Die TIE-Analyse wird in drei Phasen unterteilt: Phase I charakterisiert die toxischen Eigenschaften der Proben [U.S. EPA, 1991]. In Phase II erfolgt die Identifizierung der Analyten durch analytische Methoden [U.S. EPA, 1993]. In Phase III wird eine Verifikation der Analyseergebnisse durchgeführt [U.S. EPA, 1994].

Während Phase I werden verschiedene Tests durchgeführt (Abbildung 1.2), die es unter anderem notwendig machen, den pH-Wert zu ändern. Dies kann drastische Auswirkungen auf die Toxizität der Probe haben. Ionisierbare organische Bestandteile, wie z. B. einige Pestizide, durchdringen Zellmembranen im ungeladenen Zustand einfacher und verändern dadurch ihren toxischen Effekt [Doe, 1988]. Außerdem werden z. B. Belüftungstests durchgeführt, um herauszufinden, ob toxische Effekte auf flüchtigen oder oxidierbaren Substanzen beruhen. Tests mit Chelatbildnern wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) werden durchgeführt, um Metallkationen von Aluminium, Kobalt, Kupfer, Eisen, Zink oder Nickel zu eliminieren und mit vergleichenden Toxizitätstests auf deren vorherige Anwesenheit zu prüfen.

In Phase II wird, abhängig von den in Phase I ermittelten toxikologisch wirkenden Stoffklassen, mit analytischen Methoden eine chemische Analyse durchgeführt. Zeigten sich z. B. Metallionen, kann die chemische Bestimmung durch Atomabsorptionsspektroskopie erfolgen. Wurden polare organische Verbindungen gemessen, kann die Identifizierung durch HPLC-MS erfolgen. Bei nichtionischen organischen Verbindungen kann gaschromatographische Trennung mit MS-Kopplung erfolgen.

Phase III dient zur Verifikation der in den ersten zwei Phasen erhaltenen Ergebnisse. Hier wird unter anderem durch Korrelation, Evaluation von relativen Speziessensitivitäten und Spiking-Experimente festgestellt, ob zuvor erhaltene Effekte real oder durch Artefakte hervorgerufen waren. Dazu ist es häufig notwendig, mehrere Methoden

anzuwenden, um eine sichere Aussage machen zu können. Bei den reproduzierbaren Ergebnissen kann davon ausgegangen werden, dass die identifizierten Stoffe verantwortlich für die Effekte sind.

Eine toxizitätsorientierte Abwasseranalyse besteht demnach aus Extraktion, Fraktionierung, Bestimmung der toxikologischen Parameter, Identifizierung der Substanzen und Bestätigung der Ergebnisse [Reemtsma, 2001].

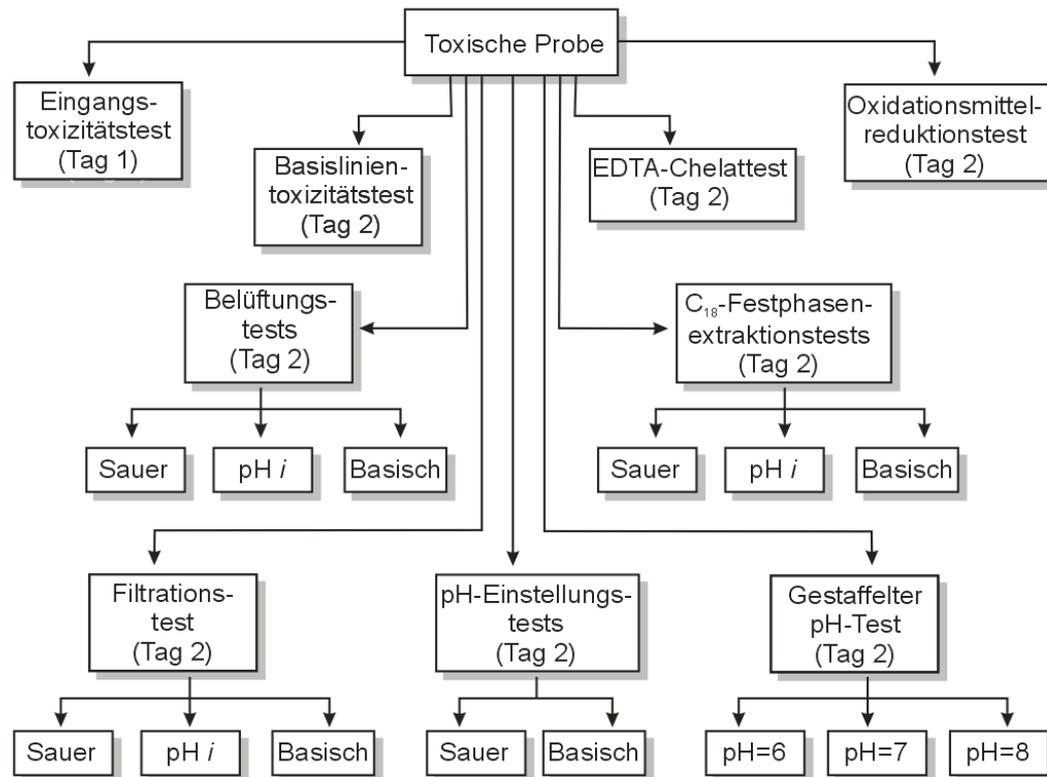


ABBILDUNG 1.2: Schematische Verfahrensweise in Phase I der TIE, dabei ist pH *i* der eigene pH-Wert der Probe ohne Modifikation [U.S. EPA, 1991].

1.2.3 Nachsäulenansatz

Eine andere Strategie verfolgt die WBA in Form des Nachsäulenansatzes. Hier erfolgt ein biologischer Erkennungsschritt, nachdem die Probe durch analytische Verfahren wie der chromatographischen Trennung in ihre einzelnen Bestandteile aufgetrennt wurde. Der Vorteil dieser Reihenfolge liegt v. a. darin, dass in der Regel Probenvorbereitungsschritte bei chromatographischen Verfahren notwendig sind und somit eventuell störende Matrixeffekte bei den Biotests ausbleiben. Dies wirkt sich auf die Reproduzierbarkeit der durchgeführten biochemischen Tests aus, die aufgrund der störenden Matrixeinflüsse als fragwürdige analytische Instrumente bezeichnet wurden [de Castro, 2003].

Werden Biosensoren in der Analytik angewandt, die auf Enzyminhibition [Amine, 2006] beruhen und ohne vorhergehende chromatographische Trennung eingesetzt werden, ist deren Anwendungsmöglichkeit begrenzt. Die Differenzierung zwischen verschiedenen Schadstoffen, die in einer Probe enthalten sind, kann bei diesem Ansatz nicht erfolgen, da die Möglichkeit besteht, dass der gleiche Biosensor auf Pestizide und Schwermetalle anspricht. Diese Problematik entfällt oder wird zumindest abgeschwächt, wenn zuvor eine chromatographische Auftrennung der Komponenten erfolgt. Das gleiche Problem kann bei Toxizitätstests mit lebenden Organismen auftreten, bei denen die Ausbildung des toxischen Effektes oft auf komplexe Wirkung verschiedener Toxine beruht. Dadurch kann ein Test unter Umständen bei verschiedenen Substanzklassen positiv ausfallen.

Die Kopplung von Biodetektion, z. B. in Form von Biosensoren, und chromatographischer Trennung zeigt jedoch andere Probleme. Es muss eine Kompatibilität zwischen den Trennbedingungen und den Bedingungen für die Messung mit dem Biosensor herrschen. Außerdem muss eine reproduzierbare Regeneration, z. B. durch Ersatz der Biokomponenten möglich sein, um eventuelle Schwankungen der Signalstärke zu verhindern [Fishman, 1998].

In neuerer Zeit geht der Trend in der Forschung eher hin zu Mikro- und Nanosensorik, d. h. zur Integration von Nanotechnologie, Mikrofluidik und bioanalytischen Messsystemen [Baeumner, 2005].

Offline-Detektion

Die Kopplung mit offline-Methoden fand in der Vergangenheit häufiger Anwendung als die direkte online-Kopplung [Kraemer, 1994]. Hierbei kann die biologische Aktivität in Fraktionen getestet werden, die nach einer chromatographischen Trennung aufgefangen wurden. Dazu kann das Eluat über den gesamten Zeitraum der Trennung in konstanten Zeitintervallen fraktioniert gesammelt werden [Uhlig, 2005]. Eine andere Möglichkeit besteht, indem einzelne Peaks nach der Detektion, z. B. durch einen UV-Detektor, als Fraktionen gesammelt werden [Vega, 1996]. Die erstere Möglichkeit bietet den Vorteil, dass auch Substanzen, die durch konventionelle Detektoren nicht erfasst werden können, in den toxikologischen Untersuchungen berücksichtigt werden.

Unter den Methoden, die sich der offline-Detektion bedienen, werden Toxizitätstests häufig in Mikrotiterplatten durchgeführt. So beschreiben Uhlig *et al.* [Uhlig, 2005] die Analyse von Pilzkulturüberständen. Der Detektion voran ging eine semipräparative HPLC-Trennung, bei der das gesamte Eluat während des chromatographischen Laufes in

sechs Fraktionen gesammelt wurde. Der Biotest wurde in der Art durchgeführt, dass Schweine-Nierenzellen (PK15) in Kavitäten von Mikrotiterplatten mit Aliquoten der Fraktionen für 24 h inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Zugabe von Alamar Blue™ [Nakayama, 1997]. Nach 4 h wurde durch Fluoreszenzmessungen die reduzierte Form des Farbstoffes detektiert.

Bei der Bestimmung von organischen Toxinen in Abwasser wurde zur groben Fraktionierung eine HPLC-Trennung durchgeführt und dabei das Eluat über die gesamte Trennung hinweg in Fraktionen gesammelt [Grung, 2007]. Die Fraktionen wurden durch Biotests mit Leberzellen von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) in Form von Kulturmedien auf Östrogene und planare dioxinähnliche Substanzen untersucht. Dabei wurde die Östrogenbestimmung aus dem Zellüberstand durchgeführt. Durch ELISA-Messungen wurde auf den Östrogen-Biomarker Vitellogenin getestet [Tollefsen, 2003]. Die Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität wurde direkt in der Zellkultur nach [Ganassin, 2000] bestimmt. Die chemische Analyse der Fraktionen erfolgte durch gaschromatographische Bestimmung mittels Massenspektrometrie (GC-MS).

Nicht nur im Umweltmonitoring ist die WBA notwendig, sondern auch z. B. im Bereich der Doping-Kontrollen stellt diese Art der Analyse einen wichtigen Bestandteil der Analytik dar. Ein auf einem Hefetest mit Androgenrezeptoren basierenden Bioassay zur Detektion von Designer-Steroiden im Urin wurde von Nielsen *et al.* beschrieben [Nielsen, 2006]. Im Anschluss an eine HPLC-Trennung von Urinproben wurde das Eluat parallel auf zwei Mikrotiterplatten fraktioniert gesammelt. In einer Platte wurden Biotests durchgeführt und auf die androgene Bioaktivität getestet. Hierzu wurden die Proben über 24 h mit Hefezellen inkubiert, die den humanen α -Androgenrezeptor exprimierten [Gaido, 1997]. Der Inhalt von positiv getesteten Kavitäten wurde von der zweiten Platte verwendet, um hochaufgelöste Massenspektrometrie nach erneuter flüssigchromatographischer Trennung zu betreiben. Nachteilig an dem Verfahren sind die langen Inkubationszeiten mit den rekombinanten Hefezellen im Bioassay.

Ein weiterer Ansatz, bei dem eine chromatographische Trennung mit Biotests gekoppelt werden kann, ist die an eine Dünnschichtchromatographie angeschlossene Detektion von Acetylcholinesterase- und Butyrylcholinesteraseinhibitoren [Marston, 2002]. Zwiebeln verschiedener Narzissengewächse wurden extrahiert und Aliquote mit geeignetem Lösungsmittel auf Dünnschichtplatten entwickelt. Nach der Entwicklung wurden die Platten getrocknet und mit einer entsprechenden Enzymlösung besprüht. In einem Behälter mit hoher Luftfeuchtigkeit wurden die Platten für 20 min bei 37°C inkubiert. Die Aktivitäts-

bestimmung der Acetylcholinesterase (AChE) wurde durch Auftragen von Fast Blue B Salzlösung, die durch eine enzymkatalysierte Reaktion zu einem lila Farbstoff umgewandelt wurde, visualisiert.

Um Ligand-Rezeptorbindungen schneller und auf molekularer Ebene detektieren zu können, kann man sich verschiedener Techniken bedienen. Möglichkeiten hierfür bieten die Fluoreszenzpolarisationsmessungen [Sportsman, 2000], die Messung der Fluoreszenzresonanzenergie [Pope, 1999] oder die Oberflächen-Plasmonenresonanz-Technik [Wilson, 2002].

Effizienter als chemische und biologische Detektion nacheinander durchzuführen wäre die zeitgleiche Messung beider Parameter. Zeck *et al.* [Zeck, 2001a] beschreiben eine multidimensionale Detektionsmöglichkeit nach vorangegangener umkehrphasenchromatographischer (RP-HPLC) Trennung von Microcystinen. Dabei wurde das Eluat nach UV-Detektion automatisiert in Fraktionen gesammelt und in Kavitäten einer MTP mit einem Proteinphosphataseinhibitionstest auf die Anwesenheit von Microcystinen und Nodularin geprüft. Zur Quantifizierung und strukturellen Charakterisierung wurden zusätzlich ELISA-Tests mit drei unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern parallel zur Enzyminhibition durchgeführt. Die positiv getesteten Fraktionen wurden durch ESI-TOF-MS-Messungen näher untersucht.

Online-Detektion

Eine schnellere Variante des Nachsäulenansatzes ist die online-Detektion. Hierbei werden die chromatographische Trennung und der biochemischer Detektionsschritt direkt miteinander gekoppelt. Dabei können verschiedenste chromatographische Verfahren wie CE, Gaschromatographie (GC) oder HPLC zum Einsatz kommen. Im Folgenden werden für die drei genannten Trennverfahren in der Literatur beschriebene Kopplungsmethoden aufgezeigt.

Biomolekulare Erkennung nach CE: Ein wichtiger Aspekt bei der Kombination von Kapillarelektrophorese und Biodetektoren muss immer berücksichtigt werden: am System liegen hohe Spannungen an. Dies ist bei der Auswahl der Art der Biodetektion in Betracht zu ziehen [Bossi, 2000].

Als Target bei der biomolekularen Detektion wurden von Fishman *et al.* ganze Zellen der Zelllinie NG108-15 verwendet. Dazu wurden Zellen am Ende einer CE auf einem bewegbaren Objektträger, der durch ein Mikroskop beobachtet werden konnte, aufgebracht [Fishman, 1996]. Die auf der Membran sitzenden Rezeptoren binden Liganden mit

hoher Spezifität. Dies wurde genutzt, um Bradykinin zu detektieren. Durch Interaktion mit dem Rezeptor wird eine Erhöhung des Ca^{2+} -Gehalts im Cytosol ausgelöst. Diese Reaktion konnte mit einem intrazellulären Calciumindikator durch Fluoreszenzmessung an einer einzelnen Zelle ausgelesen werden. Durch die Tatsache, dass mehrere Zellen immobilisiert waren, konnten mehrere Messungen hintereinander gemacht werden, da jedes Mal eine andere, frische Zelle zur Verfügung stand.

Eine andere Methode, bei der ebenfalls ganze Zellen als Targets verwendet werden, bietet die Detektion von Ionenströmen durch die Zellmembran mit der *Patch-Clamp*-Technik. Diese Technik wurde bereits 1976 von Neher und Sackmann beschrieben [Neher, 1976]. Es wurden kleine Flächen der Zellmembran zur Messung verwendet. Durch das Messen des Öffnens und Schließens der Ionenkanäle, der Desensibilisierungsrate oder der Kinetik können detaillierte Aussagen über die Interaktion von Rezeptoren und Agonisten erhalten werden. Die Detektion der Rezeptorbindung erfährt durch das Messen des Ionenstroms durch die Ionenkanäle eine biochemische Verstärkung. Da oftmals viele strukturell ähnliche Agonisten eine Reaktion auslösen, muss die Applikation der Analyten auf die Zellen einzeln geschehen, um selektive Informationen zu erhalten. Dies kann durch Kopplung an vorhergehende CE realisiert werden.

Zur Detektion der neuroaktiven Substanzen Glutamat und 2-Carboxy-3-carboxymethyl-4-isopropenylpyrrolidin, die beide Agonisten des Glutamatrezeptors vom AMPA-Typ sind, wurde nach einer CE-Trennung mit der oben beschriebenen *Patch-Clamp*-Methode der Ionenfluss an der Membran von olfaktorischen Interneuronen von *Sprague-Dawley* Ratten gemessen [Jardemark, 1997]. Dazu wurden die Zellen frisch präpariert und in einer Petrischale direkt an den CE-Auslass gebracht. Die Glutamatrezeptoren vom NMDA-Typ wurden inaktiviert. Den Migrationszeiten der Substanzen, die im Elektropherogramm gemessen wurden, konnten durch fraktioniertes Sammeln und anschließende HPLC-MS-Analytik die Strukturinformationen zugeordnet werden.

Biomolekulare Erkennung nach GC: Bereits 1957 wurde gezeigt, dass Insektenantennen elektrische Signale geben, wenn sie flüchtigen Substanzen ausgesetzt werden [Schneider, 1957]. Die Signale konnten in Form eines Elektroantennogrammes aufgezeichnet werden. Die hohe Sensibilität und Selektivität macht diese Technik zu einer starken analytischen Technik, die als GC-elektroantennographische Detektion (GC-EAD) bezeichnet wird [Moorhouse, 1969]. Die größte Schwierigkeit bei dieser Anordnung ist die Gestaltung des Interfaces, mit dem die Antennen an die GC angeschlossen werden.

Eine Möglichkeit der parallelen Detektion mit EAD und Flammenionisationsdetektor (FID) wurde von Dickens vorgestellt [Dickens, 1999]. In dieser Arbeit wurde das Verhalten der Antennen verschiedener Käfer bei der Messung von Kartoffelpflanzenemissionen getestet. Auch die Kopplung von GC-EAD und MS ist beschrieben [Weissbecker, 1004]. Mithilfe der Antenne von *H. bajulus* wurden flüchtige Komponenten von Pinien (*Pinus sylvestris* L.) bestimmt, indem der Gasfluss geteilt wurde und Messungen parallel mit MS und EAD erfolgten. Die Antennen wurden bei dem verwendeten Interface auf beiden Seiten in Elektrolytlösungen getaucht, der Mittelteil wurde quer über den Gaskanal gespannt. Im Vergleich zum MS-Chromatogramm zeigten sich beim EAD deutlich breitere Peaks und höhere Nachweisgrenzen.

Eine andere Detektionsmöglichkeit wurde 1964 von Fuller *et al.* vorgestellt. Dabei dient die menschliche Nase als Detektor [Fuller, 1964]. Die Gaschromatographie-Olfaktometrie Kopplung (GC-O) ist auch heute noch eine Methode mit breiter Anwendung und vielseitig einsetzbar [Fishman 1998]. Da die Analyten direkt in die menschliche Nase eingeblasen werden, kann diese Technik nicht zur Bestimmung von toxischen Komponenten verwendet werden. Der Einsatz liegt bei dieser Kopplung eher auf der Identifizierung von Aromastoffen in verschiedenen Matrices. Einen Überblick über verschiedene Techniken sind von van Ruth zusammen gefasst. Es existieren hauptsächlich vier GC-O-Methoden: die Verdünnungsanalyse, die Detektionsfrequenz-Methode, die nachträgliche Intensitätsbestimmungsmethode und die Zeit-Intensitätsmethode [van Ruth, 2001].

Ein Beispiel für eine GC-O-Anwendung zeigten Cullieré *et al.*, die Aromabestimmungen in Rotwein durchführten [Cullieré, 2004]. Nach Probenanreicherung durch Festphasenextraktion (SPE) wurde die GC-Analyse durchgeführt und mithilfe eines FID ein Chromatogramm parallel zu einem olfaktorischen Sensor aufgezeichnet.

Biomolekulare Erkennung nach LC: In der Literatur sind diverse biochemische Detektionsverfahren, die an die Flüssigkeitschromatographie gekoppelt wurden, beschrieben. Eine viel verbreitete Anwendung bei der Kopplung von Biodetektion und HPLC finden vor allem Enzyminhibitionstests und Rezeptorassays. Aufgrund ihres häufigen Einsatzes in der WBA soll auf diese Kopplungsmethoden in einem eigenen Kapitel (Abschnitt 1.4) eingegangen werden.

Nicht nur die HPLC wurde an Biosysteme gekoppelt. So zeigte Hirata die Kombination von Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) mit einem Enzyminhibitionsdetektor [Hirata, 2005]. Dabei wurden Inhibitoren der Protease

Subtilisin durch SEC getrennt. Die Detektion erfolgte in Form eines homogenen online-Assays, bei dem die Inhibition des Enzyms durch Zugabe eines FRET-Substrates (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) gemessen wurde. Die Inhibitormischung wurde mit einem Fluss von 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ getrennt und durch einen UV-Detektor das Chromatogramm aufgezeichnet. Das Eluat wurde nacheinander mit Protease (50 $\mu\text{L}/\text{min}$) und dem HIV-Protease-Substrat I (50 $\mu\text{L}/\text{min}$) zugegeben, so dass 1 min Inkubationszeit von Inhibitoren und Enzym eingehalten wurde. Die Detektion erfolgte nach einer Inkubationszeit von weiteren 2 min. An das Substrat waren das Fluorophor 5-[(2-Aminomethyl)amino]-naphthalen-1-sulfonsäure (EDANS) als Donor und die nichtfluoreszierende 4-(4-Dimethylaminophenyl-azo)benzoesäure (DABCYL) als Akzeptor kovalent gebunden. Um Dispersion zu vermeiden, wurden gestrickte Teflonschläuche als Reaktoren verwendet. Die Zugabe der beiden Lösungen erfolgte durch Superloops. Diese verhindern unspezifische Bindungen der Biomoleküle an der Oberfläche. Dadurch können teure Reagenzien gespart werden, da diese in der benötigten Menge eingesetzt werden können. Bei der Elution eines Inhibitors aus der SEC fand keine Spaltung des Substrates statt. Dadurch konnte die Anwesenheit fluorimetrisch detektiert werden, da die Anregungsenergie vom Donormolekül auf das Akzeptormolekül übertragen wurde und damit eine Verminderung der Signalintensität stattfand.

Auch ganze Zellgewebe und Mikroben, die mit Kohlenstoffpasten an Elektroden befestigt wurden, fanden Verwendung in Biodetektoren. Dabei wurde z. B. eine Paste aus Bananenfruchtfleisch und Graphit auf eine Elektrode aufgetragen [Wang, 1988]. Ein Problem bei dieser Messmethode sind lange Ansprechzeiten von 12 s bis hin zu mehreren Minuten. Durch die Immobilisierung der Bioproben konnten Inhibitoren gegen die spezifischen Enzyme der Gewebe oder Mikroben detektiert werden [Connor, 1990]. Durch die Parallelisierung der Messungen mit modifizierten und nicht modifizierten Elektroden kann direkt eine Aussage über die biogene Aktivität der Peaks gemacht werden.

1.3 Bestätigung der Effekte in der Wirkungsbezogenen Analytik

Vor allem bei offline-Methoden, bei denen größere Fraktionen gesammelt werden und bei Proben, die ohne Vortrennungen vermessen werden, ist eine sorgfältige Bestätigung der toxischen Komponenten wichtig. Auch bei online-Methoden können falsche Ergebnisse

erhalten werden, indem z. B. durch Koelution keine Reinstoffe in den chromatographischen Peaks vorliegen.

Daher ist eine stufenweise Bestätigung von Effekt und Verursacher eine sichere Methode, die zur Identifizierung der Substanzen führt. Bei der Anwendung der WBA in der Risikobewertung muss weiterhin das Gefährdungspotenzial bestätigt werden. Einen Vorschlag zur Bestätigung der Effekte geben Brack *et al.* (siehe Abbildung 1.3). Es handelt sich dabei um einen stufenweisen Ansatz [Brack, 2008].

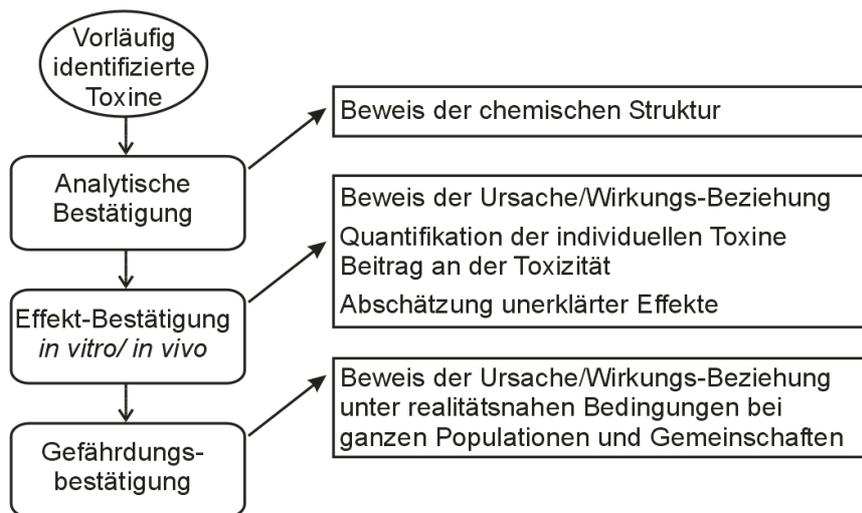


ABBILDUNG 1.3: Stufenweise Bestätigung gemessener Toxinen in der WBA [Brack, 2008].

Analytische Bestätigung: Nach der vorläufigen Identifizierung auf der Basis von Massenspektren kann eine genauere Strukturuntersuchung vorgenommen werden. Dies ist wichtig, da durch Koelution oder das Auftreten der Analyten in verschiedenen Isomeren die endgültige Bestätigung leiden kann. Daher sollte eine extensive Fraktionierung und hohe chromatographische Auflösung, wie z. B. Multistep-Prozeduren oder fraktionierte GC [Meinert, 2007] angestrebt werden. Die sicherste Methode zur Identifizierung bietet das Messen der Analyten durch Kernmagnetresonanzspektroskopie (NMR), was durch die benötigten Probenmengen oft nicht einfach zu bewerkstelligen ist, aber schon als Anwendung in der Literatur beschrieben wurde [Shiozawa, 2000].

Weitere Schritte zur Identifikation sind chromatographische Trennungen, idealerweise gekoppelt mit MS-Detektion. Die dadurch generierten Retentionsindizes sowie die Massenspektren dienen zur Festigung der Analytbestimmung [Belknap, 2006]. Ein genereller Vorteil bei der Bestimmung von unbekanntem Analyten in Proben ist die Existenz von reinen Standardsubstanzen, mit denen Spike-Experimente und vergleichende Analytik betrieben werden kann. Außerdem kann durch Datenbankrecherche eine weitere Bestäti-

gung der identifizierten Verbindungen erfolgen, wenn die fragliche Substanz gelistet ist und mit den chromatographischen Daten des Analyten übereinstimmt.

Bei der Identifizierung von neuen Umwelttoxinen ist die Massenspektrometrie in Form von LC-MS-MS ein wichtiges Werkzeug. V. a. die Kombination von TOF-MS und *Ion-Trap-MS* (IT-MS) zeigen, wie auch andere Hybrid-Geräte, z. B. mit Quadrupol und TOF (QpTOF-MS), den Vorteil, akkurate Massenbestimmung durchführen sowie Fragmentierungsmuster erhalten zu können.

Effekt-Bestätigung: Während die analytische Bestimmung der Aufklärung der chemischen Struktur dient, wird bei der Bestätigung des Effekts sichergestellt, dass die toxische Wirkung von dem identifizierten Analyten herrührt. Dies ist besonders bei Proben, die nicht in einzelne Bestandteile getrennt werden können, von großer Bedeutung.

Wichtige Werkzeuge dabei sind strukturelle Warnsignale [von der Ohe, 2005] und quantitative Struktur-Aktivitäts-Relationen (QSAR) [Liu, 2006]. Allen Bestätigungsversuchen liegen Modelle zugrunde. Bei der WBA wird v. a. das Konzept der Konzentrationsaddition verwendet. Dabei wird angenommen, dass der resultierende Effekt einer Probe sich additiv aus den Konzentrationen der enthaltenen Komponenten zusammensetzt.

Die einzelnen Analyten können sich jedoch entweder ähnlich verhalten oder unterschiedlich wirken. Aufgrund dieses Verhaltens wird die Auswahl der den Überlegungen zugrunde liegenden Modelle getroffen. Wo immer es möglich ist, sollte zur Bestätigung die komplette Dosis-Wirkungs-Beziehung herangezogen werden und nicht nur z. B. die EC₅₀-Werte. Dadurch lässt sich die unabhängige Aktivität einzelner Substanzen [Altenburger, 2004] im Fall von unterschiedlich wirkenden Substanzen bestimmen sowie das Konzept der Konzentrationsaddition, das bei gleichartig reagierenden Analyten angewandt werden kann [Altenburger, 2003], bestätigen.

Generell lässt sich eine sichere Aussage nur dann machen, wenn die Analyten total getrennt voneinander vorliegen und spezifische Toxizitätstests durchgeführt werden können. Bei Mischungen liegen den Betrachtungen immer diverse Annahmen zu Grunde, die teilweise nicht überprüfbar sind und somit zu vagen Aussagen bezüglich der einzelnen toxikologischen Wirkungen führen können.

Gefährdungsbestimmung: Die Bestimmung von toxikologischen Eigenschaften durch Tests mit einzelnen Spezies *in vivo* oder *in vitro* können als System von großer analytischer Wirkung sein, sind jedoch künstliche Systeme und limitiert in der Aussagekraft über

ökologische Relevanz. So ist z. B. die Bewertung von Stoffen in Böden und Sedimenten bezüglich ihrer Umweltgefährdung abhängig von der Bioverfügbarkeit. Dabei werden zwei komplementäre Aspekte betrachtet: 1) Die Biozugänglichkeit, die zwischen Molekülen, die leicht von Sedimenten desorbieren und solchen, die nicht in Porenwasser oder in Biota abgegeben werden, unterscheidet. 2) Die Gleichgewichtsverteilung von verfügbaren Toxinen gemäß ihrer chemischen Aktivität in verschiedenen Kompartimenten [Reichenberg, 2006]. So sind Sediment-Kontakt-Tests eine Möglichkeit, eine realistische Umweltisikobewertung vorzunehmen. Ein Beispiel für einen solchen Test ist die Verwendung von Frischwasser-Schlamm Schnecken *Potamopyrgus antipodarum*, bei denen durch direkten Kontakt die Stimulation der Embryoproduktion bestimmt wird [Hyne, 2003]. Eine andere Möglichkeit besteht in der Anwendung der WBA nicht auf das Sediment selbst sondern auf Gewebe von benthischen Organismen. Diese dienen im Vorfeld als biologischer Akkumulator und zeigen nur die Belastung an biogenen Toxinen. Dies wurde z. B. an den Muscheln *Mytilus edulis* für aromatische Kohlenwasserstoffe gezeigt [Donkin, 2003]. Konzepte, die die Bestätigung von toxischen Effekten auf der Ebene von Gemeinschaften zeigen, sind extrem rar. Die *Pollution-Induced Community Tolerance* (PICT) bietet einen vielversprechenden Ansatz, bei dem z. B. die Toxizität auf Periphyton [Schmitt-Jansen, 2005] oder Planktongemeinschaften [Peterson, 1998] getestet wird.

Zusammenfassung: Die Bestätigung ist ein kompliziertes Feld in der WBA. Durch das schrittweise Vorgehen werden sowohl der strukturelle Nachweis als auch die Ursache-Effekt-Beziehung sichergestellt. Alle Schritte sind mehreren Restriktionen unterworfen, so z. B. den geringen Probenmengen, der schlechte Verfügbarkeit von Standards und Referenzdaten, fehlendes Wissen über Konzentrations-Effekt-Beziehungen und das Verhalten bei Vorhandensein mehrerer Toxine sowie geringer Möglichkeiten von *in situ* Effekt-Bestimmungen.

1.4 Wirkungsbezogene online-Detektionsmöglichkeiten in der HPLC

Wie oben beschrieben, finden sich in der Literatur eine Vielzahl von Kopplungsmöglichkeiten von Detektion und Trennung im Sinne der WBA. Im Folgenden soll nur auf die Kombination von HPLC mit Enzyminhibitions- und Rezeptorbindungsassays eingegangen werden.

1.4.1 Enzyminhibitionsassays

Bei Biosensoren, die als Detektoren nach einer chemischen Trennung eingesetzt werden, dienen Enzyme häufig als Targetstrukturen [Weller, 2000]. Da Enzyme eine Vielfalt an Wechselwirkung und hohe Selektivität besitzen, sind sie sehr gut geeignet, verschiedene chemische Stoffgruppen zu analysieren [Faming, 1991]. Werden Enzyme als biochemische Detektionseinheit eingesetzt, so sind die Trenneffizienz der Chromatographie sowie die Enzymspezifität diejenigen Parameter, die zum Aufbau eines gut funktionierenden Analysensystems optimiert und aufeinander abgestimmt werden müssen. Das heißt, dass bei einer hohen chromatographischen Trennleistung das eingesetzte Enzym eine breitere Selektivität besitzen kann, um verschiedene Analyten enzymatisch detektieren zu können. Durch die Tatsache, dass ein Enzymmolekül bei entsprechender Inkubationszeit viele Substratmoleküle umzusetzen vermag, kann eine gute Signalverstärkung erzielt werden.

Die Enzyme werden in kombinierten Systemen oft entweder direkt auf die der Elektrodenoberfläche immobilisiert und meist amperometrisch ausgelesen [Gorton, 1994] oder aber in einem Enzymreaktor eingebettet. Letztere werden jedoch eher als Bioreaktoren denn als Biosensoren klassifiziert, da der biologische und der physikalische Transducer separat voneinander auftauchen [Emnéus, 1995].

Prinzipiell können bei der Kopplung von HPLC und Enzyminhibition zwei verschiedene Reaktortypen voneinander unterschieden werden: Die Enzyminhibition kann an der Oberfläche als heterogenes Format an immobilisierten Enzymen durchgeführt werden (*Immobilized Enzyme Reactor*, IMER) oder, als homogenes Format, mit freien Enzymen in einer Nachsäulenreaktion erfolgen.

HPLC und IMER: Die Anwendung der IMER-Technik stellt eine Möglichkeit zur Durchführung von Inhibitionstests in Form einer Nachsäulenreaktion dar. Einen Überblick über beschriebene Anwendungen dieser Technik geben Galensa und Girelli *et al.* [Galensa, 1993; Girelli, 2005].

Die Enzyme werden auf einem Trägermaterial immobilisiert, wobei dies *in situ*, also nach dem Packen einer Säule mit diesem Material, oder *in batch*, also vor dem Packen der Säule oder Kartusche, erfolgen kann [Massolini, 2001]. Der IMER wird kontinuierlich von Substratlösung durchspült. Bei dem Kontakt von aktivem Enzym und Substrat wird letzteres umgesetzt. Das vom umgesetzten Substrat erzeugte Signal (Fluoreszenz, UV-Absorption usw.) wird als konstante Basislinie aufgezeichnet. Gelangt aus der HPLC-Trennung ein Analyt in die Detektionskammer, der inhibitorische Wirkung auf die

Enzyme hat, so kommt es aufgrund eines geringeren Substratumsatzes zu einer Erniedrigung des Signals.

Ein Vorteil des IMERs besteht darin, dass verbrauchte Enzyme einfach physikalisch aus dem System entfernt und durch Neue ersetzt werden können [Günther, 1995]. Des Weiteren sind sie recht stabil und wieder verwertbar. Außerdem ist durch die Immobilisierung eine hohe Präzision und Reproduzierbarkeit möglich [Tsai, 1996]. Durch die Anbindung der Targetstrukturen an die Oberfläche sind keine Pumpen zur Beförderung der Enzymlösung in den Nachsäulenreaktor nötig. Damit kann der Aufbau eines entsprechenden Messapparatur deutlich vereinfacht werden und verhält sich somit weniger stör anfällig gegen technische Probleme.

Die Enzymkinetik stellt den limitierenden Faktor und einen wesentlicher Nachteil der IMER Technik dar. Die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktionen ist bei heterogenen Reaktionen langsamer als in vergleichbaren, homogen durchgeführten Vergleichsreaktionen [Park, 2003]. Vor allem bei der Detektion der kompetitiven Inhibitoren hängt die Inhibitionskinetik wesentlich von der Substratkonzentration ab. Um gleich bleibende Bedingungen über einen größeren Zeitraum zu gewährleisten, müssen die Enzyme regelmäßig regeneriert werden. Dies geschieht oft durch Spülen mit Reagenzlösungen. Beispiele hierfür sind Kaliumhexacyanoferratlösung bei Anwendung des Enzyms Galactoseoxidase [Bílková, 2002] oder Oximlösungen bei Acetylcholinesterasen-Biodetektoren [Worek, 2004]. Wenn diese Spülschritte nicht mehr ausreichen, kann entweder das gesamte Trägermaterial mit dem Enzym ausgetauscht werden oder eine neue Anbindung von Targets erfolgen.

Es konnte das Enzym Acetylcholinesterase durch spezifische Antikörper mit Koimmobilisation von Avidin-Biotin-Verbindungen auf Oberflächen angebunden werden. Durch die Avidin-Biotin-Bindung konnte die Regeneration und Beladung mit neuem Enzym einfach durchgeführt werden. Zuerst wurde das alte Enzym ausgewaschen und anschließend konnte durch Injektion frischer Enzymlösung dieses erneut immobilisiert werden [Markovarga, 1992].

Eine Möglichkeit, automatisiert Trägermaterial zusammen mit den Targets zu wechseln, wurde von Kindervater *et al.* beschrieben. Dabei wurde bei einer Fließinjektionsanalyse der Biodetektor mit AChE als Zielstruktur bestückt. Diese Enzyme wurden über Aminogruppen an magnetische Partikel gebunden. Die Aktivität der gekoppelten AChE wurde photometrisch und elektrochemisch getestet. Zur Anwendung als Detektionseinheit wurde beladenes Trägermaterial in einem permanenten Magnetfeld durch mehrfache

Injektion angereichert und somit der Reaktor gepackt. Um die Enzyme zu wechseln, wurde das Magnetfeld abgeschaltet und das Trägermaterial ausgewaschen. Anschließend konnte eine erneute Bepackung erfolgen [Kindervater, 1990]. Dieses Prinzip wurde bisher nicht in der Kopplung an eine HPLC-Trennung vorgestellt.

Die online-Kopplung eines IMERs als Nachsäulenreaktor nach einer HPLC-Trennung wurde mit dem Enzym Peroxidase gezeigt [Kurth, 1991]. Als Trägermaterial für die Enzyme diente poröses Glas. In einer HPLC-Trennung wurden verschiedene organische Peroxide getrennt und das Eluat anschließend mit *para*-Hydroxyphenyllessigsäure (PHOPA) als Substrat versetzt. Dieses Gemisch wurde durch einen IMER-Reaktor geleitet und so die enzymatisch katalysierte Reaktion mit PHOPA als Messgröße festgelegt. Die Peroxide als Inhibitoren führten zum Signaleinbruch.

HPLC und homogener Enzymreaktor: Bei homogenen Nachsäulenreaktoren werden sowohl Substrat als auch Enzym als Lösungen kontinuierlich zum HPLC-Eluat zugepumpt. Dabei ist meist eine Verdünnung des Eluates notwendig, um die desaktivierende Wirkung v. a. der organischen Lösungsmittel auf die Enzyme gering zu halten. Ein Vorteil gegenüber der IMER-Technik ist die Tatsache, dass zu jeder Zeit frische Enzyme zur Verfügung stehen.

Bereits 1976 wurde ein Nachsäulenreaktor mit Gasblasensegmentierung zur Bestimmung von Carbamaten vorgestellt [Moye, 1976]. Als Enzym kam Cholinesterase unter anderem aus Stubenfliegenköpfen zum Einsatz. N-Methylindoxylacetat diente als Substrat. Die Detektion erfolgte fluorimetrisch bei einer Anregungswellenlänge von 430 nm und einer Emissionswellenlänge von 501 nm. Die Reaktionszeiten betragen max. 4.5 min zur Inhibition und 3.5 min zur Inkubation mit dem Substrat.

Zur Untersuchung von Antioxidanzien und Spezies, die reaktive Sauerstoffverbindungen bilden, wurde ein online-Assay etabliert, der auf der Hemmung von Meerrettichperoxidase beruht. Dazu wurden nach RP-HPLC-Trennung mit einem Methanol-Wasser-Gradient 10% des Eluates in den Biodetektor geleitet, der Rest wurde zur UV-Detektion genutzt. Das Eluat wurde mit Substrat (PHOPA) und Kofaktoren aus einer Superloop sowie mit verschiedenen Enzymen (Meerrettichperoxidase, Cytochrom P450s, Cytochrom-P450-Reduktase, Superoxid-Dismutase) aus einer zweiten Superloop versetzt. Durch eine Abfolge verschiedener biochemischer Prozesse wird das PHOPA in sein Dimer umgebaut, welches ein Fluorophor darstellt und zur Detektion dient. Zur Vermeidung einer Verschiebung der Basislinie wurde das Eluat mit einem gegenläufigen Metha-

nol-Wasser-Gradienten derart modifiziert, dass immer der gleiche Anteil an Methanol in den Biodetektor gelangte. Da Antioxidanzien den Prozessen entgegenwirken, wurde bei dieser Stoffklasse negative Signale erhalten, bei den anderen untersuchten Stoffen resultierten positive Signale, also eine Verstärkung des Prozesses [Kool, 2007].

Zur Analyse von Inhaltsstoffen in Narzissenknollen wurde ein Test auf toxische Wirkung gegen AChE vorgestellt [Ingkaninan, 2000]. Nach isokratischer HPLC-Trennung mit Methanol-Wasser-Diethylamin (40:60:0.05, v/v/v) auf einer RP-Säule wurde der Eluatfluss geteilt und 0.04 mL/min gelangten in den Biodetektor. Zunächst wurden die Substrate Acetylthiocholiniodid und Dithionitrobenzoesäure (Ellmanns Reagenz) sowie das Enzym AChE mit einem Fluss von je 0.04 mL/min zudosiert. Anschließend erfolgte die Inkubation in einem gestrickten Reaktor mit 300 µL Innenvolumen. Die Detektion erfolgte schließlich durch einen UV/Vis-Detektor bei 405 nm. Parallel zur Detektion mit dem Biodetektor wurden Chromatogramme mit einem UV-Detektor und einem massenspektrometrischen Detektor aufgezeichnet.

Eine andere Anwendung der AChE als Targetmolekül in einem online-Assay zeigten de Jong *et al.* [de Jong, 2006]. Nach Trennung der Analyten wurde der Eluatstrom mit Enzymlösung versetzt und in einer ersten gestrickten Reaktionsschleife inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Acetylcholin, das in einer zweiten Reaktionsschleife enzymatisch unter Bildung von Essigsäure gespalten wurde. Die Detektion erfolgte durch ein Elektrospray-Massenspektrometer. Bei Anwesenheit eines Inhibitors konnte das Acetylcholin in geringerem Umfang umgesetzt werden.

Verschiedene Pflanzenextrakte wurden von Schenk *et al.* auf die Anwesenheit von Phosphodiesterase-Inhibitoren untersucht [Schenk, 2003]. Dazu wurde nach einer HPLC-Trennung mit Methanol und Wasser als Lösungsmittel ein Eluatfluss von 100 µL/min abgetrennt, der Biodetektion zugeführt und mit je 25 µL/min einer Phosphodiesteraselösung sowie einer Lösung cyclischen Guanosinmonophosphats als Substrat versetzt. In einer Inkubationsschleife konnte das Substrat durch das Enzym hydrolysiert werden, wodurch die Intensität des Fluoreszenzsignals abnahm. Bei Anwesenheit von Inhibitoren wurde der Umsatz verringert und resultierte in einer Verstärkung der Fluoreszenzsignale.

Zur Analytik von hydrolysierten Milchproben wurde ein Verfahren angewandt, bei dem nach chromatographischer Trennung die Analyten parallel mit konventionellem Detektor und Biodetektor untersucht wurde [van Elswijk, 2003]. Nach der Trennsäule wurde das Eluat aufgeteilt und ein Teil mit MS gemessen. Dem anderen Teil wurde Angiotensin-konvertierendes Enzym zugesetzt und für 60 s inkubiert, anschließend wurde

das intern gequenchte Substrat ortho-Aminobenzoessäure-Phenylalanin-Arginin-Lysin-Dinitrophenol-Prolin zugegeben und für 120 s inkubiert. Das Auslesen erfolgte durch einen Fluoreszenzdetektor.

1.4.2 Rezeptorbasierte Detektionssysteme

Rezeptorbasierte Methoden basieren auf einer der folgenden drei Möglichkeiten der Detektion: (a) der Bestimmung der funktionalen Auswirkung, z. B. Zellproliferation, (b) der Produktion von sekundären Botenstoffen wie Calcium, oder (c) der Interaktionen von Rezeptoren mit Liganden [Major, 1995]. Bei der Anwendung von freien Rezeptoren bleibt nur die Möglichkeit, über Interaktionen eine Detektion vorzunehmen. De Jong *et al.* zeigen verschiedene Beispiele von Bindungsassays auf [de Jong, 2005]. Um die Rezeptor-Ligand-Bindung erfassen zu können, muss mindestens einer der Bindungspartner eine Markierung tragen. Radioisotopenmarkierung z. B. durch ^3H , ^{125}I oder ^{32}P haben den Vorteil, dass keine Effekte oder gar Einbußen auf die Affinität auftreten. Nachteilig an dieser Art der Markierung sind neben Kosten, Gesundheit und Abfall, auch die relativ langen Zeiten, die zur Detektion benötigt werden. So benötigt man ca. 25 min, um bei der Radioisotopenmarkierung 10 000 Zerfälle zu messen, wohingegen dafür bei der Fluoreszenzmessung lediglich eine Messzeit von 50 ms nötig ist.

Eine grobe Einteilung der Methoden kann in heterogene und homogene Assays vorgenommen werden, wobei bei heterogenen Methoden die freien Liganden nach der Inkubation entfernt werden [Hemmilä, 1997]. Da bei homogenen Rezeptor-Ligand-Bindungsassays keine Abtrennung von freien und gebundenen Liganden vorgenommen werden muss, sind diese bei online-Detektionen einfacher zu handhaben. Zur Detektion finden Markierungsmethoden wie Fluoreszenzpolarisation (FP), Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) und Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) Anwendung. Allerdings zeigte sich, dass homogene Assays aufgrund von Hintergrundfluoreszenz oft geringere Sensitivitäten besitzen als heterogene [de Jong, 2005].

Gegenüber Bioassays mit Antikörpern, haben Membranrezeptorassays den Vorteil, dass durch sie ganze Chemikalienklassen mit toxischer, pharmakologischer und physiologischer Bedeutung erkannt werden können. Durch die Eigenschaft, dass Rezeptorsysteme durch viele, strukturell verwandte endokrine Agonisten aktiviert werden, können klassenspezifische Biosensoren gebaut werden. Der Nachteil an solchen Systemen ist die Tatsache, dass aufgrund von Selektivitätsproblemen oft keine Identifizierung individueller

Substanzen erfolgen kann [Fishman, 1998]. Um das Problem der absoluten Spezifität zu überwinden, wurde in der Arbeitsgruppe um Zare ein Verfahren entwickelt, bei dem CE und *Patch-Clamp*-Technik kombiniert wurden [Orwar, 1996]. Durch detaillierte Informationen über aktivierte Rezeptoren wie Kinetik, Desensibilisierungsrate der Ionen-Kanäle und Öffnungs- und Verschlusszeiten sowie die Migrationszeiten aus der CE, konnten Agonisten identifiziert werden.

Die Konkurrenz zwischen Analyt und zugesetztem markierten Liganden um die Rezeptorbindung ist eine Möglichkeit der Detektion. Dazu müssen vor der Messung jedoch die freien Liganden abgetrennt werden. Dies kann durch Affinitätsäulen [Tang, 2000], *Restricted-Access*-Materialien [Boos, 1999] oder Hohlfasermodule [Lutz, 1996] erfolgen.

Einen Rezeptor-Affinitätsdetektor (RAD) zur Detektion von strukturell ähnlichen Steroiden in Urinproben mit Hilfe von humanem Östrogenrezeptor stellten Oosterkamp *et al.* vor [Oosterkamp, 1996]. Die gesamte Einheit wurde als online-Methode gestaltet. Nach isokratischer Trennung der Komponenten mit Phosphatpuffer-Methanol-Acetonitril (50:25:25 v/v/v) wurde kontinuierlich Östrogenlösung zum Eluat gepumpt und inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Liganden Coumestrol, mit dem ebenfalls inkubiert wurde. Nachdem die Inkubationsreaktoren durchlaufen waren, wurde durch eine *Restricted-Access*-C18-Säule gebundenes und freies Coumestrol abgetrennt.

Auch die Technik der *Free-Flow Electrophoresis* (FFP) kann dazu verwendet werden, freie von gebundenen Liganden abzutrennen [Mazereeuw, 2000]. Die Detektion konnte nach der Separation z. B. durch Fluoreszenzmessung erfolgen. Eine Kopplung dieser Methode an eine vorangeschaltete HPLC-Trennung wurde mit Biotin und Streptavidin als Modellsubstanzen für Ligand- und Rezeptorproteine gezeigt. Dabei wurde zu Proben zuerst Streptavidin zugegeben und damit inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte anschließend durch Zugabe von Fluorescein-markiertem Biotin. Dieses bildete Komplexe mit freiem Streptavidin aus. Die Trennung von freiem und an Streptavidin gebundenem markiertem Biotin erfolgte via FFP. Jedoch stellte die Optimierung der Separation von gebundenem und freiem Liganden einen großen Aufwand dar. Die Puffer des biochemischen Detektors und die mobile Phase mussten zusätzlich in Bezug auf die elektrophoretische Trennung optimiert werden.

Zur Analyse von Urokinase und dazu kreuzreaktiven Verbindungen wurde ein RAD von Oosterkamp *et al.* entwickelt [Oosterkamp, 1998]. Nach einer Trennung durch RP-HPLC wurde kontinuierlich Fluorescein-markierter Urokinaserezeptor zum Eluat zugepumpt

und für 60 s inkubiert, so dass affine Analyten aus der Trennung mit den Rezeptoren spezifisch wechselwirken konnten. Anschließend wurden ungebundene Rezeptoren aus der Lösung entfernt. Dazu wurde das Gemisch über eine Affinitätssäule gepumpt, auf der Urokinase immobilisiert war und somit freie Rezeptoren binden konnte, während Rezeptor-Ligand-Komplexe die Säule durchqueren und durch einem Fluoreszenzdetektor detektiert werden konnten. Bei langen chromatographischen Läufen ergab sich durch die Sättigung der Affinitätssäulen ein Problem bei der Detektion, da auch ungebundene Rezeptoren passieren konnten und zur Signalbildung beitrugen. Eine weitere Schwierigkeit bestand darin, die Rezeptoren mit dem Fluorescein zu markieren. Idealerweise sollte nur ein Fluorophor pro Rezeptor gebunden werden, um dessen Bindungseigenschaften nicht wesentlich zu beeinflussen.

Einen homogenen Rezeptor-Ligand-Bindungsassay, der ohne die Abtrennung von freien Liganden auskommt, stellten Schobel *et al.* vor [Schobel, 2001]. In Extrakten aus Naturprodukten sollten Analyten, die an Östrogenrezeptoren binden, identifiziert werden. Dabei erfolgte zunächst eine chromatographische Trennung und anschließend nacheinander die Zugabe von Rezeptor und Ligand zu einem Teil des Eluats. Als Detektionseinheit wurde ein Fluoreszenzdetektor verwendet. Das Prinzip der Messung bestand darin, dass der Ligand Coumestrol die noch freien Bindungsstellen an den Rezeptoren belegt. Dieser Ligand ist ein Fluorophor und hat ein Emissionsmaximum bei 438 nm, wenn er mit 340 nm angeregt wird. Der Ligand-Rezeptor-Komplex zeigt eine Blauverschiebung hin zu 410 nm und hat eine viermal höhere Signalintensität als ungebundenes Coumestrol [Nelson, 1984]. Dadurch kann durch Positiv- und Negativkontrolle das Signal bei 410 nm zur quantitativen Analyse genutzt werden.

2 Nachsäulenreaktoren bei der Flüssigkeitschromatographie

Durch die Anwendung von Nachsäulenreaktoren werden vor allem zwei Ziele verfolgt: Zum einen soll die Selektivität durch spezifische Reaktionen erreicht werden, zum anderen soll die Sensitivität gegenüber konventionellen Detektoren verbessert werden. Bei der Verwendung in der WBA spielt vor allem die selektive Detektion toxischer Komponenten in Probenlösungen eine wichtige Rolle. Die Empfindlichkeit spielt nur gegenüber den Analyten eine Rolle, die auch in sehr geringen Konzentrationen toxikologische Relevanz besitzen.

Vorteile von Nachsäulenreaktoren gegenüber vorgeschalteten Reaktoren sind v. a., dass die Trennungen in ihrer ursprünglichen Form durchgeführt und somit teilweise aus der Literatur übernommen werden können sowie die Tatsache, dass Artefakte bei den Biotests eine geringere Rolle spielen. Außerdem zeigt sich ein entscheidender Vorteil darin, dass Reaktionen nicht abgeschlossen und die Produkte nicht stabil sein müssen. Die einzige Voraussetzung ist die Reproduzierbarkeit [Brinkman, 1987]

In den Nachsäulenreaktoren konnten verschiedenste Arten von Reaktionen durchgeführt werden, z. B. chemische [Saccetto, 1994] und photochemische Derivatisierung [Woolf 1999] oder Enzymreaktionen [Susumu, 1992]. Je nach Bauart werden andere Ansprüche an die Reaktorbauweise gestellt. Im Folgenden wird zunächst auf die hydro-mechanischen Anforderungen eines Nachsäulenreaktors eingegangen. Anschließend werden verschiedene Design-Möglichkeiten mit Anwendungsbeispielen aufgezeigt. Der Schwerpunkt hierbei soll auf Anwendungen aus dem Bereich der WBA liegen.

2.1 Anforderungen an die Hydromechanik

Bei der WBA wird zuerst ein Gemisch potenzieller Toxine durch HPLC aufgetrennt und anschließend nach Zugabe von Zielstrukturen mit toxikologischer Relevanz mit diesen zur Reaktion bzw. Wechselwirkung gebracht. Die Reaktion zwischen Analyt und Target läuft im Nachsäulenreaktor ab bevor eine online-Detektion vorgenommen wird. Beim Aufbau eines miniaturisierten Nachsäulensystems müssen Überlegungen bezüglich Flüssigkeitstransport, Mischen und Dispersion angestellt werden.

2.1.1 Flüssigkeitstransport

Bei vielen Anwendungen der Nachsäulenreaktoren müssen zum Eluatstrom weitere Reagenzien kontinuierlich zugeführt werden. Dazu können je nach hydrodynamischer Gegebenheit unterschiedliche Pumpen eingesetzt werden [Nguyen, 2002]. Bei mechanischen Pumpen werden dynamische Pumpentypen von Verdrängerpumpen unterschieden. Erstere sind charakterisiert durch permanente Energiezugabe, wo hingegen bei Verdrängerpumpen periodisch Energie zugeführt wird. Einen Überblick über die Anwendung der Pumpen und verschiedene Möglichkeiten des Flüssigkeitstransportes in mikrofluidischen Systemen finden sich in der Literatur [Nguyen, 2002; Laser, 2004].

Bei höheren Flüssen in der Größenordnung von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ bis zu einigen mL/min kommen in der Regel Verdrängerpumpen wie peristaltische Pumpen, Zahnriemen- und Kolbenpumpen zur Anwendung. Bei geringeren Flüssen im nL/min -Bereich, wie er bei *Lab-on-a-Chip*-Technologien benötigt wird, werden die Flüsse meistens nicht durch mechanische Pumpen gewährleistet, sondern durch Elektrophorese, Elektroosmose oder magnetohydrodynamische Pumpen [Bilitewski, 2003].

Die nichtmechanischen Pumpen haben gegenüber den mechanischen den Vorteil, dass sie eine Pfropfströmung in Kanälen oder Kapillaren ausbilden [Shao, 2006]. Diese kommt daher, dass durch das Anlegen eines externen elektrischen Feldes eine elektrische Doppelschicht durch den Reaktor bewegt wird. Durch die Viskosität des Mediums bildet sich über den gesamten Querschnitt eine homogene Fließgeschwindigkeit aus [Engelhardt, 1993a]. Demgegenüber bildet sich bei mechanisch bewegten Flüssigkeiten stets ein parabolisches Strömungsprofil aus. Dabei liegt die höchste Fließgeschwindigkeit in der Achse des Kanals. Daraus resultiert eine Dispersion der Analyten entlang der Fließrichtung (vgl. Abschnitt 2.1.2). Aufgrund dessen wären nichtmechanische Pumpen für den Aufbau eines Fließreaktors zu bevorzugen. Allerdings bedingt der Umgang mit elektrokinetisch erzeugter Bewegung einen deutlich höheren Aufwand und bringt oft Kompatibilitätsprobleme mit sich.

Neben der Dispersion sind noch weitere Parameter wie der aufzubringende Rückdruck sowie die Pulsation beim Aufbau eines Nachsäulenreaktors zu beachten. Dies hat ebenfalls Einfluss auf die Wahl der geeigneten Pumpen für das jeweilige System.

Zur Kontrolle des Flusses wird je nach Flussrate auf unterschiedliche Messmethoden zurückgegriffen [Nguyen, 2002]. Bei hohen Flussraten im mL/min -Bereich kann durch mechanisch bewegte Teile die Flussrate bestimmt werden. Bei geringeren Flussraten kommen andere Messprinzipien zum Einsatz, meist in Form von thermischen Sensoren. Dabei

wird über eine Heizung und Thermosensoren, die in den Fluss eingebracht werden, die Wärmekonvektion gemessen, die ein Maß für die Fließgeschwindigkeit darstellt [Lammerink, 1993].

Auch die Thermostatisierung der Reagenzien kann bei manchen Pumpentypen problematisch sein. Der Einsatz v. a. von Biomolekülen, wie sie in der WBA verwendet werden, macht es notwendig, konstante Temperaturen halten zu können. Dies ist z. B. bei Spritzenpumpen nur schwer zu erreichen. Sogenannte *Superloops* bieten hierfür eine Lösung. Diese als Vorratsbehälter dienenden Schläuche können einfach thermostatisiert werden [Kool, 2005]. Die Beförderung der Reagenzien erfolgt durch das Pumpen von Verdrängungsflüssigkeit [van Elswijk, 2003].

2.1.2 Dispersion

Die Geschwindigkeit des Volumenstroms ist über den Querschnitt nicht konstant. Die Art des Flusses ist entscheidend für die Änderung der Geschwindigkeitsvektoren in Abhängigkeit deren Position. Man kann zwischen laminarem und turbulentem Fluss unterscheiden [Gerthsen, 1997].

Ursache für diese Geschwindigkeitsunterschiede liegen an Reibungskräften aufgrund der Viskosität. Diese lassen die Geschwindigkeit an der Kontaktstelle mit der festen Wand gleich Null werden, die Geschwindigkeit steigt zur Mitte hin an und wird im Zentrum des Rohres maximal.

Da bei turbulentem Fluss aufgrund chaotischer Bewegung und Vermischung der Moleküle ein Austausch der Kraftmomente stattfindet, resultiert insgesamt eine gleichmäßigere Geschwindigkeitsverteilung. Man erhält eine sogenannte Pfropfströmung (Abbildung 2.1, gepunktete Linie). Im Gegensatz dazu ist der Fluss bei laminarer Strömung aus einzelnen Schichten aufgebaut, wodurch kaum ein Energietransfer stattfindet und sich so ein parabolisches Strömungsprofil ausbildet [Mott, 2000].

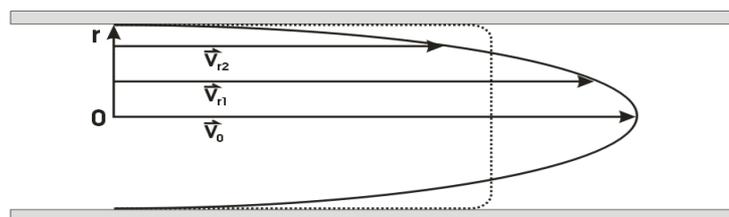


ABBILDUNG 2.1: Strömungsprofile bei turbulenter (gepunktete Linie) und laminarer (durchgezogene Linie) Strömung mit ortsabhängigen Geschwindigkeitsvektoren. Es resultiert ein parabolisches Strömungsprofil (laminar) bzw. eine Pfropfströmung (turbulent).

Wenn ein Flüssigkeitszylinder der Länge l und dem Radius r mit der Geschwindigkeit v bewegt wird und die Druckkraft $F_P = \pi r^2 \Delta p$ mit der Reibungskraft $F_R = 2\pi r l \eta$ im Gleichgewicht steht, gilt:

$$\frac{dv}{dr} = \frac{\Delta p}{2\eta l} r \quad (2.1)$$

Dabei bezeichnen die Variable η die Viskosität und p den Druck. Das parabolische Strömungsprofil lässt sich mathematisch wie folgt beschreiben, wobei v_0 die Strömungsgeschwindigkeit im Zentrum des Rohres mit dem Radius R ist:

$$v = v_0 - \frac{\Delta p}{2\eta l} r^2 \quad \text{mit} \quad v_0 = \frac{\Delta p}{4\eta l} R^2 \quad (2.2)$$

Durch das Gesetz von Hagen-Poiseulle wird der Volumenstrom eines laminaren Flusses beschrieben:

$$\dot{V} = \int_0^R 2\pi r v(r) dr = \frac{\pi \Delta p}{8\eta l} R^4 \quad (2.3)$$

Die mittlere Strömungsgeschwindigkeit über das gesamte Rohr errechnet sich dann aus:

$$\bar{v} = \frac{\dot{V}}{\pi R^2} = \frac{1}{2} v_0 \quad (2.4)$$

Da der Fluss der Flüssigkeit im Zentrum des Rohres doppelt so hoch ist wie die durchschnittliche Geschwindigkeit, kommt es bei Nachsäulenreaktoren zur axialen Dispersion zweier aufeinander folgender Analytbanden.

Mit Hilfe der Reynolds-Zahl \Re [Kutter, 2004] kann unter gegebenen Bedingungen, also einem gegebenen Rohrradius R , einer gegebenen Strömungsgeschwindigkeit v sowie der Dichte ρ und der Viskosität η der Flüssigkeit, eine Aussage darüber gemacht werden, ob in der Kapillare eine laminare oder eine turbulente Strömung vorherrscht.

$$\Re = \frac{2 \cdot v \cdot \rho \cdot R}{\eta} \quad (2.5)$$

Für Reynoldszahlen unter einem Wert von 1000 herrschen laminare Bedingungen [Gerthsen, 1997]. Der Umschlagbereich, in dem eine laminare Strömung durch kleine Störungen in der Stromlinie in eine turbulente Strömung umschlagen kann, liegt bei $1000 < \Re < 2000$. Bei höheren Reynoldszahlen gelangt man in den Bereich der turbulenten Strömung.

Wie das folgende Beispiel zeigt, werden Nachsäulenreaktoren in der Regel bei laminarer Strömung betrieben [Weigl, 1999]. Bei einer Flussrate von 140 $\mu\text{L}/\text{min}$ durch eine

lineare Kapillare mit 0.52 mm Innendurchmesser, also einer Strömungsgeschwindigkeit von $1.01 \cdot 10^{-2}$ m/s, errechnet sich eine Reynoldszahl von $\Re=6$. Bei der Berechnung wurden sowohl Dichte als auch Viskosität der Flüssigkeit als ähnlich der Werte für Wasser bei 25°C angenommen ($\rho=997 \text{ kg/m}^3$, $\eta=8.91 \cdot 10^{-4} \text{ kg/ms}$ [Mott, 2000]). Unter diesen Bedingungen liegen eindeutig laminare Bedingungen vor.

Das daraus resultierende parabolische Strömungsprofil bildet bei Nachsäulenreaktoren ein Problem. Chromatographische Banden, die in den Reaktor gelangen, verbreitern sich. Dies führt zu Einbußen in der Auflösung sowie zum Sinken der Nachweisempfindlichkeit aufgrund von Verdünnung der Analyten. Die Varianz der Bandenverbreiterung bei laminarem Strömungsprofil kann unter idealen Bedingungen nach Gleichung (2.6) berechnet werden [Deelder, 1978]:

$$\sigma_t^2 = \frac{t_r d^2}{96D_m} \quad (2.6)$$

Es sind t_r die mittlere Reaktionszeit, d der Innendurchmesser der Reaktionskapillare und D_m der molekulare Diffusionskoeffizient des Analyten.

Bei einer offenen Reaktionskapillare mit 0.52 mm Innendurchmesser beträgt die Standardabweichung σ_t nach einer Reaktionszeit von 15 min nach Gleichung (2.6) 0.84 min unter Verwendung einem typischen Diffusionskoeffizienten für kleine Moleküle von $D_m=1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ zur Berechnung. Unter der Annahme einer Gauß-förmigen Bande beträgt die Halbwertsbreite $w_{0,5}=2,354 \cdot \sigma_t$ [Cammann, 2001]. Bei oben gegebenem Beispiel ist also davon auszugehen, dass die Analytbande sich durch die Reaktionskapillare um ca. 2.0 min verbreitern würde.

Nachdem neben den Retentionszeiten ($t_{R,1}$ und $t_{R,2}$) die Basispeakbreite ($w_b=4\sigma$) in die Auflösung R_S mit eingeht (Gleichung (2.7)), kommt es bei einer Bandenverbreiterung ebenfalls zur Abnahme der Auflösung [Skoog, 1996].

$$R_S = \frac{2 \cdot [(t_R)_2 - (t_R)_1]}{W_1 + W_2} \quad (2.7)$$

Theoretisch kann durch das Verkleinern des Kapillardurchmessers die Varianz verringert werden (Gleichung (2.6)), jedoch erhöht sich nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz der Rückdruck im System dadurch. Da der Radius mit der sechsten Potenz in die Gleichung eingeht, würde beim Halbieren des Radius der Rückdruck bei gleich bleibendem Volumenstrom und das 64fache steigen.

Dem Effekt der Bandenverbreiterung kann z. B. entgegen gewirkt werden, indem die Kapillare verformt wird. Dies kann durch einfaches Wickeln oder durch gestrickte Reaktoren realisiert werden. Andere Möglichkeiten bieten die Segmentierung durch Gas oder Flüssigkeiten sowie die Erzeugung turbulenter Strömungen in gepackten Reaktoren.

2.1.3 Mischen

Da mikrofluidische Reaktoren meistens durch niedrige Reynoldszahlen gekennzeichnet sind (Abschnitt 2.1.2) und somit bei laminarem Fluss einzelne Flüssigkeitsschichten nebeneinander fließen, kann die Mischung verschiedener Flüssigkeiten, z. B. Eluat und Reaktandenlösungen, nur durch Diffusion erfolgen. Dieser Diffusionsweg ist in zwei Dimensionen über den Radius r abhängig von der Zeit τ [Berg, 1993]:

$$r^2 = 4D\tau \quad (2.8)$$

Bei einem typischen Diffusionskoeffizienten D von $5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ für sphärische Moleküle zwischen 500 g/Mol und 1000 g/Mol [Jakeway, 2000] errechnet sich eine Diffusionszeit von ca. 0.5 min für 0.25 mm, einem gängigen Radius von Kapillaren. Für 50 μm werden lediglich 1.25 s benötigt.

Es wurden verschiedene Methoden angewandt, um bei *Lab-on-a-Chip*-Aufbauten eine Verwirbelung von Flüssigkeiten zu erhalten [Hessel, 2005]. Bei dem Bau von Mischstrukturen kann auf zwei Methoden zurückgegriffen werden: aktives und passives Mixen [Locasico, 2004]. Bei aktiven Mixern ist zusätzlicher Energieaufwand notwendig. Dies kann durch Mikromixer erfolgen [Lu, 2001]. Eine andere Möglichkeit besteht darin, durch akustische Anregung von im System befindlichen Luftblasen eine Mischung hervorzurufen. Dabei dient die Phasengrenze als Membran, die zur Schwingung angeregt wird [Liu, 2002]. Durch Verwendung einer piezoelektronischen Keramik konnte diese durch Ultraschall angeregt werden und somit ein turbulenzähnlicher Fluss erzielt werden [Yang, 2001]. Auch der Einsatz von elektrischen Feldern zur Erzeugung von elektrophoretischen Kräften, die zur Verwirbelung an der Grenzschicht zwischen zwei laminaren Schichten ist in der Literatur beschrieben [Yaralioglu, 2004].

Außer aktiven Mixern kommen auch passive zum Einsatz, bei denen die Molekularbewegungen ausgenutzt werden. Dabei wird die Distanz im Kanal durch geometrisches Verformen der Reaktorkapillare verringert. Mit Abnahme der Kapillargröße wird die Diffusionszeit verkürzt (Gleichung (2.8)). Dieses Prinzip wurde für Fließinjektionsanalytik

(FIA) gezeigt [Veenstra, 1999]. Jedoch ist diese Methode limitiert durch den sich erhöhenden Rückdruck, der nach dem Hagen-Poiseulle-Gesetz steigt.

Eine weitere Möglichkeit, eine Durchmischung zu erreichen, ist das Einsetzen von Gas- oder Flüssigkeitssegmenten. Das Mischen kann dabei durch Ausbilden eines bolusförmigen Flusses verstanden werden [Snyder, 1976b]. Durch die Reibung an der Kapillarwand bilden sich zwei parallele zirkulare Strömungen aus (Abbildung 2.2), wodurch das Vermischen in longitudinaler Richtung schnell stattfinden kann. Der Einsatz von Poly(dimethylsiloxan) als Segmentierungsflüssigkeit wurde von Tice *et al.* beschrieben, um farbige wässrige Flüssigkeiten in Mikrokanälen zu vermischen [Tice, 2003].

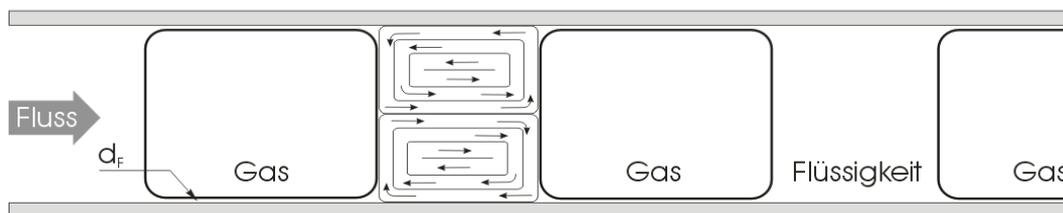


ABBILDUNG 2.2: Zirkulare Strömungen innerhalb eines Flüssigkeitssegments bei gassegmentiertem Fluss. Durch den Flüssigkeitsfilm d_f findet ein leichter Übertrag in das nachfolgende Segment statt [Snyder, 1976a; Snyder, 1976b].

2.2 Gestrickte/gehäkelte/gewickelte Kapillarreaktoren

Wie im vorherigen Kapitel dargestellt, zeigen sich auf Grund der geringen Flüsse und Flussraten bei Nachsäulenreaktoren im Regelfall laminare Fließprofile. Bei geraden Kapillaren kann in diesem Fall die Durchmischung lediglich durch Diffusion stattfinden. Diese ist oft ungenügend und zeigt sich im Rauschen der Grundlinie, bedingt durch Flüssigkeitsfahnen, die sich durch den laminaren Fluss ausbilden.

Um diese Effekte zu unterdrücken, muss die Schichtenbildung in der Kapillare aufgehoben werden, was durch einen radialen Massentransfer erreicht werden kann. Dies kann durch Wickeln der Kapillare oder durch Stricken der Reaktionskapillare mit einer Strickliesl erfolgen [Engelhardt, 1982]. Auch das Häkeln von Kapillaren erweist sich als funktional [Poulsen, 1986]. Dabei zeigt sich, dass zwischen gehäkelten und gestrickten Kapillaren keine Unterschiede im Gebrauch festzustellen waren [Engelhardt, 1993b].

Durch Zentrifugalkräfte treten in gewickelten Kapillaren Sekundärflüsse in den Biegungen auf, die orthogonal zur Fließrichtung verlaufen und so zu radialer Durchmischung führen [Kaufman, 1998]. Da die Fließgeschwindigkeit im Zentrum der Kapillare am größten ist, wird kontinuierlich die Flüssigkeit von hier nach außen Richtung Kapillarwand

gewirbelt. Dadurch wird die Flüssigkeit in zwei Strömungen durch die Kapillare geleitet [Moulin, 1996].

Um bessere quantitative Aussagen über die Güte der gestrickten Kapillaren machen zu können, wurden theoretische und experimentelle Behandlungen von Tijssen [Tijssen, 1980] und Deelder *et al.* [Deelder, 1983] durchgeführt. Der Einfluss der Wicklung auf die Dispersion kann über die Dean-Zahl Dn (Gleichung (2.9)) und die Schmidt-Zahl Sc (Gleichung (2.10)) abgeschätzt werden.

$$Dn = \Re \cdot \sqrt{\frac{r_t}{r_c}} \quad (2.9)$$

$$Sc = \frac{\eta}{D_m \cdot \rho} \quad (2.10)$$

Einfluss auf diese Zahlen haben die Reynoldszahl \Re , die Radien der Kapillare r_t und der Wicklung r_c sowie die Viskosität η und die Dichte ρ der durchgeleiteten Flüssigkeit.

Für Werte von $Dn^2 \cdot Sc \leq 100$ konnte kein signifikanter Unterschied der axialen Dispersion zwischen geraden und gewundenen Reaktionskapillaren festgestellt werden. Im Bereich von $100 \geq Dn^2 \cdot Sc \geq 5000$ hingegen konnte die axiale Dispersion um bis zu zwei Drittel reduziert werden [Janssen, 1976]. Das bedeutet, dass die Bandenverbreiterung mit enger Wicklung und häufigen Richtungswechseln reduziert werden kann. Die in der Literatur beschriebenen Methoden arbeiten meist mit Flussraten in der Höhe von 10 cm/s und mehr.

Bei Untersuchungen zur Verringerung der Dispersion in Kapillarreaktoren wurden gestrickte und gerade Kapillaren nach Microbore-HPLC miteinander verglichen [Kaufman 1998]. In Kapillaren mit 300 μ L Volumen wurden Flüsse von 30 μ L/min bis zu 1.2 mL/min getestet. Die Dispersion konnte durch gestrickte Kapillaren um 44% verbessert werden. Da die Dispersion im linearen Reaktor sehr groß ist, reicht diese Maßnahme nicht aus, um die chromatographische Auflösung über längere Strecken bei geringer Flussrate aufrecht zu erhalten. Daher empfiehlt sich der Einsatz der gestrickten Kapillaren v. a. bei kurzen Inkubationszeiten bis zwei Minuten bei Flussraten im mL/min-Bereich [Engelhardt, 1993b; Kuhlmann, 1997].

2.3 Gassegmentierte Reaktoren

Neben der physikalischen Verformung der Kapillaren besteht mit der Segmentierung des Flusses eine weitere Möglichkeit, die longitudinale Dispersion zu unterdrücken. Außerdem wird das Mischen der Reaktionslösungen verbessert (Abbildung 2.2). Dazu kann die Segmentierung der Reaktandenlösung entweder mit Gas oder mit nichtmischbaren Flüssigkeiten erfolgen. Die Longitudinaldispersion wird unterdrückt, da die Segmente in sich abgeschlossen sind und kein Übertrag in andere Segmente stattfinden kann. Dieses Prinzip wurde bereits 1957 von Skeggs beschrieben [Skeggs, 1957] und in der Klinischen Chemie in Form von FIA-Systemen angewandt. Hier hat sich der *Autoanalyzer* der Firma Technicon herausgehoben [Cerdà, 1999].

Die Flüssigkeitssegmentierung hat der Gassegmentierung gegenüber den Vorteil, dass die Kompressibilitätsunterschiede der verschiedenen Phasen geringer sind. Dies äußert sich in den Druckschwankungen und somit in der Fließgeschwindigkeit im System. Fluktuierende Fließgeschwindigkeiten sind oft die Ursache von verrauschten Grundlinien [Edwards, 1999].

Die Segmentierung mit nichtmischbaren organischen Lösungsmitteln wird in der online-Extraktion von in wässriger Phase enthaltenen Substanzen eingesetzt [Fogelqvist, 1986; Apfel, 1984]. Soll keine Extraktion durchgeführt werden, können nur hydrophile Analyten mit dieser Methode untersucht werden [Scholten, 1981]. Da in der WBA häufig hydrophobe, durch RP-HPLC getrennte Analyten untersucht werden und die Nachsäulenreaktionen auf Grund der Biokompatibilität in wässriger Lösung durchzuführen ist, käme es während der Inkubationszeiten zur Extraktion der Analyten in die organische Phase. Dadurch stünden sie der Detektion nicht mehr zur Verfügung. Daher konzentrieren sich die Betrachtungen im Folgenden auf gassegmentierte Nachsäulenreaktoren.

Die longitudinale Dispersion wird durch das Verfahren der Segmentierung gegenüber der bei linearen Reaktoren stark reduziert. Allerdings können die bandenverbreiternden Prozesse nicht vollständig unterdrückt werden, da an der Kapillarwand ein Flüssigkeitsfilm ausgebildet wird, durch den ein Übertrag in nachfolgende Kompartimente stattfindet [Nord, 1984]. Die Dicke dieses Films ist abhängig von der Oberflächenspannung und der Viskosität der verschiedenen Kompartimente [Trachsel, 2005]. Je größer diese Filmdicke wird, umso mehr erhöht sich der Übertrag und damit die Bandenverbreiterung.

Die Länge der Gassegmente muss eine kritische Länge überschreiten, die bei dem 1.5fachen Kapillardurchmesser liegt. Anderenfalls können Gasblasen innerhalb des Flüssig-

sigkeitsstroms wandern oder es kann zur Bildung von Suspensionen bei Flüssig/flüssig-Segmentierung kommen [Ahmed, 2006]. Bei geringerem Kapillardurchmesser wird die Dispersion in der Regel kleiner. Jedoch wird durch diese Maßnahme gleichfalls die Verringerung der Flussrate sowie eine Erhöhung der Segmentierungsfrequenz erforderlich, um im optimalen Bereich zu arbeiten. Bei 0.5 mm Innendurchmesser und einer Flussrate von 240 $\mu\text{L}/\text{min}$ beträgt diese theoretisch 35 s^{-1} . Dies ist technisch schwer erreichbar [Frei, 1982]. Frequenzen von 2 s^{-1} bei Abtrennung der Blasen vor der Detektion [Krull, 1986] bzw. von 5 s^{-1} ohne Abtrennen [Deelder, 1983] sind in der Praxis gebräuchlich.

Die Abtrennung der Gasphase, ohne zusätzliche Bandenverbreiterung zu verursachen, stellt beim Aufbau eines gasegmentierten Flusses die größte Herausforderung dar. Dass der Einfluss der Abtrennung auf die Bandenverbreiterung sehr groß ist, zeigten Scholten *et al.* [Scholten, 1982]. Eine optimale Leistung kann nicht durch konventionelle Methoden, z. B. unter Verwendung eines T-Stücks, erzielt werden [Deelder, 1983].

Der unterschiedliche Energieaufwand zur Verformung der Gas- bzw. Flüssigkeitssegmente kann zur Abtrennung eingesetzt werden. Durch die Oberflächenspannung lassen sich Gasblasen weniger leicht deformieren. Dadurch haben sie einen höheren Rückdruck an hydrophilen Nanoporen als wässrige Lösungen. Durch geschickte Anordnung kann so eine Phasentrennung erreicht werden [Tsai, 2002].

Jedoch ist ein physikalisches Entfernen der Blasen nicht unbedingt notwendig. Bei genügend großen Flüssigkeitssegmenten können die Daten online oder im Nachhinein digital bearbeitet werden. Dies kann z. B. durch digitales Filtern am Computer erfolgen [Smythe, 1974; Edwards, 1999]. Schon 1969 wurde ein Herausfiltern der Blasen beschrieben: Durch Messung der Leitfähigkeit zwischen Eingang und Ausgang der Messzelle konnten Luftblasen erkannt werden. Über eine Relaischaltung wurde der XY-Schreiber angesteuert. Bei geringerer Leitfähigkeit wurde ein Signal erzeugt, das den Schreiber ausschaltete und somit wurde die Luftblase nicht aufgezeichnet [Habig, 1969].

3 Proteinphosphatasen

3.1 Bedeutung von Proteinphosphatasen

Durch ihre große Bedeutung in der Signalübertragung bei eukaryontischen Zellen [Hervé, 2002] spielen Proteinphosphatasen (PP) als Zielstrukturen bei der WBA eine wichtige Rolle. So haben die PP und die Protein-Kinase, deren Antagonist, wichtige Funktionen z. B. bei der Muskelkontraktion [duBell, 2004], beim Glycogenstoffwechsel [Clotet, 1995], bei der Proteinsynthese [Ernst, 1982] oder im Leberstoffwechsel [Panserat, 2001]. Durch spezielle Rezeptoren kann in einer Zelle durch Signalmoleküle eine Amplifikationskaskade ausgelöst werden. Dabei werden durch Phosphorylierung mittels Kinasen die Zielproteine und das Signalübertragungssystem aktiviert. Im Gegensatz dazu führt die Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen zur Deaktivierung des Systems. Der Empfängerzelltyp sowie die Signalintensität ist entscheidend für das Resultat der Signalübertragung [Christen, 2005].

Phylogenetisch werden die Phosphatasen in die Familie der Phosphotyrosin-Phosphatase-Familie (PTP) sowie die zwei Familien der Serin/Threonin-Phosphatasen (PPP und PPM) unterschieden [Cohen, 1989]. Je nach Familie können Phosphorsäureester an den entsprechenden Aminosäuren der Substrate abgespalten werden.

Serin/Threonin-Phosphatasen sind verantwortlich für die Signalweiterleitung und werden funktional in zwei Typen eingeteilt, Proteinphosphatase 1 und Proteinphosphatase 2. Letztere untergliedert sich weiterhin in PP2A, PP2B und PP2C [Shenolika, 1994]. Die Unterteilung der beiden Typen erfolgt nach Substratspezifität, Sensitivität gegenüber Inhibitoren und Abhängigkeit von bivalenten Kationen (Tabelle 3.1). Innerhalb der Familie der Serin/Threonin Phosphatasen stellt der Typ PP1 die Hauptkomponente dar und ist an vielen regulatorischen Prozessen beteiligt. Sie wird aufgrund ihrer katalytischen Untereinheit unterteilt in PP1 α , PP1 β , PP1 γ 1 und PP1 γ 2 [Cohen, 2002]. Dabei codieren drei Gene die vier Isoformen [Herzig, 2000]. Jedoch gibt es mehr als 50 regulatorische Untereinheiten, mit denen die vier katalytischen Untereinheiten binden können. Dadurch ergeben sich verschiedene Funktionalitäten, die bestimmte Substratspezifitäten, begrenzte subzelluläre Bereiche und diverse Regulationen aufweisen. Dies erlaubt es, eine Vielzahl an zellulären Funktionen auszuführen, die durch unabhängige Mechanismen kontrolliert werden

[Cohen, 2002]. Da lediglich 150 Proteinphosphatasen – davon 40 für Serin/Threonin-Phosphatasen – gegenüber ca. 500 Protein-Kinasen – von denen zwei Drittel Serin/Threonin-Kinasen – im menschlichen Genom codiert sind, ist die Kombination von katalytischer und regulatorischer Untereinheit eine Möglichkeit zur breiteren Anwendung [International Human Genome Sequencing Consortium, 2001].

TABELLE 3.1: Biochemische Klassifizierung der Serin/Threonin-Phosphatasen [MacKintosh, 1999].

	PP1	PP2A	PP2B	PP2C
Phosphorylierung der Untereinheiten der Phosphorylasekinase	β	α	α	α
Absolute Abhängigkeit von bivalenten Kationen	-	-	Ca^{2+}	Mg^{2+}
Inhibition durch Okadasäure	$\text{IC}_{50}=10 \text{ nM}$	$\text{IC}_{50}=0.1 \text{ nM}$	gering	-
Inhibition durch MC-LR	$\text{IC}_{50}=0.1 \text{ nM}$	$\text{IC}_{50}=0.1 \text{ nM}$	gering	-
Aktivität gegen Casein als Substrat	sehr gering	hoch	sehr gering	hoch

3.2 Inhibitoren

Da in der vorliegenden Arbeit nur mit Proteinphosphatase 1 gearbeitet wurde, sollen lediglich die Inhibitoren für diese Spezies erörtert werden, die in der Regel auch Inhibitoren für PP2A darstellen. Es gibt einige natürlich vorkommende Inhibitoren [Hardie, 1989], die auch zur Erforschung der Rolle der reversiblen Phosphorylierung bei der Zellregulierung verwendet werden.

Zu diesen Inhibitoren gehört die von marinen Dinoflagellaten produzierte Okadasäure. Diese wird von Schwämmen und Muscheln aufgenommen und gilt als der Hauptverursacher der diarrhöischen Muschelvergiftung [Bialojan, 1988]. Weitere Inhibitoren sind das Tautamycin, das vom Bakterium *Streptomyces* produziert wird [MacKintosh, 1990a] und das Calyculin A, ein Polyketid, das aus dem Seeschwamm *Discodermia calyx* isoliert wurde [Ishihara, 1989].

In der WBA von Wasserproben sind vor allem die von Cyanobakterien produzierten cyclischen Hepatotoxine von großem Interesse. Die Cyanobakterien, auch Blaualgen genannt, sind weltweit verbreitet in Binnen- und Küstengewässern und produzieren eine Vielzahl an Toxinen. Dabei können v. a. die beiden Gruppen der Hepatotoxine und der Neurotoxine unterschieden werden [Feuillard, 1992]. Zu den Neurotoxinen zählen die

cyanobakteriellen Alkaloide Saxitoxin, Cylindrospermopsin, Anatoxin-a sowie Anatoxin-a(S) [Codd, 2000]. Die wichtigsten Hepatotoxine stellen die Microcystine (cyclische Heptapeptide) [MacKintosh, 1990b] und die Nodularine (cyclische Pentapeptide) dar [Matsushima, 1990].

Sowohl Microcystine als auch Nodularine bestehen aus einer Ringstruktur mit einer ungewöhnlichen C_{20} -Aminosäure, der (2S,3S,8S,9S)-3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4E,6E-diensäure (ADDA). Dadurch ergeben sich für diese Strukturen unterschiedlich Detektionsmethoden: zum einen macht die Doppelbindung des ADDAs eine UV-Detektion bei 238 nm möglich, zum anderen wurden monoklonale ADDA-spezifische Antikörper zur immunspezifischen Bestimmung eingesetzt [Zeck, 2001b].

Die Microcystine sind aus sieben Aminosäuren aufgebaut (Abbildung 3.1). Durch ADDA, D-Glutaminsäure, N-Methyl-dehydro-alanin, D-Alanin, der variablen L-Aminosäure (X), D-Asparaginsäure und einer weiteren variablen L-Aminosäure (Y) wird ein Peptidring gebildet, bei denen D-Glucose und D-Asparaginsäure über die Nebenketten eingebunden sind und daher in der iso-Form vorliegen.

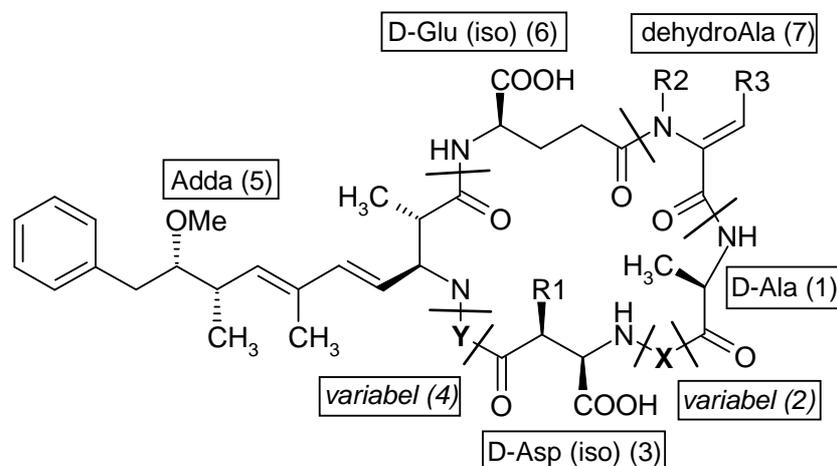


ABBILDUNG 3.1: Struktur von Microcystinen, wobei R für H oder CH_3 stehen kann.

Die Vielfalt der Microcystine, die sich durch Methylierung und Demethylierung der Seitenketten sowie die variablen L-Aminosäuren ergibt, ist groß. Es sind mehr als 60 Microcystine bekannt und isoliert, die den oben beschriebenen Aufbau besitzen [Gupta, 2003].

Da vor allem die beiden variablen L-Aminosäuren für die Vielzahl der Microcystine verantwortlich sind, wurde die Nomenklatur auf der Basis des Einbuchstabencodes der Aminosäuren aufgebaut. Microcystine werden in der Form MCYST XY oder auch MCXY geschrieben [Carmichael, 1988]. So bedeutet z. B. das Kürzel für das am häufigsten

vorkommende Microcystin [WHO, 1998] MC-LR, dass sich an der X-Position Leucin (L) und an der Y-Position Arginin (R) befindet. Tabelle 3.2 zeigt einige exemplarische Einbuchstabencodes für Aminosäuren, die bei Microcystinen von Bedeutung sind.

TABELLE 3.2: Aminosäuren und deren IUPAC- und Einbuchstabencodes [Holtzhauer, 1997].

Aminosäure	IUPAC-Code	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Phenylalanin	Phe	F
Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y

Der in Abbildung 3.2 gezeigte Bindungsmechanismus wurde für die Wechselwirkung von Microcystinen mit Serin/Threonin-Phosphatasen gezeigt [Craig, 1996]. Dabei wird das Microcystin am katalytischen Zentrum der PP schnell – innerhalb von Minuten – in einer Gleichgewichtsreaktion gebunden und führt zur Desaktivierung der katalytischen Unter-einheit. Über einige Stunden erfolgt in einem zweiten Schritt die Bildung eine kovalenten Bindung am Cystein 273 [MacKintosh, 1995].

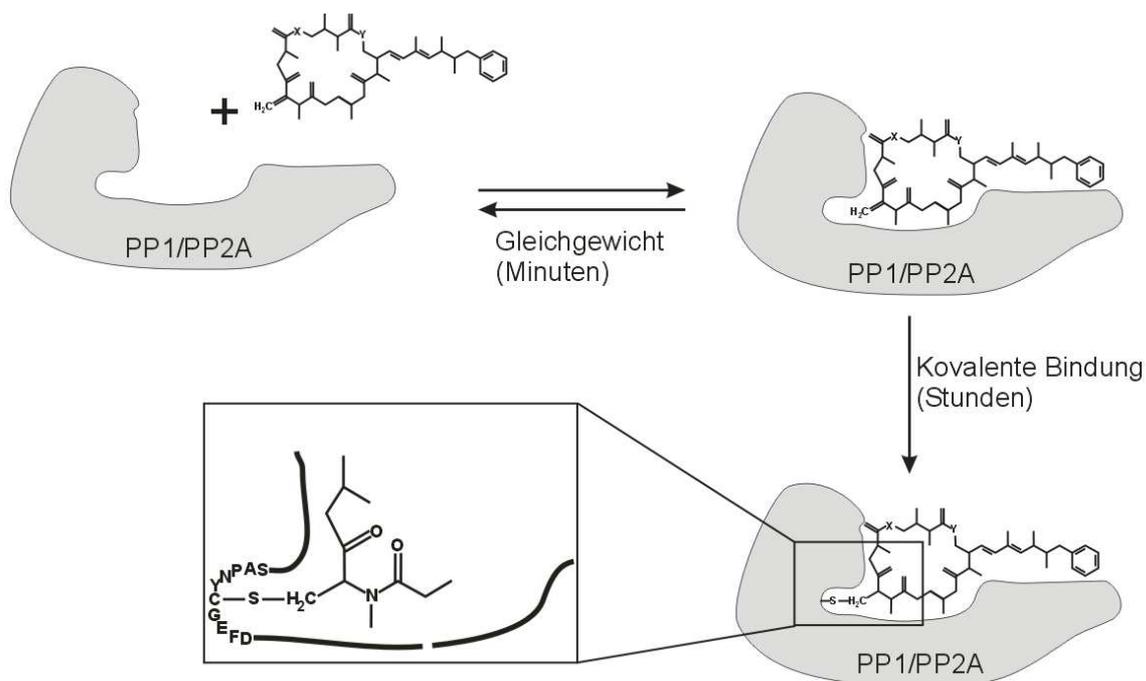


ABBILDUNG 3.2: Bindungsmechanismus von Microcystinen an die katalytische Untereinheit der PP1 und PP2A [Craig, 1996] mit kovalenter Bindung an das Cystein-273 [MacKintosh, 1995].

Goldberg *et al.* kokristallisierten PP1 α und MC-LR und konnten so Aussagen über die Lage des Microcystins in der katalytischen Tasche des Enzyms machen [Goldberg, 1995]. Die ADDA-Seitenkette liegt in einem hydrophoben Graben, der aus dem aktiven Zentrum herausführt. Mit der Bindungstasche des Enzyms treten die beiden Aminosäuren D-Glutaminsäure – mit der Carboxylgruppe – und N-Methyl-dehydro-alanin in Wechselwirkung. Letzteres bildet eine kovalente Bindung mit dem Cystein-273 des Enzyms aus. Dies erfolgt durch eine nucleophile Addition des Thiols in Form einer Michael-Addition an den α,β -ungesättigten Alaninrest des Microcystins. Aus sterischen Gründen können die Nodularine nicht kovalent gebunden werden. Okadasäure zeigt ein ähnliches Bindungsverhalten einschließlich der kovalenten Bindung an das aktive Zentrum wie die Microcystine [Maynes, 2001].

Die Aufnahme der Microcystine erfolgt v. a. in der Leber durch Hepatocyten. Es konnten Aufnahmeraten von $10.72 \pm 1.14 \text{ pMol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 10^{-6}$ Zellen [Runnegar, 1995]. Durch die Inhibition der PP kommt es zur Überphosphorylierung der Intermediärfilamente des Cytoskeletts. Dies führt zu einer morphologischen Veränderung der Hepatocyten und somit der Stabilität des Lebergewebes. Akute Vergiftungen mit Microcystinen führen zusammen mit dem hydrostatischen Druck der Blutgefäße zu schweren intrahepatischen Blutungen, die tödlich verlaufen können. Es zeigt sich auch, dass eine chronische Belastung mit Microcystinen zu Tumorwachstum führen kann [Humpage, 1999].

Die zwei wichtigsten Fälle von Vergiftungserscheinungen wurden in Australien und Brasilien festgestellt [Falconer, 2005]. In Australien wurde durch regelmäßiges Einbringen von Phosphatdünger und anorganischen Stickstoff ein Trinkwasserreservoir eutrophiert und es kam zur Algenblüte. Nach Beschwerden von Verbrauchern wegen Geschmack und Geruch des Wassers wurde Kupfersulfat zur Zerstörung der Algenzellen in das Reservoir eingebracht, was eine Ausschüttung von Microcystinen nach dem Zelltod zur Folge hatte [Falconer, 2005]. In der brasilianischen Stadt Caruaru wurden bei 126 Patienten eines Dialysezentrums nach Behandlung mit cyanobakteriell verseuchtem Wasser akute neuro- und hepatotoxische Symptome festgestellt. Diese führten bei 60 Patienten zum Tod [Pouria, 1998].

Der Grenzwert für MC-LR in Trinkwasser, der von der *World Health Organisation* (WHO) vorgeschlagen wurde, liegt bei 1 $\mu\text{g/L}$ an freiem und intrazellulärem Microcystin [WHO, 1998]. Dabei steht nicht die akute Toxizität im Vordergrund, sondern vielmehr die chronische Vergiftung und die Tumorpromotion. Dieser Wert wurde aus dem *No Observ-*

able Adverse Effect Level von 40 µg/kg abgeleitet [Fawell, 1999]. Wie oben beschrieben, besteht bei chronischer Zufuhr der Microcystine die Gefahr der Tumorbildung. Studien aus China zeigen, dass die von der WHO vorgeschlagenen Grenzwerte die Tumorbildung unterstützen [Uendo, 1999]. Es wurde ein Zusammenhang zwischen dem häufigen Auftreten von primärem Leberkarzinom und der Belastung der Trinkwässer aus Seen und Bächen mit Microcystinen hergestellt. Dabei konnten durch ELISA-Messungen auch Konzentrationen von 90 ng/L bis 460 ng/L festgestellt werden. Durch diese Ergebnisse zeigt sich, dass eine Absenkung der Grenzwerte auf 0.01 µg/L für Microcystine ratsam wäre.

3.3 Enzymaktivitätstests

Bei der Durchführung von Inhibitionstests mit Proteinphosphatasen wird in der Regel ein homogenes Format verwendet. Zur Steigerung der Empfindlichkeit werden Enzym- und Probenlösung häufig vorinkubiert und anschließend die Restaktivität des Enzyms zur Zugabe einer Substratlösung meßbar gemacht. Die Inkubationszeiten sind abhängig von der Geschwindigkeit des Substratumsatzes und der Empfindlichkeit des Auslesesystems. Dabei liegen die Vorinkubationszeiten im Bereich von 0 min bis ca. 15 min und die Inkubationszeit mit dem Substrat bei 10 min [Honkanen, 1990] bis zu 120 min [Heresztyn, 2001].

Um eine möglichst hohe Sensitivität von Enzymtests zu erreichen, wurde gezeigt, dass die eingesetzten Enzymkonzentrationen möglichst gering gehalten werden müssen [Heresztyn, 2001]. Das zeigt auch Tabelle 3.3. Bei zu niederen Konzentrationen wird der Substratumsatz jedoch zu gering und die Signale können nicht mehr vom Rauschen unterschieden werden. Die indirekt proportionale Beziehung zwischen Sensitivität und Enzymkonzentration läßt sich durch die stöchiometrische Bindung und der starken Wechselwirkung von Enzym und Toxin erklären [Craig, 1996].

TABELLE 3.3: Abhängigkeit von IC₅₀ und Quantifizierungslimits von der Konzentration der PP1[Heresztyn, 2001].

Konzentration an PP1 [Units/mL]	IC ₅₀ [ng/mL]	Quantifizierungslimits [ng/mL]
0.1	0.45	0.1 - 2.0
0.25	0.5	0.15 - 1.8
0.5	0.7	0.2 - 2.2
1.0	1.4	0.6 - 4.0

Eine Möglichkeit, die Aktivität der PP zu bestimmen, stellt die Endpunktbestimmung mit ^{32}P dar. Dabei werden physiologisch relevante Substrate wie Phosphohistamin mit radioaktivem Phosphat, das ^{32}P enthält, markiert [Brautigam, 1988]. Nach Inkubation mit der PP wurde durch Zugabe von 50% Trichloressigsäure die Reaktion gestoppt und nicht umgesetzte Substratproteine fielen aus. Durch Zentrifugation wurden die denaturierten Proteine entfernt. Proben aus dem Überstand wurden auf Papierfiltern getrocknet und durch Szintillationszählung die Radioaktivität bestimmt [Killilea, 1978].

Ein Nachweis, der ohne radioaktive Markierung auskommt, beruht auf der Reaktion von Phosphat mit Malachitgrün (Abbildung 3.3 d) und angesäuertem Phosphomolybdat zu einem Komplex, dessen Absorption bei 620 nm gemessen werden kann [Harder, 1994]. Als ein mögliches Substrat für die PP kamen Casein [Geladopoulos, 1991], aber auch Phosvitin, ein hoch phosphoryliertes Eigelb-Protein, zum Einsatz. Bei dieser Methode stört freies Phosphat die Detektion und muss daher zuvor quantitativ abgetrennt oder die Probe stark verdünnt werden [Heresztyn, 2001].

Eine sehr oft angewandte Methode zur Aktivitätsbestimmung der PP verwendet *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Substrat. (Abbildung 3.3 a). Dieses wird durch Proteinphosphatase dephosphoryliert und bildet *para*-Nitrophenol, einen gelben Farbstoff, der bei 405 nm sein Absorptionsmaximum hat [Carmichael, 1999] und einen molaren Extinktionskoeffizienten von $16500 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [MacKintosh, 1999] besitzt. pNPP ist ein unspezifisches Substrat und es kann eine Aktivitätsbestimmung nur bei gereinigten Phosphatasen vorgenommen werden. Vergleicht man dieses kolorimetrische Verfahren mit Fluoreszenz-basierten Assays so zeigt sich, dass diese sowohl höhere Präzision als auch Empfindlichkeit aufweisen [Mountfort, 1999].

Als Substrate für Fluoreszenzmessungen eignen sich Substanzen, die ihre Fluoreszenzeigenschaften durch enzymatische Dephosphorylierung verändern. Beispiele hierfür sind 4-Methyl-umbelliferylphosphat (MUP, Abbildung 3.3 c) und Fluoresceindiphosphat (FDP, Abbildung 3.3 e). Bei einem Vergleich der beiden Substrate unter Verwendung von PP2A und Okadasäure zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Sensitivität [Vieytes, 1997].

Eine weitere Verbesserung der Empfindlichkeit konnte mit dem fluorogenen Substrat 6,8-Difluoro-4-methyl-umbelliferylphosphat (DifMUP) erreicht werden [Fontal, 1999]. Durch den geringeren pK_a -Wert des 6,8-Difluoro-4-methyl-umbelliferyl ($\text{pK}_a=4.7$) gegenüber dem 4-Methyl-umbelliferyl ($\text{pK}_a=7.8$) ist beim optimalen pH-Wert für PP1 und PP2A von $\text{pH}=7$ die Fluoreszenzquantenausbeute höher.

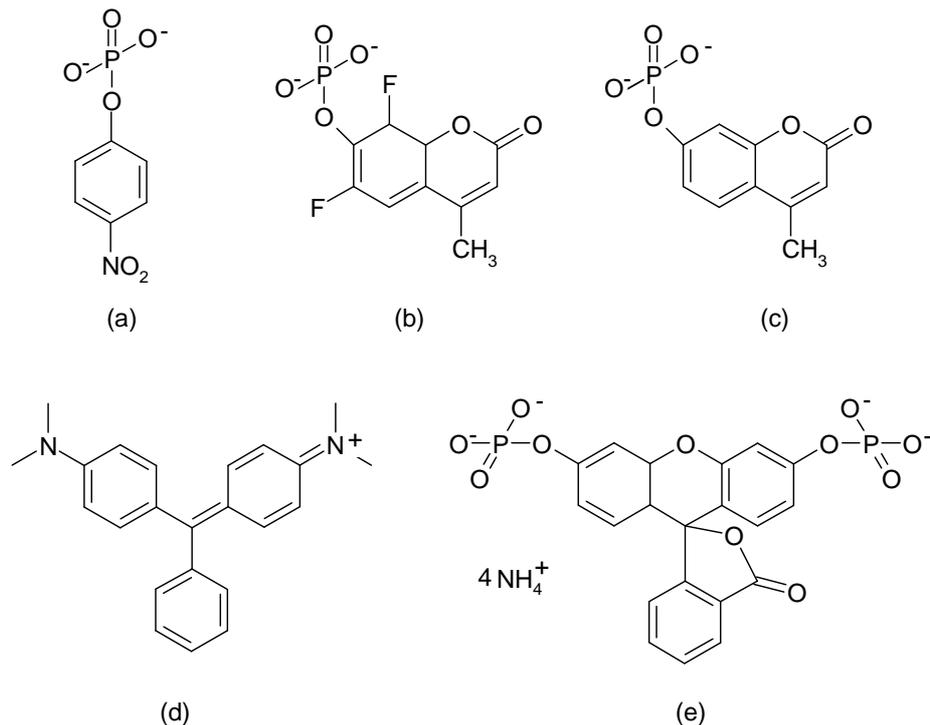


ABBILDUNG 3.3: Substrate zur Aktivitätsbestimmung der Proteinphosphatasen. Die angegebenen Wellenlängen sind die Absorptions- bzw. Anregungs- und Emissionswellenlängen. (a) pNPP ($\lambda_{\text{max}}=405$ nm), (b) DifMUP ($\lambda_{\text{EX}}=358$ nm, $\lambda_{\text{EM}}=455$ nm), (c) MUP ($\lambda_{\text{EX}}=360$ nm, $\lambda_{\text{EM}}=449$ nm), (d) Malachitgrün, (e) FDP ($\lambda_{\text{EX}}=490$ nm, $\lambda_{\text{EM}}=514$ nm).

Bei der Bestimmung der toxischen Effekte in Realproben muß beachtet werden, dass die Wirkungen der verschiedenen Microcystin-Kongeneren nicht identisch sind, d. h. nicht alle Microcystin-Arten hemmen Proteinphosphatasen gleich stark [Gupta, 2003]. Das ist zu beachten, wenn bei Realproben ohne vorhergehende Trennung die Toxizität als Summenparameter bestimmt wird. Die Konzentration von weniger aktiven Microcystinen würde dann unterschätzt und die von aktiveren Microcystinen überschätzt werden. Auch ist zu beachten, dass in Realproben cyanobakterielle Phosphatasen die Ergebnisse verfälschen können [Sim, 1993].

Neben der Bestimmung der Konzentrationen stellt auch die Abschätzung der potenziellen Giftigkeit der Probe durch PP-Inhibitionstests eine Schwierigkeit dar. Tabelle 3.4 zeigt den Vergleich zwischen EC₅₀-Werten verschiedener Microcystine bei akuten Toxizitätstests auf *T. platyurus* und IC₅₀-Werten auf PP1 und PP2A. Die Tendenzen bei den PP-Assays zeigen gleiche Tendenzen, jedoch konnte keine Korrelation mit den akuten Toxizitätstest gezeigt werden [Blom, 2005]. So war die inhibitorische Wirkung des Kongeners [D-Asp³,(E)-Dhb⁷]MC-RR bei PP-Tests deutlich geringer als bei den anderen Toxinen. Im Test mit *T. platyurus* zeigte sich jedoch eine der höchsten Toxizitäten. Dies zeigt, dass

bei *in vivo* Toxizitätstests andere Mechanismen wie Aufnahme, Transport oder Entgiftung einen starken Einfluss auf die Gesamttoxizität für Lebewesen haben. Es wurden auch Bindungen zwischen Microcystinen und der α -Einheit der ATP-Synthase beobachtet [Mikhailov, 2003].

TABELLE 3.4: IC₅₀- und LC₅₀-Werte verschiedener cyanobakterieller Toxine. Die akute Toxizität wurde mit Feenkrebse *T. platyurus* gemessen [Blom, 2005].

Toxin	IC ₅₀ [nM]		LC ₅₀ [μ M]
	PP1	PP2A	<i>T. platyurus</i>
Nodularin	0.28	0.16	1.4
MC-LR	0.25	0.05	10.8
MC-YR	1.0	0.26	4.7
MC-RR	0.68	0.1	7.0
[D-Asp ³]MC-LR	n.b.	0.09	3.5
[D-Asp ³ ,(E)-Dhb ⁷]MC-RR	1.8	2.4	3.5

Für die WBA zeigt sich die vorgeschaltete chromatographische Trennung der Probe als ein vielversprechender Weg, die Analyse ohne die oben aufgezeigte Problematik bei Summenparameterbestimmungen durchzuführen. Eine solche Kopplung wurde von Zeck *et al.* gezeigt [Zeck, 2001a]. Dabei wurde eine mehrdimensionale Detektion von Microcystinen online und offline verwendet. Online wurden mit einem PDA die Chromatogramme aufgezeichnet. In Mikrotiterplatten wurde das fraktionierte Eluat parallel mit ELISA und PP-Inhibitionstests untersucht. Die Identifizierung positiver Proben erfolgte durch Messungen mittels ESI-TOF-MS.

4 Leuchtbakterien

Da Enzyme weitgehend selektiv auf Giftstoffgruppen reagieren, muss zur Bestimmung der Gesamtoxizität von Umweltproben auf andere Targetstrukturen zurückgegriffen werden. Eine Möglichkeit besteht darin, Leuchtbakterien als Zielstruktur einzusetzen, um den gewünschten Summenparameter zu erhalten [Ribo, 1990].

Neben Pflanzen und Algen kommen auch Fische, Ratten, Mäuse und Wasserflöhe als Testorganismen zum Einsatz [Farré, 2003]. Problematisch bei Biotests mit solchen Targets sind die Reproduzierbarkeit und die Standardisierbarkeit sowie die im Regelfall langen Expositionszeiten und die relativ großen Probenvolumina, die zur Durchführung der Tests benötigt werden.

Kleinere Testorganismen erlauben das Verwenden von geringeren Testvolumina [Reemtsma, 2001]. Die Verwendung von mikrobiologischen Targets führt zu schnelleren und kostengünstigeren Testsystemen und ist darüber hinaus ethisch weniger bedenklich als Tiertests [Tothill, 1996]. Aus diesen Gründen finden mikrobielle Biotests zum Toxizitätsscreening immer mehr Anwendung in der Abwasseraufbereitung und in der Qualitätskontrolle von Wasser. So existiert mit der DIN EN ISO 11348 eine verbindliche Vorschrift, die auf der inhibitorischen Wirkung von Analyten auf das Leuchtbakterium *Vibrio fischeri* beruht.

Die Bioassays, bei denen Bakterien die Targets darstellen, können in fünf Klassen gegliedert werden. Dabei beruht die Einteilung auf der hervorgerufenen und getesteten Wirkung von toxischen Analyten [Pavez, 2006]: Wachstum der Population, Substratverbrauch, Atmung, ATP-abhängige Lumineszenz und Biolumineszenzinhibition. Testspezies für Metabolisierungsvorgänge sind z. B. *E. coli* oder *Pseudomonas putida*. Als Vertreter der Leuchtbakterien werden v. a. *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio harveyi* und *Pseudomonas fluorescens* eingesetzt.

Am häufigsten findet jedoch in neuerer Zeit das Leuchtbakterium *Vibrio fischeri* Einsatz in Bioassays [Brack, 2003]. Diese Bakterien sind Gram-negativ und leben symbiotisch mit verschiedenen Meeresbewohnern zusammen.

Unter Biolumineszenz versteht man die Luciferase-katalysierte Reaktion von molekularem Sauerstoff mit Luciferinen, wobei es zur Lichtemission kommt. Es ist zu beachten, dass die Ausdrücke Luciferase und Luciferin allgemeine Ausdrücke für Enzyme und Substrate bei einer Biolumineszenzreaktion darstellen. Definiert werden sie durch die Spezifikation des wirkenden Organismus [Wilson, 1998]. Den Effekt der Biolumineszenz beobachtete schon der griechische Philosoph Aristoteles vor 2500 Jahren [DeLuca, 1982].

Abbildung 4.1 gibt einen Überblick über die wichtigsten biochemischen Reaktionen, die während des Biolumineszenz-Prozesses in *Vibrio fischeri* ablaufen. Durch die Luciferase wird die Oxidation des bakteriellen Luciferins, nämlich eines reduzierten Riboflavinphosphates (FMNH₂) sowie eines langkettigen aliphatischen Aldehyds (RCHO) zu einem oxidierten Flavomononucleotid (FMN) und einer Fettsäure (RCOOH) katalysiert. Dabei wird die freiwerdende Energie (115kcal/Mol) in Form von Licht der Wellenlänge 490 nm abgestrahlt [Bourgois, 2001]. Dieses kann durch einen entsprechenden Detektor wie Photomultiplier, Photodiode oder empfindliche Filme aufgenommen werden [Ellis, 1999].

Die komplexe Regulation dieses Prozesses erfolgt über die *lux*-Gene. Die Transkription dieser Gene wird durch den Autoinducer, das N-Acyl-L-homoserinlacton (AHL) aktiviert, wenn eine kritische Konzentration von einigen Molekülen pro Zelle erreicht wird. AHL ist ein vom Bakterium hergestellter Transmitter, der durch die Zellmembranen diffundieren kann. [Dunlap, 1988]. Ein weiterer Parameter, der die Regulation beeinflusst, ist die cAMP-Konzentration [Meighen, 1991].

Die Lumineszenzmessung stellt eine sehr empfindliche Methode dar, toxische Bestandteile in Proben zu erkennen [DIN, 1998]. Normalerweise werden die Leuchtbakterientests bei 15°C und bei einem pH-Wert von 7 in 2%iger Natriumchloridlösung durchgeführt. Da es sich bei *Vibrio fischeri* um ein marines Bakterium handelt, ist ein gewisser Salzgehalt in der Lösung notwendig [Nagata, 2006]. Um die Stabilität des Testformats zu erhöhen, wurde bei 15°C und pH=7 gemessen, jedoch die Natriumchlorid-Konzentration zwischen 0.3 M und 0.5 M im Probenvolumen gehalten. Bei 0.1 M ebenso wie bei 1 M Natriumchlorid konnte kein Lumineszenzsignal mehr gemessen werden. Das bedeutet, dass bei Süßwasserproben vor der Messung zunächst der Salzgehalt eingestellt werden muss. Da die Lumineszenzreaktion Sauerstoff verbraucht, beeinflusst der Sauerstoffgehalt der Probe die Leuchtkraft der Bakterien und sollte ebenso wie pH-Wert und Temperatur konstant gehalten werden.

Die Intensität der Biolumineszenz der Bakteriensuspension ist von der Zelldichte abhängig. Daher kann eine Abnahme des Leuchtsignals entweder aus steigendem Anteil toxischer Analyten in der Lösung oder aus der Abnahme der Zellzahl resultieren. Diese Tatsache kann in der Fehlinterpretation von Umweltproben resultieren. Die Messung der optischen Dichte der Suspension bei 670 nm kann zur Bestimmung der Zelldichte genutzt werden. Bendiraa *et al.* stellten einen Bioreaktor vor, bei dem eine parallele Bestimmung der Intensität der Biolumineszenz und der Zelldichte online und *in situ* mit Hilfe von faseroptischen Instrumenten erfolgen konnte. Auch eine mögliche Anwendung in der Biosensortechnik wurde erwogen [Bendiraa, 2004].

Eine Änderung des Lumineszenzsignals kann durch verschiedene Einflüsse hervorgerufen werden [Kudryasheva, 2006]. So kann die Abnahme durch die Anwesenheit einer echten toxischen Substanz ausgelöst werden, die durch Struktur-Wirkungs-Beziehungen entschlüsselt werden können [Cronin, 1998]. Beispiele hierfür sind die Hemmung von Enzymsystemen, chemische Reaktionen mit Zellkompartimenten, Störungen der Membranfunktion der Zelle oder Wechselwirkungen mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche.

Auch physikalisch-chemische Effekte können für Verringerung der Biolumineszenzsignals verantwortlich sein [Kudryasheva, 2006]. So können unreaktive aromatische Verbindungen in den *CIEEL*-Mechanismus (Abbildung 4.1) eingreifen und so die Lumineszenz verändern. Die Anwesenheit von Schweratomen in der Probe kann die Singulett-Triplett-Übergangsrate verändern. Durch die Wechselwirkung mit Elektronendonoren in den Proteinen (Schwefelatome und Thiolgruppen) nehmen Kationen aus der Lösung starken Einfluss auf die enzymatischen Prozesse. Ein anderes Problem stellt die Wasserlöslichkeit der Analyten dar, die nicht immer in entsprechenden Konzentrationen löslich sind [Brack, 1999].

Neben den Probeninhaltsstoffen kommt es durch Variation in den Messprozeduren und durch Verwendung unterschiedlicher Reagenzien zusätzlich zu Abweichungen in den Messergebnissen mit Leuchtbakterientests. Es finden flüssig- und gefriergetrocknete Bakterien Anwendung. Dabei unterscheidet sich die Prozedur zur Rekonstituierung der Bakterienproben [DIN, 1998].

Um den Einfluss verschiedener Chemikalien auf die Biolumineszenz der Bakterien vergleichen zu können, wird meist der EC_{50} -Wert eines Analyten bestimmt. Dieser gibt die effektive Konzentration des Toxins an, bei dem die Biolumineszenz innerhalb eines angegebenen Zeitraumes um 50% abnimmt [van Ewijk, 1993]. Kaiser konnte zeigen, dass eine sehr gute Korrelation von EC_{50} -Werten aus *Vibrio fischeri* Assays und LD_{50} -Daten,

die mit anderen aquatischen Spezies wie Goldfischen, Regenbogenforellen, Daphnien oder Algen ermittelt wurden, besteht. Bei der Erhebung der LD₅₀-Daten aus Tests mit Säugetieren muss zwischen den möglichen Aufnahmewegen (oral, intravenös, durch die Haut usw.) unterschieden werden. Die Korrelationen sind nicht so gut wie mit marinen Spezies, aber der Vergleich mit Daten aus intravenös gegebenen Toxinen zeigt eine gute Korrelation [Kaiser, 1998].

Die Anwendungsmöglichkeiten der Leuchtbakterientests sind sehr breit gefächert [Pavez, 2006]. So konnten nicht nur Grund- und Oberflächenwasser analysiert werden, sondern auch komplexere Proben wie zum Beispiel Abwasser [Farré, 2002]. Auch die Toxizitätsbestimmung von Sedimentproben durch Inkubation und anschließendes Abtrennen der Bakterien durch Filtration [Salizzato, 1998] wurden durchgeführt und in einer Studie auf die Reproduzierbarkeit in mehreren Laboren getestet [Ross, 1999].

Verschiedene Hersteller bieten Leuchtbakterien-Testsysteme samt dem kompletten Zubehör an. In einer Studie wurden drei verschiedenen standardisierte Testsystemen unterschiedlicher Hersteller auf deren Vergleichbarkeit getestet [Jennings, 2001]. Dabei wurden in einer Toxizitätsstudie 81 Chemikalien mit den Systemen ToxAlert[®] (Merck), Microtox[®] (Azur Environmental) und LUMISTox[®] (Hach-Lange) unter standardisierten Messbedingungen vermessen und die Ergebnisse verglichen. Es zeigten sich reproduzierbar ähnliche Ergebnisse mit allen drei Testformaten, sofern der Operator unter strikter Einhaltung der Standards die Tests durchführte.

Wenn in der WBA nur Leuchtbakterien als Targets eingesetzt werden, besteht die Gefahr, manche Schadstoffe systematisch zu übersehen, da z. B. Matrixelemente den Effekt maskieren können [Reemtsma, 2001]. Systembedingt können Inhibitoren des Photosystems II nicht mit dem Leuchtbakterientest erfasst werden. Dadurch bleiben bestimmte Herbizidklassen wie Triazine mit diesem Detektionssystem unentdeckt [Brack, 2003]. Durch agonistische und synergistische Effekte kann die Toxizität einer Probe massiv verändert werden.

Aus der Literatur ist zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit keine Anwendung der Inhibitionstests von Leuchtbakterien bei der FIA oder bei Nachsäulenreaktionen gekoppelt an eine chromatographische Trennung bekannt. In einer beschriebenen Kopplung von HPLC und Biotest wurde der Teil des HPLC Eluats, der im Photodiodenarray ein Signal zeigte, fraktioniert in einer Mikrotiterplatte gesammelt und anschließend dem Toxizitätstest mit *Vibrio fischeri* in der Platte zugeführt [Reemtsma, 1999]. Dabei erfolgte nicht die kontinuierliche Aufzeichnung der Toxizität während des HPLC-Laufes, wie es mit einem

online-system möglich wäre. Fiehn *et al.* stellten einen offline durchgeführten Inhibitions-test mit Leuchtbakterien vor [Fiehn, 1997]. Dabei wurde durch wiederholtes Fraktionieren nach einer schrittweisen Festphasenextraktion der Inhibitionsassay auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt.

Um spezifische toxische Wirkungen mit Leuchtbakterientests durchführen zu können, wurden rekombinante Biolumineszenz-induzierbare *E. coli*-Stämme mit unterschiedlichen Plasmiden gezüchtet. Diese Plasmide enthalten eine transkriptionale Fusion von *E. coli*-Stress-Promotor und *Vibrio fischeri luxCABE*-Operon. Bei der Anwesenheit der Chemikalien, die den Stress-Promotor stimulieren, zeigen diese Zellen Lumineszenz [Choi, 2003]. Die so modifizierten *E. coli* wurden von Lee und Gu eingesetzt [Lee, 2005]. In einem Mehrkanalsystem wurden verschiedene *E. coli* kultiviert. Durch Injektion von Giftstoffen zeigte jeder Kanal eine individuelle Änderung der Intensität des Lumineszenzsignals auf Grund der Zelltoxizität. Dabei wurden als Toxizitätsklassen DNA-, Protein- und Zellmembran-zerstörende Reagenzien eingesetzt. Das System bestand aus einem zweistufigen Minireaktor. Der erste Reaktor regulierte das Zellwachstum durch kontinuierliche Zufuhr von frischen Bakterien. Im zweiten Reaktor wurden die pulsweise injizierten Proben mit den Leuchtbakterien vermischt und die Toxizitätstests durchgeführt.

Teil III

Ergebnisse und Diskussion



5 Auswahl der Targets für die Wirkungsbezogene Analyse

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Targetstrukturen für eine WBA mussten einige bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Sie wurden daher nach den folgenden Kriterien ausgewählt: Zum einen sollten toxikologisch relevante Informationen gewonnen werden, die durch Interaktionen von Analyten mit den Targetstrukturen gewonnen werden konnten. Da der Biodetektor als online-System eingesetzt werden sollte, mussten die Reagenzien über den Verlauf der gesamten Messung kontinuierlich zugegeben werden. Daher war ein weiteres Auswahlkriterium, nämlich eine kostengünstigen Beschaffung, zu beachten. Des Weiteren sollten die Targetstrukturen über einen längeren Zeitraum hinweg eine konstante Aktivität aufweisen. Auch sollten starke Signalunterschiede zwischen gehemmten und nicht gehemmten Proben bei möglichst kurzen Inkubationszeiten entstehen, da dieser Unterschied als Messgröße herangezogen werden sollte.

Die Wahl fiel zum einen auf das Enzym Proteinphosphatase, das als Indikator für eine hepatotoxische Wirkung von Substanzen zu betrachten ist. Zum anderen wurden Leuchtbakterien vom Stamm *Vibrio fischeri* ausgewählt. Diese sollten zur Aufklärung der Allgemeintoxizität einer Probe dienen, falls keines der spezifischen Targets eine toxische Wirkung anzeigen sollte.

5.1 Indikator für Hepatotoxizität: Proteinphosphatase

Die Wirkung der Toxine, die von Cyanobakterien produziert werden, kann im Rahmen einer WBA über die Bindung an Serin/Threonin-Phosphatasen detektiert werden. Allerdings sind diese Enzyme von Kofaktoren abhängig und die Lager- und Arbeitsstabilität ist niedrig. Die erhaltenen Phosphatase-Lösungen wurden fraktioniert und für mehrere Monate bei -80°C in Lagerungspuffer aufbewahrt. Das Auftauen und Verdünnen der einzelnen Aliquote erfolgte jeweils kurz vor Beginn der Messungen. Enzymaktivitäts- und Enzyminhibitionstests sowie Tests zur Verträglichkeit von Lösungsmitteln wurden auf Mikrotiterplatten und in Küvetten durchgeführt, um die entsprechenden Parameter für die online-Detektion vorab zu optimieren.

Die verwendeten Proteinphosphatasen wurde im Rahmen eines BMBF-Projekts von Prof. Dr. R. D. Schmid und Prof. Dr. T. T. Bachmann vom Institut für Technische Biochemie in Stuttgart hergestellt und dem Institut für Wasserchemie zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um ein Fusionsprotein aus einem grün fluoreszierenden Protein (GFPuv) und einer humanen Proteinphosphatase 1 α (Abbildung 5.1). Im Folgenden wird dieses Fusionsprotein nur als Proteinphosphatase 1 α (PP1 α) bezeichnet.

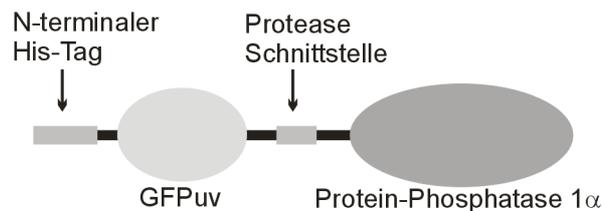


ABBILDUNG 5.1: Aufbau des Fusionsproteins PP1 α der Projektpartner aus Stuttgart.

Durch die Kopplung beider Proteine konnten zwei unterschiedliche Arten der Detektion angewendet werden. So konnte das Fusionsprotein unter Verwendung des Proteinphosphatase-Teils und eines geeigneten Substrats als Target zum Testen der Analyten auf hepatotoxische Wirkung verwendet werden. Hierbei erfolgte die Detektion substratspezifisch durch Fluoreszenz- oder Absorptionsmessungen. Des Weiteren konnte die reine Anwesenheit des Fusionsproteins und damit der Proteinphosphatase durch Fluoreszenzmessung des GFPuv bei einer Anregungswellenlänge von 395 nm und einer Emissionswellenlänge von 509 nm festgestellt werden.

Um die Konzentration an Enzym zu ermitteln, die zum Einsatz kommen sollte, wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Konzentration der Enzymlösung variiert wurde. Als Vergleich wurden dazu parallele Messreihen durchgeführt, bei denen die Enzyme zunächst mit Microcystin LF inhibiert und anschließend nach Zugabe einer 6,8-Difluoro-4-methyl-umbelliferylphosphat-Lösung (DifMUP) erfolgte die Signalaufzeichnung. In Abbildung 5.2 ist zu erkennen, dass bereits eine Enzymkonzentration von 1 U/mL ausreichend war, um Signalunterschiede zu erhalten, die als Messbereich ausreichend groß waren, um erfolgreich Inhibitionstests durchzuführen.

5.1.1 Substrate

Bei der Auswahl des Substrates für die online-Messungen wurde darauf geachtet, dass hohe Umsatzraten mit dem Enzym erzielt werden konnten. Bei kurzer Inkubationszeit sollte möglichst viel Substrat umgesetzt und somit hohe Signalintensitäten erreicht werden. Da die inhibitorische Wirkung in Form eines negatives Signals detektiert wurde,

konnte mit einer größeren Signalintensität eine mögliche Inhibition sehr empfindlich nachgewiesen werden.

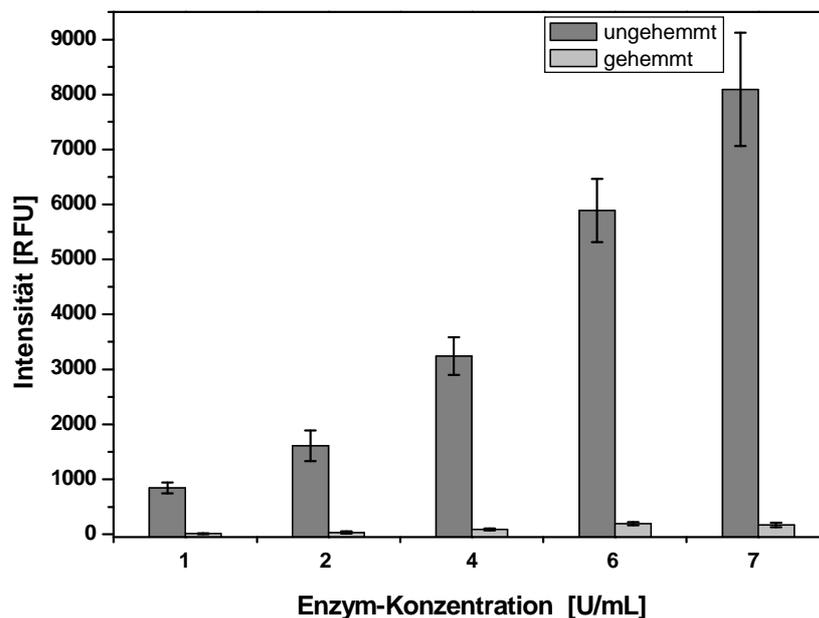


ABBILDUNG 5.2: Einfluss der PP1 α -Konzentration auf die Signalintensität. Verglichen wurden mit MC-LF (10 μ g/L) gehemmte und ungehemmte Enzymlösungen. (Fehler: Standardabweichung, n=3)

Als Substrat wurde *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP) untersucht. Da die Anwendung als online-Verfahren aufgebaut werden sollte, musste das zu untersuchende Substrat über den gesamten Zeitraum zudosiert werden. Die Tatsache, dass diese Substanz preisgünstig zu erwerben ist, macht es zu einem potenziell geeigneten Substrat. Durch enzymatische Dephosphorylierung des pNPP entstehen anorganisches Phosphat und *para*-Nitrophenolat. Letzteres kann bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert werden. Allerdings ist der Extinktionskoeffizient mit 16500 Mol⁻¹cm⁻¹ sehr niedrig. Um Signale zu erhalten, bei denen die Empfindlichkeit ausreicht, um das System zur Detektion nutzen zu können, wäre es anstrengenswert, die Reaktionszeit für die Enzymreaktion so lange wie möglich zu gestalten. Dies würde einen online-Aufbau allerdings viel komplizierter machen.

Physikalisch bedingt sind Fluoreszenzmessungen gegenüber Absorptionmessungen sensitiver. Daher sollte ebenfalls ein solches Substrat getestet werden. Wichtig bei der Auswahl war, dass die Anregungs- und Emissionswellenlängen für das zu untersuchende Substrat in einem anderen Bereich lagen als jene für das GFPuv. Deshalb wurde als Vertreter der Fluoreszenzfarbstoff DifMUP für Fluoreszenzmessungen in der Mikrotiterplatte getestet. Dessen Anregungswellenlänge liegt bei 358 nm und seine Emissionswellenlänge bei 450 nm.

Abbildung 5.3 zeigt die Inhibitionskurven mit beiden Substraten. Die Inkubationen mit dem Enzym und dem Toxin, bzw. dem Enzym und dem Substrat, wurden jeweils bei identischen Zeiten durchgeführt (siehe Legende). Lediglich die Konzentration des Enzyms musste bei der Verwendung von pNPP um den Faktor 10 höher gewählt werden, um bei gleichen Zeiten noch ähnliche Substratumsätze zu erhalten. Dies führte auch dazu, dass mit dem Fluoreszenzfarbstoff geringere IC_{50} -Werte erhalten wurden.

Zur Bestimmung der Aktivität wurde der Quotient aus gehemmten und ungehemmten Signalintensitäten errechnet und mit 100 multipliziert. So erhielt man die relative Aktivität in [%].

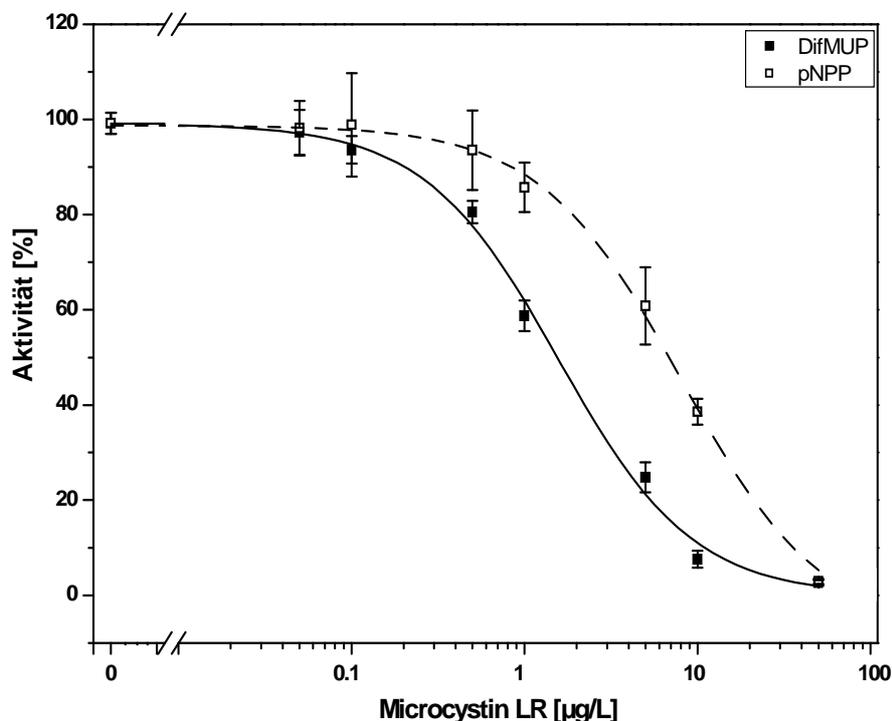


ABBILDUNG 5.3: Vergleich der beiden Substrate pNPP und DifMUP: Es wurden unter identischen Inkubationsbedingungen mit DifMUP empfindlichere Kalibrierkurven erhalten. Proteinphosphatase 1α wurde mit Microcystin LR (MC-LR) inhibiert. Die IC_{50} -Werte betrugen mit DifMUP $1.5 \mu\text{g/L}$ und mit pNPP $8.0 \mu\text{g/L}$. Bedingungen: Enzymlösung ($179 \mu\text{L}$, 1 U/mL (DifMUP) bzw. 10 U/mL (pNPP)) und MC-LR-Lösung ($20 \mu\text{L}$, verschiedene Konzentrationen) wurden 10 min bei RT inkubiert, dann erfolgte die Zugabe von je $1 \mu\text{L}$ Substrat. Die verbleibende Enzymaktivität wurde nach 10 min bei RT bestimmt. (Fehler: Standardabweichung, $n=3$)

Weiterhin wurde untersucht, wie stark die Autoprotolyserate beider Farbstoffe in wässrigem Medium war. Dies ist eine wichtige Größe für den online-Assay, da die Substrate über längere Zeiträume hinweg bei Raumtemperatur in wässriger Lösung vorlagen. Dazu wurden wässrige Substratlösungen von je 0.5 mM hergestellt und über 1 h vermessen. Es zeigte sich, dass bei beiden Substraten nach einer Stunde weniger als 2% Signalzuwachs

zu verzeichnen war. Die Zugabe von 10% Methanol zeigte zudem keinen messbaren Effekt auf das Signal.

Um einen möglichst geringen Verbrauch an Substrat zu erreichen, wurden weitere Tests für die Optimierung der DifMUP-Konzentration durchgeführt. Hierzu wurde im MTP-Format die Enzymlösung (2U/mL) mit Microcystin-Lösung (0.1 µg/mL) gehemmt. Als Substrat-Konzentrationen wurden 0.5 mM, 1 mM und 10 mM gewählt. Parallel dazu wurden nichtinhibierte Referenzproben gemessen. Die Messungen über einen Zeitraum von 40 min ist in Abbildung 5.4 dargestellt.

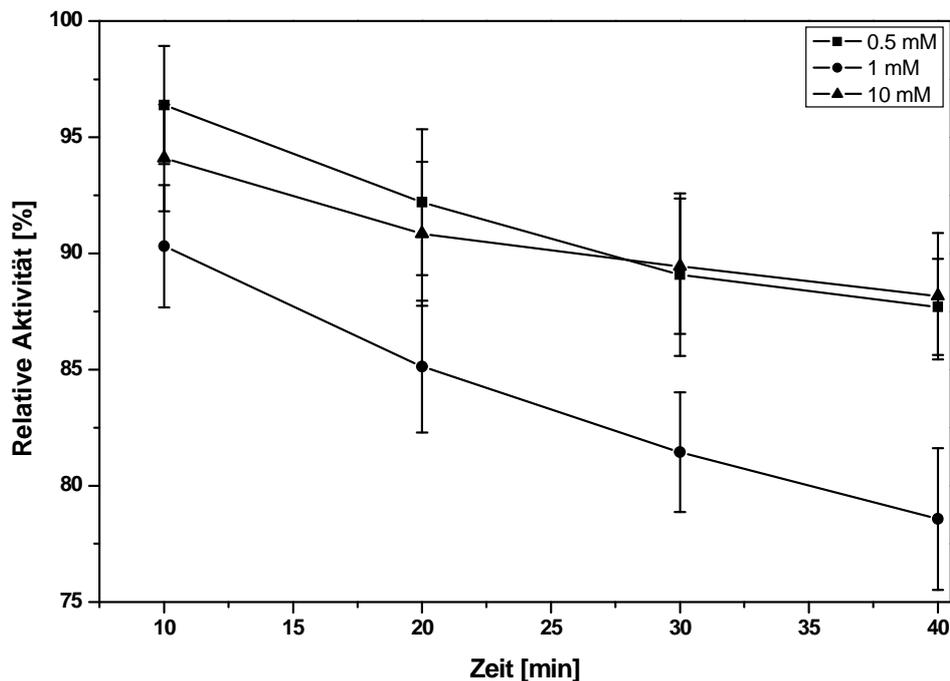


ABBILDUNG 5.4: Aktivität der PP1 α nach 10 min Inkubation mit MC-LF (0.1 µg/mL) bei unterschiedlichen DifMUP-Konzentrationen. Die relative Aktivität errechnet sich aus dem Quotienten von gehemmtem Signal und ungehemmter Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt. (Fehler: Standardabweichung, n=4)

Generell gilt, dass die Sensitivität eines Assays umso höher ist, je niedriger die verbleibende Aktivität bei Hemmung des Targets mit gleicher Toxin-Konzentration ist. Bei längeren Inkubationszeiten zur Farbentwicklung zeigte sich eine Verbesserung der Sensitivität für alle Substrat-Konzentrationen. Alle anderen Parameter wurden dabei nicht variiert. Die Realisierung würde jedoch im online-Verfahren aufwendiger und kostenintensiver durch höheren Chemikalienverbrauch. Trotz der kleinen Dissoziationskonstante von 38 pM [Takai, 1995] schien bei höheren DifMUP-Konzentrationen (10 mM) eine Konkurrenz aufzutreten, sodass die relative Aktivität des Enzyms wieder anstieg. Unter-

stützt werden könnte diese Vermutung durch die Tatsache, dass die Konzentration an Toxin mit 10.4 nM deutlich geringer war als die des Substrates.

Der Michaelis-Menten-Theorie zufolge erhöht sich mit steigender Substratkonzentration die Umsatzgeschwindigkeit [Voet, 1994], und es resultieren stärkere Intensitäten bei gleicher Reaktionszeit. Dies wird durch die in Tabelle 5.1 dargestellten Messungen bestätigt. Der größte Signalunterschied lag mit 10% bei der mittleren getesteten Substratkonzentration. Da das Substrat teuer ist, wurde zum einen aus ökonomischen Gründen, zum anderen aber auch durch die größte prozentuale Differenz die mittlere Konzentration von 10 mM gewählt.

TABELLE 5.1: Gemessene Intensitäten nach 10 min Inkubation von PP1 α der Konzentration 1 U/mL mit (gehemmt) bzw. ohne (ungehemmt) Microcystin LF und anschließender Entwicklung mit verschiedenen DifMUP-Konzentrationen über weitere 10 min. Die Fehler wurden als \pm Standardabweichung (s) angegeben. (n=4)

Eingesetzte Konzentration an DifMUP [mM]	Intensität \pm 1s		Differenz [%]
	ungehemmt [RFU]	gehemmt [RFU]	
5	18.0 \pm 0.6	17.3 \pm 1.0	4
10	34.6 \pm 0.6	31.3 \pm 1.88	10
100	285.6 \pm 16	268.0 \pm 6.5	6

5.1.2 Inhibitoren

Für das aufzubauende online-System sollten als Inhibitoren für die zur Verfügung gestellte Proteinphosphatase 1 α wässrige Standardlösungen verschiedener Microcystine dienen. Um die Bedingungen für den online-Test zu optimieren, wurden Tests in Mikrotiterplatten durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Inkubationszeiten sowohl für die Reaktion von Enzym mit dem Toxin als auch für die anschließende Reaktion von Enzym mit dem Substrat getestet. Da kurze Zeiten für die weitere Entwicklung entscheidend waren, wurden die getesteten Inkubationszeiten so gewählt, dass maximal 40 min benötigt wurden, bis das Ergebnis ausgelesen werden konnte.

Als Inhibitoren wurden exemplarisch Microcystin LR (MC-LR) und Microcystin LF (MC-LF) verwendet und in verschiedenen Konzentrationen vermessen. Die sich daraus ergebenden Kalibrierkurven sind in Abbildung 5.5 dargestellt. Die auf der Ordinate aufgetragenen Inhibitionsraten (RI) wurden, wie in Abschnitt 11.5 beschrieben, nach Zhou *et al.* [Zhou, 2006] modifiziert berechnet. Aus den aufgenommen Kurven lassen sich als wichtige Größe die IC₅₀-Werte als die Konzentrationen, die einen halbmaximalen Effekt

produzierten, bestimmen. Tabelle 5.2 zeigt für die beiden verwendeten Toxine die ermittelten IC_{50} -Werte bei variierten Inkubationszeiten. Auch konnten die Nachweisgrenzen aus den Daten nach der 3s-Methode berechnet werden:

$$LOD = \bar{x}_{Blank} + 3 \cdot s_{Blank} \quad (5.1)$$

Dabei sind LOD die Nachweisgrenze, \bar{x}_{Blank} der Mittelwert der Blindwertmessung und s_{Blank} die Standardabweichung der Blindwertmessung.

Die IC_{50} -Werte unterscheiden sich bei den verschiedenen Inkubationszeiten nicht signifikant voneinander. Die Nachweisgrenzen für MC-LR zeigen die Tendenz, sich mit zunehmender Inkubationszeit für die Farbentwicklung hin zu höheren Konzentrationen zu verschieben. Jedoch sind auch hier die Unterschiede nicht von großer Bedeutung. Jeweils 10 min Inkubationszeit für beide Inkubationsschritte stellten ausreichende Zeiträume dar, um in offline-Messungen niedrige Nachweisgrenzen und Testmittelpunkte zu erhalten. Diese fanden auch in den online-Verfahren Anwendung und wurden etabliert.

TABELLE 5.2: Inhibitionszeiten und resultierende IC_{50} -Werte sowie LODs. Bei den Inkubationszeiten ist die erste Zahl die Reaktionszeit von Enzym und Microcystin, die zweite Zeit die Inkubationszeit mit dem Substrat zur Farbentwicklung. (Fehler: Standardabweichung, n=4)

Inkubationszeiten	Microcystin LR [ng/L]		Microcystin LF [μ g/L]	
	IC_{50}	LOD	IC_{50}	LOD
10 min / 10 min	6.16 ± 0.34	1.16	0.88 ± 0.13	0.02
10 min / 20 min	6.58 ± 0.40	2.45	1.06 ± 0.28	0.01
20 min / 10 min	5.79 ± 0.22	1.87	0.95 ± 0.25	0.02
20 min / 20 min	6.64 ± 0.28	2.03	1.12 ± 0.17	0.01

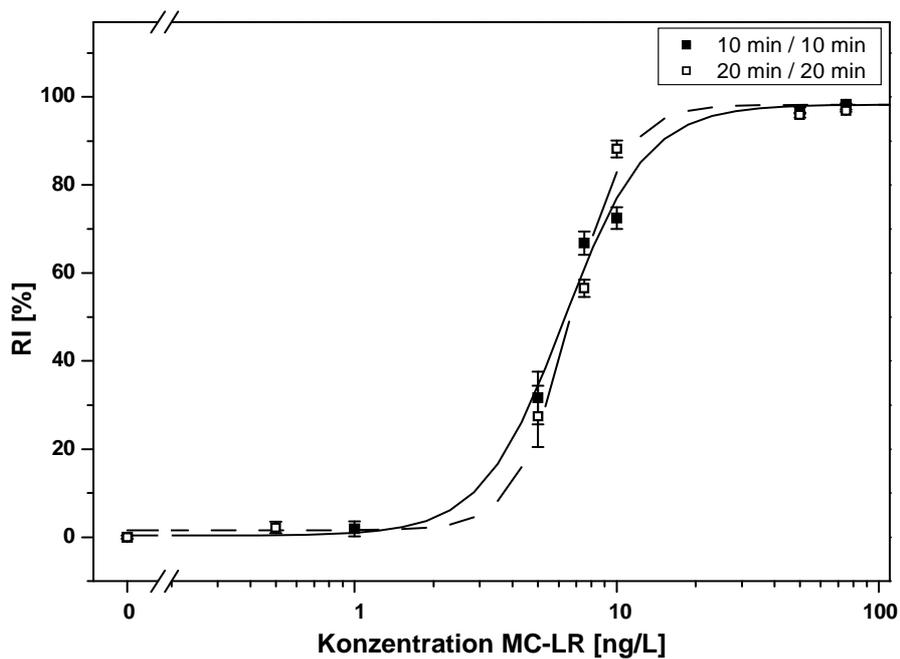
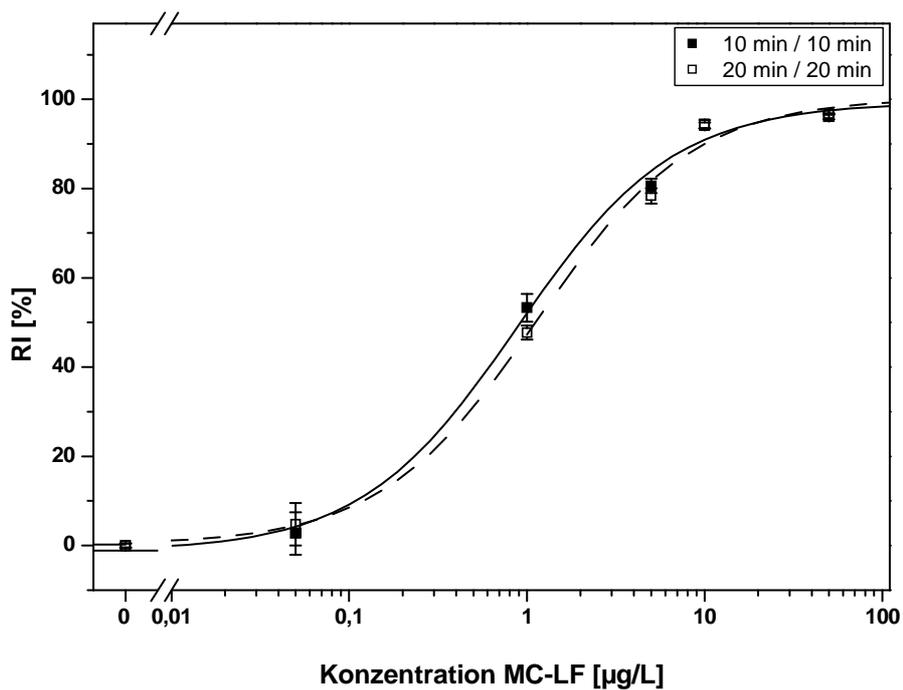


ABBILDUNG 5.5: Inhibitionstests der PP1 α mit Microcystinen bei unterschiedlichen Inkubationszeiten in der Mikrotiterplatte. Die ersten Zahlen der Legende geben jeweils die Inkubationszeit von Enzym und Toxin, die zweite die von Enzym und Substrat an. *Oben:* Inhibition mit Microcystin LR (MC-LR), *Unten:* Inhibition mit Microcystin LF (MC-LF). (Fehler: Standardabweichung, n=3)

5.1.3 Stabilität des Enzyms

Aktivitätsverlust: Da beim online-System die Zudosierung des Enzyms kontinuierlich über den gesamten Zeitraum der Messung hinweg erfolgen sollte, mußte ausreichend Lösung für eine komplette Messung bereitgestellt werden. Der Aktivitätsverlauf der PP1 α über den Zeitraum von eineinhalb Stunden wurde mithilfe eines Küvettentests ermittelt. Da schon lange bekannt ist, dass die Aktivität von aufgetauten Enzymen bei erneutem Abkühlen absinken kann [Heber, 1968], sollte gleichzeitig der Einfluss der Umgebungstemperatur, bei der die fertige Enzymlösung gelagert wurde, auf die Enzymaktivität getestet werden.

Die Durchführung erfolgte in Küvetten wie unter Abschnitt 11.4 beschrieben mit pNPP als Substrat. Die verwendeten Enzymlösungen wurden über den Testzeitraum hinweg zum einen bei RT und zum anderen bei 0°C gelagert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.6 dargestellt.

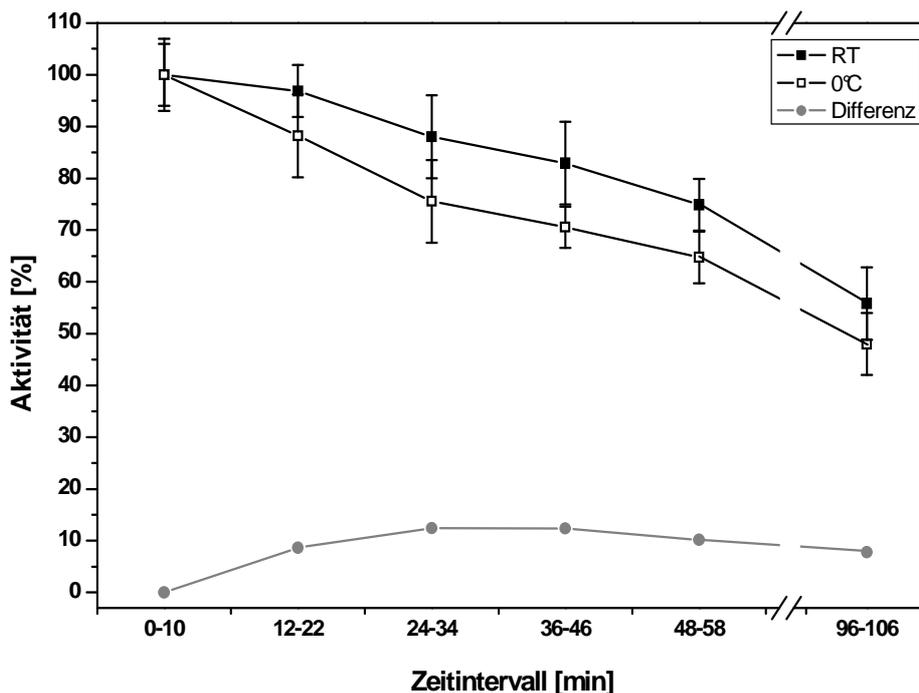


ABBILDUNG 5.6: Aktivitätsverlust der PP1 α durch Lagerung von verdünnten Enzymlösungen bei RT und 0°C über 106 min. Zusätzlich gezeigt (graue Punkte) ist die Differenz der beiden Signale. (Fehler: Standardabweichung, n=3)

Man erkennt bei beiden Kurven einen linearen Abfall der Aktivität über die Zeit. Die Aktivitäten im ersten Messintervall unterschieden sich nicht, da die Behandlung der Enzymlösungen bei diesen Messungen identisch war. Aus den bei 0°C gelagerten Proben wurde jeweils 5 min vor der Messung ein Aliquot entnommen und in einem Wasserbad

auf RT erwärmt, sodass jedes vermessene Aliquot gegenüber dem bei RT gelagerten einen weiteren Abkühl- und Erwärmungszyklus durchlief. Die Differenz zwischen den beiden Reihen blieb konstant, d. h. die Lagerung bei 0°C hatte keinen Einfluss auf die Abnahme der Aktivität. Die Gesamtaktivität sank durch den 2. Temperaturzyklus um ca. 10% ab.

Einfluss der HPLC-Parameter: Zur Trennung von Microcystinen wird in der HPLC häufig Acetonitril als organisches Eluens verwendet [Meriluoto, 1997]. Um den Einfluss verschiedener Lösungsmittel zu testen, wurden im MTP-Format Messreihen mit Methanol und Acetonitril durchgeführt. Dabei wurden zu den Enzymlösungen je 30% (v/v) einer methanolischen bzw. Acetonitril-haltigen Lösung zugegeben, um einen Gesamtgehalt von 0% - 30% an Lösungsmittel einzustellen. Wie aus Abbildung 5.7 ersichtlich wird, war Methanol als mobile Phase besser geeignet als Acetonitril, wie auch schon von Fabel *et al.* [Fabel, 2007] für PP 1 der Firma Sigma festgestellt wurde. Bereits ab einem Gehalt von mehr als 20% Acetonitril konnte kein Signal mehr festgestellt werden.

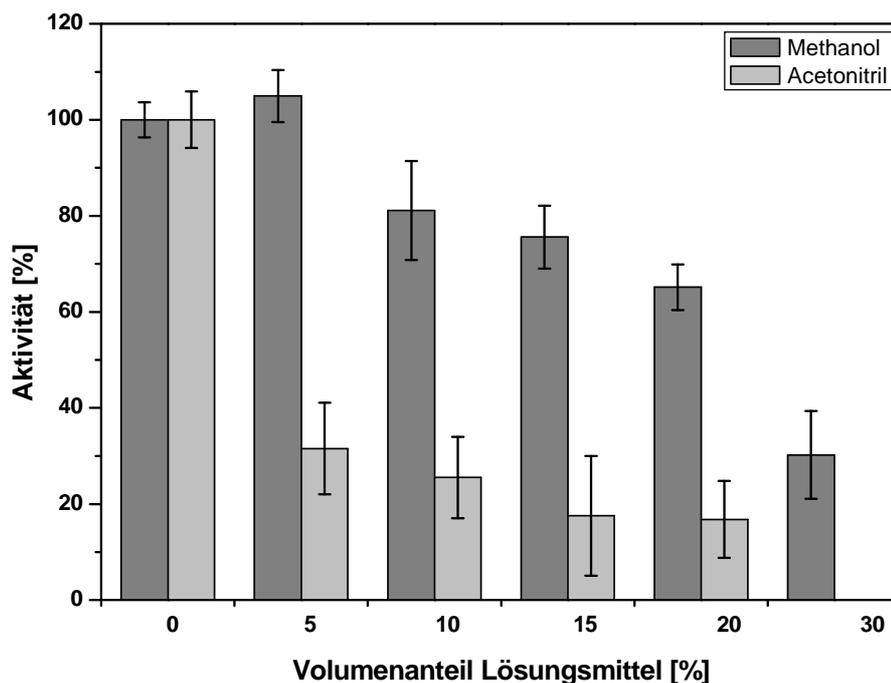


ABBILDUNG 5.7: Einfluss der in der HPLC verwendeten Lösungsmittel auf die Aktivität der Proteinphosphatase. (Fehler: Standardabweichung, n=3)

Häufig wird in der HPLC-Trennung von Microcystinen Trifluoressigsäure (TFA) als Additiv eingesetzt, wobei üblicherweise 0.05% (v/v) der Säure eingesetzt werden [Aguete, 2003]. In einem MTP-Test wurde die Verträglichkeit des Enzyms gegen 0.05% (v/v) TFA getestet. Die Versuchsbedingungen wurden gegenüber denen in Abschnitt 11.3 beschriebenen in der Form geändert, dass das Verhältnis von Enzymlösung und potenziell

toxischer Probenlösung 4:1 (v/v) bei einem Gesamtvolumen von 150 μL betrug. Dies entsprach dem verwendeten Verhältnis im online-System. Die Pufferkapazität war ausreichend, und der pH-Wert blieb stabil bei 7. Laut t-Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben nachgewiesen werden.

5.1.4 Zusammenfassung

In MTP-Tests wurden die Bedingungen zur Durchführung von Inhibitionstests mit dem Fusionsprotein untersucht. Es stellte sich dabei heraus, dass für eine kontinuierliche Zugabe des Substrates DifMUP besser geeignet ist als pNPP, da die Empfindlichkeit von DifMUP höher liegt und kein signifikanter Unterschied im Autohydrolyseverhalten festzustellen war. Als die am besten geeignete Konzentration an Substrat erwies sich 1 mM gepaart mit einer Enzymkonzentration von 1 U/mL. Die Inhibitionszeit mit den Analyten wurde auf 10 min festgesetzt, ebenso die Inkubationszeit mit dem Substrat DifMUP. Die Aktivität der Proteinphosphatase wurde stichprobenartig per Küvettentest untersucht. Hierbei kam das Substrat pNPP zum Einsatz. Diese Aktivitätstests wurden zum einen durchgeführt, wenn neue Batches Verwendung fanden, aber auch, um die Langzeitstabilität der Lagerung zu überprüfen.

5.2 Indikator für die Gesamttoxizität: Leuchtbakterium *Vibrio fischeri*

Es wurden lyophilisierte Leuchtbakterien vom Stamm *Vibrio fischeri* eingesetzt, um die Möglichkeit zu eröffnen, eine allgemeintoxikologische Aussage über die Analyten machen zu können. Zur Optimierung der Parameter im Hinblick auf ein online-System wurden auch hier MTP-Tests durchgeführt.

5.2.1 Medienwahl

Der existierende DIN-Test zur Bestimmung von allgemeintoxischen Wirkungen wässriger Proben mit Leuchtbakterien, DIN EN ISO 11348-3 [DIN, 1998], wird als Küvettentest mit einem Gesamtflüssigkeitsvolumen von 510 μL durchgeführt. Zur Verdünnung der Leuchtbakteriensuspension wird dabei – wie auch vom Lieferanten der Leuchtbakterien empfohlen – 2% Natriumchlorid, 0.2% Mangan(II)chlorid und 0.03% Kaliumchlorid in wässriger Lösung verwendet.

Bei den Tests nach dem DIN-Verfahren werden nur nach 15 min und 30 min Datenpunkte gemessen. Die Messungen erfolgen bei 15°C. Im online-System musste eine kontinuierliche Zudosierung der *Vibrio fischeri* Suspension erfolgen. Daher sollte die Intensität der Biolumineszenz über einen längeren Zeitraum hinweg nur leichten Schwankungen bzw. geringer Abschwächung unterliegen. Da dies in den vorliegenden Untersuchungen im Fall der Verdünnung mit Natriumchlorid-Lösung nicht der Fall war, wurde als Medium zum Verdünnen ein modifiziertes Nährmedium [Dunlap, 1992] verwendet. Zusätzlich zu den in der Literatur angegebenen Substanzen wurde noch ein Phosphatpuffer hinzugegeben, um eine bessere pH-Stabilität im online-Verfahren gewährleisten zu können. Durch die Verwendung des Nährmediums konnte eine bessere Langzeitstabilität des Signalniveaus erreicht werden. Dies ist in Abbildung 5.8 zu erkennen.

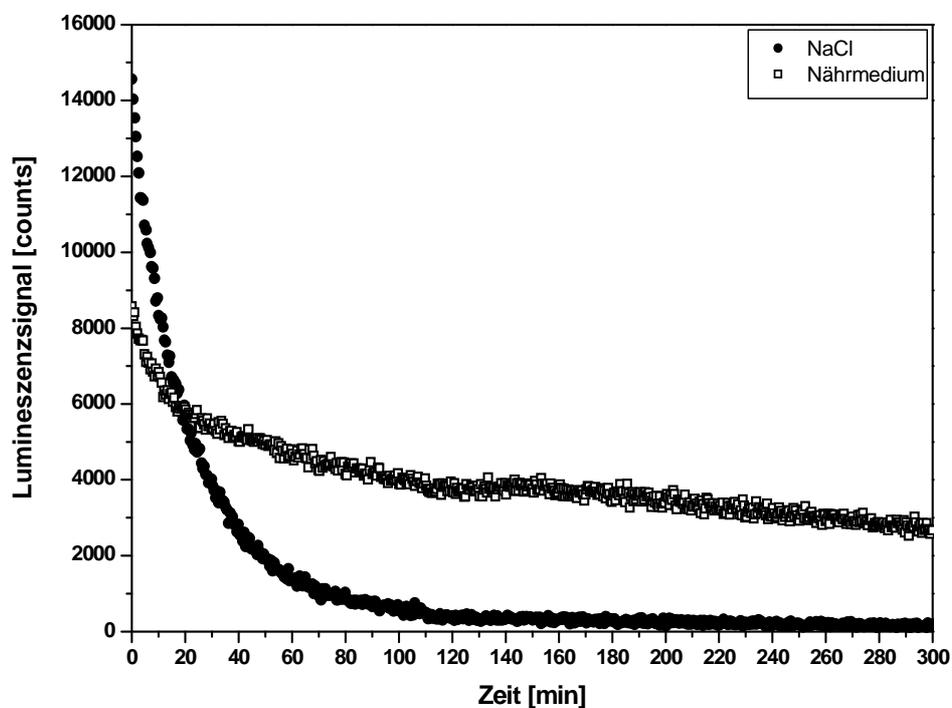


ABBILDUNG 5.8: Langzeitmessungen der Lumineszenzsignale von *Vibrio fischeri* mit 2%iger Natriumchlorid-Lösung und modifiziertem Nährmedium nach Dunlap *et al.* [Dunlap 1992] bei 19°C in der MTP. Die Fehlerbalken wurden aus Übersichtsgründen nicht eingezeichnet, jedoch betrug die Standardabweichung nicht mehr als 1.5%. (n=3)

Dadurch konnte die Suspension über einen längeren Zeitraum hinweg verwendet werden. Die Messungen wurden unmittelbar nach dem Verdünnen gestartet, sodass die Phase des Temperierens auch gemessen wurde. Diese Phase betrug 15 min. Die stärkste Signalabnahme war innerhalb der ersten 20 min zu beobachten. Im Fall des Nährmediums betrug diese 44%, bei Natriumchlorid als Medium sogar 62%. Im Zeitraum von 20 min bis 120 min wurde im Fall des Nährmediums der gleiche Abfall beobachtet wie in den ersten

20 min. Bei den Verdünnungen mit Natriumchlorid-Lösung war nach 120 min kaum noch eine luminometrische Aktivität zu erkennen. Auch zeigte sich, dass die Signalintensitäten und damit auch die Differenz zum Nullsignal mit dem Nährmedium, absolut gesehen, höher lagen. Diese Differenz sollte im online-Test als Messbereich dienen und daher einen möglichst großen Bereich umfassen.

Um die Signalintensität noch weiter zu erhöhen, wurden die Substanzen zusammen mit cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), das eine wichtige intrazelluläre Verbindung im Prozess der Lumineszenzentwicklung darstellt [Dunlap, 1989] und N-Acyl-L-homoserinlacton (AHL), das als Autoinducer die Leuchtstärke der Bakterien moduliert [Boettcher, 1995], als Additive im Nährmedium getestet. Diese Tests erfolgten in der MTP. Die Verdünnung der Bakteriensuspension betrug 1:20, so dass die Konzentration von *Vibrio fischeri* bei ca. 10^5 Zellen/mL lag. Zum Verdünnen wurde das modifizierte Nährmedium verwendet. Die in Abbildung 5.9 angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf das Gesamtvolumen der Lösung.

Die relative Leuchtintensität (Angabe in %) wurde durch Multiplikation des Quotienten aus modifizierter Signalintensität (Zugabe des Additivs) und unmodifizierter Intensität mit dem Faktor 100 berechnet.

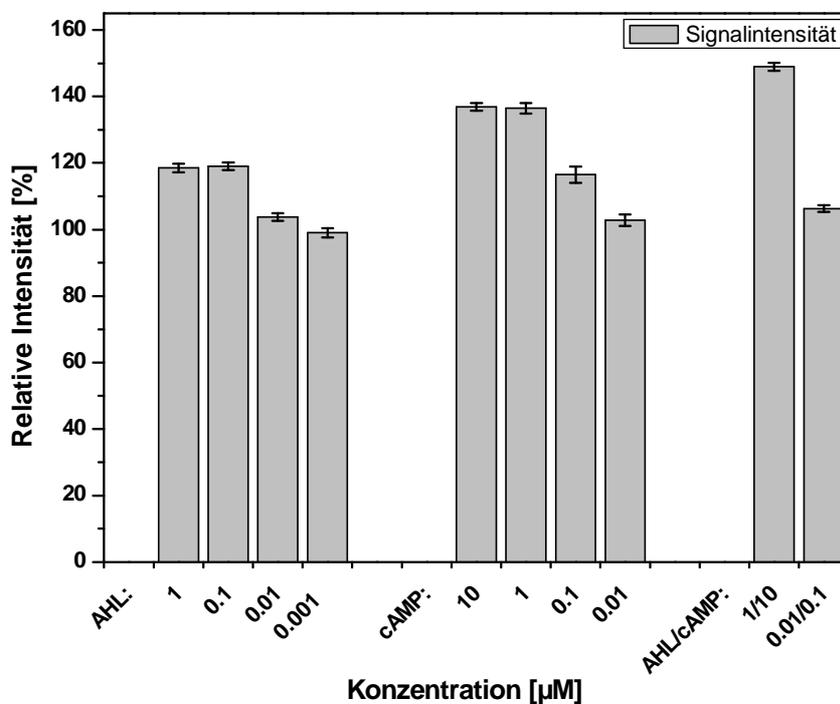


ABBILDUNG 5.9: Tests der beiden Additive AHL und cAMP zur Verstärkung der Signalintensitäten bei konstanter Bakterienkonzentration. Als Medium zum Verdünnen der Leuchtbakterien diente ein modifiziertes Nährmedium. (Fehler: Standardabweichung, n=9)

Der Einfluss von cAMP auf die Leuchtintensität erwies sich gegenüber dem von AHL als stärker. Bei beiden Substanzen wurde ein Intensitätsplateau erreicht, bei dem eine Erhöhung der Konzentration nicht mehr zu einer Steigerung der Leuchtkraft beitrug. Durch die Kombination beider Additive wurde die beste Signalsteigerung um fast 50% gegenüber von unmodifizierten Messungen erzielt. Durch stärkere Signale bei gleicher Bakterienkonzentration wird die Empfindlichkeit gesteigert, da bereits im Falle geringer Inhibition größere Signalunterschiede gemessen werden können.

In der Reaktionskette zur Lumineszenzentwicklung spielt Sauerstoff eine wichtige Rolle [Bourgois, 2001]. So lässt sich mit bloßem Auge beobachten, dass die Leuchtintensität gesteigert wird, wenn man einen Kolben mit hoher Leuchtbakterienkonzentration schüttelt und somit für erhöhte Sauerstoffzufuhr sorgt. Dieses Prinzip sollte für die Tauglichkeit bei der online-Detektion untersucht werden. Die Messungen wurden wie in Abschnitt 11.3 beschrieben durchgeführt.

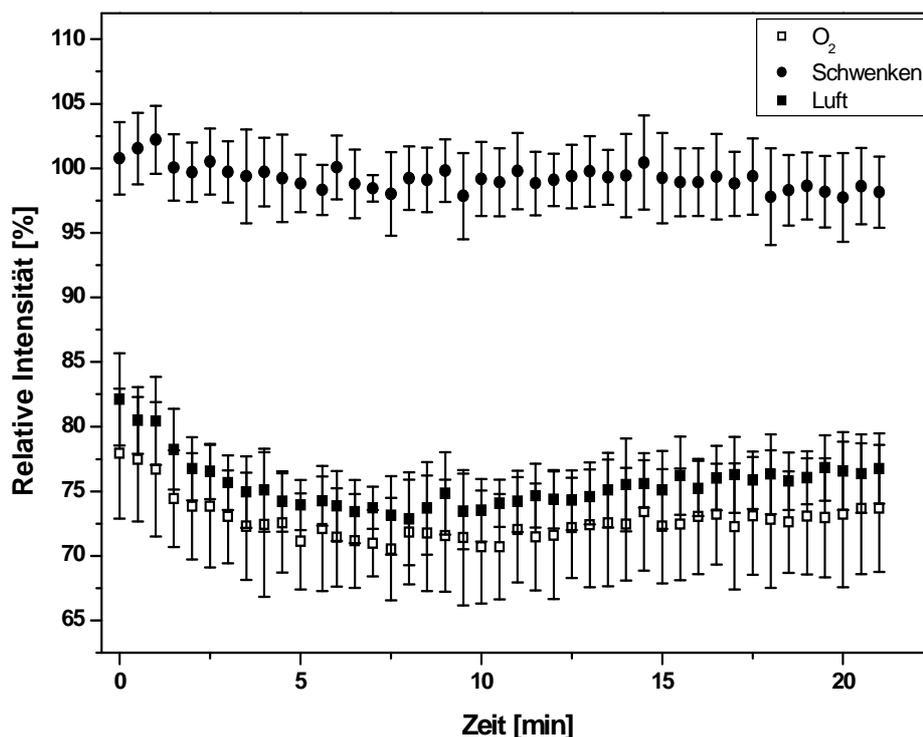


ABBILDUNG 5.10: Modifikation der Leuchtkraft durch Einblasen von Sauerstoff bzw. Pressluft über 1 min in je 2 mL Bakteriensuspension. Alternativ dazu wurde ein Ansatz geschwenkt. Die relativen Intensitäten beziehen sich auf Ansätze, die nicht behandelt wurden. (Fehler: Standardabweichung, n=3)

Abbildung 5.10 zeigt die relativen Intensitätsverläufe. Das Einleiten von sauerstoffhaltiger Luft oder reinem Sauerstoff führte zu einer Erniedrigung der Leuchtintensität, die vermutlich durch eine Stressreaktion der Bakterien hervorgerufen wurde. Das Schwenken der

Suspension über den gleichen Zeitraum zeigte keinerlei Effekte auf das Leuchtverhalten. Betrachtet man die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser, zeigt sich, dass diese bei 20°C mit 9.2 ppm [McEvoy, 1996] gering ist. Dies erlaubt die Vermutung, dass die verwendeten Flüssigkeitsvolumina zu gering waren, um eine signifikante Erhöhung des Sauerstoffgehalts in der Lösung bezogen auf die Gesamtzahl der vorhandenen Zellen zu erzielen. Des Weiteren tauschte sich der gelöste Sauerstoff schnell mit der Umgebungsluft aus.

Eine andere Möglichkeit, Sauerstoff in eine Lösung einzubringen, ist die Zugabe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Dieses kann vom bakterieneigenen Enzym Katalase abgebaut werden [Visick, 1998], indem die Katalase vom H_2O_2 oxidiert und von einem zweiten Peroxidmolekül unter O_2 -Bildung wieder reduziert wird [Chelikani, 2004]. Hierzu wurden Testreihen mit verschiedenen Gehalten an H_2O_2 im MTP-Format gemessen. Wie in Abbildung 5.11 gezeigt, hat H_2O_2 mit steigender Konzentration einen negativen Einfluss auf die Signalintensität. Die Leuchtkraft nimmt nach einiger Zeit wieder zu, erreicht allerdings nicht die Intensitäten des Kontrollansatzes. Der Verlauf der Kurven gleicht sich ab ca. 50 min dem der Blindmessungen an. Ab einem Gehalt von 0.1% tritt die antiseptische Wirkung des H_2O_2 auf, die Bakterien werden total gehemmt und die Signalintensität bricht zusammen.

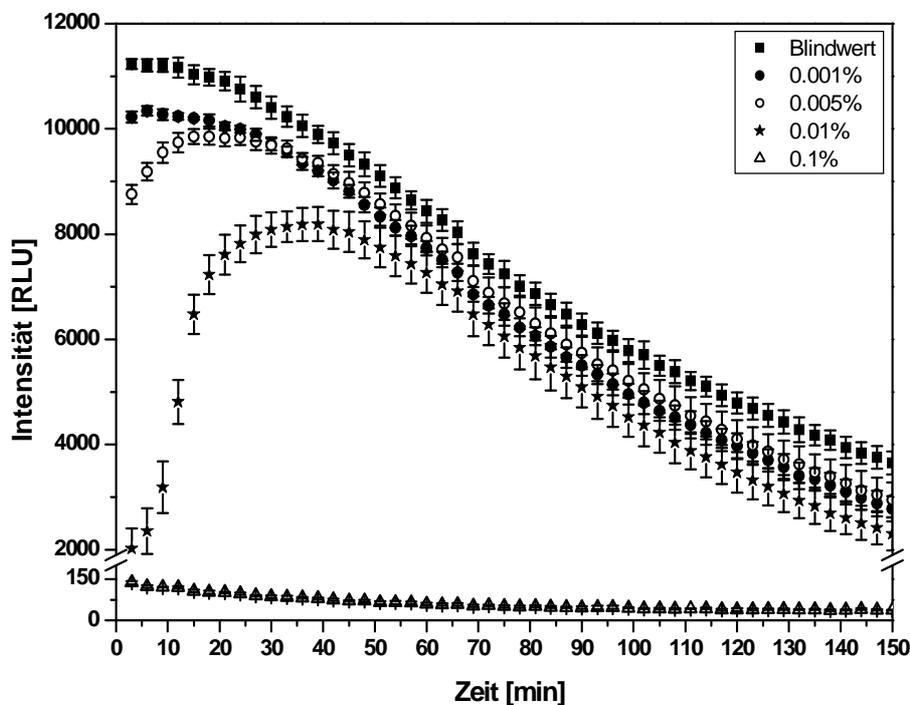


ABBILDUNG 5.11: Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Signalintensität der Leuchtbakterien. Verschiedene Konzentrationen werden bei 19°C getestet, wobei immer ca. 10^5 Zellen/mL verwendet werden. (Fehler: Standardabweichung, n=4)

Es zeigte sich, dass sich durch eine Zufuhr von Sauerstoff weder durch Einleiten in Form von reinem Sauerstoff oder Umgebungsluft noch durch Zugabe von Wasserstoffperoxid eine Steigerung der Signalintensitäten erreichen lässt.

5.2.2 Inhibitoren

Als Testsubstanzen zum Aufbau eines Detektors zur Analyse allgemeintoxischer Substanzen sollten chlorierte Phenole verwendet werden. Die toxische Wirkung dieser Stoffklasse im Hinblick auf verschiedene Leuchtbakterien ist aus der Literatur hinreichend bekannt, z. B. auf das Leuchtbakterium *Vibrio harveyi* [Ismailov, 2000] oder auf das *Photobacterium phosphoreum* [Kaiser, 1991].

Die Tests erfolgten wie unter Abschnitt 11.3 beschrieben im MTP-Format. Sie sollten nicht zur Optimierung der Nachweisgrenzen dienen, sondern zur Abschätzung der Toxizität auf das eingesetzte Leuchtbakterium. Auch sollte ermittelt werden, wie kurz die Inkubationszeit gewählt werden konnte, um die Messungen erfolgreich durchführen zu können. Nach dem DIN-Verfahren [DIN, 1998] erfolgten die Messungen nach 15 min bzw. 30 min Inkubationszeit. Für den online-Detektor sollte diese Zeit aber kürzer gewählt werden. Da keine konditionierbare Kammer für den online-Aufbau zur Verfügung stand, musste zusätzlich der Einfluss der Temperatur geprüft werden, da die im DIN-Verfahren verlangten 15°C mit dem möglichen Aufbau nicht erreichbar waren. Dazu wurden Inhibitionsmessungen bei 23°C und bei 21°C mit 3,4-Dichlorphenol (3,4-DCP) als Inhibitor durchgeführt. Die aufgetragenen Inhibitionsraten (RI) wurden wie in Abschnitt 11.5 beschrieben berechnet.

Bei höherer Temperatur stieg die effektive Konzentration, bei der 50% der Testorganismen einen Effekt zeigen (EC_{50}) von 9.7 mg/L \pm 0.5 auf 26.1 mg/L \pm 2.3 an. Die Nachweisgrenze, berechnet nach der 3s-Methode (siehe Gleichung (5.1)), verschlechterte sich mit der Temperaturerhöhung von 0.1 mg/L auf 0.5 mg/L. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass bei höherer Temperatur die Standardabweichungen ebenfalls stiegen und dadurch eine genaue Kalibrierung nicht möglich war (Abbildung 5.12). Ein weiteres Absenken der Temperatur im online-Aufbau war technisch nicht realisierbar. Daher wurden die weiteren Versuche bei 21°C durchgeführt.

Die Kalibrierkurven für die Chlorphenole 2,4-Dichlorphenol (2,4-DCP), 3,4-Dichlorphenol (3,4-DCP), 3,5-Dichlorphenol (3,5-DCP), 2,3,4,6-Tetrachlorphenol (2,3,4,6-TCP) und 2,3,5,6-Tetrachlorphenol (2,3,5,6-TCP) wurden bei 21°C aufgenommen, um deren

inhibitorische Wirkung bei kurzer Inkubationszeit zu ermitteln und um später die Qualität der erzielten online-Ergebnisse einordnen und vergleichen zu können. Tabelle 5.3 zeigt die in der MTP gemessenen Parameter der sigmoidalen Kalibrierkurven.

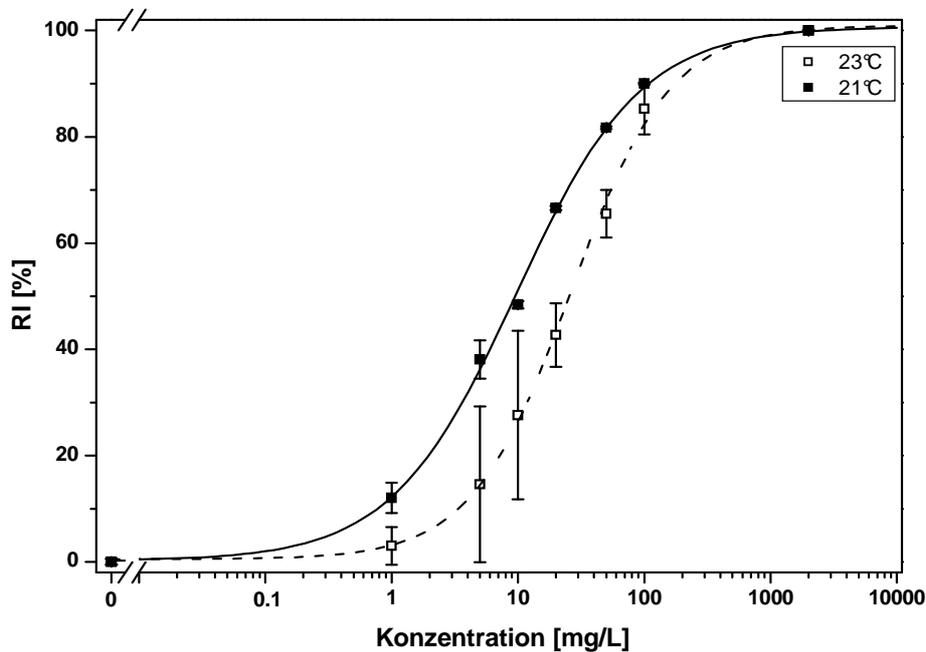


ABBILDUNG 5.12: Einfluss der Temperatur auf die Inhibitionskurven von *Vibrio fischeri*. Die Hemmung erfolgte mit 3,4-DCP. Die Messungen wurden jeweils unter gleichen Bedingungen durchgeführt, lediglich die Temperatur wurde variiert. (Fehler: Standardabweichung, n=4)

Die Nachweisgrenzen für die gewählte Substanzklasse waren im Bereich von 0.1 mg/L bis 7.8 mg/L angesiedelt. Es ließ sich jedoch kein Trend für eine Änderung der Nachweisgrenzen mit dem Chlorierungsgrad der Phenole feststellen. Das Gleiche galt für die EC₅₀-Werte, die im unteren bis mittleren mg/L-Bereich angesiedelt waren. Der EC₅₀-Wert gibt Aufschluss darüber, wie affin Hemmsubstanzen gegenüber dem Target sind. Die beiden Substanzen 2,4-DCP und 3,5-DCP zeigten die geringsten Affinitäten, sowohl durch die höchsten Nachweisgrenzen als auch die höchsten Testmittelpunkte.

TABELLE 5.3: Daten aus den Kalibrierkurven für verschiedene Chlorphenole. Gezeigt sind die EC₅₀-Werte, die Nachweisgrenzen (LOD) sowie die quasi-linearen Bereiche der Kurven. Die Messungen erfolgten in MTP bei 21°C. (n=3)

Substanz	EC ₅₀ ± 1S [mg/L]	LOD [mg/L]	Quasi-linearer Bereich [mg/L]
2,4-DCP	40 ± 1.7	1.5	20 - 100
3,4-DCP	9.7 ± 0.5	0.1	3 - 30
3,5-DCP	26.4 ± 1.2	7.8	15 - 40
2,3,4,6-TCP	9.4 ± 2.9	1.2	5 - 40
2,3,5,6-TCP	10.6 ± 1.0	1.3	5 - 20

5.2.3 Stabilität der Bakterien

Lösungsmittelverträglichkeit: Die WBA kombiniert die physikalisch-chemische Trennung mit einer biochemischen Detektionsmöglichkeit, um potenzielle Schadstoffe zu identifizieren. Daher muss der Bioinhibitionsdetektor kompatibel mit der mobilen Phase der chromatographischen Trennung sein.

Da sich die Trennung auf RP-HPLC konzentrierte, wurden die häufig verwendeten Lösungsmittel Methanol und Acetonitril sowie zusätzlich Aceton mit den Leuchtbakterien in Mikrotiterplatten inkubiert und anschließend die Signalintensitäten ermittelt. Die Inkubationsdauer betrug 5 min. Die Leuchtbakterien wurden mit dem Nährmedium verdünnt, um die Daten auf das online-System übertragen zu können.

Die Ergebnisse zeigten, dass Methanol die geringste toxische Wirkung von den getesteten Lösungsmitteln auf die Leuchtbakterien hatte. Während bei geringen Konzentrationen die signalschwächende Wirkung der drei Lösungsmittel ähnlich war, wurde ab einem Gehalt von 8% die Lumineszenz durch Acetonitril und Aceton deutlich stärker unterdrückt (Abbildung 5.13 oben). Da die chromatographische Trennung nicht nur isokratisch, sondern als Gradiententrennung erfolgen sollte, mussten auch höhere Konzentrationen verträglich sein. Dies traf am ehesten auf Methanol als Lösungsmittel zu. Außerdem sollte ein möglichst großer Volumenanteil des Eluatstroms nach der Trennung in die Biodetektion fließen, um eine Erhöhung der Nachweisgrenzen durch Verdünnen und Teilen von Flüssen und damit auch den injizierten Analyten gering zu halten. Daher wurden weitere Tests zur Verträglichkeit gegenüber Methanol so durchgeführt, dass zu 110 μ L Leuchtbakteriensuspension unterschiedliche Volumina an 50%iger bzw. 90%iger methanolischer Lösung zugegeben wurden (Abbildung 5.13 unten). Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse bei ähnlichen Volumenanteilen an Methanol durch die Zugabe unterschiedlicher Mengen an Flüssigkeit. (13.8% bei 20 μ L mit 90% und 13.3% bei 40 μ L mit 50% Methanol).

Da in der Flüssigchromatographie der Gradient in der Regel mit bis zu 90% Methanol gefahren wird, war hier eine deutliche Einschränkung im Bezug auf die in den Biodetektor überführbaren Menge gegeben. Verbesserungen konnten lediglich durch eine Modifikation der chromatographischen Methode im Hinblick auf den Gradienten erfolgen.

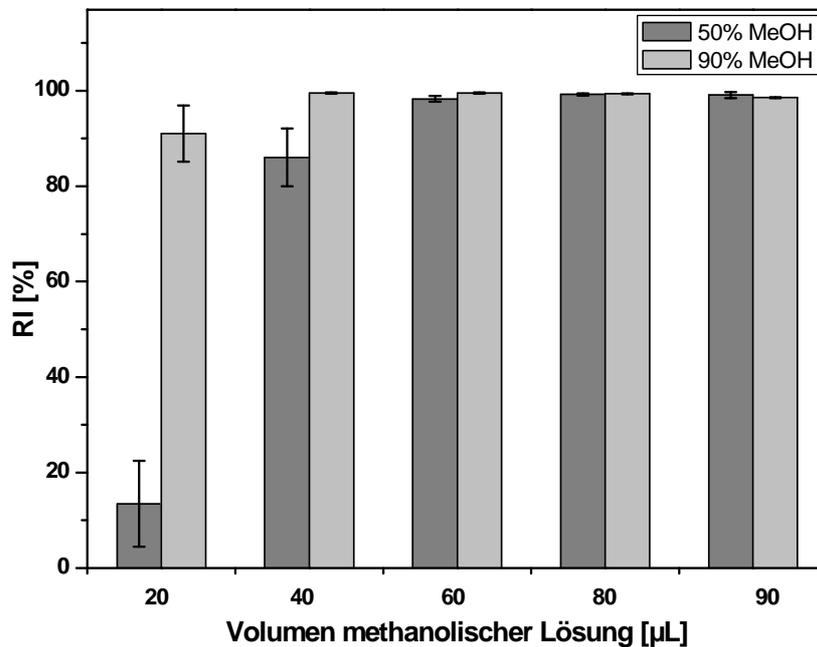
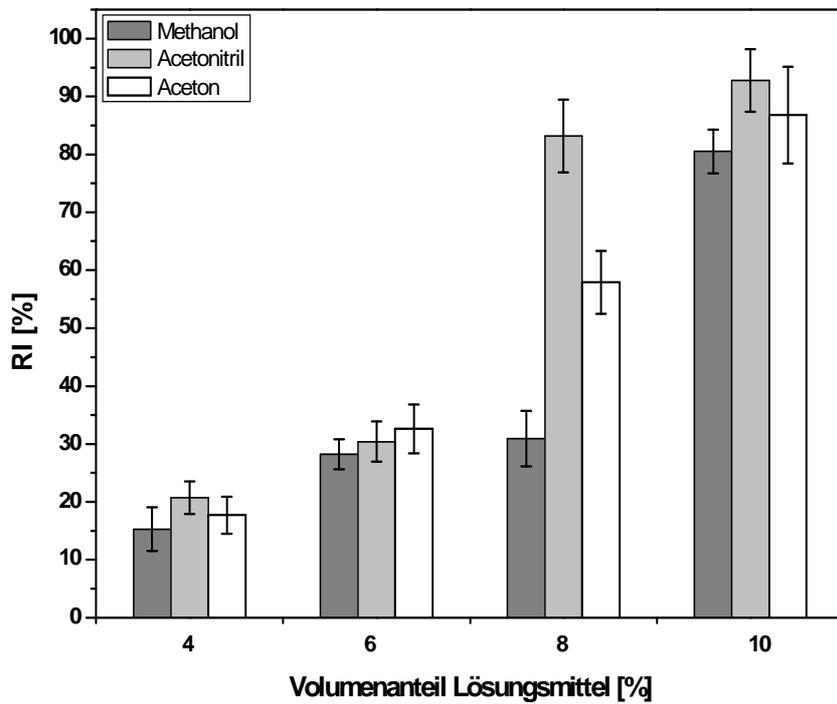


ABBILDUNG 5.13: Einfluss von Lösungsmitteln auf die Leuchtbakterien. Die Tests wurden im MTP-Format durchgeführt. *oben:* der Einfluss verschiedener möglicher Lösungsmittel für die vorangehende HPLC-Trennung. *unten:* zu 110 µL Bakteriensuspension wurden verschiedene Volumina von 50% bzw. 90% methanolischer Lösung gegeben. Ab einer Zugabe von 60 µL (16.6% bei 50%iger Lösung) tritt in beiden Fällen eine totale Inhibition auf. (Fehler: Standardabweichung, n=4)

pH-Stabilität: In der WBA soll die biochemische Detektion mit den klassischen Analysemethoden kombiniert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Kopplung an einen Photodiodenarray (PDA) und an einen massenspektrometrischen Detektor (MS) erfolgen. Die Ionisierung und damit die Signalausbeute bei der positiven Elektrosprayionisation (ESI) wurde durch die Zugabe von 0.1% Ameisensäure verbessert [Gustavsson, 2001].

Es wurden Tests zur pH-Stabilität der Leuchtbakterien durchgeführt, wie in Abschnitt 11.3 beschrieben ist. Bei pH-Werten unter 2 und über 11 zeigte sich, dass eine starke Hemmung des Lumineszenzsignals auftrat. Das Maximum der Leuchtintensität lag bei einem pH-Wert von 7. Dies steht in gutem Einklang mit dem im DIN-Test geforderten pH-Bereich von 7 ± 0.2 . Die Pufferkapazität des modifizierten Nährmediums war ausreichend, um bis 50% (v/v) der in der HPLC verwendeten ameisensauren Lösung abzupuffern und einen konstanten pH-Wert zu gewährleisten..

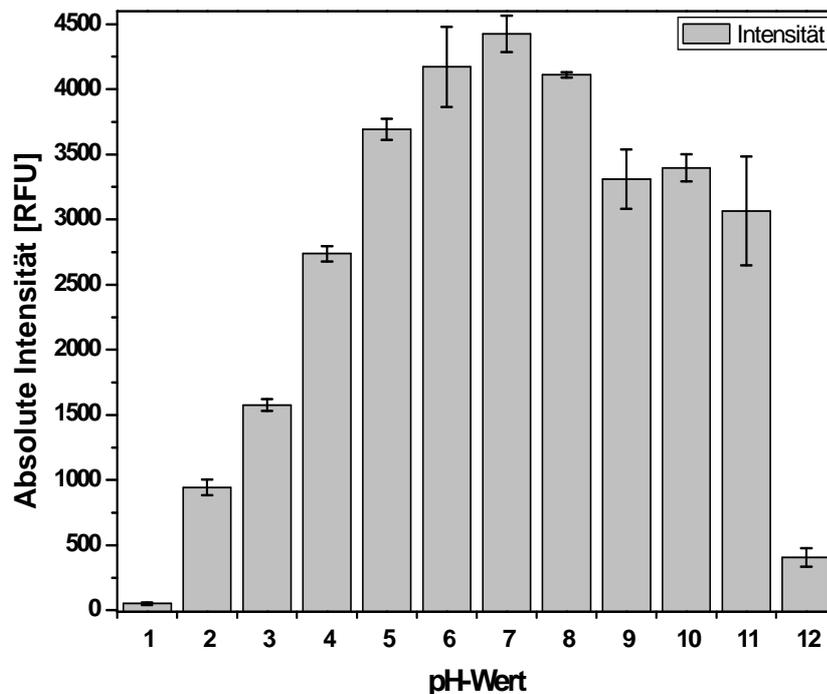


ABBILDUNG 5.14: Die Signalintensitäten der Leuchtbakterien sind zeigen eine pH-Wert-Abhängigkeit. Bei MTP-Messungen ein Optimum bei pH=7. Die Messungen wurden in modifiziertem Nährmedium durchgeführt, dessen pH-Wert mit 1M NaOH bzw. 1M HCl-Lösung eingestellt wurde. (Fehler: Standardabweichung, n=4)

5.2.4 Zusammenfassung

In offline-Experimenten wurden die Parameter zum Aufbau eines online arbeitenden Bioinhibitionsdetektors mit *Vibrio fischeri* als Target ermittelt. Durch Wahl eines geeigneten Mediums zur Verdünnung der Bakteriensuspension in Form eines modifizierten Nähr-

mediums unter Zugabe von cAMP und AHL konnte die Stabilität des Lumineszenzsignals gegenüber dem gebräuchlichen Medium verbessert werden. Die Verdünnung der Bakterien auf ca. 10^5 Zellen/mL war ausreichend, um eine Signalintensität zu erhalten, die zum Messen von Inhibitoren ausreichten. Ein pH-Wert von 7 erwies sich als am besten geeignet. Die Stabilität von *Vibrio fischeri* gegenüber Methanol war mit ca. 35% Hemmung bei 8% Lösungsmittel besser im Vergleich zu anderen getesteten Lösungsmitteln.

6 Aufbau der Fluidik

Der Aufbau der Fluidik wurde teilweise von Frau Fabel übernommen [Fabel, 2007], die in ihrer Arbeit als Target das Enzym Acetylcholinesterase als Indikator für Neurotoxizität etablierte. In der vorliegenden Arbeit wurde das Enzym Proteinphosphatase 1 α (PP1 α) als Indikator für Hepatotoxizität herangezogen, das rekombinant hergestellt wurde und somit in ausreichender Menge für Optimierungsprozesse zur Verfügung stand. Als Indikator für die allgemeine Toxizität wurden Leuchtbakterien vom Stamm *Vibrio fischeri* verwendet, die kommerziell erhältlich sind.

Das allgemeine Flussschema des Bioinhibitionsdetektors BID nach chromatographischer Trennung ist in Abbildung 6.1 gezeigt. Nachdem die Probe über eine *Reversed Phase* Chromatographie (RP) getrennt wurde, wird der Fluss aufgeteilt. Ein Teil des Flusses gelangt in den BID, der Rest des Eluats steht optional für andere Detektoren, z. B. UV/Vis-Detektor oder Massenspektrometer, zur Verfügung.

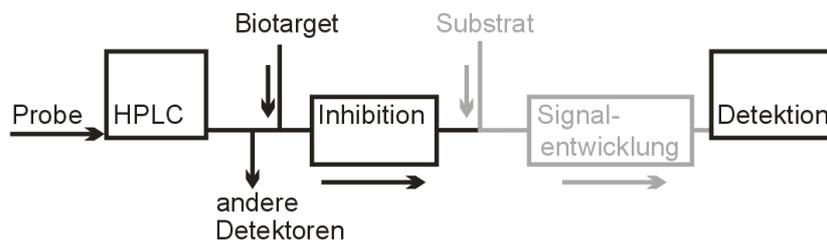


ABBILDUNG 6.1: Schematischer Aufbau des Bioinhibitionsdetektors im Sinne der Wirkungsbezogenen Analyse. Die grau gefärbten Abschnitte sind nur bei Enzymen als Targets notwendig. Beim Einsatz von Leuchtbakterien ist dieser Teil, der zur Signalentwicklung dient, nicht erforderlich.

Im Falle von Enzymen als Targetstruktur baute sich der BID aus drei Teilen auf, nämlich aus zwei Reaktoreinheiten und einer Detektionseinheit. Wie in Abschnitt 1.4 erwähnt, existieren mehrere Möglichkeiten, einen Nachsäulenreaktor aufzubauen. Es wurde in der vorliegenden Arbeit ein auf homogener Enzyminhibition basierender Detektor verwendet. Vor der ersten Reaktorschleife wurde die Enzymlösung zum Eluatstrom zudosiert, vor der zweiten Reaktorschleife erfolgte die Zugabe des Substrats zur Signalentwicklung. In beiden Reaktorschleifen verweilten die Lösungen und Suspensionen über angemessene Zeiträume, um die erforderlichen Effekte auszubilden. Zuletzt erfolgte die Datenerhebung mit einem geeigneten Detektionssystem wie z. B. einem Fluoreszenzdetektor.

Im Fall der Verwendung von Leuchtbakterien als Targetstruktur bestand der BID lediglich aus zwei Kompartimenten. Hier war die Zudosierung eines Substrates nicht notwendig, da das Signal von den Bakterien selbst erzeugt wurde. Die Signalaufzeichnung erfolgte in diesem Fall durch einen Lumineszenzdetektor.

Durch die Verwendung des online integrierten BID bestand der Vorteil, zu jedem Zeitpunkt während einer Messung frische Targets in konstanter Menge zum Eluat der Trennung zugeben zu können. Nachteilig daran war jedoch die Tatsache, dass größere Mengen an Chemikalien in Form von teuren Targets oder Substraten verbraucht wurden.

6.1 Pumpenwahl

Die verschiedenen Flüssigkeitsströme mussten mit Pumpen in das System eingebracht werden. Hierbei war zur besseren Reproduzierbarkeit eine pulsationsarme, konstante und kontinuierliche Zuführung wichtig. Generell bestimmt die Auflösung des Schrittmotors zur Bewegung von Kolben bei Spritzenpumpen und Kolbenpumpen das Pulsationsverhalten. Dieses wurde am besten durch eine Kolbenpumpe der Firma VICI erreicht, deren Schrittmotor eine Auflösung von 243 200 Schritte pro 100 μL besaß. Mit dieser Pumpe wurde die PP1 α -Lösung dem BID zugeführt, die den größten Fluss im System darstellte. Außerdem konnte die Enzymlösung, vorgelegt in Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen, im Wasserbad auf 20°C temperiert werden. Nachteilig bei der Kolbenpumpe war jedoch das verhältnismäßig große Totvolumen von ca. 100 μL , das bei der Applikation des Substrats mit 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ zu einem sehr hohen Verbrauch geführt hätte.

Die Zuleitung des Substrates wurde durch eine Spritzenpumpe gewährleistet. Hierbei kam die Pumpe PHD 2000 (Harvard Instruments) zum Einsatz, die von einem hochauflösenden Schrittmotor angetrieben wird. Die minimale Schrittgeschwindigkeit, die sich aus Flussrate und Kolbendurchmesser errechnet, beträgt ein Schritt pro 27.3 s. Dies entspricht einer Schrittlänge von 0.082 μm . Da der Kolbendurchmesser in die Schrittlänge einfließt, sollte eine Spritze verwendet werden, die möglichst nah am zu verwendeten Volumen der Lösung liegt. Daher wurde eine 250- μL -Spritze verwendet, bei der das Volumen in der Größenordnung des zu verwendenden Volumens für eine Messung lag. Die Zugabe der Proteinlösung erfolgte mithilfe einer Kolbenpumpe, die das pulsationsärmste Strömungsprofil aufwies. Die Leuchtbakterien wurden mit einer Spritzenpumpe in das System geleitet, um einen möglichst geringen Stress auf die Bakterien auszuüben.

Da die zum Segmentieren eingesetzte Luft vor dem Fluoreszenzdetektor entfernt werden musste, bestand die Notwendigkeit, den Flüssigkeitsstrom durch die Detektorzelle zu ziehen. Um dies möglichst pulsationsfrei zu bewerkstelligen, wurde zunächst versucht, durch Kopplung eines mit Flüssigkeit gefüllten Schlauches unter Ausnutzung der Schwerkraft den Fluss zu ermöglichen. Die Flussgeschwindigkeit war dabei vom Durchmesser und der Länge des Schlauches abhängig und somit nicht exakt einstellbar. Das Vorhandensein von Luft führte ebenfalls zur Veränderung der Fließgeschwindigkeit.

Eine weitere Möglichkeit bestand in der Verwendung der Kolbenpumpe von VICI, die selbstansaugend ist. Jedoch zeigte sich, dass sich bei den geringen Fließgeschwindigkeiten die teilweise nicht entfernten Luftblasen als sehr störend erwiesen: Sie resultierten in einer unregelmäßigen Basislinie. Daher wurde zu diesem Zweck eine Spritzenpumpe von Cavro verwendet, die mit einem Drei-Wege-Ventil ausgestattet war. Unter Verwendung von zwei Spritzen, die im Pendelbetrieb eingesetzt wurden, konnte unter der Steuerung durch das Programm Labview eine Spritze den Fluss aufrechterhalten, während die andere entleert wurde. Luftblasen, die durch den Detektor gelangten, konnten durch schnelle Entleerungsvorgänge der Spritzen zügig aus den Kolben eliminiert werden.

Als weiterer Zufluss in das System musste Luft eingebracht werden. Dazu wurde eine Schlauchpumpe eingesetzt. Die geförderten Volumina waren abhängig vom Schlauchdurchmesser sowie vom Anpressdruck und der Drehgeschwindigkeit der Walzen. Die Einstellung der Blasengröße war an dieser Stelle gut regelbar.

6.2 Gassegmentierung des Flusses

Da der Verbrauch an Reagenzien gering gehalten werden sollte, wurden die Flüsse möglichst niedrig gehalten und lagen bei einigen $\mu\text{L}/\text{min}$. Dazu musste der Eluatstrom aus der HPLC-Trennung geteilt werden, um bei geringen Volumina arbeiten zu können. Des Weiteren musste auf die Lösungsmittelverträglichkeit der Targets geachtet werden (siehe Abschnitt 5.1.3 und Abschnitt 5.2.3). Um variable Flussraten aus der HPLC in den BID einstellen zu können, wurde bei den Messungen mit Leuchtbakterien der Fluss durch Restriktionskapillaren mit einem einstellbaren Flussteiler geregelt. Dies erwies sich als sehr störanfällig für Schwankungen, z. B. durch den durch das Einbringen der Luftblasen verursachten schwankenden Rückdruck im System. Daher wurde bei den Messungen mit PP1 α ein Flussteiler verwendet, der bei 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ eine Teilungsrate von 1:20 hatte.

Die Reaktoren wurden in Form von *fused-silica* Kapillaren realisiert, die bei einem Innendurchmesser von 0.53 mm unterschiedliche Längen besaßen. Da die errechneten Reynolds-Zahlen im Bereich von 5 lagen, konnte von einer laminaren Strömung ausgegangen werden (Abschnitt 2.1). Dies führt zu einer Dispersion der zuvor aufgetrennten Analyten aufgrund des Strömungsprofils und damit verbunden zu bandenverbreiternden Effekten im BID [Fabel, 2006].

Um diese Effekte zu minimieren, kann der Fluss segmentiert werden. Fluidmechanisch wäre die Segmentierung mit nicht mischbaren Flüssigkeiten wie beispielsweise Hexan einfach zu handhaben. Da an den Phasengrenzen jedoch Flüssig-Flüssig-Extraktionsprozesse der zuvor durch RP-HPLC getrennten Analyten stattfinden, konnte Hexan aber nicht eingesetzt werden. Die Segmentierung erfolgte daher durch das Einbringen von Luft in das fluidische System. Dadurch bildeten sich kleine Reaktionsvolumina, die zum einen eine verbesserte radiale Vermischung innerhalb des Segments bewirkten und zum anderen die Longitudinaldispersion verringerten.

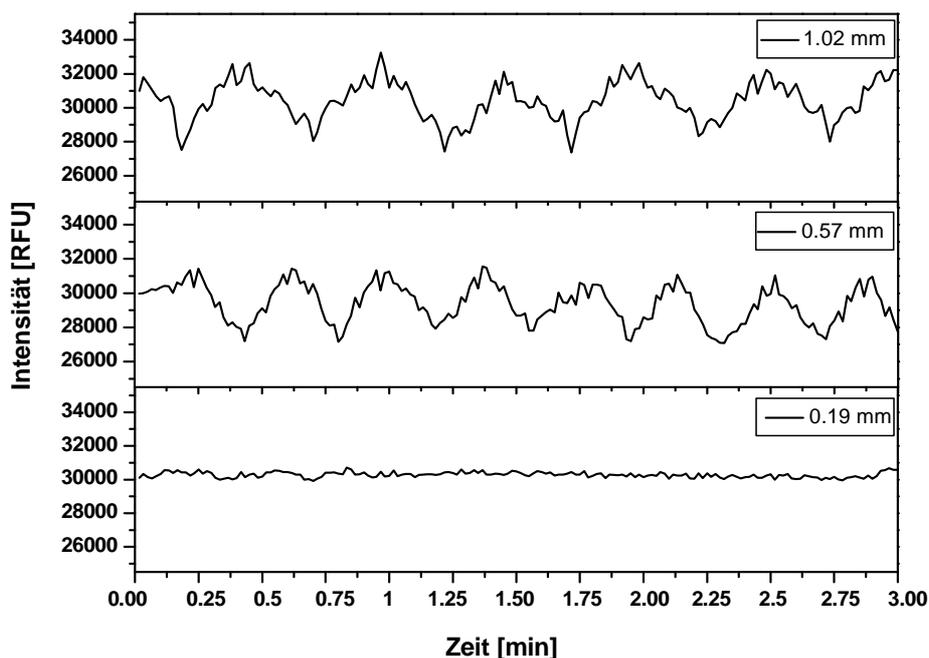


ABBILDUNG 6.2: Vergleich verschiedener Schlauchinnendurchmesser bei Verwendung einer Schlauchpumpe zum Einbringen von Luft ins fluidische System zur Erzeugung eines gasegmentierten Flusses.

Wie oben beschrieben, hing die Größe der Luftblasen, aber auch die Stärke der Pulsation vom Innendurchmesser und der Laufgeschwindigkeit der Rollen ab. Bei kleineren Durchmessern musste die Frequenz erhöht werden, um gleiche Luftvolumina einzubringen.

Wie in Abbildung 6.2 zu erkennen ist, eignen sich Schläuche mit kleinerem Durchmesser bei höherer Frequenz der Pumpe besser zum Einbringen der Luftsegmente als dickere Schläuche und niedere Frequenzen. So beträgt die mittlere Amplitude bei dem großvolumigen Schlauch $4705 \text{ RFU} \pm 2.1\%$, bei dem Schlauch mit I.D.=0.57 mm nur noch $3750 \text{ RFU} \pm 2.1\%$. Wird ein Schlauch mit zu geringem Innendurchmesser verwendet (z. B. 0.075 mm), so kann keine Luft mehr in das fluidische System eingebracht werden.

6.3 Blasenfilter

Wie in Abschnitt 7.1.2 erläutert, war die Zugabe von Additiven zum Enzympuffer zur Vermeidung der Adsorption der Enzyme an den Kapillarwänden der Reaktionsschleifen notwendig. Da sowohl Pluronic F68 [Mulligna, 2003] als auch BSA [German, 1985] schaumbildende Substanzen sind, musste der Blasenfilter zum Abtrennen der Luftblasen neu konstruiert werden.

Das Prinzip, nach dem der Filter arbeitet, ist das einer offenen Rinne. Der Blasenfilter wurde aus einem PEEK-Block gefertigt. An der Unterseite wurden die Anschlüsse für Zu- und Ablauf der gassegmentierten Lösung gesetzt. Die durch eine Bohrung an die Oberfläche kommende Lösung wurde von einer V-förmigen Rinne aufgenommen. Der Einbau des Blasenfilters in das fluidische System erfolgte unter ca. 30° . Durch die Neigung der Rinne wurde die Lösung, bedingt durch die Schwerkraft, zum Auslass geführt, wo sie durch eine Bohrung zum Detektor geleitet wurde. Am Ende der Rinne wurde eine sich zur Bohrung hin verjüngende Rinne vom Rand her eingefräst, um eventuell überstehende Flüssigkeiten abzutransportieren und so das Vermischen mit frischer Lösung zu vermeiden.

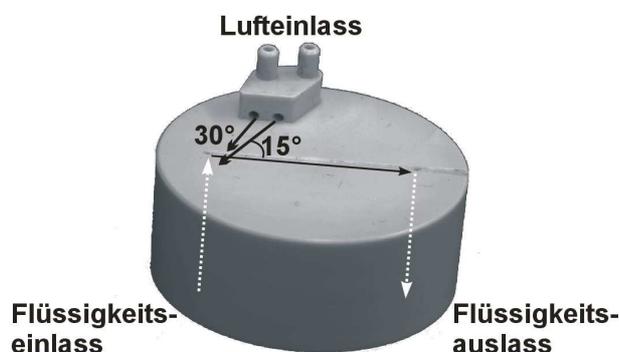


ABBILDUNG 6.3: Bild des konstruierten Blasenfilters. Durch den Luft-einlass konnte Druckluft angeschlossen werden, sodass ein Gasstrom über die Rinne resultiert. Dieser war hilfreich, um Luftblasen zerplatzen zu lassen. Der Filter wurde unter einem Winkel von ca. 30° eingebaut, so fließt die Flüssigkeit Richtung Auslass.

Ohne die Zugabe von tensidischen Additiven oder Proteinlösungen reichte diese Vorrichtung aus, die Luftblasen am Anfang der Rinne zum Platzen zu bringen. Da jedoch die Zugabe solcher schaumbildenden Additive nötig war, wurden die Luftblasen nicht oder nur unvollständig entfernt. Durch das Einbauen einer Einheit neben der Rinne, mit der ein Luftstrom über die Rinne geleitet werden konnte, wurden die Luftblasen auch unter Verwendung von Additiven effektiv entfernt. Der Luftstrom konnte unter zwei verschiedenen Winkeln, nämlich unter 30° und 15° gegen die Flussrichtung (siehe Abbildung 6.3) über den Filter geleitet werden. Der Bauplan befindet sich im Kapitel „Technische Zeichnungen“ auf Seite 151. Es zeigte sich, dass der spitzere Winkel (15°) besser zum Abtrennen geeignet war als der flachere, bei dem durch den Filter die Luftblasen häufig nicht abgetrennt wurden.

6.4 Umbau des Lumineszenzdetektors

Zur online-Detektion der toxischen Wirkung gegenüber den Leuchtbakterien wurde ein luminometrischer Detektor benötigt, der im Durchflussverfahren betrieben werden kann. Da ein Detektor mit den benötigten Spezifikationen nicht kommerziell erhältlich war, wurde ein handelsübliches Gerät in entsprechender Weise umgebaut.

Bei dem Gerät, das umgebaut werden sollte, handelte es sich um das Luminometer Glowmax 20/20n der Firma Turner Biosystems. Im Zuge des Umbaus musste ein neues Gehäuse gebaut werden, das absolut lichtdicht sein musste. Die technischen Zeichnungen zum Bau des Gehäuses befinden sich im Kapitel „Technische Zeichnungen“.

Da der Detektor im Durchfluss arbeiten sollte, musste eine Möglichkeit gefunden werden, Kapillaren in den Messraum hinein- und wieder herauszuführen. Dies wurde durch Kapillarverbinder, die in den Deckel eingearbeitet wurden, realisiert. Der Deckel (technische Zeichnung auf Seite 154) wurde aus einer Metallplatte gefertigt, die anschließend schwarz eloxiert wurde. Zusammen mit der Aussparung an der Oberseite des Detektors sollte durch passendes Arbeiten ein lichtdichter Abschluss gefertigt werden. Um eventuell noch durch die Spalten einfallendes Licht zu eliminieren, wurde der Deckel zusätzlich mit schwarzer Dichtmasse gegen das Gerät abgedichtet.

Überlegungen, einen Abfallbehälter in der Messkammer zu installieren, waren aufgrund von Platzmangel schlecht realisierbar. Außerdem müsste die Kammer zum Entleeren oft geöffnet und dadurch die Abdichtung stets erneuert werden.

Die neu gestaltete Messzelle bestand aus einer FEP-Kapillare (Perfluorethylenpropylen-Copolymer) mit einem Innendurchmesser von 0.51 mm und einer Wandstärke von 0.5 mm. Das Messprinzip beruhte hier auf dem Sammeln von selbständig emittierten Photonen. Daher konnte der gassegmentierte Fluss direkt ohne Verwendung eines Blasenfilters in den Detektor geleitet werden. Der kreisförmige Querschnitt der Messzelle unterstützte dies, da die Luftblasen hier nicht hängen bleiben konnten, wie es in Messzellen mit viereckigem Querschnitt beobachtet wurde. Da eine möglichst hohe Quantenausbeute resultieren sollte, musste die Messzelle so nah wie möglich an den Photomultiplier, den eigentlichen Detektor, herangebracht werden. Dazu wurden verschiedene Flusszellenhalter gebaut (Technische Zeichnungen auf Seite 155 f.), die sich im Volumen und damit in der Länge der zur Detektion verfügbaren Abschnitte unterschieden (Tabelle 6.1).

TABELLE 6.1: Parameter der verschiedenen getesteten Flusszellen. Mit dem Luminometer wurde standardmäßig 1 Messung/s durchgeführt.

Form	Länge [mm]	Volumen [μL]	Durchflussdauer bei 130 $\mu\text{L}/\text{min}$ [s]
Strich	23	4.5	2.0
Kreis	68	13.4	6.1

Es zeigte sich, dass mit aufsteigender Volumenzahl auch die Signalintensität zunahm. Durch längere Messstrecken blieben mit zunehmender Länge bei der Luftsegmentierung das Volumenverhältnis von Gasphase zu flüssiger Phase konstant, da mehrere Segmente gleichzeitig gemessen wurden. Dadurch wurde die Basislinie gleichmäßiger (Abbildung 6.4). Inhibitionstests mit 3,4-DCP zeigten gute Signale bei längerer Flusszelle, bei der kürzeren Zelle konnte kein signifikantes Signal aus dem Rauschen identifiziert werden. Durch die Länge der Flusszelle bestimmte sich auch die maximale Auflösung. Wird die Flusszelle zu lang, verringert sich also die Auflösung, da das Volumen der Flusszelle das minimale Volumen zwischen zwei Peaks festlegt.

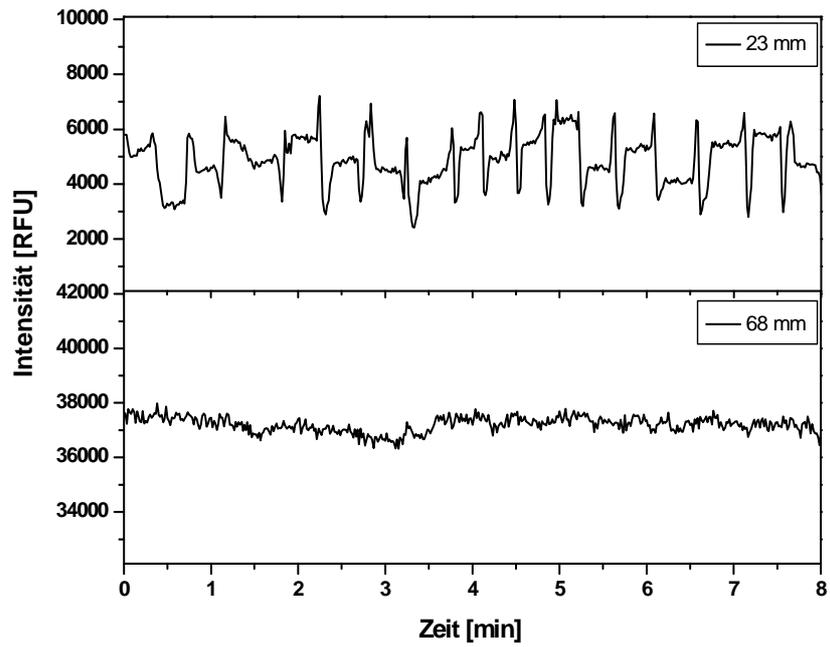


ABBILDUNG 6.4: Basislinienvergleich bei unterschiedlichen Längen der Flusszelle. Die Messzeit für einen Punkt betrug je 1 s.

7 Wirkungsbezogene Analyse mit gassegmentiertem Bioinhibitionsdetektor

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit stellte die Identifizierung toxischer Analyten unter Anwendung der Wirkungsbezogenen Analytik dar. Die Arbeit konzentrierte sich vor allem auf die Entwicklung von Nachsäulendetektorsystemen zum Nachweis von toxischen Effekten. Die dazu verwendeten Targetstrukturen waren zum einen in *Pichia pastoris* rekombinant hergestellte Fusionsproteine aus GFPuv und Proteinphosphatase 1 α , und zum anderen lyophilisierte Leuchtbakterien vom Stamm *Vibrio fischeri*, die von Hach-Lange in Form eines Test-Kits bezogen wurden.

Da zu einem späteren Zeitpunkt eine Parallelisierung der BID mit anderen Detektoren geplant war, sollte von Anfang an ein Aufbau mit geringem technischen Aufwand und zugleich niedrigem Chemikalienverbrauch realisiert werden.

Im folgenden Kapitel sollen beide Detektorsysteme vorgestellt werden, mit denen die jeweiligen Targets im Sinne der WBA online an vorangehende chromatographische Trennungen gekoppelt werden können. Die Aufbauten für beide Targets unterscheiden sich und werden jeweils getrennt vorgestellt. Die Optimierung erfolgte, wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, in Form eines gassegmentierten Nachsäulendetektors.

7.1 Proteinphosphatase

Der Aufbau des online-Detektorsystems zur Bestimmung der Toxizität gegenüber PP1 α sowie die damit erhaltenen Ergebnisse werden im folgenden Kapitel vorgestellt und diskutiert.

7.1.1 Aufbau

Das Flusschema der Messeinheit zur WBA mittels Inhibition der PP1 α ist in Abbildung 7.1 dargestellt. Mit einem Autosampler wurde die Probe in das chromatographische System injiziert. Auf einer C18-Säule erfolgte die Trennung mithilfe eines Lösungsmittelgradienten, der aus Methanol und Wasser bestand. Zur Anwendung kam Methanol als organische Phase, da dieses, wie bereits in Abschnitt 5.1.3 beschrieben

wurde, den geringsten toxischen Effekt auf das Enzym ausübt. Beide Lösungsmittel enthielten 0.01% Ameisensäure, um eine bessere Ionisierbarkeit im ESI-TOF-MS zu erreichen.

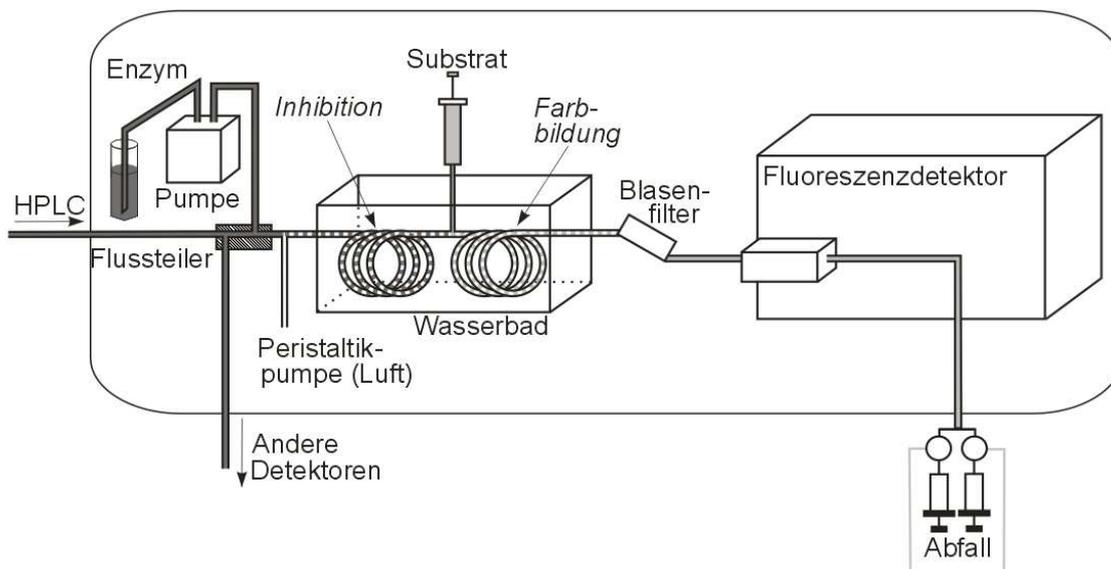


ABBILDUNG 7.1: Aufbau des Detektorsystems zur Wirkungsbezogenen Analyse mit PP1 α als Target. Der Aufbau der HPLC, die vorgeschaltet ist, wurde der Übersichtlichkeit halber nicht eingezeichnet. Der Kanal zu den anderen Detektoren wurde an den UV/Vis- und an den massenspektrometrischen Detektor gekoppelt. Kursiv geschrieben sind die beiden Effekte, die in den Inkubationsschleifen stattfinden.

Nach der HPLC-Trennung wurde der Eluatstrom aufgeteilt. Ein Teil des Flusses wurde in den gassegmentierten BID geleitet, der Rest stand für andere Detektionsarten zur Verfügung. Zum Einsatz kamen hier ein UV/Vis-Photodiodenarray (PDA) zur Absorptionsmessung und ein massenspektrometrischer Detektor zur Erfassung der Massen. Es zeigte sich, dass im Fall der Microcystine keine Signale im PDA erhalten wurden. Im Massenspektrometer hingegen konnten niedere Signale detektiert werden.

Der verwendete Flussteiler war maßgefertigt (siehe Abbildung 7.13 B), mit einem Eingangsfluss von 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ bei einer Teilungsrate von 1:20. Durch einen Rückdruck von ca. 40 bar bei einem Fluss von 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ konnte das Splitverhältnis unabhängig von den Schwankungen des Rückdrucks im BID konstant gehalten werden. Geringe Druckschwankungen, z. B. durch das Einbringen von Luftsegmenten, waren gegen den vom Splitter erzeugten Rückdruck unbedeutend. Durch den Flussteiler wurde auch der Anteil des Eluates festgelegt, der in den BID eingespeist wurde.

Als Substrat zur Visualisierung der Enzymaktivität der Proteinphosphatase wurde der Fluoreszenzfarbstoff DifMUP eingesetzt. Die Aufzeichnung des Signals erfolgte mit

einem Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 358 nm und einer Emissionswellenlänge von 455 nm mit einer Messfrequenz von 21 Hz.

Um die Enzymlösung in das System zu pumpen, wurde eine Kolbenpumpe der Firma VICI verwendet. Die Zugabe der Lösung erfolgte kontinuierlich über den Zeitraum der Messung mit einer Geschwindigkeit von 40 $\mu\text{L}/\text{min}$, was sich bei den Vorversuchen als die optimale Geschwindigkeit herausgestellt hatte. Da die gesamte Inkubationszeit 20 min betrug, wurde zum Ende der Messung, um Enzym zu sparen, die Enzymlösung getauscht und eine reine Pufferlösung durch das System gepumpt, um die restliche Reaktorfüllung zu eluieren und messen zu können. Dieser Austausch machte es nötig, eine Kolbenpumpe zu verwenden, da mit einer pulsationsärmeren Spritzenpumpe dieser Wechsel nicht möglich war. Die Zudosierung des Substrates erfolgte mit einer Spritzenpumpe der Firma Harvard Apparatus. Durch die Wahl einer kleinen Spritze (250 μL) konnte eine kontinuierliche Zugabe mit geringen Schwankungen gewährleistet werden. Die Fließgeschwindigkeit wurde nach der Durchführung von Optimierungsmessungen auf 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ festgesetzt.

Als Inkubationsreaktoren kamen zwei 5 m lange *fused-silica* Kapillaren zum Einsatz, die auf einen GC-Säulenkäfig aufgewickelt waren. Um die Aktivität der untersuchten Enzyme zu verbessern, erfolgten die Inkubationsschritte bei 30°C. Diese Temperatur wurde durch ein Wasserbad erzeugt. Bei höheren Temperaturen wurde die Autohydrolyse rate des Substrates zu hoch. So stieg der Wert von ca. 50 RFU bei 30°C auf 210 RFU bei 37°C an. Das maximale Messsignal lag, bedingt durch den Detektor, bei 1000 RFU.

7.1.2 Optimierung des Enzymflusses

Um Inhibitionsmessungen durchführen zu können, musste sichergestellt sein, dass zu jedem Zeitpunkt der Messung die gleiche Menge an Enzym durch das System den Detektor erreicht. Hierzu wurden, wie in Abschnitt 13.1 beschrieben ist, online-Messungen mit der Detektion des GFPuv-Labels durchgeführt. Da GFPuv im definierten Verhältnis von 1:1 kovalent mit der Proteinphosphatase gekoppelt vorlag, war das Signal des GFPuv ein Maß für die vorhandene Menge an PP1 α . Zum Vergleich wurden analoge Referenzmessungen mit dem Protein eGFP durchgeführt, welches frei und nicht an ein Enzym gebunden vorlag.

Erwartet wurde in beiden Fällen ein sprunghafter Signalanstieg auf ein erhöhtes Niveau mit dem Erreichen des Detektors der Proteinlösung, sowie ein rascher Abfall des

Signals auf das Ursprungsniveau, nachdem die Proteinlösung durch den Puffer ersetzt wurde. Abbildung 7.2 zeigt den tatsächlichen Verlauf beider Messreihen. Man erkennt, dass der Verlauf der Kurve von freiem Protein dem oben Beschriebenen sehr nahe kam. Betrachtet man jedoch die Kurve des Fusionsproteins, stellt man fest, dass der Anstieg sehr langsam, nämlich über einen Zeitraum von 50 min vonstatten ging. Dies weist darauf hin, dass das Fusionsprotein nicht ohne Wechselwirkungen durch die Inkubationsschleifen zum Detektor gelangte. Da es sich um unterschiedliche Proteine handelte, kann kein Vergleich der beiden Kurven über die absolute Intensität gezogen werden. Die Tatsache, dass sich die beiden GFP-Spezies nur in fünf Aminosäuren unterschieden, ließ den Schluss zu, dass das Enzym für die Retention verantwortlich war.

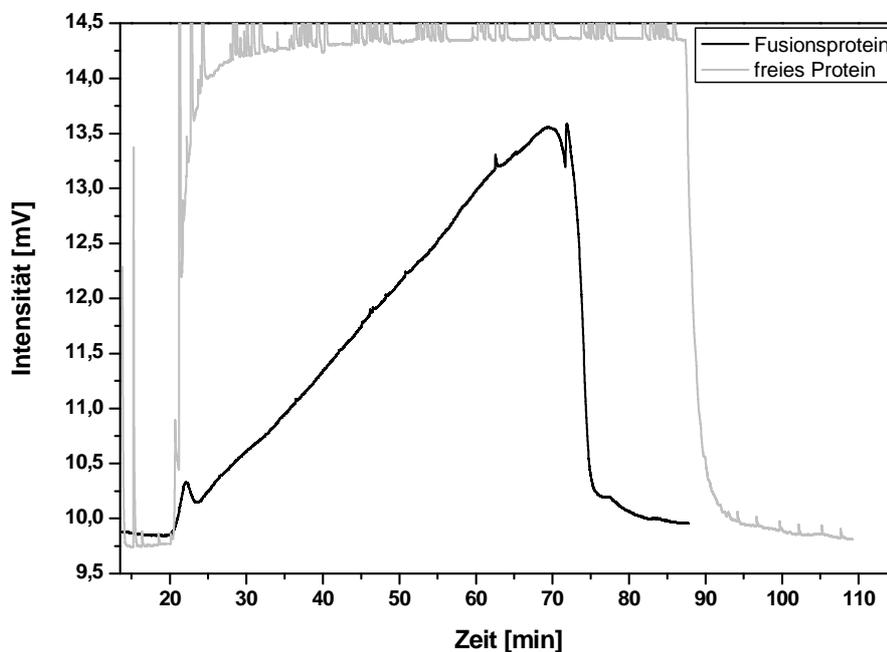


ABBILDUNG 7.2: Vergleich der Signalverläufe von freiem Protein (eGFP, $\lambda_{\text{ex}}=488$, $\lambda_{\text{em}}=509$) und dem Fusionsprotein (GFPuv, $\lambda_{\text{ex}}=395$, $\lambda_{\text{em}}=509$). Beide Lösungen wurden mit dem TRIS-Puffer PP1-1 hergestellt und im luftsegmentierten Modus mit *fused-silica* Kapillaren als Reaktoren gemessen. Die Peaks bei freiem Protein kommen von Luftblasen, die in den Detektor gezogen wurden.

Um den Einfluss des Kapillarmaterials auf die Retention der PP1 α zu untersuchen, wurden, wie in Abbildung 7.3 gezeigt, unterschiedliche Kapillarmaterialien getestet. Da bei allen Messungen die gleichen Bedingungen herrschten, konnte hier auch über die absolute Signalintensität eine Aussage gemacht werden. Es zeigte sich, dass bei der Verwendung der PEEK-Kapillaren das höchste absolute Signal entstand. Durch die nach Abschnitt 11.6 modifizierten *fused-silica* Kapillaren verbesserte sich die Signalf orm deutlich gegenüber

dem Signal mit unmodifizierten *fused-silica* Kapillaren: Sie zeigte einen steilen Anstieg und Abfall.

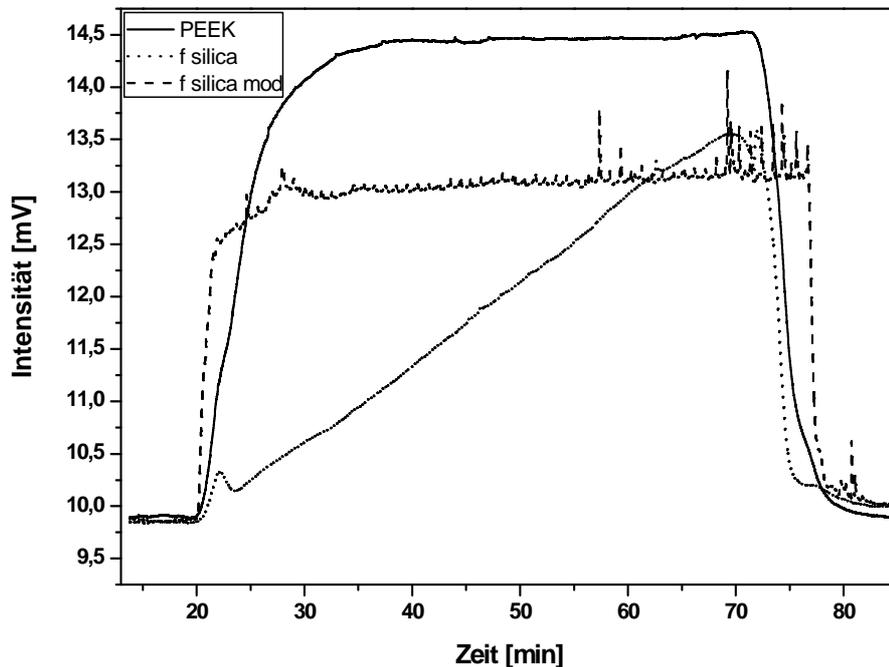


ABBILDUNG 7.3: Unterschiedliche Kapillaren wurden unter gleichen Versuchsbedingungen auf die Adsorption von PP1 α getestet. PEEK: PEEK-Kapillaren, f silica: *fused silica* Kapillaren, f silica mod: modifizierte *fused silica* Kapillaren.

Bei PEEK zeigte sich jedoch, dass die Luftblasen nicht gleichmäßig verteilt waren, sondern während des Durchlaufens der Inkubationsstecke wanderten und miteinander verschmolzen. Damit würde für eine WBA die Segmentierung deutlich schlechter. Außerdem zeigte sich, dass die Microcystine an der Oberfläche starken Adsorptionseffekten unterworfen waren. Somit konnte PEEK nicht als Reaktormaterial zur Verfügung stehen. Bei den modifizierten *fused-silica* Kapillaren trat nach je ca. 10 Messungen eine deutliche Erhöhung des Rückdrucks im BID auf, sodass die Gassegmentierung nicht mehr aufrechterhalten werden konnte. Damit zeigte sich auch diese Kapillarart als nicht tauglich für die Verwendung im BID.

Aus der ELISA-Messtechnik ist schon lange bekannt, dass unerwünschte Adsorptionseffekte durch die Zugabe von Proteinen oder anderen Additiven verringert oder unterdrückt werden können [Vogt, 1987]. Daher wurden unterschiedliche Additive getestet, indem sie zuvor durch die als Reaktoren verwendeten Kapillaren geleitet wurden und sich auch im Puffer der Enzyme wiederfanden. Dies machte es erforderlich, einen neuen Blasenfilter zu konzipieren, wie er bereits in Abschnitt 6.3 vorgestellt wurde.

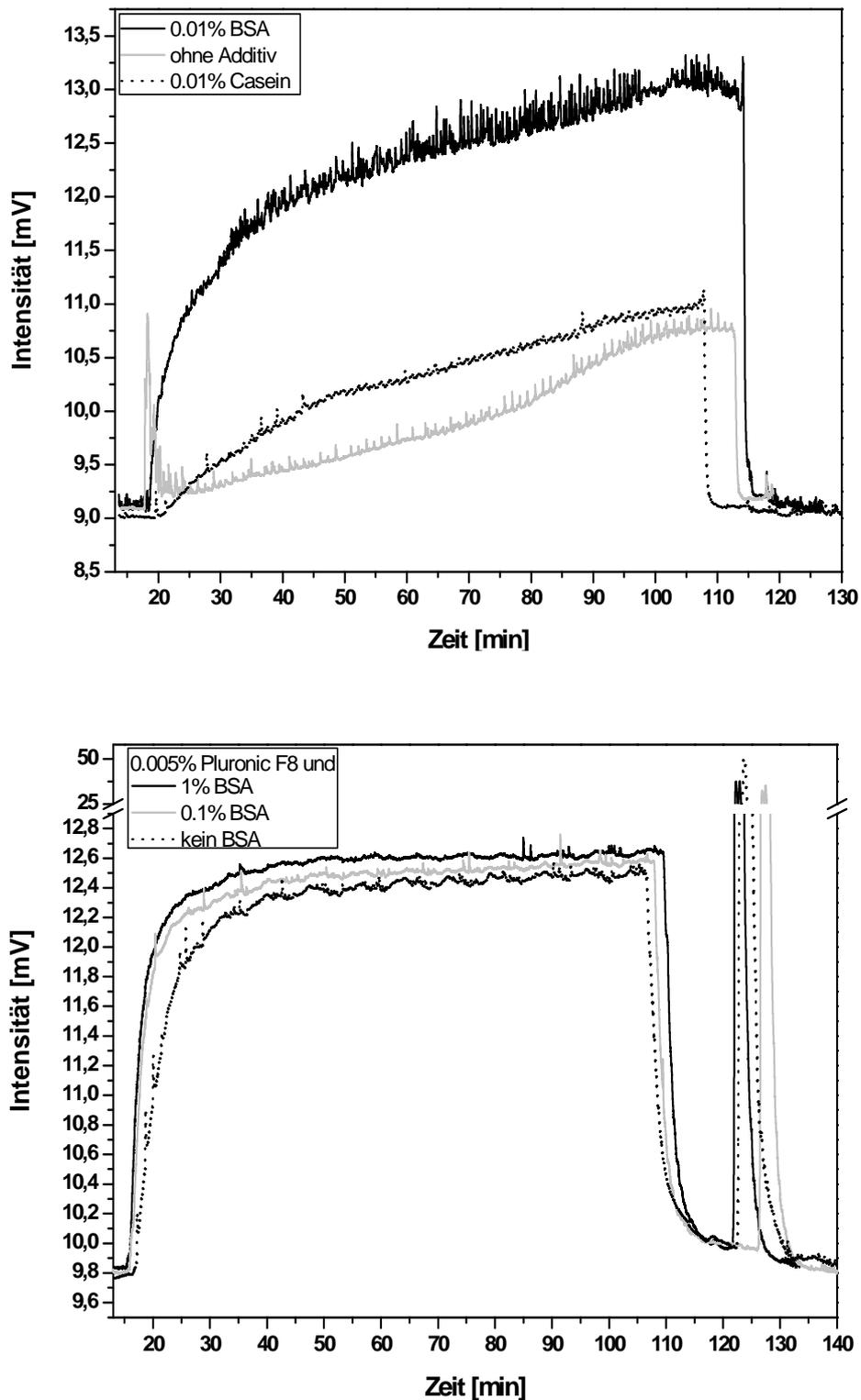


ABBILDUNG 7.4: Zugabe von Additiven zu den Enzymlösungen. *Oben*: Vergleich von Casein und BSA (je 0.001%) mit Messungen ohne Additive; die Luftblasen wurden mit dem alten Blasenfilter entfernt. *Unten*: Zugabe von 0.005% Pluronic F68 und zusätzlich BSA in verschiedenen Konzentrationen. Die Blasenabtrennung erfolgte mit dem neuen Blasenfilter. Gezeigt ist weiterhin die Elutionsfraktion mit Hellmanex II Lösung (2%), mit der die adsorbierten Enzyme aus der Kapillare gewaschen wurden (Peaks bei ca. 125 min).

Ohne den Luftstrom konnten die Luftblasen mit den Additiven nur unzureichend entfernt werden. Der Effekt ist in Abbildung 7.4 zu erkennen, wenn man die Kurve mit 0.01% BSA als Additiv in der oberen Abbildung betrachtet und mit den Kurven der unteren Abbildung vergleicht. Die Aufzeichnung der Daten für die obere Abbildung erfolgte unter Anwendung des Blasenfilters ohne Hilfsgas. Bei den in der unteren Abbildung gezeigten Messungen kam der neu konstruierte Blasenfilter mit Gasstrom zum Einsatz. Die in der Kapillarelektrophorese als Additiv eingesetzte (Hydroxypropyl)-methyl-cellulose zur Vermeidung von Proteinadsorption [Schulze, 2007] zeigte bei dem in dieser Arbeit aufgebauten System keinerlei Effekte im Bereich von 0.05% (w/w) [Schulze, 2007] bis 0.5% [Bean, 1998].

Am günstigsten erwies sich die Kombination aus BSA und Pluronic F68. Hier zeigte der Signalverlauf die steilsten Anstiege und Abfälle bei der Änderung der Enzymkonzentration. In Abbildung 7.4 unten ist zusätzlich das Spülen der Kapillare mit Hellmanex II Lösung nach ca. 105 min gezeigt. Die Spüllösung weist bei den verwendeten Detektionswellenlängen ähnliche Signalintensitäten wie der verwendete Puffer auf, sodass die Peaks bei ca. 125 min auf eine enzymatische Herkunft schließen lassen, die durch den Spülvorgang wieder von der Kapillarwand abgelöst wurden.

Zur Verifikation der adsorptiven Effekte wurde das System weitestgehend vereinfacht, um Störungen auszuschließen. In offline-Versuchen, die wie in Abschnitt 13.1 beschrieben durchgeführt wurden, konnten diese Effekte reproduziert werden. Dies ist in Abbildung 7.5 und Abbildung 7.6 gezeigt.

Messungen, mit denen das Adsorptionsverhalten der Analyten auf verschiedenen Oberflächen ermitteln werden sollte, wurden durchgeführt. Getestet wurden, wie in Abbildung 7.5 gezeigt, PEEK-Kapillaren und *fused-silica* Kapillaren. Es zeigten sich auf den PEEK-Kapillaren deutliche Adsorptionseffekte. Die RI-Werte sanken auch nach fünf-fachem Spülen mit Lösungsmittel nicht wieder auf den Blindwert. Die Standardabweichung ist groß und kann durch unreproduzierbare und ungerichtete Adsorptionseffekte erklärt werden. Ähnliche Beobachtungen bezüglich der Adsorptionseffekte wurden von Hyenstrand *et al.* gemacht [Hyenstrand, 2001a], die die Adsorption von Microcystinen auf Polystyrol in Form von Pipettenspitzen untersucht hatten. Die Adsorption hing maßgeblich vom Methanolanteil in der flüssigen Phase ab. Erst ab einem Methanolanteil von 40% kam es zu einer deutlich Abnahme der Adsorption. Im online-System konnte kein so hoher Anteil an Methanol verwendet werden, da die Proteinphosphatase dabei denaturierte.

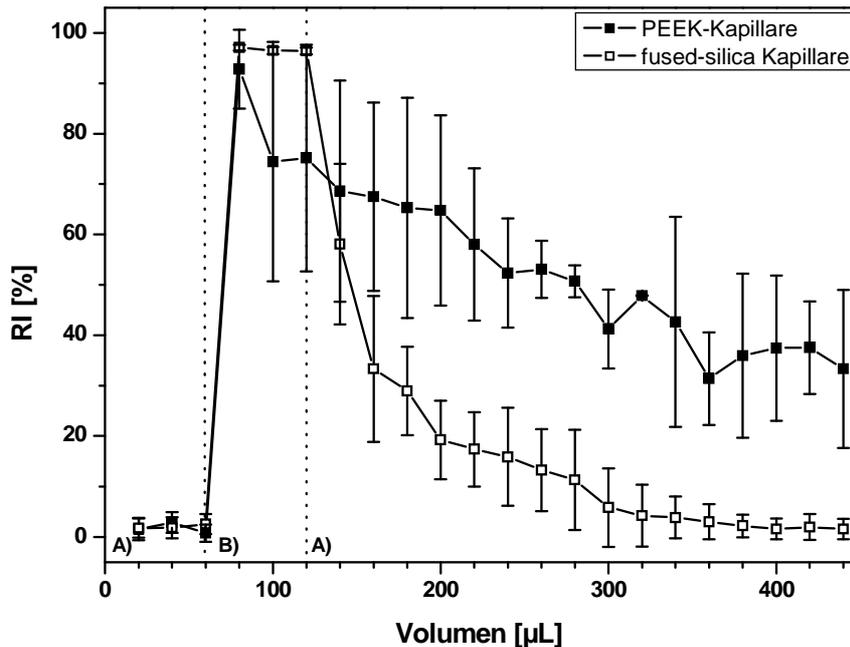


ABBILDUNG 7.5: Adsorptionsverhalten von Microcystinen an PEEK-Kapillaren und *fused-silica* Kapillaren. Die Buchstaben zeigen die Volumina, die an (A) Wasser/MeOH in Verhältnis 90/10 und (B) Toxinlösung zugegeben wurden. (Fehler: Standardabweichung, n=5)

Bei Messungen mit *fused-silica* Kapillaren wurde ebenfalls eine langsamere Abnahme der RI-Werte beobachtet. Jedoch konnte hier das Signal nach ca. dreifacher Volumengabe an Lösungsmittel wieder nahezu auf den Blindwert abgesenkt werden. Auch diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen von Hyenstrand *et al.* [Hyenstrand, 2001b], die Adsorptionseffekte von Microcystinen auf Glas untersuchten. Dass Antibiotika auf PEEK-Kapillaren adsorptiv gebunden wurden, zeigten schon Hambleton *et al.* [Hambleton, 1995], was zeigt, dass Adsorptionseffekte auf PEEK messbar vorkommen können.

Das Adsorptionsverhalten von PP1 α wurde in *fused-silica* und PEEK-Kapillaren getestet. Bei der Messung mit *fused-silica* Kapillaren ohne Pufferadditive zeigte sich, dass nach Elution des Enzyms die Werte nicht mehr auf die Werte vor der Zugabe abfielen. Der Waschpeak, der durch die Hellmanex II-Lösung verursacht wurde, lieferte deutlich höhere Signale als der eigentliche Enzympeak. Da die Intensität ein Maß für die Enzymmenge war, konnte daraus gefolgert werden, dass ein großer Teil der Enzyme auf der Oberfläche adsorbiert wurden. Da BSA eine leichte Fluoreszenz bei den verwendeten Wellenlängen zeigte, lagen die Intensitäten bei Messungen mit Additiven generell höher. Die Basislinie blieb bei diesen Versuchen nach einer Enzymgabe nur leicht erhöht. Durch das Eluieren mit Hellmanex II-Lösung wurde ein viel geringerer Waschpeak gefunden. Es blieb bei der Zugabe von Additiven ein Adsorptionseffekt vorhanden, wenn auch in deutlich abgeschwächerter Form. Die Kurven glichen sich in den Hellmanex II-Fractionen sehr gut an.

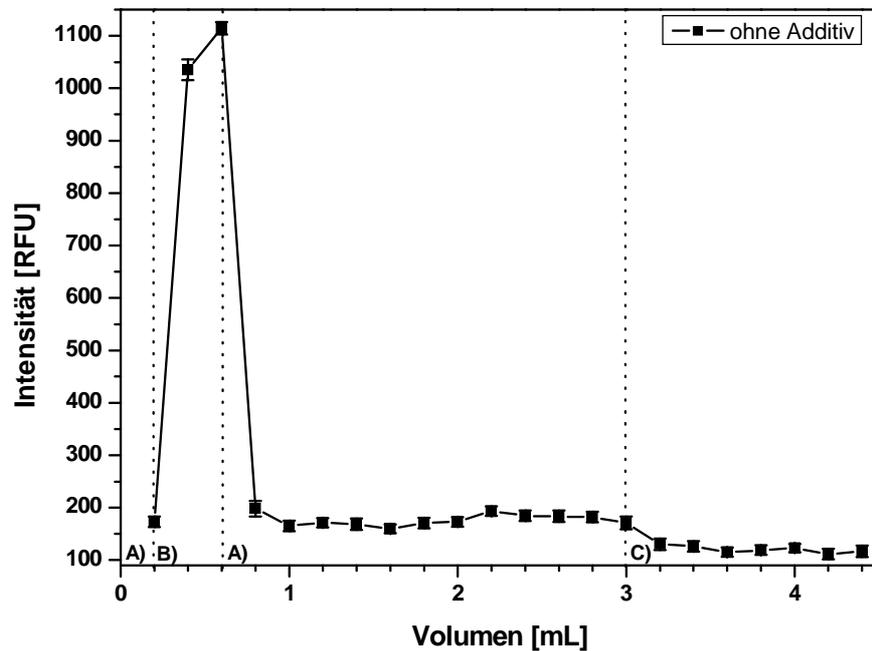
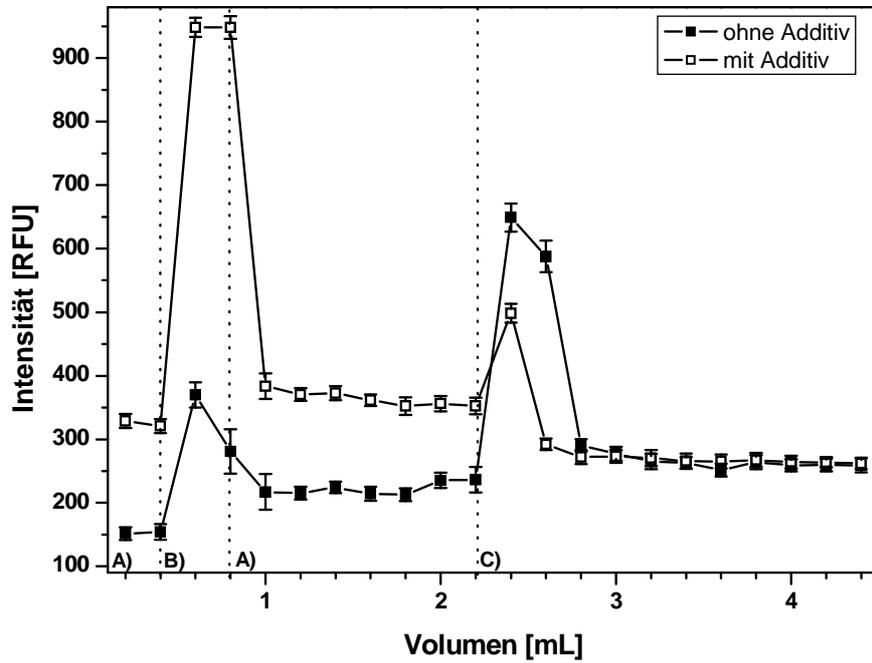


ABBILDUNG 7.6: Adsorption der PP1 α unter Verwendung verschiedenen Kapillarmaterialien in offline-Messungen. Die Fraktionen wurden in Kavitäten von MTP gesammelt. Die Buchstaben zeigen die zugepumpten Volumina von (A) Puffer, (B) Enzymlösung und (C) Hellmanex II Lösung. Oben: fused silica Kapillaren, bei der zum einen Enzymlösung ohne Additive und zum anderen Enzymlösung mit 0.005% Pluronic F68 und 0.1% BSA getestet wurden. Unten: PEEK-Kapillaren, in denen Enzymlösung ohne Additive gemessen wurden. (Fehler: Standardabweichung, n=3)

Die Messungen mit PEEK-Kapillaren wurden ohne die Zugabe von Additiven durchgeführt; die Enzyme lagen in reinem Puffer vor. Es zeigten sich keine sichtbaren Adsorptionseffekte: Der Elutionspeak der Enzymlösung war scharf auf die zwei vorhergesagten Fraktionen begrenzt, und die Intensitäten bei den Pufferlösungen waren vor und nach der Enzymlösung im Rahmen der Fehlerbalken auf gleichem Niveau.

Jenkins *et al.* [Jenkins, 2004] zeigten, dass eine alkalische Phosphatase mit einer Bindungskonstante von $5.9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ an PEEK bindet. Die Effekte sind jedoch klein und nach 15 min in der Größenordnung von ca. 0.5 nmol/m^2 . Die Desorptionsrate war für dieses Enzym mit $5.4 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ so gering, dass bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen kein Tailing beobachtet werden konnte.

7.1.3 Fließinjektionsexperimente

Es wurden Versuche durchgeführt, bei denen der enzymatische Detektor nicht an eine HPLC-Trennung gekoppelt wurde, sondern die Injektion der Analyten im Sinne einer Fließinjektionsanalyse mithilfe eines manuellen Injektionsventils erfolgte. Dadurch sollten eventuell störende Einflüsse minimiert werden. Das Volumen der Probenschleife betrug hierbei $5 \mu\text{L}$.

Der für den Transfer in den BID erforderliche Fluss entsprach der Größenordnung des Eluatstroms bei der Kopplung an die HPLC. Die Peakbreite wurde maßgeblich von zwei Faktoren beeinflusst: Zum einen hing sie von der Fließgeschwindigkeit durch die Probenschleife ab, zum anderen von der Dauer der Durchströmung der Schleife.

Die Fließgeschwindigkeit, mit der der Austrag aus der Probenschleife erfolgte, war indirekt proportional zur Peakbreite, wie dies in Abbildung 7.7 zu sehen ist. In allen drei gezeigten Fällen konnten die aus Fluss und Probenvolumen errechneten Zeiten nicht erreicht werden, jedoch wurde die Abweichung mit zunehmender Fließgeschwindigkeit geringer. Bei der Injektion sollte ein möglichst hoher und schmaler Peak generiert werden. Dies wurde mit höheren Flussraten erreicht, allerdings würden hohe Flüsse durch den Injektor höhere Flüsse der auf den restlichen Kanälen mit sich bringen, was nicht ökonomisch gewesen wäre.

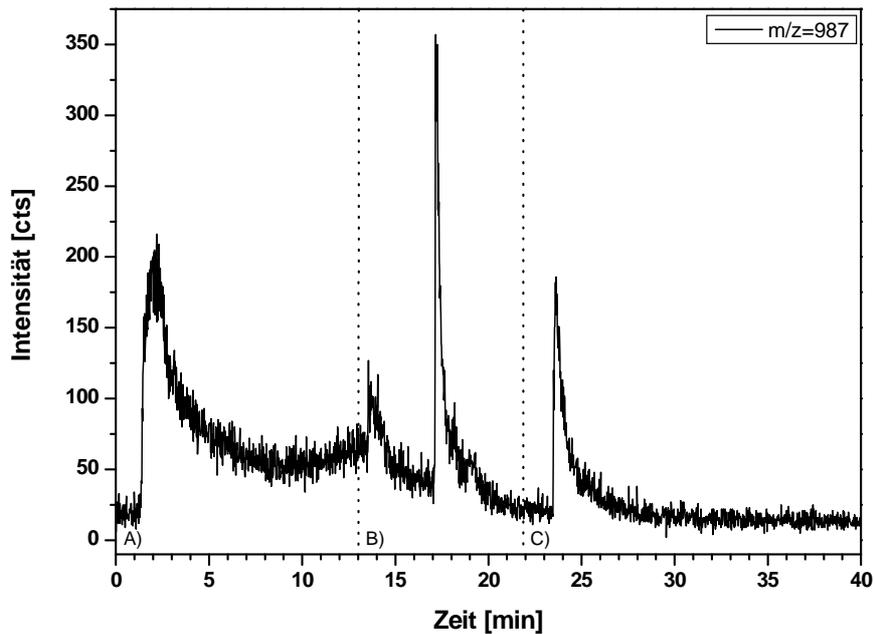


ABBILDUNG 7.7: Massenspur $m/z=987$, die $[M+H]^+$ -Spur für das MC-LF. Manuelle Injektionen von 5 μL erfolgten bei folgenden Flüssen: (A) 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, (B) 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ (C) 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. Der Fluss durch die Probenschleife wurde nur zum Beladen derselbigen unterbrochen.

Ein weiterer Faktor war die Dauer des Flusses durch die Probenschleife. Es wurde festgestellt, dass bei einer längeren Durchströmungszeit die Peaks einer deutlichen Verbreiterung unterlagen (Tabelle 7.1). Demgegenüber wurde bei kürzeren Durchflusszeiten ein geringerer Integralwert erhalten. Dies bedeutete, dass weniger Analyt in das System gelangte. Die Peaks zeigten mit höheren Flusszeiten eine steigende Tendenz zu Tailingeffekten. Durch eine Verkürzung der Durchflusszeit konnte die Peakbreite daher optimiert werden, jedoch wurde nicht mehr die gesamte Analytmenge in den BID eingebracht.

TABELLE 7.1: Zusammenhang zwischen Durchflusszeit und Basispeakbreite sowie Integral. 5 μL einer MC-LR-Lösung (5 mg/L) wurden mit 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ direkt in das MS eingespritzt, wobei die Zeit, in der sich die Probenschleife im Fluss befand, variierte. (Fehler: Standardabweichung, $n=3$)

Durchflusszeit	Basispeakbreite	Integral
4.5 min	4.5 min	200 \pm 11
1 min	2.4 min	150 \pm 9
0.5 min	2.0 min	140 \pm 10

Messungen zur Reproduzierbarkeit im Fließinjektionsverfahren zeigten schlechte Reproduzierbarkeit und breite Peaks mit starken Tailingeffekten (Abbildung 7.8). So wurde für die Inhibitionsrate von MC-LF (5 mg/L) ein Wert von 77% \pm 13% ermittelt (Fehler: Standardabweichung, $n=4$). Durch die Tatsache, dass die Probenschleife nur für die Dauer von

1 min gespült wurde, fand keine vollständige Elution der Analyten statt. Somit konnte die Menge an Analyt, die in den Biodetektor gelangte, nicht bestimmt werden und daher stark schwanken.

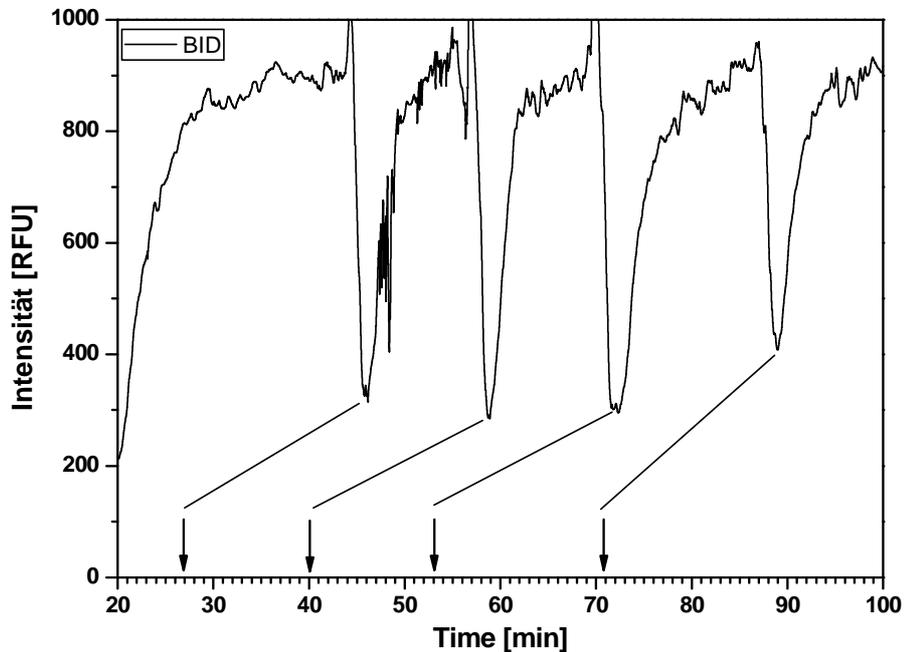


ABBILDUNG 7.8: Injektion von MC-LF (5 mg/L) in den BID. Die Pfeile markieren den Injektionszeitpunkt der Probe. Bei der dritten Injektion wurde die Probenschleife für 1.6 min im Fluss belassen, was sich in einem stärkerem Tailing zeigt.

7.1.4 Kopplung mit anderen Detektoren

Um Messungen im Sinne der WBA durchzuführen, sollte der BID parallel zu anderen Detektoren nach einer HPLC-Trennung der Analyten Anwendung finden. Als weitere Detektoren wurden zum einen ein Photodiodenarray-Detektor (PDA) der Firma Waters und zum anderen ein Elektrospray-Flugzeit-Massenspektrometer (ESI-TOF-MS) der Firma Micromass ausgewählt.

Mit dem PDA konnten von den Microcystinen keine UV/Vis-Absorptionssignale generiert werden. Daher war eine parallele Detektion zusammen mit dem BID in Anschluss an die HPLC-Trennung nicht praktikabel.

Mit dem Massenspektrometer konnten bei höheren Konzentrationen Signale generiert werden. Allerdings waren die Konzentrationen zu hoch, um für eine analytische Anwendung infrage zu kommen. In Abbildung 7.9 ist ein Chromatogramm gezeigt, bei dem der BID und das MS parallel nach der HPLC geschaltet waren. In weiteren Messungen fanden die Messungen mit dem BID ohne parallele Detektionssysteme statt. Der Rest des Eluats

aus der HPLC wurde in einen Abfallbehälter geleitet, da die Detektionsgrenzen der anderen zur Verfügung stehenden Detektoren deutlich über denen des BID lagen.

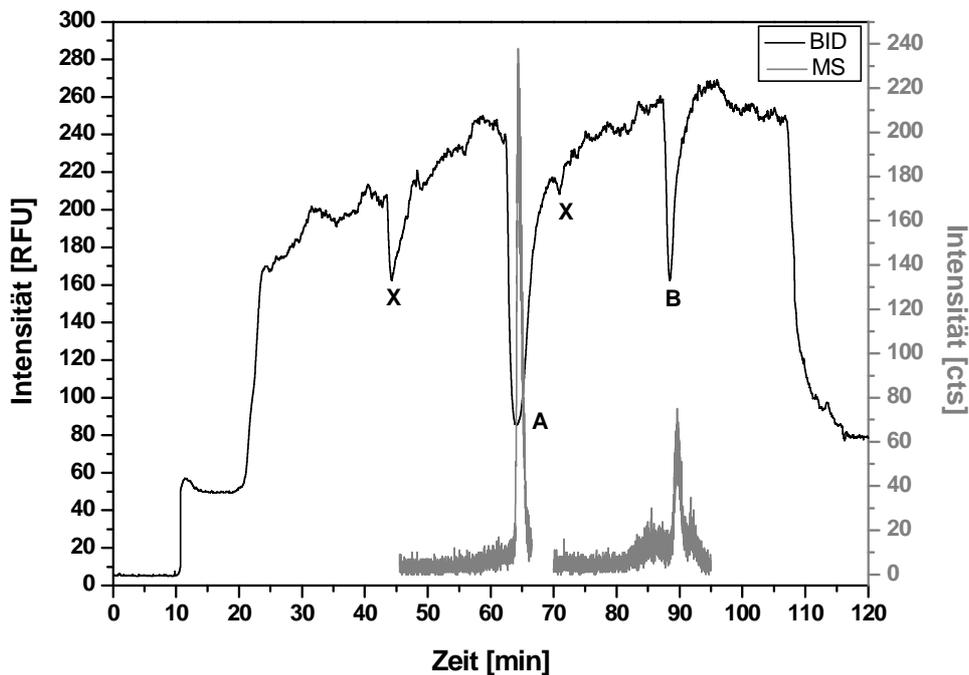


ABBILDUNG 7.9: Parallele Detektion mit BID und MS. Die Messung am MS erfolgte im TIC-Modus, abgebildet ist die $[M+H]^+$ -Spur ($m/z=987$). Es wurden zwei Injektionen durchgeführt: die Messung am BID wurde nicht unterbrochen. Die Injektionen erfolgten nach 45 min und nach 70 min. Bis 10 min wird Pufferlösung detektiert, bis 20 min die DifMUP-Zugabe ohne Enzym. Ab 20 min kommen Enzym und Substrat zum Detektor. Es wurden $18 \mu\text{L}/\text{min}$ aus der HPLC in den BID eingespeist. X: Injektionspeaks, A: MC-LF (5 mg/L), B: MC-LF (0.5 mg/L).

Weiterhin konnte beim Vergleich der Peakbreiten der Analyten, die von beiden Detektoren aufgenommen wurden, beim BID eine deutliche Bandenverbreiterung zusammen mit Tailingeffekten beobachtet werden. Da die Messungen mit Luftsegmentierung durchgeführt wurden, waren bandenverbreiternde Prozesse aufgrund von Longitudinaldiffusionen auszuschließen. Dieser Effekt zusammen mit der Tatsache, dass die Basislinie nach Ende der Enzymgabe nach ca. 108 min nicht auf den Ausgangswert absank, wiesen auf adsorptive Effekte in den Reaktionsschleifen hin.

7.1.5 Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit der Messungen zu testen, wurden mehrere Versuchsreihen mit Microcystin LR durchgeführt und die Signale nach Durchlaufen von HPLC und BID aufgenommen. Die Inhibitionsraten wurden nach Gleichung (11.8) ermittelt und sind in Tabelle 7.2 dargestellt. Es zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit der einzelnen erfassten Parameter. Damit verbunden war auch eine hohe Genauigkeit der Inhibitionsrate mit einer

geringen Standardabweichung von 0.57%. Das Rauschen der Basislinie war auf die gegenläufig pumpenden Kolbenpumpen zurückzuführen, da beim Phasenwechsel leichte Flussspitzen auftraten. Dieser Effekt konnte nicht eliminiert werden.

TABELLE 7.2: Inhibitionsraten (RI) für MC-LR (0.7 ng Absolutmenge) und die Parameter, aus denen sie berechnet wurden. Mittelwert (MW) und Standardabweichung (S) wurden für n= 5 berechnet.

HG [RFU] ^a	BI [RFU] ^b	PI [RFU] ^c	RI [RFU] ^d	MW [%]	S [%]
25	340	137	64.44		
25	370	143	65.80		
25	325	129	65.33		
30	300	125	64.81		
30	340	140	64.52	64.98	0.57

^a Wert des Hintergrunds, verursacht durch Autoprotolyse des Substrats

^b Theoretischer Wert der Basislinie zum Zeitpunkt des Peakmaximums

^c Wert des Signals am Peakmaximum

^d Berechnet nach Gleichung (11.8)

Bei der chromatographischen Trennung von zwei Microcystinen konnte ebenfalls eine hohe Reproduzierbarkeit erzielt werden, wie in Abbildung 7.10 zu sehen ist. Unter den angewandten Trennbedingungen hatte das MC-LR eine Retentionszeit von 8.8 min, das MC-LF von 15.2 min.

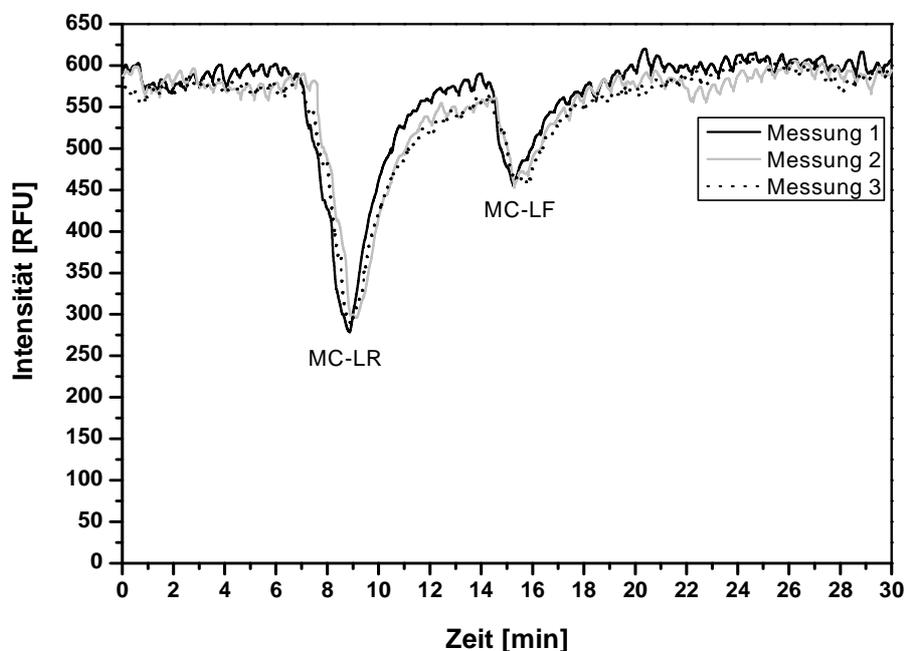


ABBILDUNG 7.10: Messungen der Trennungen von MC-LR (1mg/L) und MC-LF (0.05 mg/L) mit BID im online-Verfahren. Gezeigt ist nur jeweils derjenige Ausschnitt der Signalaufzeichnung, der einer Messung entspricht. Die Zeitskalen wurde so gesetzt, dass die Injektion zum Zeitpunkt t=0 min erfolgte.

Bei der Betrachtung der Chromatogramme zeigte sich, dass die Basispeakbreiten mit ca. 7 min für MC-LR bzw. 6.5 min für MC-LF sehr groß waren. Des Weiteren konnte starkes Tailing beobachtet werden, so dass die Peaks keine erwartete Gaussform mehr aufwiesen. Trotz der Zugabe von Additiven zur Deaktivierung der Oberflächen gegenüber Adsorption erfuhr ein Teil der Komponenten im BID eine Retention. Dies hatte einen direkten Einfluss auf die Peakkapazität, die durch die breiten Peaks sehr gering wurde.

7.1.6 Kalibrierkurven

Mit der Gewährleistung der Reproduzierbarkeit wurden Kalibrierkurven für die beiden Microcystine MC-LF und MC-LR, nach vorangegangener Trennung via HPLC (Abbildung 7.11), aufgenommen. Beim Vergleich der Werte für IC₅₀ und der Nachweisgrenze (LOD) von online-Detektion und offline-Messungen in der MTP konnte festgestellt werden, dass im MTP-Verfahren deutlich niedrigere Werte erzielt wurden, wie aus Tabelle 7.3 zu entnehmen ist.

TABELLE 7.3: Vergleich der Parameter aus online- und offline-Kalibrierungen von MC-LR und MC-LF. Die Konzentrationsangaben beziehen sich jeweils auf die eingesetzte Analytmenge. Für das offline-Verfahren wurden die gleichen Inkubationszeiten wie online verwendet. (Fehler: Standardabweichung, n=4)

Verfahren	Microcystin LR		Microcystin LF	
	IC ₅₀	LOD	IC ₅₀	LOD
Online	78.79 µg/L ± 8.5 µg/L	8.30 µg/L	596.34 µg/L ± 61.59 µg/L	32.92 µg/L
Offline	6.16 ng/L ± 0.34 ng/L	1.16 ng/L	0.88 µg/L ± 0.13 µg/L	0.02 µg/L

Da die Inhibitionsraten aus den Signalunterschieden zwischen Basislinie und Peakmaximum und nicht über die Peakflächen errechnet wurden, zeigte sich durch die starke Bandenverbreiterung eine Abschwächung der Inhibitionssignale. Des Weiteren wurde im online-Verfahren – im Gegensatz zu den Messungen in der MTP – nur ein Teil der injizierten Analyten gemessen, da es zu einer Abtrennung des Analyten von 90% nach der Trennung und somit zur Reduktion der Analytmenge kam. Zum anderen führten Verdünnungseffekte während der Trennung und beim Einbringen in den BID sowie leichte Adsorptionseffekte der Analyten an den Reaktorwänden zu einer weiteren Konzentrationsabnahme bei der anschließenden Detektion.

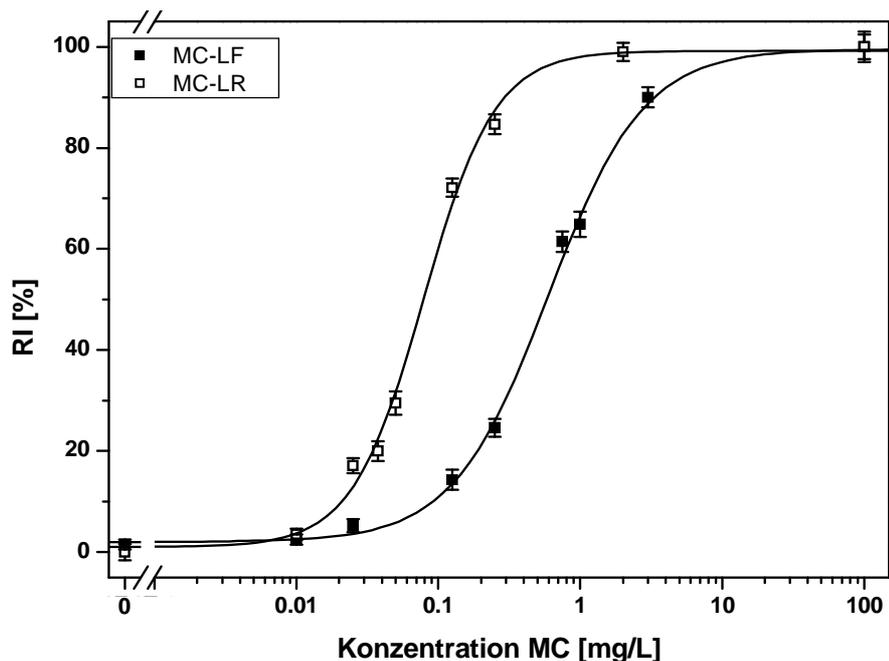


ABBILDUNG 7.11: Kalibrierkurven von Microcystin LF (MC-LF) und LR (MC-LR). Messungen erfolgten online mit dem BID nach vorangegangener HPLC-Trennung. (Fehler: Standardabweichung, n=4)

7.1.7 Zusammenfassung

Die Schwierigkeit bei der Entwicklung einer Wirkungsbezogenen Analyse mit PP1 α als Targetstruktur lag vor allem an den adsorptiven Eigenschaften des Enzyms auf den Kapillaroberflächen. Dies und die adsorptiven Eigenschaften der Analytgruppe der Microcystine verhinderten, dass die Auflösung, die durch die chromatographische Trennung erzielt wurde, trotz der Anwendung eines gassegmentierten Flusses aufrechterhalten werden konnte. Die Peakkapazität sank dadurch drastisch ab; eine chromatographische Trennung von Vielkomponentensystemen würde keinen großen Gewinn in Bezug auf eine Wirkungsbezogene Analytik bringen, da die Korrelation der Peaks in den verschiedenen Detektionssystemen nicht eindeutig vorgenommen werden kann.

Es konnte trotzdem gezeigt werden, dass eine Kopplung an chromatographische Verfahren möglich war und die Reproduzierbarkeit ausreichte, um das System kalibrieren zu können. Im Vergleich mit durchgeführten offline-Messungen lagen die Nachweisgrenzen jedoch um einige Zehnerpotenzen höher.

7.2 Leuchtbakterien

Zur Ermittlung der allgemeinen Toxizität von Analysenlösungen wurde ein Bioinhibitionsdetektor mit Leuchtbakterien etabliert. Der Aufbau sowie Ergebnisse aus Fließinjektionsexperimenten und Messungen im Sinne der WBA werden im folgenden Abschnitt dargestellt und diskutiert.

7.2.1 Aufbau

Der Aufbau des Bioinhibitionsdetektors mit den Leuchtbakterien vom Stamm *Vibrio fischeri* als Targetstruktur gleicht dem in Abschnitt 7.1.1 beschriebenen System. Da die Aktivität der Bakterien direkt über die intrazellulär hervorgerufene Lumineszenzintensität bestimmt werden konnte, war eine Substratzugabe nicht erforderlich. Dadurch verringerte sich der Aufbau des BID um eine Reaktionsschleife und bestand somit aus einem Inkubationsreaktor in Form einer 4 m langen *fused silica* Kapillare sowie der Detektionseinheit. Dazu diente das in Abschnitt 6.4 beschriebene umgebaute Lumineszenzmessgerät. Um den Einfluss von Streulicht zu minimieren, wurden die Inkubationsschleifen in einer lichtdichten Kammer installiert. Der Transferteil der Kapillare in den Lumineszenzdetektor sowie die Kapillare, die aus dem Detektor in den Abfall geführt wurde, wurden mit Schrumpfschläuchen ummantelt. Dadurch konnte kein Fremdlicht in das System eingebracht werden. Ein Flussschema des gesamten Aufbaus ist in Abbildung 7.12 gezeigt.

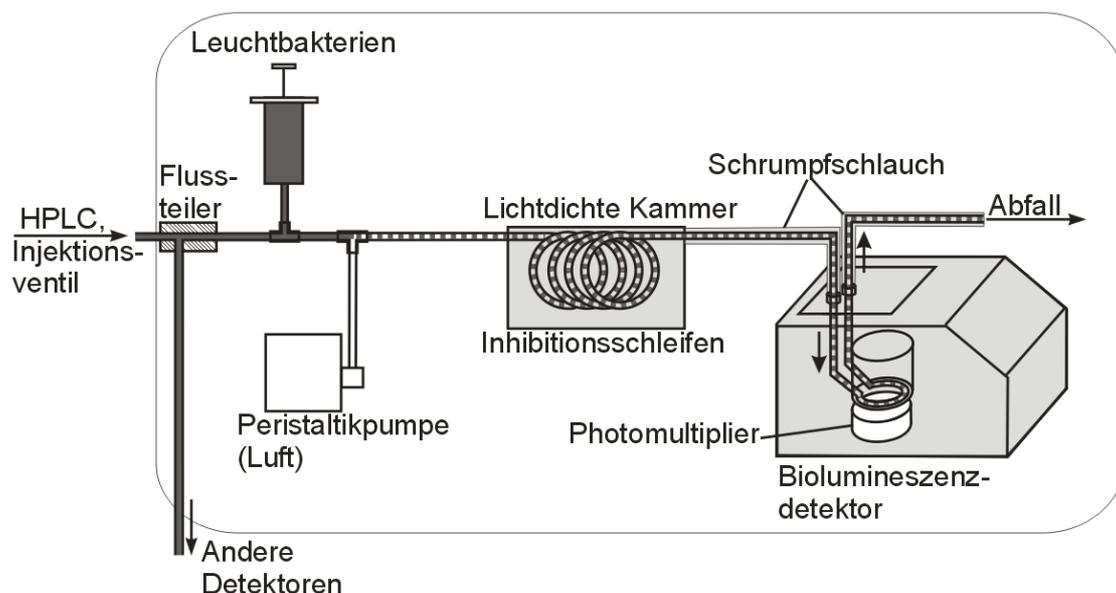


ABBILDUNG 7.12: Flussschema des BID mit *Vibrio fischeri*. Die Injektion der Analyten in das System erfolgte entweder durch vorhergehende HPLC-Trennung oder durch direkte Injektion im Sinne einer Fließinjektionsanalyse.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde darauf verzichtet, die HPLC-Anlage mit einzuzeichnen. Das System wurde sowohl an eine HPLC-Anlage gekoppelt als auch als Fließinjektionsmodul verwendet, wobei in diesem Fall die Injektionen über ein Sechsweg-Ventil der Firma Rheodyne erfolgte. In diesem Fall wurde kein Flussteiler eingebaut; das gesamte Analysenvolumen gelangte in den BID.

Die Flussteilermodule, die Verwendung fanden, sind in Abbildung 7.13 dargestellt. Der Vorteil des variablen Flussteilers lag darin, dass die Splitrate frei gewählt werden konnte. Durch die Verwendung von Restriktionskapillaren an den Ausgängen konnten die Flüsse zumindest für den Zeitraum einer Messung konstant gehalten werden.

Die Reproduzierbarkeit war jedoch schwierig zu bewerkstelligen, da der Fluss vor jeder Messung exakt eingestellt werden musste und dieser einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse hatte. Die Verwendung des fest eingestellten Flussteilers zeigte eine gute Reproduzierbarkeit, jedoch konnten die Splitraten nicht variiert werden und waren bei einem Eingangsfluss des HPLC-Eluates von 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ auf 1:20 eingestellt.

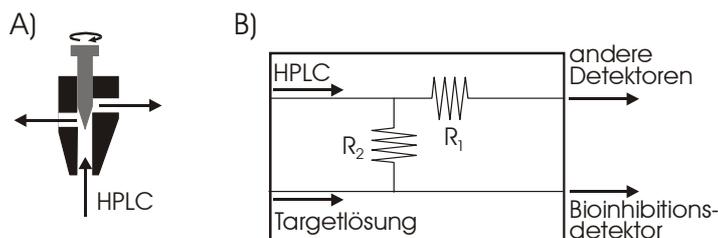


ABBILDUNG 7.13: Verwendete Flussteilermodule zum Einleiten des Eluates in den Biodetektor. (A) Variabler Flussteiler, der über Restriktionskapillaren mit unterschiedlichen Detektoren verbunden wurde. (B) Fester Flussteiler, der den Eluatstrom im Verhältnis 1:20 teilt. Durch hohe Innenwiderstände beeinflussten Schwankungen des Rückdrucks im System das Split-Verhältnis nicht.

7.2.2 Fließinjektionsexperimente

Lösungsmiteleinfluss: Die in offline-Tests erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Lösungsmittel, mit denen die Bakteriensuspension hergestellt wurde, konnten im Fließsystem bestätigt werden. (Abbildung 7.14). Die Basislinie bei Messungen mit einer Natriumchlorid-Lösung zeigte nach 31 min eine Intensitätsabnahme von 27%, wie die Langzeitmessungen in der MTP erwarten ließen. Die Verwendung des modifizierten Nährmediums verbesserte die Stabilität der Basislinie und führte zu einer Verbesserung der Nachweisgrenzen. So konnte bei den Messungen mit Bakterien in Natriumchlorid-Lösung eine Konzentration von 5 mg/L einer 3,4-DNP-Lösung nicht detektiert werden, mit dem modifiziertem Nährmedium hingegen schon.

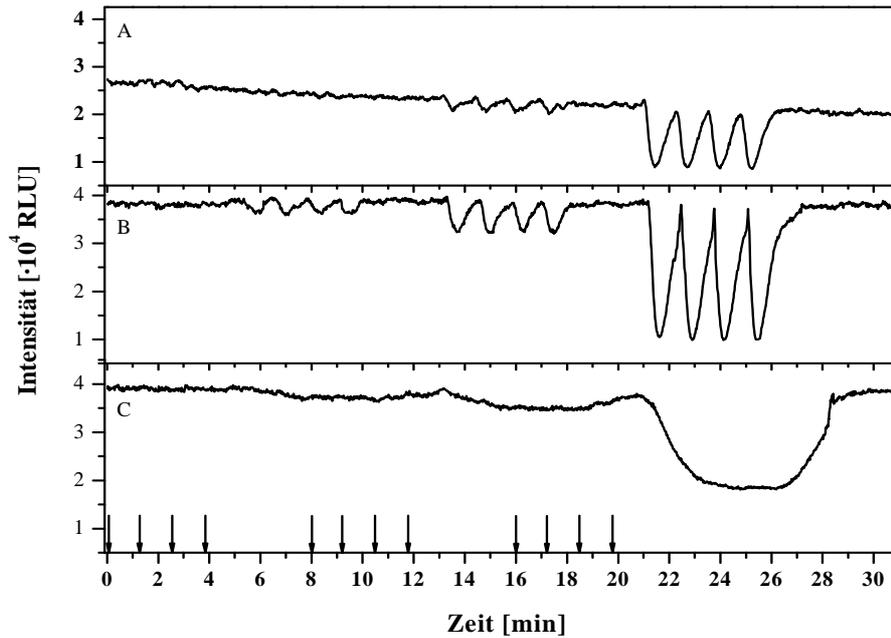


ABBILDUNG 7.14: Lumineszenzsignale, die nach der Injektion von 3,4-DCP in unterschiedlich hohen Konzentrationen aufgenommen wurden. Die Pfeile zeigen die Injektionszeitpunkte (je 20 μL). Es wurden in der ersten Serie ($t=0$ min) 5 mg/L, in der zweiten Serie ($t=8$ min) 10 mg/L und in der dritten Serie ($t=16$ min) 100 mg/L injiziert. A: Luftsegmentierter Fluss, 2% NaCl-Lösung zur Verdünnung, B: Luftsegmentierter Fluss, modifiziertes Nährmedium als Lösungsmittel, C: keine Luftsegmentierung, modifiziertes Nährmedium als Lösungsmittel.

Tabelle 7.4 zeigt die Inhibitionsraten der Fließinjektionsanalyse im Vergleich zu den Inhibitionsraten, die nach dem DIN-Verfahren [DIN, 1998] in der MTP gemessen wurden. Bei der Zugabe von AHL und cAMP zu den in NaCl-Lösung verdünnten Bakterien hatte, ebenso wie im Nährmedium, eine Verbesserung der Testbedingungen zur Folge, wurde aber in den Vergleichsmessungen nicht angewandt, um die Ergebnisse mit denen aus dem DIN-Test vergleichen zu können.

TABELLE 7.4: Inhibitionsraten (RI) in Abhängigkeit der injizierten Konzentrationen von 3,4-DCP. Die Berechnungen erfolgten nach den in Abschnitt 11.5 beschriebenen Verfahren. (Fehler: Standardabweichung, $n=4$)

Konzentration von 3,4-DCP [mg/L]	RI \pm 1s [%]		
	MTP-Format	online-System	
		Mod. Nährmedium	NaCl-Lösung
5	16 \pm 3.1	7 \pm 0.1	n.d.
10	51 \pm 2.4	16 \pm 0.4	11 \pm 0.1
100	90 \pm 3.5	73 \pm 1.2	58 \pm 0.7

Gassegmentierung: Bei einem großem Probendurchsatz ist es wünschenswert, die Injektionsfrequenz möglichst hoch zu wählen. Um einzelne Injektionen voneinander getrennt zu halten, wurde die Fließinjektionsanalyse in der gassegmentierten Form durchgeführt. Die Anwendung der Flussegmentierung führte zusätzlich zu einer besseren Durchmischung der zusammengeführten Flüssigkeiten innerhalb der flüssigen Segmente [Dummann, 2003]. So konnten bereits Proben mit 5 mg/L 3,4-DCP von der Basislinie unterschieden werden.

Die relative Standardabweichung der Basislinie über einen Zeitraum von 2 min (n=120) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen segmentiertem und unsegmentiertem Fluss. Bei beiden belief sie sich auf 0.8%. Die Reproduzierbarkeit der Basislinie wurde über zehn Messungen getestet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Intensität.

Kalibrierung: Als Negativkontrolle wurde Penicillin G eingesetzt. Dieses ist ein Antibiotikum, das nur auf wachsende Zellen Einfluss hat, da es in den Aufbau der Zellwand eingreift [Martin, 1979]. Penicillin G zeigte bis zu einer Konzentration von 10 g/L weder im MTP-Format noch im online-System einen inhibitorischen Effekt.

Tabelle 7.5 zeigt die resultierenden Ergebnisse der Kalibrierkurven von unterschiedlichen Chlorphenolen. Verglichen wurden die im online-Verfahren erhaltenen Ergebnisse mit denen, die mit MTP-Format nach DIN-Vorschrift erhalten wurden.

TABELLE 7.5: EC₅₀-Werte von Phenolen aus Mikrotiterplattentests nach DIN-Verfahren und aus dem online-System. Die Messungen erfolgten jeweils bei 21°C. (Fehler: Standardabweichung, n=20)

Substanz	MTP-Format		online-System	
	EC ₅₀ ± 1s [mg/L]	Quasi-linearer Bereich [mg/L]	EC ₅₀ ± 1s [mg/L]	Quasi-linearer Bereich [mg/L]
2,4-DCP	40 ± 1.7	20 - 100	97.2 ± 1.5	40 - 200
3,4-DCP	9.7 ± 0.5	3 - 30	35.9 ± 1.8	7 - 90
3,5-DCP	26.4 ± 1.2	15 - 400	59.8 ± 8.0	30 - 300
2,3,4,6-TCP	9.4 ± 2.9	5 - 40	11.5 ± 1.6	4 - 30
2,3,5,6-TCP	10.6 ± 1.1	5 - 20	19.5 ± 4.0	5 - 40
2,3,5,6-TCP ^a	10.7 ± 1.0	5 - 20	19.4 ± 4.1	5 - 40

^a Analytlösung enthielt 5 mg/L Huminsäure

Generell lagen die RI-Werte bei den Messungen mit dem Fließinjektionssystem niedriger als die mit den MTP-Tests erzielten Ergebnisse. Entsprechend lagen die EC₅₀-Werte für die getesteten Phenole im MTP-Verfahren – bis auf 3,4-DCP und 2,3,4,5-TCP – etwa um

den Faktor zwei niedriger. Bei dem erwähnten Dichlorderivat waren die offline-Ergebnisse um den Faktor vier höher. Für das Tetrachlorderivat konnten bei allen Messungen fast identische Werte beobachtet werden. Die Standardabweichung im Fließinjektionsverfahren lag mit 3.8% etwas höher als die der Abweichungen bei den MTP-Tests, die durchschnittlich 1.8% betrug. Bei der Korrelation der EC_{50} -Werte aus beiden Testverfahren konnte eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse festgestellt werden (Abbildung 7.15). Als Maß hierfür diente die linearen Regressionsgrade mit $R^2=0.97$ ($m=6$).

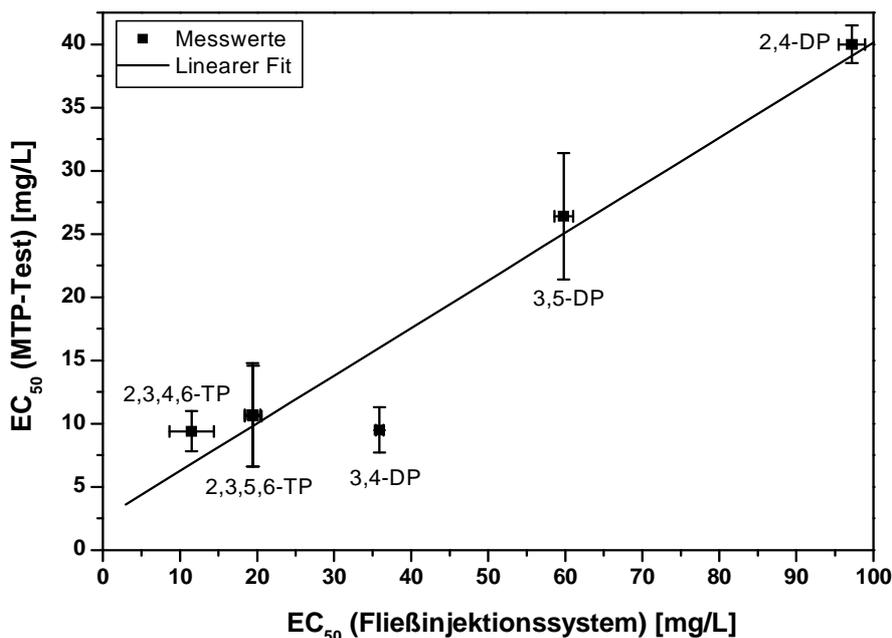


ABBILDUNG 7.15: Korrelation der EC_{50} -Werte aus MTP-Tests und Fließinjektionsanalyse mit einer linearen Regression ($y=0.38x + 2.51$) mit $R^2=0.97$ ($m=6$). (Fehler: Standardabweichung, $n=20$)

Ein Grund für die bessere Sensitivität im Plattentest ist die geringere Verdünnung der Analyten in den Kavitäten. Hier wurden die gleichen Volumenverhältnisse verwendet, wie sie im Fließsystem zum Einsatz kamen. Bei der Injektion konnte es durch Dispersion innerhalb der Transferkapillare von Injektionsventil zum T-Stück und somit zum Bakterienstrom zur Verdünnung kommen und somit zu einer Verringerung der RI-Werte führen.

Matrixeffekte: Des Weiteren wurde der Einfluss von möglichen Matrixfaktoren mit beiden Detektionssystemen getestet. Da eine Anwendung des Flusssystems im Bereich der Wasseranalytik liegen könnte, wurde als ein häufig auftretender Matrixbestandteil Huminsäure als Zusatzstoff untersucht. Es zeigten sich bis zu einer Konzentration von 5 mg/L keine signifikanten Einflüsse auf die Toxizitätsmessungen. Die EC_{50} -Werte lagen innerhalb der Standardabweichungen der ohne Zugabe von Huminsäure gemessenen Proben.

Diese Konzentration von 5 mg/L liegt über den üblichen realen Konzentrationen [Artinger, 2000].

7.2.3 Kopplung an die HPLC

Die Signalintensitäten wurden in Abhängigkeit von der Flussrate in den Biodetektor bestimmt, wie es in Abbildung 7.16 dargestellt ist. Um den Einfluss von Methanol auszuschließen, wurde in den BID nur Wasser eingeleitet. Es zeigte sich, dass die Signalintensitäten indirekt proportional zur Durchflussmenge verliefen. Ab einer Flussrate des HPLC-Eluates von etwa 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ in den Biodetektor, also fast einer 1:1-Vermischung, sank die Grundlinie zu stark ab, um noch eine ausreichende Empfindlichkeit zur Detektion der Inhibitionssignale zu gewährleisten. Bei der Korrelation von Flussrate und Signalintensität zeigte sich ein linearer Zusammenhang ($y = -323.3x + 34688.1$), der mit $R^2 = 0.996$ ($m=6$) eine sehr gute Linearität im gemessenen Bereich aufwies.

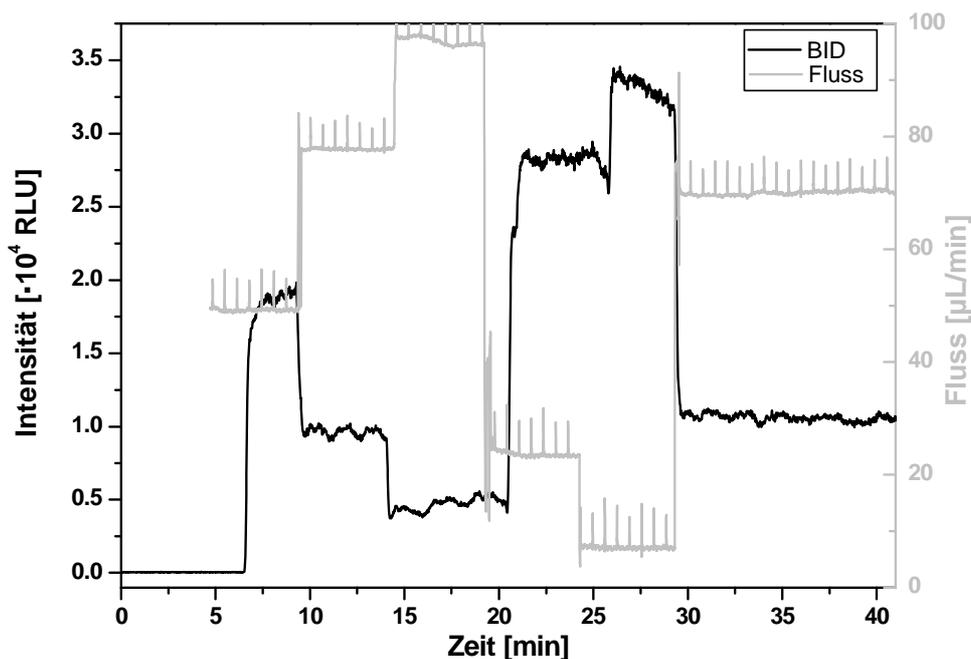


ABBILDUNG 7.16: Variation der Flussrate von Wasser in den BID. Die Leuchtbakteriensuspension wurde mit 110 $\mu\text{L}/\text{min}$ durch das System gepumpt. Die Datenaufzeichnung der Flussraten erfolgte parallel zum BID und wurde durch Subtraktion der Messwerte vom Gesamtfluss aus der HPLC mit 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ berechnet.

Messungen mit einem Zufluss von bis zu 70 $\mu\text{L}/\text{min}$ wären bei einer Fließgeschwindigkeit der Bakteriensuspension von 110 $\mu\text{L}/\text{min}$ seitens der Signalintensität durchführbar, jedoch müsste der Einfluss von Methanol beachtet werden, der bei absoluten Konzentrationen von 10% MeOH über 80% Inhibition hervorrief (siehe Abschnitt 5.2.3).

Eine Möglichkeit, den Lösungsmittelgradienten in der HPLC zu beeinflussen, bestand darin, die Anfangskonzentration an organischer Phase zu erhöhen und den Gradienten mit geringerer Endkonzentration flacher zu fahren (Abbildung 7.17 oben). Dies führte generell dazu, dass die Peaks hin zu geringeren Retentionszeiten wanderten, die Auflösung R_S von früh eluierenden Substanzen jedoch starke Einbußen erlitt. Diese lagen schließlich mit $R_S < 1.5$ nicht mehr basisliniengetrennt vor.

Ein weiterer Ansatz zur Optimierung hin zu geringeren Methanolkonzentrationen war die Erhöhung der Temperatur der Trennsäule bis auf 60°C unter Verwendung eines flachen Lösungsmittelgradienten (Abbildung 7.17 unten). Bei dieser Maßnahme wurden alle Peaks hin zu kürzeren Retentionszeiten verschoben. Die Auflösung der früh eluierenden Substanzen blieb auch bei höheren Temperaturen bei $R_S > 1.5$. Die Integrale blieben sowohl im Rahmen der Standardabweichung, wie auch bei der Veränderung des Gradienten konstant. Da der Säulenofen eine Maximaltemperatur von 60°C erreichen konnte, lag hier die Limitierung dieser Optimierungsmethode.

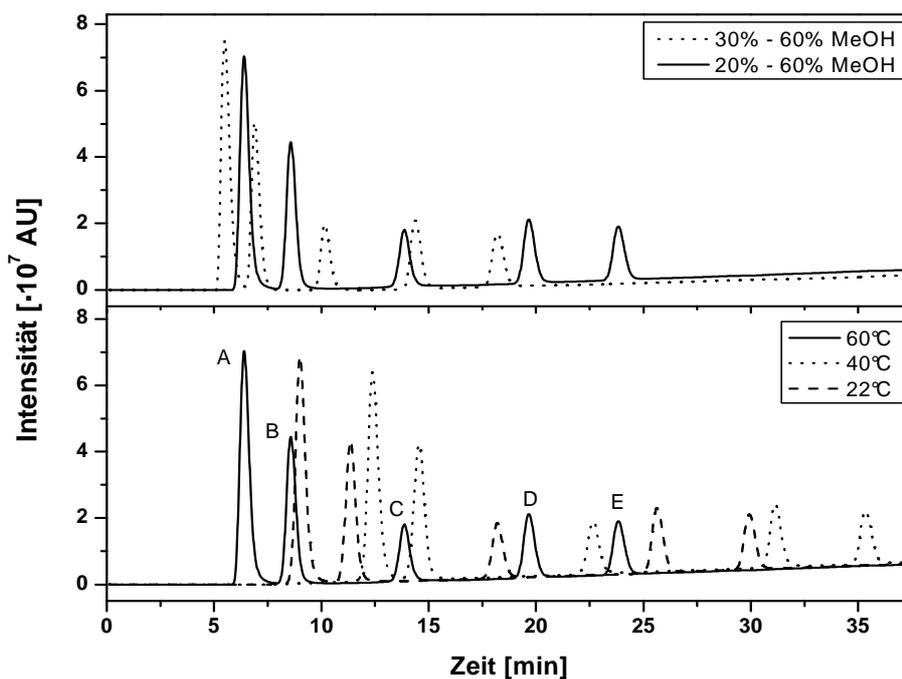


ABBILDUNG 7.17: Optimierung der HPLC-Trennung zur Reduktion des MeOH-Gehaltes im Lösungsmittel. *Oben:* Optimierung des Gradienten bei 60°C durch Variation der Anfangskonzentration von MeOH. *Unten:* Veränderung des Chromatogramms bei Erhöhen des Temperaturgradienten linear von 20% auf 60% MeOH über eine Zeitspanne von 35 min, anschließend Rekonditionierung bei 30% MeOH. A: 2,4-Dinitrophenol, B: 4-Fluor-2-nitrophenol, C: 2-Methyl-4,6-dinitrophenol, D: 3,4-Dichlorphenol, E: 3,5-Dichlorphenol.

Trotz erhöhter Temperatur war ein Gradient von 20% bis zu 50% MeOH nötig, um bei gegebener Auswahl an Analyten alle zu eluieren. Weitere Versuche ergaben, dass die

Flussraten aus der HPLC-Anlage in den BID dadurch stark reduziert werden mussten. In Abbildung 7.18 sind die Chromatogramme von Messungen gezeigt, die im Sinne der WBA unter paralleler Detektion von BID und PDA durchgeführt wurden. Dabei wurden Flussraten von 11 $\mu\text{L}/\text{min}$ und 22 $\mu\text{L}/\text{min}$ aus der HPLC-Trennung in den BID miteinander verglichen. Die Peakverbreiterung bei 3,4-DCP und 3,5-DCP war auf den Gradienten zurückzuführen und wäre durch einen steileren Anstieg auf eine höhere Endkonzentration nach ca. 12 min vermeidbar gewesen. Durch die Kopplung mit dem BID war diese Maßnahme wegen der Methanoleffekte nicht anwendbar.

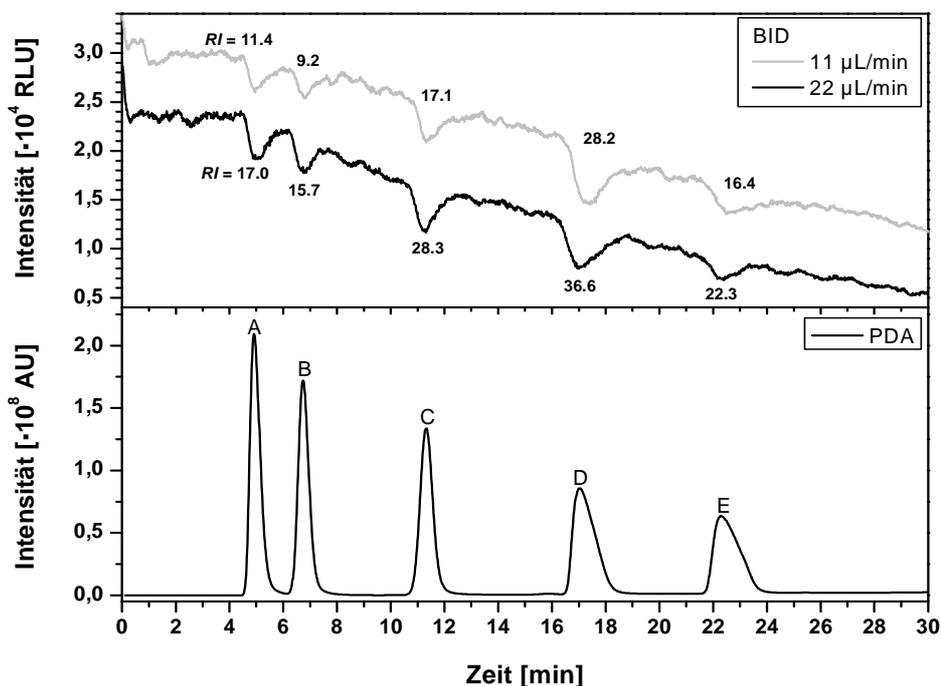


ABBILDUNG 7.18: Wirkungsbezogene Analyse mit BID und PDA als Detektoren. A: 2,4-Dinitrophenol (200 mg/L), B: 4-Fluor-2-nitrophenol (300 mg/L), C: 2-Methyl-4,6-dinitrophenol (200 mg/L), D: 3,4-Dichlorphenol (300 mg/L), E: 3,5-Dichlorphenol (300 mg/L).

Die Basislinie des BID zeigte eine negative Steigung, die durch den MeOH-Gradienten bedingt war. Durch die Peakverbreiterung der beiden Dichlorphenole in der HPLC ergaben diese auch im BID breite und flache Peaks. Beim Vergleich der beiden BID-Spuren mit unterschiedlichen Zuflussmengen aus der HPLC zeigte sich, dass mit zunehmendem Fluss des Eluats in den BID die Basislinie absank. Mit steigenden Flussraten aus der HPLC erhöhte sich ebenfalls die Absolutmenge an Analyten, die den Toxizitätsmessungen zugeführt wurden.

Die RI-Werte zeigten die erwartete direkte Abhängigkeit mit verändertem Fluss. Bei einem höherem Fluss zeigte sich ein Anstieg der RI-Werte. Durch einer weiteren Erhö-

hung des Eluatflusses in den BID wurde der toxische Effekt des Methanols zu groß, und es konnten keine Peaks mehr identifiziert werden, da die Basisline bis auf die Hintergrundsignale zurückging.

7.2.4 Zusammenfassung

Der Umbau des Lumineszenzdetektors wurde getestet und zeigte eine gute Funktionalität zusammen mit der Flusszelle von 68 mm Länge. Das Detektionssystem war unempfindlich gegen die Gassegmentierung, daher musste die Gasphase vor der Detektion nicht abgetrennt werden.

Messungen in Form der Fließinjektionsanalyse wurden durchgeführt und zeigten gute Ergebnisse, wenn auch die Inhibitionswerte generell zwei- bis vierfach niedriger lagen als in durchgeführten offline-Messungen. Als vorteilhaft zeigte sich die Verdünnung mit modifiziertem Nährmedium und die Zugabe von AHL und cAMP.

Bei der Kopplung an die HPLC-Trennung zur Durchführung einer WBA zeigte sich, dass der Einfluss des Methanols sehr groß war und hier die Limitierung in der Detektion lag, da die Analyten nur bei geringer Flussrate und damit geringer Absolutmenge in den BID eingespeist werden konnten.

Teil IV

Zusammenfassung und

Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Entwicklung von Detektionssystemen, die zur Messung von Analyten im Sinne der WBA eingesetzt werden können, um die Verknüpfung des Auftretens einzelner Substanzen und deren toxischer Wirkung herstellen zu können.

Da die Auswahl der möglichen Targets groß war, wurden zwei Vertreter ausgewählt, denen unterschiedliche Targetstrukturen zugrunde lagen. Zum einen fiel die Wahl auf Leuchtbakterien vom Stamm *Vibrio fischeri*, die als Indikator für die allgemeine Toxizität dienen sollten, zum anderen wurde die Proteinphosphatase 1 α ausgewählt, ein Enzym, das als Indikator für die hepatotoxische Wirkung von Analyten Anwendung fand. Das Enzym wurde von Projektpartnern aus Stuttgart hergestellt und in Form eines Fusionsproteins, das aus einer Proteinphosphatase 1 α und einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) bestand, bereit gestellt. Als Modellsubstanzen wurden cyanobakterielle Toxine sowie halogenierte Phenole gewählt.

Es sollte zudem ein System aufgebaut werden, in dem eine vorhergehende HPLC-Trennung der Analyten und eine anschließende online-Detektion mit verschiedenen parallel geschalteten Detektoren miteinander verbunden werden. Dadurch sollte eine möglichst einfach automatisierte Möglichkeit erschlossen werden, um Probeninhaltsstoffe zu identifizieren und deren Effekte zu charakterisieren.

Für die Messungen mit dem Enzym als Target war zur Ermittlung der Aktivität und somit des Grades der Hemmung die Zugabe eines Substrates notwendig. Zur Auswahl standen einerseits das kostengünstigere *para*-Nitrophenylphosphat, das nach Dephosphorylierung durch Absorptionsmessung detektiert werden konnte, und andererseits der Fluoreszenzfarbstoff 6,8-Difluoro-4-methylumbelliferylphosphat. Die Enzyminhibitionstests konnten mit Letzterem empfindlicher durchgeführt werden. Bei einem Verbrauch von geringeren Mengen an Enzymen konnten beim Fluoreszenzsubstrat nach kürzerer Zeit schon auswertbare Signale registriert werden. Daher erwies es sich als angebracht, den kostenintensiveren Farbstoff zur Anwendung im online-System zu bringen, auch wenn die Zudosierung des Substrates kontinuierlich über den Zeitraum der gesamten Messung erfolgen musste. Zur stichprobenartigen Überprüfung der Enzymaktivität in der Küvette – bei Verwendung neuer *Batches* und zur Überprüfung der Langzeitstabilität bei der Lagerung – wurde das *para*-Nitrophenylphosphat verwendet. Bei der Anwendung von *Vibrio fischeri* konnte auf die Zugabe von Substrat verzichtet werden, da die Leuchtkraft der Bakterien als Indikator für toxikologische Effekte von Analyten genutzt werden konnte.

In offline-Versuchen wurden die Targets hinsichtlich der Lösungsmittelverträglichkeit untersucht, das als Laufmittel in der HPLC benötigt wurde. Methanol erwies sich in beiden Fällen als das am besten geeignete Laufmittel. Dabei zeigte sich, dass das Enzym weniger empfindlich reagierte als die Bakterien, bei denen die Konzentrationen an Methanol unter 10% bleiben musste, um überhaupt Messungen durchführen zu können. Auch wurde die Reaktion auf pH-Wert-Änderungen getestet. In beiden Bioinhibitionssystemen wurden Puffersysteme integriert, die im Rahmen des eingebrachten sauren HPLC-Eluates eine pH-Änderung abpuffern konnten. Die Säuren selbst hatten keinen Einfluss auf die Target-Strukturen.

Für die Proteinphosphatase wurden Versuche durchgeführt, um ideale Lagerbedingungen für die Aliquote während der Messung zu erhalten. Es zeigte sich, dass die Lagerung bei Raumtemperatur am vorteilhaftesten über die Dauer der Messung war, nachdem die Enzymaliquote kurz zuvor aufgetaut und verdünnt worden waren. Bei einer Lagerung bei 0°C zeigte sich ein Aktivitätsabfall.

Für die Leuchtbakterien wurde ein neues Medium zur Verdünnung verwendet, das es erlaubte, über Zeiträume von mehr als 60 min hinweg bei stabilem Grundsignal Messungen durchzuführen. Es handelte sich um ein modifiziertes Nährmedium, dem zusätzlich noch N-Acyl-L-homoserinlacton sowie cyclisches Adenosinmonophosphat beigefügt wurde, um eine stärkere Leuchtintensität bei gleicher Bakterienkonzentration zu erzielen.

Die online-Systeme wurden nach dem Vorbild des Acetylcholinesterase-Inhibitionssystems von Frau Fabel [Fabel, 2008] konzipiert. Um die in der HPLC erzielte Auflösung aufrechtzuerhalten, wurde der Fluss in den Inkubationsschleifen durch Luftsegmentierung unterbrochen und dadurch eine Bandenverbreiterung durch Longitudinaldiffusion vermieden. Um eine gleichmäßige Segmentierung mit wenig Pulsation zu erhalten, wurde die Luft mit einer Schlauchpumpe, die mit hoher Frequenz und einem Schlauch mit kleinem Innendurchmesser betrieben wurde, eingespeist. Im Fall der Enzymmessung mussten die Luftsegmente vor der Detektion wieder entfernt werden, um ohne Störungen messen zu können. Dazu fand ein Blasenfilter Verwendung, der als offene Rinne konzipiert war, über das ein Luftstrom geleitet wurde, um die Blasen aufplatzen zu lassen.

Da auf dem Markt kein geeigneter Durchflussdetektor zur Durchfluss-Lumineszenzmessung im $\mu\text{L}/\text{min}$ -Maßstab existierte, musste ein handelsübliches Küvetten-Luminometer umgebaut werden, um im Durchflussmodus messen zu können. Dazu wurden ein neues Gehäuse sowie ein Deckel entworfen. Durch letzteren konnten die Kapillaren in den Detektor hineingeleitet und wieder herausgeführt werden. Um den Eintrag von Streu-

licht aus der Umgebung in den Detektor zu vermeiden, wurde der Aufbau weitestgehend in einer lichtdichten Ausführung aufgebaut.

Bei Messungen mit Proteinphosphatase 1 α wurde festgestellt, dass das Enzym adsorptiv auf *fused silica* Kapillaren bindet. Durch vergleichende Untersuchungen mit freiem GFP konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein nicht mit dem GFP-Teil mit der Oberfläche in Wechselwirkung trat.

Es wurden überdies Versuche unternommen, andere Kapillarmaterialien mit besseren Eigenschaften zu finden. Da die Notwendigkeit der Gassegmentierung bestand, konnten Kunststoffe wie PEEK oder Teflon ausgeschlossen werden, da bei diesen Materialien die Luftsegmente nicht konstant blieben und die Analyten adsorbiert wurden, wie in dieser Arbeit für PEEK nachgewiesen wurde. Eine Oberflächenmodifikation der *fused silica* Kapillaren mit Methoxy-polyethylenglycol zur Deaktivierung wurde getestet, jedoch zeigten sich hier bereits nach wenigen Messungen erhöhte Rückdrücke, unter denen weitere Messungen nicht mehr möglich waren. Daher wurde auf eine Modifikation der Enzymlösung zurückgegriffen und Pluronic F68 (0.005%) und BSA (0.1%) zugegeben. Es zeigte sich jedoch, dass die in der Chromatographie erzielte Auflösung nicht durch den Bioinhibitionsdetektor hindurch aufrechterhalten werden konnte. Die detektierten Peaks zeigten eine starke Bandenverbreiterung, sodass die Peakkapazität für den Biodetektor sehr gering wurde. Die Nachweisgrenzen lagen mit 8.30 $\mu\text{g/L}$ für Microcystin LR bzw. 32.92 $\mu\text{g/L}$ für Microcystin LF um mehrere Potenzen über den Nachweisgrenzen der in Mikrotiterplatten durchgeführten offline-Messungen.

Bei den Leuchtbakterien wurden Messungen durchgeführt, bei denen der Bioinhibitionsdetektor als Fließinjektionsmodul verwendet wurde. Die Injektion erfolgte direkt in das System, sodass die gesamte Analytmenge den Detektor erreichte. Die Messungen zeigten EC_{50} -Werte für die getesteten Chlorphenole, die von 4 mg/L bis 40 mg/L reichten und in der Größenordnung der als Vergleich durchgeführten offline-Messungen lagen. Bei den Messungen mit vorangehender HPLC-Trennung zeigte sich, dass die Inhibitionswerte deutlich niedriger wurden. Hier fand ein Split des HPLC-Eluates statt: nur 5% der Analyten gelangten in die Biodetektion. Außerdem zeigte sich, dass der Einfluss des Lösungsmittels eine entscheidende Rolle spielte, weil es die Flussrate aus der Trennung zur Biodetektion limitierte.

Für die Weiterentwicklung der online-Leuchtbakterientests wäre es erforderlich, eine chromatographische Technik einzusetzen, bei der möglichst wenig organisches Lösungsmittel zum Einsatz kommt. Denkbar wäre hier die von der Firma Bischoff entwickelte

POP-LC, bei der die Trennung durch die Kopplung verschiedener stationärer Phasen erreicht wird und auf Lösungsmittelgradienten verzichtet werden kann, wie von Kuehnle *et al.* [Kuehnle, 2008] zur isokratischen Trennung von Steroiden kürzlich gezeigt wurde. Eine zweite Möglichkeit wäre die Anwendung einer Hochtemperatur-Flüssigkeitschromatographie, bei der der Lösungsmittelgradient durch einen Temperaturgradienten bei isokratischen Trennbedingungen ersetzt wird [Guillarme, 2004]. Letztere Möglichkeit wurde schon 2005 in Kombination mit einem Enzymassay erfolgreich angewandt [de Boer, 2005].

Generell stellt sich die Frage, ob es erfolgreicher wäre, ein System zu etablieren, das nicht im online-Modus arbeitet, sondern eine Fraktionierung des Eluats z. B. auf einer Matrix in Form von Mikrotröpfchen erfolgt und anschließend die Toxizitätstests auf dieser Oberfläche durchgeführt werden. Dadurch könnte eine Entfernung des organischen Lösungsmittels erfolgen und höhere Konzentrationen des Analyten der toxischen Untersuchung zugänglich gemacht werden. Ein ähnliches Konzept, bei dem Immunoassays auf einer CD durchgeführt werden und die Kopplung an eine HPLC vorgeschlagen wurde, stellten Kido *et al.* vor [Kido, 2000].



Teil V

Experimenteller Teil



9 Geräte

9.1 Pumpen

HPLC-System Alliance (2695, Waters GmbH, Eschborn)

Kolbenpumpe Model M6 pump (CP2-4841-100, VICI, GAT Gamma Analysen-Technik GmbH, Bremerhaven)

Schlauchpumpe Ismatec SA MS-Reglo (Ismatec, Wertheim-Mondfeld)

Spritzenpumpe Cavro XL 3000 Modular Digital Pump (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim)

Spritzenpumpe Model 11 (Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten)

Spritzenpumpe (Model PHD 2000 Infuse/Withdraw (71-2001, Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten)

9.2 Detektoren

Elektrospray-Flugzeit-Massenspektrometer, LCT (Micromass, Waters GmbH, Eschborn)

Fluoreszenzdetektor 2020-FP-S mit 5 μ L Durchflussszelle (6829-J003S, Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt)

Fluoreszenzreader Wallac Victor² Multilabel Counter (Perkin Ellmer, Rodgau-Jügesheim)

Luminometrischer Detektor, Glowmax 20/20n (Turner Bio-Systems, Sunnyvale, USA)

Mikrotiterplattenreader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (Biotek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall)

UV-Vis-Detektor, Photodiodenarray (996, Waters GmbH, Eschborn)

9.3 Fluidik-Zubehör

3-Stopper-Schlauch, Tygon, I.D. 0.19 mm (SC0049, ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld)

3-Stopper-Schlauch, Tygon, I.D. 0.57 mm (SC0054, ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld)

- 3-Stopper-Schlauch, Tygon, I.D. 0.64 mm (SC0055, ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld)
- 3-Stopper-Schlauch, Tygon, I.D. 1.02 mm (SC0059, ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld)
- Delrin Nuts 1/16“ (Z-UC-P-202X, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
- ETFE Flangeless Ferrules 1/16“ (Z-UC-P-200X, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
- ETFE Luer Adapter 1/4x28 (Z-UP-P-624, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
- FEP-Tubing, 1/16“x 0.002“ (Z-VI-TFEP120, Vici Valco, Postnova Analytics, Landsberg)
- Flusssensor, CMOSens Liquid Flow Meter (ASL 1600-10, Sensirion AG, Zürich/Schweiz)
- Glaskapillare mit Polyimidbeschichtung, 660 µm x 530 µm (6540-TSP630660, Polymicro Technologies, Optronis GmbH, Kehl)
- Injektionsventil, 6 Wege (7725, Rheodyne, Rohnert Park, CA, USA)
- Makeup-Flow Splitter, maßgefertigt, 1:20 (529-620-PO90-Cs, Sunchrom Wissenschaftliche Geräte GmbH, Friedrichsdorf)
- Micro-Splitter Ventil, variable Splitraten (Z-UC-P-451, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
- Trennsäule Luna C18(2), 50 mm x 4.6 mm, 5 µm (1.615500, Merck, Darmstadt)
- PEEK Ferrules 1/16“ (Z-UC-F-142x, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
- PEEK Fingertight Nut 1/16“, long (Z-UC-F-330X, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
- PEEK Flangeless Nut 1/16“ (Z-UC-P-230X, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
- PEEK-Frit-in-a-ferrule 1/8“, 2 µm (Z-UC-P-374, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
- PEEK-T-Stück, 10-32 Anschlüsse, 0.5mm Bohrung (Z-UC-P-727, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
- PEEK-T-Stück, 1/4-28 Anschlüsse, 0.5mm Bohrung (Z-UC-P-712, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)
- PEEK-Tubing 1/16“ (Z-UC-P-712, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

Peek ZDV Union, 0.02“ (Z-UC-P-704, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

Spritze mit PE-Dichtung und Luer Lock, 250 μ L, PE, XL (2645818, ILS Innovative Labor Systeme GmbH, Stützerbach)

Spritze mit PTFE-Dichtung und Luer Lock, 10 mL, H-M, XL (2645078, ILS Innovative Labor Systeme GmbH, Stützerbach)

Stainless Steel Fritte 0.2 μ m (Z-UC-A-417, Upchurch Scientific, Postnova Analytics, Landsberg)

9.4 Sonstiges

Einstufiger Gasrückdruckregler 0-40 psi (81890, Alltech GmbH, Unterhaching)

Flaschendruckregler, Messung FM61 10 bar (71706139, Messer Griesheim GmbH, Krefeld)

Mikrotiterplatte für Fluoreszenzmessungen, schwarz, F-Form, mittlere Bindungskapazität (655 076, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen)

Mikrotiterplatte für Lumineszenzmessungen, weiß, F-Form, mittlere Bindungskapazität (655075, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen)

Micro Inserts, 300 μ L (WIC 47000, Wicom Germany, Heppenheim)

Schraubkappen, Silikon/PRTFE-Septum, geschlitzt (WIC 43945/B, Wicom Germany, Heppenheim)

Rotilabo[®]-Zentrifugenröhrchen, PP, steril, 15 mL (AN77.1, Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)

Schüttler für Mikrotiterplatten (Easyshaker EAS 2/4, SLT, Crailsheim)

Target Schraubvial, 2 mL, klar (WIC 41150, Wicom Germany, Heppenheim)

UV-Vis-Spektrometer DU 650 (Beckmann Instrument, Fullerton/USA)

Waage Mettler AT261 Delta Range (Mettler-Toledo, Gießen)

10 Chemikalien und Reagenzien

10.1 Verwendete Chemikalien

- 1,4-Dimercaptobutan-2,3-diol (DTT) (20291, Pierce, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn)
- 3-(Glycidyoxypropyl)-trimethoxysilan (GOPS), $\geq 98.0\%$ (440167, Aldrich, Taufkirchen)
- 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES), $\geq 99.5\%$ (H3375, Sigma, Taufkirchen)
- 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat (pNPP) (4744, Sigma, Taufkirchen)
- 6,8-Difluoro-4-methyl-umbelliferylphosphat (DifMUP) (D6567, Invitrogen, Karlsruhe)
- α -Amino-o-methoxy-polyethylenglykol (XTJ-506, Huntsman Advanced Materials GmbH, Bergkamen)
- Aceton, Chromasolv (34850, Riedel-de Haën, Taufkirchen)
- Acetonitril, LC-MS Chromasolv (34967, Fluka, Taufkirchen)
- Ameisensäure, puriss. p.a., ca. 98% (94318, Fluka, Taufkirchen)
- Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), $\geq 99\%$ (A9501, Sigma, Taufkirchen)
- Dextran 6000, aus *Leuconostoc* spp., BioChemika, (31388, Fluka, Taufkirchen)
- Dextran 15000 - 20000, aus *Leuconostoc mesenteroides* (D4624, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), puriss. p.a. $\geq 99.0\%$ (03610, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
- Hellmanex[®] II (Hellma GmbH & Co KG Müllheim)
- Huminsäure, nativ (7821.1, Carl-Roth GmbH, Karlsruhe)
- (Hydroxypropyl)-methyl-cellulose, BioChemika (56340, Fluka, Taufkirchen)
- Isopropanol, purum, $\geq 99\%$ (59310, Fluka, Taufkirchen)
- Kaliumchlorid, SigmaUltra, $\geq 99\%$ (P9333, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
- Magnesiumsulfat Heptahydrat, SigmaUltra, $\geq 98\%$ (M5921, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)
- Mangan(II)chlorid, $\geq 99\%$ (244589, Aldrich, Taufkirchen)
- Methanol, HPLC-MS Chromasolv, $\geq 99.9\%$ (34966, Riedel-de Haën, Taufkirchen)
- N-Acyl-L-homoserinlacton (AHL), $\geq 98\%$ (K3007, Sigma, Taufkirchen)

Natriumchlorid, SigmaUltra, $\geq 99.5\%$ (S7653, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)

Natriumhydroxid

Pluronic[®] F127 (P244-250G, Sigma, Taufkirchen)

Pluronic[®] F68, Pflanzenzellkultur getestet (P7061, Sigma, Taufkirchen)

Salzsäure purum, ca. 4 M (84435, Fluka, Taufkirchen)

Sauerstoff 5.0 (I1001S10R2A001, Air Liquide, Gröbenzell)

Schwefelsäure, puriss. p.a., 95-98% (84719, Fluka, Taufkirchen)

Stickstoff 5.0 (I4001R18RVA001, Air Liquide, Gröbenzell)

Thioharnstoff, puriss. p.a., $\geq 99.0\%$ (88810, Fluka, Taufkirchen)

Tris(4-hydroxymethyl)-methylamin (TRIS), purum, $\geq 99.0\%$ (93304, Fluka, Taufkirchen)

Trypton durch pancreatischen Verdau aus Casein (T9410, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)

TWEEN[®] 20 (63158, Riedel-de Haën, Taufkirchen)

Wasser, HPLC-MS grade (34877, Riedel-de Haën, Taufkirchen)

10.2 Proteine, Enzyme und Organismen

Bovin Serum Albumin (BSA), lyophilisiert, pH=5.2 (A3912, Sigma, Taufkirchen)

Casein aus Rindermilch, gereinigt (C5890, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Taufkirchen)

Grün-fluoreszierendes Protein eGFP (hergestellt Klontiert in pUC-Vektor und in *E. coli DH5alpha* exprimiert von AK Prof. Schmidt, Stuttgart)

LUMIStox Leuchtbakterien vom Stamm *Vibrio fischeri*, lyophilisiert (LCK 488, Hach-Lange, Düsseldorf)

Proteinphosphatase-1 α Fusionsprotein mit GFP (rekombinant hergestellt in *Pichia pastoris* von AK Prof. R.D. Schmid, Universität Stuttgart)

10.3 Standardsubstanzen

2,3,4,6-Tetrachlorphenol (2,3,4,6-TCP), Pestanal, 100ng/ μ L in Methanol (45907, Riedel-de Haën, Taufkirchen)

2,3,5,6-Tetrachlorphenol (2,3,5,6-TCP), Pestanal, (36518, Riedel-de Haën, Taufkirchen)

2,4-Dichlorphenol, Pestanal (2,4-DCP), (35811, Riedel-de Haën, Taufkirchen)

2-Methyl-4,6-dinitrophenol (DNOC), Pestanal (45464, Fluka, Taufkirchen)

3,4-Dichlorphenol, Pestanal (3,4-DCP), (36793, Riedel-de Haën, Taufkirchen)

3,5-Dichlorphenol, (3,5-DCP), Pestanal (46070, Riedel-de Haën, Taufkirchen)

4-Fluor-2-Nitrophenol, 99% (345059, Aldrich, Taufkirchen)

Microcystin LF, isoliert aus *Microcystis aeruginosa* (ALX-350-081, Alexis Biochemicals, Axxora Deutschland GmbH, Lörrach)

Microcystin LR, isoliert aus *Microcystis aeruginosa* (ALX-350-012, Alexis Biochemicals, Axxora Deutschland GmbH, Lörrach)

Penicillin G Natriumsalz, BioChemika, $\geq 98\%$ (13752, Fluka, Taufkirchen)

10.4 Pufferlösungen

TRIS-Puffer PP1-1 (pH=7)

6.06 g TRIS

0.77g DTT

29mg EDTA

0.13g MnCl_2

mit 1M HCl auf pH=7 einstellen

auffüllen auf 100mL mit MilliQ-Wasser

TRIS-Puffer PP1-2 (pH=8)

6.06 g TRIS

0.77g DTT

29mg EDTA

0.13g MnCl_2

0.25% TWEEN 20

mit 1M HCl auf pH=8 einstellen

auffüllen auf 100mL mit MilliQ-Wasser

LB-Nährmedium

1.11 g CaCl_2

1.75 g NaCl

75 mg KCl

1.23 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.17 g Na_2HPO_4

CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

71 mg NaH_2PO_4

0.5 g Trypton

0.3 g Hefeextrakt

0.3 mL Glycerin

0.22 g HEPES

mit HCl auf pH=7 einstellen

auf 100 mL mit MilliQ-Wasser auffüllen

11 Standardprozeduren

11.1 Ansetzen der Analytstandardlösungen

Die Microcystine (ca. 1 g/L) wurden durch direkte Zugabe von Methanol in Lösung gebracht und anschließend mit Methanol auf ca. 100 mg/L verdünnt. Die genaue Konzentration wurde durch UV-Messungen unter Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten für Microcystin LR von $\epsilon=39800 \text{ Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [Harada 1990] für alle Microcystinlösungen berechnet. Diese Stammlösungen wurden in Braungläsern bei einer Temperatur von -20°C aufbewahrt.

Die Herstellung der verwendeten Microcystinlösungen für die Messungen mit Proteinphosphatase wurden durch weiteres Verdünnen mit MilliQ-Wasser hergestellt. Diese Verdünnungen wurden ebenfalls in Braungläsern über mehrere Monate hinweg bei einer Temperatur von -20°C aufbewahrt.

Die Herstellung der Phenol-Stammlösungen erfolgte in Methanol:Wasser im Verhältnis 1:1. Die Phenole wurden abgewogen und in Messkolben aufgelöst. Die Weiterverdünnung erfolgte mit MilliQ-Wasser.

11.2 Herstellung der Targetlösungen

Die lyophilisierten Leuchtbakterien sowie die in Puffer eingefrorene Proteinphosphatase mussten vor den Messungen aufgetaut und (im Fall der Bakterien) reaktiviert werden. Anschließend fand jeweils ein Verdünnungsschritt statt.

11.2.1 Leuchtbakterien

Zur Durchführung der Leuchtbakterientests wurde ein kommerziell erhältliches Testsystem verwendet. Dieses bestand aus lyophilisierten Leuchtbakterien des Stamms *Vibrio fischeri* und einer Reaktivierungslösung (NaCl/MgCl₂, gepuffert bei pH=6). Die Aufbewahrung erfolgte bei -18°C . Erst unmittelbar vor der Verwendung wurden die Reagenzien aufgetaut.

Die Reaktivierung erfolgte, nachdem die Reaktivierungslösung aufgetaut war, wobei sie dann eine Temperatur von ca. 8°C aufwies. Dies wurde durch Messungen mit einem

Quecksilber-Thermometer stichprobenartig festgestellt. Die Lösung wurde zügig in das Gefäß mit den lyophilisierten Leuchtbakterien pipettiert. Daraus resultierte eine leicht getrübe Suspension, bei der mit bloßem Auge keine Lumineszenz festgestellt werden konnte. Nach Angaben des Herstellers war die Konzentration ca. $2 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Da die Intensität mit der Zeit abnahm, wurde ein Aliquot entnommen und der Rest bei 4°C aufbewahrt.

Das entnommene Aliquot wurde sofort mit dem LB-Nährmedium auf die entsprechende Konzentration an Zellen verdünnt. Dazu wurde der Puffer durch einen Spritzenfilter mit 0.2 µm Porengröße steril filtriert. Vor der Zugabe der Bakterienlösung wurden die beiden Additive, cyclisches Adenosinmonophosphat und N-Acyl-homoserin-lacton (beides in wässriger Lösung mit 100 mM), eingebracht. Die Bakterienlösung wurde über 15 min lang bei 21°C temperiert und anschließend eingesetzt.

Für die Vergleichsmessungen nach dem DIN-Verfahren wurden die Bakterien sowohl für online-Messungen als auch für Messungen im Mikrotiterplattenformat in 2% NaCl-Lösung verdünnt.

11.2.2 Proteinphosphatase

Die in den Experimenten verwendete Proteinphosphatase war ein Fusionsprotein aus PP1α und GFPuv, das von Prof. R. D. Schmidt und Prof. T. T. Bachmann zur Verfügung gestellt wurde. Die Proteine lagen in suspendierter Form in einem Lagerungspuffer vor. Dieser bestand aus 30 mM TRIS, 20 mM NaCl, 1 mM MnCl₂, 0.1 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 0.125 mg/ml BSA und 5% Glycerin. Diese Stammlösung wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert. Das Auftauen der einzelnen Fraktionen erfolgte unmittelbar vor den Messungen.

Es wurde 1 mL TRIS-Puffer PP1-1, bei Aktivitätsmessungen mit *para*-Nitrophenylphosphat TRIS-Puffer PP1-2, mit 0.125 mL BSA-Lösung (5 mg/mL in MilliQ-Wasser) und 3.275 mL MilliQ-Wasser versetzt. Diese Lösung wurde zum Verdünnen der Enzymlösung verwendet, indem diese in ein entsprechendes Volumen pipettiert wurde. Wenn nicht anders beschrieben, wurden Lösungen mit einer Enzymaktivität von 1 U/mL hergestellt und verwendet.

Bei den online-Messungen wurden der fertigen Enzymlösung noch 0.005% Pluronic F68 zugesetzt, um adsorptive Effekte der Enzyme an der Kapillarwand zu minimieren.

Das verwendete Substrat DifMUP wurde mit Wasser aufgelöst, eine Stammlösung der Konzentration 10 mmol/L in Wasser hergestellt und in Aliquoten zu je 10 µL bei -20° aufbewahrt. Kurz vor den Messungen wurde – wenn nicht anders angegeben – die Substratlösung mit MilliQ-Wasser um den Faktor 10 verdünnt.

11.3 Durchführung der Mikrotiterplattentests

11.3.1 Proteinphosphatase

Zur Durchführung von Optimierungsschritten wurden Tests in Mikrotiterplatten gemacht. Da es sich bei der Detektionsart um Fluoreszenz handelt, wurden schwarze Mikrotiterplatten verwendet, um den Anteil an Streulicht gering zu halten. Nur bei Messungen mit pNPP wurden farblose Platten verwendet, da hier die Detektionsart die Absorption war. Zur Anwendung kamen low-binding Platten, um die Enzyme – wie im online-Assay – in Lösung zu halten und nicht die Eigenschaften von sorbierten Enzymen zu testen. Die Messungen fanden bei 19°C statt.

In eine Messzelle wurden 179 µL der unter Abschnitt 11.2.2 beschrieben hergestellten Enzymlösung vorgelegt und 20 µL der zu testenden Toxinlösung hinzupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde 1 µL der Substratlösung (10 mM DifMUP-Lösung oder 165 mM pNPP-Lösung) zugegeben und erneut über einen Zeitraum von 10 min inkubiert. Nach der Farbentwicklung erfolgte das Auslesen der Platten mit einem geeigneten Mikrotiterplattenreader.

11.3.2 Leuchtakterien

Um optimale Parameter für die online-Durchführung der Toxizitätstests mit *Vibrio fischeri* zu ermitteln, wurden Tests in Mikrotiterplatten durchgeführt. Zum Einsatz kamen weiße Mikrotiterplatten, um möglichst hohe Quantenausbeuten der Biolumineszenz zu erzielen. Die Tests erfolgten, wenn nicht anders angegeben, bei 20°C.

Tests mit flüssigen Additiven: Die Bakterien wurden aufgetaut und die Verdünnung wie oben beschrieben hergestellt. In jeder Kavität wurden 110 µL Bakteriensuspension vorgelegt. Anschließend wurden 10 µL der zu testenden Lösung hinzugegeben. Nach einer Durchmischung, die über 10 s auf einem Schüttler erfolgte, wurden die Messungen durchgeführt. Die Inkubationszeit von Bakterien und Analyten betrug üblicherweise 5.5 min.

Das Auslesen der Platten erfolgte wie auch bei den Experimenten mit PP1 α mit einem Mikrotiterplattenreader.

Bei den Versuchen, in denen das Leuchtverhalten in Abhängigkeit des pH-Werts untersucht werden sollte, wurden je 2 mL Pufferlösung mit 1 M HCl-Lösung bzw. 1 M NaOH-Lösung auf die entsprechenden pH-Werte eingestellt. Anschließend wurden mit jeder Lösung Leuchtbakterien auf 10^5 Zellen/mL verdünnt. Jeweils 110 μ L der Suspensionen wurden pro Kavität vorgelegt und nach einer Inkubationszeit von 5.5 min gemessen.

Tests mit gasförmigen Additiven: Zum Testen des Einflusses von gelöstem Sauerstoff auf das Leuchtverhalten der Bakterien wurden in je 2 mL Bakteriensuspension (10^5 Zellen/mL) über 1 min lang Sauerstoff bzw. Pressluft mithilfe einer Pasteurpipette eingeblasen. Ein weiterer Kolben mit 2 mL Bakteriensuspension wurde 1 min lang bei Raumatmosphäre geschwenkt. Zur Kontrolle wurde ein Kolben nicht behandelt und durch vorsichtiges Pipettieren eine Durchmischung mit der Umgebungsluft vermieden. In Mikrotiterplatten wurden je 200 μ L der Lösungen vermessen.

11.4 Bestimmung der Enzymaktivität

Die Enzymaktivität wird üblicherweise in Units pro Milliliter angegeben. Dabei kann die Definition von Units bezogen auf die Enzyme unterschiedlich sein.

Für die PP1 α ist 1 Unit definiert als der Umsatz von 1 nmol des Substrates p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol und anorganischem Phosphat bei 30°C und einem pH-Wert von 8.

Mithilfe eines Photometers kann die Aktivität der Enzyme durch das Messen der Absorptionsänderung pro Zeiteinheit in einer Küvette bestimmt werden. Nach dem Gesetz von LAMBERT-BEER gilt:

$$\Delta A = \varepsilon \cdot \Delta c \cdot d \quad (11.1)$$

Dabei stellen ΔA die Absorptionsänderung pro Minute, ε den molaren Extinktionskoeffizient (für die PP1 mit p-Nitrophenylphosphat $13200 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), Δc den Substratumsatz im nmol/mL pro Minute und d die Küvettendicke in mm (hier: $d=10 \text{ mm}$) dar.

Die Aktivität der Enzyme A_{Enzym} [U/min] errechnet sich dabei für die PP1 wie folgt:

$$A_{\text{Enzym}} = \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL} \cdot \text{min}} \right] \cdot f = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot d} \cdot f = \frac{\Delta(A \cdot f)}{13.2} \left[\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right] \quad (11.2)$$

Hierbei ist f ein Korrekturfaktor, in den die Verdünnung der Enzymlösung bei der Aktivitätsbestimmung mit eingeht.

Da die Messgeräte nicht thermostatisierbar waren, mussten die Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Dadurch konnte nur eine Näherung zur Abschätzung der Aktivität durchgeführt werden.

Zur Durchführung der Messungen in Küvetten wurden 5 μL verdünnte Enzymlösung zusammen mit 100 μL TRIS-Puffer PP1-2 und 25 μL BSA Lösung (5 mg/mL) in 670 μL MilliQ-Wasser vermischt. 100 μL einer pNPP Lösung (165 mM) wurden zugegeben und die Messung wurde bei 410 nm durchgeführt. Ein Experiment wurde für die Dauer von 10 min gesetzt, eine Messung dauerte 6 s. Die Verdünnung wurde so gewählt, dass ein deutlicher Anstieg der Absorption gemessen wurde, der Wert 1 jedoch nicht überschritten wurde.

Durch Anlegen einer Gerade an die Messwerte konnte unter Berücksichtigung der Verdünnung nach Gleichung (11.2) die Enzymaktivität berechnet werden.

Um die Autohydrolyse des Substrats zu berücksichtigen, wurden Messungen ohne Enzym durchgeführt und die daraus resultierenden Ergebnisse in die Ergebnisse der Enzymtests eingerechnet.

11.5 Quantifizierung der Inhibitionsexperimente

Zur Quantifizierung wurden die Signalhöhen der Mikrotiterplattenmessungen oder des jeweiligen Bioinhibitionsdetektors, angegeben in Relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) bei Enzymmessungen bzw. Relativen Lumineszenzeinheiten (RLU) bei Messungen mit Leuchtakterien, herangezogen. Um die toxikologischen Effekte zu quantifizieren, wurden verschiedene Auswerteformeln verwendet, je nachdem, ob das Verfahren im Fließsystem oder in der Mikrotiterplatte (MTP) durchgeführt wurde, um die Inhibitionsraten RI , angegeben in der Einheit [%], zu berechnen.

11.5.1 Mikrotiterplattentest

Proteinphosphatase: Bei den Proteinphosphatasen wurde die Berechnung der Inhibitionsrate ähnlich der Berechnung zur Quantifizierung bei online-Tests gemacht. In der MTP konnten bei jeder Messung Referenzwerte generiert werden. Dabei wurden Messungen

durchgeführt, die statt der Zugabe von Analytlösung nur mit dem verwendeten Puffer verdünnt wurden. Aus den so generierten Daten lassen sich die RI-Werte nach folgender Formel berechnen:

$$RI = \left(1 - \frac{PI - HG}{BW - HG}\right) \cdot 100 \quad (11.3)$$

Dabei sind PI die Signalintensität am Peakmaximum, BW die Intensität in den Kontrollansätzen und HG das Hintergrundsignal, das durch Autoprotolyse des Substrates verursacht wird.

Leuchtbakterien: Zur Quantifizierung der toxikologischen Effekte mit den Leuchtbakterien *Vibrio fischeri* bei den Messungen in MTPs wurde eine Methode nach DIN EN ISO 11348-2 [DIN, 1998] verwendet, indem folgende Formeln zur Berechnung der Inhibitionsraten (RI) dienen.

$$RI = \frac{I_{ct} - I_{Tt}}{I_{ct}} \cdot 100 \quad (11.4)$$

Es sind I_{ct} die korrigierte Lumineszenzintensität und I_{Tt} die Lumineszenzintensität der Probe nach der Zeit t . Da die Lumineszenz durch die Verdünnung abnimmt, muss zusätzlich die Leuchtintensität vor der Verdünnung korrigiert werden.

$$I_{ct} = (I_0 \cdot \bar{f}_{kt}) \quad (11.5)$$

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{f_{kt}} \quad (11.6)$$

Hier sind f_{kt} der Korrekturfaktor für die Kontaktzeit t , I_{kt} die Lumineszenzintensität des Kontrollansatzes zur Zeit t , I_0 die Intensität vor der Verdünnung und \bar{f}_{kt} der mittlere Korrekturfaktor.

11.5.2 online-Detektor

In der online-Detektion konnte anders als bei MTP-Tests keine Referenzmessung parallel zur Toxizitätsmessung durchgeführt werden. Somit musste eine andere Berechnung für die Inhibitionsraten herangezogen werden. Zur Anwendung kam in der vorliegenden Arbeit eine modifizierte Methode nach Zhou *et al.* [Zhou, 2006]. Die Werte für die Grundlinien, also nicht-inhibierte Signale, wurden je 0.1 min vor und nach dem Peak genommen. Dabei wurden Mittelwerte aus je 5 Einzelwerten genommen. Durch lineare

Regression konnte durch die resultierende Geradengleichung der theoretische Wert für das nicht-inhibierte Signal zum Zeitpunkt des Peakmaximums (BL) berechnet werden. Die Intensität am Peakmaximum (PI) wurde als gehemmtes Signal genommen. Korrigiert werden mussten beide Werte bei Messungen mit Enzymen um das durch die Autoprotolyse des Substrats verursachte Signal (HG).

$$RI = \left(1 - \frac{PI}{BI}\right) \cdot 100 \quad (11.7)$$

$$RI = \left(1 - \frac{PI - HG}{BI - HG}\right) \cdot 100 \quad (11.8)$$

Dabei gilt die Gleichung (11.7) für die Leuchtbakterien und die Gleichung (11.8) für Enzymmessungen. Die RI-Werte wurden für jede Messung berechnet, anschließend zu einem Mittelwert zusammengefasst und damit die Standardabweichung der einzelnen RI-Werte berechnet.

11.6 Modifikation der *fused-silica* Kapillaren

Zur Inaktivierung der Oberfläche gegenüber Adsorptionseffekten der PP1 α wurden die als Reaktoren verwendeten *fused-silica* Kapillaren auf der Innenseite nach einer modifizierten Vorschrift von Cras *et al.* [Cras, 1999] mit Polyethylenglykol (PEG) beschichtet. Dieses Verfahren ist aus der Herstellung von Biochips auf der Basis von Glasträgern bekannt [Lesaicherre, 2002]. Im Gegensatz zur Chipherstellung mussten die Flüssigkeiten in die Kapillare gepumpt werden. Dies erfolgte mithilfe einer Schlauchpumpe. Der Schlauchinnendurchmesser betrug 0.64 mm, sodass die Kapillare direkt angeschlossen werden konnte, indem sie ein Stück weit in den Schlauch hinein geschoben wurde. Der Fluss wurde auf etwa 0.1 mL/min eingestellt.

Es wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Modifikation getestet: bei einer Methode erfolgte die Aktivierung der Wand im basischen Milieu, bei der anderen im sauren Milieu. In beiden Verfahren wurde als Oberflächenmodifikation Amino-methoxy-PEG (mPEG) zur Verringerung der Adsorption verwendet [Lan, 2005].

11.6.1 Aktivierung der Oberfläche

Die Aktivierung der Oberfläche erfolgte bei Raumtemperatur. Zu Beginn wurde die Kapillare mit einer 2% Hellmanex II Lösung 1 h lang unter Durchfluss gespült und

anschließend über Nacht mit der Lösung stehengelassen. Im Folgenden wurden die Kapillaren mit Wasser gespült. Erst danach erfolgte die Aktivierung der Oberfläche.

Dieses erfolgte bei der basischen Variante über einen Zeitraum von 40 min mit KOH (10%) in Isopropanol im Durchfluss. Bei der Durchführung im sauren Milieu wurde zunächst 1 h lang ein Salzsäure/Methanol-Mischung im Verhältnis 1:1 durch die Kapillare gepumpt, dann 10 min lang mit Wasser gewaschen und anschließend für 1 h lang konzentrierte Schwefelsäure durch die Kapillare geleitet.

Bei beiden Ansätzen wurden die Kapillaren nach der Aktivierung je 20 min lang mit Wasser und Methanol gewaschen und abschließend unter Stickstoffstrom getrocknet.

11.6.2 Modifikation der Oberfläche

Die aktivierte und getrocknete Kapillare wurde zunächst mit 3-(Glycidyloxypropyl)-trimethoxysilan (GOPS) gefüllt. Dann wurde das freie Ende der Kapillare in das freie Ende des Schlauches der Schlauchpumpe gesteckt und somit ein geschlossener Raum erzeugt. Die Kapillarwand wurde für 1 h bei einer Temperatur von 60°C mit GOPS inkubiert. Nachdem die Kapillare auf RT abgekühlt war, wurde im Durchfluss erst 20 min lang mit Ethanol gewaschen und dann mit 5 ml Methanol nachgespült.

Es wurde eine methanolische mPEG-Lösung (0.5 g/mL) hergestellt. Diese wurde über 20 h lang bei RT durch die Kapillare gepumpt. Das nicht an der Oberfläche gebundene mPEG wurde durch Spülen mit 30 mL Methanol aus der Kapillare entfernt.

12 Chromatographische Bedingungen

Bei den in diesem Abschnitt beschriebenen Methoden handelt es sich um optimierte chromatographische Bedingungen, die in der Trennung der entsprechenden Problemstellungen angewandt wurden. Wenn andere Bedingungen gewählt wurden, wird dies an der entsprechenden Stelle im Ergebnisteil angegeben.

12.1 Trennung der Microcystine

Die Trennung erfolgte auf einer HPLC-Anlage der Firma Waters. Das Injektionsvolumen der Analytlösung betrug in der Regel 20 μL , die mithilfe eines integrierten Autosamplers injiziert wurden. Als stationäre Phase kam die RP-Säule Luna C18 der Firma Phenomenex zum Einsatz. Als mobile Phase wurden Wasser und Methanol mit je 0.05% (v/v) TFA verwendet. Der Fluss betrug 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. Die Trennung erfolgte durch Gradiententrennung (siehe Tabelle 12.1) bei 20°C. Um eine bessere Lösungsmitteldurchmischung zu erzielen, wurden beide Laufmittel mit je 10% (v/v) des anderen vorgemischt. Der BID wurde, wenn andere Detektoren zum Einsatz kamen, parallel dazu geschaltet. Im Fall von massenspektrometrischer Detektion wurde jeweils der *Total Ion Count* (TIC) aufgenommen und die entsprechenden Massenspuren zur Analyse extrahiert.

TABELLE 12.1: Lösungsmittelgradient zur Trennung der Microcystine mittels HPLC

Zeit	Mobile Phase A H₂O/MeOH 90/10 mit 0.05% TFA	Mobile Phase B MeOH/H₂O 90/10 mit 0.05% TFA
0min	50%	50%
15 min	0%	100%
17 min	0%	100%
20 min	50%	50%
30 min	50%	50%

12.2 Trennung der Phenole

Zur Trennung der Phenole wurde eine HPLC-Anlage der Firma Waters verwendet. Das Injektionsvolumen der Analytlösung betrug in der Regel 20 μL . Die Injektion erfolgte

mithilfe eines integrierten Autosamplers. Eine Luna C18 Säule der Firma Phenomenex diente als Trennsäule. Die Trennung wurde, wenn nicht anders angegeben, bei einer Temperatur von 60°C durchgeführt. Es wurde mit einem Lösungsmittelgradienten, bei dem Methanol und Wasser zum Einsatz kamen, gearbeitet (Tabelle 12.2). Der Fluss betrug hier ebenfalls 200 µL/min. Das Eluat wurde nach der Trennsäule durch eine in einem Eisbad befindliche Stahlkapillare geleitet und so abgekühlt, um keine thermische Inhibition zu verursachen. Im Regelfall wurde der Fluss im Verhältnis 1:20 aufgeteilt, wobei der kleinere Fluss von ca. 10 µL/min in den BID geleitet wurden. Der Rest wurde zur UV/Vis-Detektion in einen PDA geleitet. Dort erfolgte die Datenaufnahme mit einer Frequenz von 1 Hz. Es wurden Spektren von 200 nm bis 400 nm aufgenommen.

TABELLE 12.2: Lösungsmittelgradient zur Optimierung der HPLC-Bedingungen

Zeit	Mobile Phase A Wasser	Mobile Phase B Methanol
0 min	20%	80%
35 min	40%	60%
36 min	20%	80%
38 min	20%	80%

13 Gassegmentierter Bioinhibitionsdetektor

Zur Messung der unterschiedlichen Zielsubstanzen (Enzyme oder Bakterien) wurden verschiedene Bioinhibitionsdetektoren verwendet. Der genaue Aufbau der Apparaturen für die Messungen mit Enzymen bzw. Leuchtbakterien ist im Ergebnisteil beschrieben. Ein prinzipieller Unterschied beider Detektionssysteme bestanden in der Signalerfassung und die daraus resultierende Auswertung sowie Unterschiede im Aufbau der Fluidik. Generell wurde immer mit einem luftsegmentierten Fluss gearbeitet, um die Diffusion und damit die Bandenverbreiterung zu minimieren. Das Einleiten der Luft über eine Schlauchpumpe erfolgte in der Art, dass die Luftsegmente genauso groß oder bis zu doppelt so groß waren wie die Flüssigkeitssegmente.

13.1 Durchführung der Messungen

13.1.1 online-Verfahren

GFP-Messungen: Diese Messungen wurden durchgeführt, um die Menge an detektiertem PP1 α zu erfassen. Dazu wurde, wenn nicht anders beschrieben, eine Enzymlösung der Konzentration 1 U/mL mit TRIS-Puffer PP1-1 hergestellt. Eventuelle Additive wurden zugegeben. Mithilfe einer Kolbenpumpe wurde die Lösung mit 40 μ L/min in den BID gepumpt und mit 10 μ L/min des HPLC-Eluats (Wasser/Methanol 90/10) versetzt. Gemessen wurde dabei im gassegmentierten Modus. Die Materialien für die Inkubationsschleifen wurden variiert. Zur Anwendung kamen *fused silica* Kapillaren, PEEK Kapillaren und *fused silica* Kapillaren, die wie in Abschnitt 11.6 beschrieben modifiziert wurden. Auf Zugabe des Substrats konnte hier verzichtet werden. Die Detektion erfolgte bei $\lambda_{\text{ex}}=395$ nm und $\lambda_{\text{em}}=509$ nm. Nach der Enzym-Puffer-Mischung wurde mit reinem Puffer nachgespült und mit Hellmanex II Lösung (2%) eventuell adsorbierte Enzyme abgewaschen.

DifMUP-Messungen: Bei der Verwendung der Proteinphosphatase als Target-Struktur musste neben der Enzymlösung auch eine Substratlösung zugeführt werden. Das Eluat aus der HPLC-Trennung wurde aufgeteilt, wobei 10 μ L/min in den BID gelangten. Dieser Strom wurde mit 40 μ L/min einer Enzymlösung (1 U/mL) versetzt, die, wie

Abschnitt 11.2 beschrieben wurde, kurz vor der Messung hergestellt wurde. Anschließend erfolgte die Segmentierung des Flusses mittels Zugabe von Luft. Die Inkubationszeit zur Ausbildung des toxischen Effektes betrug bedingt durch Kapillarlänge und Fließgeschwindigkeit 10 min. Durch ein T-Stück wurde das Substrat (10 mM) mit einer Geschwindigkeit von 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ eingespritzt. Nach 10 min Inkubation mit dem Substrat erfolgte nach Abtrennung der Luftblasen die Detektion durch einen Fluoreszenzdetektor mit $\lambda_{\text{ex}}=358\text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}}=455\text{ nm}$.

Leuchtbakterien *Vibrio fischeri*: Die jeweils wie oben beschrieben frisch hergestellte Bakteriensuspension (ca. $3.75 \cdot 10^8$ Zellen/mL) wurde mit einer Spritzenpumpe mit 110 $\mu\text{L}/\text{min}$ durch den BID gepumpt. Das Eluat aus der HPLC wurde, wenn es nicht anders angegeben ist, mit 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ zu der Bakteriensuspension geleitet. Der Eintrag der Luft zur Flusssegmentierung erfolgte mit ca. 60 $\mu\text{L}/\text{min}$. Nach 5.6 min Inkubationszeit erfolgte die Messung mit einem Biolumineszenzdetektor.

Bei Messungen des Flusses mit dem Flusssensor wurden diese Daten in der Art modifiziert, dass die Zeiten an den BID angeglichen wurden, indem die Totzeit des BID addiert wurde.

13.1.2 offline-Verfahren

Wie bereits in Abschnitt 7.1.2 erörtert wurde, zeigten sich unter der Verwendung der PP1 α bandenverbreiternde Effekte. In einem offline-System sollte dies unter möglichst einfachen Bedingungen überprüft werden, um eventuelle Nebeneffekte zu minimieren oder gar auszuschließen.

Diese Effekte wurden für *fused silica* Kapillaren mit 530 μm Innendurchmesser und PEEK-Kapillaren mit dem Innendurchmesser von 500 μm untersucht. Die Länge betrug in beiden Fällen 4 m, was bei *fused silica* Kapillaren einem Volumen von 880 μL und bei PEEK-Kapillaren einem Volumen von 780 μL entsprach.

Adsorption von PP1 α : Durch eine Kapillare wurden die Lösungen mithilfe einer Spritzenpumpe gepumpt. Die verwendeten Puffer waren zum einen der reine TRIS-Puffer PP1-1, zum anderen der in Abschnitt 11.2 beschriebene, mit BSA und Pluronic F68 modifizierte Puffer.

Nach Spülen mit wässriger Hellmanex II Lösung (2%) und Nachwaschen mit einem der Puffer wurde die *fused silica* Kapillare mithilfe der Spritzenpumpe zuerst mit 400 μL

Pufferlösung befüllt, die PEEK-Kapillare mit 200 μL . Anschließend wurde in beide Kapillartypen 40 μL an Enzymlösung eingepumpt. Die Elution erfolgte mit einem konstanten Fluss von 0.1 mL/min. Zuerst wurde mit ca. 1.4 mL (*fused silica* Kapillare) bzw. 2.2 mL (PEEK-Kapillare) des zur Verdünnung der Enzyme verwendeten Puffers und anschließend mit Hellmanex II Lösung (2%) gespült. Fraktionen zu je 200 μL wurden in je einer Kavität einer MTP aufgefangen. Die Detektion des Enzyms erfolgte anschließend mit einem Mikrotiterplattenlesegerät bei $\lambda_{\text{ex}}=395$ nm und $\lambda_{\text{em}}=509$ nm.

Adsorption von Microcystinen: Zur Untersuchung der Adsorptionseffekte von Microcystinen auf der Kapillarwand der Inkubationsreaktoren wurde derselbe Aufbau wie oben beschrieben verwendet.

Nach dem Spülen der Kapillare mit Methanol und anschließend mit Wasser wurden mittels der Spritzenpumpe zuerst 60 μL Toxin (MC-LR, 100 ng/L) eingebracht. Die Elution erfolgte mit einer MeOH-Wasser-Mischung (10/90 v/v) bei gleichbleibendem Fluss (100 $\mu\text{L}/\text{min}$ bzw. 50 $\mu\text{L}/\text{min}$) durch eine Spritzenpumpe. In einer MTP wurden je 20 μL des Eluates in einer Kavität gesammelt. Die erhaltenen Fraktionen wurden mithilfe einer Multikanalpipette mit 80 μL Enzymlösung versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Nach anschließender Zugabe von je 1 μL DifMUP Lösung (10 μM) wurden nach 5s schütteln auf einem Schüttler und 10 min Inkubationszeit die Fluoreszenzsignale mit einem Mikrotiterplattenlesegerät bei $\lambda_{\text{ex}}=358$ nm und $\lambda_{\text{em}}=455$ nm gemessen.

13.1.3 Fließinjektionsanalyse

Proteinphosphatase: Bei Messungen mit Fließinjektionsanalyse erfolgte die Injektion der Analyten manuell mithilfe eines Sechs-Wege-Ventils. Als Probenschleife wurde eine PEEK-Kapillare mit einem Volumen von 5 μL eingesetzt.

Die Messungen mit Enzymen wurden genauso durchgeführt, wie in den online-Verfahren beschrieben. Der Fluss durch das Ventil betrug 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ und wurde 1 min lang durch die Probenschleife geleitet. Als Lösungsmittel wurde, wenn nicht anders angegeben, eine MeOH-Wasser-Mischung (10/90 v/v) mit 0.005% TFA verwendet. In der Zeit nach der Injektion, bei der der Fluß nicht durch die Probenschleife geleitet wurde, wurde die Schleife mit 500 μL MeOH und 200 μL des MeOH-Wasser-Gemisches gespült, um adsorbierte Analyten aus der Probenschleife zu entfernen.

Zur Bestimmung der Formen der Injektionspeaks wurde das Injektionsventil direkt mit 5 cm Kapillare (I.D. 0.16 mm) an den Eingang des Massenspektrometers gekoppelt. Die Datenaufzeichnung erfolgte im TIC-Modus. Zur Auswertung wurden die entsprechenden Massenspuren extrahiert. Bei der Integration der Peaks wurde ebenfalls die einzelne Massenspur verwendet.

Leuchtbakterien: Mit einer 10-mL-Spritze wurde die vor jeder Messung frisch hergestellte Bakteriensuspension mit einer Geschwindigkeit von 110 $\mu\text{L}/\text{min}$ durch das BID-System gepumpt, welches auf 21°C temperiert war. Die Injektion der Proben erfolgte über ein Sechs-Wege-Ventil mit einer 20 μL Probenschleife. Der Fluss durch das Ventil betrug 40 $\mu\text{L}/\text{min}$, als Lösungsmittel wurde HEPES-Puffer mit 10% Methanol verwendet. Die Injektionen erfolgten in Serien von je vier Injektionen. Innerhalb einer Serie erfolgten die einzelnen Injektionen alle 76 s, zwischen den Serien lagen je 252 s. Beide Flüsse wurden über ein T-Stück zusammengeführt. Über ein weiteres T-Stück fand der Lufteintrag zur Segmentierung statt. Die Inkubationszeit der Leuchtbakterien mit den Analyten betrug 5.6 min. Die Detektion erfolgte hier mit dem umgebauten Lumineszenzdetektor mit einer Flusszelle von 68 mm (13.4 μL).

13.2 Signalauswertung mit Proteinphosphatase

Da das Prinzip bei den Messungen mit PP1 α darauf beruhte, die Inhibition des Enzyms zu detektieren, wurden als Messsignale negative Peaks registriert und aufgezeichnet. Eine Integration über eine konventionelle Chromatographie-Software (z. B. Chromstar, MassLynx 4.1) war nicht möglich. Allerdings bestand die Möglichkeit, mithilfe von Origin 7G und der darin enthaltenen Peak-Fitting-Module zu arbeiten. Es war jedoch schwierig anzuwenden, da die Anpassung der negativen Pulse mit einer Funktion zu aufwendig gewesen wären. Des Weiteren waren die Peakformen aufgrund der Enzymkinetik und adsorptiven Effekten nicht gaußförmig.

Als Messgröße wurde daher die Differenz in der Signalintensität zwischen Basislinie und Peakminimum herangezogen. Als Korrektur musste die Signalintensität einberechnet werden, die durch die Autohydrolyse des Substrates verursacht wurde. Dazu wurden Messungen ohne Zugabe von Analyten und Enzym durchgeführt, um den entsprechenden Mittelwert zu ermitteln.

Um die Chromatogramme von BID und Massenspektrometer korrelieren zu können, musste der Unterschied in den Retentionszeiten zwischen beiden Spuren ermittelt werden. Hierzu wurde ein bekannter starker Inhibitor chromatographisch untersucht und die Bruttoretentionszeiten beider Detektoren miteinander verglichen und der Unterschied errechnet. Die Zeiten des BID wurden durch Subtraktion der errechneten Differenz korrigiert und so den Signalen des MS gleichgerichtet.

Die Aufzeichnung der einzelnen Datensätze erfolgte mit unterschiedlicher Software: Die BID-Daten wurden mit dem Programm Chromstar aufgenommen, die Daten des PDA wurden von MassLynx 4.1 aufgezeichnet. Die Werte wurden exportiert und in Origin 7G bearbeitet. Dabei wurden die Chromatogramme dahingehend verändert, dass die Zeitskala des BID an die des PDAs angepasst wurde, um korrespondierende Peaks besser identifizieren zu können.

13.3 Signalauswertung mit Leuchtbakterien

Auch bei den Toxizitätstests mit den Leuchtbakterien waren die Signale bei der Detektion der Analyten negativ. Somit wurde auch hier auf die Signaldifferenz zwischen Peakminimum und Basislinie zurückgegriffen. Die Intensität des Hintergrundleuchtens wurde dabei ebenfalls bei der Berechnung des Signal berücksichtigt.

Die Datenaufzeichnung mit dem BID erfolgte durch eine in den Detektor integrierte Software, die die Daten als Excel-Datei ausgab. Die Daten aus dem PDA wurden mit Masslynx 4.1 aufgezeichnet. Eine Bearbeitung der Chromatogramme erfolgte mit dem Programm Origin 7G. Eine Modifikation wurde dahingehend vorgenommen, dass die Zeitskalen von PDA und BID angeglichen wurden. Dazu wurden Messungen mit einer inhibitorischen Substanz vorgenommen. Die zeitliche Differenz der dadurch verursachten Signale in beiden Detektoren wurde als Offset verwendet. Durch die Korrektur der Zeit im BID konnten die Chromatogramme übereinandergelegt und miteinander verglichen werden.

Teil VI

Anhang



14 Abkürzungen

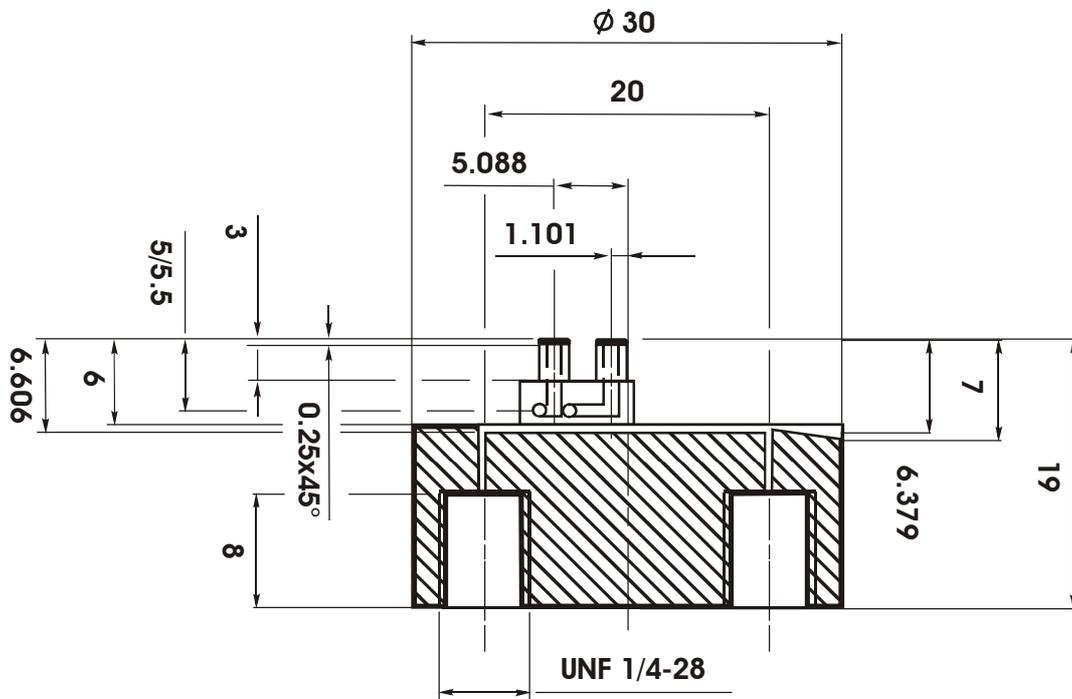
AChE	Acetylcholinesterase
AHL	N-Acyl-L-homoserinlacton
BSA	Bovin serum albumin
BID	Bioinhibitionsdetektor
BLIA	<i>Bioresponse-linked instrumental analysis</i>
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CE	<i>Capillary electrophoresis</i> (=Kapillarelektrophorese)
cts	Counts
DifMUP	6,8-Difluoro-4-methyl-umbelliferylphosphat
DOC	Dissolved organic carbon
DTT	1,4-Dimercaptobutan-2,3-diol
EC ₅₀	Effektive Konzentration, bei der 50% der Testorganismen einen Effekt zeigen
EDA	<i>Effect-directed analysis</i>
ESI	<i>Electrospray Ionisation</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FDP	Fluoresceindiphosphat
FEP	Perfluorethylenpropylen-Copolymer
FIA	Fließinjektionsanalyse
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> , Grün-fluoreszierendes Protein
GOPS	3-(Glycidylxypropyl)-trimethoxysilan
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC ₅₀	Testmittelpunkt sigmoidaler Kalibrierkurven; entspricht 50% Inhibition
I.D.	Innendurchmesser
IMER	<i>Immobilized Enzyme Reactor</i>
IT-MS	<i>Ion Trap Mass Spectrometry</i>
LC	Flüssigkeitschromatographie
LOD	<i>Limit of Detection</i> (=Nachweisgrenze)
m	Anzahl der Punkte für einen Graphen

MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
MC-LF	Microcystin LF
MC-LR	Microcystin LR
MeOH	Methanol
mPEG	α -Amino-o-methoxy-polyethylenglycol
MS	Massenspektrometer
MTP	Mikrotiterplatte
MUP	4-Methyl-umbelliferylphosphat
n	Anzahl der Messungen für einen Punkt eines Graphen
PDA	Photodiodenarray
PEEK	Polyetheretherketon
PEG	Polyethylenglycol
PHOPA	<i>para</i> -Hydroxyphenyllessigsäure
pNPP	4-Nitrophenylphosphat
PP	Proteinphosphatase
PP1	Proteinphosphatase 1
RAD	Rezeptor-Affinitätsdetektor
RFU	Relative Fluorescence Units
RLU	Relative Luminescence Units
RP	<i>Reversed Phase</i> (=Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (=Festphasenextraktion)
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	<i>Total Ion Count</i>
TIE	<i>Toxicity Identification Evaluation</i>
TOF	<i>Time of Flight</i> (Flugzeitanalysator)
TRIS	Tris(4-hydroxymethyl)-methylamin
WBA	Wirkungsbezogene Analytik

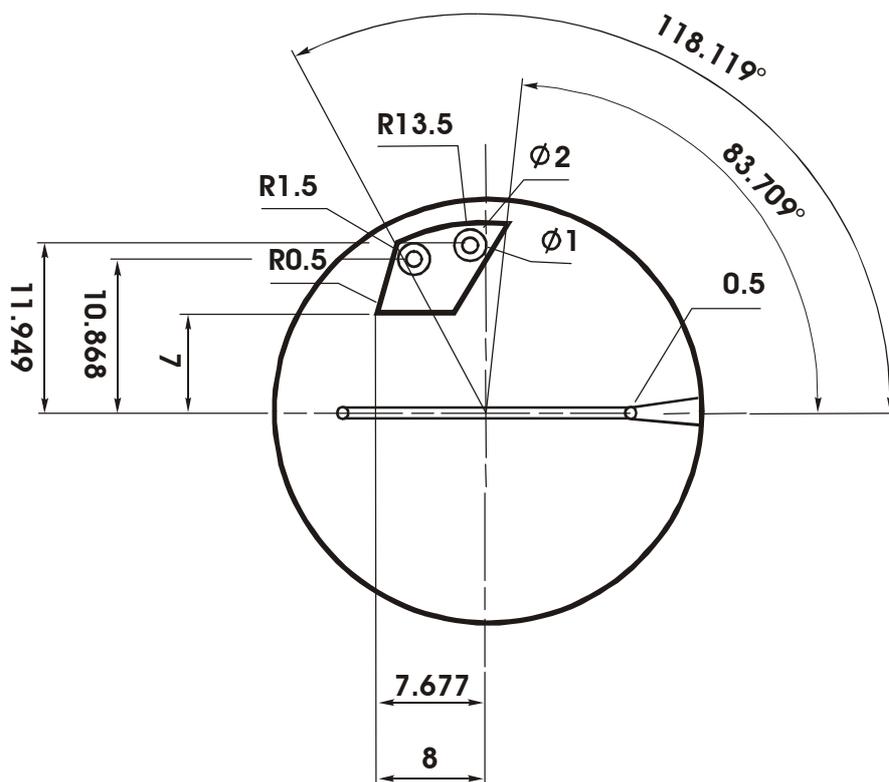
15 Technische Zeichnungen

Blasenfilter zur Entfernung von Luftblasen bei gasegmentiertem Fluss mit Fluoreszenzdetektion

Seitenansicht

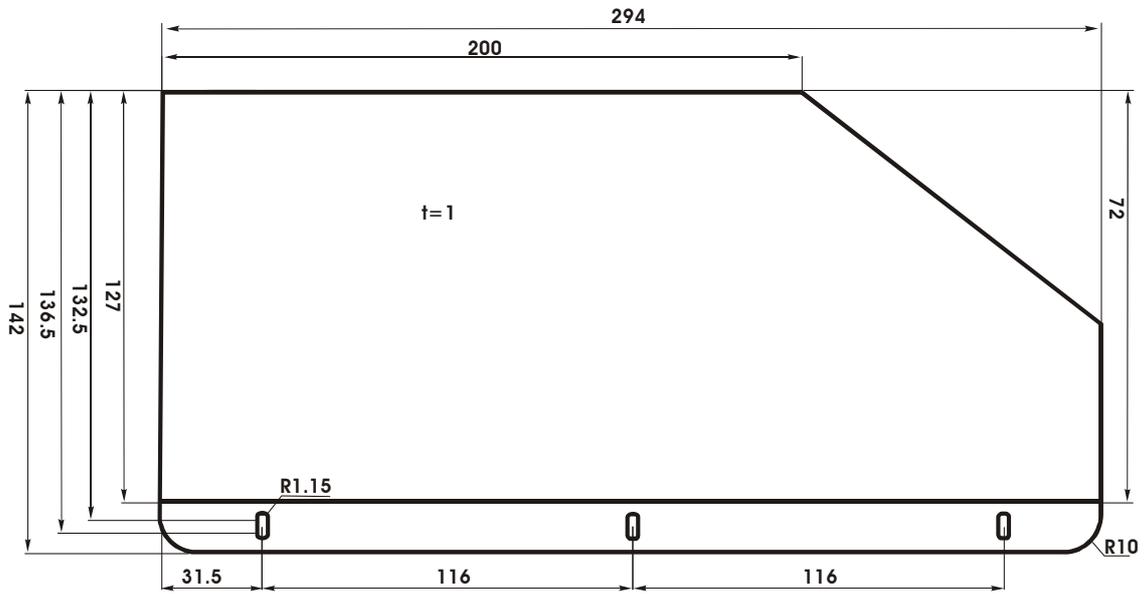


Draufsicht

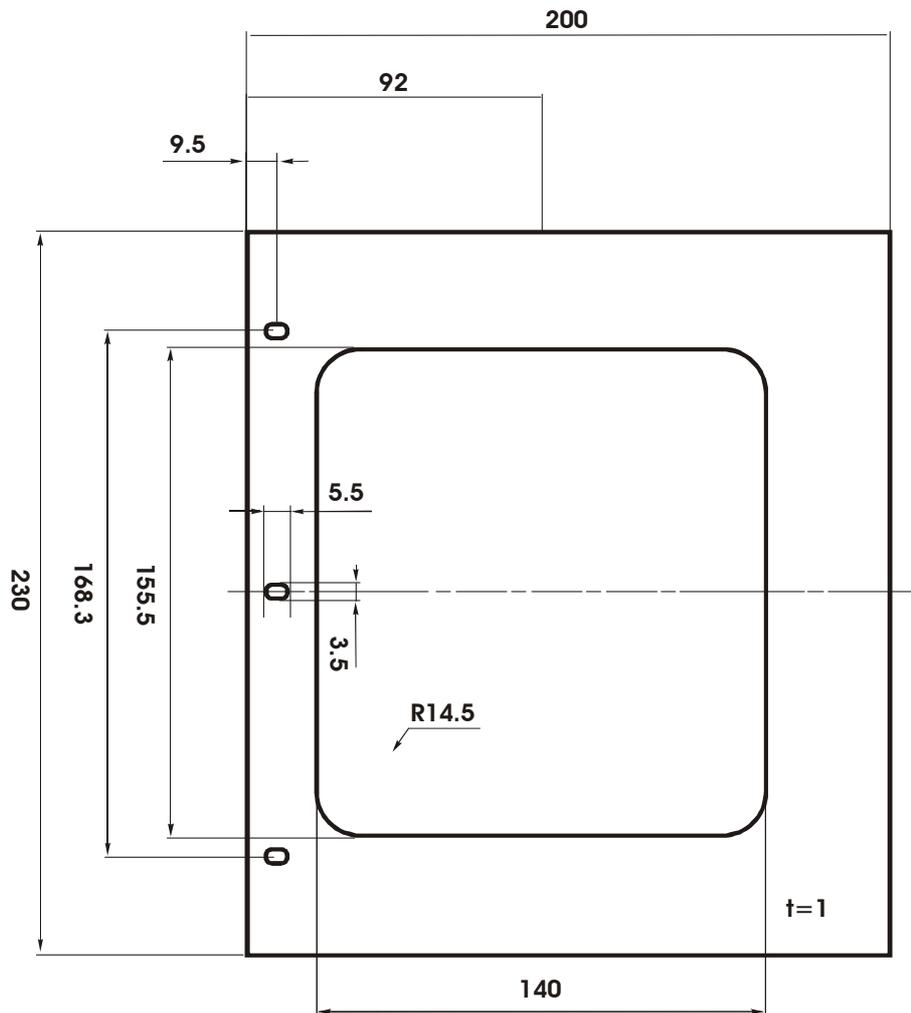


Umbau des Gehäuses für den Luminometrischen Detektor

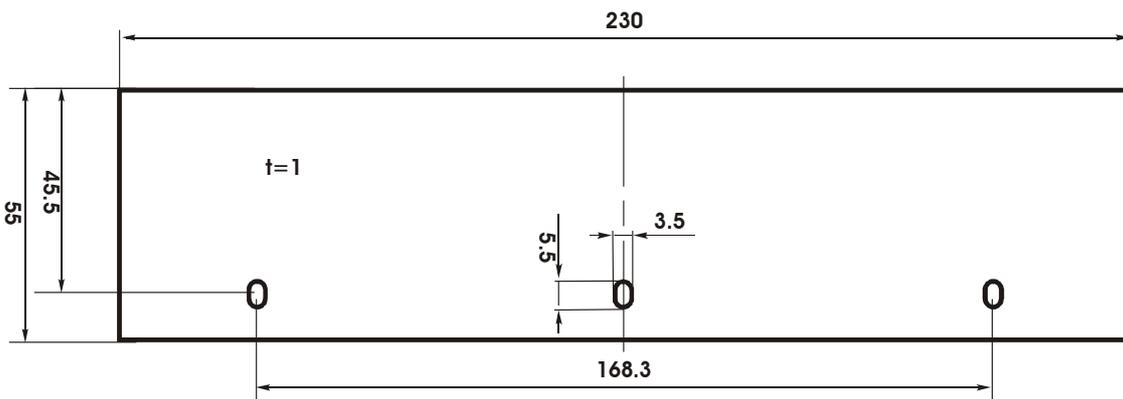
Seitenplatten



Oberteil

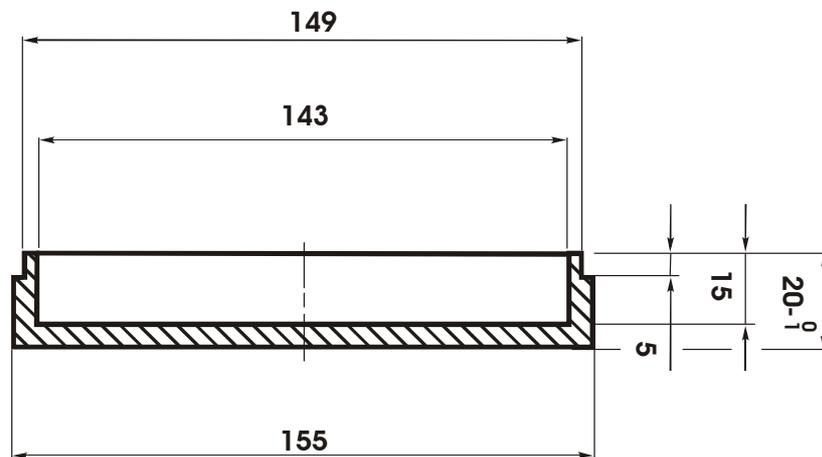


Frontteil

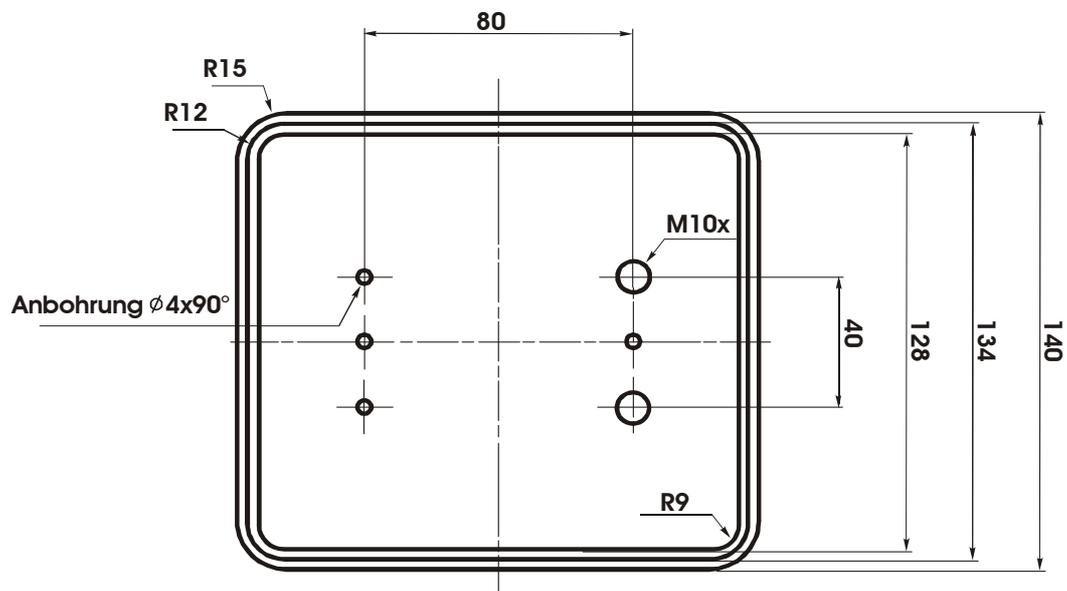


Deckel des umgebauten luminometrischen Detektors

Seitenansicht

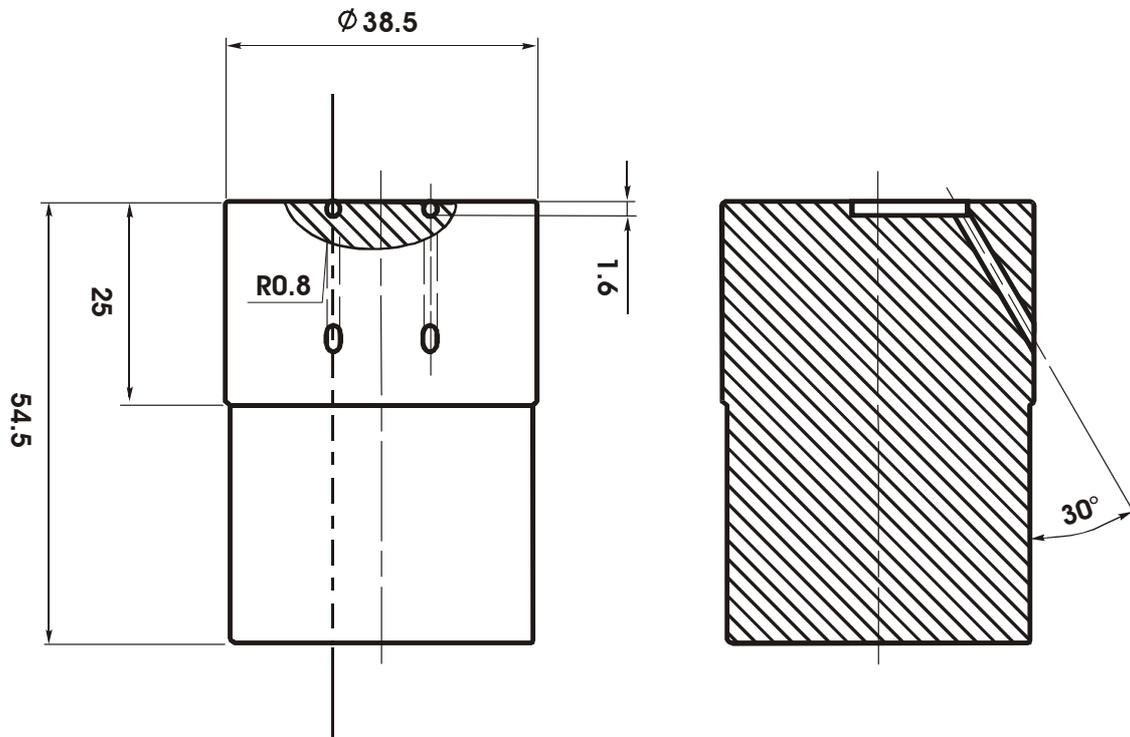


Draufsicht

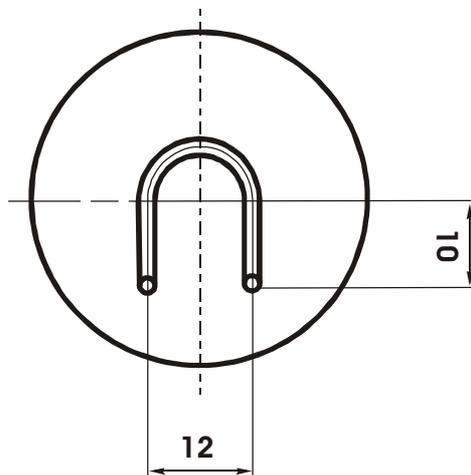


Flusszellenhalter (23 mm Länge)

Seitenansicht

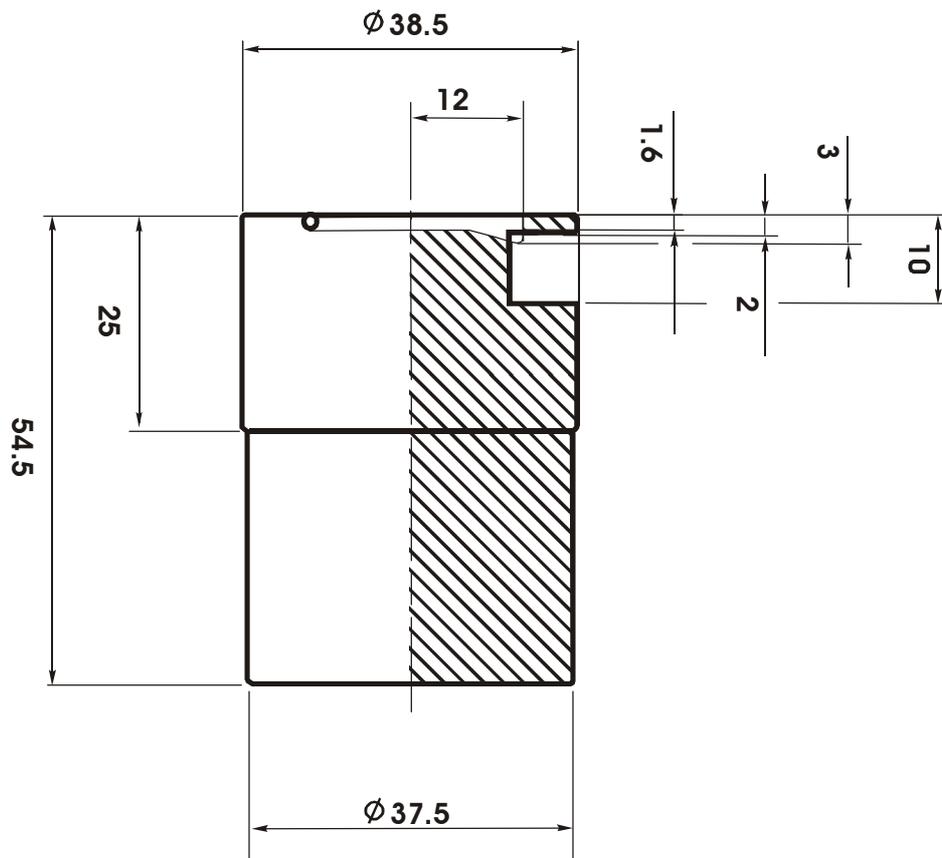


Draufsicht

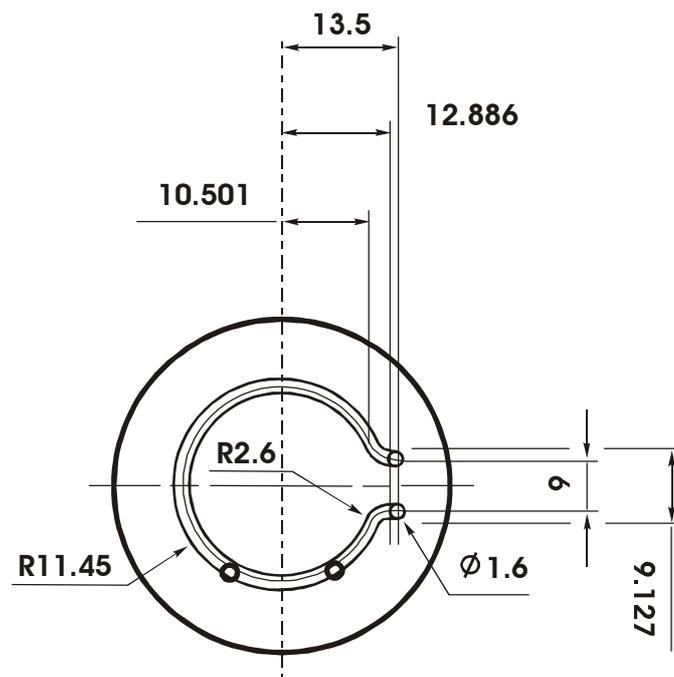


Flusszellhalter (68 mm Länge)

Seitenansicht



Draufsicht



16 Literaturverzeichnis

- Aguete**, E. C., Gago-Martínez, A., Leão, J. M., Rodríguez-Vázquez, J. A., Menàrd, C., Lawrence J. F., *HPLC and HPCE analysis of microcystins RR, LR and YR present in cyanobacteria and water by using immunoaffinity extraction*, *Talanta*, **2003**, 59, 697-705.
- Ahmed**, B., Barrow, D., Wirth, T., *Enhancement of reaction rates by segmented fluid flow in capillary scale reactors*, *Adv. Synth. Catal.*, **2006**, 348, 1043-1048.
- Altenburger**, R., Nendza, M., Schüürmann, G., *Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships*, *Environ. Toxicol. Chem.*, **2003**, 22, 1900-1915.
- Altenburger**, R., Walter, H., Grote, M., *What contributes to the combined effect of a complex mixture?*, *Environ. Sci. Technol.*, **2004**, 38, 6353-6362.
- Amine**, A., Mohammadia, H., Bourais, I., Palleschi G., *Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring*, *Biosens. Bioelectron.*, **2006**, 1408-1423.
- Ankley**, G. T., Schubauer-Berigan, M. K., *Background and overview of current sediment toxicity identification evaluation procedures*, *J. Aquat. Ecosyst. Health*, **1995**, 4, 133-149.
- Apffel**, J. A., Brinkman, U. T. A., Frei, R. W., *Design and application of a post-column extraction system compatible with miniaturized liquid-chromatography*, *Chromatographia*, **1984**, 18, 5-10.
- Artinger**, R., Buckau, G., Geyer, S., Fritz, P., Wolf M., , Kim, J. I., *Characterization of groundwater humic substances: influence of sedimentary organic carbon*, *Appl. Geochem.*, **2000**, 15, 97-116.
- Baeumner**, A. J., *Biosensors for environmental pollutants and food contaminants*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, 377, 434-445.
- Bean**, S. R., Lookhart, G. L., *Faster capillary electrophoresis separation of wheat proteins through modifications to buffer composition and sample handling*, *Electrophoresis*, **1998**, 19, 3190-3198.
- Belknap**, A. M., Solomon, K. R., Maclatchy, D. L., Dubé, M. G., Hewitt, L. M., *Identification of compounds associated with testosterone depression in fish exposed to bleached kraft pulp an paper mill chemical recovery condensates*, *Environ. Toxicol. Chem.*, **2006**, 25, 2322-2333.

Bendriaa, L., Picart, P., Daniel, P., Horry, H., Durand, M.-J., Thouand, G., *Versatile device for on-line and in-situ measurement of growth and light production of bioluminescent cells*, Sens. Actuator B - Chem., **2004**, 103, 115-121.

Berg, H. C., *Random walks in biology*, Princeton University Press, Princeton, **1993**.

Bialojan, C., Takai, A., *Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases specificity and kinetics*, Biochem. J., **1988**, 256, 283-290.

Bilitewski, U., Brenner-Weiß, G., Hansen, P.-D., Hock, B., Meulenber, E., Müller, G., Obst, U., Sauerwein, H., Scheller, F. W., Schmid, R., Schanbl, G., Spener, F., *Bioresponse-linked instrumental analysis*, Trac - Trends Anal. Chem., **2000**, 19, 428-433.

Bilitewski, U., Genrich, M., Kadow, S., Mersal, G., *Biochemical analysis with microfluidic systems*, Anal. Bioanal. Chem., **2003**, 377, 556-569.

Bílková, Z., Slováková, M., Lycka, A., Horák, D., Lenfeld, J., Turková, J., Churáček, J., *Oriented immobilization of galactose oxidase to bead and magnetic bead cellulose and poly(HEMA-co-EDMA) and magnetic poly(HEMA-co-EDMA) microspheres*, J. Chromatogr. B., **2002**, 770, 25-34.

Blom, J. F., Jüttner, F., *High crustacean toxicity of microcystin congeners does not correlate with high protein phosphatase inhibitory activity*, Toxicon, **2005**, 46, 465-470.

Boettcher, K. J., Ruby, E. G., *Detection and quantification of Vibrio fischeri autoinducer from symbiotic squid light organs*, J. Bacteriol., **1995**, 177, 1053-1058.

Boos, K.-S., Grimm, C.-H., *High-performance liquid chromatography integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packings*, Trac - Trends Anal. Chem., **1999**, 18, 175-180.

Bossi, A., Piletsky, S. A., Righetti, P. G., Turner, A. P. F., *Capillary electrophoresis coupled to biosensor detection*, J. Chromatogr. A., **2000**, 892, 143-153.

Bourgois, J.-J., Sluse, F. E., Baguet, F., Mallefet, J., *Kinetics of light emission and oxygen consumption by bioluminescent bacteria*, J. Bioenerg. Biomembr., **2001**, 4, 353-363.

Brack, W., Altenburger, R., Ensenbach, U., Möder, M., Segner, H., Schüürmann, G., *Bioassay-directed identification of organic toxicants in river sediment in the industrial region of Bitterfeld (Germany) – a contribution to hazard assessment*, Arch. Environ. Contam. Toxicol., **1999**, 37, 164-174.

Brack, W., *Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures?*, Anal. Bioanal. Chem., **2003**, 377, 397-404.

Brack, W., *Wirkungsorientierte Analytik komplexer Mischungen Erfahrungen aus der Umwelt- und Ökotoxikologie für die Lebensmitteluntersuchung*, J. Verbr. Lebensm., **2006**, 1, 301-309.

Brack, W., Schmitt-Jansen, M., Machala, M., Brix, R., Barceló, D., Schymanski, E., Streck, G., Schulze T., *How to confirm identified toxicants in effect-directed analysis*, Anal. Bioanal. Chem., **2008**, 390, 1959-1973.

Brautigam, D. L., Shriner, C. L., *Methods to distinguish various types of protein phosphatase activity*, Methods Enzymol., **1988**, 159, 339-347.

Brenner-Weiß, G., Obst, U., *Approaches to bioresponse-linked instrumental analysis in water analysis*, Anal. Bioanal. Chem., **2003**, 377, 408-416.

Brinkman, U. A. T., *A review of reaction detection in HPLC*, Chromatographia, 1987, 24, 190-200.

Buikema, A. L., Niederlehner, B. R., Cairns Jr., J., *Biological monitoring part IV - Toxicity testing*, Water Res., **1982**, 16, 239-262.

Cammann, K. (Hrsg.), *Instrumentelle Analytische Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2001**.

Carmichael, W. W., Beasley, V., Bunner, D. L., Eloff, J. N., Falconer, I., Gorham, P., Harada, K.-I., Krishnamurthy, T., Min-Juan, Y., Moore, R. E., Rinehart, K., Runnegar, M., Skulberg, O. M., Watanabe, M., *Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae)*, Toxicon, **1988**, 26, 971-973.

Carmichael, W. W., An, J., *Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins*, Nat. Toxins, **1999**, 7, 377-385.

Carr, R. S., Nipper, M., Biedenbach, J. M., Hooten, R. L., Miller, K., Saepoff, S., *Sediment toxicity identification evaluation (TIE) studies at marine sites suspected of ordnance contamination*, Arch. Environ. Contam. Toxicol., **2001**, 41, 298-307.

Cerdà, V., Estela, J. M., Forteza, R., Cladera, A., Becerra, E., Altimira, P., Sitjar, P., *Flow techniques in water analysis*, Talanta, **1999**, 50, 695-705.

Chapman, P. M., Wang, F., Germano, J. D., Batley, G., *Pore water testing and analysis: The good, the bad, and the ugly*, Mar. Pollut. Bull., **2002**, 44, 359-366.

Chelikani, P., Fita, I., Loewena, P. C., *Diversity of structures and properties among catalases*, Cell. Mol. Life Sci., **2004**, 61, 192-208.

Christen, P., Jaussi, R., *Biochemie*, Springer-Verlag, Heidelberg, **2005**.

Choi, S. H., Gu, M. B., *Toxicity biomonitoring of degradation byproducts using freeze-dried recombinant bioluminescent bacteria*, Anal. Chim. Acta, **2003**, 229-238.

Clotet, J., Posas, F., Hu, G-Z, Ronne, H., Ariño, J., *Role of protein phosphatase 2A in the control of glycogen metabolism in yeast*, Eur. J. Biochem., **1995**, 229, 207-214.

Codd, G. A., *Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control*, Ecol. Eng., **2000**, 16, 51-60.

Cohen, P., *The structure and regulation of protein phosphatases*, Annu. Rev. Biochem., **1989**, 58, 453-508.

Cohen, P T. W., *Protein phosphatase 1 – targeted in many directions*, J. Cell Sci., **2002**, 115, 241-256.

Connor, M. P., Wang, J., Kubiak, W., Smyth, M. R., *Tissue- and microbe-based electrochemical detectors for liquid chromatography*, Anal. Chim. Acta, **1990**, 229, 139-143.

Cras, J. J., Rowe-Taitt, C. A., Nivens, D. A., Ligler, F. S., *Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization*, Biosens. Bioelectron., **1999**, 14, 683-688.

Craig, M., Luu, H. A., McCreedy, T. L., Williams, D., Andersen, R. J., Holmes, C. F. B., *Molecular mechanism underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type 2A protein phosphatase*, Biochem. Cell Biol., **1996**, 74, 569-578.

Cronin, M. T. D., Schultz, T. W., *Structure-toxicity relationships for three mechanisms of action of toxicity to *Vibrio fischeri**, Ecotox. Environ. Safe., **1998**, 39, 56-69.

Culleré, L., Escudero, A., Cacho, J., Ferreira, V., *Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality spanish aged red wines*, J. Agric. Food Chem., **2004**, 52, 1653-1660.

de Boer, A. R., Alcaide-Hidalgo, J. M., Krabbe, J. G., Kolkman, J., van Emde Boas, C. N., Niessen, W. M. A., Lingeman, H., Irth, H., *High-temperature liquid chromatography coupled on-line to a continuous-flow biochemical screening assay with electrospray ionization mass spectrometric detection*, Anal. Chem., **2005**, 77, 7894-7900.

de Castro, M. D. L., Herrera, M. C., *Enzyme inhibition-based biosensors and biosensing systems: questionable analytical devices*, Biosens. Bioelectron., **2003**, 18, 279-294.

de Jong, L. L. A., Uges, D. R. A., Franke, J. P., Bischoff, R., *Receptor–ligand binding assays: Technologies and Applications*, J. Chromatogr. B, **2005**, 829, 1-25.

-
- de Jong**, C. F., Derks, R. J. E., Bruyneel, B., Niessen, W., Irth, H., *High-performance liquid chromatography–mass spectrometry-based acetylcholinesterase assay for the screening of inhibitors in natural extracts*, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1112, 303-310.
- Deelder**, R. S., Kroll, M. G. F., Beeren, J. B., van den Berg, J. H. M., *Post-column reactor systems in liquid-chromatography*, *J. Chromatogr.*, **1978**, 149, 669-682.
- Deelder**, R. S., Kuijpers, A. T. J. M., van den Berg, J. H. M., *Evaluation and comparison of reaction detectors*, *J. Chromatogr.*, **1983**, 255, 545-561.
- DeLuca**, M., Kricka, L. J., McElroy, W. D., *Analytical applications of bioluminescence*, *Trac - Trends Anal. Chem.*, **1982**, 1, 225-228.
- Dickens**, J. C., *Predator-prey interactions: Olfactory adaptations of generalist and specialist predators*, *Agric. For. Entomol.*, **1999** 1, 47–54.
- DIN EN ISO 11348-3**, *Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientests)*, **1998**, Wiley-VCH, Weinheim.
- Doe**, K. G., Ernst, W. R., Parker, W. R., Julien, G. R. J., Hennigar, P. A., *Influence of pH on the acute lethality of fenitrothion, 2,4-D, and aminocarb and some pH-altered sublethal effects of aminocarb on rainbow trout (*Salmo gairdneri*)*, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **1988**, 45, 287-293.
- Donkin**, P., Smith, E. L., Rowland, S. J., *Toxic effects of unresolved complex mixtures of aromatic hydrocarbons accumulated by mussels, *Mytilus edulis*, from contaminated field sites*, *Environ. Sci. Technol.*, **2003**, 37, 4825-4830.
- duBell**, W. H., Rogers, T. B., *Protein phosphatase 1 and an opposing protein kinase regulate steady-state L-type Ca^{2+} current in mouse cardiac myocytes*, *J. Physiol.*, **2004**, 556, 79-93.
- Dummann**, G., Quittmann, U, Gröschel, L, Agar, D. W., Wörz, O., Morgenschweis, K., *The capillary-microreactor: A new reactor concept for the intensification of heat and mass transfer in liquid–liquid reactions*, *Catal. Today*, **2003**, 79-80, 433-439.
- Dunlap**, P. V., Greenberg, E. P., *Control of *Vibrio fischeri* lux gene transcription by a cyclic AMP receptor protein-luxR protein regulatory circuit*, *J. Bacteriol.*, **1988**, 170, 4040-4046.
- Dunlap**, P. V., *Regulation of luminescence by cyclic AMP in cya-like and crp-like mutants of *Vibrio fischeri**, *J. Bacteriol.*, **1989**, 171, 1199-1202.

- Dunlap**, P. V., Kuo, A., *Cell Density-dependent modulation of the Vibrio fischeri luminescence system in the absence of autoinducer and luxR protein*, J. Bacteriol., **1992**, 174, 2440-2448.
- Edwards**, J. L., Bauman, R., Spence, D. M., *Air segmented continuous flow analysis in microbore tubing*, Anal. Chim. Acta, **1999**, 401, 209-214.
- Ellis**, R. J., Wright, A. G., *Optimal use of photomultipliers for chemiluminescence and bioluminescence applications*, Luminescence, **1999**, 14, 11-18.
- Emnéus**, J., Marko-Varga, G., *Biospecific detection in liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, **1995**, 703, 191-243.
- Engelhardt**, H., Neue, U. D., *Reaction detector with three dimensional coiled open tubes in HPLC*, Chromatographia, **1982**, 15, 403-408.
- Engelhardt**, H., Beck, W., Kohr, J., Schmitt, T., *Capillary electrophoresis: methods and scope*, Angew. Chem. Int. Edit., **1993a**, 32, 629-649.
- Engelhardt**, H., Meister, J., Kolla, P., *Optimisation of post-column reaction detector for HPLC of explosives*, Chromatographia, **1993b**, 35, 5-12.
- Ernst**, V., Levin, D., Foulkes, J. G., London, I. M., *Effects of skeletal muscle protein phosphatase inhibitor-2 on protein synthesis and protein phosphorylation in rabbit reticulocyte lysates*, Proc. Natl. Acad. Sci., **1982**, 79, 7092-7096.
- Fabel**, S., *Online-Enzyminhibitionsdetektor für die Wirkungsbezogene Analyse von Toxinen*, Dissertation, Technische Universität München, **2007**.
- Falconer**, I. R., *Is there a human health hazard from microcystins in the drinking water supply?*, Acta Hydrochim. Hydrobiol., **2005**, 33, 64-71.
- Faming**, Z., Kobe, B., Stewartffi, C.-B., Rutter, W. J., Goldsmith, E. J., *Structural Evolution of an Enzyme Specificity, The structure of rat carboxypeptidase A2 at 1.9-Å resolution*, J. Biol. Chem., **1991**, 266, 24606-24612.
- Farré**, M., Klöter, G., Petrovic, M., Alonso, M. C., López de Alda, M. D., Barceló, D., *Identification of toxic compounds in wastewater treatment plants during a field experiment*, Anal. Chim. Acta, **2002**, 456, 19-30.
- Farré**, M., Barceló, D., *Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis*, Trac - Trends Anal. Chem., **2003**, 22, 299-310.
- Fastner**, J., Erhard, M., Carmichael, W. W., Sun, F., Rinehart, K. L., Rönicke, H., Chorus, I., *Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the*

genera microcystis and planktothrix from german freshwaters, Arch. Hydrobiol., **1999**, 2, 147-63.

Fawell, J. K., Mitchell, R. E., Everett, D. J., Hill, R. E., *The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin-LR*, Human Exp. Toxicol., **1999**, 18, 162-167.

Feuillade, J., *Les toxines des cyanobactéries: revue de synthèse*, Rev. Sci. Eau, **1992**, 489-508.

Fiehn, O., Vigelahn, L., Kalnowski, G., Reemtsma, T., Jekel, M., *Toxicity-directed fractionation of tannery wastewater using solid-phase extraction and luminescence inhibition in microtiter plates*, Acta Hydrochim. Hydrobiol., **1997**, 25, 11-16.

Fishman, H. A., Orwar, O., Allbritton, N. L., Modi, B. P., Shear, J. B., Scheller, R. H., Zare, R. N., *Cell-to-cell scanning in capillary electrophoresis*, Anal. Chem., **1996**, 68, 1181-1186.

Fishman, H. A., Greenwald, D. R., Zare, R. N., *Biosensors in chemical separations*, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct., **1998**, 27, 165-98.

Fogelqvist, E., Krysell, M., *On-line liquid-liquid extraction in a segmented flow directly coupled to on-column injection into a gas chromatograph*, Anal. Chem., **1986**, 58, 1516-1520.

Fontal, O. I., Vieytes, M. R., Baptista de Sousa, J. M. V., Louzao, M. C., Botana, L. M., *A fluorescent microplate assay for microcystin-LR*, Anal. Biochem., **1999**, 269, 298-296.

Frei, R. W., *Reaction detectors in modern liquid chromatography*, Chromatographia, **1982**, 15, 161-166.

Fuller, G. H., Steltenkamp, R., Tisserand, G. A., *The gas chromatograph with human sensor: Perfumer*, Ann. NY Acad. Sci., **1964**, 116, 711-724.

Gaido, K. W., Leonard, L. S., Lovell, S., Gould, J. C., Babai, D., Portier, C. J., McDonnell, D. P., *Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay*, Toxicol. Appl. Pharmacol. **1997**, 143, 205-212.

Galensa, R., *Postcolumn derivatisation*, In: Wagner, G., Giulbault, G. G. (Hrgs.), *Food biosensor analysis, Chapter 9*, CRC Press, Basel, **1993**, 191-219.

Ganassin, R.C., Schirmer, K., Bols, N.C., *Cell and tissue culture*. In: Ostrander, G. K. (Hrsg.), *The laboratory fish, Chapter 38*, Academic Press, San Diego, **2000**, 631-651.

Geladopoulos, T. P., Sotiroudis, T. G., Evangelopoulos, A. E., *A malachite green calorimetric assay for protein phosphatase activity*, Anal. Biochem., **1991**, 192, 112-116.

German, J. B., O'Neill, T. E., Kinsella, J. E., *Film forming and foaming behavior of food proteins*, **1985**, 62, 1358-1366.

Gerthsen, C., *Physik*, Springer-Verlag, Berlin, **1997**.

Girelli, A. M., Mattei, E., *Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review*, *J. Chromatogr. B*, **2005**, 819, 3-16.

Goldberg, J., Huang, H.-B., Kwon, Y.-G., Greengard, P., Nairn, A. C., Kuriyan, J., *Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1*, *Nature*, **1995**, 376, 745-753.

Gorton, L., *Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells*, *Electroanal.*, **1994**, 7, 23-45.

Goryacheva, I. Y., de Saeger, S., Eremin, S. A., van Peteghem C., *Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: Evolution from single to multiple analyte screening: A review*, *Food Addit. Contam.*, **2007**, 24, 1169-1183.

Grung, M., Lichtenthaler, R., Ahel, M., Tollefsen, K.-E., Langford, K., Thomas K. V., *Effect-directed analysis of organic toxicants in wastewater effluent from Zagreb, Croatia*, *Chemosphere*, **2007**, 67, 108-120.

Günther, A., Bilitewsk, U., *Characterisation of inhibitors of acetylcholinesterase by an automated amperometric flow-injection system*, *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 300, 117-125.

Guillarme, D., Heinisch, S., Rocca, J. L., *Effect of temperature in reversed phase liquid chromatography*, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1052, 39-51.

Gupta, N., Pant, S. C., Vijayaraghavan, R., Lakshmana Rao, P. V., *Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice*, *Toxicology*, **2003**, 188, 285-296.

Gustavsson, S. A., Samskog, J., Markides K. M., Langstrom, B., *Studies of signal suppression in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents*, *J. Chromatogr. A*, **2001**, 937, 41-47.

Habig, R. L., Schlein, B. W., Waters, L., Thiers, R. E., *A bubble-gating flow cell for continuous-flow analysis*, *Clin. Chem.*, **1996**, 1045-1055.

Harder, K. W., Owen, P., Wong, L. K. H., Aebersold, R., Clark-Lewis, I., Jirik, F. R., *Characterization and kinetic analysis of the intracellular domain of human protein tyrosine phosphatase β (HPTP β) using synthetic phosphopeptides*, *Biochem. J.*, **1994**, 298, 395-401.

-
- Hambleton, P.**, Lough, W. L., Maltas, J., Mills, M. J., *Unusual analyte adsorption effects on inert LC components*, J. Liq. Chromatogr. R. T., **1995**, 18, 3205-3217.
- Harda, K.-J.**, Matsuura, A., Suzuki, M., Wantanabe, M. F., Oischi, S., Dahlem, A. M., Beasley, V. R., Carmichael, W. W., *Isolation and characterization of the minor components associated with microcystins LR and RR in the cyanobacterium (blue-green algae)*, Toxicon, **1990**, 28, 55-64.
- Hardie, D. G.**, *Analysis of signal transduction pathways using protein (serin/threonine) phosphatases*, In: Hardie, D. G. (Hrsg.), *Protein phosphorylation – a practical approach*, Oxford University Press, Oxford, **1989**, Kap. 3, 53-67.
- Heber, F.**, *Freezing injury in relation to loss of enzyme activities and protection against freezing*, Chryology, **1968**, 5, 188-201.
- Hemmilä, I.**, Webb, S., *Time-resolved fluorometry: An overview of the labels and core technologies for drug screening applications*, Drug Discov. Today, **1997**, 2, 373-381.
- Heresztyn, T.**, Nicholson, B. C., *A colorimetric protein phosphatase inhibition assay for the determination of cyanobacterial peptide hepatotoxins based on the dephosphorylation of phosvitin by recombinant protein phosphatase 1*, Environ. Toxicol., **2001**, 16, 242-252.
- Hervé, J. C.**, Sarroilhe, D., *Modulation of junctional communication by phosphorylation: Protein phosphatases, the missing link in the chain*, Biol. Cell, **2002**, 94, 423-432.
- Herzig, S.**, Neumann, J., *Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes*, Physiol. Rev., **2000**, 80, 173-210.
- Hessel, V.**, Löwe, H., Schönfeld, F., *Micromixers - a review on passive and active mixing principles*, Chem. Eng. Sci., **2005**, 60, 2479-2501.
- Hirata, J.**, Chung, L. P., Ariese, F., Irth, H., Gooijer, C., *Coupling of size-exclusion chromatography to a continuous assay for subtilisin using a fluorescence resonance energy transfer peptide substrate: Testing of two standard inhibitors*, J. Chromatogr. A., **2005**, 1081, 140-144.
- Hock, B.**, *Wirkungsbezogene Analytik in der Lebensmittelüberwachung*, J. Verbr. Lebensm., **2006**, 1, 269-270.
- Holtzhauer, M.**, *Biochemische Labormethoden*, Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**.
- Honkanen, R. E.**, Zwiller, J., Mooren, R. E., Daily, S. L., Khatra, B. S., Dukelow, M., Boynton, A. L., *Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases*, J. Biol. Chem., **1990**, 265, 19401-19404.

Humpage, A., Falconer, I. R., *Microcystin-LR and liver tumor promotion: Effects on cytokinesis, ploidy, and apoptosis in cultured hepatocytes*, Environ. Toxicol., **1999**, 14, 61-75.

Hyenstrand, P., Metcalf, J. S., Beattie, K. A., Codd, G. A., *Effects of adsorption to plastics and solvent conditions in the analysis of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by high performance liquid chromatography*, Water Res., **2001a**, 35, 3508-3511.

Hyenstrand, P., Metcalf, J. S., Beattie, K. A., Codd, G. A., *Losses of the cyanobacterial toxin microcystin-LR from aqueous solution by adsorption during laboratory manipulations*, Toxicon, **2001b**, 39, 589-594.

Hyne, R. V., Maher W. A., *Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline*, Ecotox. Environ. Safe., **2003**, 54, 366-374.

Ingkaninan, K., de Best, C. M., van der Heijden, R., Hofte, A. J. P., Karabatak, B., Irth, H., Tjaden, U. R., van der Greef, J., Verpoorte, R., *High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products*, J. Chromatogr. A, **2000**, 872, 61-73.

International Human Genome Sequencing Consortium, *Initial sequencing and analysis of the human genome*, Nature, **2001**, 409, 860-921.

Ishihara, H., Martin, B. L., Brautigan, D. L., Karaki, H., Ozaki, H., Kato, Y., Fuetani, N., Watabe, S., Hashimoto, K., Uemura, D. and Hartshorne, D. J., *Calyculin A and okadaic acid: Inhibitors of protein phosphatase activity*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **1989**, 159, 871-877.

Ismailov, A. D., Pogosyan, S. I., Mitrofanova, T. I., Egorov, N. S., Netrusov A. I., *Bacterial bioluminescence inhibition by chlorophenols*, Appl. Biochem. Microbiol., **2000**, 36, 404-408.

Jakeway, S. C., de Mallo, A. J., Russell, E. L., *Miniaturized total analysis systems for biological analysis*, Fresenius J. Anal. Chem., **2000**, 366, 525-539.

Janssen, L. A. M., *Axial-dispersion in laminar-flow through coiled tubes*, Chem. Eng. Sci., **1976**, 31, 215-218.

Jardemark, K., Orwar, O., Jacobson, I., Moscho, A., Zare, R. N., *Patch clamp detection in capillary electrophoresis*, Anal. Chem., **1997**, 69, 3427-3434.

Jenkins, J., Prabhakarandian, B., Lenghaus, K., Hickman, J., Sundaram, S., *Fluidics-resolved estimation of protein adsorption kinetics in a biomicrofluidic system*, Anal. Biochem., **2004**, 331, 207-215.

Jennings, V. L. K., Rayner-Brandes, M. H., Bird, D. J., *Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium (*Vibrio fischeri*): A comparison of three commercial systems*, *Wat. Res.*, **2001**, 35, 3448-3456.

Kaiser, K. L. E., Palabrica, V. S., *Photobacterium phosphoreum toxicity data index*, *Water Poll. Res. J. Canada*, **1991**, 26, 361-431.

Kaiser, K. L. E., *Correlations of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms*, *Environ. Health Persp.*, **1998**, 106, Suppl. 2, 583-591.

Kaufman, A., D., Kissinger, P. T., *Extra-column band spreading concerns in post-column photolysis reactors for microbore liquid chromatography*, *Curr. Sep.*, **1998**, 17, 9-16.

Keil, C., Forchert, A., Fastner, J., Szewzyk, U., Rotard, W., Chorus, I., Krätke, R., *Toxicity and microcystin content of extracts from a *Planktothrix* bloom and two laboratory strains*, *Water Res.*, **2002**, 36, 2133-2139.

Kido, H., Maquieira, A., Hammock, B. D., *Disc-based immunoassay microarrays*, *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 411, 1-11.

Killilea, S. D., Aylward, J. H., Mellgren, R. L., Lee, E. Y. C., *Purification and properties of bovine myocardial phosphorylase phosphatase (protein phosphatase C)*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1978**, 191, 638-646.

Kindervater, R., Kunnecke, W., Schmid, R., *Exchangeable immobilized enzyme reactor for enzyme inhibition tests in flow-injection analysis using a magnetic device. Determination of pesticides in drinking water*, *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 234, 113-117.

Kool, J., Van Liempd, S. M., Ramautar, R., Schenk, T., Meerman, J. H. N., Irth, H., Commandeur, J. N. M., Vermeulen, N. P. E., *Development of a novel cytochrome P450 bioaffinity detection system coupled online to gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography*, *J. Biomol. Screen.*, **2005**, 10, 427-436.

Kool, J., Van Liempd, S. M., Harmsen, S., Schenk, T., Irth, H., Commandeur, J. N. M., Vermeulen, N. P. E., *An on-line post-column detection system for the detection of reactive-oxygen-species-producing compounds and antioxidants in mixtures*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, 388, 871-879.

Kraemer, P. M., Li, X. Q., Hammock, B. D., *Integration of liquid chromatography with immunoassay: An approach combining the strength of both methods*, *J. AOAC Intern.*, **1994**, 77, 1275-1287.

Krull, I. S., *Reaction detection in liquid chromatography*, Marcel Dekker, New York, **1986**.

Kudryasheva, N. S., *Bioluminescence and exogenous compounds: Physico-chemical basis for bioluminescent assay*, J. Photochem. Photobiol. B - Biol., **2006**, 83, 77-86.

Kuehnle M., Rehbein J., Holtin K., Dietrich B., Gradl M., Yeman H., Albert, K., *Phase optimized liquid chromatography as an instrument for steroid analysis*, J. Sep. Sci. **2008**, 31, 1655-1661.

Kuhlmann, O., Krauss, G.-J., *Crocheted ETFE-reactor for on-line post-column photo-derivatization of diclofenac in high-performance liquid chromatography*, J. Pharm. Biomed. Anal., **1997**, 16, 553-559.

Kurth, H.-H., Gab, S., Turner, W. V., Kettrup, A., *A high-performance liquid chromatography system with an immobilized enzyme reactor for detection of hydrophilic organic peroxides*, Anal. Chem., **1991**, 63, 2586-2589.

Kutter, J. P., Klank, H., *Microfluidics - Theoretical aspects*, In: Geschke, O., Henning K., Tellemann, P., *Microsystem engineering of lab-on-a-chip devices*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.

Lammerink, T. S. J., Tas, N. R., Elwenspoek, M., Flultman, J. H. J., *Micro-liquid flow sensor*, Sens. Actuator A - Phys., **1993**, 37-38, 45-50.

Lan, S., Veiseh, M., Zhang, M., *Surface modification of silicon and gold-patterned silicon surfaces for improved biocompatibility and cell patterning selectivity*, Biosens. Bioelectron., **2005**, 20, 1697-1708.

Laser, D. J., Santiago, J. G., *A review of micropumps*, J. Micromech. Microeng., **2004**, 14, R35-R64.

Lee, H. J., Villaume, J., Cullen, D. C., Kim, B. C., Gu, M. B., *Monitoring and classification of PAH toxicity using an immobilized bioluminescent bacteria*, Biosens. Bioelectron., **2003**, 18, 571-577.

Lee, J. H., Gu, M. B., *An integrated mini biosensor system for continuous water toxicity monitoring*, Biosens. Bioelectron., **2005**, 1744-1749.

Lesaicherre, M.-L., Uttamchandani, M., Chen, G. Y. J., Yaoa, S. Q., *Developing site-specific immobilization strategies of peptides in a microarray*, Bioorg. Med. Chem. Lett., **2002**, 12, 2079-2083.

Liu, R. H., Yang, J., Pindera, M. Z., Athavale, M., Grodzinski, P., *Bubble-induced acoustic micromixing*. Lab Chip, **2002**, 2, 151-157.

Liu, H., Papa, E., Gramatica, P., *QSAR prediction of estrogen activity for a large set of diverse chemicals under the guidance of OECD principles*, Chem. Res. Toxicol., **2006**, 19, 1540-1548.

Locascio, L. E., *Microfluidic mixing*, Anal. Bioanal. Chem., **2004**, 379, 325-327.

Lu, L.-H., Ryu, K. S., Liu, C. (Hrsg.), *A novel microstirrer and arrays for microfluidic mixing*, In: Ramsey, J. M., van den Berg, A. (Hrsg.) *Micro total analysis systems*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **2001**. 28–30.

Lutz, E. S. M., Irth, H., Tjaden, U. R. and Greef, J. V. D., *Applying hollow fibres for separating free and bound label in continuous-flow immunochemical detection*, J. Chromatogr. A, **1996**, 755, 179-187.

MacKintosh, C. Klumpp, S., *Tautomycin from the bacterium Streptomyces verticillatus another potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A*, FEBS Lett., **1990a**, 277, 137-140.

MacKintosh, C., Beattie, K. A., Klumpp, S., Cohen, P. and Codd, G. A., *Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants*, FEBS Lett., **1990b**, 264, 187-192.

MacKintosh, C., Moorehead, G., *Assay and purification of protein (serine/threonine) phosphatases*, In: Hardie, D. J. (Hrsg.), *Protein phosphorylation – a practical approach*, Oxford University Press, Oxford, **1999**, Kap. 7, 153-181.

MacKintosh, R. W., Dalby, K. N., Campell, D. G., Cohen, P. T. W., Cohen, P., MacKintosh, C., *The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1*, FEBS Letters, **1995**, 371, 236-240.

Major, J. S., *Challenges of high throughput screening against cell surface receptors*, J. Recept. Signal. Transduct. Res., **1995**, 15, 595-607.

Marko-Varga, G. A., *Column liquid chromatography in combination with immobilized enzymes and electrochemical detection and its applications in some industrial processes*, Electroanalysis, **1992**, 4, 403-427.

Marston, A., Kissling, J., Hostettmann, K., *A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants*, Phytochem. Anal., **2002**, 13, 51-54.

Martin, H. H., Gmeiner, J., *Modification of peptidoglycan structure by penicillin action in cell walls of Proteus mirabilis*, Eur. J. Biochem., **1979**, 95, 487-495.

- Mascini**, M., Palchetti, I., Marrazza, G., *DNA electrochemical biosensors*, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2001**, 269, 15-22.
- Massolini**, G., Calleri, E., De Lorenzi, E., Pregnolato, M., Terreni, M., Felix, G., Gandini, C., *Immobilized penicillin G acylase as reactor and chiral selector in liquid chromatography*, *J. Chromatogr. A*, **2001**, 921, 147-160.
- Matsushima**, R., Yoshizawa, S., Watanabe, M.F., Harada, K.-I., Furusawa, M., Carmichael, W.W. and Fujiki, H., *In vitro and in vivo effects of protein phosphatase inhibitors, microcystins and nodularin, on mouse skin and fibroblasts*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1990**, 171, 867-874.
- Maynes**, J. T., Bateman, K. S., Cherney, M. M., Das, A. K., Luu, H. A., Holmes, C. F. B., James, M. N. G., *Crystal structure of the tumor-promoter okadaic acid bound to protein phosphatase-1*, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 44078-44082.
- Mazereeuw**, M., de Best, C. M., Tjaden, U. R., Irth, H., van der Greef, J., *Free flow electrophoresis device for continuous on-line separation in analytical systems. An application in biochemical detection*, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 3881-3886.
- McEvoy**, A. K., McDonagh, C. M., MacCraith B. D., *Dissolved oxygen sensor based on fluorescence quenching of oxygen-sensitive ruthenium complexes immobilized in sol-gel-derived porous silica coatings*, *Analyst*, **1996**, 121, 785-788.
- Meighen**, E. A., *Molecular biology of bacterial bioluminescence*, *Microbiol. Rev.*, **1991**, 55, 123-142.
- Meinert**, C., Moeder, M., Brack, W., *Fractionation of technical p-nonylphenol with preparative capillary gas chromatography*, *Chemosphere*, **2007**, 70, 215-223.
- Meriluoto**, J., *Chromatography of microcystins*, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 352, 277-298.
- Mikhailov**, A., Härmälä-Braskén, A.-S., Hellman, J., Meriluoto, J., Eriksson, J. E., *Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR*, *Chem.-Biol. Interact.*, **2003**, 142, 223-237.
- Moorhouse**, J. E., Yeadon, R., Beevor, P. S., Nesbitt, B. R., *Method for use in studies of insect chemical communication*, *Nature*, **1969**, 223, 1174-1175.
- Mott**, R. L., *Applied fluid mechanics*, Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, **2000**.
- Moulin**, P., Rouch, J. C., Serra, C., Clifton, M. J., Aptel, P., *Mass transfer improvement by secondary flows: Dean vortices in coiled tubular membranes*, *J. Membrane Sci.*, **1996**, 114, 235-244.

-
- Mountfort**, D. A., Kennedy, G., Garthwaite, I., Quilliam, M., Truman, P., Hannah, D. J., *Evaluation of the fluorometric protein phosphatase inhibition assay in the determination of okadaic acid in mussels*, *Toxicon*, **1999**, 37, 909-922.
- Moye**, H. A., Wade, T. E., *A fluorometric enzyme inhibition detector for carbamate pesticide analysis by high speed liquid chromatography*, *Anal. Lett.*, **1976**, 9, 891-920.
- Mulligan**, C. N., Eftekhari, F., *Remediation with surfactant foam of PCP-contaminated soil*, *Eng. Geol.*, **2003**, 70, 269 -279.
- Nagata**, S., Zhou, X., *Analysis of factors to affect the bioassay system using bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri**, *J. Health Sci.*, **2006**, 52, 9-16.
- Nakayama**, G. R., Caton, M. C., Nova, M. P., Parandoosh, Z., *Assessment of the alamar blue assay for cellular growth and viability in vitro*, *J. Immunol. Methods*, **1997**, 204, 205-208.
- Neher**, E., Sakmann, B., *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres*, *Nature*, **1976**, 260, 799-802.
- Nelson**, K., Pavlik, E. J., van Nagell Jr., J. R., Hanson, M. B., Donaldson, E. S., Flanigan, R. C., *Estrogenicity of coumestrol in the mouse: fluorescence detection of interaction with estrogen receptors*, *Biochemistry*, **1984**, 23, 2565-2572.
- Nguyen**, N.-T., Wereley, S. T., *Fundamentals and applications of microfluidics*, Artech House, Norwood, **2002**.
- Nielen**, M. W. F., Bovee, T. F. H., van Engelen, M. C., Rutgers, P., Hamers, A. R. M., van Rhijn, J. H. A., Hoogenboom, L. R. A. P., *Urine testing for designer steroids by liquid chromatography with androgen bioassay detection and electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry identification*, *Anal. Chem.*, **2006**, 78, 424-431.
- Nord**, L., Karlberg, B., *Extraction based on the flow-injection Part 6. Film formation and dispersion in liquid-liquid segmented flow extraction systems*, *Anal. Chim. Acta*, **1984**, 164, 233-249.
- Oosterkamp**, A. J., Villaverde Herraiz, M. T., Irth, H., Tjaden, U. R., van der Greef, J., *Reversed-phase liquid chromatography coupled on-line to receptor affinity detection based on the human estrogen receptor*, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 1201-1206.
- Oosterkamp**, A. J., van der Hoeven, R., Glässgen, W., König, B., Tjaden, U. R., van der Greef, J., Irth, H., *Gradient reversed-phase liquid chromatography coupled on-line to receptor-affinity detection based on the urokinase receptor*, *J. Chromatogr. B*, **1998**, 715, 331-338.

Orwar, O., Jardemark, K., Jacobson, I., Moscho, A., Fishman, H. A., Scheller, R. H., Zare, R. N., *Patch-clamp detection of neurotransmitters in capillary electrophoresis*, Science, **1996**, 272, 1779-1782.

Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., *Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*, J. Exp. Biol., **2001**, 204, 2351-2360.

Park, S.-S., Cho, S. I., Kim, M.-S., Kim, Y.-K., Kim, B.-G., *Integration of on-column immobilized enzyme reactor in microchip electrophoresis*, Electrophoresis, **2003**, 24, 200-206.

Parvez, S., Venkataraman, C., Mukherji, S., *A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals*, Environ. Int., **2006**, 32, 265-268.

Petersen, S., Gustavson, K., *Toxic effects of tri-butyl-tin (TBT) on autotrophic pica-, nano-, and microplankton assessed by a size fractionated pollution-induced community tolerance (SF-PICT) concept*, Aquat. Toxicol., **1998**, 40, 253-264.

Pope, A. J., Haupts, U. M., Moore, K. J., *Homogeneous fluorescence readouts for miniaturized high-throughput screening: Theory and practice*, Drug Discov. Today, **1999**, 4, 350-362.

Poulsen, J. R., Briks, K. S., Gandelman, M. S., Briks, J. W., *Crocheted PTFE reactors for post-column photochemistry in HPLC*, Chromatographia, **1986**, 22, 231-234.

Pouria, S., de Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R. L., Barreto, V. T. S., Ward, C. J., Preiser, W., Poon, G. K., Neild, G. H., Codd, G. A., *Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru*, Lancet, **1998**, 352, 21-26.

Reemtsma, T., Fiehn, O., Jekel, M., *A modified method for the analysis of organics in industrial wastewater as directed by their toxicity to *Vibrio fischeri**, Fresenius J. Anal. Chem., **1999**, 363, 771-776.

Reemtsma, T., *Prospects of toxicity-directed analysis in wastewater analysis*, Anal. Chim. Acta, **2001**, 426, 279-287.

Reichenberg, F., Mayer, P., *Two complementary sides of bioavailability: accessibility and chemical activity of organic contaminants in sediments and soils*, Environ. Toxicol. Chem., **2006**, 25, 1239-1245.

Ribo, J. M., Rogers, F., *Toxicity of mixtures of aquatic contaminants using the luminescent bacteria bioassay*, Toxicity Assess., **1990**, 5, 135-152.

Rogers, K. R., *Biosensors for environmental applications*, *Biosens. Bioelectron.*, **1995**, 10, 533-541.

Rodriguez-Mozaz, S., López de Alda, M. J., Marco, M.-P., Barceló, D., *Biosensors for environmental monitoring: A global perspective*, *Talanta*, **2005**, 65, 291-297.

Ross, P., Burton Jr., G. A., Greene, M., Ho, K., Meier, P., Sweet, L., Auwarter, A., Bispo, A., Doe, K., Erstfeld, K., Goudey, S., Goyvaerts, M., Henderson, D., Jourdain, M., Lenon, M., Pandard, P., Qureshi, A., Rowland, C., Schipper, C., Schreurs, W., Trottier, S., Van Aggelen G., *Interlaboratory precision study of a whole sediment toxicity test with the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri**, *Environ. Toxicol.*, **1999**, 14, 339-345.

Runnegar, R., Berndt, N., Kaplowitz, N., *Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: Effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1995**, 134, 264-272.

Sacchetto, G. A., Favaro, G., Pastore, P., Fiorani, M., *Optimization of the amperometric detection of nitrite by reaction with iodide in a post-column reactor for liquid chromatography of non-volatile nitrosamines*, *Anal. Chim. Acta*, **1994**, 294, 251-260.

Salizzato, M., Pavoni, B., Ghirardini, A. V., Ghetti, P. F., *Sediment toxicity measured using *Vibrio fischeri* as related to the concentrations of organic (PCBs, PAHs) and inorganic (metals, sulphur) pollutants*, *Chemosphere*, **1998**, 36, 2949-2968.

Schenk, T., Breel, G. J., Koevoets, P., van Den Berg, S., Hogenboom, A. C., Irth, H., Tjaden, U. R., van Der Greef J., *Screening of natural products extracts for the presence of phosphodiesterase inhibitors using liquid chromatography coupled online to parallel biochemical detection and chemical characterization*, *J. Biomol. Screen.*, **2003**, 8, 421-429.

Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., *Predicting and observing responses of algal communities to photosystem-II-herbicide exposure using pollution-induced community tolerance and species-sensitivity distributions*, *Environ. Toxicol. Chem.*, **2005**, 24, 304-312.

Schneider, D., *Elektrophysiologische Untersuchungen an Chemo- und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L.*, *Z. Vergl. Physiol.*, **1957**, 40, 8-41.

Schobel, U., Frenay, M., van Elswijk, D. A., McAndrews, J. M., Long, K. R., Olson, L. M., Bobzin, S. C., Irth, H., *High resolution screening of plant natural product extracts for estrogen receptor α and β binding*, *J. Biomol. Screen.*, **2001**, 6, 291-303.

Scholten, A. H. M. T., Brinkman, U. A. T., Frei, R. W., *Solvent segmentation in liquid-chromatography – application to photochemical-reaction detectors*, J. Chromatogr., **1981**, 205, 229-237.

Scholten, A. H. M. T., Brinkman U. A. T., Frei R. W., *Comparison of liquid segmented with nonsegmented flow systems in postcolumn reactors for liquid chromatography*, Anal. Chem., **1982**, 54, 1932-1938.

Schulze, P., Schüttpelz, M., Sauer M., Belder, D., *Two-photon excited fluorescence detection at 420 nm for label-free detection of small aromatics and proteins in microchip electrophoresis*, Lab Chip, **2007**, 7, 1841-1844.

Seifert, M., Haindl, S., Hock B., *Development of an enzyme linked receptor assay (ELRA) for estrogens and xenoestrogens*, Anal. Chim. Acta, **1999**, 386, 191-199.

Shao, Z., Ren, C. L., Schneider, G. E., *A 3D electrokinetic flow structure of solution displacement in microchannels for on-chip sample preparation applications*, J. Micro-mech. Microeng., **2006**, 16, 589–600.

Shenolika, S., *Protein serine/threonin phosphatase – new avenues for cell regulation*, Annu. Rev. Cell Biol. **1994**, 10, 55-86.

Shiozawa, T., Tada, A., Nukaya, H., Watanabe, T., Takahashi, Y., Asanoma, M., Ohe, T., Sawanishi, H., Katsuhara, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Terao, Y., *Isolation and identification of a new 2-phenylbenzotriazole-type mutagen (PBTA-3) in the Nikko river in Aichi, Japan*, Chem. Res. Toxicol. **2000**, 13, 535-540.

Sim, A. T. R., Mudge, L.-M., *Protein phosphatase activity in cyanobacteria: Consequences for microcystin toxicity analysis*, Toxicon, **1993**, 31, 1179-1186.

Skeggs, L. T., *An automatic method for colorimetric analysis*, Am. J. Clin. Pathol., **1957**, 28, 311-322.

Skoog, D. A., Leary, J. J., *Instrumentelle Analytik Grundlagen - Geräte - Anwendungen*, Springer-Verlag, Heidelberg, **1996**.

Smythe, W. J., Bellinger, S. L., *Fluidic system for inclusion in a total automated fluid system of a sample analyzer*, United States Patent Office, Number 3 826 615, **1974**.

Snyder, L. R., Adler, H. J., *Dispersion in segmented flow through glass tubing in continuous-flow analysis: The ideal model*, Anal. Chem., **1976a**, 48, 1017-1022.

Snyder, L. R., Adler, H. J., *Dispersion in segmented flow through glass tubing in continuous-flow analysis: The nonideal model*, Anal. Chem., **1976b**, 48, 1022-1027.

Sportsman, J. R., Leytes, L. J., *Miniaturization of homogeneous assays using fluorescence polarization*, Drug Discov. Today, **2000**, 5, 27-32.

Stevenson, D., *Immuno-affinity solid-phase extraction*, J. Chromatogr. B, **2000**, 745, 39-48.

Susumu, Y., Masaharu, N., Hiroyuki W., Kenji, S., *Specific detection of acetyl-coenzyme A by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with an immobilized enzyme reactor*, J. Chromatogr., **1992**, 590, 241-245.

Takai, A., Sasaki, K., Nagai, H., Mieskes, G., Isobe, M., Isono, K., Yasumoto, T., *Inhibition of specific binding of okadaic acid to protein phosphatase 2A by microcystin-LR, calyculin-A and tautomycin: Method of analysis of interactions of tight-binding ligands with target protein*, Biochem. J., **1995**, 306, 657-665.

Tang, Z., Karnes, H. T., *Coupling immunoassays with chromatographic separation techniques*, Biomed. Chromatogr., **2000**, 14, 442-449.

Thormann, W., Caslavská, J., Ramseier, A., Siethoff C., *Multianalyte capillary electrophoresis assays for screening and confirmation of urinary drugs of abuse*, J. Microcolumn Sep., **2000**, 12, 13-24.

Tice, J. D., Song, H., Lyon, A. D., Ismagilov, R. F., *Formation of droplets and mixing in multiphase microfluidics at low values of the Reynolds and the capillary numbers*, Langmuir, **2003**, 19, 9127-9133.

Tijssen, R., *Axial dispersion and flow phenomena in helically coiled tubular reactors for low flow analysis and chromatography*, Anal. Chim. Acta, **1980**, 114, 71-89.

Tollefsen, K. E., Mathisen, R., Stenersen, J., *Induction of vitellogenin synthesis in an atlantic salmon (*Salmo salar*) hepatocyte culture: A sensitive in vitro bioassay for the oestrogenic and anti-oestrogenic activity of chemicals*, Biomarkers, **2003**, 8, 394-407.

Tothill, I. E., Turner, A. P. F., *Developments in bioassay methods for toxicity testing in water treatment*, Trac - Trends Anal. Chem., **1996**, 5, 178-188.

Trachsel, F., Günther, A., Khan, S., Jensen, K. F., *Measurement of residence time distribution in microfluidic systems*, Chem. Eng. Sci., **2005**, 60, 2729-2737.

Tsai, J.-H., Lin, L., *Active microfluidic mixer and gas bubble filter driven by thermal bubble micropump*, Sens. Actuator A - Phys., **2002**, 97-98, 665-671.

Tsai, T.-R., Chain, T.-M., Chen, K.-C., Chen, Ch.F., Tsai, T.-H., *Determination of acetylcholine by on-line microdialysis coupled with pre- and post-microbore column enzyme reactors with electrochemical detection*, J. Chromatogr. B, **1996**, 678, 151-155.

Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M. F., Park, H.-D., Chen, G.-C., Chen, G., Yus, S.-Z., *Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay*, *Carcinogenesis*, **1996**, 17, 1317-1321.

Uhlig, S., Gutleb, A. C., Thrane, U., Flåøyen, A., *Identification of cytotoxic principles from *Fusarium avenaceum* using bioassay-guided fractionation*, *Toxicon*, **2005**, 46, 150-159.

U.S. Environmental Protection Agency, *Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase I toxicity characterization procedures*, Second Edition, EPA-600/6-91-003, **1991**, Environmental Research Laboratory-Duluth, MN.

U.S. Environmental Protection Agency, *Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase II toxicity identification procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity*, EPA-600/R-92-080, **1993**, Environmental Research Laboratory-Duluth, MN.

U.S. Environmental Protection Agency, *Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates*, EPA-600/R-94-024, **1994**, Environmental Research Laboratory-Duluth, MN.

van der Hoeven, N., Noppert, F., Leopold, A., *How to measure no effect. Part I: Towards a new measure of chronic toxicity in ecotoxicology. Introduction and workshop results*, *Environmetrics*, **1997**, 241-248.

van der Hoeven, N., *Current issues in statistics and models for ecotoxicological risk assessment*, *Acta Biother.*, **2004**, 52, 201-217.

van Elswijk, D. A., Diefenbach, O., van der Berg, S., Irth, H., Tjaden, U. R., van der Greef, J., *Rapid detection and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitors by on-line liquid chromatography–biochemical detection, coupled to electrospray mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1020, 45-58.

van Ewijk, P. H., Hoekstra, J. A., *Calculation of the EC_{50} and its confidence interval when subtoxic stimulus is present*, *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, **1993**, 25, 25-32.

van Ruth, S. M., *Methods for gas chromatography-olfactometry: A review*, *Biomol. Eng.*, **2001**, 17, 121-128.

Veenstra, T. T., Lammerink, T. S. J., Elwenspoek, M. C., van den Berg, A., *Characterization method for a new diffusion mixer applicable in micro flow injection analysis systems*, *J. Micromech. Microeng.*, **1999**, 9, 199-202.

-
- Vega**, M. M., Fernández, C., Blázquez, T., Tarazona, J. V., Castaño A., *Biological and chemical tools in the toxicological risk assessment of Jarama river, Madrid, Spain*, Environ. Pollut., **1996**, 93, 135-139.
- Vieytes**, M. R., Fontal, O. I., Leira, F., Baptista de Sousa, J. M. V., Botana, L. M., *A fluorescent microplate assay for diarrheic shellfish toxins*, Anal. Biochem., **1997**, 248, 258-264.
- Visick**, K. L., Ruby, E. G., *The periplasmic, group III catalase of Vibrio fischeri is required for normal symbiotic competence and is induced both by oxidative stress and by approach to stationary phase*, J. Bacteriol., **1998**, 2087-2092.
- Voet**, D., Voet, J. G., *Biochemie*, VCH, Weinheim, **1994**, 329-334.
- Vogt Jr.**, R. F., Phillips, D. L., Henderson, L. O., Whitfield, W., Spierto, F.W., *Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates*, J. Immunol. Methods, **1987**, 101, 43-50.
- von der Ohe**, P. C., Kühne, R., Ebert, R.-U., Altenburger, R., Liess, M., Schüürmann, G., *Structural alertss a new classification model to discriminate excess toxicity from narcotic effect levels of organic compounds in the acute daphnid assay*, Chem. Res. Toxicol., **2005**, 18, 536-555.
- Yang**, Z., Matsumoto, S., Goto, H., Matsumoto, M., Maeda, R., *Ultrasonic micromixer for microfluidic systems*, Sens. Actuator A - Phys., **2001**, 93, 266-272.
- Yaralioglu**, G. C., Wygant, I. O., Marentis, T. C., Khuri-Yakub, B. T., *Ultrasonic mixing in microfluidic channels using integrated transducers*, Anal. Chem., **2004**, 76, 3694-3698.
- Wang**, J., Lin, M. S., *Mixed plant tissue-carbon paste bioelectrode*, Anal. Chem., **1988**, 60, 1545-1587.
- Weigl**, B. H., Yager, P., *Microfluidic diffusion-based separation and detection*, Science, **1999**, 283, 346-347.
- Weissbecker**, B., Holighaus, G., Schütz, S., *Gas chromatography with mass spectrometric and electroantennographic detection: Analysis of wood odorants by direct coupling of insect olfaction and mass spectrometry*, J. Chromatogr. A., **2004**, 1056, 209-216.
- Weller**, M. G., *Immunochromatographic techniques - a critical review*, Fresenius J. Anal. Chem., **2000**, 366, 635-645.

WHO, *Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR*, In: *Guidelines for drinking water quality. 2nd Edition*, Anhang zu Vol. 2. *Health criteria and other supporting information*. World Health Organization, Geneva, Switzerland, **1998**, 95–110.

Wilson, T., Hastings, J. W., *Bioluminescence*, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, **1998**, 14, 197-230.

Wilson, W. D., *Analyzing biomolecule interactions*, *Science*, **2002**, 295, 2103-2105.

Woolf, E., Fu, I., Matuszewski, B., *Determination of rofecoxib, a cyclooxygenase-2 specific inhibitor, in human plasma using high-performance liquid chromatography with post-column photochemical derivatization and fluorescence detection*, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **1999**, 730, 221-227.

Worek, F., Thiermann, H., Szinicza, L., Eyer, P., *Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes*, *Biochem. Pharmacol.*, **2004**, 68, 227-2248.

Zeck, A., Weller, M. G., Niessner, R., *Multidimensional biochemical detection of microcystins in liquid chromatography*, *Anal. Chem.*, **2001a**, 73, 5509-5517.

Zeck, A., Weller, M. G., Bursill, D., Niessner, R., *Generic microcystin immunoassay based on monoclonal antibodies against Adda*, *Analyst*, **2001b**, 126, 2002-2007.

Zhou, X., Okamura, H., Nagata, S., *Remarkable synergistic effects in antifouling chemicals against *Vibrio fischeri* in a bioluminescent assay*, *J. Health. Sci.*, **2006**, 52, 243-251.