

Bericht Nr. 2011/01
Langenau, den 21.02.2011

**HPC Harres Pickel Consult AG
Nansenstraße 5**

**79539 Lörrach
Deutschland**

Projektnummer: 2092160

**Wirkungsbezogene Analytik
Grundwasserdetailuntersuchungen
„Kesslergrube / BASF - Werksgelände“
Grenzach-Wyhlen**

Dipl.-Ing. (FH) Stefan Weiß, Dr. Wolfgang Schulz

Zweckverband Landeswasserversorgung
Am Spitzigen Berg 1
89129 Langenau
Deutschland

Inhaltsverzeichnis:

1	Aufgabenstellung	9
2	Probenahme	10
3	Analysenverfahren und Auswertung	12
3.1	Wirkungsbezogene Analytik mit <i>Vibrio fischeri</i> und HPTLC/AMD	12
3.1.1	Begriffserklärung und Prinzip der wirkungsbezogenen Analytik	12
3.1.2	Leuchtbakterium <i>Vibrio fischeri</i>	13
3.1.3	Die Methode HPTLC/AMD mit Biolumineszenz-Detektion	17
3.2	Ermittlung der Hemmung	23
3.3	Dosis-Wirkungsbeziehung	26
3.4	Halbquantitativer Vergleich der Hemmbanden	27
3.5	Polaritätsabschätzung von Hemmbanden	32
3.6	Bestimmung der Verdünnungsstufe G_{lb}	36
3.6.1	Küvettenhemmtest $G_{lb, \text{Küvette}}$	36
3.6.2	TLC-Hemmtest $G_{lb, \text{TLC}}$	38
4	Ergebnisse	42
4.1	Polardiagrammdarstellung der RIHV-Werte	42
4.2	Tabelle der $G_{lb, \text{TLC}}$-Werte	62
5	Anhang	95
5.1	Probenvorbereitung	95
5.1.1	Probenlagerung	95
5.1.2	Festphasenextraktion (SPE)	95
5.2	HPTLC/AMD-Gradienten	96
5.3	Anzucht der Bakterien	100
5.3.1	Herstellung des Nährmediums	100
5.3.2	Zusammensetzung Reaktivierungslösung	100
5.3.3	Reaktivierung der Bakterien und Inkubation der Nährlösung	101
6	Literatur	123

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3-1:	<i>Vibrio fischeri</i> in Symbiose mit <i>Euprymna scolopes</i> (Hawaiianischer Tintenfisch)	13
Abb. 3-2:	Kolonien von <i>Vibrio fischeri</i> auf Agar unter Kunstlicht (links) bzw. Eigenleuchten (Mitte) sowie Eigenleuchten einer Bakteriensuspension im Erlenmeyer-Kolben (rechts)	14
Abb. 3-3:	Autoinduktor-Molekül N-(3-oxo)-hexanoyl-L-homoserine lactone für die Biolumineszenz von <i>Vibrio fischeri</i>	14
Abb. 3-4:	Verknüpfung von Atmungskette und Lumineszenz-Zyklus [14]	15
Abb. 3-5:	Schematische Darstellung des Bakteriums und toxikologische Wirkeinflüsse [13].....	16
Abb. 3-6:	Schematischer Ablauf der HPTLC/AMD	18
Abb. 3-7:	Schematische Darstellung der Vorgänge bei der Gradientenelution durch AMD (nach Burger [15]).....	19
Abb. 3-8:	Schema der HPTLC/AMD-Entwicklungseinheit	20
Abb. 3-9:	Fokussierender Effekt der AMD bei der HPTLC	20
Abb. 3-10:	Verschiedene physikalische Detektionsverfahren.....	21
Abb. 3-11:	Schematische Darstellung des Analysenverfahrens HPTLC/AMD mittels UV/Vis-Detektion	22
Abb. 3-12:	Schematische Darstellung des Leuchtbakterientests auf der HPTLC-Platte.....	22
Abb. 3-13	Darstellung der Lage von Untergrundbahn (U) und Probenbahn (P) zur Ermittlung der ortsabhängigen Hemmung H_n^P	23
Abb. 3-14:	Vergleich des Hemmwert-Chromatogramms bzw. Γ – Wert-Chromatogramms mit dem UV Chromatogramm einer Probe	25
Abb. 3-15:	Dosis-Wirkungsbeziehung für drei unterschiedlichen Substanzen ermittelt mittels HPTLC und wirkungsbezogener Detektion mit <i>Vibrio fischeri</i>	26
Abb. 3-16:	Abhängigkeit von Gammawert und Auftragevolumen für unterschiedliche Substanzbanden in doppelllogarithmischer Darstellung.....	29
Abb. 3-17	Prinzipielle Darstellung der Auswertung mittels reziprokem Isohemmvolumen (RIHV) eines Dünnschichtchromatogramms mit wirkungsbezogener Detektion	31
Abb. 3-18:	Darstellung der RIHV-Werte (logarithmisch) in einem Polardiagramm.....	31
Abb. 3-19:	Vergleich der AMD-Gradienten 1 und 2 an der Probe P12	32
Abb. 3-20:	Vergleich der Gradienten anhand des Retentionsverhalten des Kontroll-Mixes	33
Abb. 3-21:	Lage und log K_{OW} -Werte der Substanzen aus dem Kontroll-Mix im Rf-Polardiagramm	34

Abb. 3-22:	Darstellung der Absorptionsmaxima der Referenzsubstanzen im Rf-Polardiagramm	35
Abb. 3-23:	Verdünnung der Probe mit der Leuchtbakteriensuspension beim Küvettentest	36
Abb. 3-24:	Durchführung von zwei geometrischen Verdünnungsreihen zur Bestimmung der Verdünnungsstufe G (nach DIN EN ISO 11348-1:2009-05).....	36
Abb. 3-25:	Schematische Darstellung der Probenvorbereitung zur Ermittlung des G-Wertes auf der TLC-Platte	38
Abb. 3-26:	Linearisierte Dosis-Wirkungs-Beziehung von Bromoxynil zur Ermittlung des EC ₂₀ - bzw. EC ₅₀ -Wertes.....	39
Abb. 4-1:	Br 49 S-1 G2 RIHV.....	42
Abb. 4-2:	Cl 31 S-1 G2 RIHV	43
Abb. 4-3:	Cl 32 S-1 G2 RIHV.....	43
Abb. 4-4:	Cl 33 S-1 G2 RIHV.....	44
Abb. 4-5:	Cl 34 S-1 G2 RIHV	44
Abb. 4-6:	Cl 35 S-1 G2 RIHV	45
Abb. 4-7:	Cl 36 S-1 G2 RIHV.....	45
Abb. 4-8:	Cl 37 S-1 G2 RIHV.....	46
Abb. 4-9:	KE 20 S-1 G2 RIHV	46
Abb. 4-10:	KE 21 S-1 G2 RIHV	47
Abb. 4-11:	KE 22 S-1 G2 RIHV	47
Abb. 4-12:	KE 24 S-1 G2 RIHV	48
Abb. 4-13:	KE 25 S-1 G2 RIHV	48
Abb. 4-14:	KE 26 S-1 G2 RIHV	49
Abb. 4-15:	KE 30 S-1 G2 RIHV	49
Abb. 4-16:	KE 31 S-1 G2 RIHV	50
Abb. 4-17:	KE 28 S-1 G2 RIHV	50
Abb. 4-18:	KE 29 S-1 G2 RIHV	51
Abb. 4-19:	KE 32 S-1 G2 RIHV	51
Abb. 4-20:	KE 33 S-1 G2 RIHV	52
Abb. 4-21:	KE 34 S-1 G2 RIHV	52
Abb. 4-22:	KE 36 S-1 G2 RIHV	53
Abb. 4-23:	KE 40 S-1 G2 RIHV	53
Abb. 4-24:	KE 41 S-1 G2 RIHV	54
Abb. 4-25:	KE 42 S-1 G2 RIHV	54
Abb. 4-26:	KE 43 S-1 G2 RIHV	55
Abb. 4-27:	P 2 S-1 G2 RIHV.....	55
Abb. 4-28:	P 3 S-1 G2 RIHV.....	56
Abb. 4-29:	P 4 S-1 G2 RIHV.....	56
Abb. 4-30:	P 5 S-1 G2 RIHV.....	57
Abb. 4-31:	P 8 S-1 G2 RIHV.....	57

Abb. 4-32:	P 11 S-1 G2 RIHV	58
Abb. 4-33:	P 12 S-1 G2 RIHV	58
Abb. 4-34:	P 16a S-1 G2 RIHV	59
Abb. 4-35:	Blindprobe 1 S-1 G2 RIHV	59
Abb. 4-36:	Blindprobe 2 S-1 G2 RIHV	60
Abb. 4-37:	Blindprobe 3 S-1 G2 RIHV	60
Abb. 4-38:	Blindprobe 4 S-1 G2 RIHV	61
Abb. 5-1:	Schematische Darstellung des Gradienten „Kesslergrube G-1“	97
Abb. 5-2:	Schematische Darstellung des verwendeten Gradienten „Kesslergrube G-2“	99

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Probenbezeichnung	11
Tabelle 3-1:	Übersicht toxikologische Wirkungsweisen [13]	16
Tabelle 3-2:	Zusammensetzung Kontroll-Mix	33
Tabelle 3-3:	Bestimmung $G_{lb,Küvette}$ -Wert mit Hilfe von zwei geometrischen Verdünnungsreihen.....	37
Tabelle 3-4:	Vergleich der Berechnung von $G_{lb,Küvette}$ und $G_{lb,TLC}$	40
Tabelle 5-1:	HPTLC/AMD-Gradient „Kesslergrube G-1“.....	96
Tabelle 5-2:	Verwendeter HPTLC/AMD-Gradient „Kesslergrube G-2“.....	98
Tabelle 5-3:	Verdünnungsreihen der einzelnen Proben	102

Abkürzungsverzeichnis

I_t	Lichtintensität der Probe nach der Inkubationszeit t (z. B. 30 min)
I_0	Lichtintensität der Referenzprobe (Probe ohne Wirksubstanz)
i_n^P	ortsabhängige Probenintensität (digitalisierte Graustufen 0 - 255)
EC_{50}	Effekt Konzentration 50 %
$H_{Ges,i}$	Gesamthemmung einer Substanzbande
H_i	Hemmung einer Substanzbande i
i_n^U	ortsabhängige Untergrundintensität (digitalisierte Graustufen 0 - 255)
H_n^P	ortsabhängige Hemmung (%)
$1/V(50)$	reziprokes Isohemmvolumen für EC_{50}
a	Lageparameter der Dosis - Wirkungsbeziehung
$a_{i,j}$	Achsenabschnitt der Regressionsgeraden der Substanz i in Probe j
AMD	Automatisierte Mehrfachentwicklung (Automated Multiple Development)
b	Steigungsparameter der Dosis - Wirkungsbeziehung
$b_{i,j}$	Steigung der Regressionsgeraden der Substanz i in Probe j
c	Konzentration bzw. Flächenmasse (Dosis)
CH_2Cl_2	Dichlormethan
G-1	HPTLC/AMD Gradient 1 Kesslergrube
G-2	HPTLC/AMD Gradient 2 Kesslergrube
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
KG	Kesslergrube
log D	pH-abhängiger logarithmischer Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
log K_{OW}	logarithmischer Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
LW	Zweckverband Landeswasserversorgung
m	Masse
MeOH	Methanol

n	Pixelreihe im definierten Bereich P bzw. U (entspricht Laufstrecke bzw. Rf-Wert)
P	Probe
Rf	relative Fließstrecke
RIHV	reziprokes Isohemmvolumen
S-1	Serie 1 (Probenahmezeitraum 15.02. – 25.02.2010)
SPE	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)
TLC	Thin Layer Chromatography
U	Untergrund
UV/Vis	Ultraviolette- / sichtbares Licht
V(50)	Isohemmvolumen für EC ₅₀
WBA	Wirkungsbezogene Analytik

1 Aufgabenstellung

Der Zweckverband Landeswasserversorgung wurde im Rahmen der Grundwasserdetailuntersuchungen im Umfeld der Deponie „Kesslergrube“ bei Genzach-Wyhlen beauftragt, die wirkungsbezogene Analytik in Kopplung mit der Dünnschichtchromatographie anzuwenden. Indem die Wirkung zu einer Exposition erstmalig in das Untersuchungskonzept integriert ist, wird ein bisher in der Umweltanalytik kaum beachteter Aspekt für die Bewertung und Entscheidungsfindung mit herangezogen. Am Beispiel der Untersuchungen an dieser Deponie sollen die Durchführbarkeit, die Möglichkeiten und die Aussagekraft mit dem zusätzlichen Informationsgewinn der Methode aufgezeigt werden. Hierzu werden ausgewählte Proben mittels HPTLC/AMD und wirkungsbezogener Analytik (WBA) mit *Vibrio fischeri* untersucht.

2 Probenahme

Die Durchführung der Probenahme erfolgte in der Zeit vom 15.02.2010 bis zum 25.02.2010 durch den Auftraggeber. Als Probengefäße dienten bei 450 °C ausgeheizte 1 L Weißglasflaschen mit Teflondichtungskappen. Der Transport der Proben in das Labor erfolgte in Kühltaschen mittels eines Kurierdienstes. Dort wurde zur Kontrolle der Kühlkette die Eingangstemperatur ermittelt (siehe Tab. 2-1). Die Proben wurden im Kühlschrank (4 – 7 °C) bis zur Aufarbeitung gelagert.

Tabelle 2-1: Probenbezeichnung

Bezeichnung	Probenahme- datum	Temperatur bei Anlieferung im Labor
Blindwert 1	15.02.2010	3 °C
Blindwert 2	15.02.2010	3 °C
Blindwert 3	16.02.2010	10 °C
Blindwert 4	16.02.2010	10 °C
Br 49	16.02.2010	10 °C
CI 31	15.02.2010	3 °C
CI 32	15.02.2010	3 °C
CI 33	16.02.2010	10 °C
CI 34	15.02.2010	3 °C
CI 35	15.02.2010	3 °C
CI 36	16.02.2010	10 °C
CI 37	15.02.2010	3 °C
KE 20	16.02.2010	10 °C
KE 21	16.02.2010	10 °C
KE 22	15.02.2010	3 °C
KE 24	16.02.2010	10 °C
KE 25	16.02.2010	10 °C
KE 26	16.02.2010	10 °C
KE 28	17.02.2010	11 °C
KE 29	16.02.2010	10 °C
KE 30	16.02.2010	10 °C
KE 31	16.02.2010	10 °C
KE 32	16.02.2010	10 °C
KE 33	16.02.2010	10 °C
KE 34	16.02.2010	10 °C
KE 36	15.02.2010	3 °C
KE 40	16.02.2010	10 °C
KE 41	16.02.2010	10 °C
KE 42	25.02.2010	4 °C
KE 43	17.02.2010	11 °C
P 2	16.02.2010	10 °C
P 3	17.02.2010	11 °C
P 4	16.02.2010	10 °C
P 5	16.02.2010	10 °C
P 8	16.02.2010	10 °C
P 11	17.02.2010	11 °C
P 12	17.02.2010	11 °C
P 16a	16.02.2010	10 °C

3 Analysenverfahren und Auswertung

3.1 *Wirkungsbezogene Analytik mit *Vibrio fischeri* und HPTLC/AMD*

3.1.1 *Begriffserklärung und Prinzip der wirkungsbezogenen Analytik*

Die klassischen chemischen Analysenverfahren geben Aufschluss über die qualitative und quantitative Zusammensetzung einer Probe. Für die quantitative Bestimmung müssen die Analyten bekannt sein (Targetanalytik). Dagegen arbeiten biologische Testsysteme ausschließlich mit Wirkungen und Wirkungsäquivalenten, welche den summarischen Effekt aller Inhaltsstoffe der Wasserprobe betrachten. Die biologischen Testsysteme können je nach Selektivität und Empfindlichkeit der verwendeten Biomoleküle, Zellen, Organismen oder Populationen Aussagen über das Vorhandensein verschiedener biologisch wirksamer Substanzen treffen. Der Vorteil ist, dass auch unbekannte Substanzen, die ein Wirkpotenzial aufweisen und in ausreichender Konzentration vorhanden sind, im Gegensatz zur Targetanalytik, erfasst werden.

Beide analytischen Konzepte sind für die Umweltanalytik wichtig. Deshalb liegt es nahe, die Vorteile der beiden Konzepte in einem gemeinsamen Ansatz, der wirkungsbezogenen Analytik (WBA), zu vereinen. In der wirkungsbezogenen Analytik werden klassische analytische Methoden mit einem biologischen bzw. biochemischen System derart kombiniert, dass die nachgewiesenen Substanzen (Exposition) auch gleichzeitig in ihrer Wirkung erfasst werden. Bei der Kombination mit der HPLC ist eine aufwändige Fraktionierung erforderlich, während bei der Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC) die WBA direkt auf der Platte durchgeführt werden kann. Die gleichzeitige Erfassung von Exposition und deren Wirkung ist aufgrund der prächromatographischen Trennung möglich.

Der Leuchtbakterien-Biolumineszenzhemmtest mit *Vibrio fischeri* wird in der Abwasseranalytik klassisch als Küvettentest eingesetzt [1]. Im Küvettentest kann jedoch lediglich eine Summenwirkung der vorhandenen Substanzen erfasst werden. Die Biolumineszenz-Detektion nach Trennung auf einer Dünnschichtplatte ermöglicht jedoch ein differenzierteres, substanzspezifischeres Bild der Hemmung [2-7]. Der orts aufgelöste Hemmverlauf lässt sich mit einem bei der LW entwickelten Verfahren über die Probenbahn darstellen [7-10]. Damit hat diese Methode der wirkungsbezogenen Analytik gegenüber der bioanalytischen Methode des Leuchtbakterien-Biolumineszenzhemmtests in der Küvette deutliche Vorteile, beispielsweise eine wesentlich höhere Empfindlichkeit [11].

3.1.2 Leuchtbakterium *Vibrio fischeri*

Allgemeines

Vibrio fischeri wurde 1889 von Martinus Willem Beijerinck entdeckt. In geringen Konzentrationen kommt das Bakterium in allen Weltmeeren vor, wobei die Symbiose mit anderen Lebensformen besonders verbreitet ist. In Abb. 3-1 ist ein Beispiel einer solchen Symbiose abgebildet.

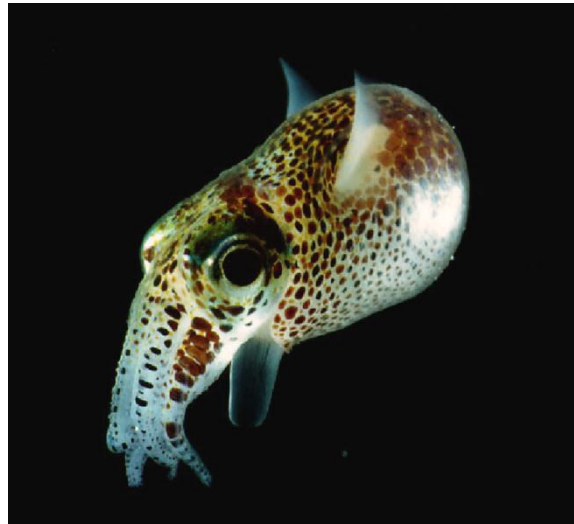


Abb. 3-1: *Vibrio fischeri* in Symbiose mit *Euprymna scolopes* (Hawaiianischer Tintenfisch)¹

In der Systematik der Lebewesen (Taxonomie) gehört dieses Bakterium zur Klasse der Gamma Proteobacteria und zur Gattung *Vibrio*. Auf der Grundlage von genetischen Untersuchungen schlagen Urbanczyk et al. (2007) vor das Leuchtbakterium neu zu klassifizieren und der Gattung *Aliivibrio* zuzuordnen [12]. Aufgrund der weiten Verbreitung wird hier der Name *Vibrio fischeri* beibehalten. *Vibrio fischeri* wird vom Gram-Test nicht gefärbt. Es lebt fakultativ aerob, d.h. es kann sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen wachsen. Zur Fortbewegung nutzt es Flagellen. Die Besonderheit dieses Bakteriums ist jedoch seine Fähigkeit zur Biolumineszenz. Als Biolumineszenz wird in der Biologie die Fähigkeit von Lebewesen genannt, entweder selbst oder mit Hilfe von Symbionten Licht zu erzeugen. Dieses Phänomen kann schon mit bloßem Auge deutlich wahrgenommen werden (Abb. 3-2).

¹M. J. McFall-Ngai und E. G. Ruby, University of Hawaii. Zur Verfügung gestellt von der National Science Foundation

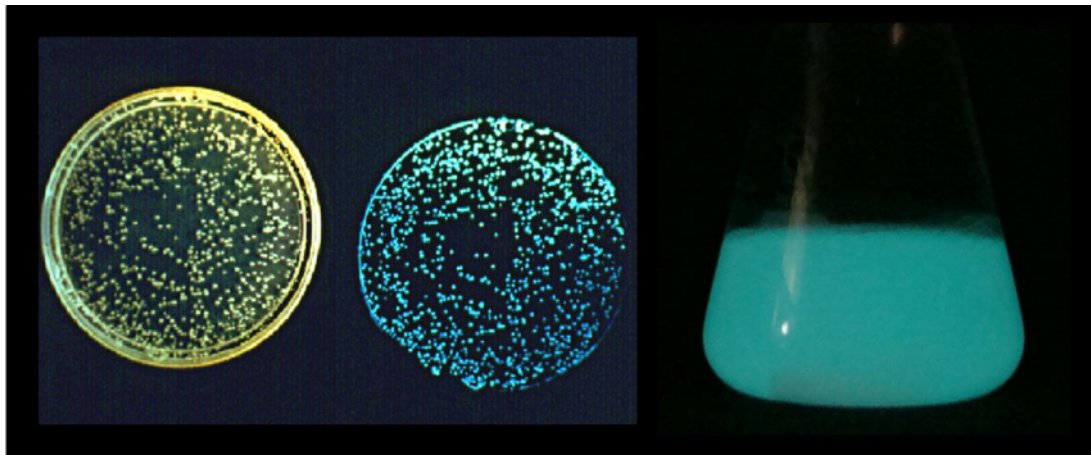


Abb. 3-2: Kolonien von *Vibrio fischeri* auf Agar unter Kunstlicht² (links) bzw. Eigenleuchten³ (Mitte) sowie Eigenleuchten einer Bakteriensuspension im Erlenmeyer-Kolben (rechts)

Da das Licht als freiwerdende Energie chemischer Prozesse abgegeben wird, handelt es sich bei der Biolumineszenz um eine spezielle Form der Chemilumineszenz. Die Biolumineszenz wird durch die mit dem Enzym Luciferase katalysierte Oxidation von Luciferin zu Oxiluciferin hervorgerufen. Dabei wird ein langkettiger Aldehyd zur korrespondierenden Säure oxidiert. Für die Synthese dieses Enzyms ist ein gewisser Schwellenkonzentration eines bestimmten Autoinduktors (Abb. 3-3) notwendig. Dieser Autoinduktor wird von den Bakterien als Stoffwechselprodukt ausgeschieden. Deshalb gibt es für das Leuchten einer Bakterienkultur eine gewisse Mindestzelldichte (ca. $10^{10} - 10^{11}$ Zellen/mL).

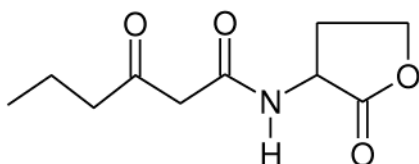


Abb. 3-3: Autoinduktor-Molekül N-(3-oxo)-hexanoyl-L-homoserine lactone für die Biolumineszenz von *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri zeigt im Gegensatz zum Glühwürmchen ein kontinuierliches Leuchten. Das emittierte Licht liegt in einem Wellenlängenbereich von 420 bis 630 nm. Die höchste spektrale Strahlungsdichte ist bei 490 nm. Die Tatsache, dass vom Bakterium kontinuierlich Licht

² W. Hastings, Harvard University, E. G. Ruby, University of Hawaii, zur Verfügung gestellt von der National Science Foundation

³ W. Hastings, Harvard University, E. G. Ruby, University of Hawaii, zur Verfügung gestellt von der National Science Foundation

emittiert wird und der Prozess der Lichterzeugung direkt mit dem Energiestoffwechsel verknüpft ist, machen *Vibrio fischeri* zu einem geeigneten Biotest-Organismus [13].

Stoffwechselprozess des Leuchtvorgangs

In der Natur gibt es viele Organismen die Biolumineszenz betreiben. Dabei werden von den Organismen unterschiedliche Enzym- und Substratstrukturen verwendet. Als gemeinsames Merkmal hat sich für das Leuchten lediglich die Notwendigkeit von Sauerstoff herausgestellt. Bei *Vibrio fischeri* wird das hellgrüne Leuchten durch eine vom Enzym Luciferase katalysierte Oxidation von reduziertem Flavinmononukleotid (FMNH₂) und einem langkettigen Aldehyd (RCHO) erzeugt (Abb. 3-4) [14]. Wie in der nachfolgenden Abbildung 3-4 gezeigt, bindet sich FMNH₂ an die Luciferase und reagiert mit Sauerstoff zum Peroxyflavin. Dieser Peroxyflavin-komplex wird von dem langkettigen Aldehyd zu einem relativ stabilen Zwischenprodukt reduziert. Das Zwischenprodukt zerfällt unter Lichtemission.

Die Nettoreaktion ist:

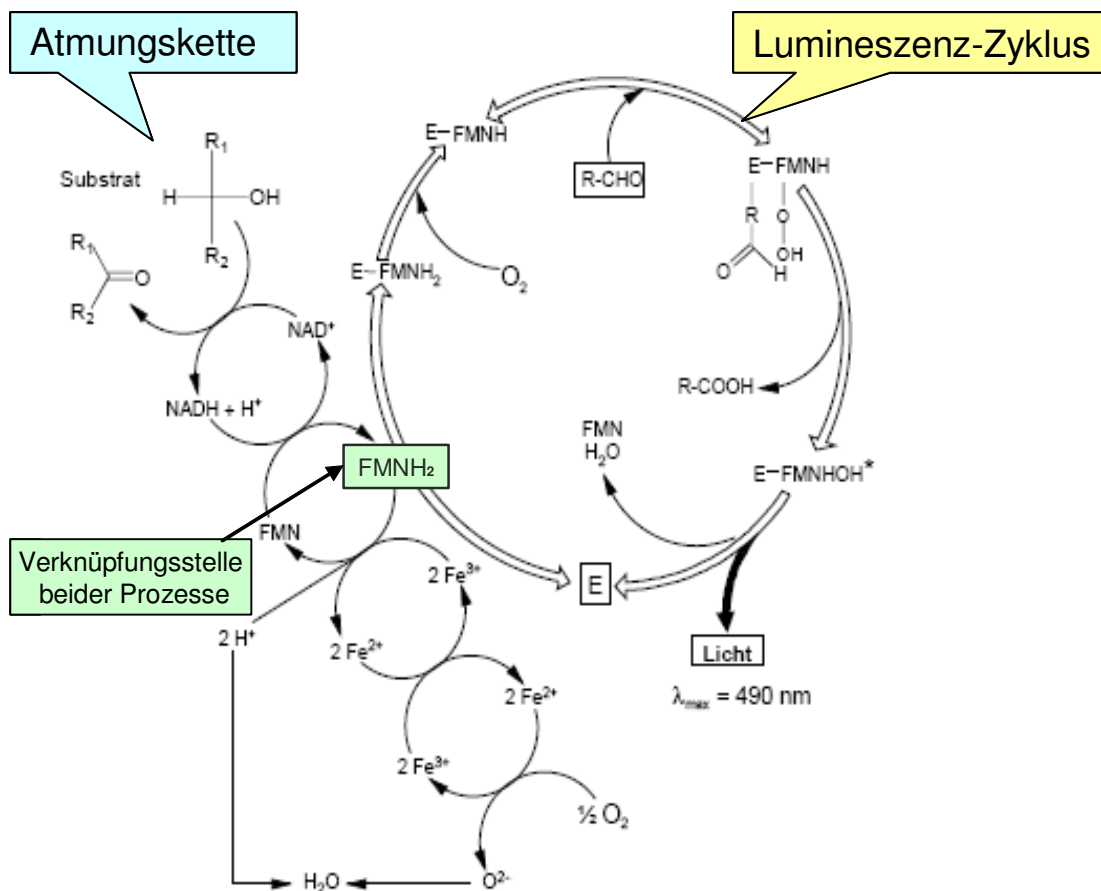
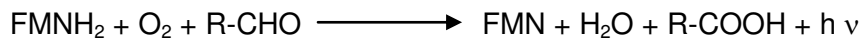


Abb. 3-4: Verknüpfung von Atmungskette und Lumineszenz-Zyklus [14]

Toxikologische Wirkungsweisen

Im Leuchtbakterientest äußert sich die toxikologische Wirkung (oder temporär toxische Wirkung) einer Substanz durch die Störung des Energiestoffwechsels. Es gibt für Substanzen viele Möglichkeiten, den Energiestoffwechsel negativ zu beeinflussen. Wichtige bekannte Wirkweisen sind: 1. narkotische Wirkung, 2. Entkopplung des Protonentransports durch die Membran und 3. Hemmung des Elektronentransports (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Übersicht toxikologische Wirkungsweisen [13]

	Wirkung	Wirkmechanismus
1	Narkotische Wirkung	Unspezifische Störung der Membran-Struktur
2	Entkopplung des Protonentransports durch die Membran	Beeinflussung des Protonengradienten
3	Hemmung des Elektronentransports	Besetzen von Bindungsstellen

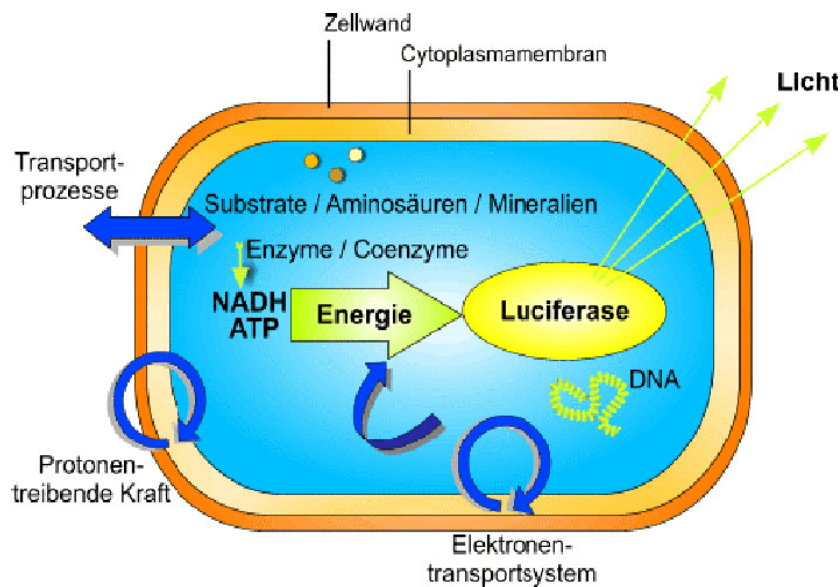


Abb. 3-5: Schematische Darstellung des Bakteriums und toxikologische Wirkeinflüsse [13]

Narkotische Wirkung

Die narkotische Wirkung, die so genannte Basistoxizität, entspricht der minimalen Toxizität jeder Chemikalie. Lipophile Moleküle diffundieren durch die Membran in das Bakterium und bilden ein Verteilungsgleichgewicht aus. Dabei stört die Chemikalie die Membranstruktur und die Membranfunktion, welche den Energiestoffwechsel und damit die Lumineszenz hemmt. Der basistoxische Effekt einer Substanz hängt von der Konzentration der in der Membran anwesenden Stoffe und somit lediglich von der Lipophilie und der Konzentration des Stoffes ab. Narkotisch wirkende Stoffe verhalten sich in Mischungen somit konzentrationsadditiv.

Entkopplung des Protonentransports durch die Membran

Eine weitere toxische Wirkung ist die Entkopplung des Protonentransports durch die Membran. Zellen können durch den Transport von Protonen durch Membranen Energie gewinnen. Für diesen Transport ist jedoch ein Protonengradient, also ein gewisses Konzentrationsgefälle von Protonen notwendig. Saure Substanzen können diesen Protonengradienten verändern und so die Energieversorgung der Zelle stören. Der Mechanismus lässt sich dabei wie folgt beschreiben: Ein saures Molekül, z.B. Phenol diffundiert von außen nach innen durch die Zellmembran, dort herrscht gegenüber „außen“ Protonenmangel. Das Phenol gibt sein Proton an die Umgebung im Membraninneren ab und das gebildete Phenolat diffundiert, getrieben vom elektrochemischen Potenzial der Membran, nach außen. Außerhalb herrscht Protonenüberschuss, das Phenolat wird zum Phenol protoniert und diffundiert abermals ins Innere zurück. Im Inneren der Zelle angekommen, wird das Proton abermals abgegeben und der Zyklus beginnt von neuem. Der Protonengradient, und damit das elektrochemische Potenzial, wird auf diese Weise verringert und so die Energieproduktion gehemmt.

Hemmung des Elektronentransports

Stoffe mit hohem Redoxpotenzial können den Elektronentransport direkt hemmen. Dabei reagieren die Stoffe entweder direkt oder über die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale mit Zellbestandteilen und stören so die Elektronenübertragung zellulärer Prozesse.

3.1.3 Die Methode HPTLC/AMD mit Biolumineszenz-Detektion

Die Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) in Kombination mit der automatisierten Mehrfachentwicklung (AMD) erlaubt eine vollständige Automatisierung der dünn-schichtchromatographischen Trenntechnik mit programmierbarer Mehrfachentwicklung sowie Gradientenelution und resultiert in einer, gegenüber der konventionellen Dünnschichtchromatographie (TLC), wesentlich verbesserten Trennleistung mit 20 bis 30 Basislinientrennungen pro Chromatogramm. Mehrwellenlängenmessungen bieten eine ausgezeichnete visuelle Auswertemöglichkeit; ebenso können UV/Vis-Spektren direkt in Remission aufgenommen

werden. Jede Substanz lässt sich somit durch ihr chromatographisches Verhalten und über ihre UV/Vis-Kenndaten (Spektrum) bestimmen. Interferenzen und Störsubstanzen können auf diese Weise leicht erkannt und eliminiert werden.

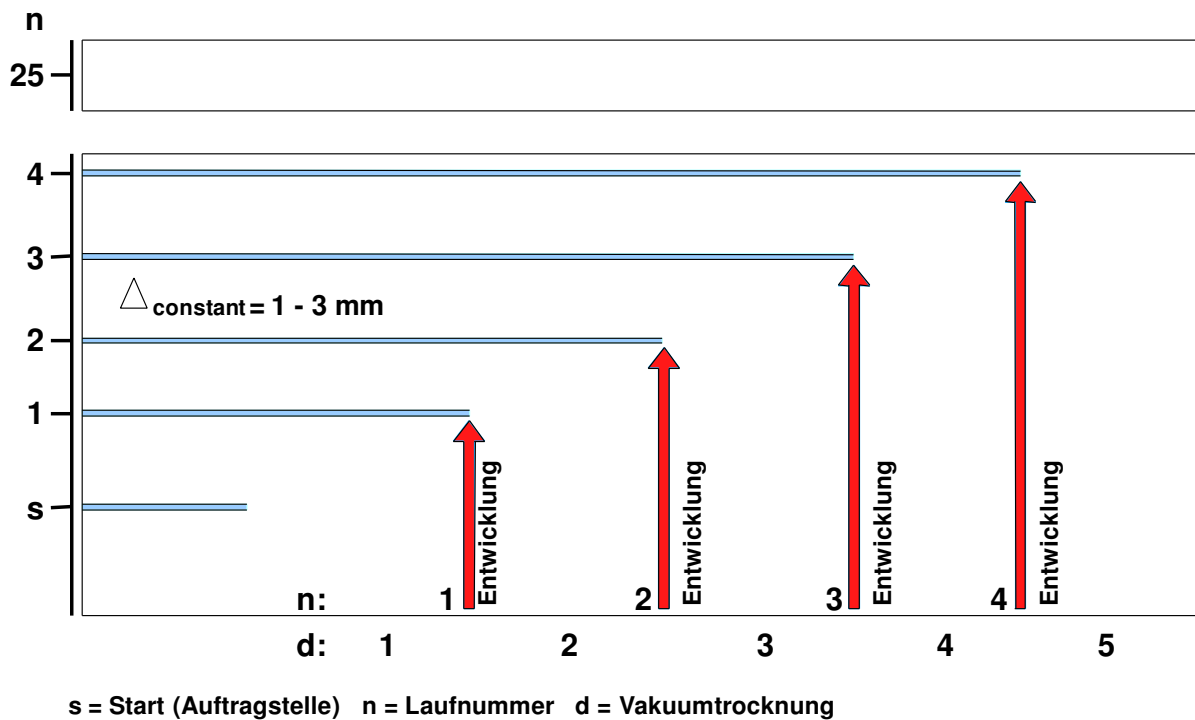
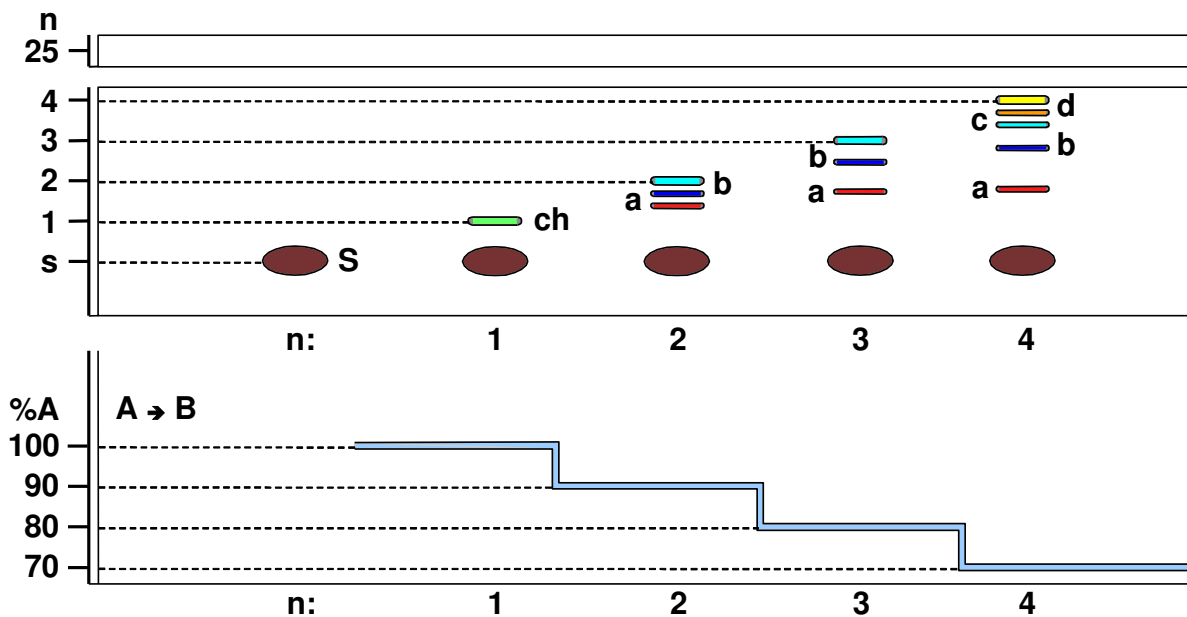


Abb. 3-6: Schematischer Ablauf der HPTLC/AMD

Bei der herkömmlichen Dünnschichtchromatographie erfolgt die Entwicklung der TLC-Platte in einer Stufe mit einer konstanten Fließmittelzusammensetzung. Bei der AMD-Technik nach K. Burger [15] hingegen läuft die chromatographische Entwicklung der HPTLC-Platte in vielen Teilschritten mit unterschiedlichen Fließmittelzusammensetzungen ab.

Üblicherweise werden bei der AMD-Technik bis zu 40 Einzelläufe durchgeführt. Wie in Abb. 3-6 dargestellt, ist die Laufstrecke jeder einzelnen Entwicklung um ein konstantes Inkrement länger als die Strecke des vorhergehenden Laufes. In der Regel wird bei jeder neuen Entwicklung um 1 bis 3 Millimeter weiter chromatographiert. Die Lauffähigkeit des Lösemittels auf der Platte lässt sich durch Trocknen zwischen den einzelnen Läufen erhalten. Hierzu wird das Fließmittel aus der Entwicklungskammer abgezogen und restliches Lösemittel nahezu vollständig durch Anlegen eines Unterdrucks aus dem Sorbens entfernt.



s = Start, n = Laufnummer, S = Startfleck,
 ch = chromatographierbarer Anteil der Probe, a - d = Komponenten aus der Probe,
 A → B = Elutionsmittelgradient von Fließmittel A nach B,
 A = polare Fließmittelkomponente, B = unpolare Fließmittelkomponente

Abb. 3-7: Schematische Darstellung der Vorgänge bei der Gradientenelution durch AMD (nach Burger [15])

Der AMD-Prozess beginnt mit einem Trocknungsschritt durch Evakuieren des Chromatographietanks. Dabei werden Lösemittelreste, sowie leichtflüchtige Analyten der aufgetragenen Probenlösungen aus dem Sorbens der HPTLC-Platte entfernt, da diese den Chromatographievorgang beeinflussen würden. Dann wird mit sauberer inerter Atmosphäre begast (N_2) und anschließend nach Einbringen des Fließmittels in den Tank der erste Lauf gestartet. Nach dessen Beendigung und auch nach allen folgenden Entwicklungen wird die mobile Phase aus der Kammer gesaugt und der nächste Zyklus beginnt mit Trocknung, Begasung und einer etwas längeren Laufstrecke. Dies wird so lange wiederholt, bis das gesamte vorgegebene Entwicklungsprogramm abgearbeitet ist. Die beschriebenen Arbeitsschritte werden vollautomatisch in der AMD Entwicklungseinheit durchgeführt (Abb. 3-8).

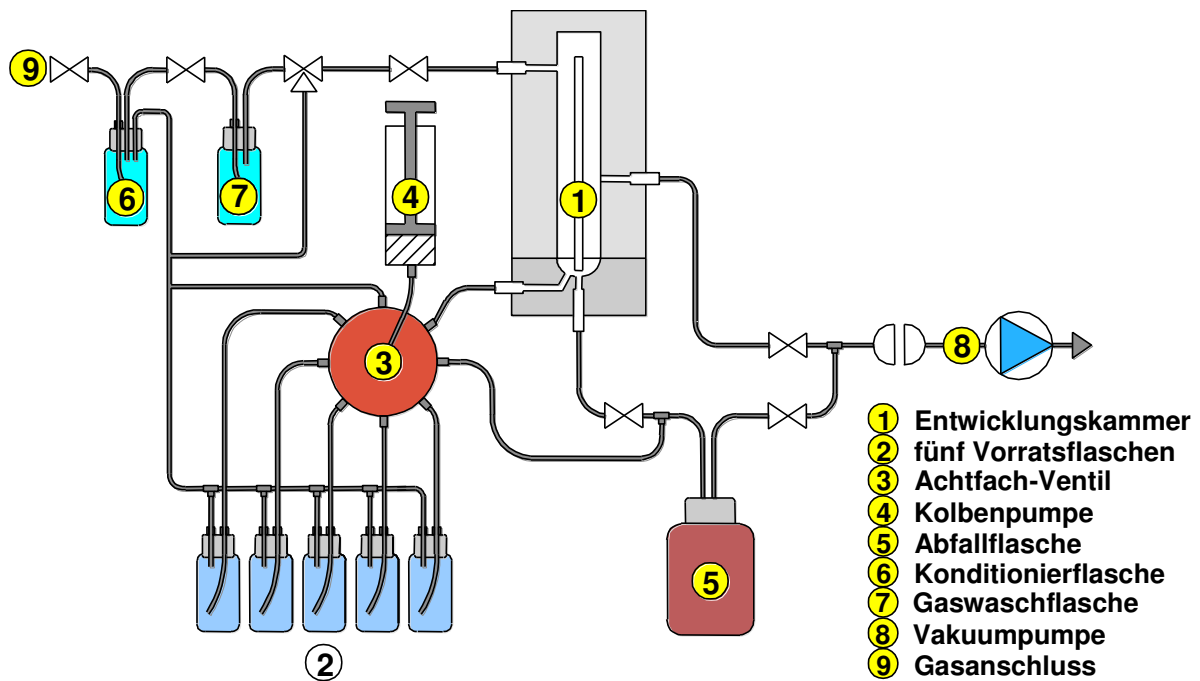


Abb. 3-8: Schema der HPTLC/AMD-Entwicklungseinheit

Weiterhin wird die Nachweisbarkeit der Substanzen gegenüber der konventionellen TLC durch einen Fokussierungseffekt erhöht. Bei jedem neuen Lauf werden die Substanzflecken von der Fließmittelfront überstrichen und dabei die Substanzen aus dem unteren Bereich der Bande früher verlagert als im oberen Bereich der Bande. (Abb. 3-9). Es wird somit der Bandenverbreiterung durch Diffusionseffekte während der Entwicklung entgegengewirkt und die Bandenbreite ist weitgehend unabhängig von der Laufstrecke und der Startbandenbreite.

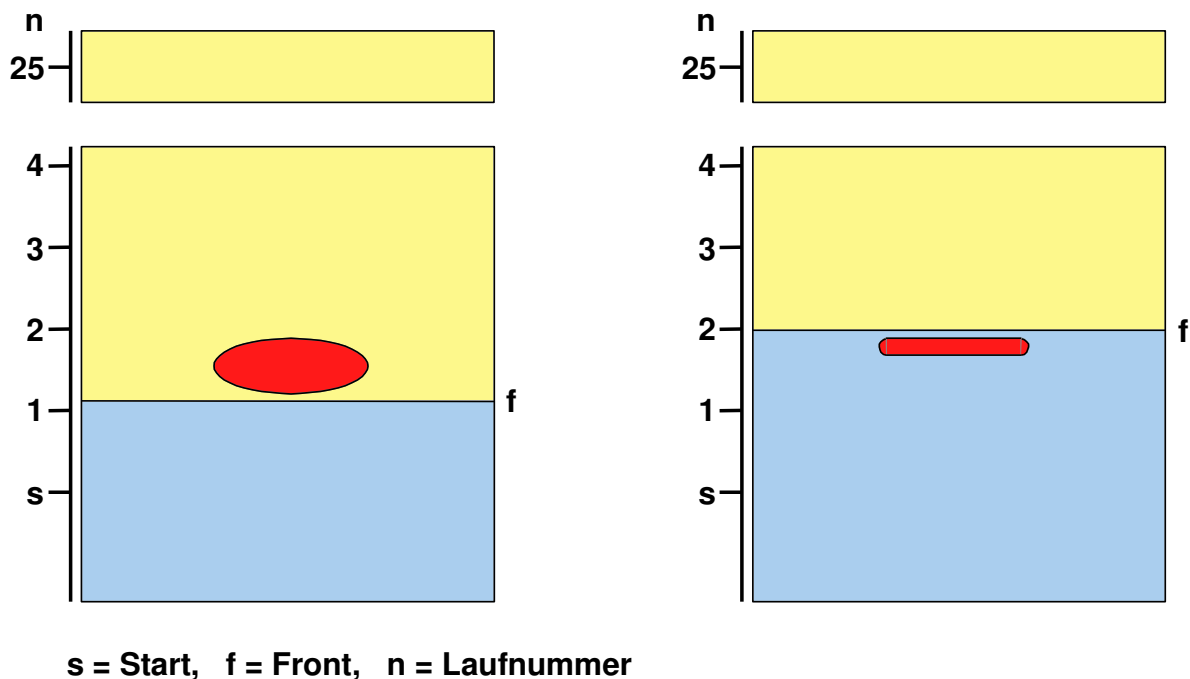


Abb. 3-9: Fokussierender Effekt der AMD bei der HPTLC

Nach der Entwicklung der HPTLC-Platte erfolgt die physikalisch-chemische Detektion. Um einen ersten Eindruck von der Probe auf der entwickelten Platte zu gewinnen, wird die Platte unter Weißlicht und zwei verschiedenen UV-Wellenlängen (254 nm und 366 nm) betrachtet. Unter Weißlicht sind nur farbige Substanzen zu erkennen. Wird die Platte unter einer Wellenlänge von $\lambda = 366$ nm betrachtet, sind dagegen Substanzen mit ihrer Eigenfluoreszenz sichtbar. Bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254$ nm wird der auf der Platte gebundene Fluoreszenzindikator zur Fluoreszenz angeregt. Substanzen, die in diesem Wellenlängenbereich Licht absorbieren, verursachen dunkle Banden auf bläulichem Hintergrund (Fluoreszenzlöschung). Zur Dokumentation des beschriebenen Eindrucks von den Platten werden diese jeweils mit dem Visualizer (Camag) bei verschiedenen Wellenlängen fotografiert. Zur detaillierten Untersuchung können alle UV/Vis-aktiven Substanzen durch das Messen der Remission über die Laufstrecken der Proben mittels eines Mehrwellenlängenscans ortsabhängig erfasst werden. Auch kann auf diese Weise die Fluoreszenz detektiert werden. Zudem ist die Aufnahme eines UV/Vis-Remissionsspektrums der einzelnen Substanzen möglich (TLC-Scanner 3, Camag). Diese verschiedenen physikalischen Detektionsverfahren werden in Abb. 3-11 gezeigt.

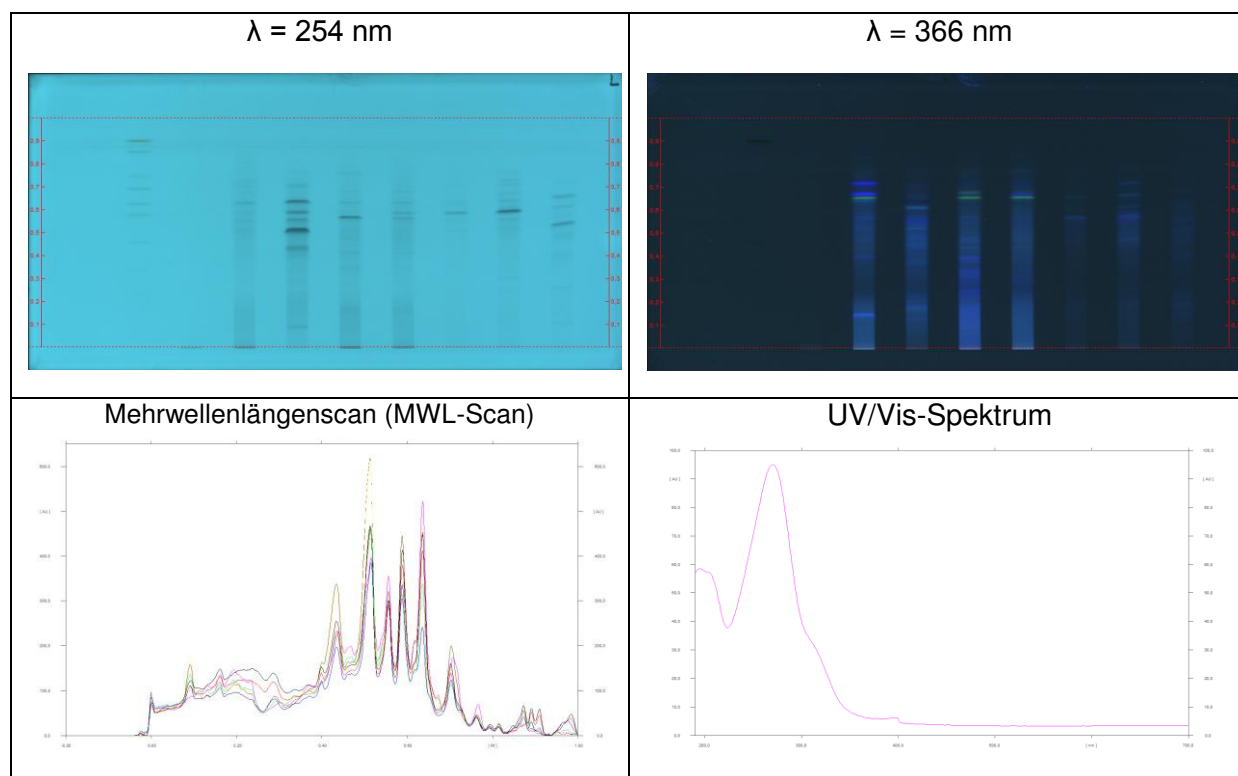


Abb. 3-10: Verschiedene physikalische Detektionsverfahren

Abb. 3-11 zeigt die einzelnen Phasen der HPTLC/AMD-Methode von der Auftragung über die Entwicklung bis zur Detektion.

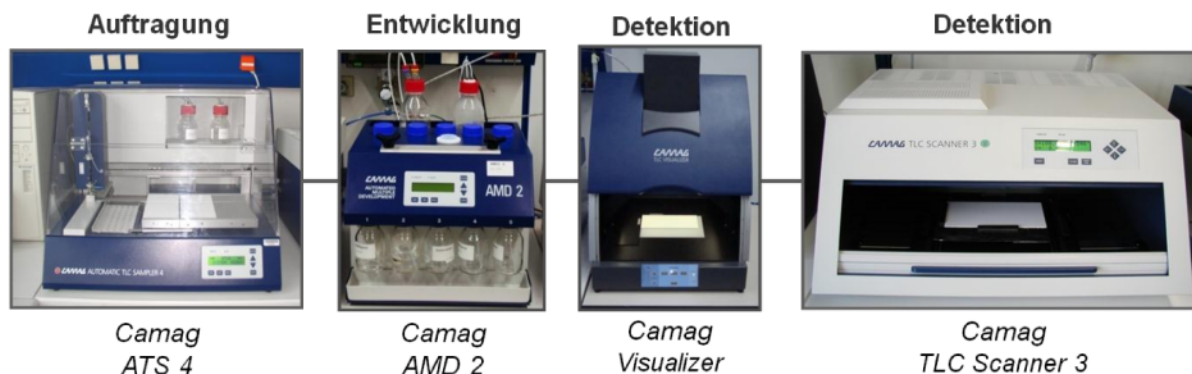


Abb. 3-11: Schematische Darstellung des Analysenverfahrens HPTLC/AMD mittels UV/Vis-Detektion

Für die Biolumineszenz-Detektion werden die entwickelten Chromatogramme mit dem „Chromatogram Immersion Device III“ (Camag) in eine Suspension mit *Vibrio fischeri* getaucht. Anschließend wird die Platte mit einem Gummiwischer vorsichtig und gleichmäßig von überstehender Flüssigkeit befreit und zur Detektion in eine Dunkelkammer mit Digitalkamera (Bioluminizer, Camag) eingelegt. Liegen Substanzen vor, die die Leuchtbakterien hemmen, so werden diese als dunkle Banden im Bild sichtbar. Die Vorgehensweise ist in Abb. 3-12 schematisch dargestellt.

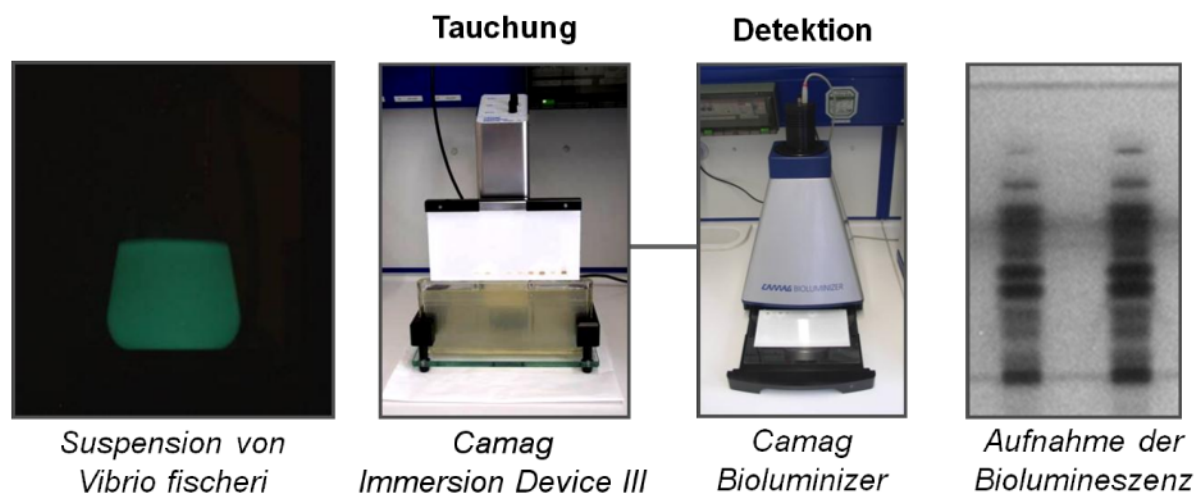


Abb. 3-12: Schematische Darstellung des Leuchtbakterientests auf der HPTLC-Platte

3.2 Ermittlung der Hemmung

Die Auswertung der mit dem Bioluminizer gewonnenen Digitalaufnahme erfolgt mit der Bildauswertesoftware (Gimp) und Microsoft Excel. Hierfür wird nacheinander ein Auswertefenster über das Bild der Laufstrecke (P) einer Probenbahn, sowie den dazugehörigen linken und rechten Untergrundbahn (U) gelegt (s. Abb. 3-13). Die ortsabhängigen Graustufen zwischen 0 (schwarz) und 255 (weiß), im Folgenden als Intensität i bezeichnet, werden in ein Excel-Arbeitsblatt übertragen.

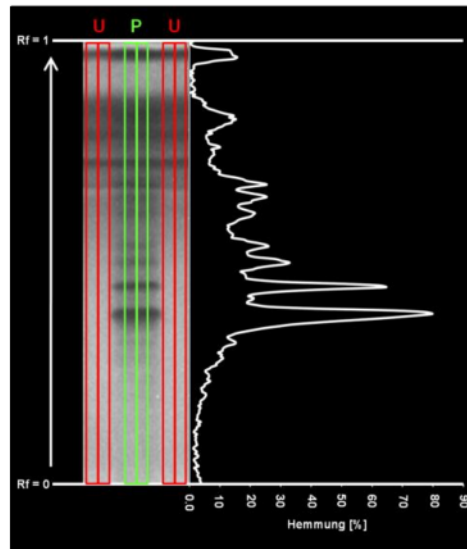


Abb. 3-13 Darstellung der Lage von Untergrundbahn (U) und Probenbahn (P) zur Ermittlung der ortsabhängigen Hemmung H_n^P

Aus diesen Daten wird die ortsabhängige Hemmung nach Gl. 1 und Gl. 2 berechnet. Der Untergrund i_n^U ergibt sich als Mittelwert vom linken und rechten Untergrundwert.

$$i_n^U = \frac{i_n^{U(\text{links})} + i_n^{U(\text{rechts})}}{2} \quad (\text{Gl. 1})$$

$$H_n^P = \left(1 - \frac{i_n^P}{i_n^U} \right) \cdot 100\% \quad (\text{Gl. 2})$$

i_n^U ortsabhängige Untergrundintensität (Graustufen 0 – 255)

i_n^P ortsabhängige Probenintensität (Graustufen 0 – 255)

H_n^P : ortsabhängige Hemmung (%)

H_i Hemmung der Bande i (%)

P: Probe

U: Untergrund

n: Pixelreihe im definierten Bereich P bzw. U (entspricht Laufstrecke bzw. Rf-Wert)

Grundlage für die Berechnung der ortsabhängigen Hemmung ist Gl. 3 für die Berechnung der Hemmung bei Anwendung des Leuchtbakterien-Küvettentests [16].

$$H = \frac{I_0 - I_t}{I_0} \cdot 100\% \quad (\text{Gl. 3})$$

H: Hemmung (%)

I_0 : Lichtintensität der Referenzprobe (Probe ohne Wirksubstanz)

I_t : Lichtintensität der Probe nach der Inkubationszeit t (z. B. 30 min)

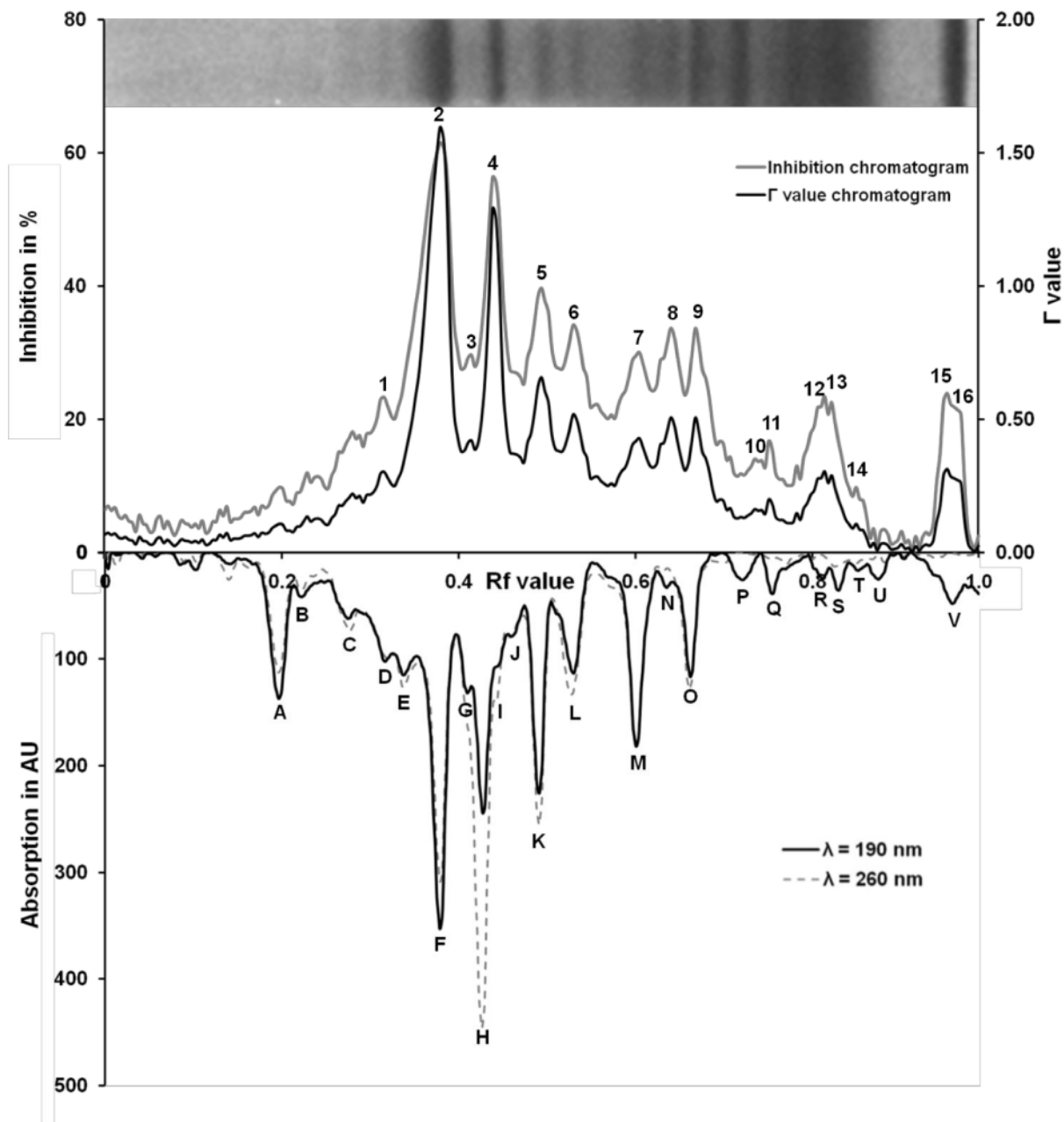


Abb. 3-14: Vergleich des Hemmwert-Chromatogramms bzw. Γ – Wert-Chromatogramms mit dem UV Chromatogramm einer Probe

Wird zusätzlich zur Hemmung der Gamma-Wert (Γ -Wert = $\text{Hemmung [\%]} / 100 - \text{Hemmung [\%]}$) orts aufgelöst abgetragen und werden beide miteinander verglichen, kann festgestellt werden, dass sich die Bandenbreite im Γ -Wert-Chromatogramm der Breite der Banden im UV-Chromatogramm annähert. Dies ist auf den sigmoiden Verlauf der Dosis-Wirkungsbeziehung zurückzuführen, der durch den Γ -Wert ausgeglichen wird [7] (Abb. 3-14). Daher wird der Γ -Wert immer für die ortsabhängig Darstellung der Stärke der Hemmung herangezogen. Auf den Γ -Wert soll später in Kapitel 3.4 genauer eingegangen werden.

3.3 Dosis-Wirkungsbeziehung

In Abb. 3-15 sind beispielhaft für die Dosis-Wirkungsbeziehung Chloridazon (Herbizid) und dessen zwei Metabolite Desphenyl-chloridazon und Methyl-desphenyl-chloridazon dargestellt. Die Ermittlung der Hemmung erfolgte über die Auftragung der reinen Substanzen auf die Dünnschichtplatte (ohne Chromatographie) mit anschließender Tauchung in die Leuchtbakteriensuspension. Die relevante Dosisgröße ist die Masse der aufgetragenen Substanz pro Fläche (Flächenmasse ng/cm²).

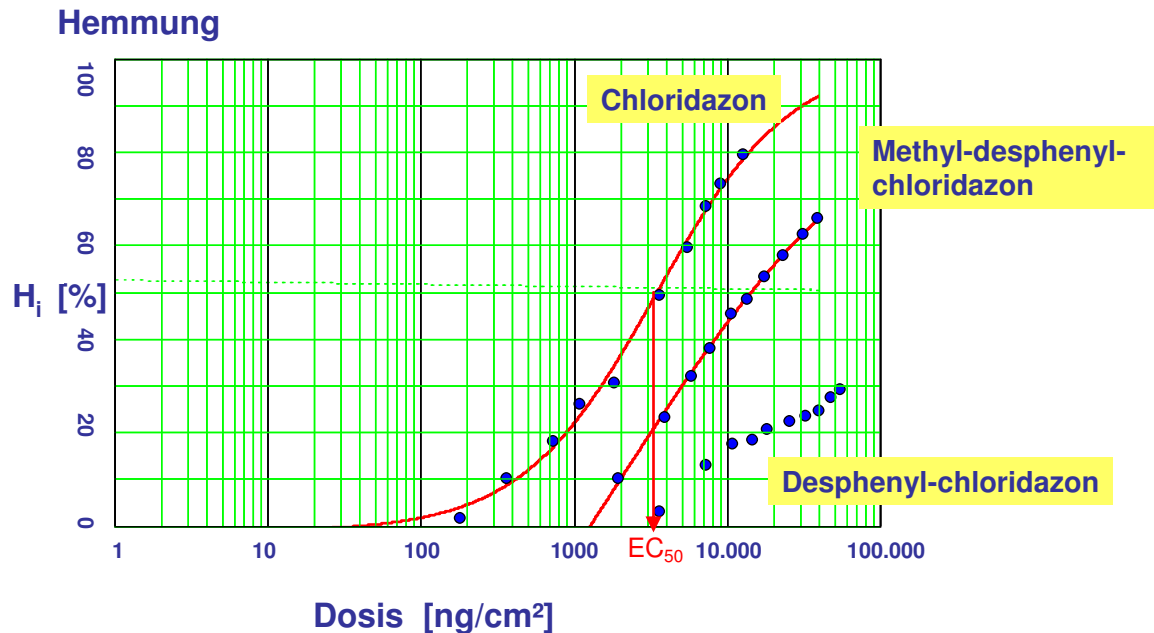


Abb. 3-15: Dosis-Wirkungsbeziehung für drei unterschiedlichen Substanzen ermittelt mittels HPTLC und wirkungsbezogener Detektion mit *Vibrio fischeri*

Die Beschreibung des sigmoidalen Verlaufs der Hemmung H als Funktion der Dosis c erfolgt durch Gl. 5. Die Konstante a ist der so genannte Lageparameter, die Konstante b der Steigungsparameter und die Konstante k die so genannte Kontrolle. Im Allgemeinen wird die Kontrolle $k = 0$ gesetzt.

$$H_i = k + \frac{1 - k}{1 + e^{[a - b \ln c]}} \quad (\text{Gl. 5})$$

H_i : Hemmung der Substanzbande i [-]

k : Wirkung der Kontrolle [-]

a : Lageparameter der Dosis-Wirkungsbeziehung [-]

b : Steigungsparameter der Dosis-Wirkungsbeziehung [-]

c : Konzentration bzw. Flächenmasse (Dosis) [-]

Die Parameter k , a und b sind wie H_i dimensionslos. Da in Gl. 5 die Dosis c als Argument vom Logarithmus steht, wird die Dosis als Vielfaches einer Standard-Dosis beispielsweise $1 \mu\text{g/mL}$ oder 1 ng/cm^2 angegeben. Daraus folgt für die Parameter die dimensionslose Einheit. Zu beachten ist, dass die Größe der Parameter von der verwendeten Basis des Logarithmus abhängt.

Der EC_{50} -Wert berechnet sich aus der Gleichung für die Dosis-Wirkungsbeziehung (Gl. 5) nach Gl. 6:

$$\text{EC}_{50} = e^{a/b} (1 - 2k)^{1/b} \qquad \text{EC}_{50} = e^{a/b} \quad \text{für } k = 0 \qquad (\text{Gl. 6})$$

EC_{50} : Effekt Konzentration für 50 % Hemmung $H_i = 0,5$ (Einheit der Standard-Dosis
z. B. $\mu\text{g/mL}$ oder ng/cm^2)

In der Abb. 3-15 ist die Kurvenanpassung nach Gl. 5 rot eingezeichnet. Über den EC_{50} -Wert ist ein Vergleich der Toxizität gegenüber Leuchtbakterien von Substanzen möglich.

3.4 ***Halbquantitativer Vergleich der Hemmbanden***

Ein halbquantitativer Vergleich der Dünnschichtchromatogramme mit wirkungsbezogener Detektion unter Verwendung der Leuchtbakterien *Vibrio fischeri* erforderte die Entwicklung eines neuen Auswerteverfahrens. Die Ursache liegt in folgenden drei Punkten begründet:

- Die Hemmung der Leuchtbakterien korreliert nicht linear mit der Konzentration bzw. Substanzmenge (siehe Abschn. 3.3). Der Zusammenhang ist durch einen s-förmigen Verlauf der Dosis-Wirkungsbeziehung gegeben. Dies bewirkt eine geringere Empfindlichkeit bei kleineren bzw. größeren Konzentrationen bzw. Massen relativ zum EC_{50} -Wert.
- Jede Substanz zeigt eine unterschiedliche Dosis-Wirkungsbeziehung. Diese ist charakterisiert durch den Lageparameter a und den Steigungsparameter b .
- Bei der Untersuchung von realen Proben sind die Substanzen im Allgemeinen unbekannt und somit liegen auch keine Daten zur Dosis-Wirkungsbeziehung vor. Hinzu kommt, dass die Konzentrationen der Substanzen in den einzelnen Proben unbekannt sind oder dass es sich bei einzelnen Banden um ein Substanzgemisch handelt.

Deshalb kann der Vergleich von unterschiedlichen Proben nicht auf Basis der ermittelten Hemmung für die einzelnen Substanzbanden erfolgen. Dies ist der grundlegende Unterschied zur Detektion mittels UV-Absorption. Hier können die Absorptionen der einzelnen Substanzbanden unterschiedlicher Proben direkt miteinander verglichen und gegebenenfalls mit den unterschiedlichen Auftragevolumen korrigiert werden. Dies ist aufgrund der linearen Beziehung zwischen Absorption und Substanzkonzentration bzw. Masse möglich.

Zur Ermittlung der Dosis-Wirkungsbeziehung (Response-Kurve) einer Substanzbande ist eine Linearisierung des s-förmigen Verlaufs zweckmäßig. In der Literatur ist dies durch die Einführung des Gammawertes (Γ) beschrieben. Die Definition des Γ -Wertes ist laut Gl. 7:

$$\Gamma = \frac{H}{100 - H} \quad (\text{Gl. 7})$$

Durch Verwendung des Gammawertes ergibt sich nach einsetzen von H aus Gl.5 eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Γ -Wertes und dem Logarithmus der Dosis (Gl. 8).

$$\lg \Gamma_{i,j} = a_{i,j} + b_{i,j} \cdot \lg V_{i,j} \quad (\text{Gl. 8})$$

H = Hemmung[%]

$V_{i,j}$ = Auftragevolumen[μL]

Γ = Gammawert

i = Bande bzw. chromatographierte Substanz

j = Probenextrakt

$a_{i,j}$ = Achsenabschnitt

$b_{i,j}$ = Steigung

Als Dosis wird das auf die Dünnschichtplatte aufgetragene Probenvolumen eingesetzt. Die Hemmwirkung auf der Dünnschichtplatte ist der Flächenmasse (Masse Substanz pro Fläche) proportional und damit dem aufgetragenen Probenvolumen (Gl. 9).

$$H_i \approx m_i = c_i \cdot V_i \quad (\text{Gl. 9})$$

Zur Unterscheidung der Substanzbanden (charakterisiert durch den Rf-Wert) wird der Index i verwendet. Unterschiedliche Extrakte, in denen die Substanz i enthalten ist, werden durch den Index j (Probenextrakt) unterschieden.

$$H = 50\% \rightarrow \Gamma = 1 \rightarrow 0 = a_{i,j} + b_{i,j} \cdot \lg V_{i,j}(50) \quad (\text{Gl. 10})$$

Das Volumen $V_{i,j}(50)$ entspricht somit dem Auftragevolumen des Probenextraktes j , welcher eine Hemmung von 50 % für die Substanz i auf der Dünnschichtplatte hervorruft. In Abb. 3-16 ist die Abhängigkeit des Logarithmus vom Gammawert und vom Auftragevolumen für unterschiedliche Substanzbanden einer Probe dargestellt. Der Schnittpunkt mit der x-Achse ($\log(V)$) ergibt sich durch umformen der Gl. 10 wie folgt:

$$V_{i,j}(50) = 10^{-a_{i,j}/b_{i,j}} \quad (\text{Gl. 11})$$

Die Konzentration $c_{i,j}$ der Substanz i in dem Probenextrakt j erlaubt gemäß Gl. 12 aus dem Volumen $V(50)$ die entsprechende Masse $m(50)$ zu berechnen.

$$m_{i,j}(50) = c_{i,j} \cdot V_{i,j}(50) \quad (\text{Gl. 12})$$

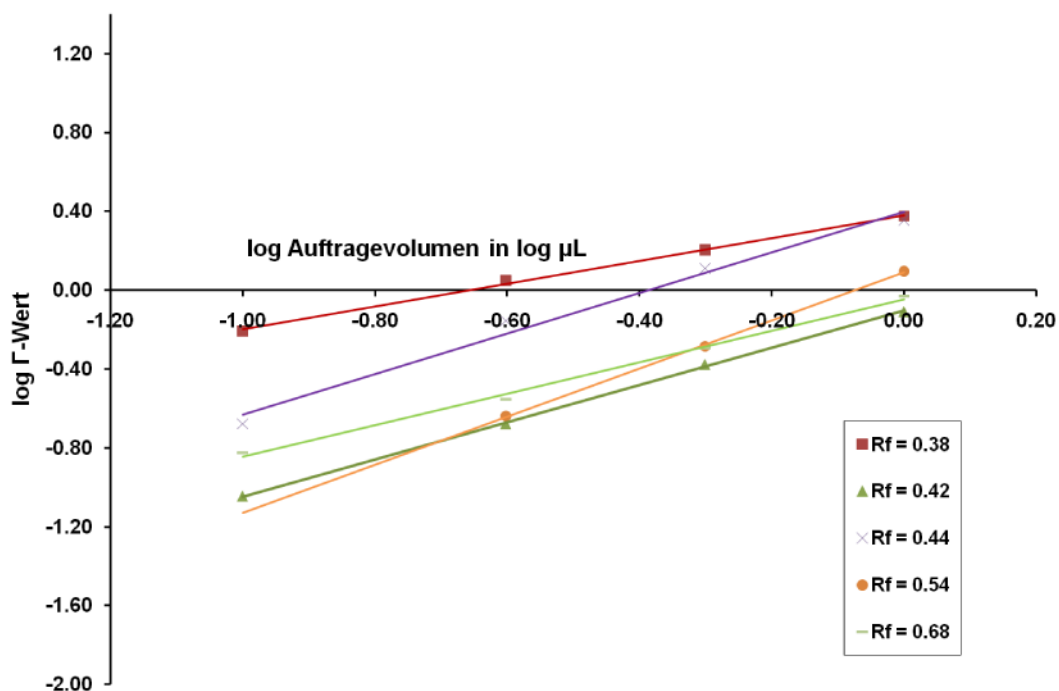


Abb. 3-16: Abhängigkeit von Gammawert und Auftragevolumen für unterschiedliche Substanzbanden in doppellogarithmischer Darstellung

Für die Substanz i in zwei unterschiedlichen Proben $j = 1$ und $j = 2$ gilt nach Gl. 12:

$$\begin{aligned} m_{i,1}(50) &= c_{i,1} \cdot V_{i,1}(50) \\ m_{i,2}(50) &= c_{i,2} \cdot V_{i,2}(50) \end{aligned} \quad (\text{Gl. 13})$$

Bei einer identischen Hemmung von 50 % der Proben $j = 1$ und $j = 2$ für die Substanz i folgt zwangsläufig, dass die entsprechenden Massen gleich sein müssen (Gl. 14):

$$m_{i,1}(50) = m_{i,2}(50) \quad \text{gleiche Hemmung (Gl. 14)}$$

Damit ergibt sich für das Konzentrationsverhältnis der Substanz i in den Probenextrakten $j = 1$ und $j = 2$ Gl. 15:

$$c_{i,1} \cdot V_{i,1}(50) = c_{i,2} \cdot V_{i,2}(50)$$

$$\frac{c_{i,1}}{c_{i,2}} = \frac{\frac{1}{V_{i,1}(50)}}{\frac{1}{V_{i,2}(50)}} \quad (\text{Gl. 15})$$

Gleichung 15 zeigt die umgekehrte Proportionalität des Volumens $V(50)$ zu der Konzentration der Substanz i in den zu vergleichenden Proben $j = 1$ und $j = 2$. Der $V(50)$ -Wert wird im Folgenden Isohemmvolumen, der $1/V(50)$ -Wert als reziprokes Isohemmvolumen (RIHV) bezeichnet. Das RIHV ist direkt proportional zur Konzentration der Substanz i in der jeweiligen Probe (siehe Gln. 15) und gibt an welches Volumen einer Probe aufgetragen werden muss, damit für eine bestimmte Hemmbande die Hemmung von 50 % erreicht wird. Die Ermittlung des RIHV ermöglicht somit den Vergleich (Konzentrationsverhältnis) unterschiedlicher Proben unabhängig vom Auftragevolumen auf die Dünnschichtplatte. Je größer der RIHV-Wert ist, desto kleiner ist das benötigte Volumen zum Erreichen des EC_{50} -Wertes und desto größer ist die Konzentration des hemmenden Stoffes i im Extrakt der zu vergleichenden Proben.

In Abb. 3-17 ist beispielhaft das Ergebnis der Auswertung einer Probe von einer HPTLC Platte nach dem oben beschriebenen Verfahren dargestellt.

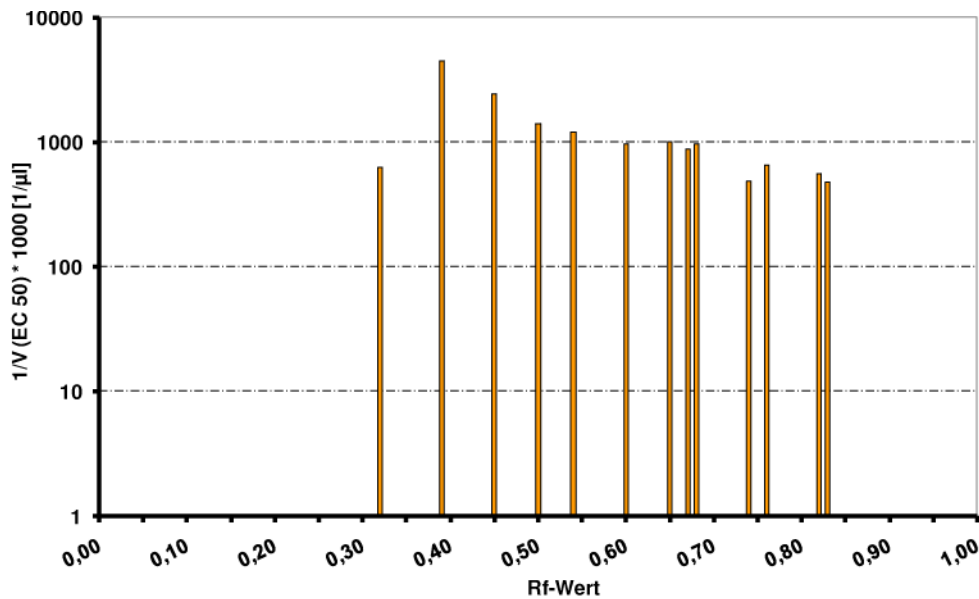


Abb. 3-17 Prinzipielle Darstellung der Auswertung mittels reziprokem Isohemmvolumen (RIHV) eines Dünnschichtchromatogramms mit wirkungsbezogener Detektion

In Abhängigkeit des Rf-Wertes ist das RIHV logarithmisch für die einzelnen Banden einer Probe als Balken eingezeichnet. Die Multiplikation mit dem Faktor 1000 dient lediglich der besseren Handhabung der Zahlenwerte. Durch den Bezug auf dieselbe Hemmung von 50 % können unterschiedlichen Proben anhand ihrer Balkendiagramme verglichen werden.

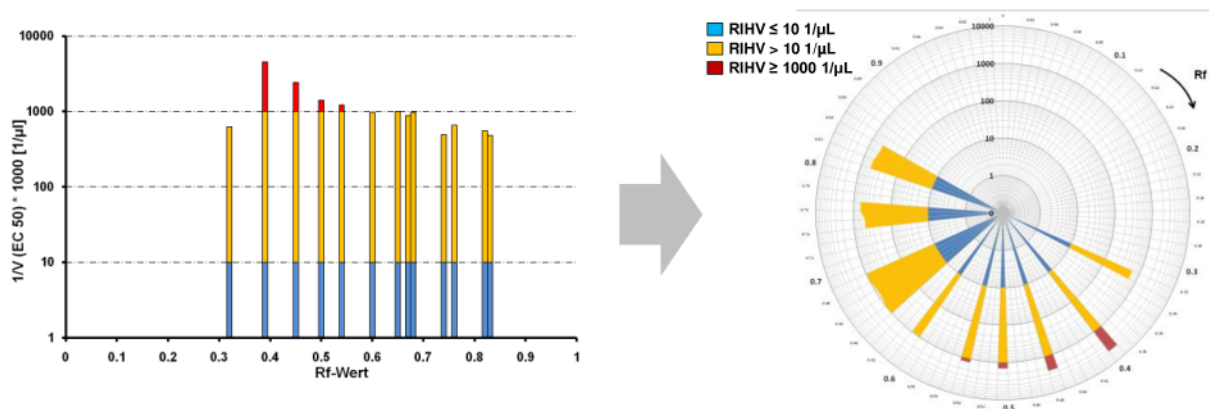


Abb. 3-18: Darstellung der RIHV-Werte (logarithmisch) in einem Polardiagramm

Für den besseren Abgleich der Probenmuster wird ein logarithmisches Polardiagramm verwendet. Dazu werden die Rf-Werte mit den dazugehörigen RIHV-Werten im Uhrzeigersinn von 0 bis 1 abgetragen (Abb. 3-18). Zur Verdeutlichung der logarithmischen Skalierung wurden drei Farbabstufungen für die Größe des mit 1000 multiplizierten RIHV-Wertes eingeführt. Blau für RIHV-Werte $\leq 10 \cdot [1000 \text{ 1/}\mu\text{L}]$, Gelb $> 10 \cdot [1000 \text{ 1/}\mu\text{L}]$ und Rot für Werte $\geq 1000 \cdot [1000 \text{ 1/}\mu\text{L}]$.

3.5 *Polaritätsabschätzung von Hemmbanden*

Zuerst wurden die Proben mit einem Übersichtsgradienten (Gradient 1, G-1) analysiert. Dabei zeigte sich, dass die meisten Substanzen, die eine Biolumineszenzhemmung auslösen, sich im R_f -Bereich von 0,5 bis 0,9 befinden. Zur Verbesserung der Trennung wurde ein zweiter Gradient (Gradient 2, G-2) entwickelt. In Abb. 3-19 ist das Ergebnis beider Gradienten exemplarisch für den Probenextrakt der Probenahmeestelle P12 gegenübergestellt. Die verbesserte Trennung des Gradienten 2 gegenüber dem Gradienten 1 ist deutlich zu erkennen. Es sind neue aufgetrennte Banden und dadurch bedingt unterschiedliche Schwärzungen ersichtlich.

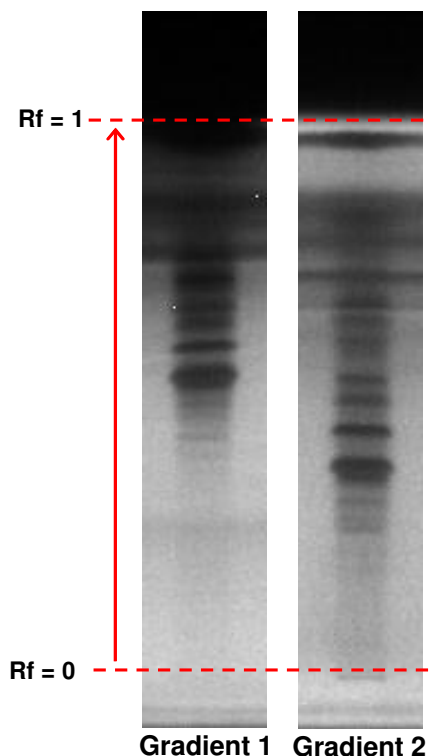


Abb. 3-19: Vergleich der AMD-Gradienten 1 und 2 an der Probe P12

Vor jeder Entwicklung wurde eine Mischung aus 9 Substanzen zusätzlich zu den Proben auf die HPTLC-Platte aufgetragen. Diese Mischung wird im Folgenden Kontroll-Mix genannt und besteht aus den in Tabelle 3-2 aufgelisteten Stoffen. Anhand dieses Kontroll-Mixes kann die Stabilität der chromatographischen Entwicklung beurteilt werden. Zusätzlich ist es möglich, mit Hilfe der R_f -Werte der einzelnen Verbindung aus dem Kontroll-Mix, den HPTLC/AMD-Gradienten zu charakterisieren. Abb. 3-21 zeigt den Vergleich der Gradienten 1 und 2 für das chromatographische Verhalten der Substanzen des Kontroll-Mixes. Besonders die Naphthalinsulfonsäuren (1-3) bzw. Thioharnstoff (4) und Theobromin (5) wurden durch den Gradient 2 im Vergleich zu Gradient 1 stark in den vorderen R_f -Bereich verschoben.

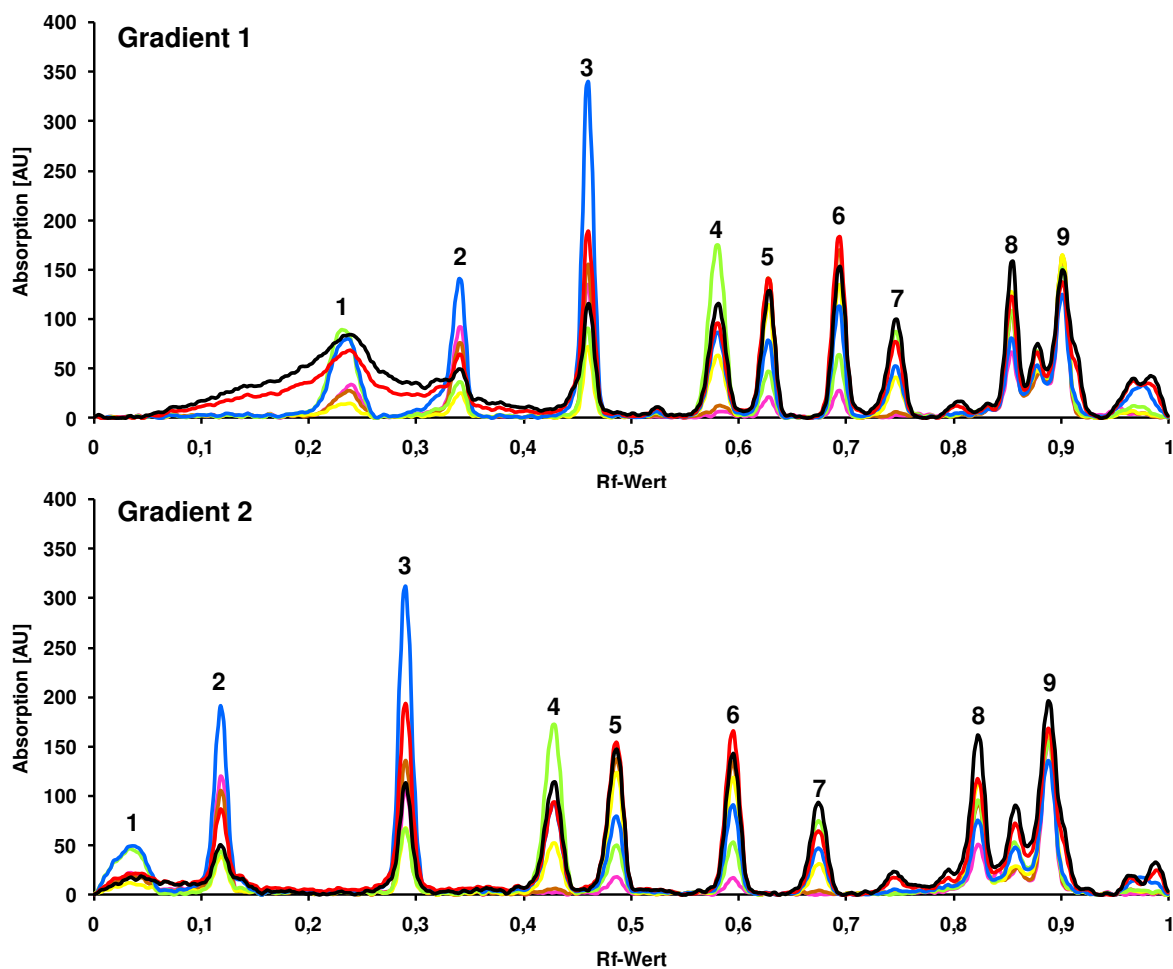


Abb. 3-20: Vergleich der Gradienten anhand des Retentionsverhalten des Kontroll-Mixes

Tabelle 3-2: Zusammensetzung Kontroll-Mix

Nr.	Substanz	CAS	log K _{ow}	Rf-Wert Gradient 1	Rf-Wert Gradient 2
1	1,3,6-Naphthalintrisulfonsäure	86-66-8		0,23	0,04
2	1,5-Naphthalindisulfonsäure	81-04-9		0,34	0,12
3	1-Naphthalinsulfonsäure	85-47-2		0,46	0,29
4	Thioharnstoff	62-56-6	-0,95	0,58	0,43
5	Theobromin	83-67-0	-0,52	0,63	0,49
6	Coffein	58-08-2	-0,07	0,69	0,59
7	Acetanilid	103-84-4	1,16	0,74	0,67
8	Benzanilid	93-98-1	3,07	0,85	0,82
9	Dimethylgelb	60-11-7	4,14	0,90	0,89

Die Polarität der Substanzen aus dem Kontroll-Mix können mit dem Verteilungskoeffizient zwischen n-Octanol und Wasser (K_{OW}) bzw. mit dem dekadischen Logarithmus des Verteilungskoeffizienten ($\log K_{OW}$) beschrieben werden.

$$\log K_{OW} = \log \frac{c_{n-Octanol}}{c_{Wasser}} \quad (\text{Gl. 16})$$

Der $\log K_{OW}$ -Wert gibt das Verhältnis der Konzentrationen eines Stoffes im Zweiphasensystem n-Octanol und Wasser an. Je kleiner der $\log K_{OW}$ -Wert desto wasserlöslicher ist eine Substanz. Anhand der $\log K_{OW}$ -Werte der Verbindungen des Kontroll-Mixes und deren Retentionsverhalten bei der HPTLC/AMD lassen sich die Polaritäten von Substanzen abschätzen. Für einen schnellen Vergleich zwischen der Lage der Hemmbanden und den Banden der Kontroll-Mix-Substanzen wurden letztere auch in ein R_f -Polardiagramm für den Gradienten 2 abgetragen (Abb. 3-22). Für die Naphthalinsulfonsäuren lässt sich kein $\log K_{OW}$ -Wert angeben, da deren n-Octanol/Wasser-Verteilungsgleichgewicht vom pH-Wert abhängig ist. Zur Polaritätsbeschreibung dieser Substanzen wird der pH-abhängige $\log D$ -Wert herangezogen.

$$\log D = \log \frac{K_{OW}}{1 + 10^{pH - pK_a}} \quad (\text{Gl. 17})$$

Da während der Gradientenelution sich der pH-Wert ändert, kann für die Naphthalinsulfonsäuren keine direkte Zuordnung zu einem $\log D$ -Wert getroffen werden. Deshalb ist in Abb. 3-21 der R_f -Bereich der stark polaren Verbindungen rot umrandet.

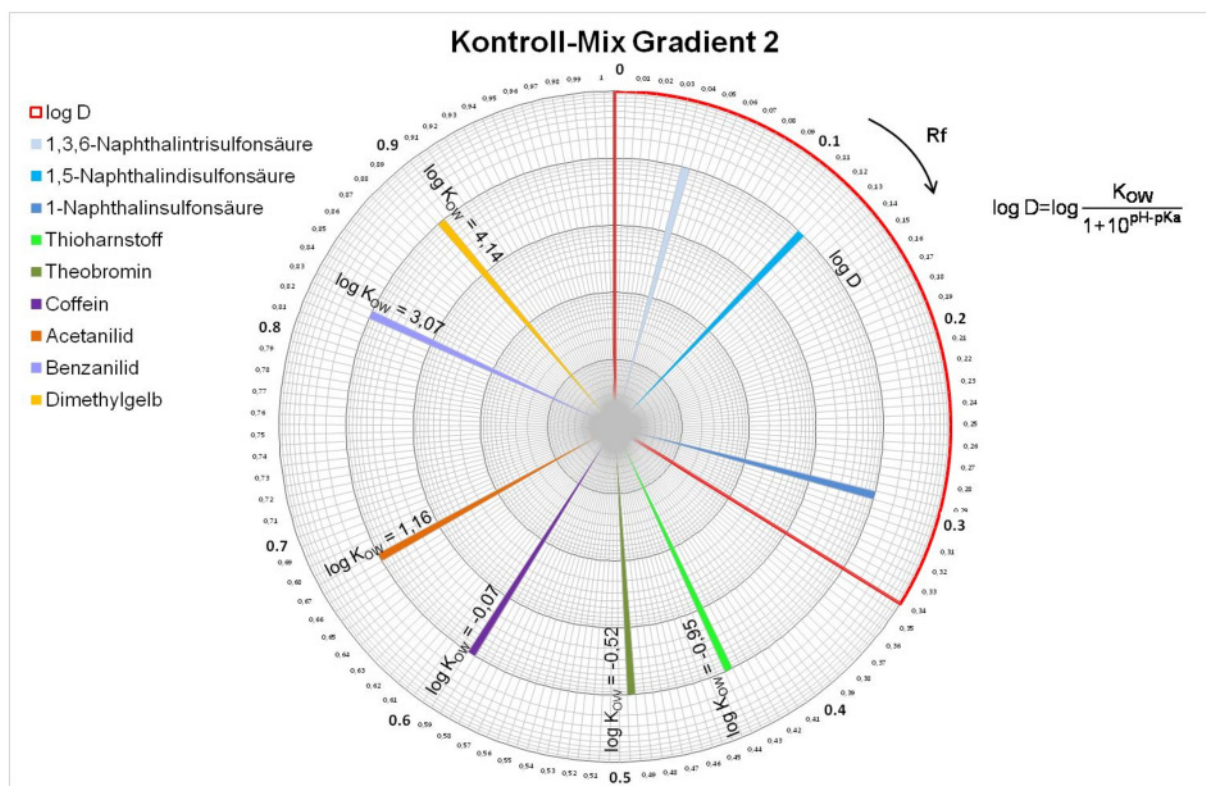


Abb. 3-21: Lage und $\log K_{OW}$ -Werte der Substanzen aus dem Kontroll-Mix im R_f -Polardiagramm

Zur Einordnung des Retentionsverhaltens der verschiedenen Hemmbanden wurden zusätzlich ausgewählte Referenzsubstanzen auf eine HPTLC-Platte aufgetragen und mit der gleichen AMD-Methode entwickelt wie auch die Proben aus der Kesslergrube und deren Umgebung. Die Absorption im Absorptionsmaximum der einzelnen Referenzsubstanzen wurde in einem Rf-Polardiagramm dargestellt (Abb. 3-22).

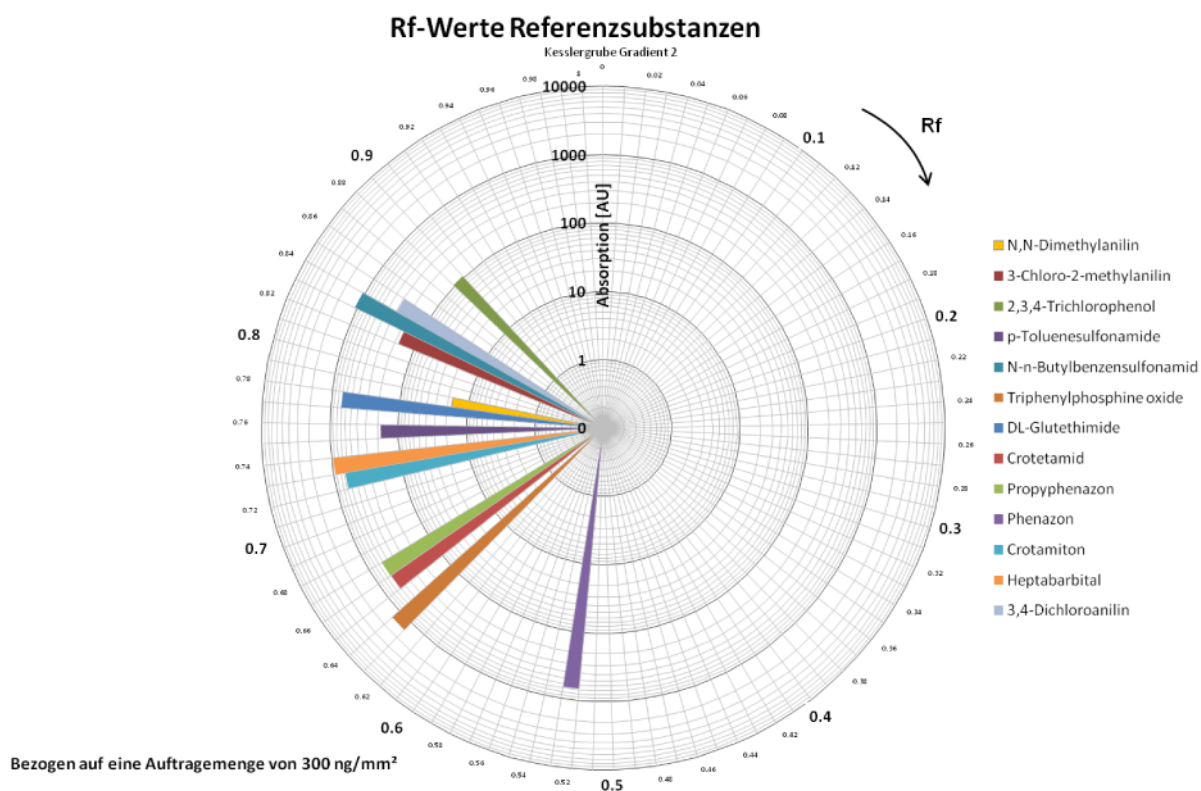


Abb. 3-22: Darstellung der Absorptionsmaxima der Referenzsubstanzen im Rf-Polardiagramm

3.6 **Bestimmung der Verdünnungsstufe G_{lb}**

3.6.1 **Küvettenhemmtest G_{lb} , Küvette**

Zur Bestimmung der Biolumineszenzhemmung von *Vibrio fischeri* wird beim Küvettentest die Probe mit der Leuchtbaktériensuspension verdünnt. Somit ist es mit diesem Testverfahren nicht möglich die Hemmung der Originalprobe zu detektieren. (Abb. 3-23)

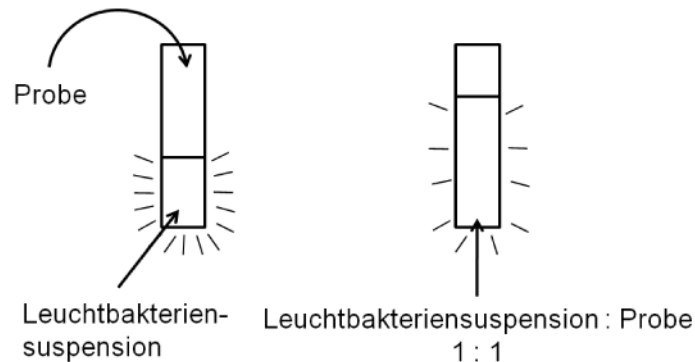


Abb. 3-23: Verdünnung der Probe mit der Leuchtbaktériensuspension beim Küvettentest

Zur Bestimmung der Verdünnungsstufe G bzw. G-Wert wird die Wasserproben soweit verdünnt bis eine Hemmung von $\leq 20\%$ erreicht ist. Der G-Wert entspricht dem reziproken Wert des Volumenanteils der Probe im Verdünnungswasser (DIN EN ISO 11348-1:2009-05). Zur Ermittlung dieses G-Wertes werden zwei geometrische Verdünnungsreihen hergestellt (Abb. 3-24).

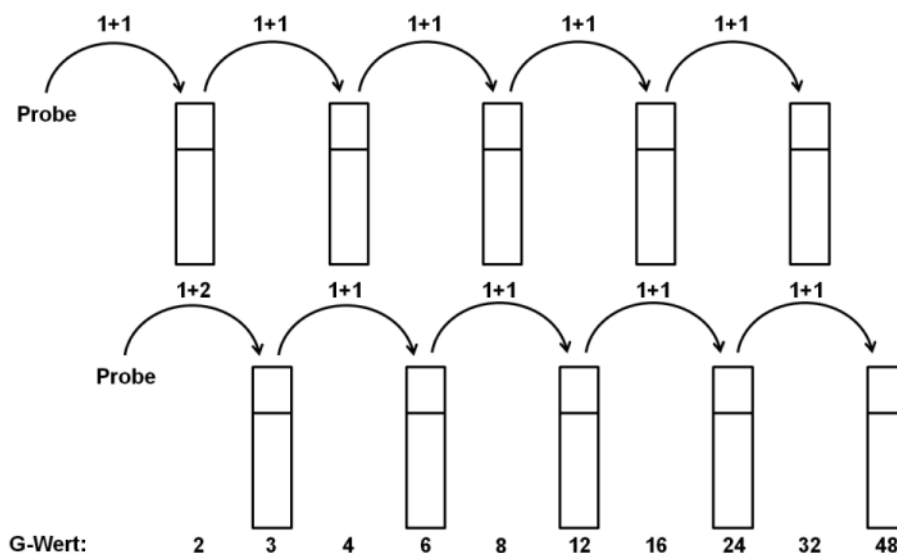


Abb. 3-24: Durchführung von zwei geometrischen Verdünnungsreihen zur Bestimmung der Verdünnungsstufe G (nach DIN EN ISO 11348-1:2009-05)

Beispiel

Substanz: Bromoxynil

 c_{Probe} (Bromoxynil) = 30,0 mg/L EC_{20} = 2,25 mg/L V_{Gesamt} = 1 mL

Experimentell:

Tabelle 3-3: Bestimmung $G_{\text{lb,Küvette}}$ -Wert mit Hilfe von zwei geometrischen Verdünnungsreihen

Verdünnungsreihe 1		Verdünnungsreihe 2	
Konzentration in Küvette [mg/L]	$G_{\text{lb,Küvette}}$	Konzentration in Küvette [mg/L]	$G_{\text{lb,Küvette}}$
15,0	2	10,0	3
7,50	4	5,00	6
3,75	8	2,50	12
EC_{20} 2,25 mg/L			
1,88	16	1,25	24

Um eine Hemmung der Biolumineszenz von ≤ 20 % für die Probe zu erreichen, wird ein $G_{\text{lb,Küvette}}$ -Wert zwischen 12 und 16 benötigt.

Rechnerisch:

$$V(EC_{20}) = \frac{EC_{20} \cdot V_{\text{Gesamt}}}{c_{\text{Probe}}} = \frac{2,25 \text{ mg/L} \cdot 1 \text{ mL}}{30 \text{ mg/L}} = 75,0 \text{ } \mu\text{L}$$

$$G_{\text{lb,Küvette}} = \frac{V_{\text{Gesamt}}}{V(EC_{20})} = \frac{1000 \text{ } \mu\text{L}}{75,0 \text{ } \mu\text{L}} = 13$$

bzw.

$$G_{\text{lb,Küvette}} = \frac{c_{\text{Probe}}}{EC_{20}} = \frac{30,0 \text{ mg/L}}{2,25 \text{ mg/L}} = 13$$

3.6.2 TLC-Hemmtest $G_{lb,TLC}$

Bei der Ermittlung des G-Wertes für den auf der TLC-Platte durchgeführten Test mit Leuchtbakterien wird analog zum Küvettentest vorgegangen. Dabei entspricht die Verdünnungsstufe beim Küvettentest, dem Auftragsvolumen der Extraktlösung im TLC-Test jeweils für eine Hemmung $< 20\ %$. Da die Probe im Gegensatz zum Küvettentest beim TLC-Test meist angereichert wird, muss dieser Anreicherungsfaktor (E) bei der Ermittlung des $G_{lb,TLC}$ -Wertes berücksichtigt werden. Zur Verdeutlichung der beiden unterschiedlichen Verfahren wurden deshalb die Bezeichnungen $G_{lb,Küvette}$ und $G_{lb,TLC}$ eingeführt.

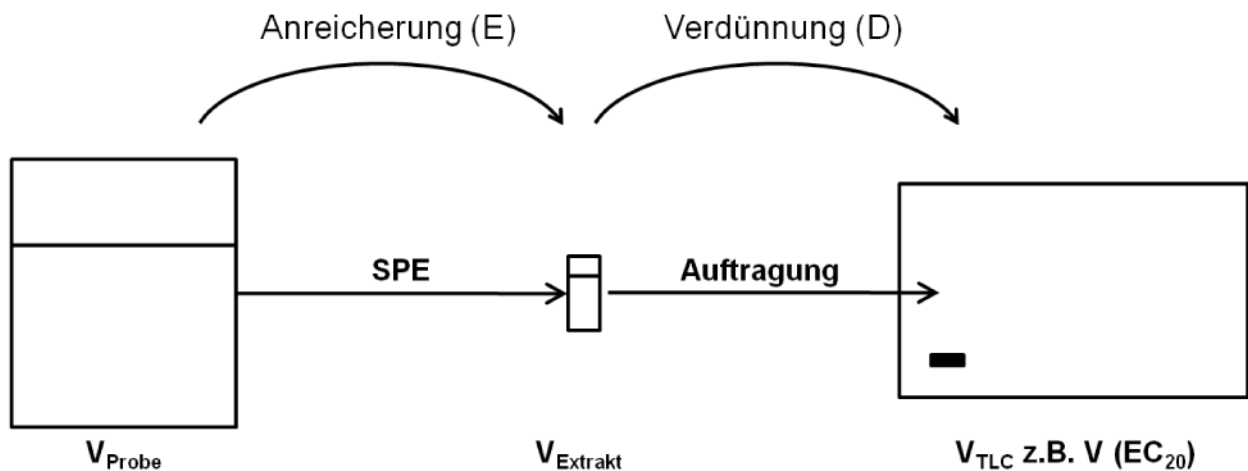


Abb. 3-25: Schematische Darstellung der Probenvorbereitung zur Ermittlung des G-Wertes auf der TLC-Platte

Vor der Auftragung der Proben auf die TLC-Platte erfolgt eine Anreicherung mittels Festphasenextraktion (SPE). Danach werden definierte Volumenteile des Extrakts auf die TLC-Platte aufgetragen. Dies entspricht einer Verdünnung des SPE-Extraktes. Wenn der gesamte Extrakt auf einmal aufgebracht wird, entspricht dies dem Verdünnungsfaktor $D = 1$ (keine Verdünnung). Durch das Auftragen von verschiedenen Volumina der Probe kann mit Hilfe des logarithmierten Gamma-Wertes eine linearisierte Dosis-Wirkungsbeziehung ermittelt werden. Aus dieser lassen sich die Volumina zum Erreichen der EC_{20} - bzw. EC_{50} -Werte bestimmen (Abb. 3-26).

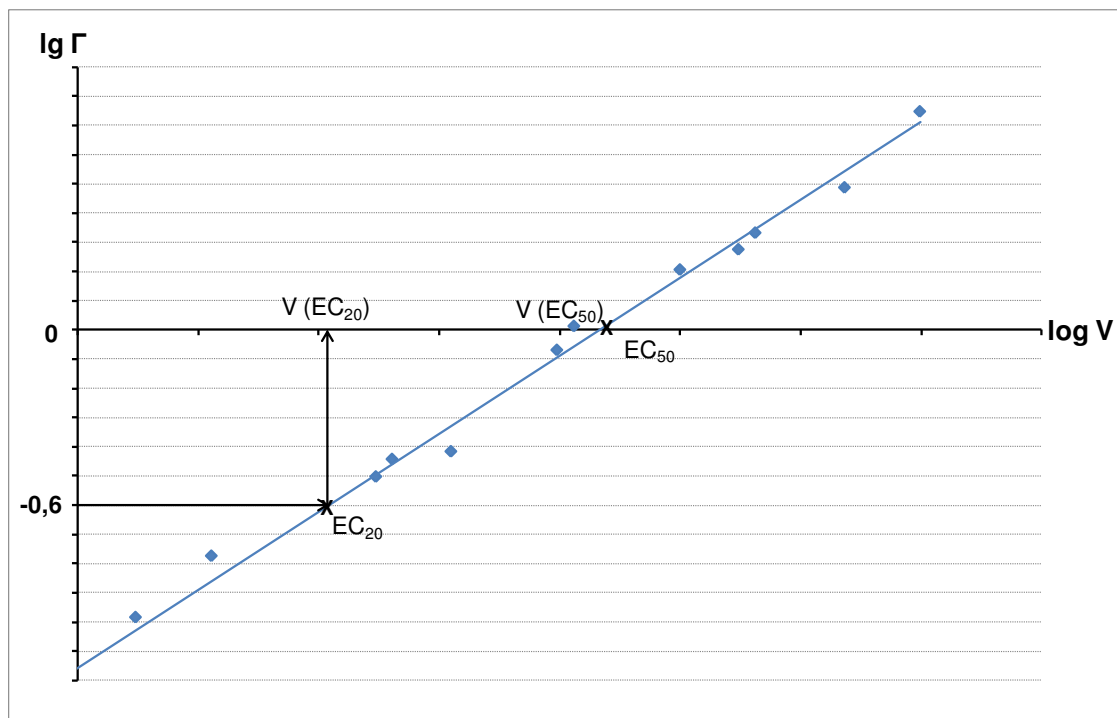


Abb. 3-26: Linearisierte Dosis-Wirkungs-Beziehung von Bromoxynil zur Ermittlung des EC₂₀- bzw. EC₅₀-Wertes

Berechnung der Verdünnungsstufe G

Da es sich bei der Probenvorbereitung für die TLC mit Biolumineszenz-Detektion in erster Linie um eine Anreicherung (E) handelt, können Anreicherungsstufen (A) ermittelt werden. Da aber meist nur Teile des Extraktes aufgetragen werden, muss zusätzlich die Verdünnung (D) mit berücksichtigt werden. Der Kehrwert zur Anreicherung ist die Verdünnung. Deshalb kann direkt aus dem A-Wert, welcher notwendig ist um eine Hemmung der Biolumineszenz von $\leq 20\%$ auszulösen, die entsprechende Verdünnungsstufe berechnet werden. Bei dieser Berechnung muss die Auftragsfläche konstant gehalten werden, um die Proben untereinander zu vergleichen. Bei einem G-Wert > 1 muss die Probe um die entsprechenden Stufen verdünnt werden. Wenn der G-Wert < 1 ist, ist eine Anreicherung der Probe notwendig.

$$A = E \cdot D$$

$$E = \frac{V_{\text{Probe}}}{V_{\text{Extrakt}}}$$

$$D = \frac{V(\text{EC}_{20})}{V_{\text{Extrakt}}}$$

E: Anreicherungsfaktor

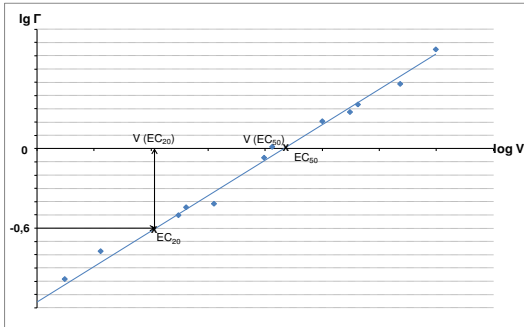
D: Verdünnungsfaktor

$$A = \frac{V_{\text{Probe}} \cdot V(\text{EC}_{20})}{V_{\text{Extrakt}} \cdot V_{\text{Extrakt}}}$$

Berechnung der Verdünnungsstufe G

$$G_{\text{lb,TLC}} = \frac{1}{A} = \frac{V_{\text{Extrakt}} \cdot V_{\text{Extrakt}}}{V_{\text{Probe}} \cdot V(\text{EC}_{20})}$$

Tabelle 3-4: Vergleich der Berechnung von $G_{lb,Küvette}$ und $G_{lb,TLC}$

	Küvette	TLC
Dosis-Wirkungs-beziehung		
Effekt-Konzentration	$EC_{20} \text{ Küvette } [\text{mg/L}]$	$EC_{20} \text{ TLC } [\text{ng/cm}^2]$
Proben-bezeichnung	c_{Probe} : Konzentration in der Wasserprobe [mg/L] V_{Probe} : Probenvolumen V_{Extrakt}: Extraktvolumen	
Berechnung Volumen	$V(EC_{20} \text{ Küvette }) = \frac{EC_{20} \text{ Küvette} \cdot V_{\text{Probe}}}{c_{\text{Probe}}}$	$V(EC_{20} \text{ TLC}) = \frac{EC_{20} \text{ TLC} \cdot \text{Fläche}}{c_{\text{Probe}}}$
Anreicherung	-	$E = \frac{V_{\text{Probe}}}{V_{\text{Extrakt}}}$
Verdünnung	Verdünnungsstufen	$D = \frac{V(EC_{20} \text{ TLC})}{V_{\text{Extrakt}}}$
G-Wert	$G_{lb,Küvette} = \frac{V_{\text{Probe}}}{V(EC_{20} \text{ Küvette})}$ $G_{lb \text{ Küvette}} = \frac{c_{\text{Probe}}}{EC_{20} \text{ Küvette}}$	$A = E \cdot D = \frac{V_{\text{Probe}} \cdot V(EC_{20} \text{ TLC})}{V_{\text{Extrakt}} \cdot V_{\text{Extrakt}}}$ $G_{lb,TLC} = \frac{1}{A}$

	Küvette	TLC
Beispiel	$c_{\text{Probe}} = 0,30 \text{ [mg/L]}$ Bromoxynil	
Effekt-Konzentration	$EC_{20 \text{ Küvette}} 2,3 \text{ [mg/L]}$	$EC_{20 \text{ TLC}} 24 \text{ [ng/cm}^2\text{]}$
Volumen	$V_{\text{Probe}} = 1 \text{ mL}$	$V_{\text{Probe}} = 100 \text{ mL}$ $V_{\text{Extrakt}} = 1 \text{ mL}$
Berechnung Volumen	$V(EC_{20 \text{ Küvette}}) = \frac{2,25 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \cdot 1 \text{ mL}}{0,30 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}$ $= 75,0 \mu\text{L}$	$V(EC_{20 \text{ TLC}}) = \frac{24 \frac{\text{ng}}{\text{cm}^2} \cdot 0,12 \text{ cm}^2}{0,30 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}$ $V(EC_{20 \text{ TLC}}) = 9,6 \mu\text{L}$
Anreicherung		$E = 100$
Verdünnung	2, 3, 4, 6, 8, 12, 16 ...	$D = \frac{9,6 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}}$
G-Wert	$G_{\text{lb}, \text{Küvette}} = \frac{c_{\text{Probe}}}{EC_{20}} = \frac{0,30 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{2,3 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}$ $G_{\text{lb}, \text{Küvette}} = 0,13$	$A = \frac{100 \text{ mL} \cdot 9,6 \cdot 10^{-3} \text{ mL}}{1 \text{ mL} \cdot 1 \text{ mL}}$ $A = 0,96$ $G_{\text{lb}, \text{TLC}} = 1,04$
Interpretation	$G_{\text{lb}} < 1$ kein Effekt in der Wasserprobe	Effekt nachweisbar

Eine gegenseitige Umrechnung der G-Werte ist generell nicht möglich. Hierfür sind stoffspezifische Faktoren notwendig, die die Wechselwirkung der Substanz mit der stationären Phase der TLC-Platte berücksichtigen. Dies ist derzeit Gegenstand weiterer Untersuchungen.

4 Ergebnisse

4.1 Polardiagrammdarstellung der RIHV-Werte

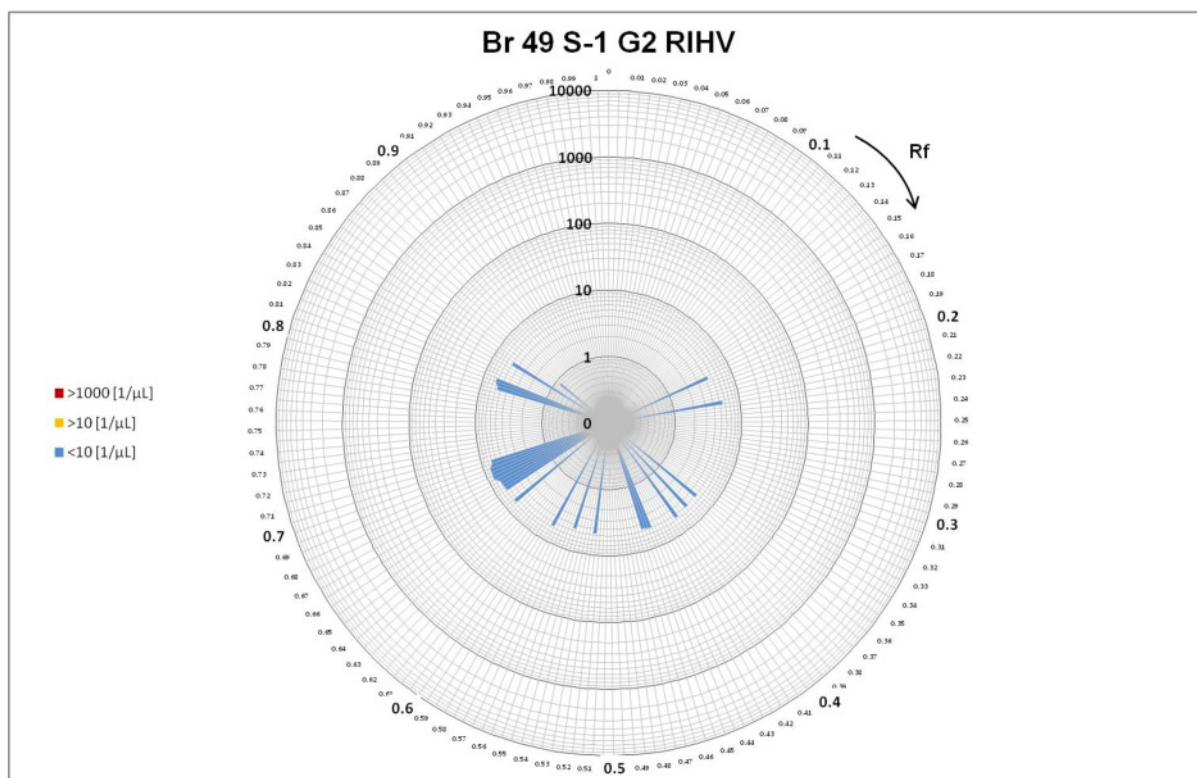


Abb. 4-1: Br 49 S-1 G2 RIHV

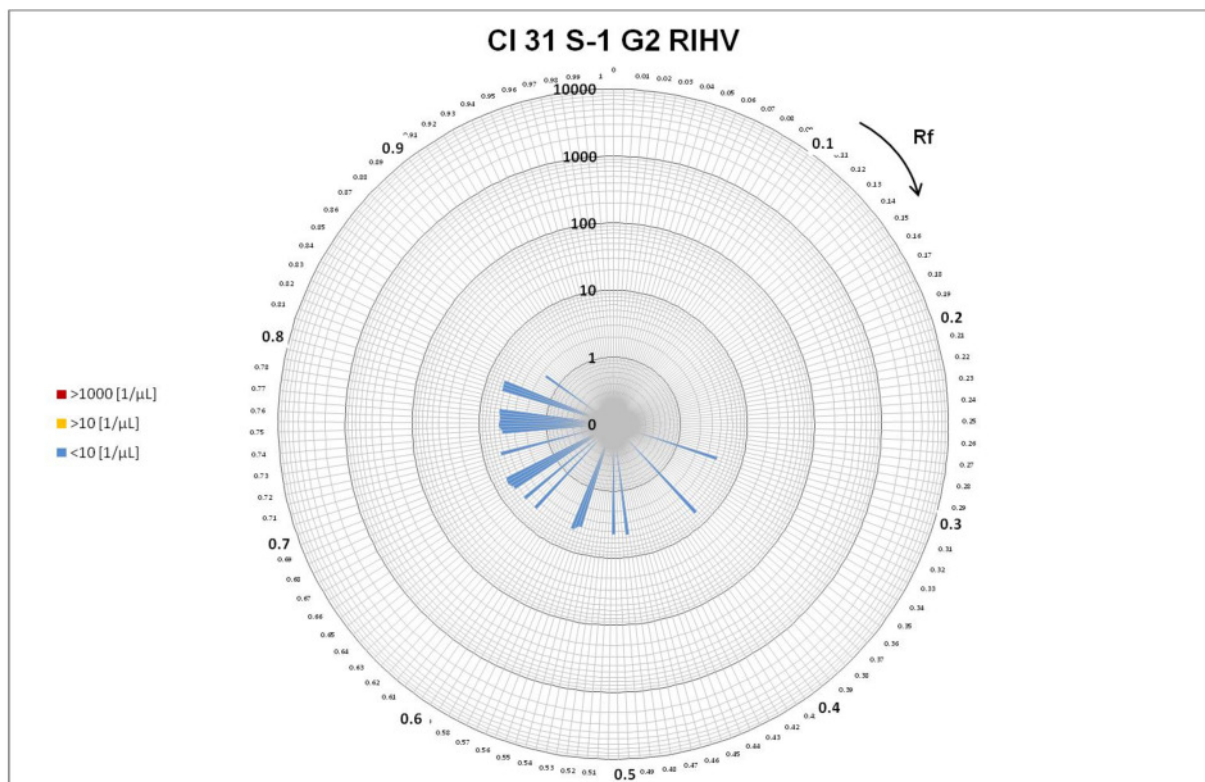


Abb. 4-2: CI 31 S-1 G2 RIHV

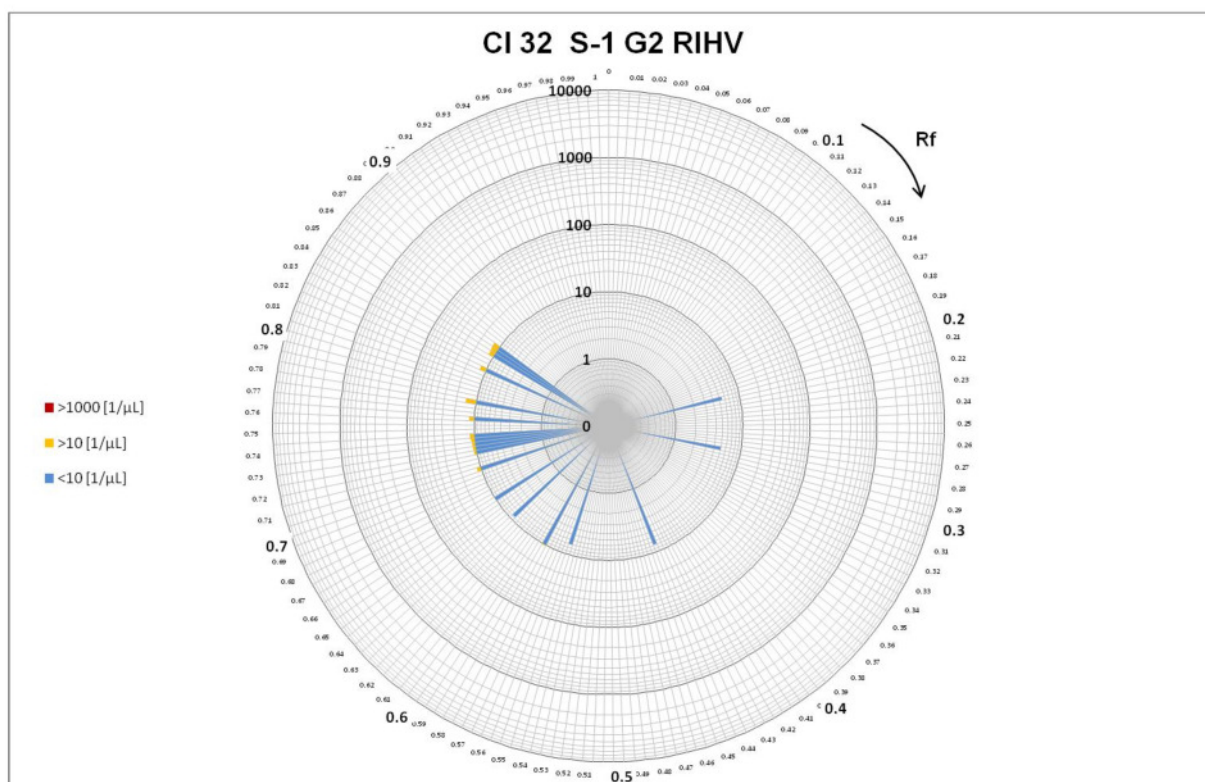


Abb. 4-3: CI 32 S-1 G2 RIHV

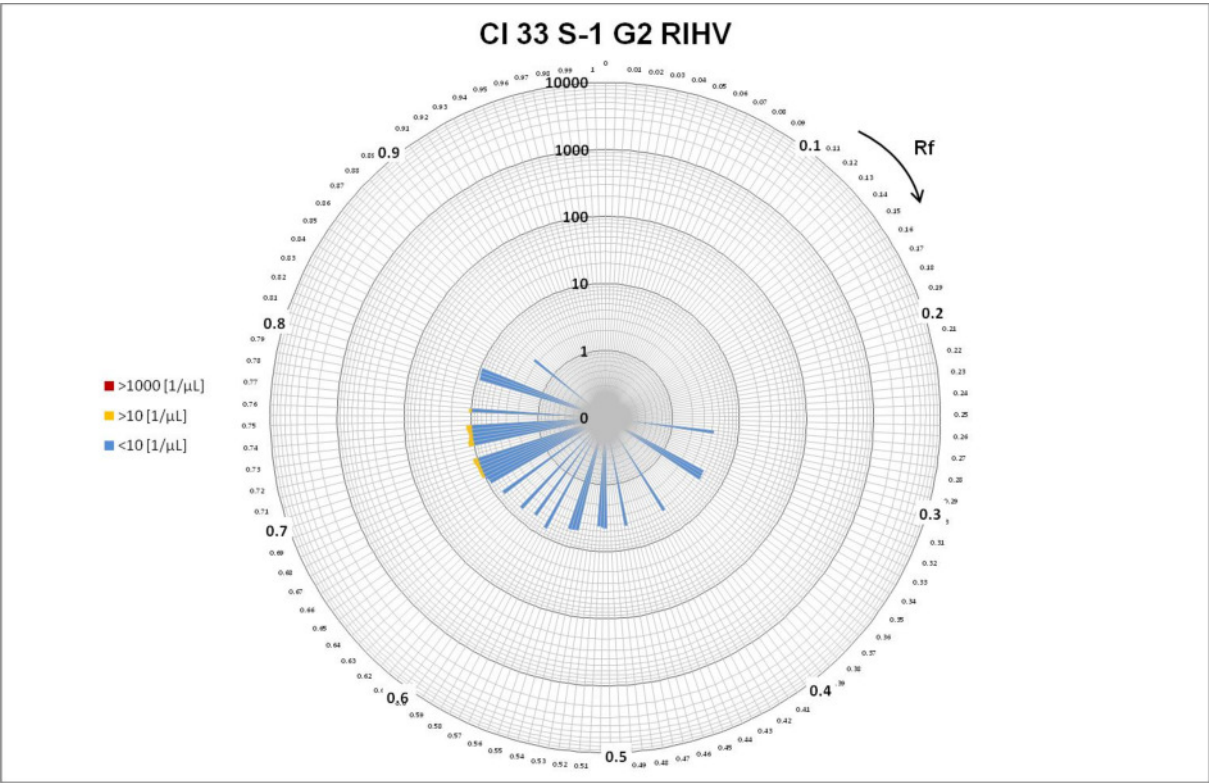


Abb. 4-4: CI 33 S-1 G2 RIHV

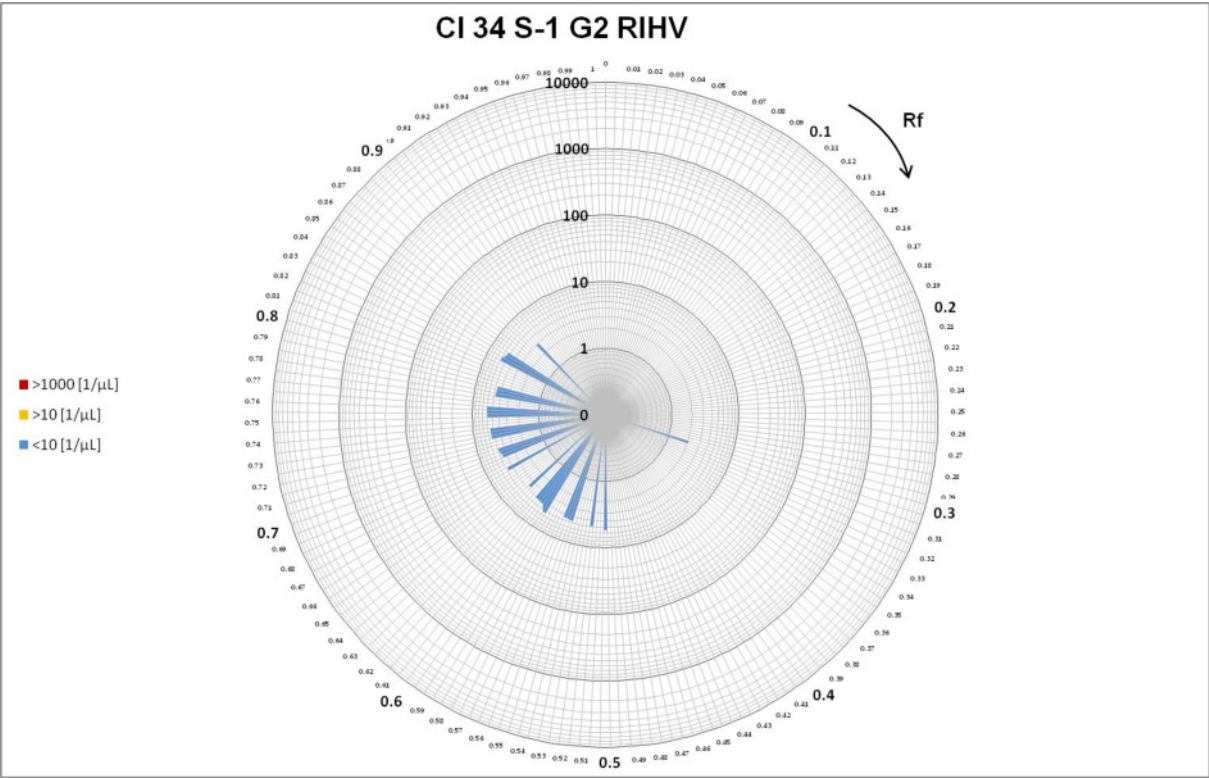


Abb. 4-5: CI 34 S-1 G2 RIHV

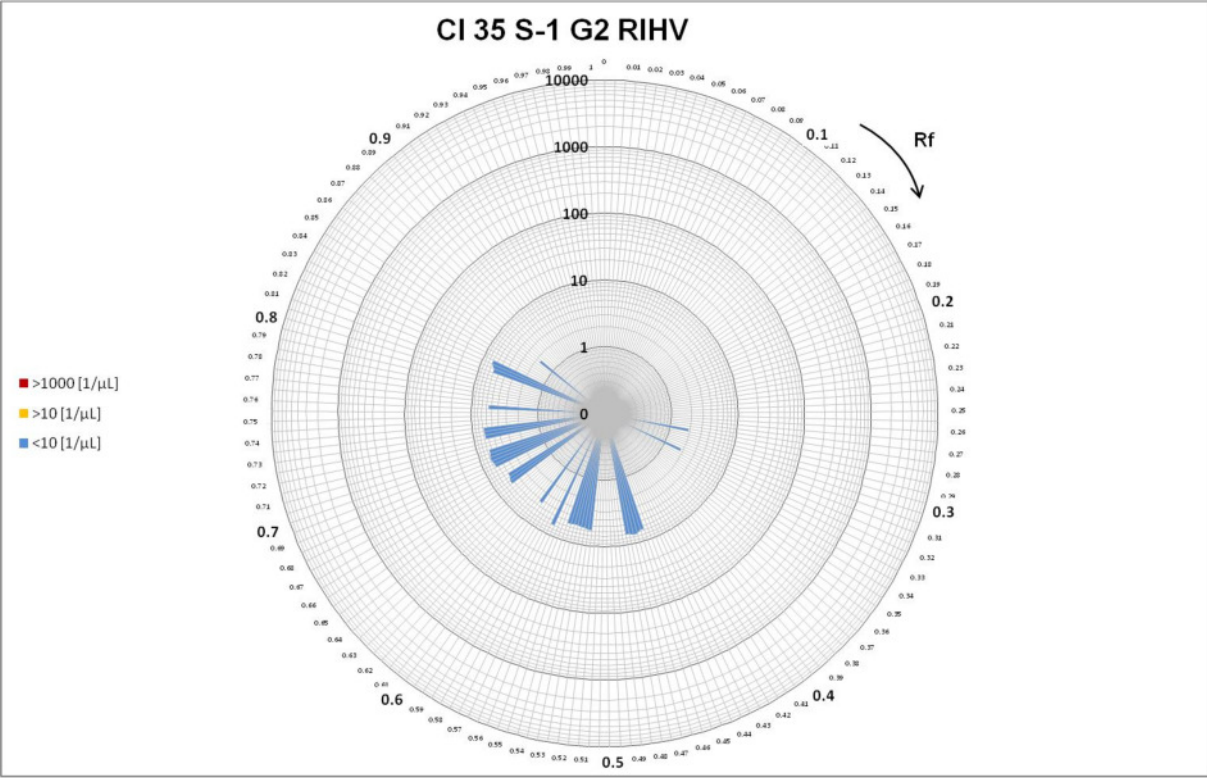


Abb. 4-6: CI 35 S-1 G2 RIHV

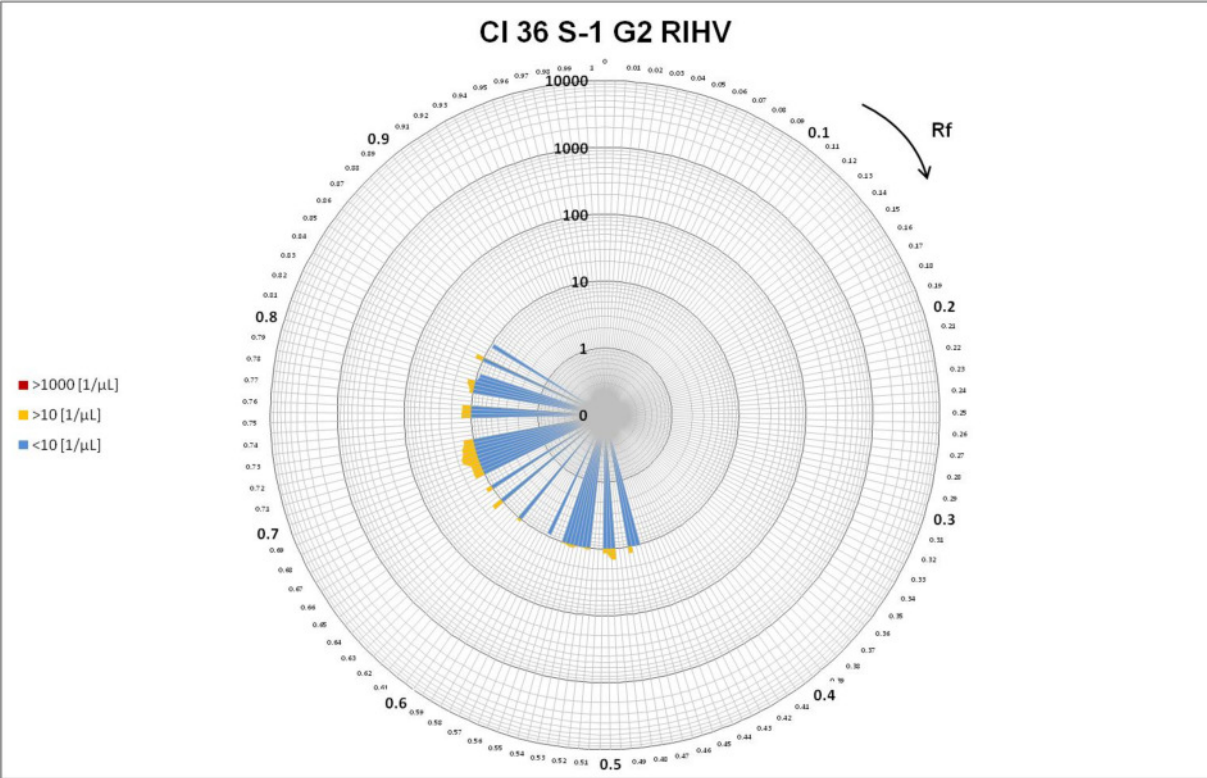


Abb. 4-7: CI 36 S-1 G2 RIHV

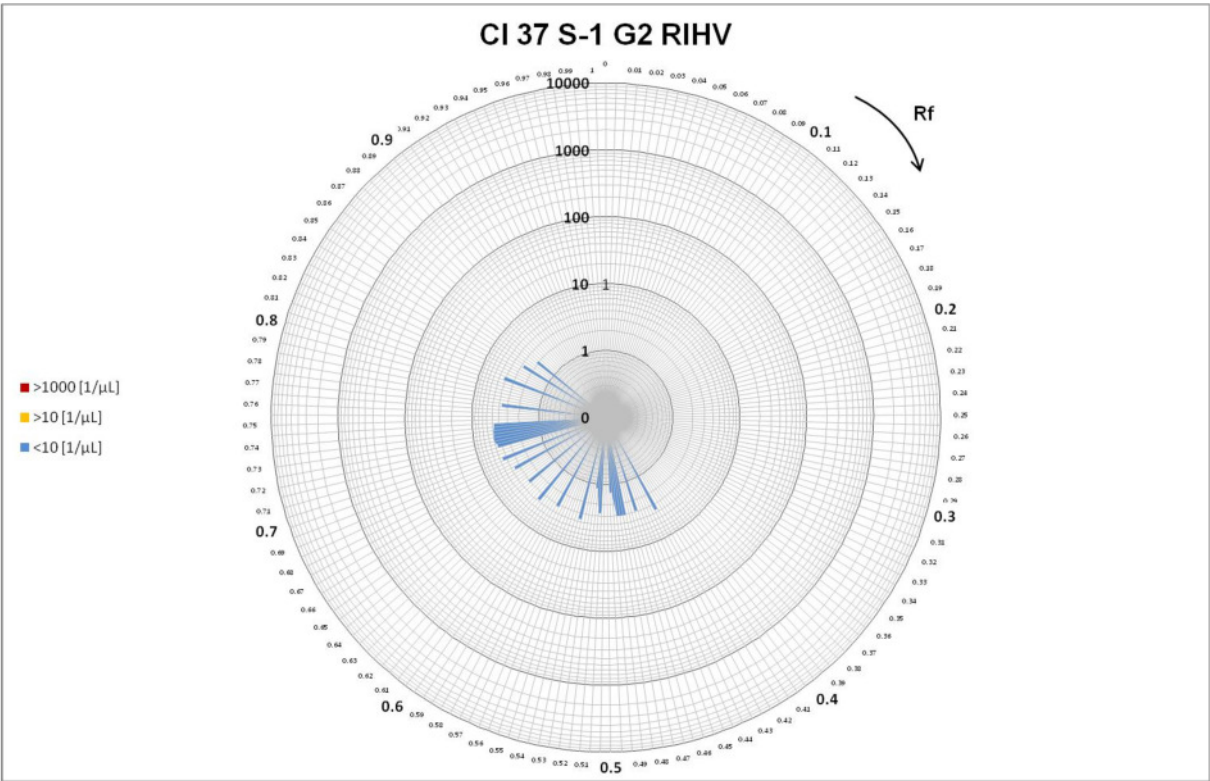


Abb. 4-8: CI 37 S-1 G2 RIHV

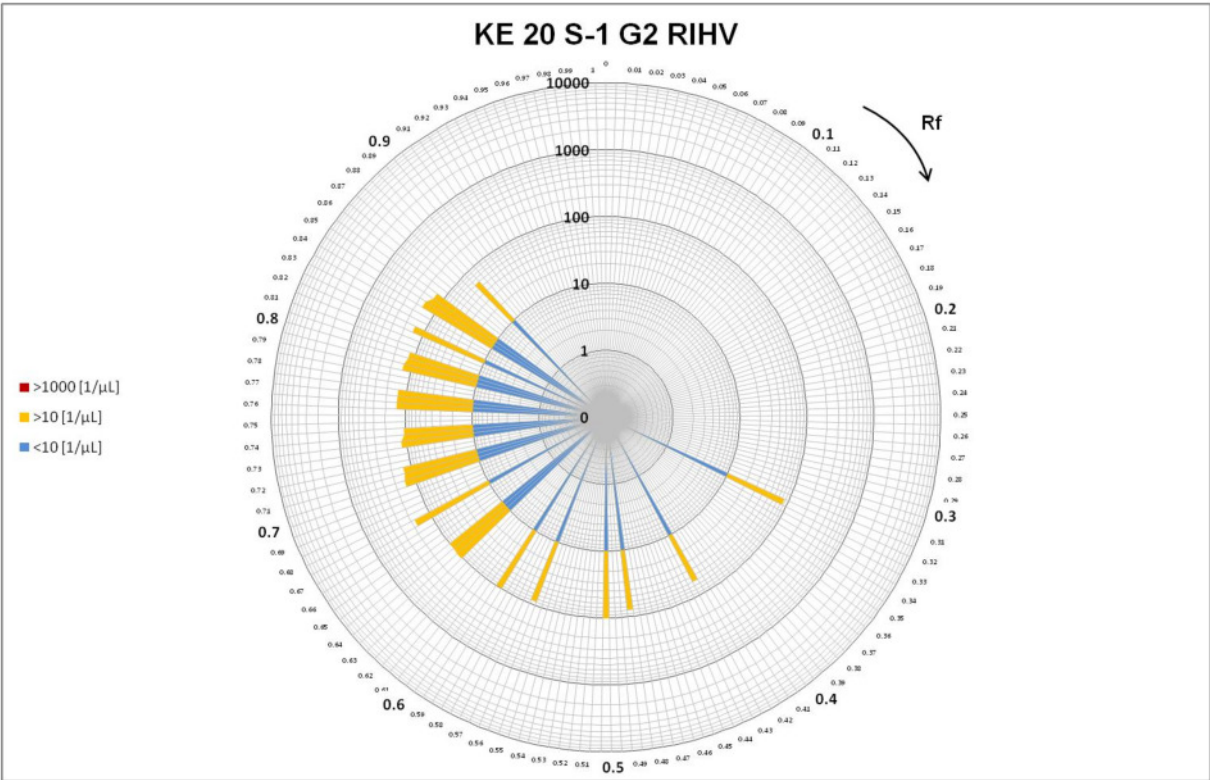


Abb. 4-9: KE 20 S-1 G2 RIHV

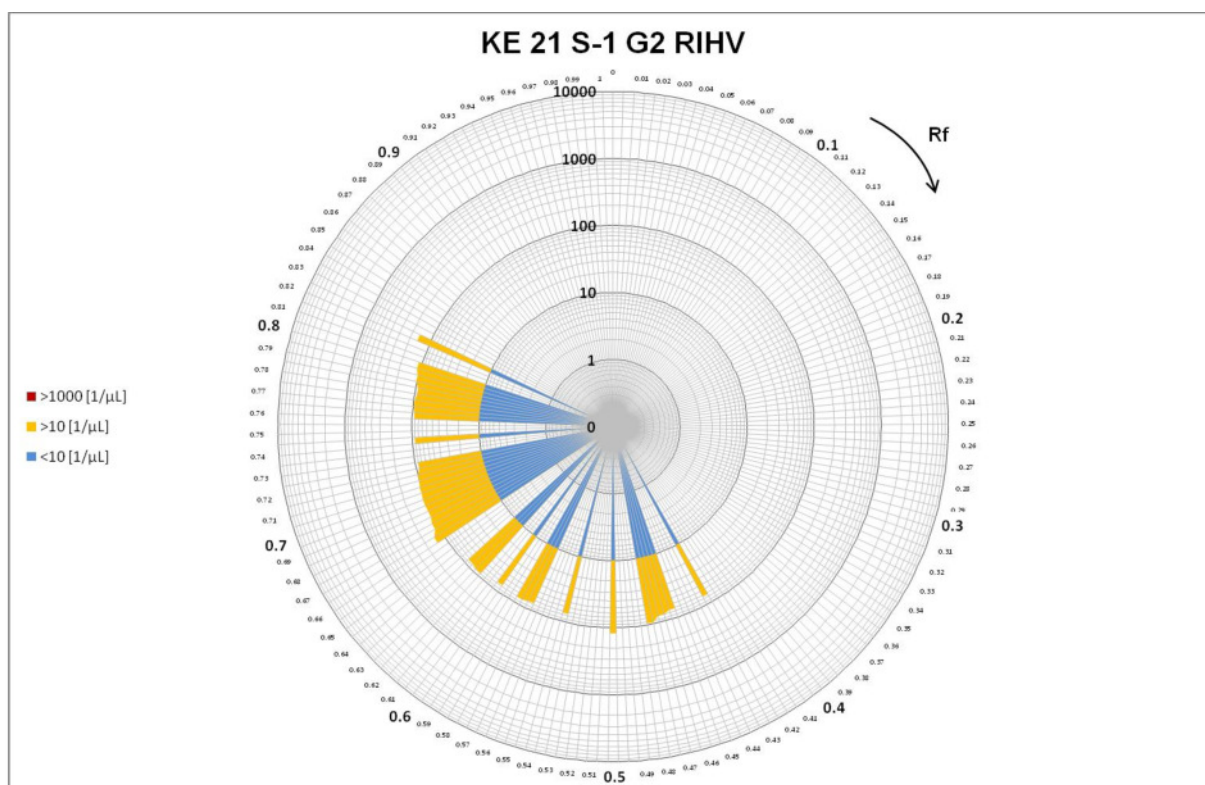


Abb. 4-10: KE 21 S-1 G2 RIHV

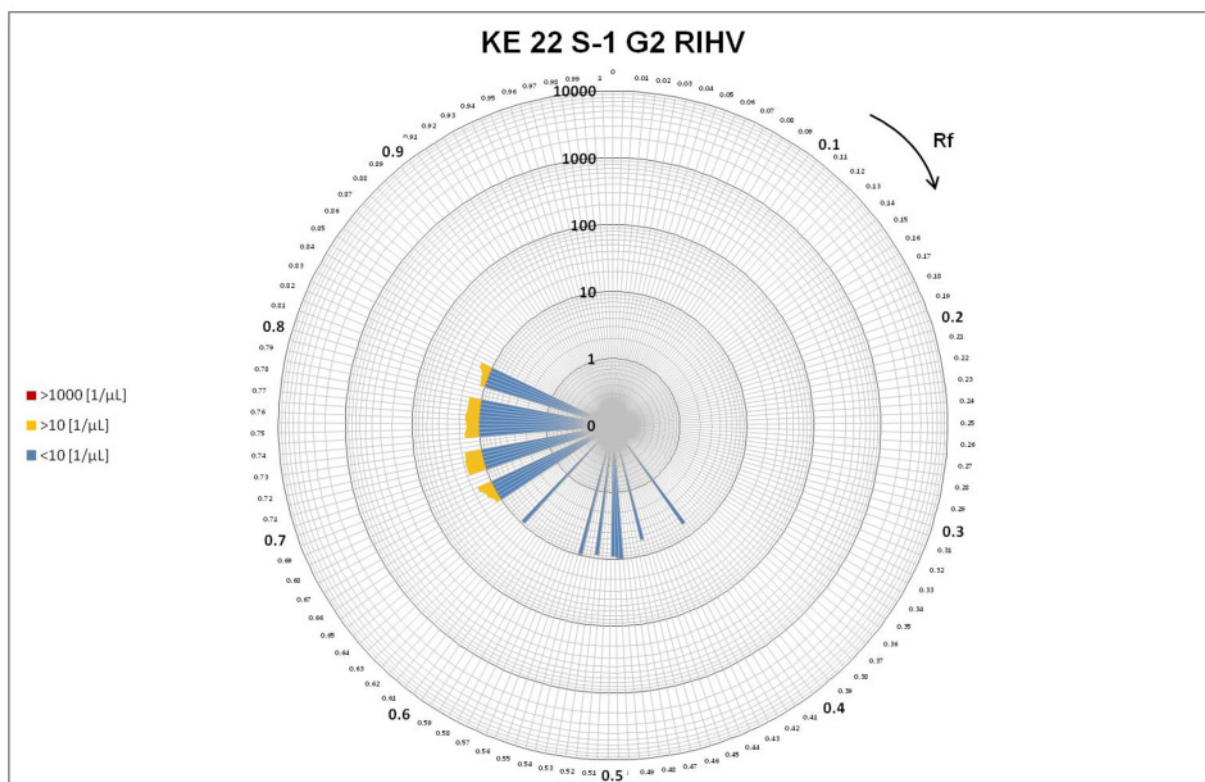


Abb. 4-11: KE 22 S-1 G2 RIHV

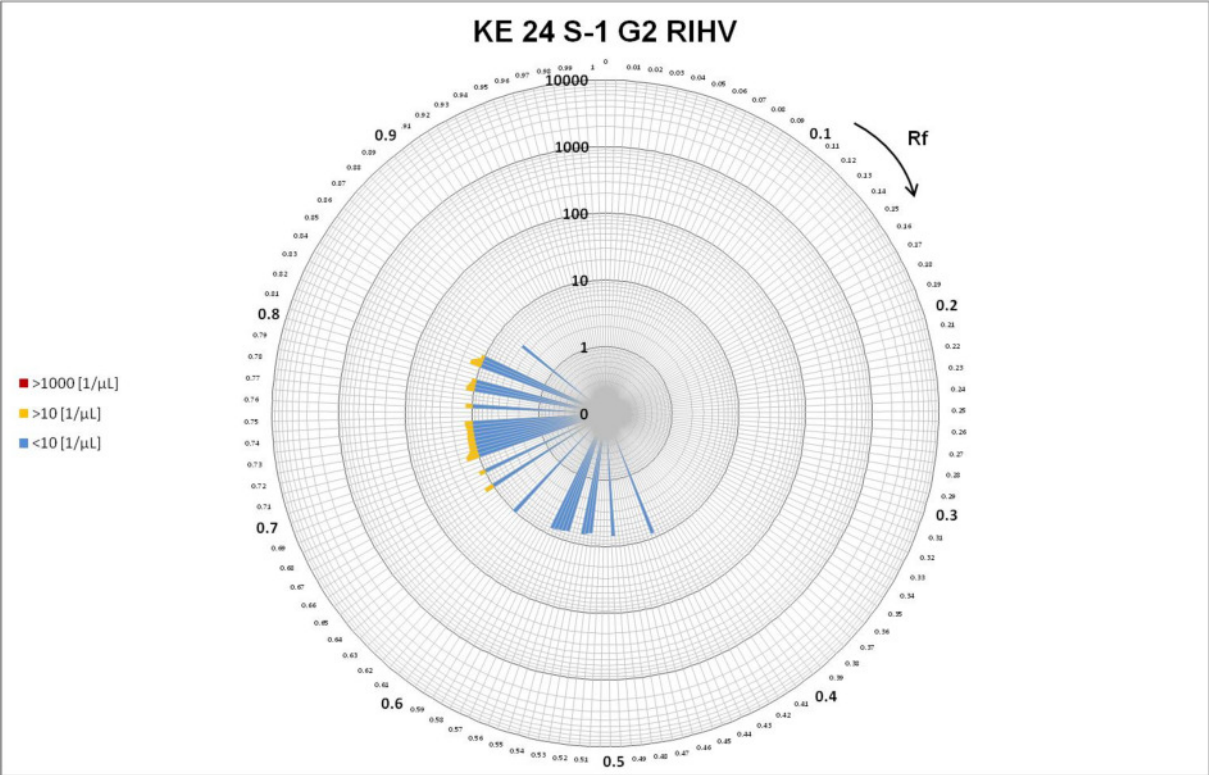


Abb. 4-12: KE 24 S-1 G2 RIHV

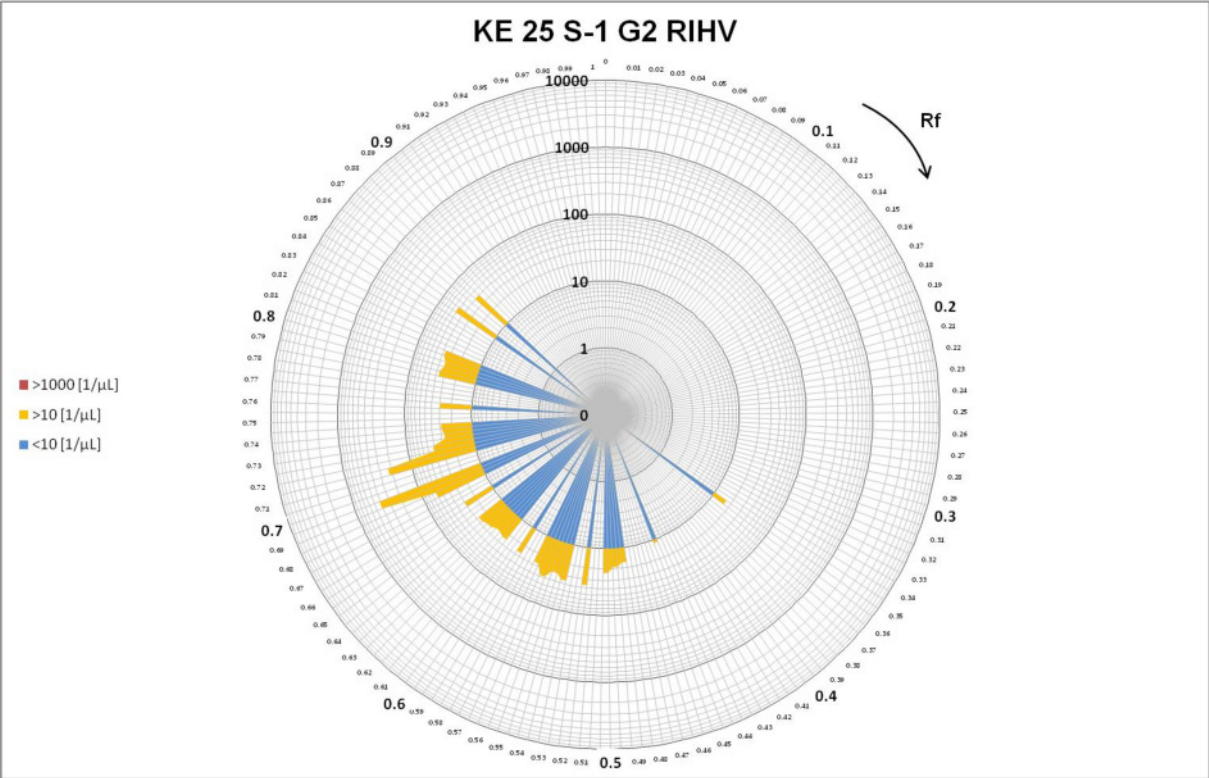


Abb. 4-13: KE 25 S-1 G2 RIHV

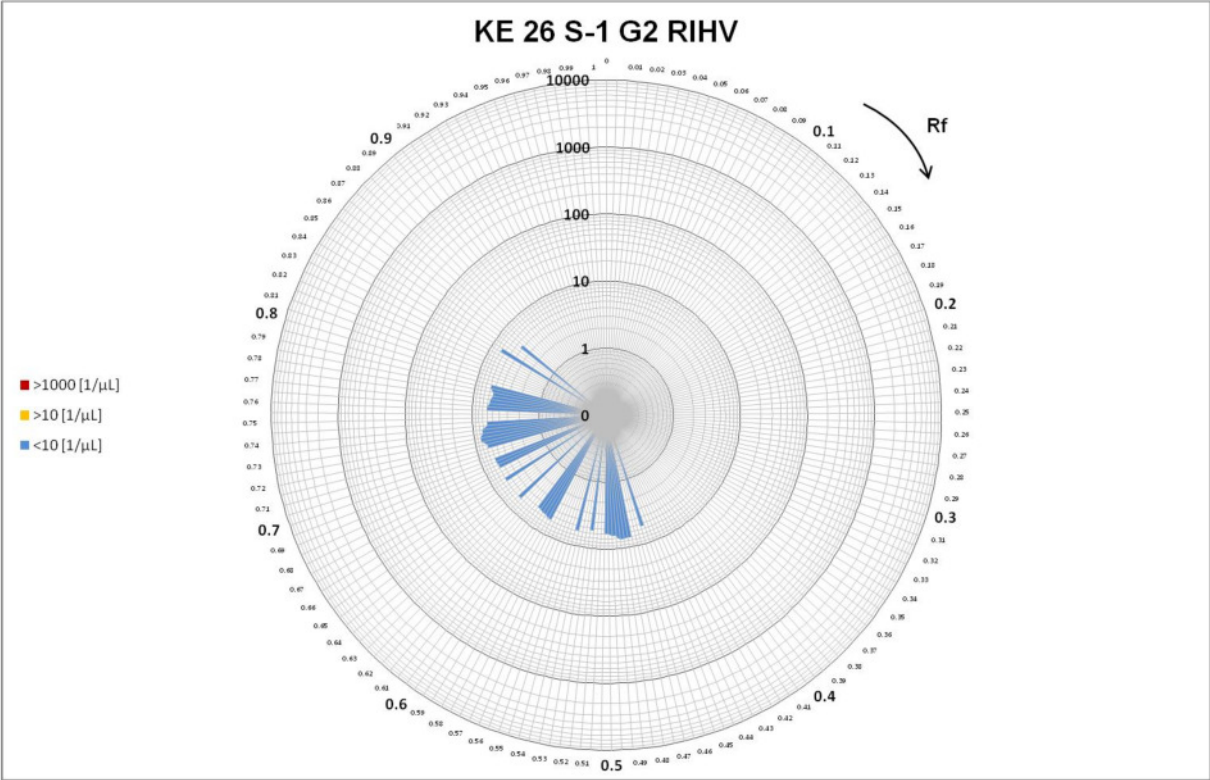


Abb. 4-14: KE 26 S-1 G2 RIHV

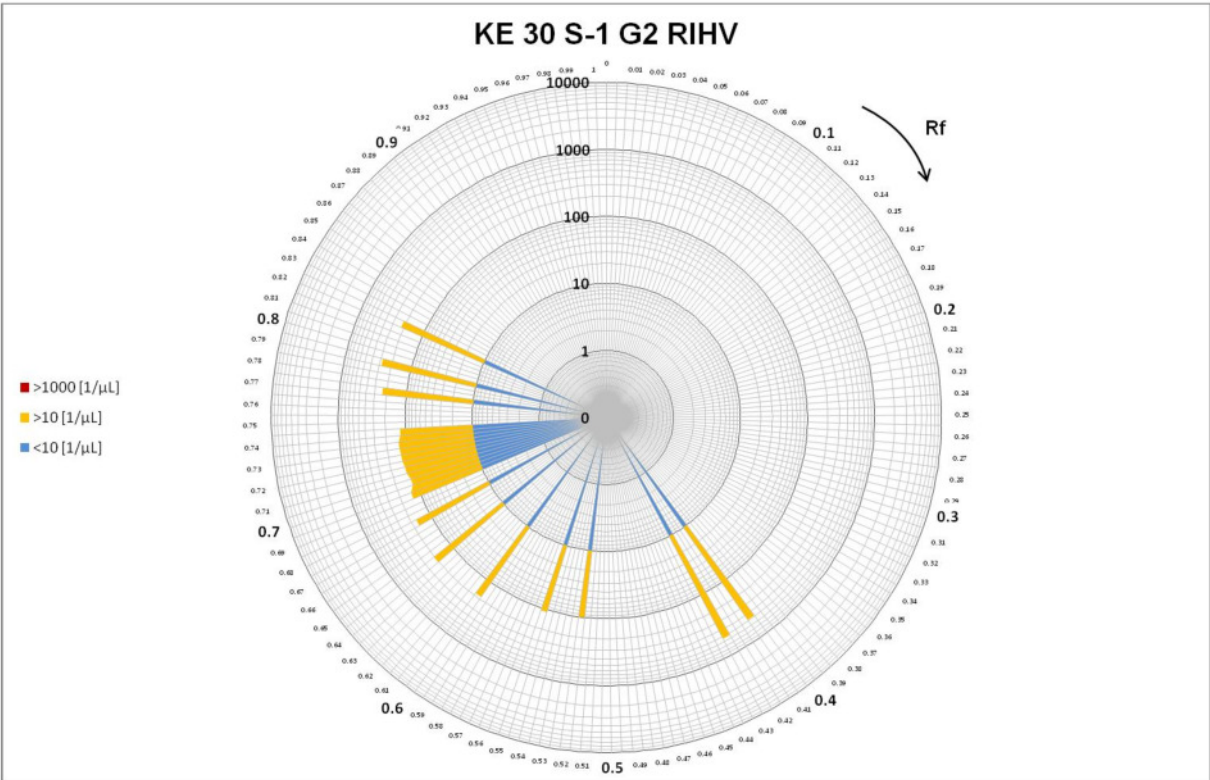


Abb. 4-15: KE 30 S-1 G2 RIHV

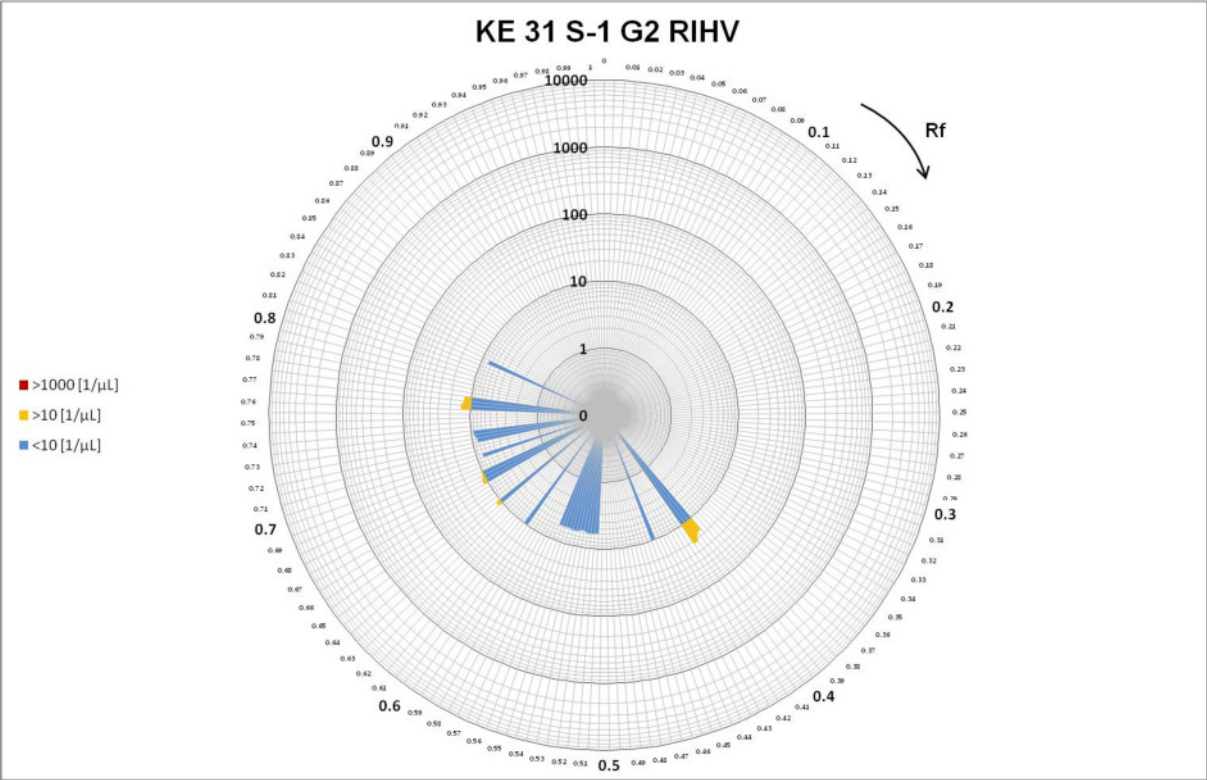


Abb. 4-16: KE 31 S-1 G2 RIHV

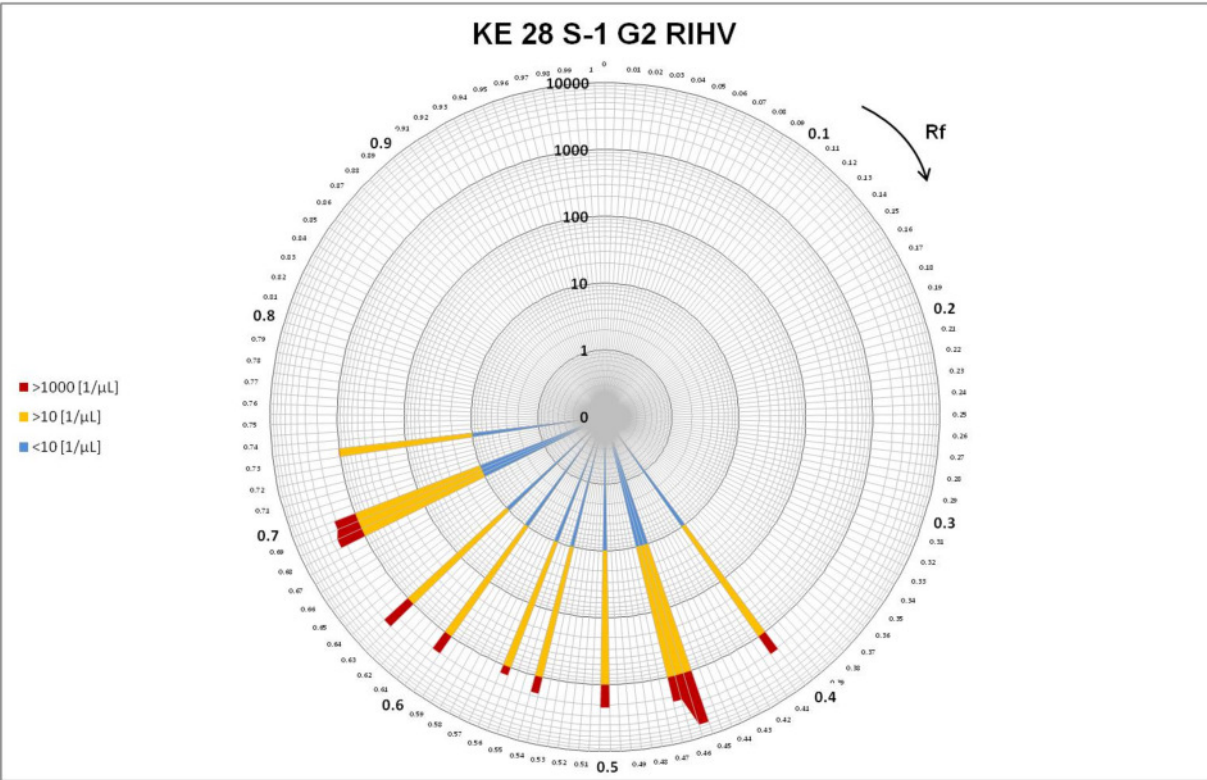


Abb. 4-17: KE 28 S-1 G2 RIHV

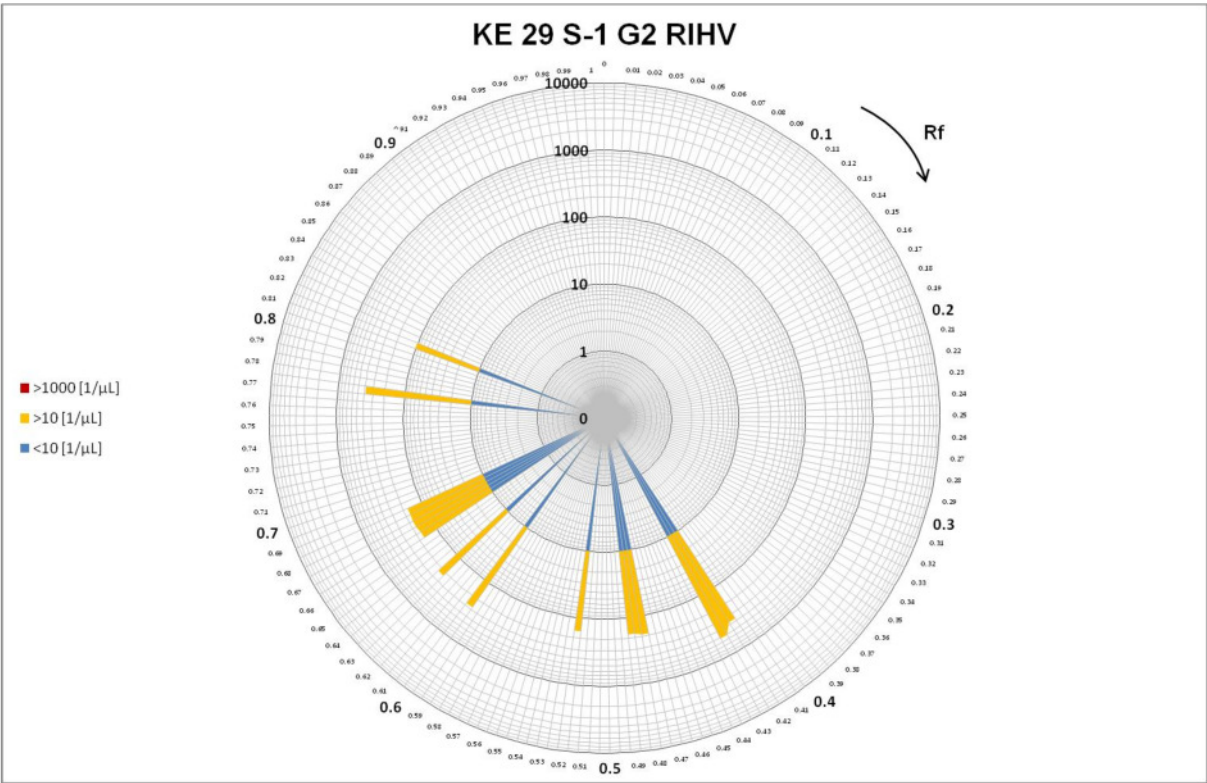


Abb. 4-18: KE 29 S-1 G2 RIHV

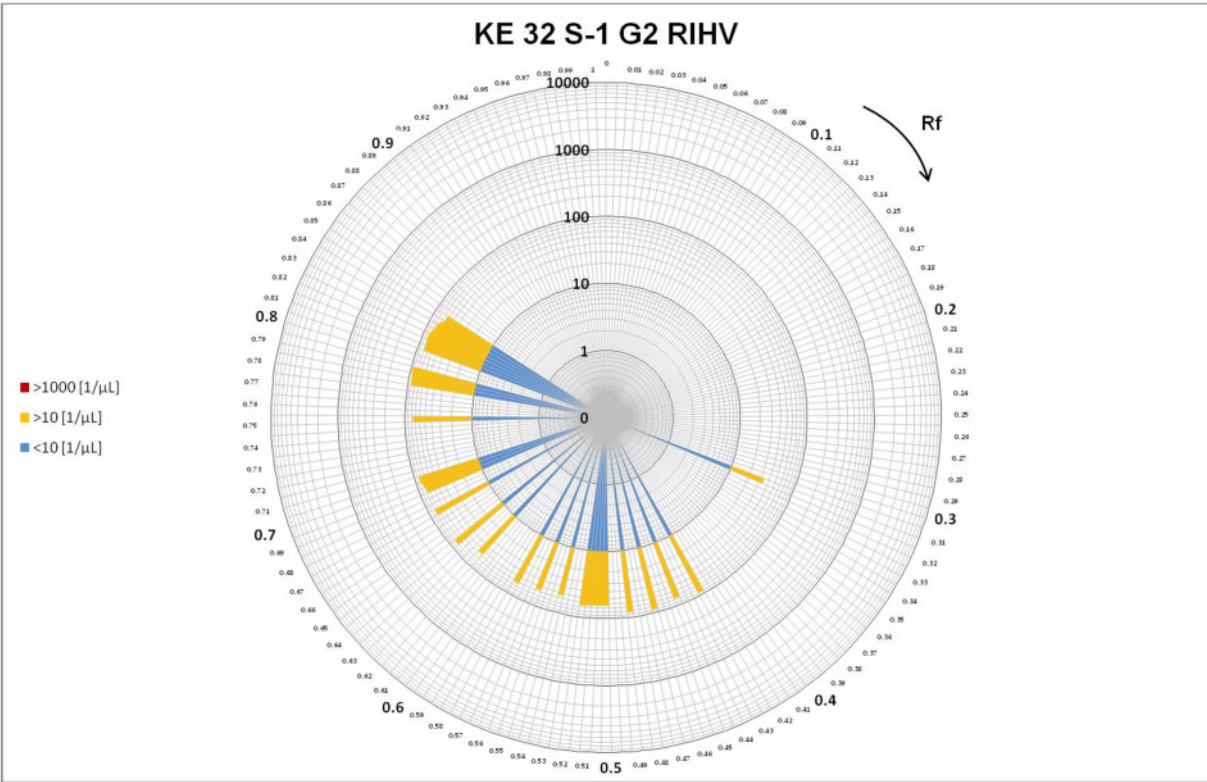


Abb. 4-19: KE 32 S-1 G2 RIHV

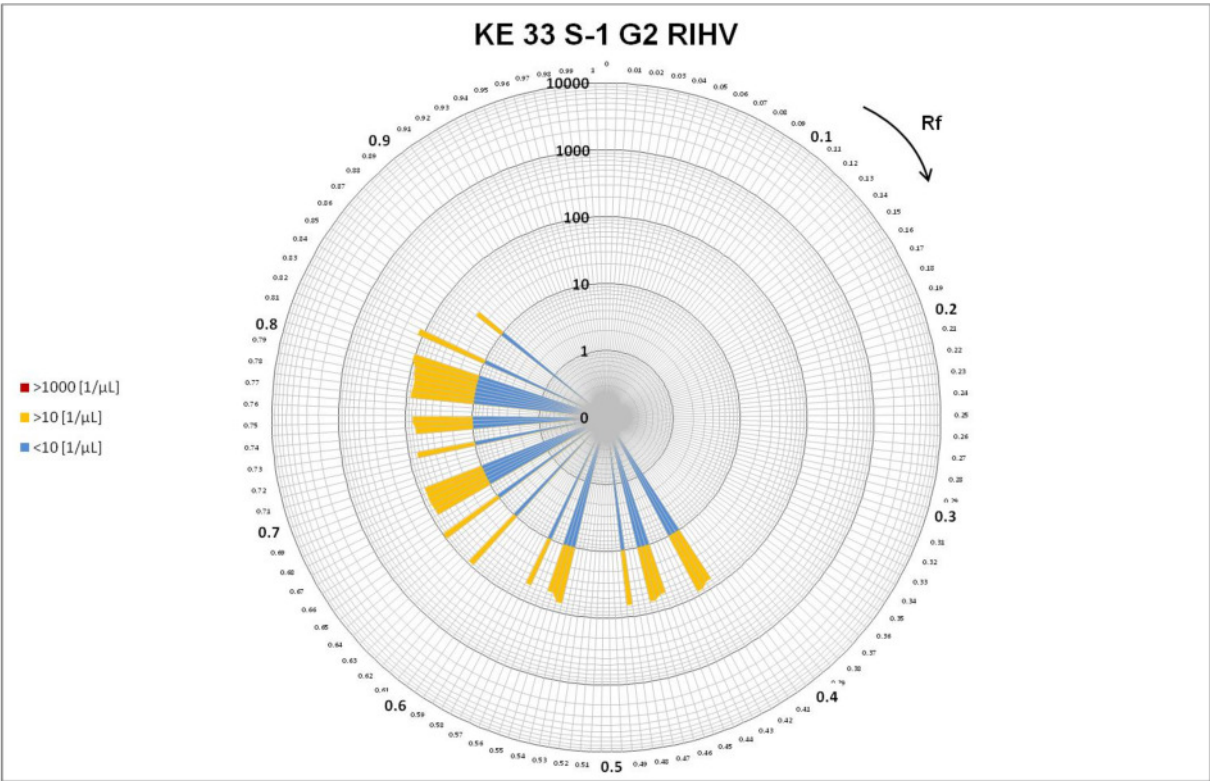


Abb. 4-20: KE 33 S-1 G2 RIHV

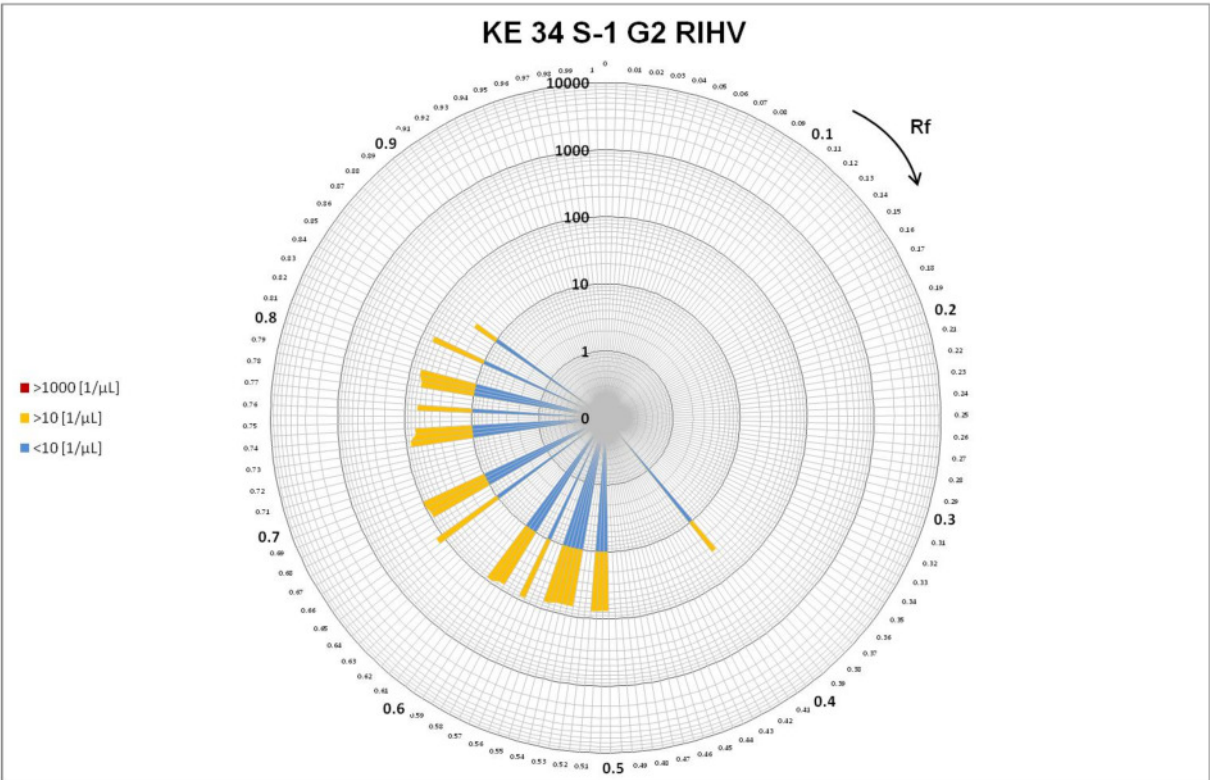


Abb. 4-21: KE 34 S-1 G2 RIHV

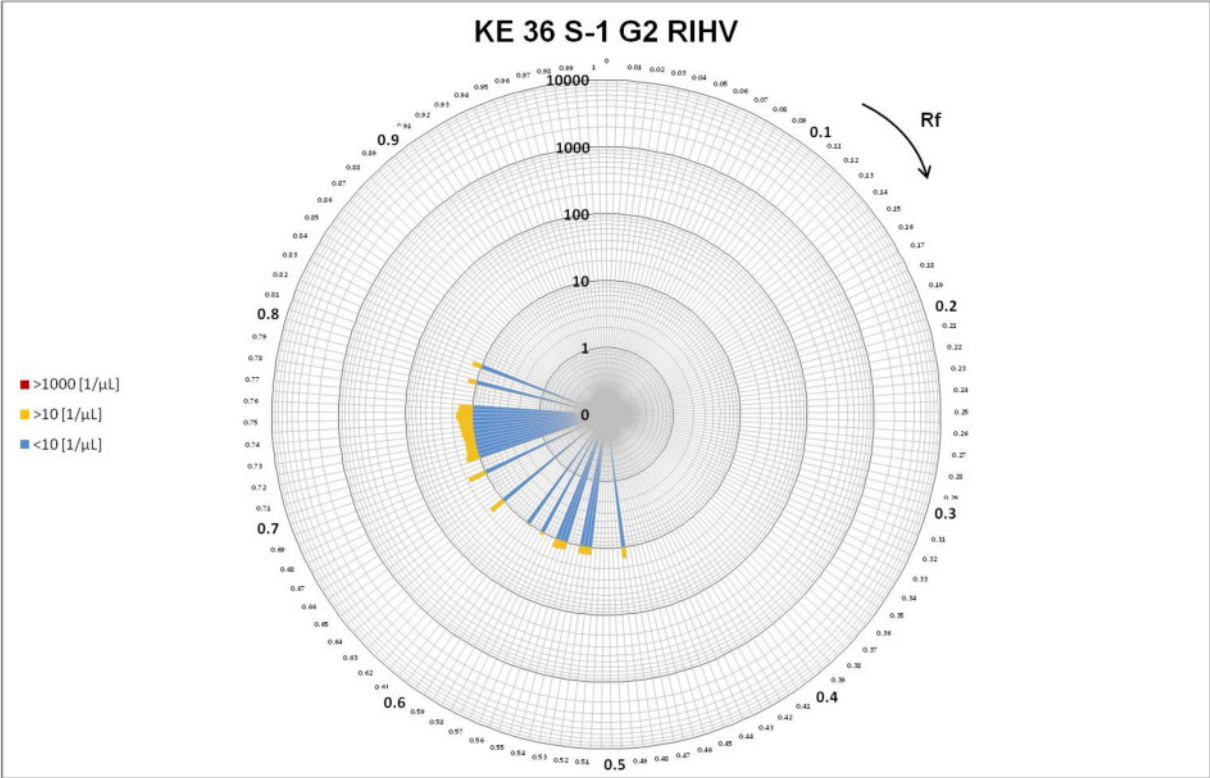


Abb. 4-22: KE 36 S-1 G2 RIHV

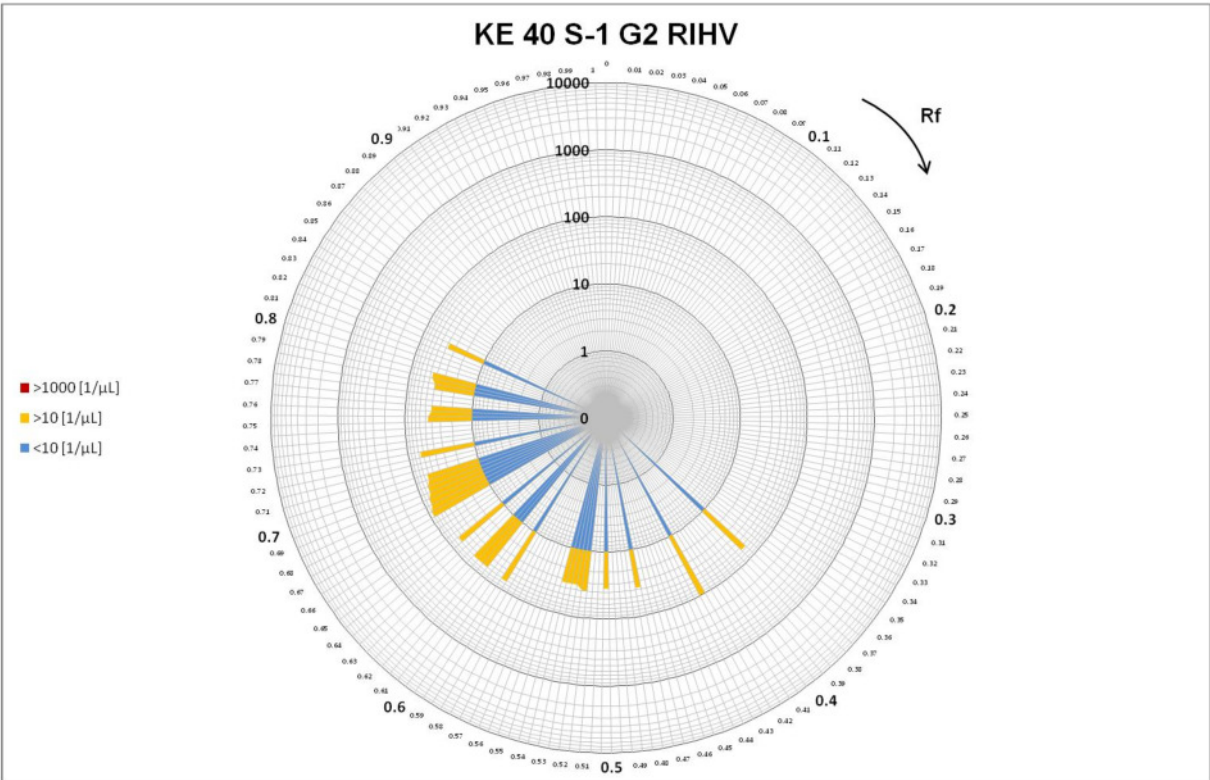


Abb. 4-23: KE 40 S-1 G2 RIHV

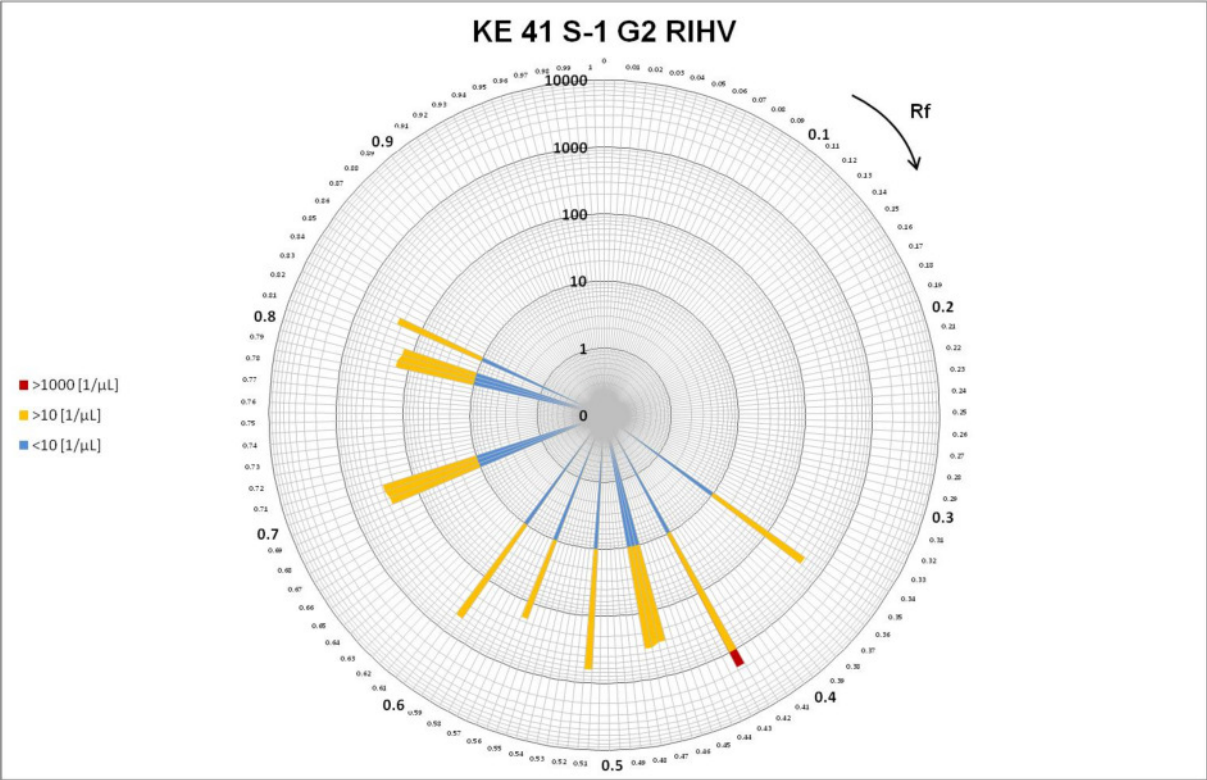


Abb. 4-24: KE 41 S-1 G2 RIHV

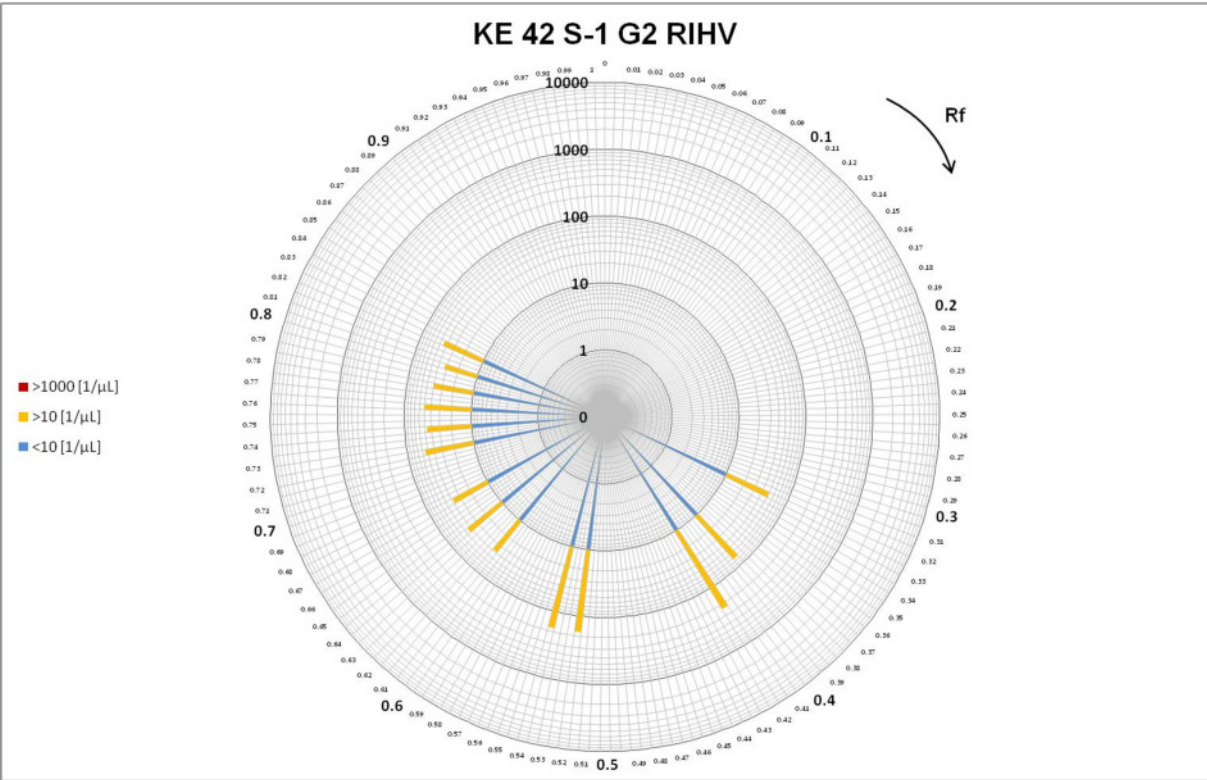


Abb. 4-25: KE 42 S-1 G2 RIHV

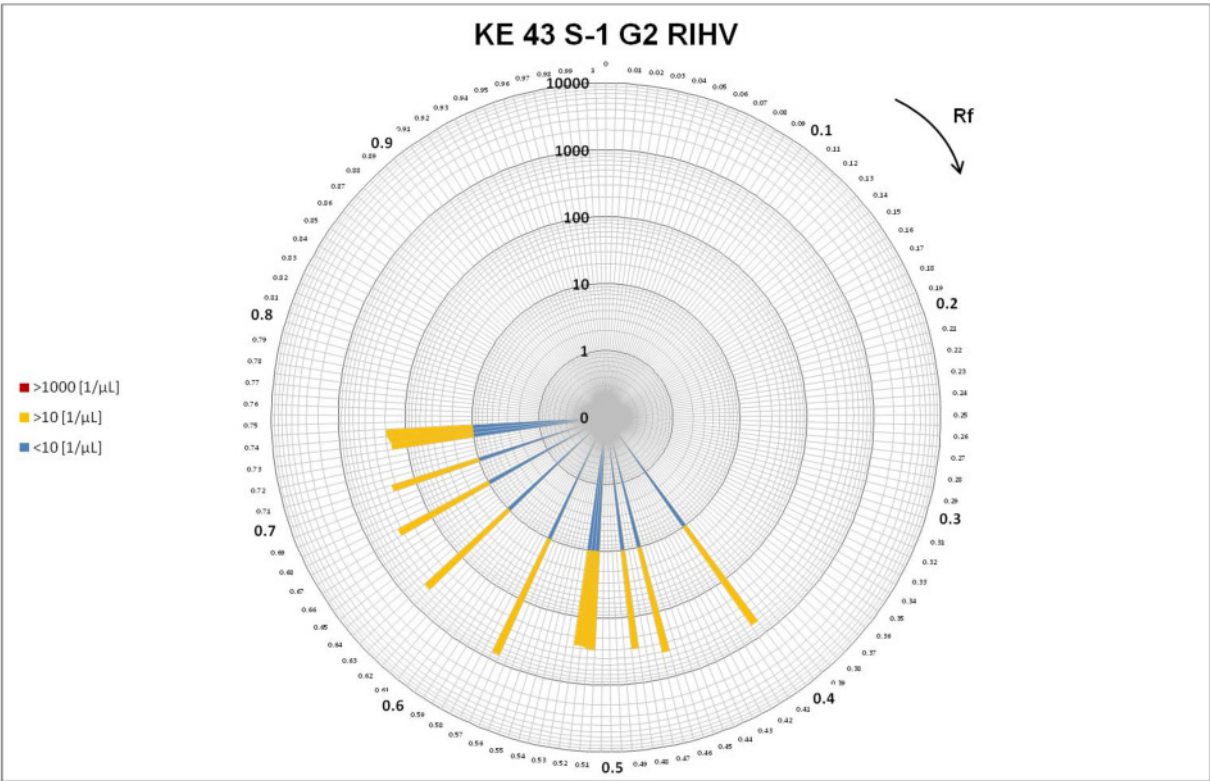


Abb. 4-26: KE 43 S-1 G2 RIHV

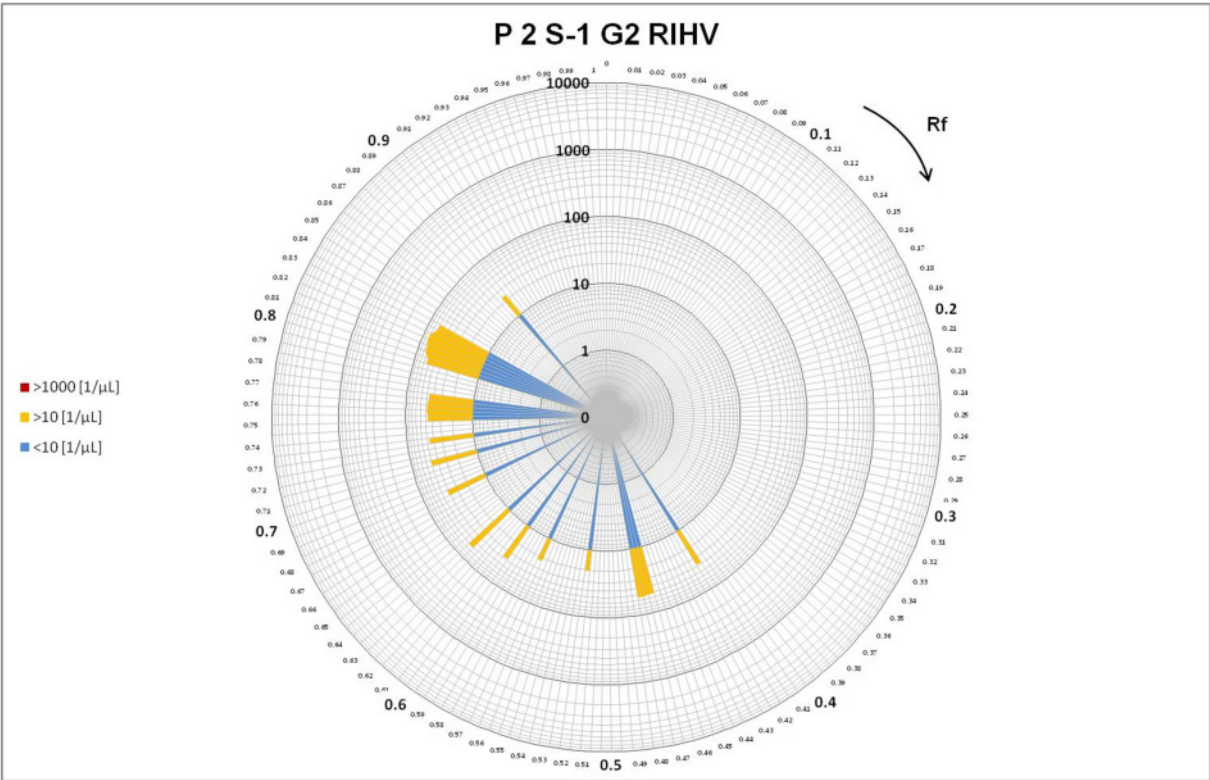


Abb. 4-27: P 2 S-1 G2 RIHV

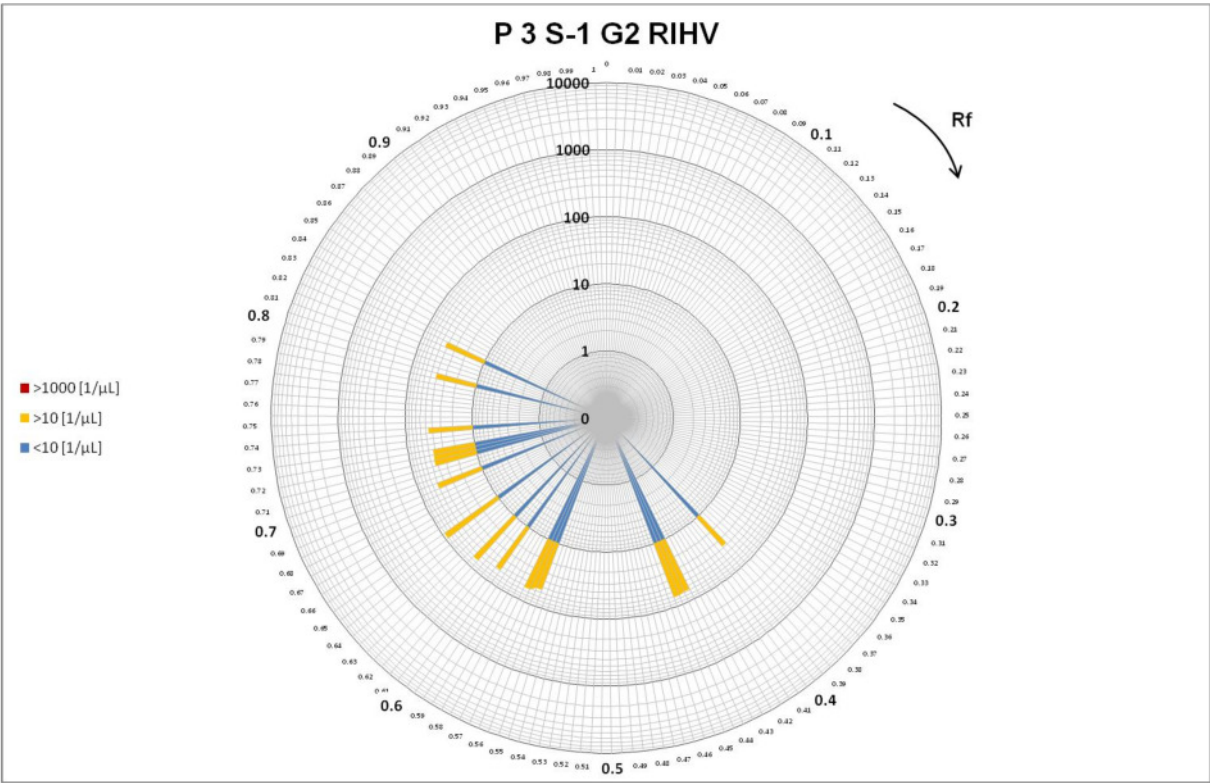


Abb. 4-28: P 3 S-1 G2 RIHV

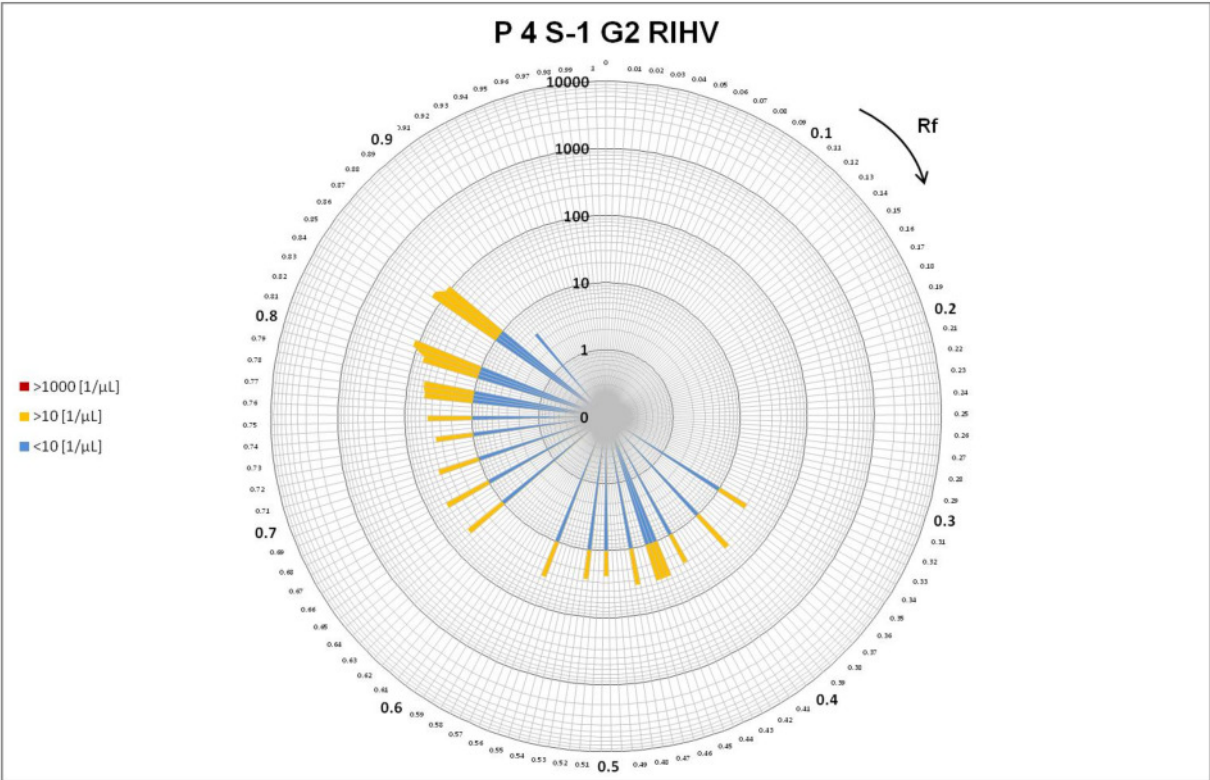


Abb. 4-29: P 4 S-1 G2 RIHV

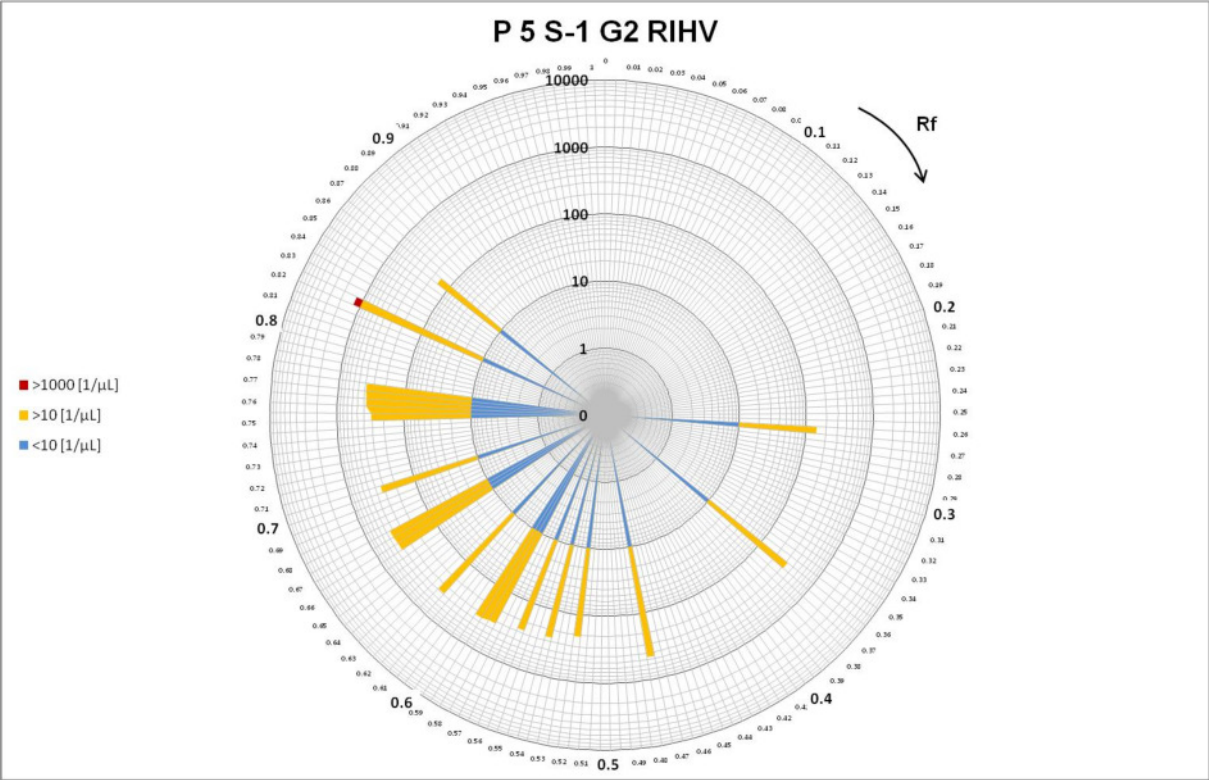


Abb. 4-30: P 5 S-1 G2 RIHV

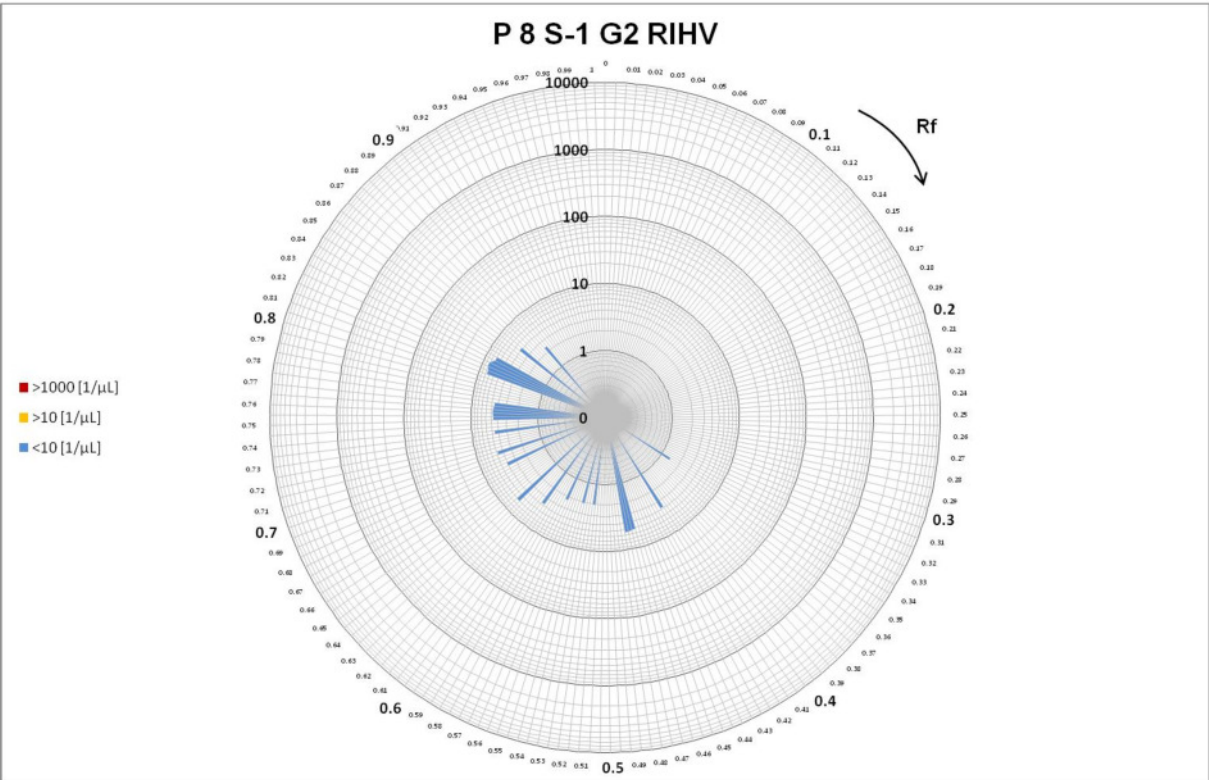


Abb. 4-31: P 8 S-1 G2 RIHV

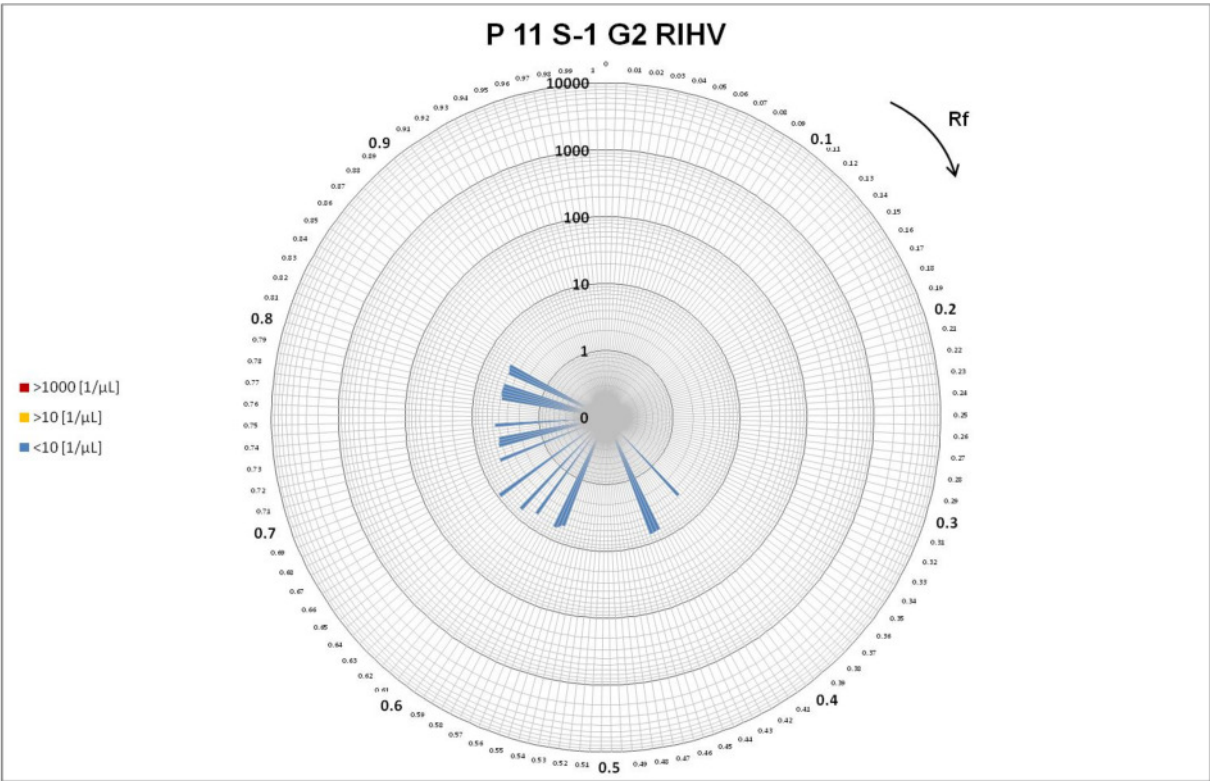


Abb. 4-32: P 11 S-1 G2 RIHV

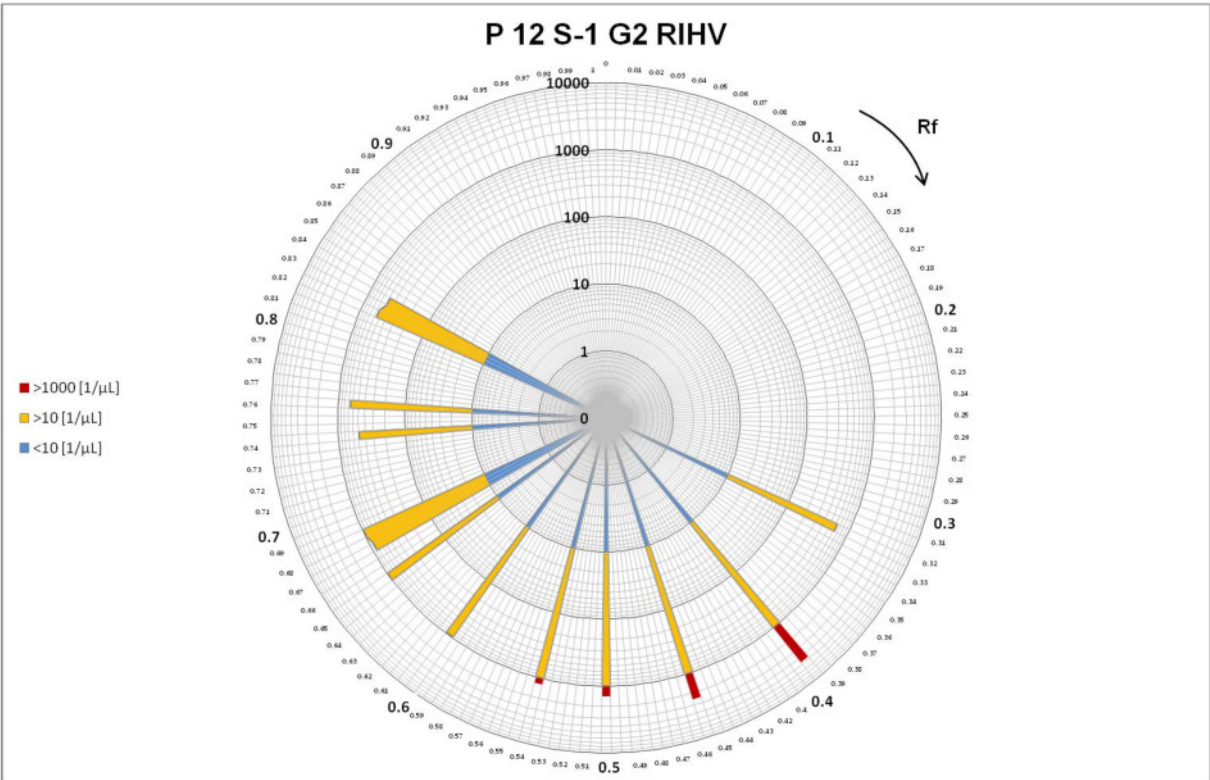


Abb. 4-33: P 12 S-1 G2 RIHV

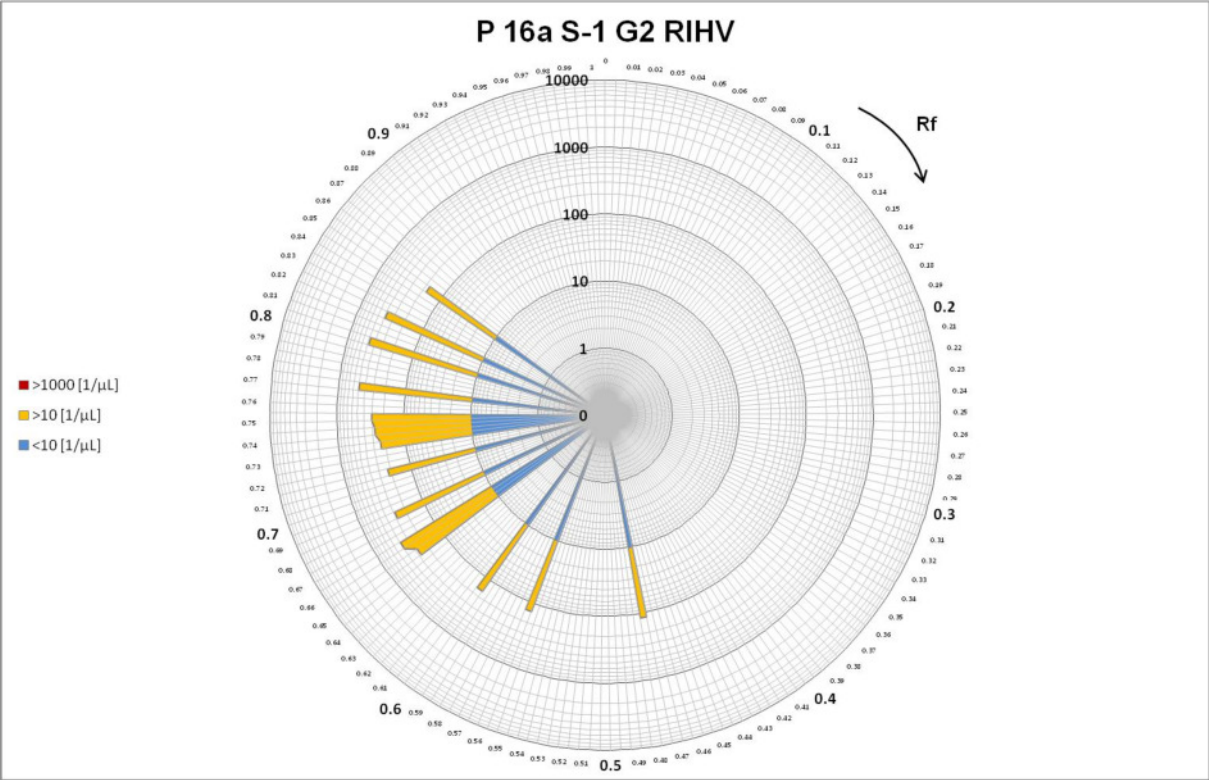


Abb. 4-34: P 16a S-1 G2 RIHV

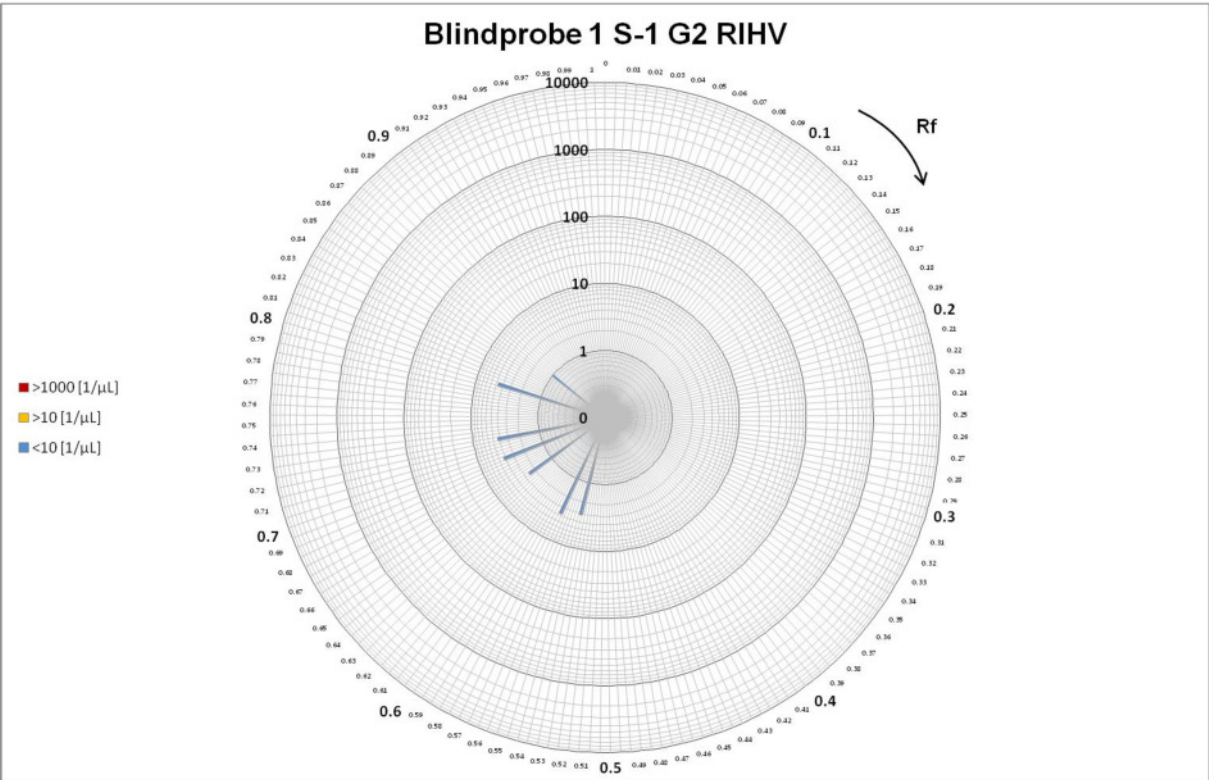


Abb. 4-35: Blindprobe 1 S-1 G2 RIHV

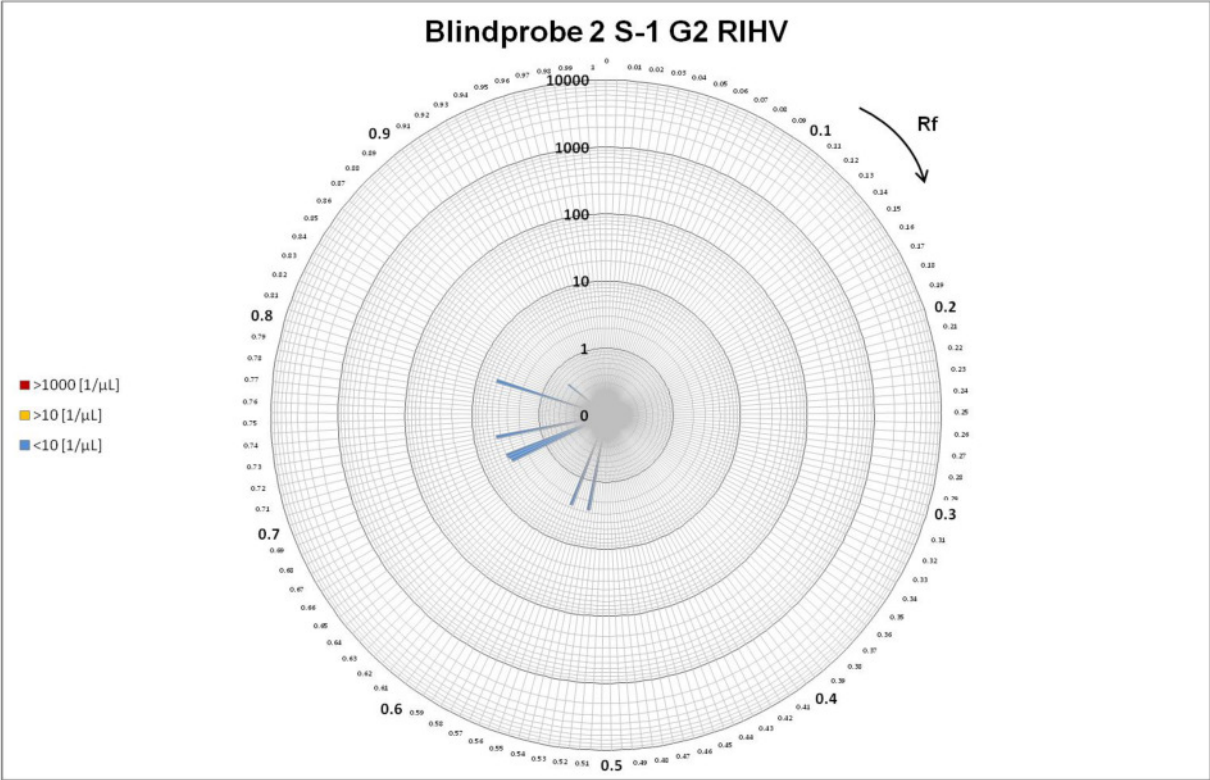


Abb. 4-36: Blindprobe 2 S-1 G2 RIHV

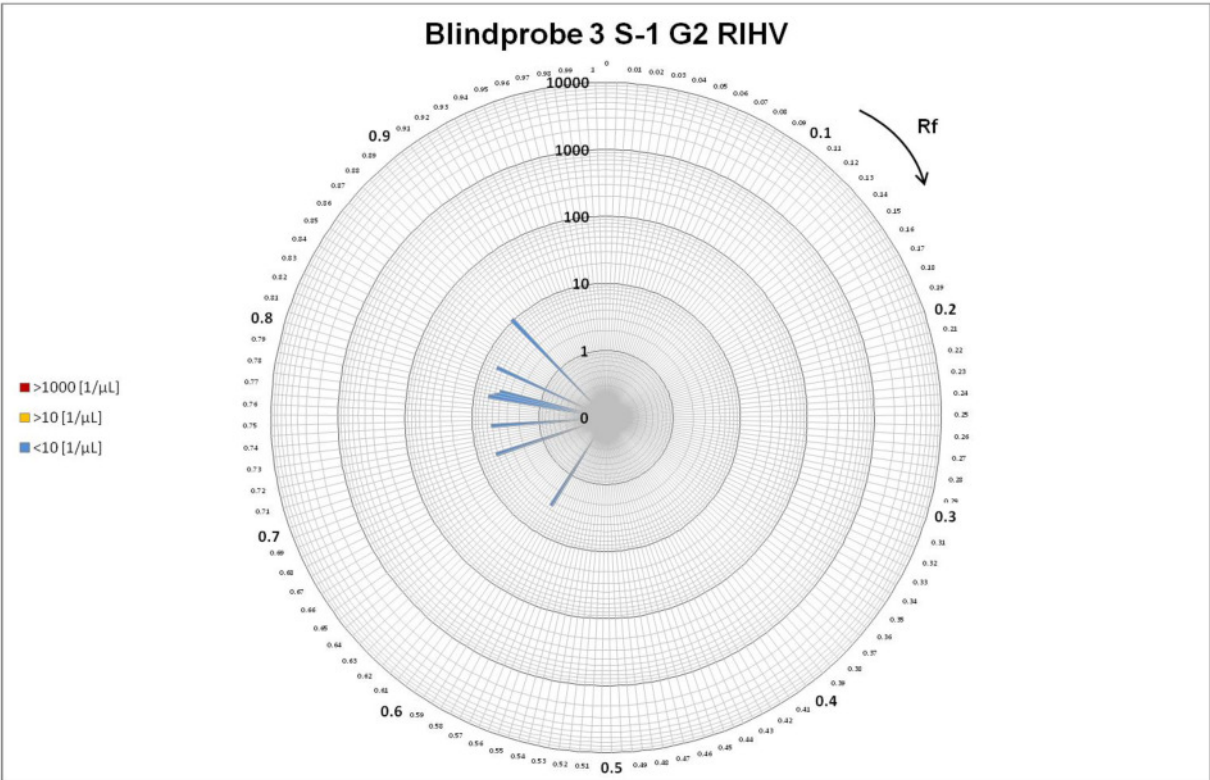


Abb. 4-37: Blindprobe 3 S-1 G2 RIHV

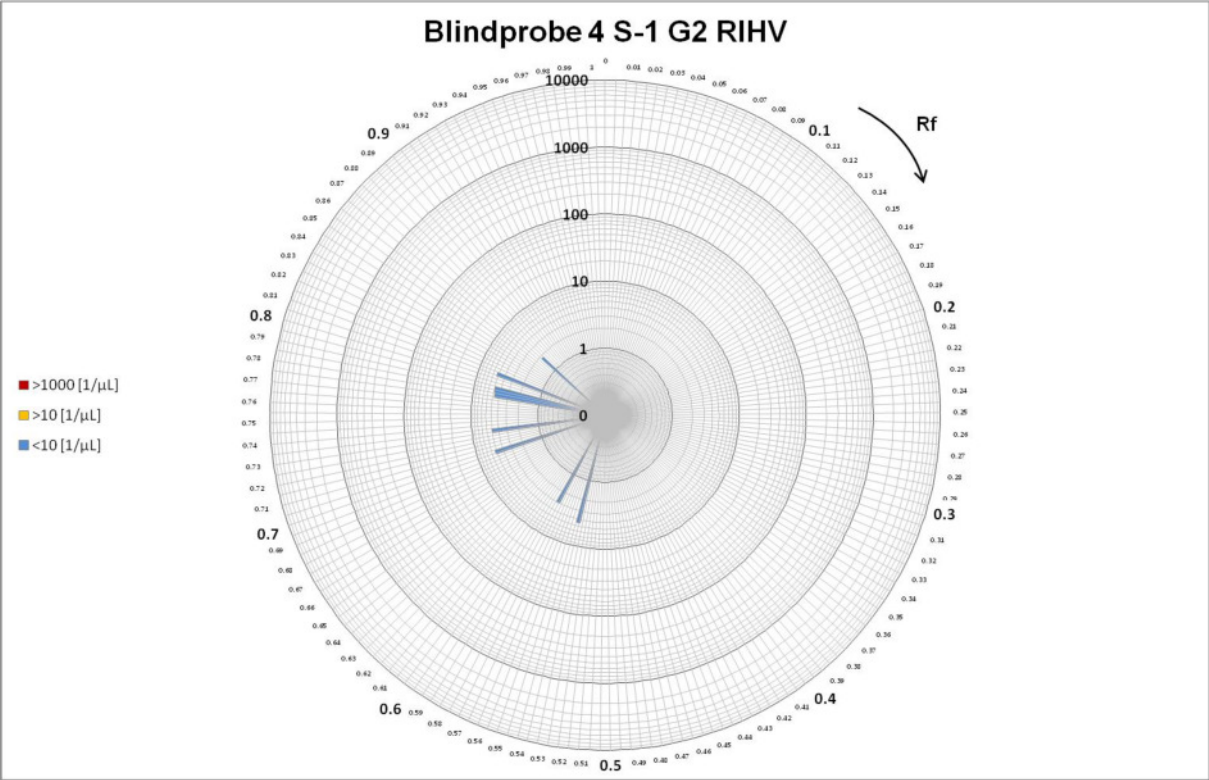


Abb. 4-38: Blindprobe 4 S-1 G2 RIHV

4.2 *Tabelle der $G_{lb,TLC}$ -Werte*

	Blindprobe 2 S-1 SPE pH2		Blindprobe 1 S-1 SPE pH 2		CI 31 S-1 SPE pH2		Br 49 S-1 SPE pH2		CI 32 S-1 SPE pH2	
Rf	$G_{lb,TLC}$	1/V (EC 50) *1000	$G_{lb,TLC}$	1/V (EC 50) *1000	$G_{lb,TLC}$	1/V (EC 50) *1000	$G_{lb,TLC}$	1/V (EC 50) *1000	$G_{lb,TLC}$	1/V (EC 50) *1000
0.000										
0.005										
0.010										
0.015										
0.020										
0.025										
0.030										
0.035										
0.040										
0.045										
0.050										
0.055										
0.060										
0.065										
0.070										
0.075										
0.080										
0.085										
0.090										
0.095										
0.100										
0.105										
0.110										
0.115										
0.120										
0.125										
0.130										
0.135										
0.140										
0.145										
0.150										
0.155										
0.160										
0.165										
0.170										
0.175										
0.180							0	4		
0.185										
0.190										
0.195										
0.200										
0.205										
0.210									0	5
0.215										
0.220							0	5		
0.225										
0.230										
0.235										
0.240										
0.245										
0.250										
0.255										
0.260										
0.265										
0.270										
0.275										
0.280									0	5
0.285										
0.290										

Rf	Blindprobe 2 S-1 SPE pH2		Blindprobe 1 S-1 SPE pH 2		CI 31 S-1 SPE pH2		Br 49 S-1 SPE pH2		CI 32 S-1 SPE pH2	
	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000
0.295										
0.300					0	4				
0.305										
0.310										
0.315										
0.320										
0.325										
0.330										
0.335										
0.340										
0.345										
0.350										
0.355										
0.360							0	5		
0.365										
0.370										
0.375										
0.380					0	6	0	5		
0.385										
0.390										
0.395										
0.400							0	5		
0.405										
0.410										
0.415										
0.420										
0.425										
0.430										
0.435										
0.440							0	5	0	8
0.445										
0.450							0	5		
0.455										
0.460										
0.465										
0.470										
0.475										
0.480					0	11				
0.485										
0.490										
0.495										
0.500					0	4				
0.505										
0.510										
0.515										
0.520							0	4		
0.525										
0.530	0	3								
0.535										
0.540			0	3						
0.545										
0.550					0	4	0	5	0	7
0.555										
0.560	0	3			0	4				
0.565										
0.570			0	4						
0.575										
0.580							0	6	0	11
0.585										

Rf	Blindprobe 2 S-1 SPE pH2		Blindprobe 1 S-1 SPE pH 2		CI 31 S-1 SPE pH2		Br 49 S-1 SPE pH2		CI 32 S-1 SPE pH2	
	G _{lib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{lib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{lib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{lib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{lib, TLC}	1/V (EC 50) *1000
0.590										
0.595										
0.600										
0.605										
0.610										
0.615										
0.620					0	5				
0.625										
0.630									0	9
0.635										
0.640					0	5	0	7		
0.645										
0.650			0	3						
0.655										
0.660					0	6	0	7	0	10
0.665										
0.670					0	6	0	7		
0.675										
0.680	0	4			0	6	0	8		
0.685										
0.690	0	4	0	4			0	8		
0.695										
0.700							0	7	0	12
0.705										
0.710					0	5				
0.715										
0.720	0	5	0	4					0	11
0.725										
0.730									0	11
0.735										
0.740					0	5			0	12
0.745										
0.750					0	5				
0.755										
0.760					0	5			0	12
0.765										
0.770					0	4				
0.775										
0.780									0	15
0.785										
0.790										
0.795										
0.800	0	5	0	5	0	5	0	6		
0.805										
0.810					0	6	0	6		
0.815										
0.820									0	13
0.825										
0.830										
0.835										
0.840							0	4	0	12
0.845										
0.850					0	3			0	13
0.855										
0.860	0	1	0	1			0	1		
0.865										
0.870										
0.875										
0.880										

Rf	Blindprobe 2 S-1 SPE pH2		Blindprobe 1 S-1 SPE pH 2		CI 31 S-1 SPE pH2		Br 49 S-1 SPE pH2		CI 32 S-1 SPE pH2	
	G _{lib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{lib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{lib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{lib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{lib, TLC}	1/V (EC 50) *1000
0.885										
0.890										
0.895										
0.900										
0.905										
0.910										
0.915										
0.920										
0.925										
0.930										
0.935										
0.940										
0.945										
0.950										
0.955										
0.960										
0.965										
0.970										
0.975										
0.980										
0.985										
0.990										
0.995										
1.000										

Rf	CI 33 S-1 SPE pH2		CI 34 S-1 SPE pH2		CI 35 S-1 SPE pH2		CI 36 S-1 SPE pH2		CI 37 S-1 SPE pH2	
	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000
0.000										
0.005										
0.010										
0.015										
0.020										
0.025										
0.030										
0.035										
0.040										
0.045										
0.050										
0.055										
0.060										
0.065										
0.070										
0.075										
0.080										
0.085										
0.090										
0.095										
0.100										
0.105										
0.110										
0.115										
0.120										
0.125										
0.130										
0.135										
0.140										
0.145										
0.150										
0.155										
0.160										
0.165										
0.170										
0.175										
0.180										
0.185										
0.190										
0.195										
0.200										
0.205										
0.210										
0.215										
0.220										
0.225										
0.230										
0.235										
0.240										
0.245										
0.250										
0.255										
0.260										
0.265										
0.270	0	4								
0.275										
0.280					0	2				
0.285										
0.290										

Rf	CI 33 S-1 SPE pH2		CI 34 S-1 SPE pH2		CI 35 S-1 SPE pH2		CI 36 S-1 SPE pH2		CI 37 S-1 SPE pH2	
	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000
0.295										
0.300			0	2						
0.305										
0.310										
0.315										
0.320					0	2				
0.325										
0.330	0	5								
0.335										
0.340	0	5								
0.345										
0.350										
0.355										
0.360										
0.365										
0.370										
0.375										
0.380										
0.385										
0.390										
0.395										
0.400										
0.405										
0.410	0	4								
0.415										
0.420									0	4
0.425										
0.430										
0.435										
0.440										
0.445										
0.450									0	3
0.455										
0.460					0	7	0	10		
0.465					0	7				
0.470	0	4			0	7	0	12	0	3
0.475										
0.480									0	3
0.485										
0.490							0	15	0	1
0.495										
0.500	0	5	0	5			0	12		
0.505										
0.510	0	4							0	3
0.515										
0.520			0	5	0	6	0	11	0	1
0.525										
0.530					0	5	0	10		
0.535										
0.540	0	5			0	5	0	11	0	4
0.545										
0.550	0	6	0	5	0	5	0	10		
0.555										
0.560			0	4						
0.565										
0.570					0	7	0	9		
0.575										
0.580	0	8							0	3
0.585										

Rf	CI 33 S-1 SPE pH2		CI 34 S-1 SPE pH2		CI 35 S-1 SPE pH2		CI 36 S-1 SPE pH2		CI 37 S-1 SPE pH2	
	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000
0.590			0	5						
0.595										
0.600	0	6	0	4	0	4				
0.605										
0.610			0	4			0	11	0	4
0.615										
0.620	0	7								
0.625										
0.630			0	4						
0.635										
0.640							0	14	0	3
0.645										
0.650	0	8			0	5				
0.655										
0.660					0	5	0	12		
0.665										
0.670	0	9	0	5					0	4
0.675										
0.680	0	11			0	6	0	14		
0.685										
0.690	0	11	0	5	0	7	0	14	0	5
0.695										
0.700	0	12	0	5	0	6	0	18		
0.705										
0.710							0	16	0	5
0.715										
0.720	0	12	0	5	0	7	0	14	0	5
0.725										
0.730	0	11	0	5	0	7			0	5
0.735										
0.740	0	12							0	5
0.745										
0.750			0	6			0	14		
0.755										
0.760	0	11	0	6	0	5	0	14		
0.765										
0.770									0	4
0.775										
0.780			0	5			0	11		
0.785										
0.790			0	5			0	13		
0.795										
0.800	0	9					0	9		
0.805										
0.810	0	10			0	6			0	4
0.815										
0.820					0	7	0	13		
0.825										
0.830			0	6						
0.835										
0.840			0	5			0	9	0	3
0.845										
0.850										
0.855										
0.860	0	2			0	2			0	2
0.865										
0.870										
0.875										
0.880			0	3						

Rf	CI 33 S-1 SPE pH2		CI 34 S-1 SPE pH2		CI 35 S-1 SPE pH2		CI 36 S-1 SPE pH2		CI 37 S-1 SPE pH2	
	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000
0.885										
0.890										
0.895										
0.900										
0.905										
0.910										
0.915										
0.920										
0.925										
0.930										
0.935										
0.940										
0.945										
0.950										
0.955										
0.960										
0.965										
0.970										
0.975										
0.980										
0.985										
0.990										
0.995										
1.000										

Rf	KE 20 S-1 SPE pH2		KE 21 S-1 SPE pH2		KE 22 S-1 SPE pH2		KE 24 S-1 SPE pH2		KE 25 S-1 SPE pH2	
	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000
0.000										
0.005										
0.010										
0.015										
0.020										
0.025										
0.030										
0.035										
0.040										
0.045										
0.050										
0.055										
0.060										
0.065										
0.070										
0.075										
0.080										
0.085										
0.090										
0.095										
0.100										
0.105										
0.110										
0.115										
0.120										
0.125										
0.130										
0.135										
0.140										
0.145										
0.150										
0.155										
0.160										
0.165										
0.170										
0.175										
0.180										
0.185										
0.190										
0.195										
0.200										
0.205										
0.210										
0.215										
0.220										
0.225										
0.230										
0.235										
0.240										
0.245										
0.250										
0.255										
0.260										
0.265										
0.270										
0.275										
0.280										
0.285										
0.290										

Rf	KE 20 S-1 SPE pH2		KE 21 S-1 SPE pH2		KE 22 S-1 SPE pH2		KE 24 S-1 SPE pH2		KE 25 S-1 SPE pH2	
	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000
0.295										
0.300										
0.305										
0.310										
0.315										
0.320	0	86								
0.325										
0.330										
0.335										
0.340										
0.345										
0.350									0	16
0.355										
0.360										
0.365										
0.370										
0.375										
0.380										
0.385										
0.390										
0.395										
0.400					0	6				
0.405										
0.410										
0.415										
0.420	0	59	0	74						
0.425										
0.430										
0.435										
0.440							0	8	0	11
0.445										
0.450			0	73						
0.455										
0.460			1	80	0	6				
0.465										
0.470			1	96						
0.475										
0.480	1	78							0	17
0.485										
0.490					0	10	0	7	0	19
0.495										
0.500	1	100	1	123	0	9			0	23
0.505										
0.510										
0.515										
0.520					0	9	0	6		
0.525										
0.530							0	7		
0.535										
0.540			0	75	0	10			0	35
0.545										
0.550							0	7	0	29
0.555										
0.560	1	87					0	7	0	38
0.565										
0.570			1	78			0	8	0	27
0.575										
0.580			1	83						
0.585										

Rf	KE 20 S-1 SPE pH2		KE 21 S-1 SPE pH2		KE 22 S-1 SPE pH2		KE 24 S-1 SPE pH2		KE 25 S-1 SPE pH2	
	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000
0.590	1	99							0	26
0.595										
0.600			1	78						
0.605										
0.610									0	24
0.615										
0.620			1	90	0	9	0	10	0	22
0.625										
0.630	1	104	1	86					0	25
0.635										
0.640	1	100							0	27
0.645										
0.650										
0.655										
0.660			1	139	0	12	0	14	0	30
0.665										
0.670	1	177	1	118	0	14				
0.675										
0.680			1	109	0	17	0	12	0	61
0.685										
0.690			1	111					11	415
0.695										
0.700	1	143	1	107	0	19	0	16		
0.705										
0.710	1	133	1	101	0	19	0	13	3	223
0.715										
0.720			1	92	0	18	0	13	0	27
0.725										
0.730	1	121					0	13	0	30
0.735										
0.740	1	107	1	92	0	17	0	13	0	29
0.745										
0.750					0	16				
0.755										
0.760	1	136	1	94	0	16	0	13		
0.765										
0.770	1	136	1	99	0	15				
0.775										
0.780			1	93	0	15	0	13		
0.785										
0.790	1	134	1	105			0	12	0	37
0.795										
0.800	1	122	1	115	0	12			0	33
0.805										
0.810					0	13	0	15	0	37
0.815										
0.820	1	145	1	158	0	15	0	11		
0.825										
0.830										
0.835										
0.840	1	161								
0.845										
0.850	1	136							0	52
0.855										
0.860							0	4		
0.865										
0.870									0	40
0.875										
0.880	1	60								

Rf	KE 20 S-1 SPE pH2		KE 21 S-1 SPE pH2		KE 22 S-1 SPE pH2		KE 24 S-1 SPE pH2		KE 25 S-1 SPE pH2	
	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000
0.885										
0.890										
0.895										
0.900										
0.905										
0.910										
0.915										
0.920										
0.925										
0.930										
0.935										
0.940										
0.945										
0.950										
0.955										
0.960										
0.965										
0.970										
0.975										
0.980										
0.985										
0.990										
0.995										
1.000										

Rf	KE 26 S-1 SPE pH2		KE 30 S-1 SPE pH2		KE 31 S-1 SPE pH2		KE 28 S-1 SPE pH2		KE 29 S-1 SPE pH2	
	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000
0.000										
0.005										
0.010										
0.015										
0.020										
0.025										
0.030										
0.035										
0.040										
0.045										
0.050										
0.055										
0.060										
0.065										
0.070										
0.075										
0.080										
0.085										
0.090										
0.095										
0.100										
0.105										
0.110										
0.115										
0.120										
0.125										
0.130										
0.135										
0.140										
0.145										
0.150										
0.155										
0.160										
0.165										
0.170										
0.175										
0.180										
0.185										
0.190										
0.195										
0.200										
0.205										
0.210										
0.215										
0.220										
0.225										
0.230										
0.235										
0.240										
0.245										
0.250										
0.255										
0.260										
0.265										
0.270										
0.275										
0.280										
0.285										
0.290										

Rf	KE 26 S-1 SPE pH2		KE 30 S-1 SPE pH2		KE 31 S-1 SPE pH2		KE 28 S-1 SPE pH2		KE 29 S-1 SPE pH2	
	G _{ib} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} , TLC	1/V (EC 50) *1000
0.295										
0.300										
0.305										
0.310										
0.315										
0.320										
0.325										
0.330										
0.335										
0.340										
0.345										
0.350										
0.355										
0.360										
0.365										
0.370										
0.375										
0.380										
0.385										
0.390					0	17				
0.395										
0.400			10	478	0	22	14	2104		
0.405										
0.410									2	367
0.415										
0.420			15	533					4	514
0.425										
0.430										
0.435										
0.440					0	10				
0.445										
0.450	0	5					70	6440		
0.455										
0.460							21	2385		
0.465										
0.470	0	7							1	187
0.475										
0.480	0	7							1	175
0.485										
0.490	0	6								
0.495										
0.500	0	6					14	2215		
0.505										
0.510					0	6				
0.515										
0.520	0	5	1	100	0	6			1	157
0.525										
0.530					0	6				
0.535										
0.540	0	6			0	6	15	1792		
0.545										
0.550			1	108	0	6				
0.555										
0.560					0	6	10	1342		
0.565										
0.570										
0.575										
0.580	0	6								
0.585										

Rf	KE 26 S-1 SPE pH2		KE 30 S-1 SPE pH2		KE 31 S-1 SPE pH2		KE 28 S-1 SPE pH2		KE 29 S-1 SPE pH2	
	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000
0.590	0	5								
0.595										
0.600	0	5	1	184	0	10	21	2047	2	273
0.605										
0.610										
0.615										
0.620										
0.625										
0.630	0	6					17	3016	1	229
0.635										
0.640			2	204	0	12				
0.645										
0.650										
0.655										
0.660	0	6							1	167
0.665										
0.670			2	166	0	12			1	175
0.675										
0.680	0	6			0	11	21	2513	1	170
0.685										
0.690	0	6	1	133			16	2168		
0.695										
0.700			1	114	0	8				
0.705										
0.710	0	7	1	124						
0.715										
0.720	0	8	1	130	0	9				
0.725										
0.730	0	7	1	132	0	9	8	1027		
0.735										
0.740	0	6	1	121						
0.745										
0.750										
0.755										
0.760	0	6			0	14				
0.765										
0.770	0	6	3	229	0	13			9	383
0.775										
0.780	0	5								
0.785										
0.790	0	6	4	279						
0.795										
0.800										
0.805										
0.810									1	102
0.815										
0.820			2	222	0	8				
0.825										
0.830										
0.835										
0.840	0	7								
0.845										
0.850										
0.855										
0.860	0	4								
0.865										
0.870										
0.875										
0.880										

Rf	KE 26 S-1 SPE pH2		KE 30 S-1 SPE pH2		KE 31 S-1 SPE pH2		KE 28 S-1 SPE pH2		KE 29 S-1 SPE pH2	
	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000
0.885										
0.890										
0.895										
0.900										
0.905										
0.910										
0.915										
0.920										
0.925										
0.930										
0.935										
0.940										
0.945										
0.950										
0.955										
0.960										
0.965										
0.970										
0.975										
0.980										
0.985										
0.990										
0.995										
1.000										

Rf	KE 32 S-1 SPE pH2		KE 33 S-1 SPE pH2		KE 34 S-1 SPE pH2		KE 36 S-1 SPE pH2		KE 40 S-1 SPE pH2	
	G _{ib} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} , TLC	1/V (EC 50) *1000
0.000										
0.005										
0.010										
0.015										
0.020										
0.025										
0.030										
0.035										
0.040										
0.045										
0.050										
0.055										
0.060										
0.065										
0.070										
0.075										
0.080										
0.085										
0.090										
0.095										
0.100										
0.105										
0.110										
0.115										
0.120										
0.125										
0.130										
0.135										
0.140										
0.145										
0.150										
0.155										
0.160										
0.165										
0.170										
0.175										
0.180										
0.185										
0.190										
0.195										
0.200										
0.205										
0.210										
0.215										
0.220										
0.225										
0.230										
0.235										
0.240										
0.245										
0.250										
0.255										
0.260										
0.265										
0.270										
0.275										
0.280										
0.285										
0.290										

Rf	KE 32 S-1 SPE pH2		KE 33 S-1 SPE pH2		KE 34 S-1 SPE pH2		KE 36 S-1 SPE pH2		KE 40 S-1 SPE pH2	
	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000
0.295										
0.300										
0.305										
0.310	0	34								
0.315										
0.320										
0.325										
0.330										
0.335										
0.340										
0.345										
0.350										
0.355										
0.360										
0.365										
0.370									0	66
0.375										
0.380										
0.385										
0.390					0	35				
0.395										
0.400										
0.405										
0.410			0	73						
0.415										
0.420	1	91	1	85					1	97
0.425										
0.430										
0.435										
0.440	0	77								
0.445										
0.450			1	57						
0.455										
0.460	1	88	1	66						
0.465										
0.470									0	37
0.475										
0.480	1	84	1	65			0	15		
0.485										
0.490										
0.495										
0.500	0	64			0	75			0	35
0.505										
0.510	0	64			0	76				
0.515										
0.520	1	66					0	13	0	39
0.525										
0.530					0	70	0	13	0	33
0.535										
0.540	0	54	1	71	0	70			0	34
0.545										
0.550			0	54	1	76	0	13		
0.555										
0.560	0	57					0	14		
0.565										
0.570			1	56	1	86				
0.575										
0.580	0	63					0	11		
0.585										

Rf	KE 32 S-1 SPE pH2		KE 33 S-1 SPE pH2		KE 34 S-1 SPE pH2		KE 36 S-1 SPE pH2		KE 40 S-1 SPE pH2	
	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000
0.590					1	81			1	72
0.595										
0.600					1	90	0	11		
0.605										
0.610									0	69
0.615										
0.620	0	57	1	93					0	70
0.625										
0.630										
0.635										
0.640	1	80					0	17	0	67
0.645										
0.650			1	97	1	126				
0.655										
0.660										
0.665										
0.670	1	80	1	79	1	91			1	89
0.675										
0.680			1	83	1	99	0	19	1	79
0.685										
0.690	1	77	1	82					1	70
0.695										
0.700	1	86					0	16	1	63
0.705										
0.710							0	14		
0.715										
0.720			1	75			0	14	1	66
0.725										
0.730					1	85	0	15		
0.735										
0.740			1	72	1	70	0	16		
0.745										
0.750	1	77	1	79			0	18	0	46
0.755										
0.760					1	65	0	16	0	41
0.765										
0.770			1	87						
0.775										
0.780	1	91	1	84	1	63			0	40
0.785										
0.790	2	95	1	89	1	69	0	13	0	46
0.795										
0.800			1	106						
0.805										
0.810	1	80					0	14		
0.815										
0.820	1	84	1	122	1	67			0	38
0.825										
0.830	1	76								
0.835										
0.840	1	64								
0.845										
0.850					0	24				
0.855										
0.860			0	30						
0.865										
0.870										
0.875										
0.880										

Rf	KE 32 S-1 SPE pH2		KE 33 S-1 SPE pH2		KE 34 S-1 SPE pH2		KE 36 S-1 SPE pH2		KE 40 S-1 SPE pH2	
	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ib} ,TLC	1/V (EC 50) *1000
0.885										
0.890										
0.895										
0.900										
0.905										
0.910										
0.915										
0.920										
0.925										
0.930										
0.935										
0.940										
0.945										
0.950										
0.955										
0.960										
0.965										
0.970										
0.975										
0.980										
0.985										
0.990										
0.995										
1.000										

Rf	KE 41 S-1 SPE pH2		KE 42 S-1 SPE pH2		KE 43 S-1 SPE pH2		P2 S-1 SPE pH2		P 3 S-1 SPE pH2	
	G _{ld, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ld, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ld, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ld, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ld, TLC}	1/V (EC 50) *1000
0.000										
0.005										
0.010										
0.015										
0.020										
0.025										
0.030										
0.035										
0.040										
0.045										
0.050										
0.055										
0.060										
0.065										
0.070										
0.075										
0.080										
0.085										
0.090										
0.095										
0.100										
0.105										
0.110										
0.115										
0.120										
0.125										
0.130										
0.135										
0.140										
0.145										
0.150										
0.155										
0.160										
0.165										
0.170										
0.175										
0.180										
0.185										
0.190										
0.195										
0.200										
0.205										
0.210										
0.215										
0.220										
0.225										
0.230										
0.235										
0.240										
0.245										
0.250										
0.255										
0.260										
0.265										
0.270										
0.275										
0.280										
0.285										
0.290										

Rf	KE 41 S-1 SPE pH2		KE 42 S-1 SPE pH2		KE 43 S-1 SPE pH2		P2 S-1 SPE pH2		P 3 S-1 SPE pH2	
	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000
0.295										
0.300										
0.305										
0.310										
0.315										
0.320			0	50.3						
0.325										
0.330										
0.335										
0.340										
0.345										
0.350	4	464								
0.355										
0.360										
0.365										
0.370										
0.375										
0.380			1	73					0	38
0.385										
0.390										
0.395										
0.400					5	619				
0.405										
0.410			4	231			0	38		
0.415										
0.420	49	1794								
0.425										
0.430									1	69
0.435										
0.440									1	73
0.445										
0.450										
0.455										
0.460	3	302			3	413	0	52		
0.465										
0.470	3	345					0	55		
0.475										
0.480					2	305				
0.485										
0.490										
0.495										
0.500										
0.505										
0.510	4	632			2	302				
0.515										
0.520			2	172	2	272	0	20		
0.525										
0.530										
0.535										
0.540			2	177						
0.545										
0.550										
0.555										
0.560	1	178							0	55
0.565										
0.570					4	787	0	22	0	64
0.575										
0.580										
0.585										

Rf	KE 41 S-1 SPE pH2		KE 42 S-1 SPE pH2		KE 43 S-1 SPE pH2		P2 S-1 SPE pH2		P 3 S-1 SPE pH2	
	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000
0.590										
0.595										
0.600	4	501					0	38	1	58
0.605										
0.610			0	39						
0.615										
0.620									1	73
0.625										
0.630					3	484	1	61		
0.635										
0.640			0	44						
0.645										
0.650									0	93
0.655										
0.660										
0.665										
0.670			0	38	2	343				
0.675										
0.680							0	41		
0.685										
0.690	2	269							0	51
0.695										
0.700	2	294			2	231				
0.705										
0.710							0	50	0	44
0.715										
0.720			1	54					0	43
0.725										
0.730					1	172	0	46		
0.735										
0.740			0	46	1	197			0	46
0.745										
0.750							0	47		
0.755										
0.760			0	51			0	48		
0.765										
0.770							0	46		
0.775										
0.780			0	40						
0.785										
0.790	1	158							0	42
0.795										
0.800	2	142	0	32			0	64		
0.805										
0.810							1	76		
0.815										
0.820	3	240	0	44			1	82	0	43
0.825										
0.830							1	69		
0.835										
0.840										
0.845										
0.850										
0.855										
0.860										
0.865										
0.870										
0.875										
0.880										

Rf	KE 41 S-1 SPE pH2		KE 42 S-1 SPE pH2		KE 43 S-1 SPE pH2		P2 S-1 SPE pH2		P 3 S-1 SPE pH2	
	G _{ld, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ld, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ld, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ld, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ld, TLC}	1/V (EC 50) *1000
0.885										
0.890							0	24		
0.895										
0.900										
0.905										
0.910										
0.915										
0.920										
0.925										
0.930										
0.935										
0.940										
0.945										
0.950										
0.955										
0.960										
0.965										
0.970										
0.975										
0.980										
0.985										
0.990										
0.995										
1.000										

Rf	P 4 S-1 SPE pH2		P 5 S-1 SPE pH2		P 8 S-1 SPE pH2		P 11 S-1 SPE pH2		P 12 S-1 SPE pH2	
	G _{ld} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} , TLC	1/V (EC 50) *1000
0.000										
0.005										
0.010										
0.015										
0.020										
0.025										
0.030										
0.035										
0.040										
0.045										
0.050										
0.055										
0.060										
0.065										
0.070										
0.075										
0.080										
0.085										
0.090										
0.095										
0.100										
0.105										
0.110										
0.115										
0.120										
0.125										
0.130										
0.135										
0.140										
0.145										
0.150										
0.155										
0.160										
0.165										
0.170										
0.175										
0.180										
0.185										
0.190										
0.195										
0.200										
0.205										
0.210										
0.215										
0.220										
0.225										
0.230										
0.235										
0.240										
0.245										
0.250										
0.255										
0.260			2	143						
0.265										
0.270										
0.275										
0.280										
0.285										
0.290										

Rf	P 4 S-1 SPE pH2		P 5 S-1 SPE pH2		P 8 S-1 SPE pH2		P 11 S-1 SPE pH2		P 12 S-1 SPE pH2	
	G _{ld} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} , TLC	1/V (EC 50) *1000
0.295										
0.300										
0.305										
0.310										
0.315										
0.320									5	626
0.325										
0.330										
0.335										
0.340	0	29			0	1				
0.345										
0.350										
0.355										
0.360			4	312						
0.365										
0.370										
0.375										
0.380	0	44					0	4		
0.385										
0.390									99	4528
0.395										
0.400										
0.405										
0.410					0	4				
0.415										
0.420	0	29								
0.425										
0.430							0	7		
0.435										
0.440	0	35					0	7		
0.445										
0.450	0	36							19	2437
0.455										
0.460					0	5				
0.465										
0.470	0	35	5	455	0	5				
0.475										
0.480										
0.485										
0.490										
0.495										
0.500	0	24							8	1406
0.505										
0.510										
0.515										
0.520	0	27	2	211	0	2				
0.525										
0.530										
0.535										
0.540			3	258	0	2			7	1217
0.545										
0.550										
0.555										
0.560	0	36	4	269			0	5		
0.565										
0.570					0	2	0	6		
0.575										
0.580			3	324						
0.585										

Rf	P 4 S-1 SPE pH2		P 5 S-1 SPE pH2		P 8 S-1 SPE pH2		P 11 S-1 SPE pH2		P 12 S-1 SPE pH2	
	G _{lib} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{lib} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{lib} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{lib} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{lib} , TLC	1/V (EC 50) *1000
0.590			4	346						
0.595										
0.600					0	4	0	6	6	970
0.605										
0.610										
0.615										
0.620			5	385			0	7		
0.625										
0.630					0	6				
0.635										
0.640	1	46								
0.645										
0.650							0	9	8	1002
0.655										
0.660			3	429						
0.665										
0.670	1	52	4	440					10	874
0.675										
0.680					0	4			6	972
0.685										
0.690							0	5		
0.695										
0.700	1	43	3	327	0	5				
0.705										
0.710					0	5	0	5		
0.715										
0.720							0	4		
0.725										
0.730	1	37			0	5				
0.735										
0.740							0	5	3	491
0.745										
0.750	1	47	2	309	0	5				
0.755										
0.760			3	372	0	5			3	656
0.765										
0.770	1	54	4	384	0	5				
0.775										
0.780	1	58					0	4		
0.785										
0.790							0	4		
0.795										
0.800	1	73					0	4		
0.805										
0.810	2	118			0	8				
0.815										
0.820			27	1256	0	8	0	4	5	554
0.825										
0.830					0	7	0	4	4	480
0.835										
0.840										
0.845										
0.850	2	146								
0.855										
0.860	1	112	2	153	0	4				
0.865										
0.870										
0.875										
0.880										

Rf	P 4 S-1 SPE pH2		P 5 S-1 SPE pH2		P 8 S-1 SPE pH2		P 11 S-1 SPE pH2		P 12 S-1 SPE pH2	
	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000	G _{ib, TLC}	1/V (EC 50) *1000
0.885										
0.890	0	4			0	2				
0.895										
0.900										
0.905										
0.910										
0.915										
0.920										
0.925										
0.930										
0.935										
0.940										
0.945										
0.950										
0.955										
0.960										
0.965										
0.970										
0.975										
0.980										
0.985										
0.990										
0.995										
1.000										

Rf	P 16a S-1 SPE pH2		P 16a S-1 SPE pH2		BW S-1 SPE pH2		Blindprobe 3 S-1SPE pH 2		Blindprobe 4 S-1SPE pH 2	
	G _{ld} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} , TLC	1/V (EC 50) *1000
0.000										
0.005										
0.010										
0.015										
0.020										
0.025										
0.030										
0.035										
0.040										
0.045										
0.050										
0.055										
0.060										
0.065										
0.070										
0.075										
0.080										
0.085										
0.090										
0.095										
0.100										
0.105										
0.110										
0.115										
0.120										
0.125										
0.130										
0.135										
0.140										
0.145										
0.150										
0.155										
0.160										
0.165										
0.170										
0.175										
0.180										
0.185										
0.190										
0.195										
0.200										
0.205										
0.210										
0.215										
0.220										
0.225										
0.230										
0.235										
0.240										
0.245										
0.250										
0.255										
0.260										
0.265										
0.270										
0.275										
0.280					0	1				
0.285										
0.290										

Rf	P 16a S-1 SPE pH2		P 16a S-1 SPE pH2		BW S-1 SPE pH2		Blindprobe 3 S-1SPE pH 2		Blindprobe 4 S-1SPE pH 2	
	G _{ld} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} ,TLC	1/V (EC 50) *1000
0.295										
0.300										
0.305										
0.310										
0.315										
0.320										
0.325										
0.330										
0.335										
0.340										
0.345										
0.350										
0.355										
0.360										
0.365										
0.370										
0.375										
0.380										
0.385										
0.390										
0.395										
0.400										
0.405										
0.410										
0.415										
0.420										
0.425										
0.430										
0.435										
0.440										
0.445										
0.450										
0.455										
0.460										
0.465										
0.470	1	117	1	117						
0.475										
0.480										
0.485										
0.490										
0.495										
0.500										
0.505										
0.510					0	1				
0.515										
0.520										
0.525										
0.530										
0.535										
0.540									0	4
0.545										
0.550					0	3				
0.555										
0.560	2	134	2	134	0	3				
0.565										
0.570										
0.575										
0.580									0	3
0.585										

Rf	P 16a S-1 SPE pH2		P 16a S-1 SPE pH2		BW S-1 SPE pH2		Blindprobe 3 S-1SPE pH 2		Blindprobe 4 S-1SPE pH 2	
	G _{lib} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{lib} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{lib} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{lib} , TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{lib} , TLC	1/V (EC 50) *1000
0.590							0	4		
0.595										
0.600	2	158	2	158	0	2				
0.605										
0.610					0	2				
0.615										
0.620					0	1				
0.625										
0.630										
0.635										
0.640					0	2				
0.645										
0.650	3	278	3	278						
0.655										
0.660	6	395	6	395	0	2				
0.665										
0.670					0	3				
0.675										
0.680	3	286	3	286	0	3				
0.685										
0.690										
0.695										
0.700					0	4	0	5	0	5
0.705										
0.710	2	222	2	222						
0.715										
0.720					0	5				
0.725										
0.730	3	238	3	238	0	6			0	5
0.735										
0.740	3	278	3	278	0	5	0	5		
0.745										
0.750	4	306	4	306						
0.755										
0.760					0	5				
0.765										
0.770	8	496	8	496	0	6				
0.775										
0.780					0	5	0	6	0	5
0.785										
0.790							0	4	0	5
0.795										
0.800	4	483	4	483						
0.805										
0.810					0	7			0	5
0.815										
0.820	4	389	4	389			0	6		
0.825										
0.830										
0.835										
0.840					0	3				
0.845										
0.850	2	175	2	175						
0.855										
0.860					0	2				
0.865										
0.870									0	2
0.875										
0.880							0	11		

Rf	P 16a S-1 SPE pH2		P 16a S-1 SPE pH2		BW S-1 SPE pH2		Blindprobe 3 S-1SPE pH 2		Blindprobe 4 S-1SPE pH 2	
	G _{ld} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} ,TLC	1/V (EC 50) *1000	G _{ld} ,TLC	1/V (EC 50) *1000
0.885										
0.890										
0.895										
0.900										
0.905										
0.910										
0.915										
0.920										
0.925										
0.930										
0.935										
0.940										
0.945										
0.950										
0.955										
0.960										
0.965										
0.970										
0.975										
0.980										
0.985										
0.990										
0.995										
1.000										

5 Anhang

5.1 *Probenvorbereitung*

5.1.1 *Probenlagerung*

Geschützt vor Licht bei 4 - 7 °C

5.1.2 *Festphasenextraktion (SPE)*

Probenvolumen: 500 mL

pH-Wert: auf pH = 2 einstellen

Festphasenmaterial: Isolute, ENV+ (200mg), V = 6 mL

Vorkonditionierung: 1.) 6 mL n-Hexan
2.) 6 mL Aceton
3.) 6 mL Methanol
4.) 6 mL Laborreinstwasser pH = 2

Elution: mit insgesamt 6 mL MeOH. Zwischen den Elutionsschritten unter 50 °C warmen Stickstoff abblasen. Beim letzten Elutionsschritt auf ca. 25 µl einengen.

Aufnahmevolumen: 1000 µl

5.2 HPTLC/AMD-Gradienten

Tabelle 5-1: HPTLC/AMD-Gradient „Kesslergrube G-1“

MeOH: HCOOH 100 : 0.05	CH ₂ Cl ₂	n-Hexan	Migration Distanz	Trocknungszeit
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
50,0 Vol %	50,0 Vol %	0,0 Vol %	10,0 mm	4,0 min
47,5 Vol %	52,5 Vol %	0,0 Vol %	13,3 mm	4,0 min
45,0 Vol %	55,0 Vol %	0,0 Vol %	16,5 mm	4,0 min
42,5 Vol %	57,5 Vol %	0,0 Vol %	19,8 mm	4,0 min
40,0 Vol %	60,0 Vol %	0,0 Vol %	23,0 mm	4,0 min
37,5 Vol %	62,5 Vol %	0,0 Vol %	26,3 mm	4,0 min
35,0 Vol %	65,0 Vol %	0,0 Vol %	29,6 mm	4,0 min
32,5 Vol %	67,5 Vol %	0,0 Vol %	32,8 mm	4,0 min
30,0 Vol %	70,0 Vol %	0,0 Vol %	36,1 mm	4,0 min
27,5 Vol %	72,5 Vol %	0,0 Vol %	39,3 mm	4,0 min
25,0 Vol %	75,0 Vol %	0,0 Vol %	42,6 mm	4,0 min
22,5 Vol %	77,5 Vol %	0,0 Vol %	45,9 mm	4,0 min
20,0 Vol %	80,0 Vol %	0,0 Vol %	49,1 mm	4,0 min
17,5 Vol %	82,5 Vol %	0,0 Vol %	52,4 mm	4,0 min
15,0 Vol %	85,0 Vol %	0,0 Vol %	55,7 mm	4,0 min
12,5 Vol %	87,5 Vol %	0,0 Vol %	58,9 mm	4,0 min
10,0 Vol %	90,0 Vol %	0,0 Vol %	62,2 mm	4,0 min
7,5 Vol %	92,5 Vol %	0,0 Vol %	65,4 mm	4,0 min
5,0 Vol %	95,0 Vol %	0,0 Vol %	68,7 mm	3,0 min
2,5 Vol %	97,5 Vol %	0,0 Vol %	72,0 mm	3,0 min
0,0 Vol %	100,0 Vol %	0,0 Vol %	75,2 mm	3,0 min
0,0 Vol %	66,7 Vol %	33,3 Vol %	78,5 mm	3,0 min
0,0 Vol %	33,4 Vol %	66,6 Vol %	81,7 mm	3,0 min
0,0 Vol %	0,0 Vol %	100,0 Vol %	85,0 mm	10,0 min

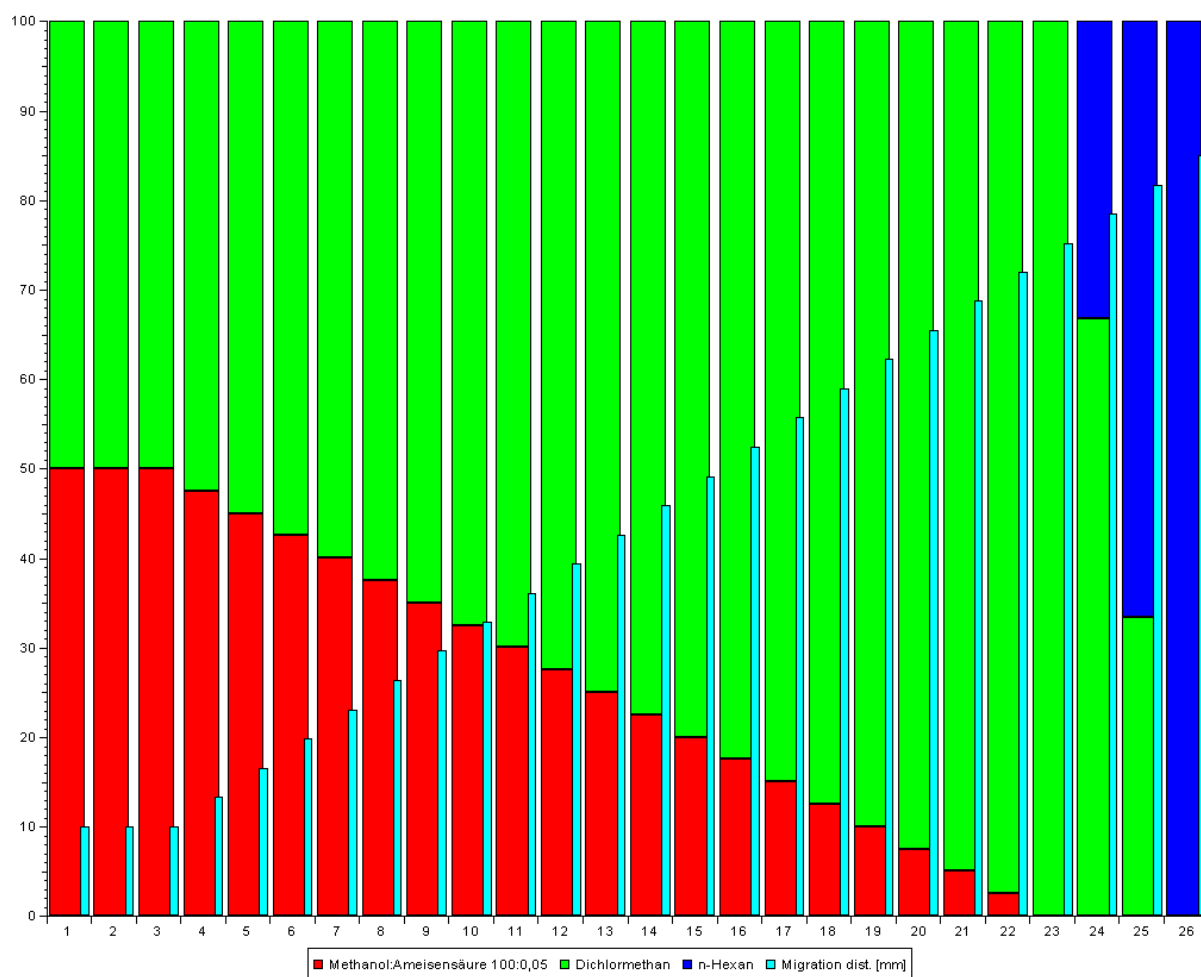


Abb. 5-1: Schematische Darstellung des Gradienten „Kesslergrube G-1“

Tabelle 5-2: Verwendeter HPTLC/AMD-Gradient „Kesslergrube G-2“

MeOH: HCOOH 100 : 0.05	CH₂Cl₂	n-Hexan	Migration Distanz	Trocknungszeit
30.0 Vol %	70.0 Vol %	0.0 Vol %	10.0 mm	4.0 min
30.0 Vol %	70.0 Vol %	0.0 Vol %	10.0 mm	4.0 min
30.0 Vol %	70.0 Vol %	0.0 Vol %	10.0 mm	4.0 min
27.9 Vol %	72.1 Vol %	0.0 Vol %	14.7 mm	4.0 min
25.7 Vol %	74.3 Vol %	0.0 Vol %	19.4 mm	4.0 min
23.6 Vol %	76.4 Vol %	0.0 Vol %	24.1 mm	4.0 min
21.4 Vol %	78.6 Vol %	0.0 Vol %	28.8 mm	4.0 min
19.3 Vol %	80.7 Vol %	0.0 Vol %	33.4 mm	4.0 min
17.1 Vol %	82.9 Vol %	0.0 Vol %	38.1 mm	4.0 min
15.0 Vol %	85.0 Vol %	0.0 Vol %	42.8 mm	4.0 min
12.9 Vol %	87.1 Vol %	0.0 Vol %	47.5 mm	4.0 min
10.7 Vol %	89.3 Vol %	0.0 Vol %	52.2 mm	4.0 min
8.6 Vol %	91.4 Vol %	0.0 Vol %	56.9 mm	3.0 min
6.4 Vol %	93.6 Vol %	0.0 Vol %	61.6 mm	3.0 min
4.3 Vol %	95.7 Vol %	0.0 Vol %	66.3 mm	3.0 min
2.1 Vol %	97.9 Vol %	0.0 Vol %	70.9 mm	3.0 min
0.0 Vol %	100.0 Vol %	0.0 Vol %	75.6 mm	3.0 min
0.0 Vol %	50.0 Vol %	50.0 Vol %	80.3 mm	3.0 min
0.0 Vol %	0.0 Vol %	100.0 Vol %	85.0 mm	3.0 min

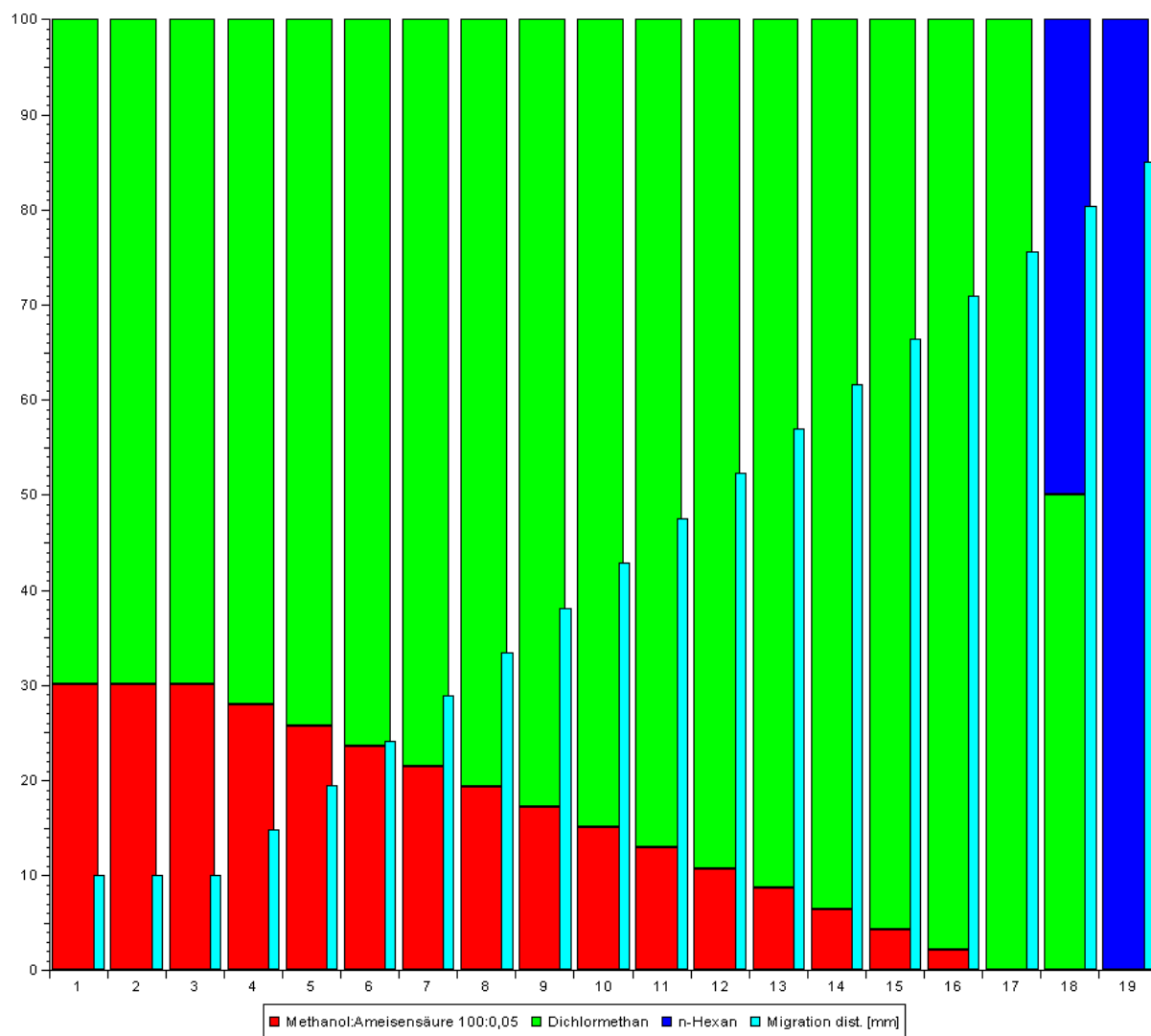


Abb. 5-2: Schematische Darstellung des verwendeten Gradienten „Kesslergrube G-2“

5.3 Anzucht der Bakterien

5.3.1 Herstellung des Nährmediums

(Nach DIN EN ISO 11348-1:2009-05)

- 60 g Natriumchlorid
- 12,2 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
- 4,2 g Dikaliumhydrogenphosphat
- 0,4 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat
- 1 g Diammoniumhydrogenphosphat
- 3,4 mL Glycerin 87%
- 10 g Pepton aus Casein
- 1 g Hefeextrakt

in 2 L-Messkolben geben und zur Marke mit dest-Wasser auffüllen.

- danach den pH-Wert mit NaOH und HCl-Lsg. auf $7,0 \pm 0,2$ einstellen.
- in 9 Erlenmeyerkolben je 220 mL der hergestellten Lösung überführen
- die Erlenmeyerkolben mit Alufolie gut verschließen.
- für 20 min bei 121 °C autoklavieren.
- die Nährmedien im Kühlschrank aufbewahren.

5.3.2 Zusammensetzung Reaktivierungslösung

(Nach DIN EN ISO 11348-1:2009-05)

- 20,0 g Natriumchlorid
- 2,035 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat
- 0,30 g Kaliumchlorid

in 1 L dest. Wasser auflösen und bei -18 °C bis -20 °C lagern.

5.3.3 Reaktivierung der Bakterien und Inkubation der Nährlösung

- **5 mL** aufgetaute, möglichst **kalte Reaktivierungslösung** zügig in die Mitte der (ebenfalls noch kalten) gefriergetrockneten Leuchtbakterien pipettieren.
- nun die reaktivierten Bakterien in das Nährmedium schütten

Die Bakterien sollten permanent gerührt werden, dabei Luftöffnungen im Deckel nicht vergessen. Bei ca. 20 °C sind die Bakterien nach etwa 20 - 24 h bereit für die Analyse.

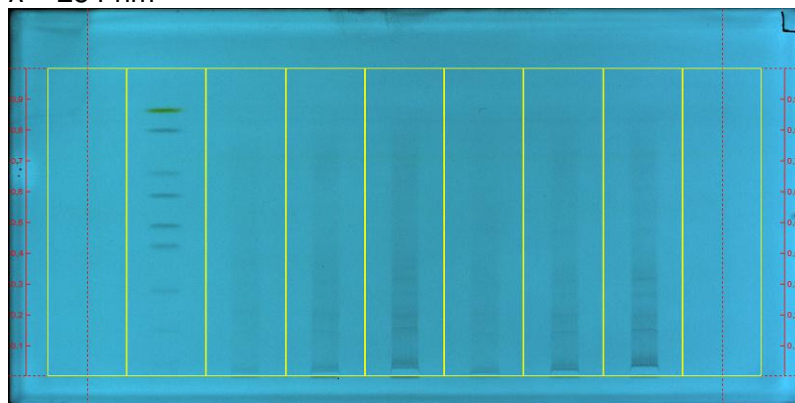
Verdünnungsreihe Kesslergrube

Probenentnahmestellen	Auftragevolumina nach SPE-Anreicherung [µL]			
	V 1	V 2	V 3	V 4
Blindwert 1	50	100	150	
Blindwert 2	50	100	150	
Blindwert 3	50	100	150	
Blindwert 4	50	100	150	
Br 49	25	50	100	150
Cl 31	50	100	150	200
Cl 32	25	50	100	150
Cl 33	50	100	150	300
Cl 34	50	100	150	200
Cl 35	50	100	150	200
Cl 36	50	100	150	300
Cl 37	50	100	150	200
KE 20 (1:10)	25	50	100	150
KE 21 (1:10)	25	50	100	150
KE 22	25	50	150	200
KE 24	25	50	100	150
KE 25	50	100	150	200
KE 26	50	100	150	200
KE 28 (1:100)	10	25	50	100
KE 29 (1:10)	10	25	50	100
KE 30 (1:10)	10	25	50	100
KE 31 (1:10)	25	50	100	150
KE 32 (1:10)	25	50	100	150
KE 33 (1:10)	25	50	100	150
KE 34 (1:10)	25	50	100	150
KE 36	25	50	100	150
KE 40 (1:10)	25	50	100	150
KE 41 (1:100)	50	100	150	200
KE 42 (1:10)	25	50	100	150
KE 43 (1:100)	50	100	150	200
P 2 (1:10)	50	100	150	200
P 3 (1:10)	50	100	150	200
P 4 (1:10)	50	100	150	200
P 5 (1:10)	10	25	50	100
P 8	50	100	150	200
P 11	50	100	150	200
P 12 (1:100)	10	25	50	100
P 16a (1:10)	10	25	50	75

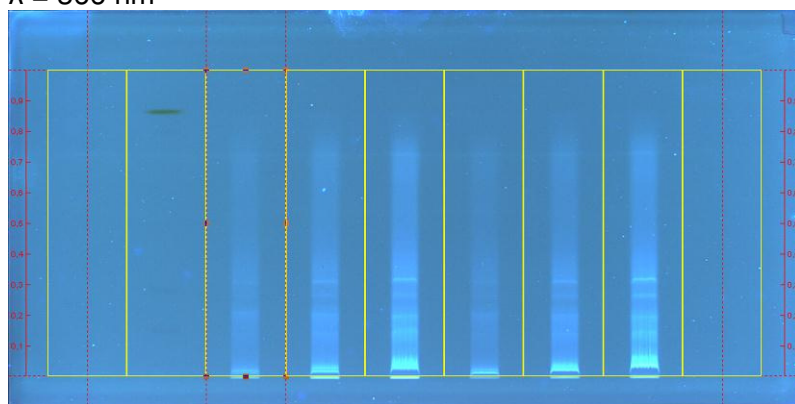
Tabelle 5-3: Verdünnungsreihen der einzelnen Proben

100825_KG_SPE pH2_Verd_G2_ENV+

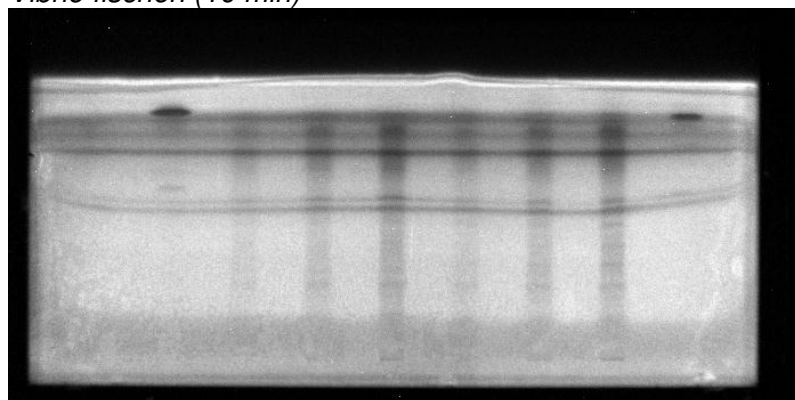
$\lambda = 254 \text{ nm}$



$\lambda = 366 \text{ nm}$



Vibrio fischeri (10 min)

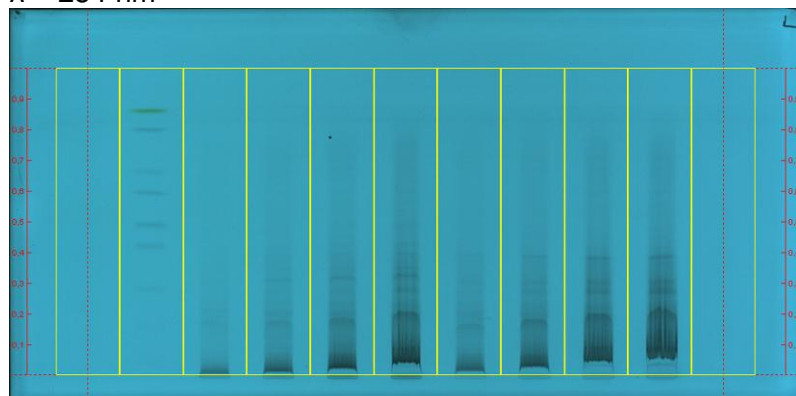


Beschreibung Auftragung

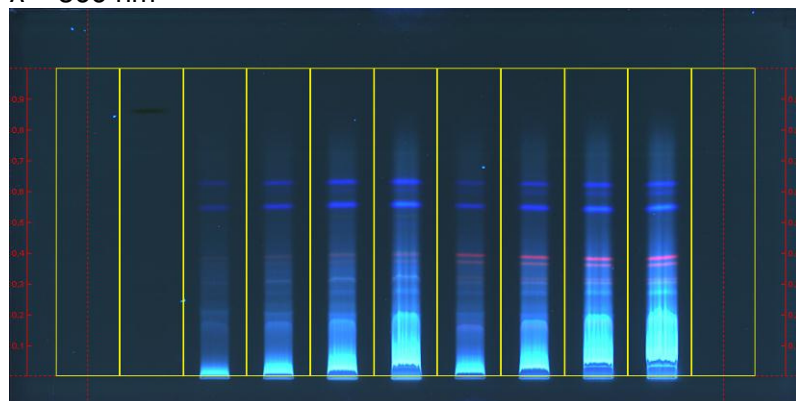
- | | |
|------------------------------------|--|
| 1.) 100 μL MeOH | 6.) 50 μL Blindprobe 2 |
| 2.) 30 μL Kontroll-Mix | 7.) 100 μL Blindprobe 2 |
| 3.) 50 μL Blindprobe 1 | 8.) 150 μL Blindprobe 2 |
| 4.) 100 μL Blindprobe 1 | 9.) 10 μL Triclosan (10 ng/ μL) |
| 5.) 150 μL Blindprobe 1 | |

100826_KG_SPE pH2_Verd_G2_ENV+_b

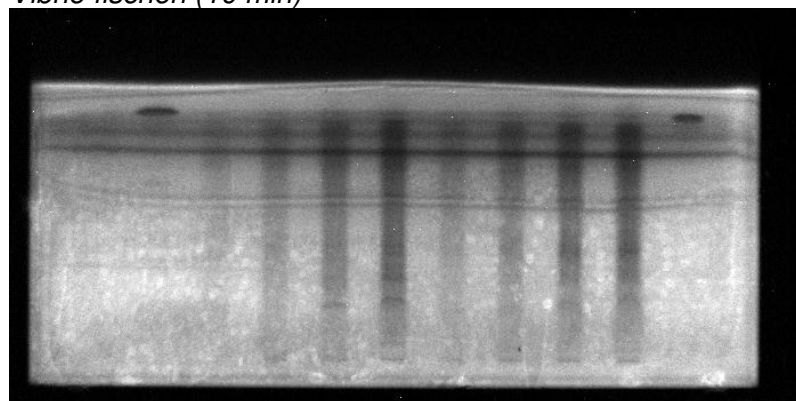
$\lambda = 254 \text{ nm}$



$\lambda = 366 \text{ nm}$



Vibrio fischeri (10 min)

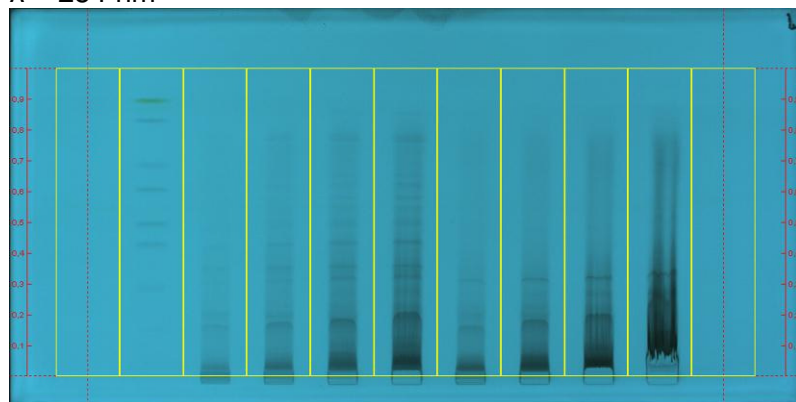


Beschreibung Auftragung

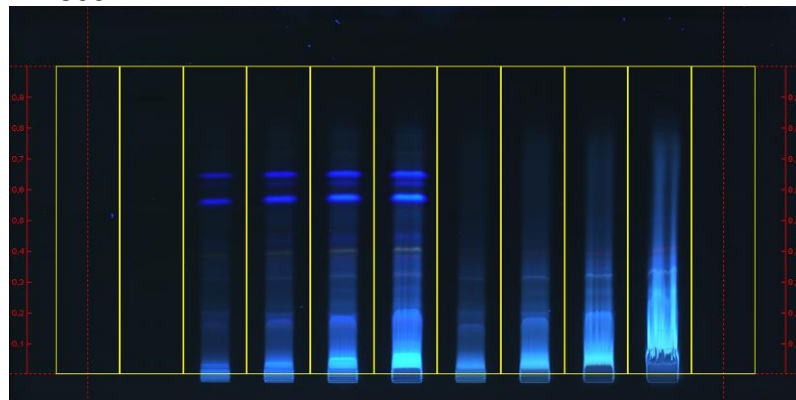
- | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| 1.) 100 μL MeOH | 7.) 50 μL CI 31 |
| 2.) 30 μL Kontroll-Mix | 8.) 100 μL CI 31 |
| 3.) 25 μL Br 49 | 9.) 150 μL CI 31 |
| 4.) 50 μL Br 49 | 10.) 200 μL CI 31 |
| 5.) 100 μL Br 49 | 11.) 10 μL Triclosan |
| 6.) 150 μL Br 49 | |

100827_KG_SPE pH2_Verd_G2_ENV+

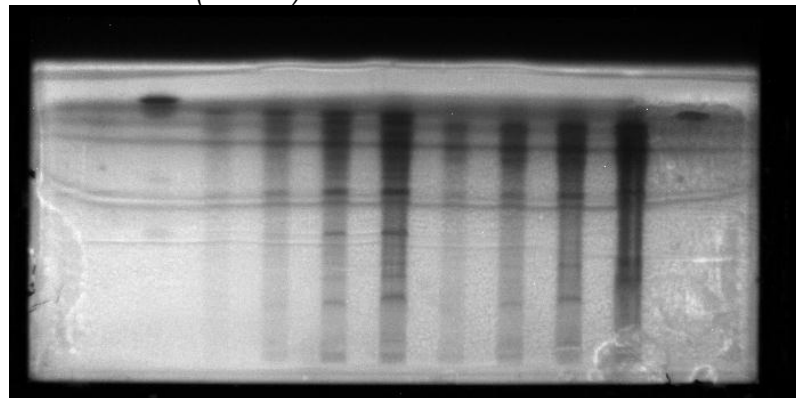
$\lambda = 254 \text{ nm}$



$\lambda = 366 \text{ nm}$



Vibrio fischeri (10 min)

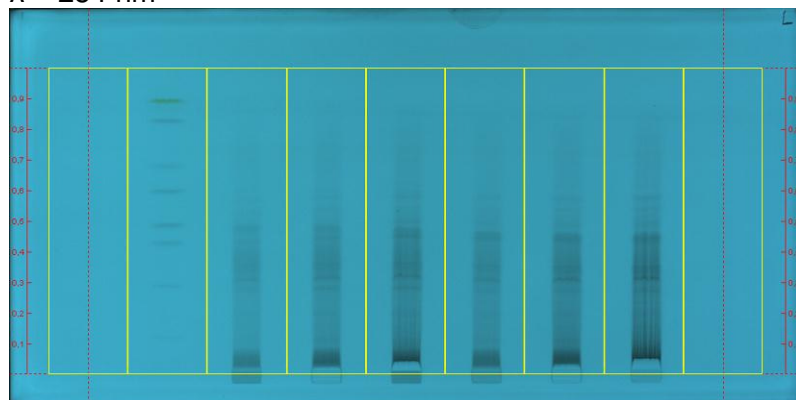


Beschreibung Auftragung

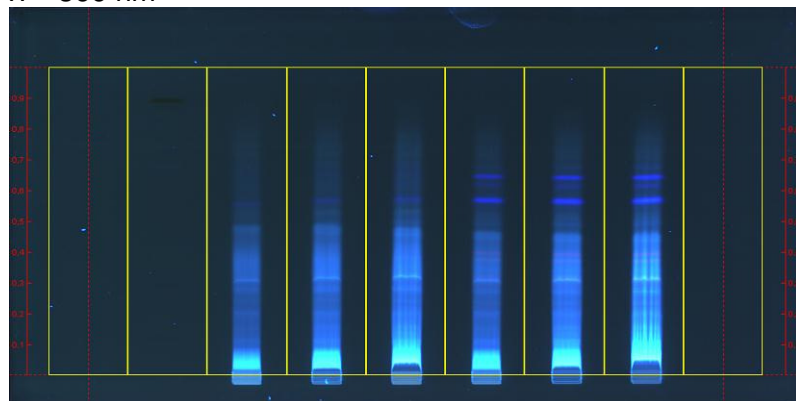
- | | |
|----------------------------------|--|
| 1) 100 μL MeOH | 7) 50 μL CI 33 |
| 2) 30 μL Kontroll-Mix | 8) 100 μL CI 33 |
| 3) 25 μL CI 32 | 9) 150 μL CI 33 |
| 4) 50 μL CI 32 | 10) 300 μL CI 33 |
| 5) 100 μL CI 32 | 11) 10 μL Triclosan (10 ng/ μL) |
| 6) 150 μL CI 32 | |

100830_KG_SPE pH2_Verd_G2_ENV+

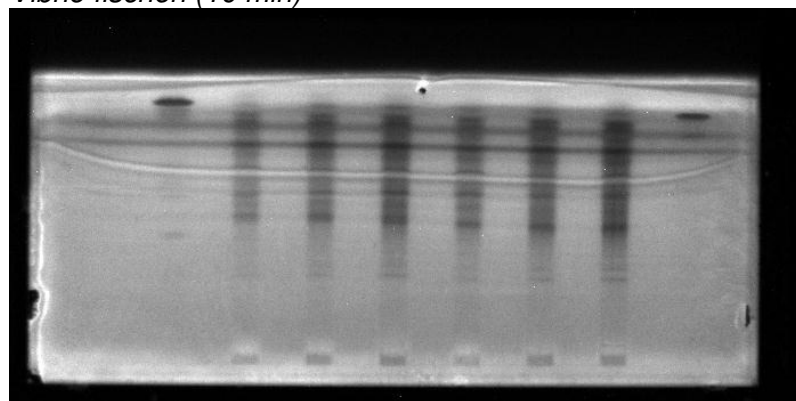
$\lambda = 254 \text{ nm}$



$\lambda = 366 \text{ nm}$



Vibrio fischeri (10 min)

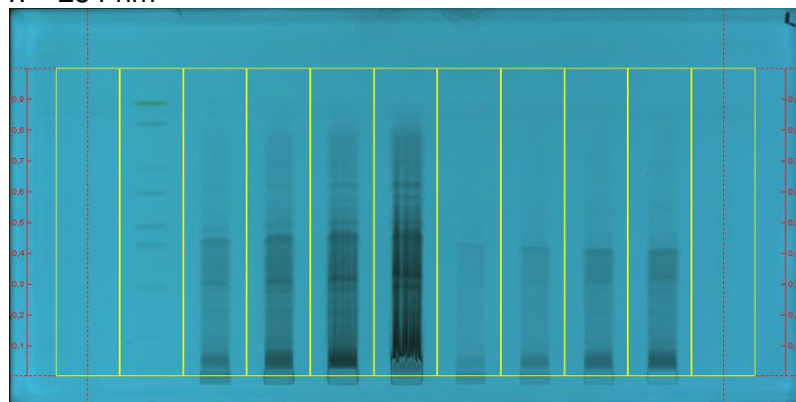


Beschreibung Auftragung

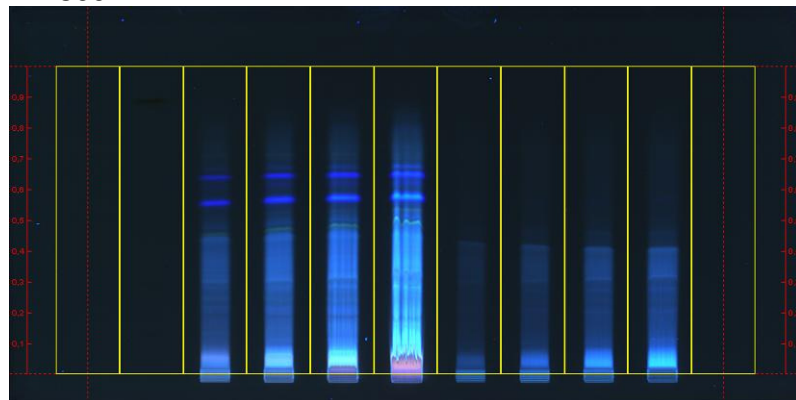
- | | |
|----------------------------------|---|
| 1) 100 μL MeOH | 6) 100 μL CI 35 |
| 2) 30 μL Kontroll-Mix | 7) 150 μL CI 35 |
| 3) 100 μL CI 34 | 8) 200 μL CI 35 |
| 4) 150 μL CI 34 | 9) 10 μL Triclosan (10 ng/ μL) |
| 5) 200 μL CI 34 | |

100831_KG_SPE pH2_Verd_G2_ENV+

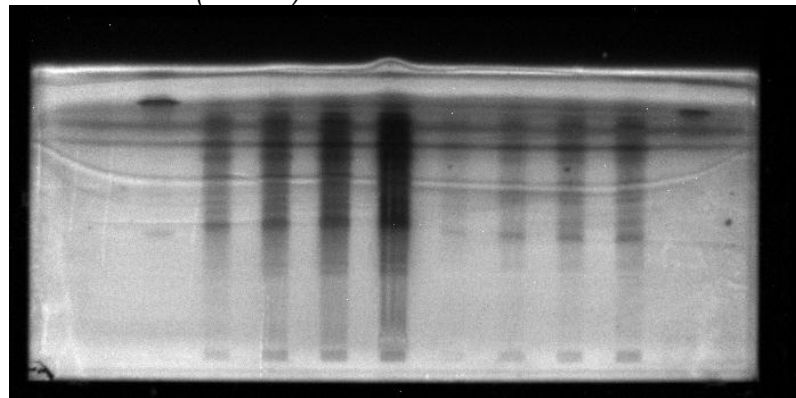
$\lambda = 254 \text{ nm}$



$\lambda = 366 \text{ nm}$



Vibrio fischeri (10 min)

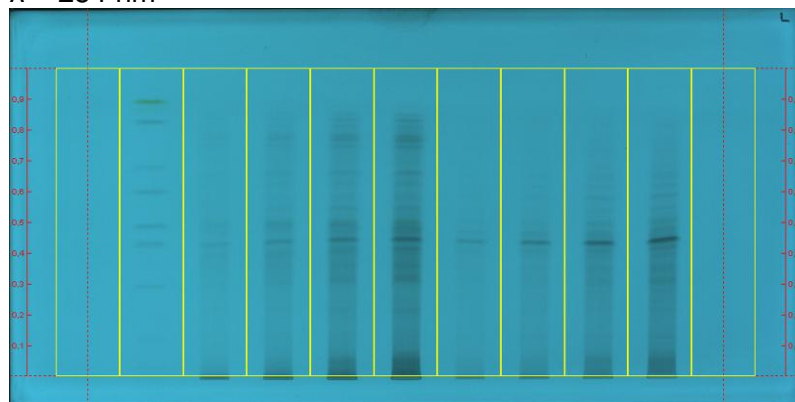


Beschreibung Auftragung

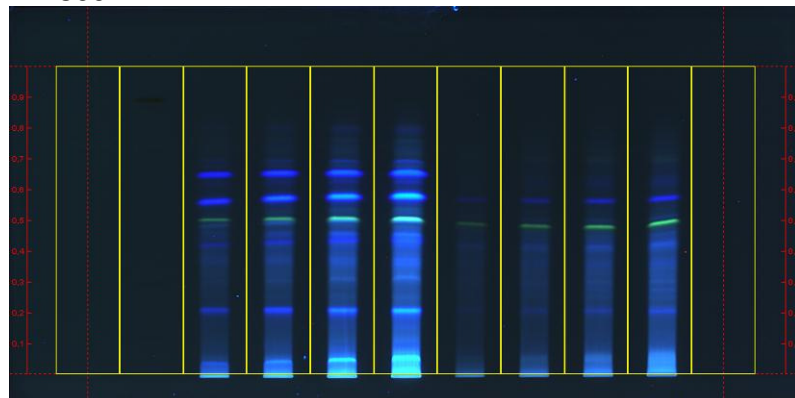
- | | |
|----------------------------------|--|
| 1) 100 μL MeOH | 7) 50 μL CI 37 |
| 2) 30 μL Kontroll-Mix | 8) 100 μL CI 37 |
| 3) 50 μL CI 36 | 9) 150 μL CI 37 |
| 4) 100 μL CI 36 | 10) 200 μL CI 37 |
| 5) 150 μL CI 36 | 11) 10 μL Triclosan (10 ng/ μL) |
| 6) 300 μL CI 36 | |

100901_KG_SPE pH2_Verd_G2_ENV+

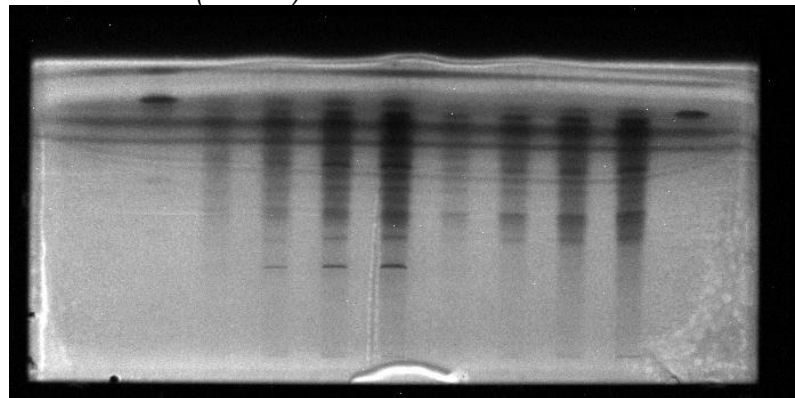
$\lambda = 254 \text{ nm}$



$\lambda = 366 \text{ nm}$



Vibrio fischeri (10 min)

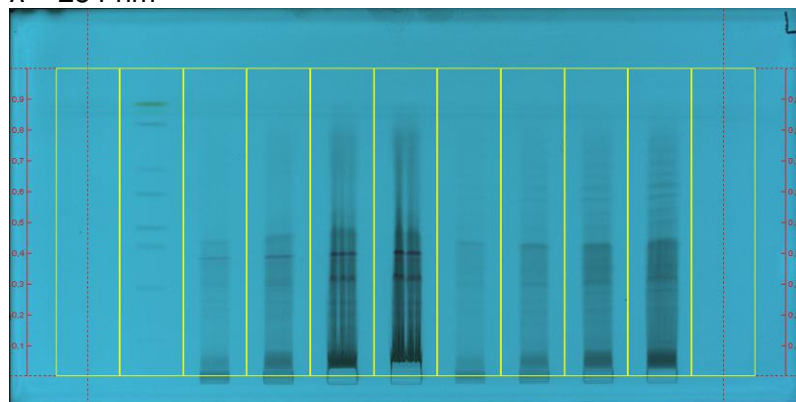


Beschreibung Auftragung

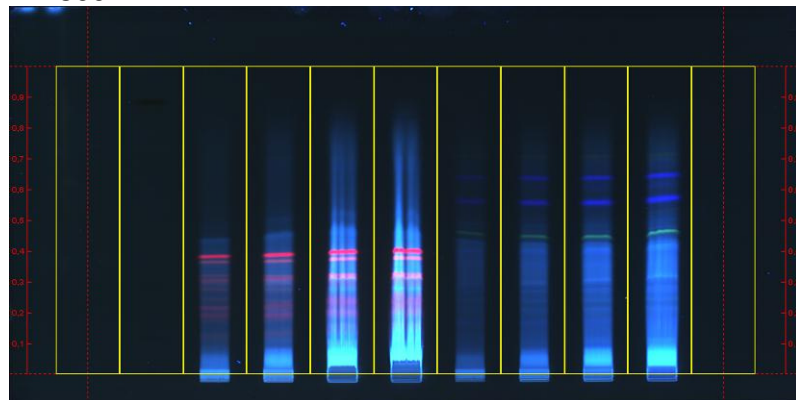
- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1) 100 μL MeOH | 7) 25 μL KE 21 (1:10) |
| 2) 30 μL Kontroll-Mix | 8) 50 μL KE 21 (1:10) |
| 3) 25 μL KE 20 (1:10) | 9) 100 μL KE 21 (1:10) |
| 4) 50 μL KE 20 (1:10) | 10) 150 μL KE 21 (1:10) |
| 5) 100 μL KE 20 (1:10) | 11) 10 μL Triclosan (10 ng/ μL) |
| 6) 150 μL KE 20 (1:10) | |

100902_KG_SPE pH2_Verd_G2_ENV+

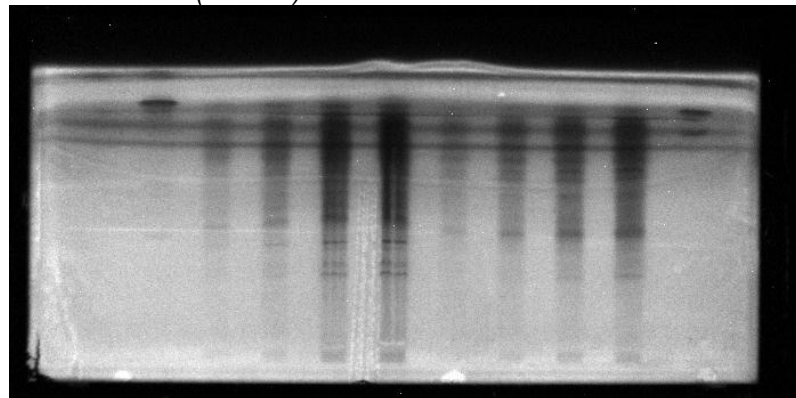
$\lambda = 254 \text{ nm}$



$\lambda = 366 \text{ nm}$



Vibrio fischeri (10 min)

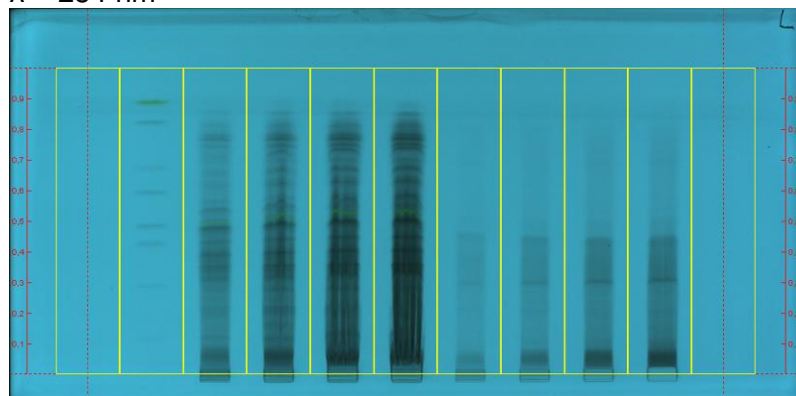


Beschreibung Auftragung

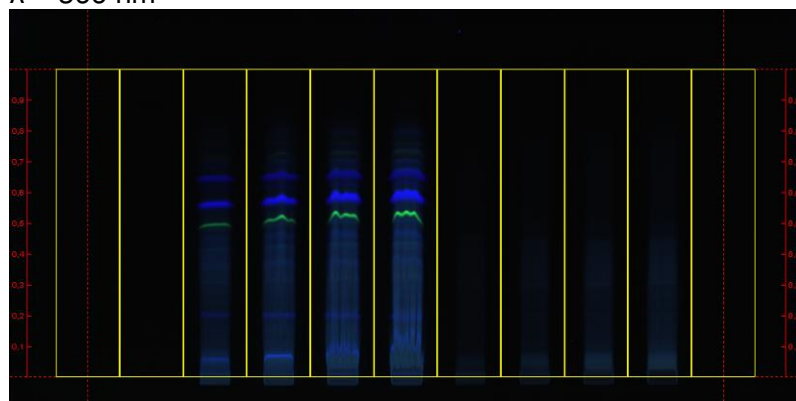
- | | |
|----------------------------------|--|
| 1) 100 μL MeOH | 7) 25 μL KE 24 |
| 2) 30 μL Kontroll-Mix | 8) 50 μL KE 24 |
| 3) 25 μL KE 22 | 9) 100 μL KE 24 |
| 4) 50 μL KE 22 | 10) 150 μL KE 24 |
| 5) 150 μL KE 22 | 11) 10 μL Triclosan (10 ng/ μL) |
| 6) 200 μL KE 22 | |

100903_KG_SPE pH2_Verd_G2_ENV+

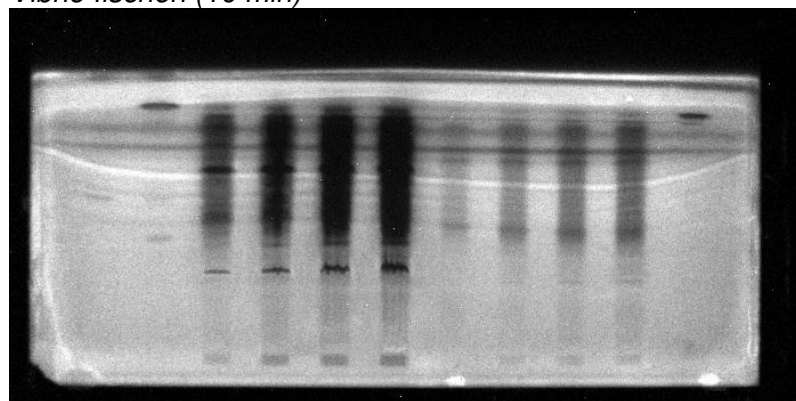
$\lambda = 254 \text{ nm}$



$\lambda = 366 \text{ nm}$



Vibrio fischeri (10 min)

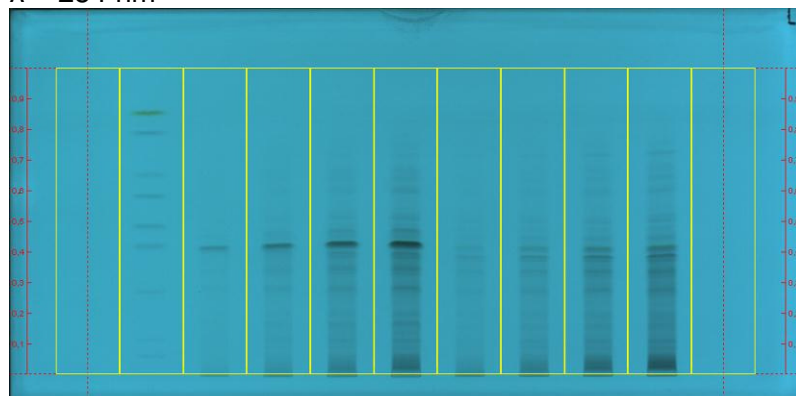


Beschreibung Auftragung

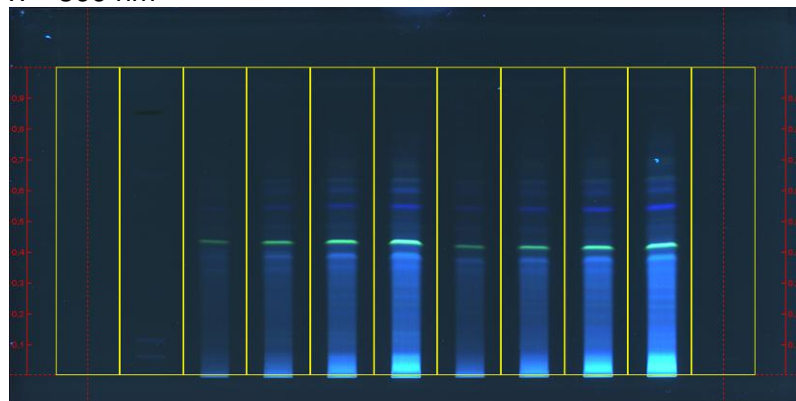
- | | |
|----------------------------------|--|
| 12) 100 μL MeOH | 6) 50 μL KE 26 |
| 1) 30 μL Kontroll-Mix | 7) 100 μL KE 26 |
| 2) 50 μL KE 25 | 8) 150 μL KE 26 |
| 3) 100 μL KE 25 | 9) 200 μL KE 26 |
| 4) 150 μL KE 25 | 10) 10 μL Triclosan (10 ng/ μL) |
| 5) 200 μL KE 25 | |

100906_KG_SPE pH2_Verd_G2_ENV+

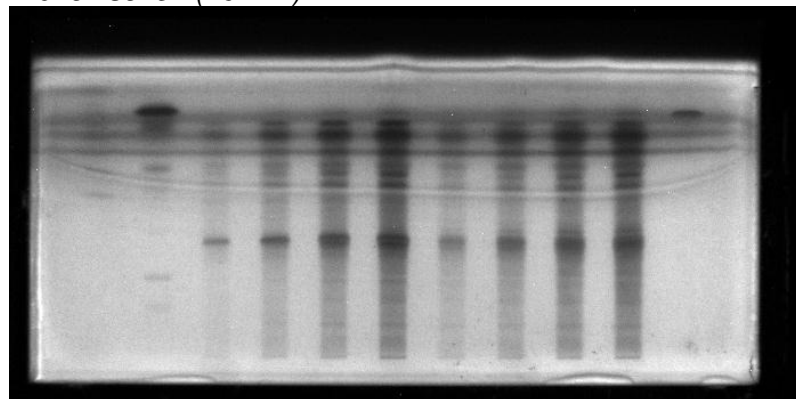
$\lambda = 254 \text{ nm}$



$\lambda = 366 \text{ nm}$



Vibrio fischeri (10 min)

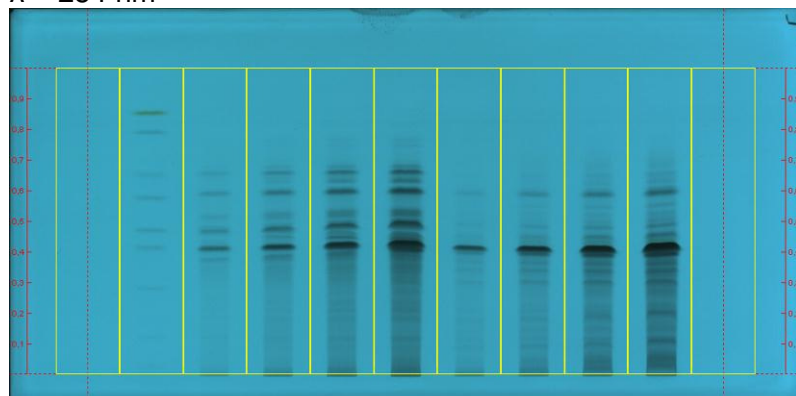


Beschreibung Auftragung

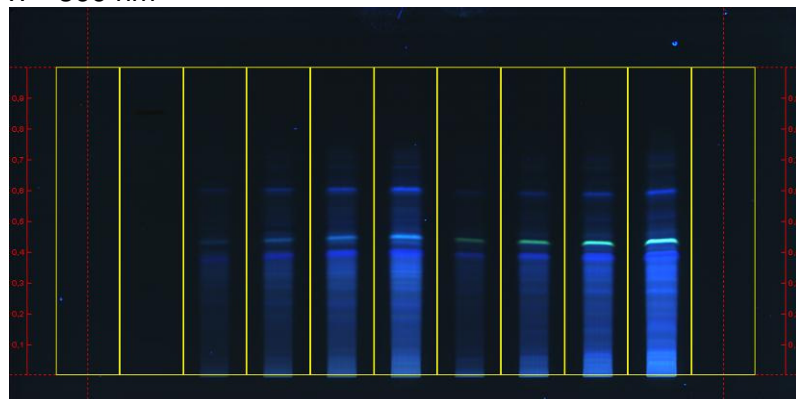
- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1) 100 μL MeOH | 7) 25 μL KE 31 (1:10) |
| 2) 30 μL Kontroll-Mix | 8) 50 μL KE 31 (1:10) |
| 3) 10 μL KE 30 (1:10) | 9) 100 μL KE 31 (1:10) |
| 4) 25 μL KE 30 (1:10) | 10) 150 μL KE 31 (1:10) |
| 5) 50 μL KE 30 (1:10) | 11) 10 μL Triclosan (10 ng/ μL) |
| 6) 100 μL KE 30 (1:10) | |

100906_KG_SPE pH2_Verd_G2_ENV+_b

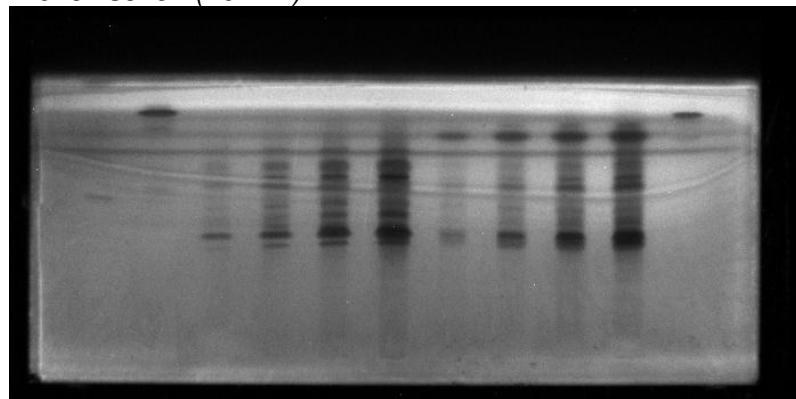
$\lambda = 254 \text{ nm}$



$\lambda = 366 \text{ nm}$



Vibrio fischeri (10 min)

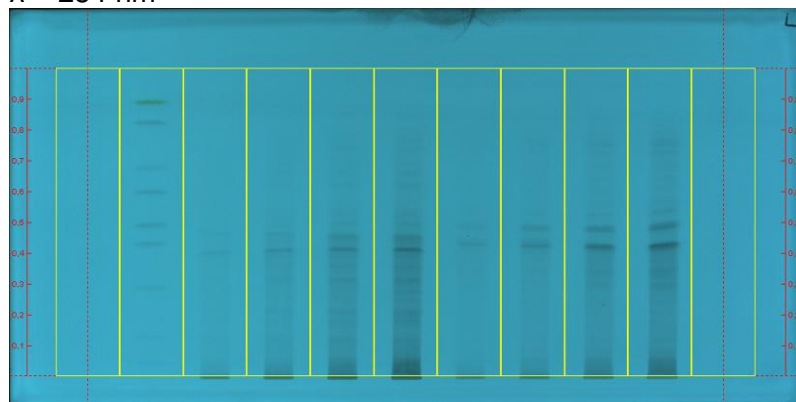


Beschreibung Auftragung

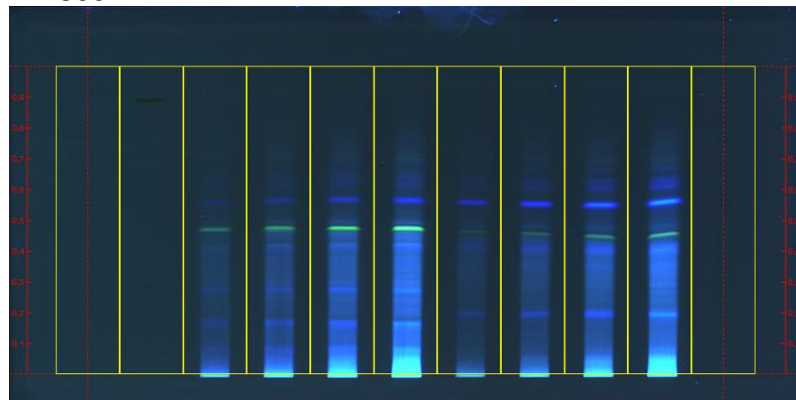
- | | |
|------------------------------------|--|
| 1) 100 μL MeOH | 7) 10 μL KE 29 (1:10) |
| 2) 30 μL Kontroll-Mix | 8) 25 μL KE 29 (1:10) |
| 3) 10 μL KE 28 (1:100) | 9) 50 μL KE 29 (1:10) |
| 4) 25 μL KE 28 (1:100) | 10) 100 μL KE 29 (1:10) |
| 5) 50 μL KE 28 (1:100) | 11) 10 μL Triclosan (10 ng/ μL) |
| 6) 100 μL KE 28 (1:100) | |

100907_KG_SPE pH2_Verd_G2_ENV+

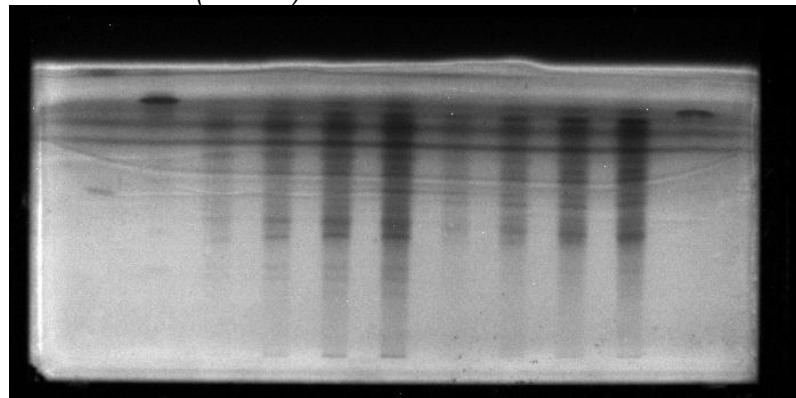
$\lambda = 254 \text{ nm}$



$\lambda = 366 \text{ nm}$



Vibrio fischeri (10 min)

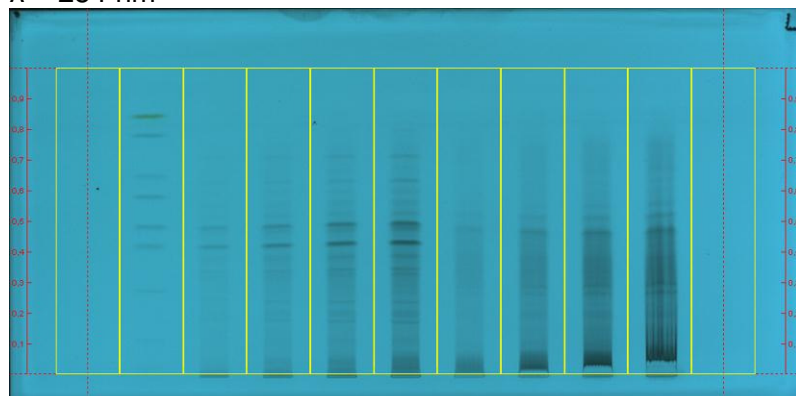


Beschreibung Auftragung

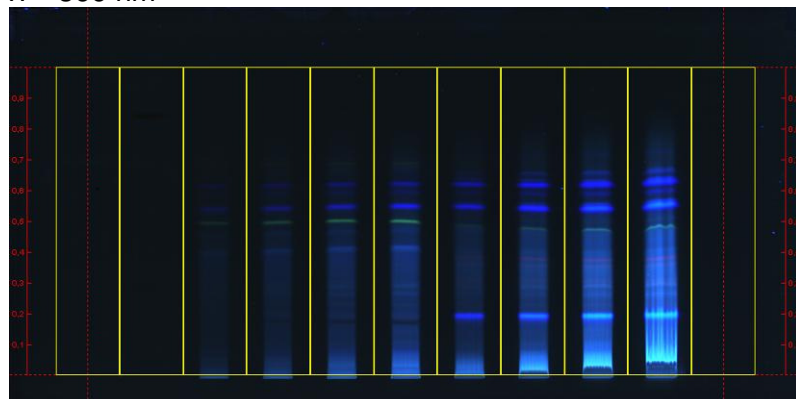
- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1) 100 μL MeOH | 7) 25 μL KE 33 (1:10) |
| 2) 30 μL Kontroll-Mix | 8) 50 μL KE 33 (1:10) |
| 3) 25 μL KE 32 (1:10) | 9) 100 μL KE 33 (1:10) |
| 4) 50 μL KE 32 (1:10) | 10) 150 μL KE 33 (1:10) |
| 5) 100 μL KE 32 (1:10) | 11) 10 μL Triclosan (10 ng/ μL) |
| 6) 150 μL KE 32 (1:10) | |

100907_KG_SPE pH2_Verd_G2_ENV+_b

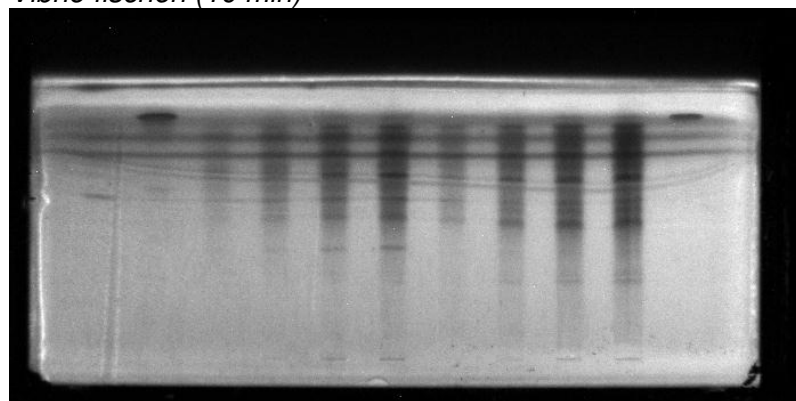
$\lambda = 254 \text{ nm}$



$\lambda = 366 \text{ nm}$



Vibrio fischeri (10 min)

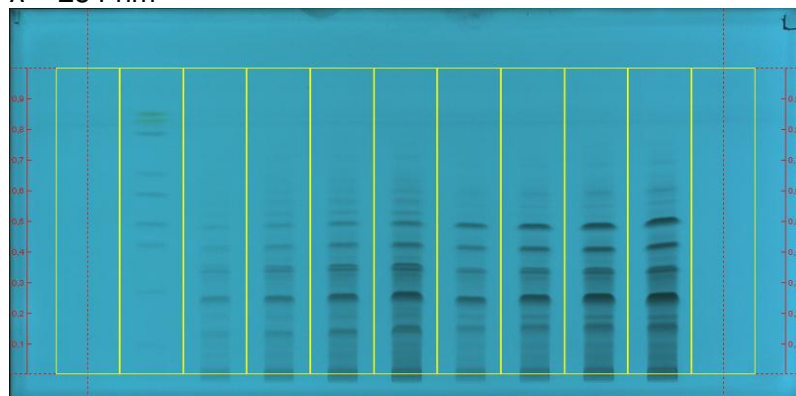


Beschreibung Auftragung

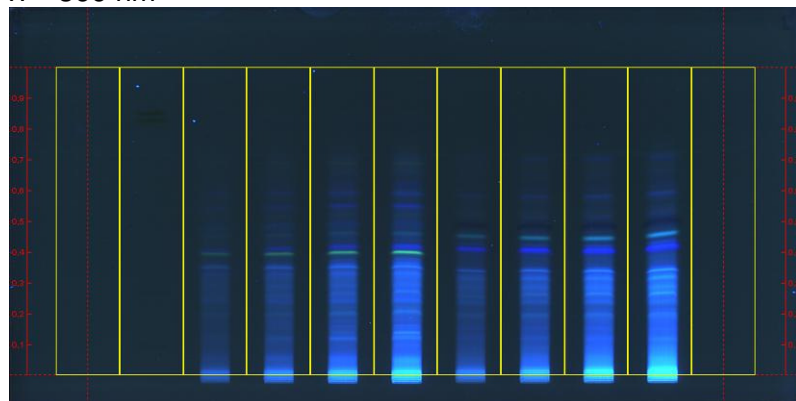
- | | |
|-----------------------------------|--|
| 12) 100 μL MeOH | 6) 25 μL KE 36 |
| 1) 30 μL Kontroll-Mix | 7) 50 μL KE 36 |
| 2) 25 μL KE 34 (1:10) | 8) 100 μL KE 36 |
| 3) 50 μL KE 34 (1:10) | 9) 150 μL KE 36 |
| 4) 100 μL KE 34 (1:10) | 10) 10 μL Triclosan (10 ng/ μL) |
| 5) 150 μL KE 34 (1:10) | |

100908_KG_SPE pH2_Verd_G2_ENV+

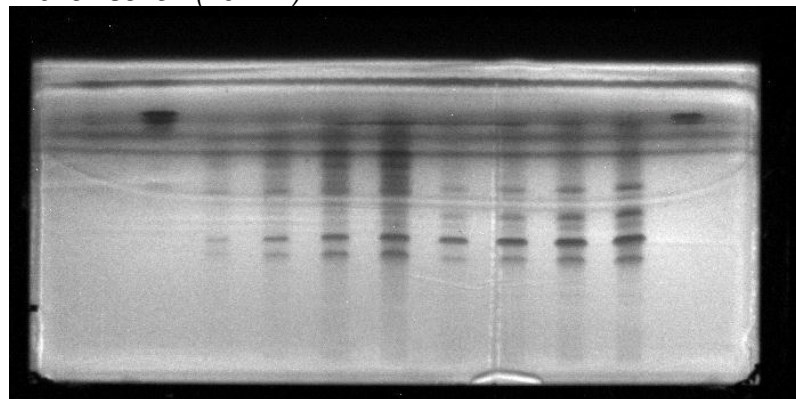
$\lambda = 254 \text{ nm}$



$\lambda = 366 \text{ nm}$



Vibrio fischeri (10 min)



Beschreibung Auftragung

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1) 100 μL MeOH | 7) 50 μL KE 41 (1:100) |
| 2) 30 μL Kontroll-Mix | 8) 100 μL KE 41 (1:100) |
| 3) 25 μL KE 40 (1:10) | 9) 150 μL KE 41 (1:100) |
| 4) 50 μL KE 40 (1:10) | 10) 200 μL KE 41 (1:100) |
| 5) 100 μL KE 40 (1:10) | 11) 10 μL Triclosan (10 ng/ μL) |
| 6) 150 μL KE 40 (1:10) | |

100909_KG_SPE pH2_Verd_G2_ENV+

$\lambda = 254 \text{ nm}$

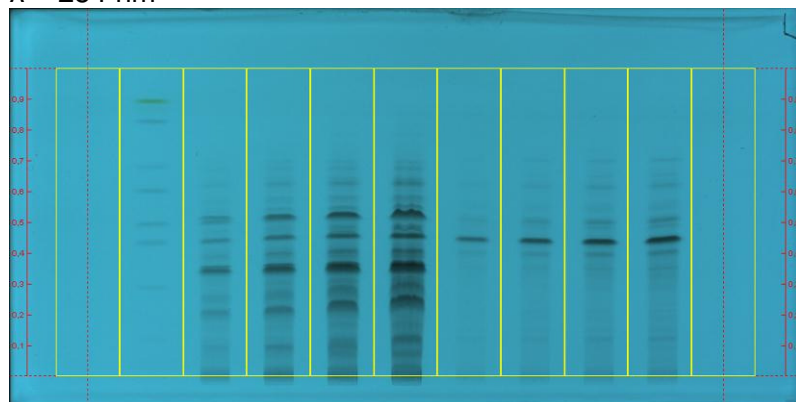
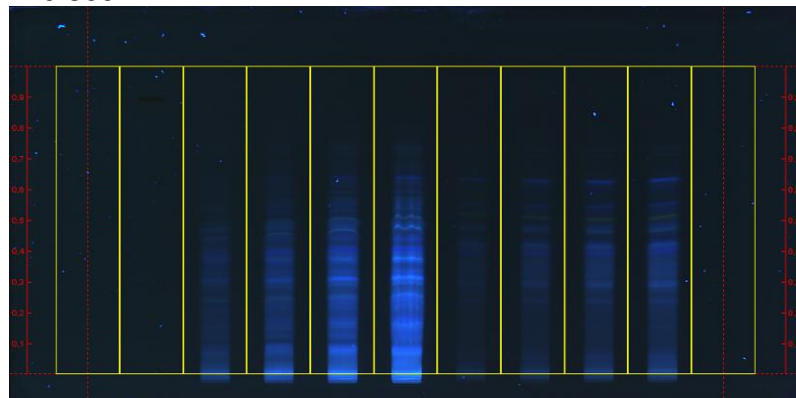
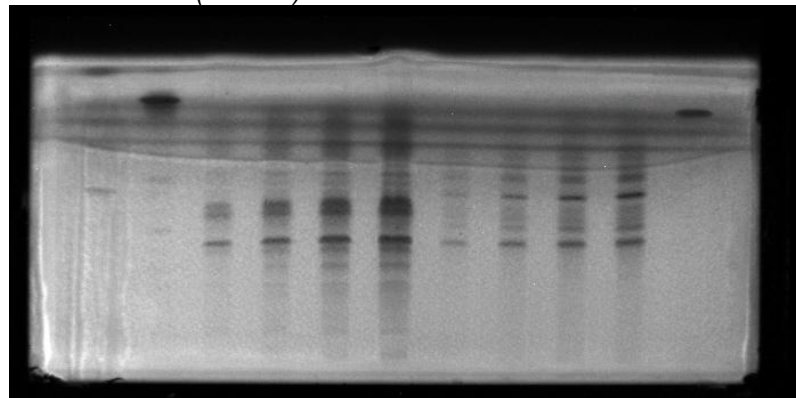


Bild 366 nm



Vibrio fischeri (10 min)



Beschreibung Auftragung

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 12) 100 μL MeOH | 6) 50 μL KE 43 (1:100) |
| 1) 30 μL Kontroll-Mix | 7) 100 μL KE 43 (1:100) |
| 2) 25 μL KE 42 (1:10) | 8) 150 μL KE 43 (1:100) |
| 3) 50 μL KE 42 (1:10) | 9) 200 μL KE 43 (1:100) |
| 4) 100 μL KE 42 (1:10) | 10) 10 μL Triclosan (10 ng/ μL) |
| 5) 150 μL KE 42 (1:10) | |

100909_KG_SPE pH2_Verd_G2_ENV+_b

$\lambda = 254 \text{ nm}$

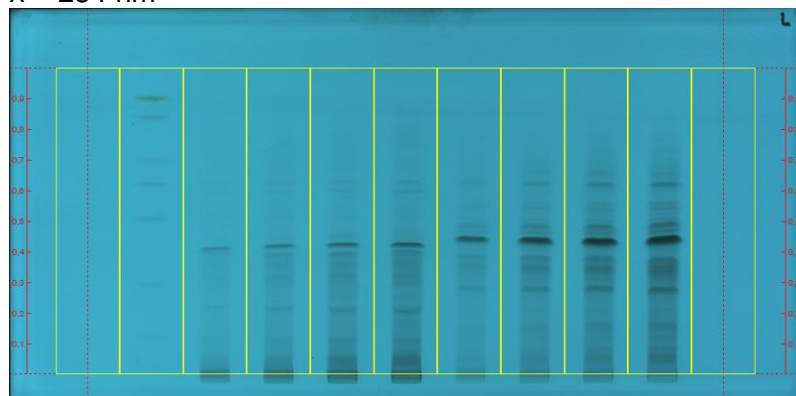
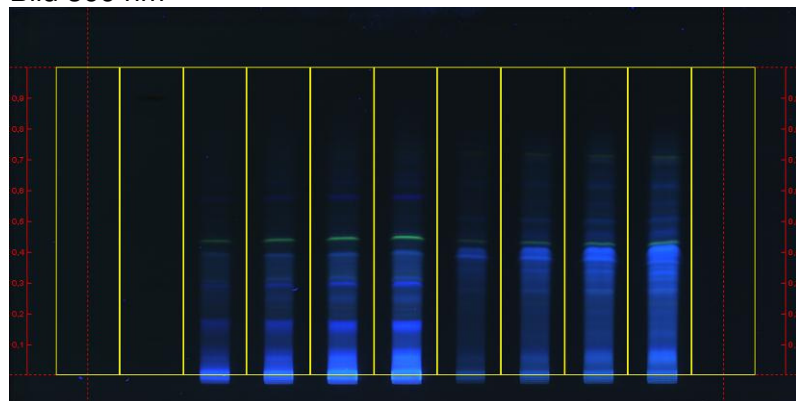
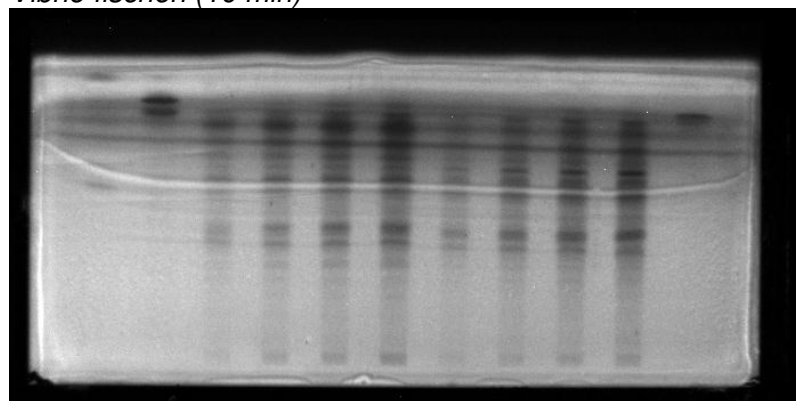


Bild 366 nm



Vibrio fischeri (10 min)

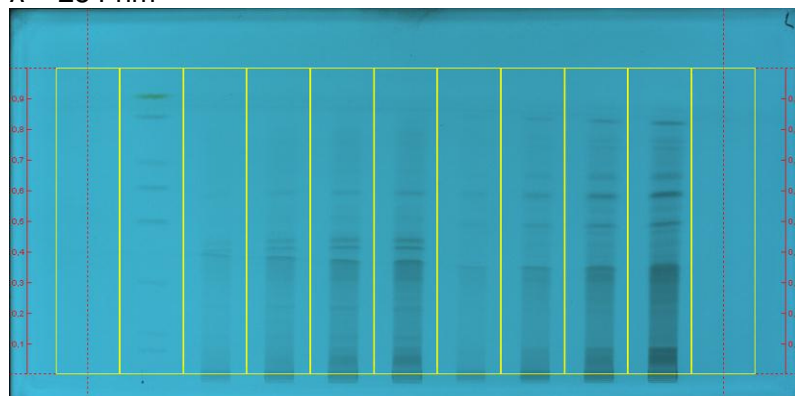


Beschreibung Auftragung

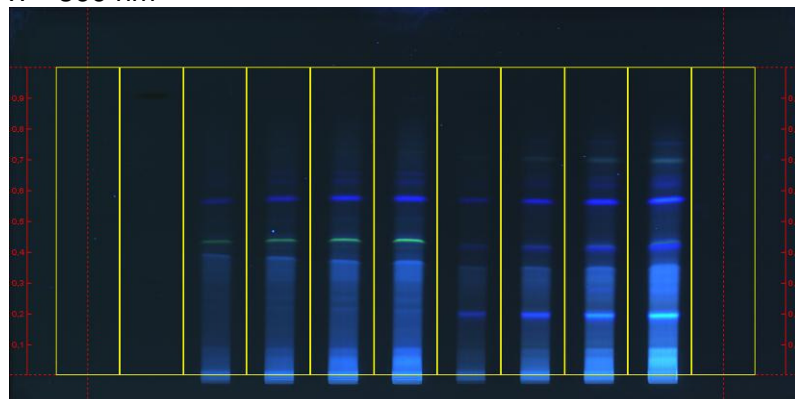
- | | |
|----------------------------------|--|
| 1) 100 μL MeOH | 7) 50 μL P3 (1:10) |
| 2) 30 μL Kontroll-Mix | 8) 100 μL P3 (1:10) |
| 3) 50 μL P2 (1:10) | 9) 150 μL P3 (1:10) |
| 4) 100 μL P2 (1:10) | 10) 200 μL P3 (1:10) |
| 5) 150 μL P2 (1:10) | 11) 10 μL Triclosan (10 ng/ μL) |
| 6) 200 μL P2 (1:10) | |

100915_KG_SPE pH2_Verd_G2_ENV+

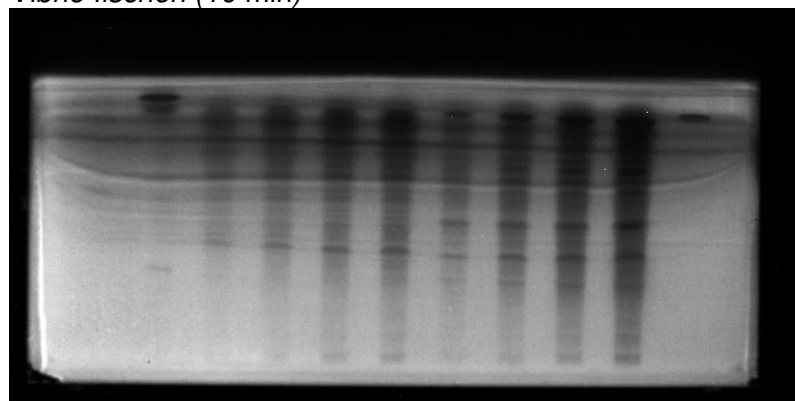
$\lambda = 254 \text{ nm}$



$\lambda = 366 \text{ nm}$



Vibrio fischeri (10 min)

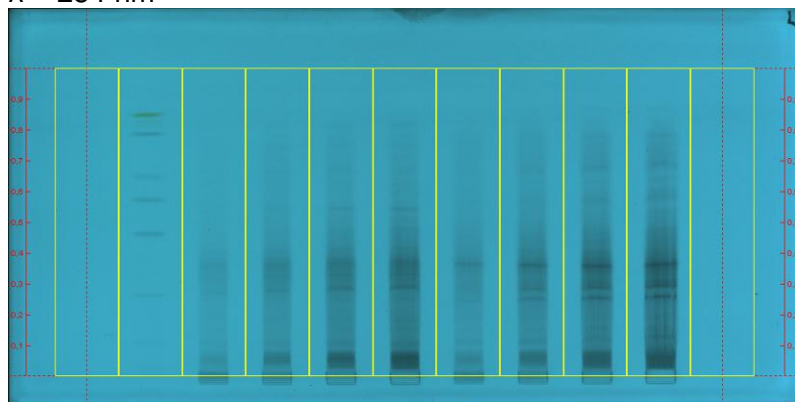


Beschreibung Auftragung

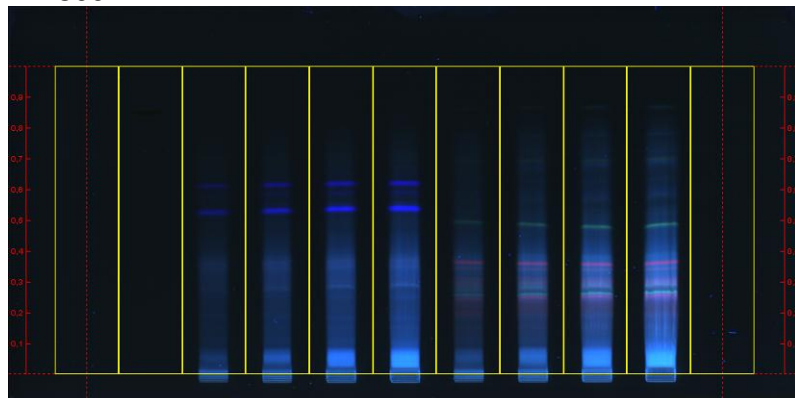
- | | |
|----------------------------------|--|
| 12) 100 μL MeOH | 6) 10 μL P5 (1:10) |
| 1) 30 μL Kontroll-Mix | 7) 25 μL P5 (1:10) |
| 2) 50 μL P4 (1:10) | 8) 50 μL P5 (1:10) |
| 3) 100 μL P4 (1:10) | 9) 100 μL P5 (1:10) |
| 4) 150 μL P4 (1:10) | 10) 10 μL Triclosan (10 ng/ μL) |
| 5) 200 μL P4 (1:10) | |

100915_KG_SPE pH2_Verd_G2_ENV+_b

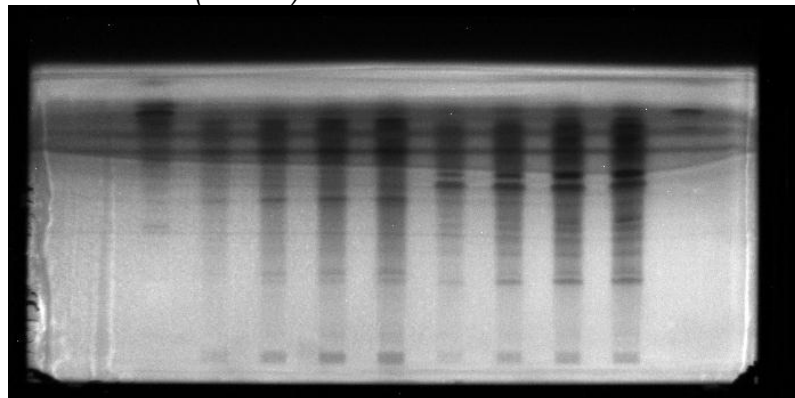
$\lambda = 254 \text{ nm}$



$\lambda = 366 \text{ nm}$



Vibrio fischeri (10 min)

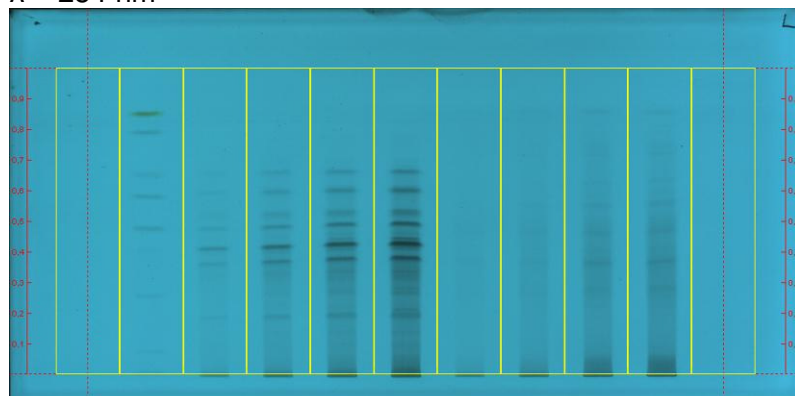


Beschreibung Auftragung

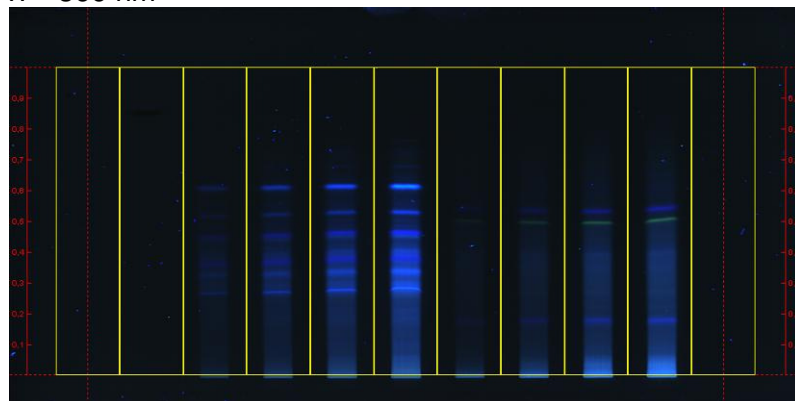
- | | |
|----------------------------------|--|
| 1) 100 μL MeOH | 7) 50 μL P11 |
| 2) 30 μL Kontroll-Mix | 8) 100 μL P11 |
| 3) 50 μL P8 | 9) 150 μL P11 |
| 4) 100 μL P8 | 10) 200 μL P11 |
| 5) 150 μL P8 | 11) 10 μL Triclosan (10 ng/ μL) |
| 6) 200 μL P8 | |

100916_KG_SPE pH2_Verd_G2_ENV+

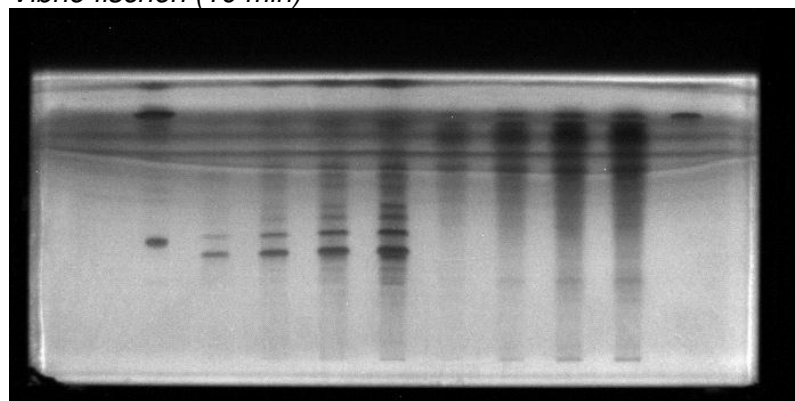
$\lambda = 254 \text{ nm}$



$\lambda = 366 \text{ nm}$



Vibrio fischeri (10 min)

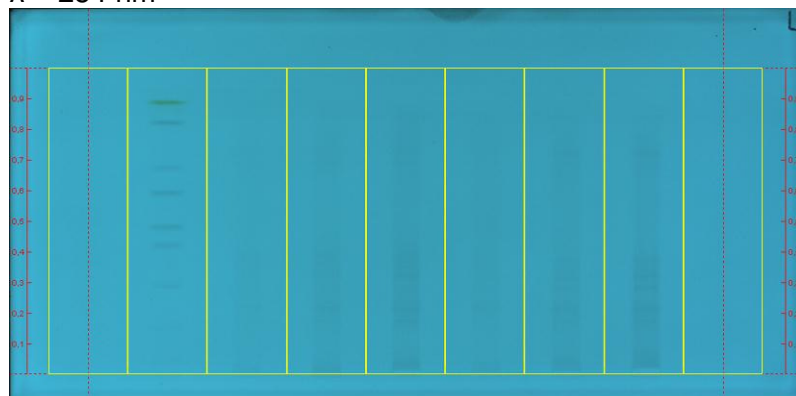


Beschreibung Auftragung

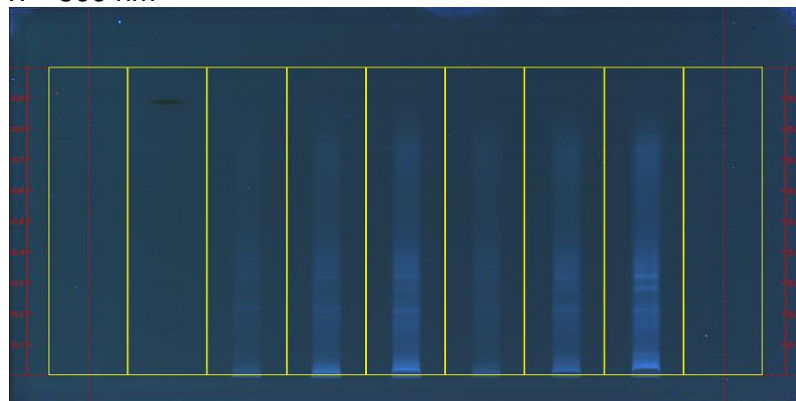
- | | |
|----------------------------------|--|
| 1) 100 μL MeOH | 7) 10 μL P16a (1:10) |
| 2) 30 μL Kontroll-Mix | 8) 25 μL P16a (1:10) |
| 3) 10 μL P12 (1:100) | 9) 50 μL P16a (1:10) |
| 4) 25 μL P12 (1:100) | 10) 75 μL P16a (1:10) |
| 5) 50 μL P12 (1:100) | 11) 10 μL Triclosan (10 ng/ μL) |
| 6) 100 μL P12 (1:100) | |

101207_KG_SPE pH2_Verd_G2_ENV+

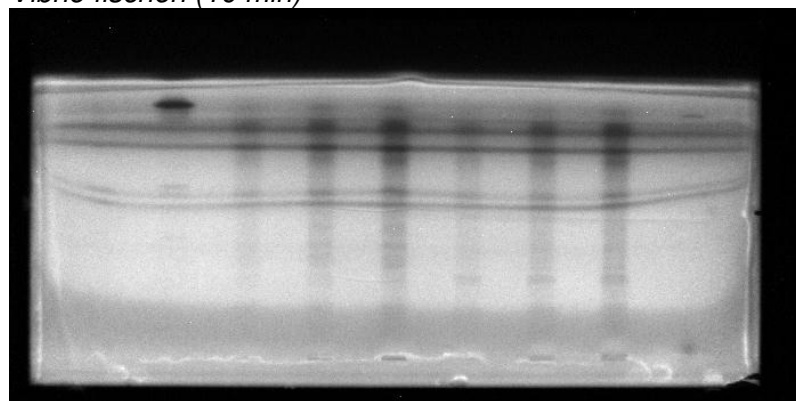
$\lambda = 254 \text{ nm}$



$\lambda = 366 \text{ nm}$



Vibrio fischeri (10 min)



Beschreibung Auftragung

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 1) 100 μL MeOH | 7) 100 μL Blindprobe 4 |
| 2) 30 μL Kontroll-Mix | 8) 150 μL Blindprobe 4 |
| 3) 50 μL Blindprobe 3 | 9) 10 μL Triclosan (10 ng/ μL) |
| 4) 100 μL Blindprobe 3 | |
| 5) 150 μL Blindprobe 3 | |
| 6) 50 μL Blindprobe 4 | |

6 Literatur

- [1] DIN EN ISO 11348-3:2009-05 (2009).
- [2] G. Eberz, H. Rast, K. Burger, W. Kreiss, C. Weisemann, *Chromatographia* 43 (1996) 5.
- [3] C. Weins, H. Jork, *Journal of Chromatography A* 750 (1996) 403.
- [4] T. Reemtsma, A. Putschew, M. Jekel, *Waste Management* 19 (1999) 181.
- [5] W.H. Weber, W. Seitz, A. Aichinger, R. Albert, *CBS - Camag Bibliography Service* 94 (2005) 2.
- [6] S.M. Verbitski, G.T. Gourdin, L.M. Ikenouye, J.D. McChesney, *American Biotechnology Laboratory* 24 (2006) 40
- [7] W. Schulz, W. Seitz, S.C. Weiss, W.H. Weber, M. Böhm, D. Flottmann, *JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* 21 (2008) 427.
- [8] S. Knödler, W. Seitz, W. Schulz, W.H. Weber, in *HPTLC*, Berlin, 2006.
- [9] W. Schulz, W. Seitz, W.H. Weber, in *HPTLC*, Helsinki, 2008.
- [10] S.C. Weiss, W. Schulz, W.H. Weber, in *ANAKON*, Berlin, 2009.
- [11] S.C. Weiss, W. Seitz, W. Schulz, W.H. Weber, *GIT - Labor-Fachzeitschrift* 55 (2011).
- [12] H. Urbanczyk, J.C. Ast, M.J. Higgins, J. Carson, P.V. Dunlap, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57 (2007) 2823.
- [13] N. Reineke, in *Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg, Hamburg*, 2003.
- [14] E. Teuscher, U. Lindequist, *Biogene Gifte*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1994.
- [15] K. Burger, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 318 (1984) 228.
- [16] DIN EN ISO 11348-1 (2009).

Aufgestellt:

Langenau, den 21.02.2011



Dipl.-Ing. (FH) Stefan Weiß



Dr. Wolfgang Schulz