

**Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz  
- Fachbereich Pflanzenernährung -  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

---

**Entwicklung, Optimierung, Validierung und Automatisierung eines  
Immunoassays zur sensitiven Detektion des endokrinen  
Disruptors 17 $\beta$ -Östradiol im Wasserkreislauf**

**Inaugural – Dissertation**

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Agrarwissenschaften

(Dr. agr.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt am 14.12.2006

von

Therese Hintemann

aus

Bonn

Referent:	PD Dr. R.J. Schneider
Korreferent:	Prof. Dr. W. Amelung
Tag der mündlichen Prüfung:	09. Februar 2007

### ***Unsinn und Sinn***

*Du suchst und suchst. Und kannst den Sinn nicht finden.*

*Gib's auf; denn so wirst du ihn nicht ergründen.*

*Pfeif dir ein Liedchen, träume vor dich in,*

*wie oft enthüllt im Un-Sinn sich der Sinn!*

*(Mascha Kaléko)*



## Zusammenfassung

Entwicklung, Optimierung, Validierung und Automatisierung eines Immunoassays zur sensitiven Detektion des endokrinen Disruptors  $17\beta$ -Östradiol im Wasserkreislauf

Über kommunale Abwässer und die Ausbringung tierischer Düngemittel (z.B. Gülle und Mist) kann das natürliche Sexualhormon  $17\beta$ -Östradiol (E2) in den Wasserkreislauf gelangen und stellt dort auf Grund seiner hohen endokrinen Wirksamkeit ein Risikopotential für Mensch und Umwelt dar. Bisher werden zur Bestimmung von E2-Konzentrationen in der Regel zeit- und kostenaufwändige chromatographische Verfahren angewendet. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einfacher, sensitiver sowie zeit- und kostengünstiger Messverfahren, welche eine Routineüberwachung von Gewässern praktikabel machen.

Im Rahmen dieser Studie wurde ein Immunoassay (ELISA) für die sensitive Detektion von E2 im Wasserkreislauf entwickelt. Bei der Optimierung wurden die Effekte der Faktoren Inkubationszeit und Tracerverdünnung auf die Nachweisempfindlichkeit quantifiziert, von denen letzterer den größten Einfluss aufwies. Ebenfalls wurde der Effekt von Matrix und Konservierungsmethoden für die Proben auf die messbaren E2-Konzentrationen untersucht. Es zeigte sich, dass Matrixeffekte zu Fehlern bei der Bestimmung der E2-Konzentration führten und Lagerungseffekte durch die hier untersuchten Konservierungsmethoden nicht ausgeschlossen werden konnten.

Zur Erhöhung der Präzision und damit der Nachweisempfindlichkeit wurde der entwickelte manuelle E2-ELISA automatisiert. In Zusammenarbeit mit der Firma quo data wurde ein Immunoassay-Automat (ESTR-A-LISER) entwickelt und für die automatische Durchführung des E2-ELISA optimiert. Basis dieses Automaten ist eine Pipettiereinheit, die randomisiertes Arbeiten sowie eine zeit- und mengenexakte Pipettierung ermöglichen soll. Ebenfalls in die Arbeitsstation integriert sind ein Photometer, das die automatische Messung der optischen Dichte zulässt und eine Auswertesoftware, welche Trendkorrekturen vornimmt.

In einer Feldstudie zur Validierung beider Messverfahren wurden die E2-Konzentrationen in Oberflächengewässern und Kläranlagenabläufen mit dem ELISA zum einen nach einer Anreicherung der Proben manuell, zum anderen direkt mit Hilfe des ESTR-A-LISER bestimmt. Dabei konnte mit Anreicherung der Proben bei manueller Durchführung eine Nachweisgrenze von  $0,14 \text{ ng L}^{-1}$  erreicht werden. Mit dem Automaten wurden, bei probenspezifischer Berechnung, Nachweisgrenzen bis zu  $0,3 \text{ ng L}^{-1}$  erreicht und zusätzlich das 95 %-Konfidenzintervall der Messwerte ermittelt. Beide Messmethoden zeigten eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse. In den Kläranlagenabläufen konnten E2-Konzentrationen von  $0,6 \text{ ng L}^{-1}$  bis  $51 \text{ ng L}^{-1}$  nachgewiesen werden, während in den Oberflächengewässern zwischen  $0,2$  und  $9,2 \text{ ng L}^{-1}$  gemessen wurden.

Die in dieser Studie entwickelten Messverfahren für E2 stellen beide einfache und kostengünstige Instrumente dar. Dies ermöglicht zukünftig die Schaffung einer breiten und repräsentativen Datengrundlage über die E2-Belastungen in Gewässern und deren Zuläufen, welche für die Risikobewertung und damit für einen nachhaltigen Gewässerschutz unabdingbar ist.

## Abstract

Development, optimisation, validation and automation of an immunoassay for the sensitive detection of the endocrine disruptor 17 $\beta$ -estradiol in the water cycle

The endogenous sex hormone 17 $\beta$ -estradiol (E2) can enter the water cycle via sewage and organic fertiliser, thus posing a potential risk for humans and the environment because it is one of the most potent endocrine disrupting compounds. E2 concentrations are currently measured using time consuming and expensive chromatographic methods. Therefore, the aim of this study was to develop analytical methods that are simple, sensitive, as well as efficient and less expensive.

Within the scope of this work, an immunoassay (ELISA) was developed and optimised for the sensitive detection of E2 in the water cycle. Furthermore, the influences of incubation time and tracer concentration on sensitivity were quantified, with the latter showing the more significant effect. Furthermore, the influence of matrix and sample conservation methods on the measurable E2 concentration were studied. The findings show that the matrix may influence the error of the results, and that the storage effects of the examined conservation methods cannot be neglected.

The manual E2-ELISA was then automated in order to improve its precision and sensitivity. The automated instrument (ESTR-A-LISER) was developed in co-operation with the company quo data and optimised for the performance of the E2 ELISA. The ESTR-A-LISER consists of a robotic workstation which enables randomisation and accurate pipetting both in time and volume. A photometer for the direct measurement of optical density, as well as software which performs trend adjustments, are also included.

During the field study E2 concentrations in several surface waters and effluents from sewage treatment plants were measured both using the manual ELISA (after enrichment of the samples) and directly using the ESTR-A-LISER. By preconcentration of the samples and applying the manual ELISA, a detection limit of 0.14 ng L<sup>-1</sup> could be established. The ESTR-A-LISER enables sample specific detection limits down to 0.3 ng L<sup>-1</sup> and additionally specifies the 95 % confidence level for the results. E2 concentrations in the effluent samples were between 0.6 ng L<sup>-1</sup> and 51 ng L<sup>-1</sup> and for surface waters between 0.2 und 9.2 ng L<sup>-1</sup>.

Both the manual E2 ELISA developed in this study and its automation, are simple and cost effective instruments for the sensitive detection of E2. In the future this will allow the creation of a broad and representative data base on the occurrence of E2 in water bodies and their influents which is indispensable for risk assessment and sustainable water protection.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen.....</b>	<b>3</b>
2.1	Endokrine Disruptoren .....	3
2.2	Das Hormon 17 $\beta$ -Östradiol.....	4
2.2.1	Eintragswege in die Umwelt.....	7
2.2.1.1	Häusliche Abwässer .....	7
2.2.1.2	Landwirtschaftliche Tierproduktion.....	8
2.2.2	Abbau- und Sorptionsprozesse .....	10
2.2.2.1	Boden .....	11
2.2.2.2	Kläranlagen .....	13
2.2.3	Auswirkungen auf die Umwelt.....	18
2.2.4	Vorkommen in der aquatischen Umwelt.....	22
2.3	Immunoassays.....	24
2.3.1	Testsysteme .....	24
2.3.2	Antikörper .....	28
2.3.3	Antigen-Antikörperbindung .....	29
2.3.4	Affinitätslimitierung.....	32
2.3.5	Sensitivität .....	32
2.3.6	Auswertung von Immunoassays .....	34
2.3.6.1	4-Parameter-Kurve .....	34
2.3.6.2	Kenndaten .....	37
2.3.7	Selektivität .....	38
2.3.8	Validierung und Qualitätssicherungskonzepte .....	39
2.3.9	Matrixeffekte .....	41
2.3.10	Lösungsmittel und Konservierungsmethoden .....	43
2.3.11	Automatisierung von Immunoassays .....	44
<b>3</b>	<b>Material .....</b>	<b>48</b>
3.1	Entwicklung und Optimierung des ELISA.....	48
3.2	ESTR-A-LISER .....	51
3.3	Feldstudie.....	52

<b>4</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1</b>	<b>Entwicklung und Optimierung des ELISA .....</b>	<b>53</b>
4.1.1	Pufferlösungen .....	53
4.1.2	Stammlösungen und Verdünnungen .....	56
4.1.3	Ausgangssituation der Optimierung und Entwicklung des ELISA .....	56
4.1.4	Immunisierung und Gewinnung von Antikörpern .....	58
4.1.5	Verdünnung und Volumen des Antikörpers .....	60
4.1.6	Lagerung der Seren .....	61
4.1.7	Tracersynthese: Kopplung von 3,17 $\beta$ -Dihydroxy-1,3,5(10)-17estratrien-6-on- (carboxymethyloxim) an Meerrettichperoxidase (E2-POD) .....	61
4.1.8	Verdünnung des Tracers sowie Vorinkubationszeiten und Inkubationszeiten von Standards und Tracer .....	63
4.1.9	Blocking .....	64
4.1.10	Substrat.....	64
4.1.11	Stopplösungen .....	65
4.1.12	Optimierung des Assays bei 5 % Methanol .....	66
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung des Immunoassays .....</b>	<b>66</b>
4.2.1	Kreuzreaktivität .....	66
4.2.2	Mehrfaktorielle Untersuchung zum Einfluss verschiedener Faktoren auf den ELISA.....	67
4.2.3	Ermittlung der Kenndaten.....	67
<b>4.3</b>	<b>Einfluss von Matrixeffekten .....</b>	<b>69</b>
<b>4.4</b>	<b>Einfluss organischer Lösungsmittel.....</b>	<b>70</b>
<b>4.5</b>	<b>Konservierung von Realproben .....</b>	<b>70</b>
<b>4.6</b>	<b>Auswertung der manuellen Tests .....</b>	<b>72</b>
4.6.1	Dixontest .....	72
4.6.2	Statistische Auswertung .....	72
<b>4.7</b>	<b>ESTR-A-LISER .....</b>	<b>75</b>
4.7.1	Arbeitsstation .....	75
4.7.2	Software .....	76
4.7.3	Optimierung des ELISA am ESTR-A-LISER.....	78
4.7.4	Messung mit dem ESTR-A-LISER.....	80
4.7.5	Auswertung .....	81
<b>4.8</b>	<b>Feldstudie .....</b>	<b>82</b>
4.8.1	Feldproben.....	83



---

4.8.1.1	Oberflächengewässer .....	83
4.8.1.2	Kläranlagen .....	84
4.8.2	Probenahme .....	86
4.8.3	Bestimmung des DOC .....	86
4.8.4	Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit .....	86
4.8.5	Anreicherungsmethode .....	87
4.8.6	Bestimmung der Wiederfindungsraten .....	88
4.8.7	Messung der Feldproben .....	88
4.8.8	Referenzmessungen .....	89
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>90</b>
<b>5.1</b>	<b>Entwicklung und Optimierung des Immunoassays .....</b>	<b>90</b>
5.1.1	Antikörper .....	90
5.1.2	Tracer .....	93
5.1.3	Optimierung von Verdünnungen und Inkubationszeiten .....	96
5.1.4	Blocking .....	99
5.1.5	Substrate .....	100
5.1.6	Stopplösungen .....	102
<b>5.2</b>	<b>Charakterisierung des Assays .....</b>	<b>103</b>
5.2.1	Kreuzreaktivität .....	103
5.2.2	Mehrfaktorielle Untersuchung zum Einfluss verschiedener Faktoren auf den ELISA: Experiment I .....	105
5.2.2.1	Auswertung mit OptiVal® Experiment I .....	108
5.2.3	Mehrfaktorielle Untersuchung zum Einfluss verschiedener Faktoren auf den ELISA: Experiment II .....	110
5.2.3.1	Auswertung mit OptiVal® Experiment II .....	112
5.2.4	Kenndaten .....	117
<b>5.3</b>	<b>Einfluss von Matrixeffekten .....</b>	<b>119</b>
5.3.1	Verdünnung und Dotierung von Proben zur Reduzierung von Matrixeffekten .....	119
5.3.2	Huminsäuren .....	121
<b>5.4</b>	<b>Einfluss organischer Lösungsmittel .....</b>	<b>125</b>
<b>5.5</b>	<b>Optimierung des Assays bei 5 % Methanol-Anteil .....</b>	<b>127</b>
<b>5.6</b>	<b>Konservierung von Proben .....</b>	<b>129</b>
<b>5.7</b>	<b>ESTR-A-LISER .....</b>	<b>135</b>
5.7.1	Auswertung .....	136

---

<b>5.8</b>	<b>Feldstudie .....</b>	<b>138</b>
5.8.1	Feldproben .....	139
5.8.2	Wiederfindungsraten .....	140
5.8.3	Messwerte.....	142
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>146</b>
6.1	Entwicklung und Optimierung des E2-ELISA.....	146
6.2	Automatisierung des E2-ELISA mit dem ESTR-A-LISER.....	151
6.3	Matrixeffekt.....	154
6.4	Konservierung von Proben.....	159
6.5	Feldstudie .....	161
<b>7</b>	<b>Fazit und Ausblick.....</b>	<b>166</b>
<b>8</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>169</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Parameter A der 4-Parameter-Kurve
ANOVA	Varianzanalyse, analysis of variance
AV	Antikörperverdünnung
B	Parameter B der 4-Parameter-Kurve
C	Parameter C der 4-Parameter-Kurve
D	Parameter D der 4-Parameter-Kurve
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMA	Dimethylacetamid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff, dissolved organic compound
E1	Östron
E2	17 $\beta$ -Östradiol
E3	Östriol
EDC	endokriner Disruptor, endokrine disrupting compound
EE2	17 $\alpha$ -Ethinylöstradiol
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
EU	Europäische Union
Feb	Februar
GC	Gaschromatographie
Jan	Januar
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, high performance liquid chromatography
HRT	hydraulische Retentionszeit, hydraulic retention time
IgG	Antikörper
Iz	Inkubationszeit
K	Kalium
LC	Flüssigchromatographie, liquid chromatography
Lf	Leitfähigkeit
LOD	Nachweisgrenze, limit of detection
LOQ	Bestimmungsgrenze, limit of quantitation
MS	Massenspektrometer
MTP	Mikrotiterplatte
N	Stickstoff
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD	Optische Dichte
P	Phosphor
p	Signifikanz

---

PBS	Phosphatpuffer, phosphate buffered saline
pH	ph-Wert
POD	Peroxidase
$r^2$	Bestimmtheitsmaß
RT	Raumtemperatur
SPE	Festphasenextraktion, solid phase extraction
SRT	Retentionszeit des Klärschlammes, solid retention time
TBABH	Tetrabutylammoniumborhydrid
TBS	Tris-Puffer, tris buffered saline
TBT	Tributylzinn
TMB	Tetramethylbenzidin
TOC	gesamter organischer Kohlenstoff, total organic compound
TV	Tracer-Verdünnung
Wdfr.	Wiederfindungsrate
$\beta$	Regressionskoeffizient

## Maßeinheiten

a	Jahr
d	Tag
g	Gramm
h	Stunde
kg	Kilogramm
L	Liter
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
mL	Milliliter
M	molar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
pg	Pikogramm

# 1 Einleitung

In den letzten Jahrzehnten ist die Besorgnis über mögliche negative Auswirkungen von Substanzen, die das Hormonsystem beeinflussen können (sogenannte „endokrine Disruptoren“), stark gestiegen (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY 2002). Die Forschung über Vorkommen und Auswirkungen von endokrinen Disruptoren in der Umwelt wurde intensiviert. Seitdem wird ihre Bedeutung für Mensch und Tier in der Wissenschaft, Politik und Öffentlichkeit diskutiert.

In der Europäischen Union (EU) wurde die Notwendigkeit erkannt, die Forschung zum Thema „endokrine Disruptoren“ auszuweiten, so dass seit dem 4. Forschungsrahmenprogramm (Beginn 1994) verschiedene Forschungsprojekte aus diesem Bereich gefördert wurden. Ein Überblick über die Aktivitäten der EU wird im Internet unter der Adresse [http://ec.europa.eu/research/endocrine/index\\_en.html](http://ec.europa.eu/research/endocrine/index_en.html) gegeben. Neben vielen anderen Projekten wurde 2001 CREDO<sup>1</sup>, der Cluster von Forschungsprojekten zum Thema endokrine Disruption gegründet, welchem die Projekte EDEN<sup>2</sup>, FIRE<sup>3</sup>, EURISKED<sup>4</sup> und COMPRENDO<sup>5</sup> angehören und acht weitere Projekte assoziiert sind.

Der in dieser Arbeit untersuchte endokrine Disruptor 17 $\beta$ -Östradiol (E2) ist ein natürliches Sexualhormon und zählt bei Wirbeltieren zu den hormonell wirksamsten Substanzen (SUMPTER und JOHNSON 2005). Wenn E2, abhängig vom Entwicklungsstadium eines Organismus, in zu hoher Dosis vorliegt, kann das Hormonsystem und damit insbesondere die Reproduktionsfähigkeit, geschädigt werden. Viele Studien haben gezeigt, dass E2-Konzentrationen, wie sie z.B. in Kläranlagenabläufen vorkommen, bereits negative Auswirkungen auf Fische haben können (ROUTLEDGE et al. 1998; ROSE et al. 2002; THORPE et al. 2003). Auch bezogen auf den Menschen wird davon ausgegangen, dass endokrine Disruptoren negative Einflüsse auf die Fortpflanzungsfähigkeit sowie die Gesundheit haben können (LIEHR 2000; INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY 2002; U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES 2005; BAY et al. 2006).

Die Haupteintragswege für E2 in die Umwelt sind kommunale Abwässer und die landwirtschaftliche Tierproduktion, über die beträchtliche Mengen an E2 in die Umwelt gelangen. Dabei spielen die Kläranlagen eine zentrale Rolle bei der Beseitigung von E2 aus dem kommunalen Abwasser und bestimmen bei ungenügender Eliminationsleistung damit den E2-Eintrag über diesen Eintragsweg in die Umwelt (SUMPTER und JOHNSON 2005).

---

<sup>1</sup> <http://www.credocluster.info/>

<sup>2</sup> <http://www.edenresearch.info/>

<sup>3</sup> <http://www.rivm.nl/fire/>

<sup>4</sup> <http://www.eurisked.org/>

<sup>5</sup> <http://www.comprendo-project.org/>

Die Kontamination von Gewässern mit E2 kann zu einem nicht zu unterschätzendem ökonomischen Schaden führen, wenn aufwändige Aufbereitungsverfahren erforderlich werden, weil die Qualität des Trinkwassers beeinträchtigt wird oder der Fischereisektor leidet, weil die Fischpopulationen zurückgehen. Auch in der Landwirtschaft steigen die Kosten in der Tierproduktion bei negativer Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit von landwirtschaftlich genutzten Tieren. Daher ist die Überwachung der in der Umwelt vorkommenden endokrinen Substanzen notwendig, um mögliche Gefährdungspotentiale rechtzeitig zu erkennen und diesen entgegen zu wirken. Um ein Monitoring-Netz aufbauen zu können, sind einfache, kostengünstige und sehr zuverlässige Messmethoden erforderlich.

Auf Grund der oben genannten Erfordernisse war es das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung und Optimierung eines E2-ELISA, der die Detektion von E2 in der aquatischen Umwelt ermöglicht. Angestrebt war ein möglichst zuverlässiges, einfaches und kostengünstiges Verfahren für die direkte Messung von E2 in Wasserproben, welches sich für Routineuntersuchungen eignet. Aufgrund der sehr niedrigen Wirkkonzentrationen von E2 in der Umwelt ist dazu ein Messverfahren mit einer Nachweisgrenze im unteren ng L<sup>-1</sup>-Bereich bzw. sub-ppt-Bereich notwendig. Neben der Optimierung des Assays bezüglich maximaler Empfindlichkeit wurde als zweiter Ansatz die Automatisierung des Assays verfolgt, um über erhöhte Präzision der Messung und ein geeignetes Auswertungsverfahren die Nachweisgrenze weiter zu senken. Zusätzlich sollte mit der Auswertung ein Qualitätskriterium zur Beurteilung des Messverfahrens erarbeitet werden. Da sowohl Probenmatrix als auch die Lagerung von Proben Einfluss auf die messbare E2-Konzentration haben, sollten diese Effekte im Rahmen von Voruntersuchungen überprüft werden. Das Ziel einer Feldstudie war die in dieser Arbeit entwickelten und optimierten Messverfahren auf ihre Praxistauglichkeit zu testen.

Zusammenfassend ergaben sich daraus folgende Teilaufgaben:

1. Entwicklung und Optimierung eines ELISA für die sensitive Detektion von E2 im Wasserkreislauf.
2. Implementierung des E2 ELISA auf einer halbautomatischen Pipettierstation (ESTR-A-LISER). Erweiterung des Messbereichs auf Konzentrationen unterhalb von 10 ng L<sup>-1</sup> in Proben.
3. Durchführung von Voruntersuchungen bezüglich der Handhabung von Feldproben betreffend Matrixeffekte und Lagerung/Konservierung von Proben.
4. Erprobung der Praxistauglichkeit beider Messsysteme (manuelle und automatisierte Durchführung des ELISA) im Rahmen einer Feldstudie.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Endokrine Disruptoren

Endokrine Disruptoren (engl.: Endocrine Disrupting Compounds, EDCs) greifen direkt oder indirekt in das Hormonsystem eines Organismus ein. Sie beeinflussen die Biosynthese, den Transport, die Bindung oder die Elimination natürlicher Hormone im Körper (KAVLOCK et al. 1996). EDCs können in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden:

- a) Natürliche Hormone, zu denen alle Hormone gehören, die von Organismen (Menschen, Tiere oder Pflanzen) gebildet und an die Umwelt abgegeben werden. Dazu gehören z.B. Testosteron und Phytohormone sowie das in dieser Arbeit untersuchte  $17\beta$ -Östradiol (E2).
- b) Synthetische Hormone, die zu medizinischen Zwecken synthetisiert werden und zu denen  $17\alpha$ -Ethinylöstradiol (EE2) und Mestranol gehören. Sie werden in nur sehr geringen Mengen eingesetzt, können aber um ein Vielfaches wirksamer sein als natürliche Hormone. Zudem können synthetische Hormone im Gegensatz zu den natürlichen Hormonen, die relativ schnell deaktiviert oder abgebaut werden können, in der Umwelt sehr stabil sein (LANGE und MEYER 2002).
- c) Xenobiotische EDCs sind Pestizide (DDT), Industriechemikalien (Nonylphenol, Bisphenol A, etc.), Weichmacher (Phthalate), Dioxine, Tributylzinn u.a.. Sie kommen in größeren Mengen in der Umwelt vor, aber ihre endokrine Wirksamkeit kann deutlich geringer sein als die der natürlichen Hormone (JOBILING et al. 1998).

Da diese Substanzen im Hormonsystem zwar wirkungs-, aber nicht artspezifisch sind, betreffen sie viele Organismen, sowohl aquatische als auch terrestrische. Hinzu kommt, dass sich die Auswirkungen der unterschiedlichen Substanzen addieren können (SOTO et al. 1995; KÖRNER et al. 1999). Endokrine Disruptoren können wie Hormone wirken, die Funktion der körpereigenen Hormone nachahmen (mimikrieren), antagonistisch oder synergistisch sein und damit verweiblichend oder vermännlichend wirken (JOBILING et al. 1998). Das Umweltgefährdungspotential von EDCs hängt von vielfältigen Faktoren ab, welche das Vorkommen in der Umwelt, die Sorptionseigenschaften und die Abbauprozesse der EDCs beeinflussen (siehe Kapitel 2.2.1 und 2.2.2). In erster Linie wird das Umweltgefährdungspotential der einzelnen endokrin wirksamen Substanzen durch ihre Wirksamkeit auf die unterschiedlichen Organismen und die in der Umwelt vorhandenen und verfügbaren Mengen bestimmt.

## 2.2 Das Hormon 17 $\beta$ -Östradiol

Hormone sind Botenstoffe im Körper, die in äußerst geringen Konzentrationen wirksam sind. Ihre Wirkungsspezifität ist dadurch gegeben, dass nur in bestimmten Empfängerzellen Proteine vorkommen, die das Hormon binden und somit als Hormonrezeptoren fungieren. Für ihre Wirksamkeit ist weiterhin entscheidend, welche Rezeptoren wo (in welchen Zellen) und wann exprimiert werden. Sowohl weibliche als auch männliche Wirbeltiere, einschließlich des Menschen, besitzen Rezeptoren für weibliche und männliche Sexualhormone. Damit kann es durch EDCs sowohl zur „Vermännlichung“ weiblicher Organismen als auch zur „Verweiblichung“ männlicher Organismen kommen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem weiblichen Sexualhormon 17 $\beta$ -Östradiol (E2), dem wirksamsten natürlichen Östrogen, welches zu den Steroidhormonen gehört. Hauptproduktionsort der Östrogene sind die das Ei umhüllenden Follikelzellen der Frau. In geringem Maße erzeugen jedoch auch die Hoden des Mannes, die Nebennierenrinde, die Leber, das Gehirn und andere Organe Östrogene. Durch Sexualhormone werden sowohl die geschlechtliche Entwicklung als auch der Körperbau, das Stoffwechselgeschehen und die Psyche stark beeinflusst. In jedem Körper kommen männliche und weibliche Sexualhormone vor, wobei das Mengenverhältnis entscheidend ist. Durch enzymatisch katalysierte Umwandlungsschritte sind manche Sexualhormone in einander umwandelbar. Östradiol wird aus Testosteron gebildet, somit ist Testosteron nicht nur ein männliches Sexualhormon, sondern auch Prohormon des wichtigsten weiblichen Sexualhormons (MÜLLER 2004).

Die fettlöslichen Steroidhormone, zu denen E2 gehört, gelangen zu ihrem Wirkungsort, indem sie die Zellmembran passieren, sich an cytoplasmatische Rezeptorproteine binden und dann als Hormon-Rezeptor-Komplex in den Zellkern eindringen. Dort binden sie an spezifische DNA-Sequenzen und veranlassen wiederum entsprechende Gene zur mRNA-Synthese (WEHNER und GEHRING 1990). Um mögliche negative Auswirkungen von endokrinen Substanzen mit östrogener Wirkung auf die Fortpflanzung zu erklären, werden an dieser Stelle kurz die verschiedenen Wirkungen von E2 im weiblichen Reproduktionszyklus von Menschen und Säugetieren dargestellt.

Im Uterus ist E2 für das Wachstum der Uterusschleimhaut verantwortlich, die für eine Einnistung des Embryos notwendig ist. E2 wirkt zudem auf die Hypophyse, welche die Bildung von E2 über das Follikel stimulierende Hormon (FSH) regelt. Es handelt sich dabei um ein sehr sensibles Rückkopplungssystem, bei dem E2 mit Zeitverzögerung seine eigene Freisetzung hemmt und so zum Absinken von E2-Spiegeln im Blut führt. Dies ist wiederum die Voraussetzung für das Heranreifen eines neuen Follikels. Wurde in den Follikelzellen wieder ausreichend E2 gebildet, kommt es zum Eisprung. Während der Schwangerschaft wird E2 in größeren Mengen in der Plazenta gebildet und verhindert im



Zusammenspiel mit Progesteron weitere Ovulationen. Diese feinabgestimmten Regulierungsmechanismen machen den Organismus besonders empfindlich gegenüber endokrin wirksamen Substanzen (MÜLLER 2004). Damit führt die hohe Wirksamkeit der Hormone dazu, dass kleine Änderungen der Hormonkonzentration im Blut zu großen Auswirkungen auf den Organismus führen können.

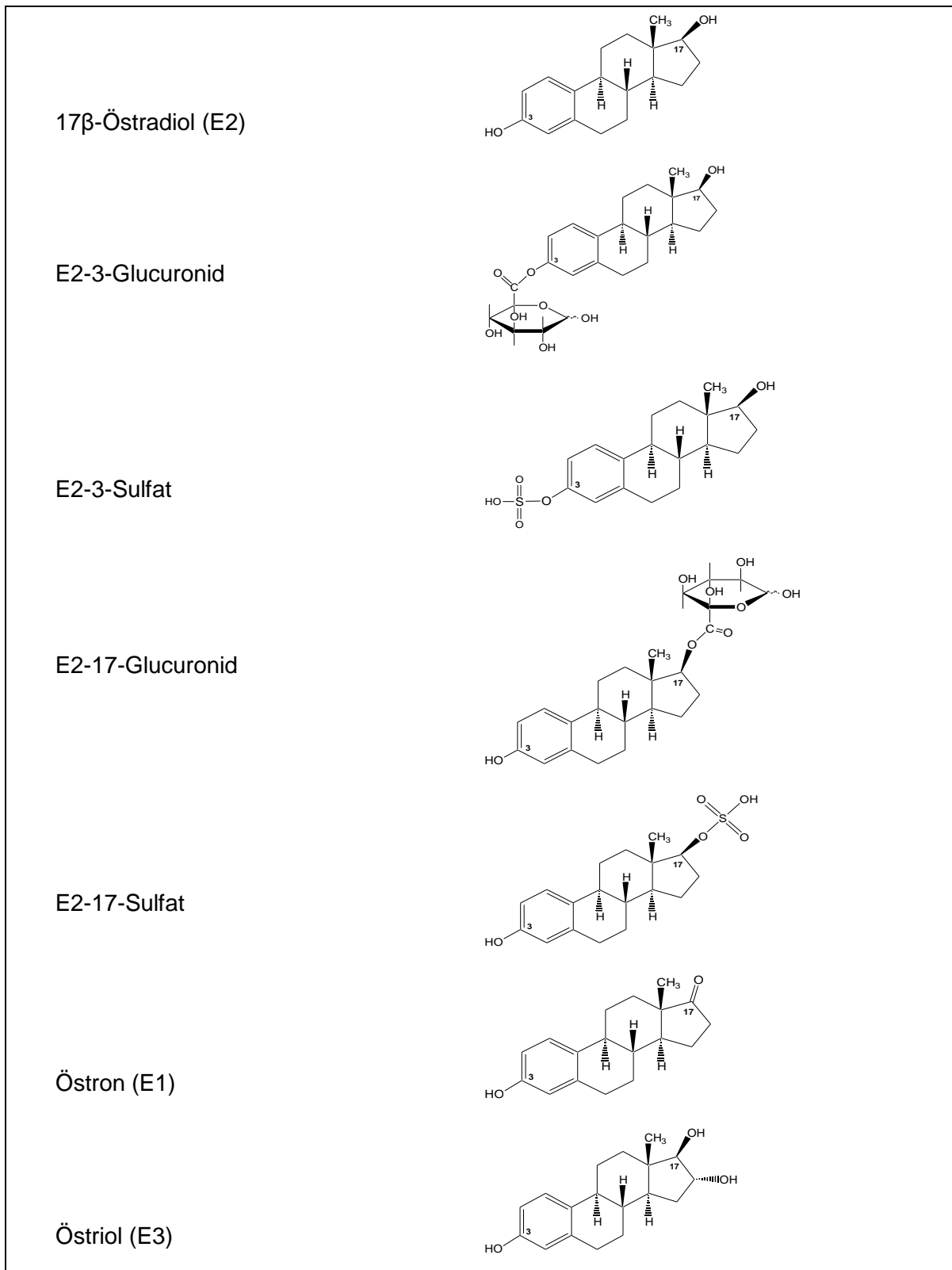
Der Abbau von E2 im Körper erfolgt in der Leber, wobei es entweder zu dem weniger aktiven 17 $\alpha$ -Östradiol bzw. zu Östron (E1) transformiert wird oder E2-Konjugate (Glucuronide und Sulfate) gebildet werden. Ausgeschieden werden Hormone größtenteils mit dem Urin als wasserlösliche Konjugate, von denen das E2-3-Glucuronid den größten Anteil ausmacht (TERNES et al. 1999a). Als Konjugate liegen die Hormone in einer biologisch inaktiven Form vor. Im Kot, über den nur ein sehr geringer Anteil an Östrogenen ausgeschieden wird, liegt E2 in seiner unkonjugierten Form vor, da vermutlich Darmbakterien die Konjugate dekonjugieren (LEGLER et al. 2002).

Die Konjugate von E2 ähneln in ihrer Struktur dem aktiven Hormon (siehe Abbildung 2.1), wobei die Sulfat- oder Glucuronidgruppe an der C-3- oder C-17-Position der Ausgangssubstanz konjugiert ist. Die Konjugate von E2 sind auf Grund ihrer polaren funktionellen Glucuronid- bzw. Sulfatgruppen besser wasserlöslich als E2 selbst. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften von E2 sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

**Tabelle 2.1:** Chemische und physikalische Eigenschaften von E2 (Hanselman et al. 2003)

Eigenschaft	E2	
Formel	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	
Molekulargewicht (MG) [g mol <sup>-1</sup> ]	272,4	
Löslichkeit in Wasser (S <sub>w</sub> ) [mg L <sup>-1</sup> ]	3,9 - 13,3	(gering wasserlöslich)
Dampfdruck [Pa]	3*10 <sup>-8</sup>	(„nicht flüchtig“)
Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizient (log K <sub>ow</sub> )	3,1 - 4,0	(moderat hydrophob)
Säurestärke (pKs)	10,5 - 10,7	(schwach sauer)

Der relativ hohe log K<sub>ow</sub> lässt die Vermutung zu, dass die Auswaschung aus Böden eher gering sein wird, aber dass via Oberflächenabfluss („run-off“) ein Eintrag in die aquatische Umwelt wahrscheinlich ist (LEE et al. 2003).

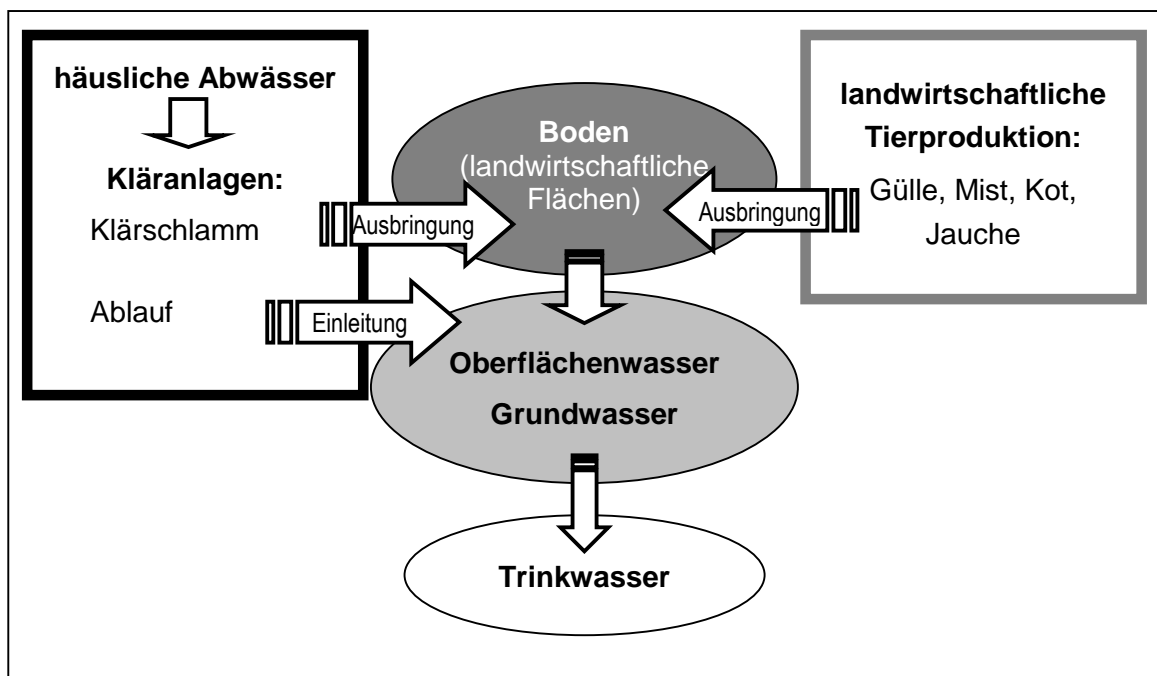


**Abbildung 2.1:** Strukturformeln von E2, E1, E3 und den relevanten E2-Konjugaten (Glucuronide und Sulfate)

### 2.2.1 Eintragswege in die Umwelt

Natürliche Hormone von Menschen und Tieren gelangen über Ausscheidungen in die Umwelt. Durch die wachsende Bevölkerungsdichte und die damit verbundene intensivere landwirtschaftliche Tierproduktion werden weltweit immer größere Mengen an natürlichen Hormonen in die Umwelt abgegeben. Hinzu kommen die eingesetzten synthetischen Hormone und xenobiotischen EDCs.

Der Eintrag von EDCs in die Umwelt erfolgt über industrielle und kommunale Abwässer sowie über den Eintrag aus der Landwirtschaft. Für das natürliche Hormon E2 sind nur die beiden zuletzt genannten Eintragswege relevant (siehe Abbildung 2.2), auf die in den folgenden Kapiteln eingegangen wird.



**Abbildung 2.2:** Eintragswege von E2 in die Umwelt

Die häuslichen Abwässer werden nach der Aufbereitung in Kläranlagen als Kläranlagenabläufe in Oberflächengewässer eingeleitet und als Klärschlamm, je nach Entsorgungskonzept, mancherorts als Dünger auf landwirtschaftlich genutzten Flächen ausgebracht. Ebenso werden auch Gülle, Mist, Kot und Jauche als Dünger eingesetzt, so dass E2 über Oberflächenabfluss und Bodenpassage auch die Gewässer erreichen kann.

#### 2.2.1.1 Häusliche Abwässer

Die im Körper von Mensch und Tier gebildeten Östrogene E2 und E1 werden über den Urin als biologisch inaktive Konjugate ausgeschieden, gelangen ins Abwasser und können

in den Kläranlagen oder im Kanal wieder in die aktive Form dekonjugiert werden. Die Hydrolyse zum biologisch aktiven Hormon kann im Abwasser (schnell und vollständig) durch Bakterien geschehen, welche die Enzyme  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase produzieren (DESBROW et al. 1998; ALCOCK et al. 1999; DAUGHTON und TERNES 1999; TERNES et al. 1999a)

Johnson et al. (2004) trugen aus verschiedenen Literaturquellen Daten zu Ausscheidungsmengen von E2 für die Entwicklung eines Modells zur Kalkulation von E2 in Kläranlagenzu- und -abläufen zusammen (siehe Tabelle 2.2). Diese Daten sollen lediglich einen Eindruck über die Größenordnung der ausgeschiedenen Mengen an E2 durch den Menschen vermitteln, da sie auf einer Vielzahl von Annahmen basieren.

**Tabelle 2.2:** Geschätzte E2-Ausscheidungsmengen der Bevölkerung nach den Modellannahmen von JOHNSON und WILLIAMS (2004).

	<b>Durchschnittliche E2 Ausscheidung (Bereich) [<math>\mu\text{g d}^{-1}</math>]</b>	<b>Geschätzter Anteil an der Bevölkerung [%]</b>	<b>Durchschnittliche Produktion (Bereich) [<math>\mu\text{g d}^{-1}</math>]</b>
Männer	1,8 (1,3 - 2,4)	50	0,9 (0,7 - 1,2)
Frauen im Zyklus	3,2 (1,7 - 4,6)	30	1,0 (0,5 - 1,4)
Frauen in der Menopause	1,0 (0,0 - 3,5)	13,5	0,1 (0 - 0,5)
Frauen in der Menopause mit Hormonersatztherapie	56 (51,5 - 61,5)	2	1,1 (1,0 - 1,2)
Schwangere Frauen	393 (340 - 445)	0,88	3,5 (3,1 - 4,1)
<b>Durchschnitt pro Kopf</b>			<b>6,6 (5,3 - 8,4)</b>

JOHNSON et al. (2004) gehen dabei von einem 50%igen Verlust an E2 im Kanal durch Sorptions- und Abbauprozesse aus, so dass nach ihren Annahmen im Durchschnitt in der Kläranlage 3,3  $\mu\text{g}$  E2 pro Tag und Einwohner anfallen würden. Nach diesen Daten tragen schwangere Frauen, trotz ihres geringen Anteils an der Bevölkerung den größten Anteil an den gesamten E2-Ausscheidungen bei.

### 2.2.1.2 Landwirtschaftliche Tierproduktion

Die täglich ausgeschiedene Menge an Östrogenen über Urin und Kot ist abhängig von Alter, Geschlecht und Reproduktionsstadium der Tiere. LANGE und MEYER (2002) berechneten an Hand verschiedener Literaturquellen durchschnittliche jährliche Ausscheidungsraten für Rinder, Schweine, Schafe und Geflügel (siehe Tabelle 2.3). Bei

den ausgeschiedenen Östrogenen handelt es sich um E2, 17 $\alpha$ -Östradiol und E1, deren Anteile je nach Tierart und Kategorie verschieden sind (SHORE et al. 1993; LANGE und MEYER 2002; HANSELMAN et al. 2003).

**Tabelle 2.3:** Geschätzte tägliche und jährliche Ausscheidung von Östrogenen in der landwirtschaftlichen Tierproduktion, verändert nach LANGE und MEYER et al. (2002). \*Die Östrogenausscheidungen durch Geflügel basieren auf Daten von SHORE et al. (1993).

Tierart	Kategorie	Östrogene [ $\mu\text{g d}^{-1}$ ]	Östrogene [ $\text{mg a}^{-1}$ ]
Rinder	Kälber	44	16
	Kühe	532	194
	trächtige Kühe	2712	990
	Bullen	479	175
Schweine	Sauen	118	43
	trächtige Sauen	192	70
	Eber	2274	830
Schafe	Schafe	23	8,4
	trächtige Schafe	52	19
	Böcke	25	9,1
Geflügel*	Masthühner	0,9	0,34
	Masthähnchen	0,2	0,07
	Legehennen	19	7,1
	Hähne	3,3	1,2

Neben dieser Tabelle zeigen auch andere Studien, dass männliche Säugetiere wie Bullen, Eber und Schafsböcke beträchtliche Mengen an Östrogenen ausscheiden (DAXENBERGER et al. 2001). Besonders auffällig ist die hohe Östrogenausscheidung bei Ebern, die einzigartig unter männlichen Säugern ist. Dies korrespondiert jedoch sehr gut mit den von DAXENBERGER et al. (2001) beschriebenen hohen E2-Gehalten in Eberfleisch. Für die Eintragsmenge in die Umwelt in Deutschland ist dies jedoch weniger bedeutend, da hier wenig Eber im Vergleich zu weiblichen und kastrierten (Mast-)Schweinen gehalten werden, sehr wohl aber in anderen Ländern wie z.B. Neuseeland. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass durch die landwirtschaftliche Tierhaltung beträchtliche Mengen an E2 in die Umwelt eingetragen werden können.

In der Regel wird der Dung aus der landwirtschaftlichen Tierproduktion entweder in Form von Mist, jedoch weit häufiger als Gülle auf die landwirtschaftlich genutzten Flächen ausgebracht. Da für die Ausbringungsmengen die Gehalte an Makronährstoffen, insbesondere Stickstoff (N), aber auch Phosphor (P) und Kalium (K), entscheidend sind,

wurden in einer Studie die Gehalte an E2 auf die in den unterschiedlichen Wirtschaftsdüngern enthaltenen Makronährstoffe N, P und K bezogen (Tabelle 2.4) (RAMAN 2004).

**Tabelle 2.4:** Verhältnisse von E2 zu den Makronährstoffen N, P und K aus der Untersuchung von RAMAN et al.(2004). Bereiche sind in ng E2 pro mg Makronährstoff angegeben.

<b>Wirtschaftsdünger</b>	<b>Tierart und Nutzungsform</b>	<b>E2/N</b> [ng mg <sup>-1</sup> ]	<b>E2/P</b> [ng mg <sup>-1</sup> ]	<b>E2/K</b> [ng mg <sup>-1</sup> ]
<b>Gülle</b>	Milchkühe	1,2 - 5,7	4,2 - 21	0,7 - 4,3
	Mastschweine	2,5 - 12	4,4 - 7,4	3,2 - 10
	Zuchtsauen	19 - 35	33 - 71	11 - 31
<b>Mist</b>	Milchkühe	2,0 - 7,9	1,2 - 21	2,7 - 42
	Mastschweine	3,3 - 8,7	6,3 - 13	6,1 - 12
	Zuchtsauen	5,5 - 28	18 - 132	9,2 - 42

In der oben aufgeführten Tabelle 2.4 sind die Bereiche angegeben, in denen sich in der Untersuchung von RAMAN et al. (2004) die Östrogen/Nährstoff-Verhältnisse befunden haben. Je größer das Verhältnis von Östrogen/Nährstoff, desto größer ist die Östrogen-Aufbringung auf die Flächen und damit das Umweltgefährdungspotential. Bei einer maximalen Ausbringungsmenge von 80 kg N pro Hektar in Form von Gülle oder Mist würden im günstigsten Falle bei Gülle von Milchkühen 96 mg E2 und im ungünstigsten Fall bei Gülle von Zuchtsauen 2,8 g E2 pro Hektar ausgebracht. Da in der Regel neben der Gülle auch mineralische Dünger eingesetzt werden, kann von geringeren E2-Eintragsmengen ausgegangen werden, die dennoch nicht zu vernachlässigen sind. Somit ist das Östrogen/Nährstoffverhältnis ein wichtiger Faktor bei der Einstufung der landwirtschaftlichen Wirtschaftsdünger bezüglich ihres Umweltgefährdungspotentials durch Östrogene.

### 2.2.2 Abbau- und Sorptionsprozesse

Ist E2 in die Umwelt gelangt, sind dort Sorptions- und Abbauprozesse für das Umweltgefährdungspotential entscheidend. Sind wenig Sorptionsmöglichkeiten für E2 vorhanden, kann die endokrine Wirksamkeit fast ausschließlich nur durch Abbau reduziert werden und eine höhere Belastung der Gewässer ist wahrscheinlich.

Die Sorptions- und Abbauprozesse in Kläranlagen, Güllelagern, Misthaufen, Gewässern und im Boden werden durch die chemischen und physikalischen Eigenschaften von E2 (siehe Tabelle 2.1) beeinflusst. Insbesondere für den Abbau treten vermehrt

Umweltfaktoren wie Temperatur, Matrix, vorhandene Mikroorganismenpopulationen, Lichtbedingungen, verfügbarer Wassergehalt des Bodens und die Sauerstoffverfügbarkeit in den Vordergrund (LARSSON 1999; LAYTON et al. 2000; COLUCCI et al. 2001; GRAY 2003; LEE et al. 2003; YING und KOOKANA 2003; YING et al. 2003; JACOBSEN et al. 2005; HEMMINGS und HARTEL 2006; SUZUKI und MARUYAMA 2006). Die Mineralisation von E2 erfolgt in mehreren Schritten, indem E2 zunächst zu E1 oxidiert und anschließend weiter mineralisiert wird. Für den Abbau von E2 in Böden und Kläranlagen spielen Mikroorganismen eine zentrale Rolle, da sie zum einen für die Dekonjugation der E2-Konjugate verantwortlich sind und zum anderen einen beträchtlichen Beitrag zur Mineralisation von E2 leisten. Für die Dekonjugation sind Mikroorganismen wie *Escherichia coli* und andere Bakterien verantwortlich, die Östrogen-Konjugate mit Hilfe von  $\beta$ -Glucuronidasen und Sulfatasen hydrolisieren und in die unkonjugierte Form zurück umwandeln (TERNES et al. 1999a; BARONTI et al. 2000; D'ASCENZO et al. 2003).

#### 2.2.2.1 Boden

Der Boden spielt für die Umweltgefährdung durch E2 eine zentrale Rolle, da er sowohl als Quelle als auch als Senke von E2 fungieren kann. Konzentration und Persistenz von E2 im Boden sind abhängig von seiner Wasserlöslichkeit, dem Abbau zu Metaboliten sowie seiner Stabilität gegenüber hydrolytischem und oxidativem mikrobiellen Abbau. Abbau- und Sorptionsprozesse finden gleichzeitig statt und beeinflussen sich gegenseitig. Im folgenden wird, speziell auf Böden ausgerichtet, zunächst auf den Abbau von E2 und im Anschluss daran auf die Sorptionsprozesse eingegangen.

Versuche mit sterilisierten Böden wurden durchgeführt, um den Anteil der Mikroorganismen an der Mineralisation von E2 zu untersuchen. JACOBSEN et al. (2005) kamen zu dem Ergebnis, dass die Oxidation von E2 zu E1 sowie der Abbau von E1 größtenteils mikrobiell geschieht. Eine andere Untersuchung mit sterilisierten und unsterilisierten Böden von COLUCCI et al. (2001) zeigte jedoch, dass trotz Sterilisation die Umsetzung von E2 zu E1 erfolgte und E1 akkumuliert wurde. COLUCCI et al. (2001) folgerten daraus, dass für die Umwandlung von E2 zu E1 nicht unbedingt Mikroorganismen vorhanden sein müssen, wohl aber für die vollständige Mineralisation von E1. HANSELMAN et al. (2003) weisen jedoch darauf hin, dass möglicherweise die Sterilisation bei COLUCCI et al. (2001) nicht ausreichend war bzw. die für die Transformation von E2 notwendigen Enzyme das Autoklavieren überstanden haben könnten. Falls das nicht der Fall war, könnte die Oxidation von E2 auch abiotisch erfolgt sein (HANSELMAN et al. 2003). Über die zentrale Bedeutung der Mikroorganismen beim Abbau von E2 sind sich die Autoren einig. Nach LANGE und MEYER (2002) ist jedoch die Aktivität der Mikroorganismen im Boden nicht

ausreichend für einen schnellen und kompletten Abbau und die Eliminierung der hormonellen Aktivität, so dass ein Umweltgefährdungspotential bestehen bleibt.

Der Eintrag von E2 in den Boden erfolgt meist durch organischen Dünger aus der Tierproduktion, der als solcher die Mineralisation von E2 im Boden maßgeblich beeinflussen kann. Je nach Dünger kann der Abbau von E2 gesteigert werden, indem die Nährstoffversorgung der Mikroorganismen verbessert und die Diversität der Bodenmikroorganismen erhöht wird. Eine Untersuchung von JACOBSEN et al. (2005) zeigte, dass die Transformation von E2 zu E1 in mit Schweinegülle gedüngtem Boden schneller verlief als im ungedüngten Boden. In dieser Studie wurden jedoch auch hemmende Wirkungen des Düngers auf den E2-Abbau genannt. Zum einen wird durch tierischen Dünger mehr organisches Material in den Boden gebracht, an dem E2 adsorbieren kann. Zum anderen kann ein Dünger mit hohem biologischem Sauerstoffbedarf zu Sauerstofflimitierung im Boden führen und somit die Mineralisationsfähigkeit im Boden reduzieren, da aerobe Bedingungen für eine schnelle Mineralisation notwendig sind (JACOBSEN et al. 2005). Ebenfalls negativ auf Mikroorganismen und damit auf den Abbau von E2 können sich toxische Stoffe wie z.B. Antibiotika auswirken. Dies bedeutet, dass die Mineralisation von E2 sowohl von den Einflussgrößen des Bodens und der Umwelt als auch von der Art und Zusammensetzung des Düngers abhängt. Besonders günstig sind die Bedingungen für die Mineralisation in gut belüfteten landwirtschaftlichen Böden nach der Applikation des tierischen Düngers während der Vegetationsphase bei warmen Temperaturen und ausreichender Feuchtigkeit. Zudem minimieren Düngeerausbringungsvarianten, die den Kontakt von E2 und Boden maximieren, den Eintrag von E2 über Oberflächenabfluss und Auswaschung in Gewässer (COLUCCI et al. 2001). Insgesamt tragen die genannten Faktoren, welche die Abbaurate von E2 erhöhen dazu bei, das umweltgefährdende Potential von E2 zu reduzieren.

Für die Sorption sind chemische und physikalische Eigenschaften sowohl des Sorbenten (Tabelle 2.1) als auch der zur Sorption zur Verfügung stehenden Materialien entscheidend. Verschiedene Studien haben das Sorptionsverhalten von E2 im Boden untersucht (SHORE et al. 1993; LAI et al. 2000; COLUCCI et al. 2001; CASEY et al. 2003; LEE et al. 2003; YING et al. 2003; CASEY et al. 2005; JACOBSEN et al. 2005). Als entscheidende Faktoren, die teilweise auch für die Sorptionsprozesse in Kläranlagen gelten können, werden von den Autoren genannt:

- die Bodenart und die damit verbundene Korngrößenverteilung,
- die Kationenaustauschkapazität (KAK),
- die spezifische Oberfläche<sup>6</sup>,

---

<sup>6</sup> angeben in  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$  Boden



- der Anteil an organischem Material (TOC<sup>7</sup> und DOC<sup>8</sup>),
- die Anzahl der Bindungsstellen,
- die hydrophobe Eigenschaft von E2 (log K<sub>ow</sub> 3,1 - 4,0),
- die Verdrängung durch andere (stärker hydrophobe) Substanzen aus der Bindung,
- der Salzgehalt im Boden und
- das Vorhandensein von phenolischen Gruppen, die für die Bindung an die organische Substanz des Bodens verantwortlich sind.

Bei Eintrag von Klärschlamm, Urin und Kot in den Boden kommt es dort zu einer Sorption von E2, durch welche der mikrobielle Abbau gehemmt werden kann (ZULLEI-SEIBERT und SKARK 2003; JACOBSEN et al. 2005). Nach starken Regenfällen spielt der Oberflächenabfluss insbesondere für die Oberflächengewässerbelastung eine entscheidende Rolle, da mit dem Boden beträchtliche Mengen an E2 aus dem tierischen Eintrag in die Oberflächengewässer abgeschwemmt werden können (FINLAY-MOORE et al. 2000; LEE et al. 2003; DORABAWILA und GUPTA 2005). Für den präferenziellen Fluss sind ebenfalls Niederschlagsmenge und -stärke sowie das Vorhandensein und die Verteilung von Makroporen und Trockenrissen entscheidend (ZULLEI-SEIBERT und SKARK 2003).

#### 2.2.2.2 Kläranlagen

Über den Zulauf aus kommunalen Abwässern gelangen größere Mengen E2 in die Kläranlagen. Zusätzlich zu den Faktoren, die den Abbau im Boden beeinflussen, bestimmen hier kläranlagenspezifische Faktoren die Abbaueffizienz. Dazu gehören die Ausstattung der Anlage (Anzahl und Art der Reinigungsstufen) und die Verweildauer des Abwassers, insbesondere im Belebtschlammbecken (sog. „Schlammalter“). Nicht abgebaute Hormonrückstände in Kläranlagenabläufen tragen entscheidend zur Freisetzung von E2 in die Umwelt bei.

Zum Verbleib von Hormonen in Kläranlagen und den dort stattfindenden Abbau- und Sorptionsprozessen wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse einiger Studien werden in den folgenden Abschnitten dargestellt. Bei der Interpretation dieser Studien ist es wichtig zu beachten, dass sowohl die Methode der Probenahme als auch die Analysenmethode die Ergebnisse beeinflussen. Auch hohe Dotierungen von Proben mit E2 in Laborversuchen können das Bild der tatsächlichen Verhältnisse in einer Kläranlage verfälschen. Sorptionsprozesse erschweren zusätzlich die Interpretation von Versuchen zum Abbau, ebenso Unterschiede in der Temperatur (JOHNSON und SUMPTER

---

<sup>7</sup> TOC (engl.: total organic carbon) = gesamter organischer Kohlenstoff

<sup>8</sup> DOC (engl.: dissolved organic carbon) = gelöster organischer Kohlenstoff

2001). Diese Faktoren können die unterschiedlichen Ergebnisse in den verschiedenen Studien erklären.

Die ersten Abbau- und Sorptionsprozesse sowie die Dekonjugation der E2-Konjugate durch Bakterien im Abwasser finden, wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben, bereits auf dem Weg in die Kläranlage statt (TERNES et al. 1999a; BARONTI et al. 2000; D'ASCENZO et al. 2003; JOHNSON und WILLIAMS 2004).

Es wird angenommen, dass in der Kläranlage die restlichen Konjugate im ersten Denitrifikationsbehälter dekonjugiert werden, welches durch die im dortigen Klärschlamm gefundene  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität bestätigt wurde (Ternes et al. 1999a; ANDERSEN et al. 2003). Dies kann den Anstieg der E2-Gehalte in den ersten Klärschritten im Vergleich zu den im Zulauf gefundenen Gehalten erklären (TERNES et al. 1999b; MATSUI et al. 2000; NASU et al. 2001; HOLBROOK et al. 2002). Daher kann von einer vollständigen Dekonjugation während des Klärprozesses ausgegangen werden. Bestätigt wird diese Annahme durch Ergebnisse von BELFROID et al. (1999), die in Kläranlagenabläufen keine E2-Konjugate mehr fanden sowie durch einen Modellversuch, bei dem die E2-3-Glucuronide komplett zu E2 abgebaut wurden (PANTER et al. 1999).

Nach Untersuchungen von MATSUI et al. (2003) und ANDERSEN et al. (2003) erfolgt auch der Abbau von E2 größtenteils biologisch in den Denitrifizierungs- und Nitrifizierungsbehältern mit Belebtschlamm. Die hohe Eliminationsrate von E1 und E2 unter denitrifizierenden Bedingungen ist besonders hinsichtlich der Optimierung der Kläranlageneffizienz von Bedeutung.

Für die Erfassung von E2-Massenflüssen in Kläranlagen ist es notwendig, auch die im Klärschlamm sorbierten Mengen an E2 zu bestimmen. ANDERSEN et al. (2003) stellten fest, dass im Klärschlamm der Denitrifikations- und der Nitrifikationsbecken kontinuierliche Mengen unterhalb von  $5 \text{ ng L}^{-1}$  sorbiert waren, obwohl die Konzentration des gelösten E2 bis unter die Nachweisgrenze reduziert wurde. Daher gingen sie davon aus, dass die Sorptionskinetik von E2 langsam verläuft und kein Gleichgewicht zwischen den sorbierten und gelösten Östrogenen vorliegt (ANDERSEN et al. 2003). In einem „Batch-Experiment“ im Labor mit Belebtschlamm aus einer Kläranlage wurde der Abbau und das Sorptionsverhalten von E2 untersucht (SUZUKI und MARUYAMA 2006). Dabei enthielt der im Versuch eingesetzte Klärschlamm mit unter  $5 \text{ ng L}^{-1}$  an E2 ähnliche Konzentrationen wie der Klärschlamm in der von ANDERSEN et al. (2003) untersuchten Kläranlage. Im Laborexperiment wurde jedoch festgestellt, dass nach Zugabe einer E2-Lösung der E2-Gehalt in den Feststoffen schnell anstieg, aber nach kurzer Zeit wieder im Bereich der E2-Ausgangskonzentration des Belebtschlammes lag (SUZUKI und MARUYAMA 2006). Daher gehen die Autoren davon aus, dass unter diesen Versuchsbedingungen (kleine Mengen, gute Durchmischung) die Adsorption an den Belebtschlamm sehr schnell verlief und die

zusätzlich adsorbierte Menge an E2 innerhalb kurzer Zeit mikrobiell abgebaut wurde. Diese Ergebnisse zusammen mit den Ergebnissen von ANDERSEN et al. (2003) lassen vermuten, dass der Klärschlamm ein bestimmtes E2-Adsorptionspotential hat, welches bei Sättigung zu konstanten E2-Konzentrationen im Klärschlamm führt.

Betrachtet man den gesamten Klärprozess, so liegen an seinem Ende im Klärschlamm nur ca. 5 % der anfänglich vorhandenen Östrogene in sorbierter Form vor (ANDERSEN et al. 2003). Dieses Ergebnis wird durch eine Untersuchung der täglichen östrogenwirksamen Frachten im Klärschlamm und im Abwasser bestätigt, bei der nur 2 - 14 % der E2-Äquivalente (mit dem YES-Assay<sup>9</sup> gemessen) aus dem Zulauf im Klärschlamm wiedergefunden wurden (HOLBROOK et al. 2002).

Ebenso wie im Boden würden die physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere der  $\log K_{ow}$  und das Vorhandensein einer phenolischen Gruppe, eine größere Adsorption von E2 an Klärschlamm vermuten lassen. Dies ist jedoch nicht aus den oben genannten Ergebnissen ersichtlich. Hierfür sind verschiedene Erklärungen möglich. Untersuchungen zum Sorptionsverhalten von E2 in Böden und Sedimenten wurden mit E2-Konzentrationen im Bereich von 10-1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  und Inkubationszeiten teilweise länger als 24 h durchgeführt (LAI et al. 2000; CASEY et al. 2003). Diese Bedingungen sind nicht mit denen in einer Kläranlage vergleichbar, weil dort die Retentionszeiten oft nur bis zu 24 h dauern und die vorherrschenden E2-Konzentrationen meist im  $\text{ng L}^{-1}$  Bereich liegen. Es ist also durchaus möglich, dass der  $\log K_{ow}$  nicht die Situation bei niedrigen E2-Konzentrationen unter 50  $\text{ng L}^{-1}$  reflektiert. Daher wäre es notwendig, die Sorptionsisothermen gerade im niedrigen Konzentrationsbereich noch genauer zu untersuchen (FÜRHACKER et al. 1999; HOLBROOK et al. 2002). Ein weiterer Aspekt hinsichtlich der Vergleichbarkeit von Sorption in Böden und in Kläranlagen sind die Matrixunterschiede zwischen beiden. Wie schon von LAI et al. (2003) untersucht wurde, ist es möglich, dass stärker hydrophobe Substanzen E2 von den Bindungsstellen im Klärschlamm verdrängen. Es kann auch sein, dass E2 im Klärschlamm sorbiert, aber in einer nicht extrahierbaren Form vorliegt (HOLBROOK et al. 2002).

Ursache für die, gemessen an der Ausgangskonzentration, geringen Anteile von E2 im Klärschlamm können neben einem möglicherweise dauerhaft begrenzten Adsorptionspotential des Klärschlammes, der relativ schnelle mikrobielle Abbau in der flüssigen Phase der Kläranlagen, insbesondere in den Denitrifikationsbecken sein. Die Wichtigkeit des mikrobiellen Abbaus von E2 in der Abwasserreinigung zeigten die oben erwähnten „Batch-Experimente“ von SUZUKI und MARUYAMA (2006), die den Abbau von E2 unter Einsatz von sterilisiertem und nicht-sterilisiertem Belebtschlamm miteinander

---

<sup>9</sup> YES = yeast estrogen screen. Bei diesem Verfahren wird das östrogene Potential in der Probe bestimmt und in E2-Äquivalenten angegeben.

verglichen. Sie zeigen, dass bei sterilisiertem Belebtschlamm zwar ähnliche Adsorptionsprozesse (siehe oben), jedoch keine Abbauprozesse stattfanden. Der mikrobielle Abbau in den nicht-sterilisierten Proben verlief so schnell, dass innerhalb weniger Stunden die E2-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze lagen und damit die Wichtigkeit der Mikroorganismen für den E2-Abbau bestätigt wurde.

Die Eliminierungsraten von E2 in Kläranlagen werden maßgeblich von Temperatur und Niederschlagsereignissen beeinflusst, da beide Faktoren auf die mikrobielle Aktivität bzw. die Ausgangskonzentration des Abwassers einwirken (TERNES 1998; TERNES et al. 1999b; SUZUKI und MARUYAMA 2006). TERNES et al. (1999a) stellten in einem weiteren „Batch-Experiment“ mit Klärschlamm fest, dass die Umsatzrate von E2 zu E1 bei einer E2-Konzentration von  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  höher war als bei einer E2-Konzentration von  $1 \text{mg L}^{-1}$ . Sowohl Dekonjugation als auch Abbauprozesse fanden bei geringeren Konzentrationen schneller statt als bei höheren (TERNES et al. 1999a). Bei  $20^\circ\text{C}$  wurde für die Oxidation von E2 zu E1 eine Halbwertszeit von 0,2 h ermittelt. Die Mineralisation von E1 hatte jedoch eine deutlich längere Halbwertszeit von mehr als 1,5 h (TERNES et al. 1999a). Auch die besseren Eliminierungsraten von E2 im Vergleich zu E1 in Kläranlagen unterstützen die These, dass der Abbau von E2 deutlich schneller abläuft als der von E1 (TERNES et al. 1999b). Die Umwandlung von E2 zu E1 sowie der langsamere Abbau von E1 können die höheren E1-Konzentrationen in Kläranlagenabläufen erklären (BELFROID et al. 1999; BARONTI et al. 2000; ANDERSEN et al. 2003). In Tabelle 2.5 sind die Eliminierungsraten von E2 in Kläranlagen verschiedener Länder aus der Literatur zusammen gestellt.

**Tabelle 2.5:** Eliminierungsrate von  $17\beta$ -Östradiol in Kläranlagen verschiedener Länder.

Land	E2-Eliminationsrate [%]	Literaturquelle
Deutschland (n=1)	98	(ANDERSEN et al. 2003)
Italien (n=30)	$87 \pm 9$	(BARONTI et al. 2000)
Canada (n=6)	99	(LEE und PEART 1998)
Japan (n=27)	67	(NASU et al. 2001)
Brasilien (n=2)	> 92	(TERNES et al. 1999b)
Europa (n=8)	$88 \pm 13$	(JOHNSON et al. 2000)

Der Wirkungsgrad von Kläranlagen bezüglich der E2-Eliminierung wird durch verschiedene Faktoren wie hydraulische Retentionszeit (HRT), Retentionszeit des Klärschlammes (SRT), Temperatur, Niederschlagsereignisse, Denitrifikation, Nitrifikation und Phosphateliminierung beeinflusst (JOHNSON und SUMPTER 2001). Im einzelnen hat sich in verschiedenen Studien folgendes gezeigt:

- In einer Kläranlage mit Phosphat-Eliminierung wurde durch Zugabe von  $\text{FeCl}_2$  der Gehalt an E2 im Klärschlamm reduziert (TERNES et al. 2002).
- Der Einfluss der SRT auf die östrogene Aktivität (E2-Äquivalent) des Kläranlagenablaufs war groß, da sie das Sorptionspotential beeinflusste (HOLBROOK et al. 2002).
- Im Ablauf wurden die geringsten E2-Gehalte bei Anlagen mit längerer HRT und SRT gefunden und höhere Östrogen-Gehalte bei Anlagen mit kürzerer SRT<sup>10</sup> (JOHNSON und SUMPTER 2001; SERVOS et al. 2005).
- Nitrifikation und Denitrifikation erhöhten die Hormon-Eliminierung (JOSS et al. 2004; SERVOS et al. 2005). Ein zweites Denitrifikationsbecken konnte die Eliminierung auf 98 % verbessern (ANDERSEN et al. 2003).
- Kläranlagen mit Membranfiltration waren tendenziell effektiver bei der Reduktion der E2-Äquivalente als ohne (HOLBROOK et al. 2002).
- Unterschiedliche Ergebnisse wurden zu der Effizienz von Aktivkohle bezüglich der Eliminierung der östrogenen Aktivität aus der flüssigen Phase gefunden (KÖRNER et al. 2001; HOLBROOK et al. 2002; METZGER et al. 2003).
- Belebtschlammverfahren lieferten bessere Ergebnisse als der Einsatz von Tropfkörpern (METZGER et al. 2003; SERVOS et al. 2005).
- Die Zusammensetzung des Abwassers, bzw. die Anpassung der Mikroorganismen an das Abwasser, war entscheidend für die Effizienz der Kläranlage. In einem Versuch mit Klärschlamm aus einer kommunalen Kläranlage konnten 84 % von E2 eliminiert werden, mit Klärschlamm aus einer industriell genutzten Kläranlage nur 4 % (LAYTON et al. 2000).

Betrachtet man die täglichen E2 Frachten, welche die Kläranlage verlassen, liegen die gemessenen E2 Mengen in den Feststoffen mit ca.  $120 \text{ mg d}^{-1}$  deutlich über denen des flüssigen Anteils des Ablaufs ( $< 3 \text{ mg d}^{-1}$ ) (ANDERSEN et al. 2003). Ebenso waren die E2-Konzentrationen im gereinigten Abwasser geringer als im Klärschlamm wie bereits in anderen Studien festgestellt (DAUGHTON und TERNES 1999). Damit können Klärschlämme bei ihrer Ausbringung auf landwirtschaftlich genutzte Flächen eine potentielle Kontaminationsquelle für Böden und damit auch für Gewässer bedeuten (TERNES et al. 2002).

Fasst man die Ergebnisse der vorliegenden Studien zusammen, gelingt eine vollständige Entfernung aller Östrogene in den Kläranlagen nur in Ausnahmen. Dabei kann das

---

<sup>10</sup> Es konnte keine signifikante Korrelation ( $R^2 > 0,53$ ) zwischen SRT oder HRT und der E2-Eliminierung gefunden werden. Erklärbar ist dieses Phänomen möglicherweise damit, dass die vielen Faktoren, inklusive Kläranlagenzufluss und Kläranlagencharakteristika, die Wichtigkeit dieser Parameter maskieren (Servos et al. 2005).

Belebtschlammverfahren in den Kläranlagen große Anteile an E2 aus dem Wasser entfernen, dennoch stellen Kläranlagenabläufe den Haupteintragsweg von E2 in die Oberflächengewässer dar.

Die Behandlung mit Aktivkohle und Ozon sowie UV-Bestrahlung und Membranfiltration sind mögliche Verfahren, um die Effizienz der E2-Eliminierung in der Kläranlage zu steigern. Diese Methoden sind jedoch sehr teuer, so dass zunächst ein besseres Verständnis über das Schicksal von Östrogenen im Abwasser helfen soll, das Management in einer Kläranlage zu verbessern hin zu einer besseren Eliminierung von Östrogenen im Abwasser (ANDERSEN et al. 2003). Das Fazit aus den vorliegenden Untersuchungen ist, dass Maßnahmen notwendig sind, die den Abbau von E2 steigern, um die Belastung der Umwelt mit Östrogenen aus den Kläranlagen zu minimieren. Vorgehensweisen dafür könnten sein: das Verlängern von SRT und HRT, die Installation eines weiteren Denitrifikationsbeckens, die Einführung der Phosphatelimination oder der Einsatz effektiverer Mikroorganismen-Populationen, die dem Belebtschlamm zugesetzt werden können.

### 2.2.3 Auswirkungen auf die Umwelt

E2 kommt in der Umwelt gemeinsam mit anderen EDCs vor. Die toxikologischen Auswirkungen werden somit durch die Kombination der EDCs im Zusammenspiel mit vielfältigen Umweltbedingungen bestimmt.

Seit vielen Jahren sind Störungen der Reproduktion und Entwicklung im Tierreich durch endokrin wirksame Substanzen beobachtet und im Laborversuch bestätigt worden. Negative Auswirkungen wurden bei verschiedenen Wildtieren (Fischen, Vögeln, Reptilien und Schnecken) festgestellt. Von den Effekten sind in erster Linie Wirbel- und Weichtiere betroffen, deren Hormonsysteme sich ähnlich sind. Die Belastung mit Östrogenen im Wasserkreislauf ist von besonderer Bedeutung, da bei im Wasser lebenden Tieren (Fische, Schildkröten, Frösche, etc.) schon Konzentrationen im unteren  $\text{ng L}^{-1}$  Bereich zur Störung des Hormonsystems führen können (siehe unten). Östrogene, die über das sehr empfindliche Hormonsystem gesteuert werden, spielen auch bei Fischen während der Entwicklung und sexuellen Differenzierung eine wichtige Rolle. Aquatische Lebewesen sind der Gewässerbelastung kontinuierlich ausgesetzt, so dass bereits bei geringer Belastung durch permanente Kontamination eine hohe Wirksamkeit zu erwarten ist. Besondere Gefährdung der Lebewesen besteht, wenn der Abbau der EDCs z.B. durch niedrige Temperaturen reduziert ist und die Verdünnung der Kläranlagenabläufe in den Flüssen oder Seen wegen Wassermangels zu gering ist (JOBILING et al. 1998; JOHNSON

und SUMPTER 2001). Daher ist insbesondere in ariden Gebieten die Gefahr der Kontamination von Gewässern und Böden mit E2 hoch (GRAY 2003). Hinzu kommt, dass die Abwasserreinigung in diesen Regionen oft sehr schlecht oder gar nicht vorhanden ist und bei wachsender Bevölkerungsdichte in diesen Gebieten das Umweltgefährdungspotential stark ansteigt.

In der Umwelt ist nur selten ein eindeutiger kausaler Zusammenhang zwischen einer einzelnen Substanz und deren Wirkung herstellbar, da in Umweltmedien im allgemeinen eine Vielzahl endokrin wirksamer Substanzen gleichzeitig vorkommen und über additive, synergistische und antagonistische Effekte nur wenig bekannt ist (JOBILING et al. 1998; THORPE et al. 2001). Daher wurden in Laborversuchen sowohl einzelne Substanzen als auch Gemische aus endokrin wirksamen Substanzen auf ihre Auswirkung auf verschiedene Organismen untersucht (ROUTLEDGE et al. 1998; THORPE et al. 2001).

Untersuchungen mit Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), Rotaugen (*Rutilus rutilus*) und anderen Fischarten in Gewässern sowie in Laborversuchen zeigten, dass schon ab einer E2-Konzentration zwischen 1 und 10 ng L<sup>-1</sup> eine erhöhte Vitellogeninproduktion<sup>11</sup> in männlichen Fischen festzustellen war. Weitere Auswirkungen östrogenwirksamer Substanzen waren gestörte sexuelle Differenzierung und Entwicklung bis hin zu Intersex<sup>12</sup>, verbunden mit reduziertem Hodenwachstum und fehlendem Samenleiter (PURDOM et al. 1994; JOBILING et al. 1998; ROUTLEDGE et al. 1998; PANTER et al. 2000; THORPE et al. 2001; ROSE et al. 2002; THORPE et al. 2003). Inzwischen ist die Vitellogeninkonzentration in Fischen als Biomarker für östrogenwirksame Substanzen akzeptiert (JOBILING et al. 1998).

Der Einfluss der in den Wasserkreislauf gelangenden EDCs ist abhängig vom untersuchten Organismus und seiner Lebens- und Ernährungsweise. Zum Beispiel können für einen in der Flussmitte lebenden Fisch wie das Rotaugen erhöhte Konzentrationen im Wasser kritisch sein, also eher wasserlösliche EDCs. Für die sedimentnahen oder im Sediment lebenden Tiere (z.B. Schnecken) sind vermehrt die im Sediment vorhandenen EDCs und ihre Persistenz entscheidend. In diesem Fall haben die hydrophoben Substanzen das größere Gefährdungspotential (JOHNSON und SUMPTER 2001).

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Einbeziehung nicht nur der vorhandenen Konzentration, sondern auch der Zeitspanne, in welcher der Fisch der Belastung ausgesetzt ist. Untersuchungen zu Langzeitbelastungen mit EDC-haltigem Wasser aus einem Kläranlagenablauf haben gezeigt, dass die Vitellogeninproduktion sowohl von der Konzentration als auch von ihrer Dauer abhängig ist. Im Vergleich zu einem Belastungszeitraum von einem Monat reduzierte sich die Wirkschwelle bei einer viermonatigen

---

<sup>11</sup> Vitellogenin ist ein weibliches Eidotterprotein von Fischen, das in der Leber in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Östradiol gebildet wird.

<sup>12</sup> Intersex ist definiert als das gleichzeitige Vorhandensein von männlichen und weiblichen Sexualorganen.

Belastung um ca. ein Viertel (RODGERS-GRAY et al. 2001). Das ist besonders im Hinblick auf die Pseudopersistenz<sup>13</sup> von Östrogenen im Wasser von Bedeutung (SUMPTER und JOHNSON 2005).

Andere Wildtiere sind ebenfalls von dem Eintrag endokrin wirksamer Stoffe in die Umwelt beeinträchtigt. So wurde in verschiedenen Studien festgestellt, dass:

- androgenwirksame Organozinnverbindungen wie TBT<sup>14</sup> Imposex<sup>15</sup> und Intersex inklusive Vermännlichungsphänomene bei weiblichen Vorderkiemenschnecken verursachten (OEHLMANN et al. 1996; DUFT et al. 2003; HAGGER et al. 2006),
- umweltrelevante Konzentrationen von E2 bei Muscheln den Stoffwechsel und die Reifung der Gameten<sup>16</sup> beeinträchtigen können (JANER et al. 2006),
- xenobiotische EDCs bei Vögeln zu erhöhter Sterblichkeit, zu dünnen Eierschalen und zu Unfruchtbarkeit und Verhaltensstörungen bei der Aufzucht von Nachwuchs führen können (FRY 1995; OTTINGER et al. 2005),
- die Alligatorenpopulation im Apopka-See in Florida, wo nach einem DDT-Unfall Verkrüppelungen der Reproduktionsorgane auftraten, stark reduziert war (GUILLETTE et al. 1994),
- bei Schildkröten auch schon bei sehr geringen Mengen ( $< 1 \text{ ng L}^{-1}$ ) exogenen 17 $\beta$ -Östradiols eine Beeinträchtigung der Geschlechtsdifferenzierung hervorgerufen werden konnte (SHEEHAN et al. 1999; WILLINGHAM und CREWS 2000),
- beim Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) nach Behandlung mit E2 im frühen Entwicklungsstadium die Verweiblichung der Versuchstiere festgestellt wurde (BOGI et al. 2002),
- in Laborversuchen die Bioakkumulation von radioaktiv markiertem 17 $\alpha$ -Ethinyl-östradiol in aquatischen Oligochaeten (*Lumbricus variegatus*) nachgewiesen werden konnte (LIEBIG et al. 2005).

Auch bei landwirtschaftlichen Nutztieren kann es durch östrogenwirksame EDCs zu negativen Auswirkungen insbesondere auf die Reproduktionsfähigkeit kommen, die in der Landwirtschaft von großer Bedeutung ist. Es gibt einige Hinweise, dass nach dem Füttern von Tierkot an andere Tiere auf Grund von Östrogenen Störungen im Hormonsystem auftraten. Schon 1969 wurden Fehlgeburten bei Rindern, die mit Kot von mit Dienöstroldiacetat-haltigem Futter ernährtem Geflügel gefüttert wurden, beobachtet (GRIEL

---

<sup>13</sup> Pseudopersistenz bedeutet hier, dass durch die regelmäßige Zufuhr an Östrogenen durch Kläranlagenabläufe die stattfindenden Abbau und Sorptionsprozesse ausgeglichen werden und so eine relativ gleichbleibende Konzentration vorliegt.

<sup>14</sup> TBT = Tributylzinn, wurde als Schutzanstrich für Schiffe verwendet.

<sup>15</sup> Imposex bedeutet, dass männliche Sexualorgane übergroß in weiblichen Tieren ausgeprägt sind (in diesem Fall die Ausprägung eines übergroßen Penis in weiblichen Gastropoden).

<sup>16</sup> Keimzellen



et al. 1969). Shore et al. (1998) fanden heraus, dass Geflügelkotsilage<sup>17</sup> im Futter mit mehr als  $300 \mu\text{g kg}^{-1}$  Östrogenen bei nichtträchtigen Färsen<sup>18</sup> zu Hyperöstrogenismus und verspäteter sexuellen Reife führte (SHORE et al. 1998). Ebenso können durch die Fütterung von Leguminosen, welche mit östrogenhaltigem Wasser beregnet wurden und bei denen infolgedessen die Produktion von Phytoöstrogenen sehr hoch war, bei Rindern Probleme bei deren Reproduktion entstehen (SHORE und SHEMESH 2003).

Für den Menschen wurden durch das Expertenkomitee für Lebensmittelzusätze (Expert Committee on Food Additives: JECFA) der FAO und WHO die akzeptierte tägliche Aufnahme für E2 auf  $0,0 - 0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$  Körpergewicht festgelegt (JECFA 1999)<sup>19</sup>. Über den Verzehr von Fleisch, Milch und Milchprodukten nimmt der Mensch Östrogene zu sich. Zu den E2-Konzentrationen in Milch und Fleisch werden in der Literatur verschiedene Angaben gemacht. In Milch mit unterschiedlichen Fettgehalten und von Kühen in verschiedenen Laktationsphasen wurden E2-Konzentrationen zwischen  $5,6$  und  $51 \text{ ng l}^{-1}$  gefunden (MALEKINEJAD et al. 2006). Da Milch in Molkereien von vielen Kühen in unterschiedlichen Phasen ihrer Trächtigkeit gemischt wird, gehen Daxenberger et al. (2001) bei entrahmter Milch von einem Gehalt von ca.  $17,5 \text{ pg g}^{-1}$  Gesamt-E2 (freies und konjugiertes) aus. Durchschnittliche E2-Konzentrationen in Käse liegen je nach Art zwischen  $11$  und  $25 \text{ pg g}^{-1}$  und für Butter bei  $82 \text{ pg g}^{-1}$ , während die Gehalte an E2 im Rindfleisch in der Regel zwischen  $5$  und  $15 \text{ pg g}^{-1}$  und bei Schweinefleisch zwischen  $29$  und  $60 \text{ pg g}^{-1}$  liegen (HENRICKS et al. 1983; HOFFMANN und EVERS 1986; CLAUS et al. 1989; DAXENBERGER et al. 2001). Bei der oralen Aufnahme von Östrogenen kann jedoch davon ausgegangen werden, dass diese größtenteils metabolisiert werden, bevor sie die Zielorgane, wie z.B. die Keimdrüsen, erreichen, wodurch das Risikopotential stark reduziert wird (JOHNSON und SUMPTER 2001).

Kinder vor der Pubertät sind besonders empfindlich bezüglich der Hormonaufnahme durch die Nahrung, da die Fähigkeit des Körpers Hormone abzubauen deutlich geringer ist als bei Erwachsenen (ANDERSSON und SKAKKEBAEK 1999).

E2 wird generell als karzinogen und mutagen eingestuft (Service 1998; Liehr 2000; U.S. Department of Health and Human Services 2005). Da E2 jedoch natürlicherweise in sehr unterschiedlichen Mengen, abhängig vom Alter, Geschlecht und weiblichen Zyklus im Menschen gebildet wird, ist es schwierig zu definieren, ab welcher zusätzlichen Aufnahme über Lebensmittel oder Medikamente E2 tatsächlich humantoxikologisch relevant ist. Es besteht jedoch die Vermutung, dass der Rückgang der reproduktiven Gesundheit bei Männern und der Anstieg von Brust- und Hodenkrebs möglicherweise mit der weiten Verbreitung endokriner Disruptoren zusammen hängen kann.

---

<sup>17</sup> Getreide oder Maispflanzen werden zusammen mit Geflügelkot siliert.

<sup>18</sup> Noch nicht trächtig gewesenes, aber fortpflanzungsfähiges Rind.

<sup>19</sup> Das bedeutet, dass ein Mensch von  $80 \text{ kg}$  Körpergewicht bis zu  $4 \mu\text{g}$  E2 aufnehmen dürfte.

Seit Anfang der 90er Jahre besteht der Verdacht, dass Störungen der männlichen Fruchtbarkeit, wie z.B. der Rückgang der Spermamenge und Spermindichte sowie der Anstieg an Hodenkrebs, durch die Aufnahme von östrogenaktiven Substanzen über die Nahrung und das Trinkwasser verursacht werden. SHARPE und SKAKKEBAEK (1993) berichten, dass sich Störungen bei männlichen Reproduktionsorganen in den letzten Jahrzehnten verdoppelt haben, während sich die Spermindichte um die Hälfte reduziert hat. Seitdem die Frage, ob diese Störungen durch endokrine Disruptoren hervorgerufen werden können, wissenschaftlich und öffentlich diskutiert wird, haben sich einige Thesen bestätigt, andere Zusammenhänge konnten nicht nachgewiesen werden. Dabei ist die Qualität der zur Verfügung stehenden Daten, neben den Lücken beim Verständnis des Hormonsystems, ein Problem (FISCH und GOLDEN 2003; SHARPE und SKAKKEBAEK 2003). Von verschiedenen Forschern wird das sogenannten „Testicular Dysgenesis Syndrom“ (TDS)<sup>20</sup> für die Reduzierung der männlichen Fruchtbarkeit verantwortlich gemacht. Neben genetischen Defekten und der Lebensweise der Mutter gehören auch EDCs und die körpereigenen Östrogene der Mutter zu den Faktoren, die auf den Fötus im Mutterleib wirken und zum Auftreten von TDS führen können (SHARPE und SKAKKEBAEK 2003; ASKLUND et al. 2004; BAY et al. 2006). Wegen der Komplexität dieser Zusammenhänge kann für EDCs keine eindeutige Ursache-Wirkungsbeziehung aufgestellt werden, auch wenn sie mit hoher Wahrscheinlichkeit im Zusammenspiel mit anderen Faktoren zu den genannten Effekten beitragen.

#### 2.2.4 Vorkommen in der aquatischen Umwelt

In diesem Abschnitt werden zur Einschätzung des von E2 ausgehenden Umweltgefährdungspotentials in der Literatur gefundene Angaben zu E2-Konzentrationen in Kläranlagenzuläufen und –abläufen sowie zu E2-Gehalten in Oberflächengewässer aufgeführt (Tabelle 2.6 und Tabelle 2.7).

Wie bereits in Kapitel 2.2.2.2 erwähnt, müssen bei der Interpretation der Daten die verschiedenen Bedingungen bezüglich Kläranlage, Klima, Methode der Probenahme und Analyse berücksichtigt werden. Diese Faktoren gemeinsam bedingen die Variabilität der Ergebnisse. Daher können die unten gezeigten Tabellen nur einen Überblick über einige der bisher gefundenen Ergebnisse geben.

---

<sup>20</sup> Die Hypothese zum „Testicular Dysgenesis Syndrome“ (TDS) besagt, dass es durch gestörte prenatale Entwicklung der Hoden zu den vier Symptomen Kryptorchismus, Hypospadie, reduzierte Qualität des Sperma und Hodenkrebs kommen kann (SHARPE und SKAKKEBAEK. 2003).

**Tabelle 2.6:** Gemessene E2-Gehalte in verschiedenen Oberflächengewässern weltweit. Dargestellt sind Mittelwerte bzw. Konzentrationsbereiche. Die Kennzeichnung "a" bedeutet, dass die Probenahmestelle im Einflussbereich eines Kläranlagenablaufs liegt, "b" bedeutet, dass es sich um Quellwasser eines Karstgebietes handelt.

Land (Anzahl Gewässer)	E2 [ng L <sup>-1</sup> ]	Literaturquelle
Deutschland (15)	< 0,5	(TERNES et al. 1999b)
Deutschland (1) <sup>a</sup>	3,9	(PAWLOWSKI et al. 2004)
Frankreich (4)	1,4	(CARGOUET et al. 2004)
Frankreich (3) <sup>a</sup>	3,1	(CARGOUET et al. 2004)
USA (139)	9	(KOLPIN et al. 2002)
USA (5) <sup>b</sup>	6 - 66	(PETERSON et al. 2000)
USA (8) <sup>b</sup>	13 - 80	(WICKS et al. 2004)

**Tabelle 2.7:** Gemessene E2-Gehalte in verschiedenen Kläranlagenzuläufen und -abläufen. Dargestellt sind Mittelwerte bzw. Mediane. Wenn von den Autoren angegeben, wird der Bereich der Ergebnisse in Klammern angegeben, (k.A. bedeutet, dass keine Angaben vorliegen).

Land (Anzahl Kläranlagen)	Zulauf [ng L <sup>-1</sup> ]	Ablauf [ng L <sup>-1</sup> ]	Eliminierung [%]	Literaturquelle
Brasilien (1)	21	k.A.	>92	(TERNES et al. 1999b)
Deutschland (1)	16 (12 - 20)	<1	>98	(ANDERSEN et al. 2003)
Deutschland (1)	15	k.A.	64	(TERNES et al. 1999b)
Deutschland (1)	k.A.	(1 - 13)	k.A.	(KUCH und BALLSCHMITER 2000)
Deutschland (16)	k.A.	<1	k.A.	(TERNES et al. 1999b)
Deutschland (2)	k.A.	(1 - 5,6)	k.A.	(PAWLOWSKI et al. 2004)
Frankreich (4)	14,4	6,7	53	(CARGOUET et al. 2004)
Großbritannien (7)	k.A.	(1 - 49)	k.A.	(DESBROW et al. 1998)
Italien (6)	12	1,4	87	(BARONTI et al. 2000)
Italien (6)	11	1,9	85	(D'ASCENZO et al. 2003)
Japan (1)	36	4	89	(MATSUI et al. 2000)
Japan, Herbst (27)	42	13	69	(NASU et al. 2001)
Japan, Winter (27)	47	14	64	(NASU et al. 2001)
Kanada (10)	k.A.	6	k.A.	(TERNES et al. 1999b)
Kanada (18)	16 (2,4 - 26)	1,8 (0,2 - 15)	>75%	(SERVOS et al. 2005)

## 2.3 Immunoassays

Die Analyse mit Immunoassays basiert auf der Antigen-Antikörper-Erkennung. Ihre Entwicklung begann Anfang des 20. Jahrhunderts, nachdem Paul Ehrlich 1900 den Grundstein für die Entwicklung von Immunoassays mit seiner Seitenkettentheorie legte. Dabei wies er die Existenz von Zelloberflächenrezeptoren nach, die, einmal ins Blut abgegeben, Bakterientoxine neutralisieren können. 1907 führte Arrhenius erste Arbeiten zur quantitativen Immunchemie durch. In den 20er Jahren prägte Landsteiner den Begriff der Haptene<sup>21</sup> und begann die ersten Versuche mit synthetischen Hapten-Konjugaten. Yalow und Berson entwickelten 1959 in den USA den ersten Radioimmunoassay, wofür Rosalyn Yalow 1977 den Nobelpreis erhielt. 1960 formulierte Ekins die Theorie der Bindungstests, die erstmalig quantitative Beschreibungen der Assays ermöglichte. Es folgte mit Einführung des „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) durch Engvall und Perlmann 1971 der erste Test, der die radioaktive Detektion durch eine photometrische Messung ersetzte (ARRHENIUS 1907; LANDSTEINER 1933; YALOW und BERSON 1959; EKINS 1960; ENGVALL und PERLMANN 1971).

### 2.3.1 Testsysteme

Das Grundprinzip von Immunoassays besteht in der „Erkennung“ eines Analyten in einer flüssigen Phase durch die Bindung an einen Antikörper. Zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung ist in Immunoassays der Einsatz von markierten Reagenzien (Antikörper oder Analyt) notwendig. Es gibt eine Vielzahl verschiedener Testsysteme, die nach verschiedenen Charakteristika eingeteilt werden können. Diese Einteilung kann an Hand folgender Fragen erfolgen:

#### **Ist eine Konkurrenzsituation um die Antikörperbindungsstellen gegeben?**

Bei einem kompetitiven Immunoassay liegt eine Konkurrenzsituation um die Antikörperbindungsstellen zwischen dem Analyten in der Probe und entweder dem markierten Analyten (Tracer) oder dem immobilisierten Analyten vor. Die Antikörperbindungsstellen sind limitiert. Zur Optimierung der Empfindlichkeit wird die Konkurrenzsituation verstärkt, indem die Verdünnung der Antikörper maximiert wird.

Im nicht-kompetitiven Immunoassay sind Antikörperbindungsstellen im Überschuss vorhanden und es werden unmittelbar die besetzten Stellen gemessen. Dadurch zeigen

---

<sup>21</sup> Haptene sind niedermolekulare Substanzen (z.B. Steroide), die alleine keine immunogene Wirkung zeigen, d.h. sie lösen keine Immunreaktion und damit auch keine Antikörperproduktion aus. Erst durch die Kopplung an ein Makromolekül als Träger (z.B. BSA) erlangen sie immunogene Eigenschaften.

Signalintensität und Analytkonzentration einen direkt proportionalen Zusammenhang. Die Kalibrationskurve weist eine positive Steigung auf. In diesem System kann die Empfindlichkeit durch die Erhöhung der Anzahl an Bindungsstellen verbessert werden.

### **Welche Art der Markierung (Label) liegt vor?**

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Markierung, die auf unterschiedlichen Detektionsmethoden beruhen. Die Verwendung isotoopenmarkierter Derivate von Analyten waren historisch gesehen die ersten Label. Diese Methode hat den Vorteil, dass keine strukturelle oder elektronische Veränderung des Tracers bezogen auf den eigentlichen Analyten herbeigeführt wird, so dass abweichende Affinitäten von Tracer und Analyt nahezu ausgeschlossen werden können. Diese sogenannten Radioimmunoassays (RIA) können allerdings nur in speziellen Labors mit entsprechenden Strahlenschutz-einrichtungen durchgeführt werden und haben daher an Bedeutung verloren.

Eine andere Möglichkeit ist die Markierung mit Enzymen. Diese Tests werden als Enzymimmunoassays (EIA) bezeichnet. Die beiden häufigsten Enzyme, die hier Verwendung finden sind Meerrettichperoxidase (POD) und Alkalische Phosphatase. Je nach Detektionssystem können chromogene, fluorogene oder Chemilumineszenz-basierte Substrate verwendet werden. In dieser Arbeit wird mit der häufig verwendeten Kombination aus Meerrettichperoxidase und einem Tetramethylbenzidin-basierten chromogenen Substrat gearbeitet, welches photometrisch detektiert wird.

### **Findet eine Beschichtung von einem Reaktionspartner an einer festen Phase statt?**

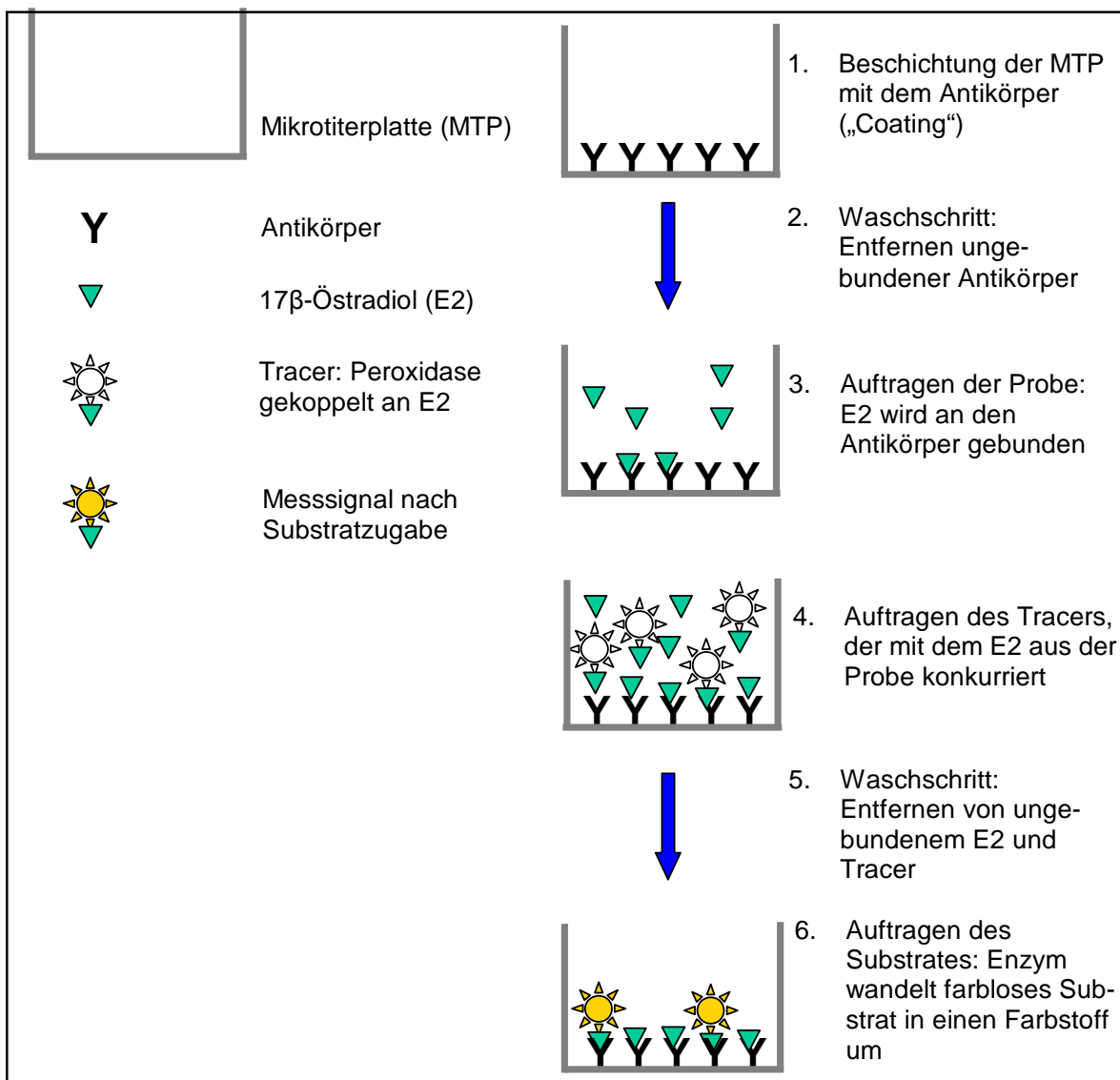
Wird eine feste Phase, z.B. eine Mikrotiterplatte (MTP), verwendet, an der ein Reaktionspartner adsorbiert ist, findet auch dort die Bildung des Antikörper-Antigen-Komplexes statt. Dieses Assayformat wird als heterogen bezeichnet, da zwei verschiedene Phasen (eine feste und eine flüssige) am Assay beteiligt sind und die eigentliche Wechselwirkung in der fest-flüssig-Grenzschicht passiert. Bei homogenen Assays finden alle Reaktionen in Lösung statt.

### **Ist der Antikörper oder das Antigen an der festen Phase adsorbiert?**

Ist der Antikörper an die feste Phase adsorbiert spricht man von einem direkten Assay. Die dazugehörige Kalibrationskurve zeigt eine negative Steigung und die Signalintensität ist damit invers proportional zur Analytkonzentration in der Probe. Ein Assay wird als indirekt bezeichnet, wenn das Antigen an der festen Phase immobilisiert ist.

An Hand der obigen Fragen kann der in dieser Arbeit verwendete Immunoassay als kompetitiver heterogener direkter Enzymimmunoassay oder auch als kompetitiver direkter ELISA (**E**nzyme-**l**inked **I**mmunosorbent **A**ssay) bezeichnet werden (siehe Abbildung 2.3). Dieser Assay wird auf einer MTP durchgeführt, deren Kavitäten direkt mit dem E2-Antikörper beschichtet werden. Nach dem Entfernen der ungebundenen Antikörper durch

einen Waschschrift, werden die Standards und Proben in die jeweiligen Kavitäten pipettiert. Das E2 der Standards oder Proben wird von den Antikörpern gebunden. Um ein messbares Signal zu erhalten, wird Tracer (Peroxidase gekoppelt an E2) hinzugegeben. Dieser konkurriert mit dem Analyten aus den Standards und den Proben um die Antikörperbindungsstellen. Nach einer definierten Inkubationszeit werden bei einem Waschschrift das ungebundene E2 und der ungebundene Tracer entfernt. Nach der Hinzugabe des Substrates entsteht eine Färbung in den Kavitäten, die durch die enzymatische Umwandlung des Substrates mittels Tracer in einen Farbstoff entsteht. Diese Färbung wird photometrisch als optische Dichte (OD) gemessen. An Hand der Standards wird eine Kalibrationskurve berechnet, mit deren Hilfe die E2-Konzentration in der Probe bestimmt wird (siehe auch Kapitel 2.3.6.1).



**Abbildung 2.3:** Schema zum Messablauf des kompetitiven direkten ELISA

Sortiert man die bisherigen Einsatzgebiete für Immunoassays nach absteigender Frequenz, ergibt sich die Reihenfolge: klinische und ambulante Diagnostik, biochemische Forschung, Prozessanalytik und Zulassung, Umweltanalytik und Umweltadministration. Immunoassays unterscheiden sich deutlich von chromatographischen Verfahren (HPLC und GC mit entsprechenden Detektionsmethoden wie MS<sup>22</sup>), die in Routinelabors in der Spurenanalytik meist zum Einsatz kommen. Die Vorteile von Immunoassays gegenüber den auf Chromatographie und Massenspektroskopie beruhenden Verfahren sind aus den unterschiedlichen Vorgehensweisen ablesbar (siehe Tabelle 2.8).

**Tabelle 2.8:** Vergleich konventioneller Analytik mit immunchemischem Verfahren

Konventionelle Analytik	Immunchemisches Verfahren
<b>Probenahme</b>	
Probenaufbereitung: Festphasenextraktion (SPE <sup>23</sup> ) zur: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anreicherung der Analyten,</li> <li>- Aufreinigung der Probe,</li> <li>- Phasenwechsel in geeignetes Lösungsmittel</li> </ul>	Probenaufbereitung*: Filtration
Chromatographie z.B. HPLC, GC	ELISA
Detektion z.B. MS, Tandem MS	Photometrische Messung
<b>Auswertung der Daten</b>	

\* Probenaufbereitung mit SPE für ELISA nur bei großem Matrixanteil

Vergleicht man die Kosten für die benötigten Geräte und Verbrauchsmaterialien beider Verfahren, sind die Kosten für Immunoassays deutlich günstiger. Zusätzlich sind die Anforderungen an die Qualifikation des Operators geringer und die Dauer der Analyse ist kürzer. Bei direkter Messung (d.h. ohne Anreicherung bzw. Aufreinigung) von Proben mit Immunoassays, werden Zeit und Material gespart, es wird weniger Abfall (z.B. Lösungsmittel) produziert und vor allem wird durch das Einsparen von Arbeitsschritten eine Quelle für potentielle Artefakte eliminiert.

Um die Anwendung von Immunoassays insbesondere in der Umweltanalytik auszudehnen, muss die Akzeptanz dieser Methode durch sehr sensitive Assays und verbesserte Dokumentation ihrer Leistungsfähigkeit (Nachweisgrenzen, Präzision und Genauigkeit)

<sup>22</sup> MS = Massenspektroskopie

<sup>23</sup> SPE= engl.: solid phase extraction

sowie Validierungs- und Qualitätssicherungskonzepte erhöht werden. Der Bereich der „Multi-Analytfähigkeit“ ist noch durch die konventionelle Analytik dominiert, aber auch in der Entwicklung von Immunoassays, insbesondere im Zusammenhang mit automatisierten Verfahren, wird sich mit der gleichzeitigen Analyse mehrerer Analyten beschäftigt.

### 2.3.2 Antikörper

Antikörper sind Proteinmoleküle (Immunglobuline), die von einem Lebewesen als Antwort auf ein körperfremdes Molekül (Antigen) synthetisiert werden. Bei Antikörpern handelt es sich um Proteine, die im Serum von Wirbeltieren in der sogenannten Immunglobulin-Fraktion vorkommen. Antikörper besitzen eine hohe Affinität zu den Antigenen, die ihre Bildung hervorgerufen haben.

Kleine Fremdmoleküle, (Haptene mit einer Molmasse  $< 2000 \text{ g mol}^{-1}$ , z.B. E2) lösen die Bildung spezifischer Antikörper erst aus, wenn sie an ein Makromolekül (z.B. BSA) gebunden sind.

Die Antikörperbildung erfolgt, nachdem sich ein Antigen an die Oberfläche von Lymphozyten gebunden hat, deren Funktion die Synthese der für dieses Antigen spezifischen Antikörper ist. Die Verbindung von Antigen und Oberflächenrezeptor löst die Entwicklung der Lymphozyten zu Plasmazellen aus. Diese bilden einen Klon identischer Zellen mit Rezeptormolekülen, welche Bindungsstellen für das selektierende Antigen besitzen. Es kommt zur Synthese großer Mengen spezifischer Antikörper. Die meisten natürlichen Antigene enthalten mehrere determinante Gruppen, die zur Bildung unterschiedlicher Antikörper führen. Antikörper eines Serums gegen eine spezifische Determinante sind gewöhnlich heterogen, da sie ein Produkt vieler antikörperbildender Zellen, sogenannter Zellklone, sind. Man spricht daher von polyklonalen Antikörpern bzw. von polyklonalen Antiseren.

Dagegen werden monoklonale Antikörper von einer einzigen Zelle oder einem Klon produziert. Sie sind homogen und erkennen nur eine einzige Bindungsstelle eines Antigens. Monoklonale Antikörper werden mit Hilfe von Zellkulturtechnik hergestellt (CAMPBELL und REECE 2006). Da monoklonale Antikörper in dieser Arbeit nicht verwendet wurden, wird hier nicht weiter auf sie eingegangen.



Immunoassays profitieren von drei bedeutenden Eigenschaften der Antikörper:

- der großen Variabilität unterschiedlichster Substanzen, die detektierbar sind,
- der sehr guten Spezifität bezüglich des Antigens und
- der Stärke der (nicht-kovalenten) Bindung zwischen Antikörper und Antigen (DAVIES 2001a).

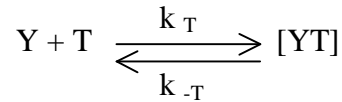
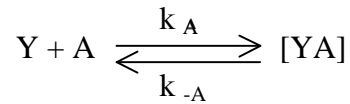
Diese Eigenschaften bilden die Grundlage dafür, dass optimierte Immunoassays selbst bei kleinsten Konzentrationen richtig und präzise messen können.

### 2.3.3 Antigen-Antikörperbindung

Immunoassays sind Bindungsassays, die auf der Antikörper-Antigen-Bindung basieren. Die dieser Reaktion zu Grunde liegenden Bindungskräfte sind: elektrostatische Interaktionen, van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrücken und hydrophobe Interaktionen (TIJSSEN 1993; DESHPANDE 1996). Das Gleichgewicht dieser Reaktion kann nach Sekunden bis hin zu mehreren Stunden eintreten. Es wird durch verschiedene Faktoren wie Assaydesign, pH-Wert, Gehalt an organischen Lösungsmitteln, Ionenstärke und Temperatur beeinflusst, die bei der Entwicklung und Optimierung eines Immunoassays berücksichtigt werden müssen. Unter Berücksichtigung vereinfachender Annahmen kann die Reaktion von Antikörper und Antigen, bzw. von Antikörper und Tracer, mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes beschrieben werden (Gleichung 2.1). Für diesen Ansatz zur Erklärung der thermodynamischen Prinzipien von Immunoassays wird davon ausgegangen, dass:

- alle Reaktionen einer Kinetik 1. Ordnung folgen,
- die Antikörper ein monovalentes Bindungsverhalten zeigen,
- keine unspezifischen Bindungen vorliegen und
- keine Randeffekte oder allosterischen Effekte auftreten (DAVIES 2001a).

Dies führt dazu, dass alle aufgeführten Gleichgewichtskonstanten und kinetischen Konstanten lediglich formale Konstanten sind.



**Gleichung 2.1:** ELISA-Reaktionsgleichungen. Y steht für den Antikörper, T für den Tracer und A für den Analyten. [YT] und [YA] sind die jeweiligen Antikörper-Tracer bzw. Antikörper-Analyt Komplexe.  $k_A$  und  $k_T$  sind die Assoziationskonstanten, und  $k_{-A}$  und  $k_{-T}$  sind die Dissoziationskonstanten.

Da Antigen (Analyt) und Tracer in dem hier verwendeten Assayformat nicht identisch sind, muss man von unterschiedlichen Assoziations- und Dissoziationskonstanten ausgehen. Daher werden für beide unterschiedliche Reaktionsgleichungen aufgestellt, auch wenn die Reaktionen nach dem gleichen Prinzip verlaufen. Das Verhältnis der jeweiligen Assoziationskonstante zur Dissoziationskonstante wird als Gleichgewichtskonstanten  $K_A$  und  $K_T$  bezeichnet (Gleichung 2.2):

$$K_A = \frac{k_A}{k_{-A}} = \frac{[YA]}{Y + A}$$

$$K_T = \frac{k_T}{k_{-T}} = \frac{[YT]}{Y + T}$$

**Gleichung 2.2:** Formal-Konstanten der ELISA-Reaktion.  $K_T$  und  $K_A$  sind die Gleichgewichtskonstanten bezogen auf den Tracer T und den Analyten A.  $k_A$  ist die Assoziationskonstante des Analyten,  $k_T$  ist entsprechend die Assoziationskonstante des Tracers.  $k_{-A}$  und  $k_{-T}$  sind die entsprechenden Dissoziationskonstanten.

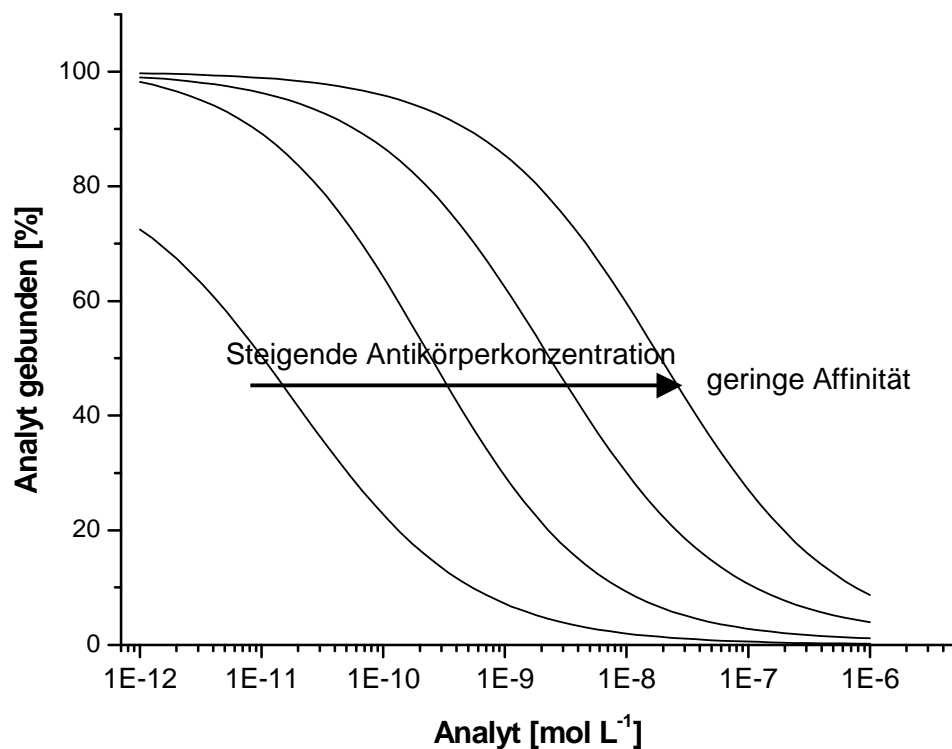
Die beiden Gleichgewichtskonstanten beschreiben das für alle Immunoassays entscheidende Verhältnis von gebundenem zu freiem Antikörper und Analyten bzw. Tracer. Oft wird diese Gleichgewichtskonstante auch als „Affinitätskonstante“ bezeichnet. Die Affinität eines Antikörpers zu einem Antigen ist hoch, wenn die Assoziationskonstante deutlich höher ist als die Dissoziationskonstante, d.h. je höher die Affinität ist, umso mehr Antikörper liegt im Gleichgewichtszustand in der gebundenen Form vor.

Genaugenommen wird die Affinität aus thermodynamischer Sicht definiert als die Stärke der nicht-kovalenten Bindung einer Antikörperbindungsstelle mit einem monovalenten Antigen. Antikörper eines Serums können unterschiedliche Affinitäten zu einem Antigen besitzen und haben zwei Bindungsstellen, daher ist die Affinitätskonstante ein Durchschnittswert der einzelnen Affinitäten. Um zwischen der „Affinität“ der Bindung

zwischen einer einzelnen Antigen-Determinante und deren individueller Bindungsstelle und der Bindungsstärke von unterschiedlichen, multivalenten Antikörpern und multivalenten Antigenen zu unterscheiden, wird letztere in der Literatur oft auch als „Avidität“ bezeichnet (TIJSSEN 1993; DESHPANDE 1996). Liegen multivalente Antikörper und Antigene vor, kann davon ausgegangen werden, dass die Bindungen nicht gleichzeitig gelöst werden und die Stabilität des Antigen-Antikörperkomplexes größer ist. Daher kann die Avidität größer sein als die Summe der einzelnen Affinitäten (TIJSSEN 1993; DESHPANDE 1996).

Dennoch gilt, je höher die Affinität eines Antikörpers bezüglich des Antigens ist, umso stärker machen sich bereits minimale Änderungen der Antigenkonzentration bemerkbar. Daraus lässt sich ableiten, dass eine hohe Affinität des Antikörpers zum Analyten die entscheidende Voraussetzung für eine gute Sensitivität des Assays ist.

Neben der Affinität des Antikörpers ist die Anzahl der verfügbaren Antikörperbindungsstellen für die ELISA-Reaktion entscheidend. Betrachtet man das Ganze als Dosis-Wirkungsbeziehung eines kompetitiven Assays, kann der Anteil an gebundenen Analyten gegen die Konzentration des Analyten aufgetragen werden (siehe Abbildung 2.4).



**Abbildung 2.4:** Beispiel zur Auswirkung der Antikörperkonzentration auf die Dosis-Wirkungsbeziehung von Analyt und gebundenem Analyt (nach DAVIES 2001a). Dargestellt sind Kurven bei unterschiedlicher Antikörperkonzentration.

An Hand dieser Abbildung ist der Einfluss der Antikörperkonzentration auf die Sensitivität des Assays erkennbar. Ein Anstieg der Antikörperkonzentration verschiebt die Kurve in Richtung höherer Konzentration des Antigens (DAVIES 2001a) und die Sensitivität des Assays wird geringer.

Aus diesen Zusammenhängen heraus ergeben sich für die Assayoptimierung zwei Hauptansatzpunkte: die Affinitätskonstante und die Konzentration der Antikörper. Die Affinitätskonstante ist für jeden Antikörper spezifisch und kann nur ermittelt, aber nicht beeinflusst werden. Die regulierbare Größe ist jedoch die Konzentration der Antikörper, welche die Anzahl der freien Bindungsstellen bestimmt.

### **2.3.4 Affinitätslimitierung**

Ein kompetitiver Immunoassay ist oft affinitätslimitiert, d.h. beliebiges Verdünnen des Tracers oder des Antikörpers ist uneffektiv. Dies zeigt sich, indem unterhalb einer bestimmten Grenzkonzentration durch weitere Verknappung der Bindungsstellen keine weitere Steigung der Assaysensitivität erreicht werden kann. In diesem Fall ist die Bindungsstärke des Antikörpers der begrenzende Faktor. Dasselbe gilt auch für die Verdünnung des Tracers. Die Sensitivität eines Assays ist daher bis zum Erreichen des Affinitätslimits durch Verdünnung von Antikörper und Tracer regulierbar (DAVIES 2001a). In der Praxis kann es jedoch vorkommen, dass schon vor Erreichen des Affinitätslimits das Messsignal so schwach ist, dass eine sinnvolle Auswertung nicht mehr möglich ist. Durch Signalverstärkung oder den Umstieg auf ein sensitiveres Detektionssystem (z.B. die Umstellung von photometrischer Detektion auf Lumineszenzmessung) kann jedoch ein Verdünnen bis zum Affinitätslimit ermöglicht werden (SCHNEIDER et al. 2005).

### **2.3.5 Sensitivität**

Da E2-Konzentrationen in Umweltproben häufig im Bereich weniger  $\text{ng L}^{-1}$  liegen, ist die Sensitivität des ELISA von besonderer Bedeutung. Nur mit einer entsprechend niedrigen Nachweisgrenze ist der Assay für den hier vorgesehenen Zweck geeignet. Daher werden die für die Beschreibung der Sensitivität des Assays und die Interpretation der Ergebnisse wichtigen Begriffe an dieser Stelle erläutert.

Die Sensitivität eines Assays wird bestimmt durch die kleinste noch nachweisbare Menge des Analyten, die unter Assaybedingungen signifikant von Null unterscheidbar ist. Entscheidende Faktoren sind die Dosis-Wirkungsbeziehung und das Untergrundrauschen,

welches durch die Standardabweichung des Blindwertes bestimmt wird (DAVIES 2001a). Die Sensitivität, definiert im Sinne der Dosis-Wirkungs-Beziehung, entspricht der Veränderung der Wirkung (Signal) bezogen auf eine Einheit des Reaktanten (Dosis bzw. Konzentration des Analyten) und bestimmt damit die Steigung der 4-Parameter-Kurve (TIJSSEN 1993). Somit ist der Assay umso sensitiver, je größer die Wirkung kleinster Änderungen der Dosis ist. Bezogen auf den in dieser Arbeit angewendeten Assay heißt das, je kleiner die Konzentrationsänderung von E2 ist, die für eine signifikante Änderung der Optischen Dichte (OD) ausreicht, umso sensitiver ist der Assay. Der Einfluss der Affinität des Antikörpers und der Anzahl der verfügbaren Antikörperbindungsstellen auf die Sensitivität des Assays wurden bereits in Kapitel 2.3.3 als bedeutend erklärt.

Die Präzision bezieht sich auf die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses und wird durch die Standardabweichung oder den Variationskoeffizienten bestimmt. Ein Ergebnis kann zwar präzise sein (d.h. der Variationskoeffizient ist sehr klein) muss aber nicht gleichzeitig auch richtig sein, da das Messergebnis vom wahren Wert abweichen kann (TIJSSEN 1993). Die Präzision eines Assays verbessert sich, je mehr sich die Antigen-Antikörperreaktion im Gleichgewicht befindet. Dieses Gleichgewicht ist bei hoher Antikörperaffinität und bei höherer Reaktionsgeschwindigkeit schneller erreicht. Beides wird durch die Faktoren vorhandene Antikörperbindungsstellen, Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke beeinflusst (DAVIES 2001b). Da bei der Optimierung von Immunoassays die Präzision eine wichtige Rolle spielt, sollte auf diese Zusammenhänge bei der Assay-Entwicklung geachtet werden. Die Präzision des Assays wird zusätzlich beeinflusst durch die Gründlichkeit des Waschschrilles, der notwendig ist für die Entfernung der ungebundenen Assaykomponenten, welche wiederum das Untergrundrauschen beeinflussen. Ebenso können bei der photometrischen Detektion Fehler auf Grund von Trübung durch die Reagenzien oder die Probenmatrix entstehen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Präzision durch alle zufälligen Fehler beeinflusst wird und sie durch die Standardabweichung vielfacher Messwiederholungen ermittelt werden kann. Eine hohe Präzision ist Voraussetzung für eine niedrige Nachweisgrenze und damit für eine gute Sensitivität des ELISA. Auf den Zusammenhang von Präzision und Kurvenverlauf wird in Kapitel 2.3.6 näher eingegangen.

Die Genauigkeit („Accuracy“) eines Ergebnisses wird durch die Übereinstimmung mit dem „wahren Wert“ definiert. Das bedeutet, dass der Mittelwert der gemessenen Konzentrationen in einer Referenzsubstanz (Standard) mit der angegebenen bzw. wahren Konzentration übereinstimmt (TIJSSEN 1993). Die Genauigkeit einer Messmethode ist determiniert durch die Fähigkeit den wahren Wert zu ermitteln. Systematische Fehler der Methode oder Artefakte im Messsystem führen zu Abweichungen des Ergebnisses vom

„wahren Wert“ (DESHPANDE 1996). Die Richtigkeit eines Messverfahrens kann durch Referenzverfahren ermittelt werden.

Für die Anwendung in der Umweltanalytik sind Assays mit hoher Sensitivität erforderlich, um Messungen im Bereich niedriger Analytkonzentrationen zu ermöglichen. In Abhängigkeit von der Sensitivität kann auch die Messung verdünnter Proben möglich sein. Das ist ein bedeutender Vorteil, wenn nur wenig Probenmaterial zur Verfügung steht oder auf Grund eines hohen Matrixanteiles eine Verdünnung das Messergebnis verbessern kann.

### **2.3.6 Auswertung von Immunoassays**

Quantitative Immunoassays benötigen eine Kalibrationskurve, um die Analytkonzentration in der Probe zu bestimmen. Bei der Erstellung der Kalibrationskurve wird die Signalstärke gegen die Kalibratorkonzentration aufgetragen und es ergibt sich ein hyperbolischer Kurvenverlauf, der eine Auswertung erschwert. Für eine bessere Auswertung wird daher die Konzentration des Analyten auf einer logarithmischen Skala angegeben. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten kompetitiven direkten ELISA führt dies zu einem sigmoidalen Kurvenverlauf mit einer oberen Asymptote im Bereich kleinster Konzentrationen und einer unteren Asymptote im Bereich der höchsten Konzentrationen (siehe Abbildung 2.5). Diese Kurvenform wirkt sich sowohl auf die Auswertung als auch auf die Bestimmung der Sensitivität aus.

#### **2.3.6.1 4-Parameter-Kurve**

Das Modell der 4-Parameter Kurve wurde von HEALY (1972) als Verbesserung der logit-log Methode entwickelt. Das logit-log Modell arbeitet mit zwei Parametern, der Steigung und dem Wendepunkt. Für das 4-Parameter-Modell integrierte Healy zwei weitere Parameter. Parameter A (obere Asymptote) beschreibt die Situation bei infinitesimal kleiner Kalibratorkonzentration (vgl. Abbildung 2.5). Im Gegensatz dazu stellt Parameter D (untere Asymptote) die unspezifischen Bindungen dar, die ein Untergrundsignal erzeugen, auch wenn bei höchster Standardkonzentration alle Antikörperbindungsstellen besetzt sind (HEALY 1972; NIX und WILD 2001). Parameter B der 4-Parameter-Kurve beschreibt die Steigung am Testmittelpunkt, welcher durch Parameter C beschrieben wird und einer Konzentrationsangabe auf der Abszisse entspricht. Für den Fall, dass keine unspezifischen Bindungen vorliegen und der Parameter D gegen Null strebt, nähert sich

Parameter C dem häufig in biologischen Inhibierungsassays verwendeten EC50-Wert<sup>24</sup> an und entspricht der Konzentration bei 50 % der maximalen Signalstärke.

Die Anpassung der Kalibrationskurve an die Messwerte in dieser Arbeit erfolgt über die sogenannte 4-Parameter-Funktion nach Rodbard (DUDLEY et al. 1985), siehe Gleichung 2.3 und Abbildung 2.5.

$$f(x) = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} + D$$

A – obere Asymptote

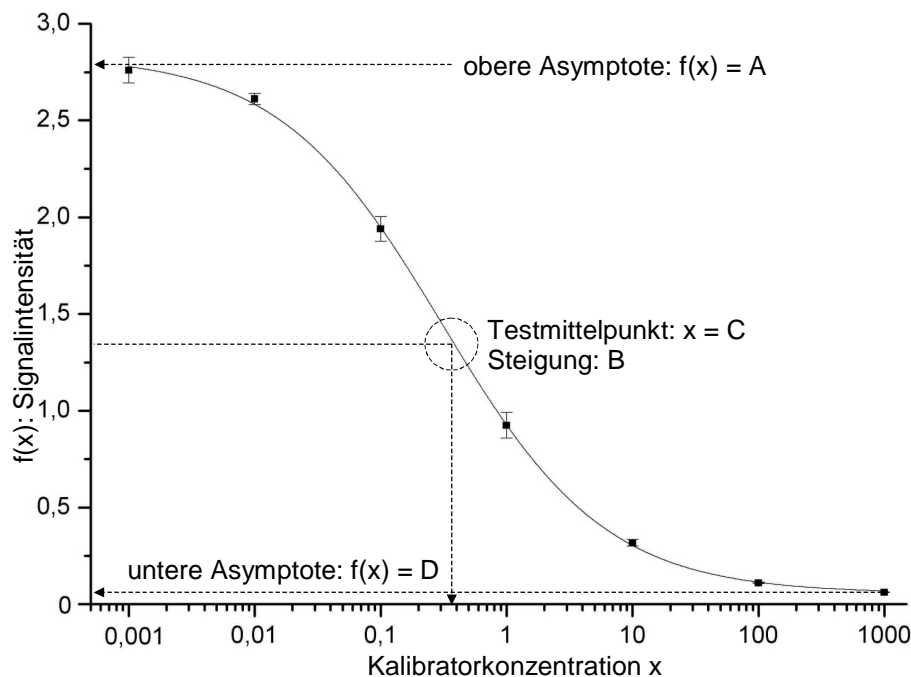
B – Steigung im Testmittelpunkt

C – Testmittelpunkt

D – untere Asymptote

Gleichung 2.3: 4-Parameter-Funktion

Beim Kurvenfitting werden in diesem Modell alle Parameter so lange verändert, bis die beste Kurvenanpassung<sup>25</sup> erreicht ist. Die Kurvenanpassung mit der 4-Parameter-Kurve ist eine iterative Prozedur.



**Abbildung 2.5:** Kalibrationskurve für einen kompetitiven ELISA bei photometrischer Messung (nach SCHNEIDER et al. 2001 und SCHNEIDER 2005).

Die Einbeziehung der Parameter A und D führt im Vergleich zur logit-log Funktion insbesondere in den beiden Endbereichen der Kurve zu einer deutlich besseren

<sup>24</sup> engl.: Effect Concentration. Der Wert gibt diejenige Konzentration an, bei welcher der gemessene Effekt 50 % beträgt.

<sup>25</sup> Bei der Kurvenanpassung wird eine gegebene Funktion an die Daten angepasst.

Anpassung (DESHPANDE 1996). Dies ist vor allem bei Assays von Vorteil, bei denen die erwarteten Analyt-Konzentrationen der Proben, wie in dieser Arbeit, in den flachen Bereich der Kurve fallen.

In diesen flacheren Bereichen der 4-Parameter-Kurve rufen bereits kleinere Streuungen der Signalstärke größere Streuungen der Konzentration hervor. Somit kann die Standardabweichung und damit auch der Konzentrationsfehler in den Bereichen kleinster und höchster Analytkonzentrationen am größten sein. Daher muss bei der Auswertung die Varianz des Fehlers, die sogenannte Heteroskedastizität, über den gesamten Kurvenverlauf berücksichtigt werden und der Fehler der Signalstärke kann nicht unmittelbar in einen Fehler der Konzentration übertragen werden (NIX und WILD 2001). Im Sinne dieser Betrachtungen hat Ekins die Berechnung von Präzisionsprofilen entwickelt (EKINS 1981), auf die im Kapitel 2.3.6.2 noch näher eingegangen wird.

Da, wie bereits erwähnt, die Präzision der Messdaten abhängig vom Konzentrationsbereich ist, kann eine Gewichtung der einzelnen Kalibratoren an Hand der Varianz ihrer Messergebnisse sinnvoll sein. Dies bedeutet, dass Kalibratoren mit kleinerer Varianz, welche die verlässlicheren Werte bieten, bei der Regression höher gewichtet werden. Die Anzahl der Messwiederholungen der einzelnen Kalibratoren kann ebenfalls miteinbezogen werden, da sie für die Verlässlichkeit der Messwerte entscheidend ist (NIX und WILD 2001). Das ist jedoch kritisch zu betrachten, da durch größere Varianzen im Bereich der kleinsten und größten Konzentrationen, das Gewicht bei der Kurvenanpassung auf den Bereich rund um den Testmittelpunkt gelegt wird. Daher kann es in den flachen Bereichen der sigmoidalen Kurve zu einer schlechteren Anpassung kommen, in Folge dessen die Genauigkeit der Messergebnisse beeinträchtigt wird.

Es existieren auch komplexere Funktionen wie ein 5-oder Mehr-Parameter-Modell, in denen zusätzlich Effekte und Trends auf der MTP mitberücksichtigt werden. Auf Grund ihrer Komplexität finden sie in der Praxis bisher aber nur selten Anwendung.

Mit Hilfe der Kurvenanpassung können Fehler bei der Durchführung des Immunoassays berücksichtigt werden, so dass die Robustheit der Methode erhöht wird. Die 4-Parameter-Kurve ist eine der verlässlichsten und flexibelsten Kurvenanpassungsmethoden für Immunoassays, dennoch sind einige Limitierungen zu beachten. Bei der Optimierung des Substrateinsatzes muss berücksichtigt werden, dass es bei Verwendung von Meerrettichperoxidase zum Abflachen der Kurve kommen kann, wenn das Enzym durch hohe Substratkonzentrationen gehemmt wird. Weitere Effekte, die in der Praxis zu Abweichungen von der Theorie des 4-Parameter-Modells führen, sind der „low-dose hook effect“, unzureichendes Waschen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten, Desorption von Antikörpern und unspezifische Bindungen. Diese Effekte können zu asymmetrischen



Verschiebungen vor allem im Bereich der kleinen oder der höheren Konzentrationen führen (NIX und WILD 2001).

### 2.3.6.2 Kenndaten

Die Kenndaten eines Immunoassays geben Auskunft über seinen Messbereich und damit teilweise über seine Einsatzmöglichkeiten. Zur grundsätzlichen Einschätzung der Empfindlichkeit eines Immunoassays eignet sich der, unmittelbar vom Assay abgeleitete, C-Wert der 4-Parameter-Kurve (Gleichung 2.3). Mit seiner Konzentrationsangabe zum Testmittelpunkt beschreibt er die Lage der Kalibrationskurve auf der Konzentrationsachse (SCHNEIDER 2005). Am Testmittelpunkt ist die Steigung der Kurve am größten und damit die Genauigkeit der Messergebnisse am höchsten. Idealerweise sollten sich die zu messenden Konzentrationen in diesem Bereich befinden, jedoch ist dies bei sehr geringen Analyt-Konzentrationen häufig nicht der Fall. Für die Berechnung der Nachweisempfindlichkeit sind andere Kriterien notwendig.

Oft werden dabei die Begriffe Nachweisgrenze (LOD<sup>26</sup>) und Bestimmungsgrenze (LOQ<sup>27</sup>) verwendet. Die Beschreibung der Nachweisgrenze über das Signal-Rausch-Verhältniss leitet sich von Kaisers spektrochemischen Arbeiten aus den 1960ern ab und hatte keinen Bezug zu sigmoiden Kalibrationskurven (KAISER 1966). In neueren Arbeiten zur Definition von Nachweisgrenzen sowie im offiziellen Kompendium der IUPAC zur analytischen Nomenklatur wird dieses Verfahren kritisiert<sup>28</sup> (IUPAC 1998; CURRIE 1999). Obgleich umstritten, hat diese Methode dennoch, als Bestandteil einer DIN-Methode (DIN 32654), Eingang in die Rahmenbedingungen für selektive Immuntestverfahren gefunden und ist als Quasi-Standard für Kenndaten zur Nachweisempfindlichkeit eines Assays etabliert. In der vorliegenden Arbeit werden entsprechend obiger DIN-Richtlinie die Nachweisgrenze (LOD) als dreifacher Signal-Rauschabstand und die Bestimmungsgrenze (LOQ) als zehnfacher Signal-Rauschabstand berechnet.

Die Bestimmung der Nachweisgrenze nur über das mit Hilfe des Blindwerts determinierte Signal-Rausch-Verhältnis ist jedoch kritisch zu betrachten, da die Fehler durch den sigmoiden Kurvenverlauf konzentrationsabhängig sehr unterschiedlich sind. Um dieser heteroskedastischen Fehlerverteilung gerecht zu werden, wird in dieser Arbeit zusätzlich zur Nachweis- und Bestimmungsgrenze das Präzisionsprofil nach EKINS (1981) ermittelt. Dazu wird der relative Fehler bezogen auf die jeweilige Konzentration der Kalibratoren

---

<sup>26</sup> LOD: engl. limit of detection

<sup>27</sup> LOQ: engl. limit of quantitation

<sup>28</sup> "L<sub>D</sub> [L<sub>D</sub> bezeichnet hier die Nachweisgrenze] is not defined, however, simply as a fixed coefficient (2, 3, etc.) times the standard deviation of a pure solution background. To do so can be extremely misleading." Zitiert nach CURRIE et al. 1999.

berechnet. Durch die Festlegung eines Schwellwertes für den relativen Fehler kann der Messbereich bestimmt werden. Die Berechnung des Präzisionsprofils ist in Kapitel 4.2.3 beschrieben.

### 2.3.7 Selektivität

Die Kreuzreaktivität eines Serums bezüglich antigen-ähnlicher Substanzen hat für die Selektivität des Assays eine entscheidende Bedeutung. Im Zusammenhang mit der Selektivität eines Immunoassays ist zwischen der sogenannten „shared reactivity“ und der eigentlichen „cross reactivity“ zu unterscheiden (BERZOFKY und SCHECHTER 1981). Die „shared reactivity“ beschreibt das Phänomen, dass unterschiedliche Antikörperpopulationen eines polyklonalen Serums verschiedene Affinitäten bezüglich eines Analyten haben. Unter der eigentlichen Kreuzreaktivität („cross reactivity“) versteht man die Querempfindlichkeit eines Antikörpers für verschiedene Analyten. Die Kreuzreaktivität eines Antikörpers bezüglich antigen-ähnlichen Substanzen wird bestimmt durch seine Affinität zu diesen Substanzen. Ein kreuzreagierendes Antigen hat meistens eine geringere Affinität, so dass im Vergleich zum Antigen eine höhere Konzentration dieser Substanz benötigt wird, um 50 % des markierten Antigens zu ersetzen (TIJSSEN 1993). Deswegen liegt der C-Wert für die kreuzreagierende Substanz im Allgemeinen in einem höheren Konzentrationsbereich.

In dieser Arbeit ist die Querempfindlichkeit des Assays bezüglich strukturell E2-ähnlicher Substanzen untersucht worden, die häufig mit Östradiol gemeinsam in der Umwelt vorkommen, um das Potential von falsch positiven Ergebnissen zu überprüfen. Dazu wurde die Bestimmung der molaren Querempfindlichkeit nach einem Verfahren angewendet, das sich auf die Testmittelpunkte bzw. den C-Wert aus der 4-Parametergleichung bezieht (ABRAHAM 1969). Hierbei wird der Quotient der C-Werte ( $\text{mol L}^{-1}$ ) der Referenzsubstanz und der zu testenden Substanz gebildet. Dieser Quotient beschreibt die prozentuale Querempfindlichkeit bezogen auf die Referenz (Gleichung 2.4).

$$CR = \frac{C_{\text{Referenz}}}{C_{\text{Test}}} * 100 \%$$

**Gleichung 2.4:** Berechnung der Kreuzreaktivität CR.  $C_{\text{Referenz}}$  ist die E2-Konzentration im Testmittelpunkt,  $C_{\text{Test}}$  ist die Konzentration der kreuzreagierenden Testsubstanz im zugehörigen Testmittelpunkt.

Auf Grund der Tatsache, dass in Umweltproben eine meist nicht definierte Mischung unterschiedlicher Substanzen vorkommt, die mitunter Kreuzreaktivitäten mit den

Antikörpern des Serums aufweisen, können falsch positive Bestimmungen nicht ausgeschlossen werden. Jedoch kann die Untersuchung der Kreuzreaktivitäten einen Eindruck vermitteln, wie stark das Potential für Querempfindlichkeiten unter bestimmten Testbedingungen für eine Vielzahl an Substanzen ist. Es muss bei diesen Untersuchungen jedoch berücksichtigt werden, dass Veränderungen der Assaybedingungen, die evtl. auch schon durch die in der Probe vorhandene Matrix gegeben sein können, die Kreuzreaktivitäten verändern können.

### **2.3.8 Validierung und Qualitätssicherungskonzepte**

Qualitätssicherung beinhaltet eine große Bandbreite an Maßnahmen zur Vorbeugung gegen Qualitätseinbußen sowie für die Sicherstellung von Präzision und Genauigkeit. Qualitätskontrolle beschreibt die Tests, die auf individuelle Assays angewandt werden, um die Validität der Ergebnisse zu überprüfen (BLOCKX und MARTIN 2001).

Gute Qualitätssicherungskonzepte umfassen sowohl die Ausstattung des Labors und die Qualifikation des Personals als auch den gesamten Prozess einschließlich der Probenahme, Analyse und Auswertung. Wichtige Aspekte dabei sind regelmäßige Kontrolle und Kalibration aller Laborgeräte, insbesondere im Hinblick auf den Verwendungszweck (BLOCKX und MARTIN 2001). Bei der Probenahme ist es notwendig, Fremdeinflüsse auf die Probe zu vermeiden und Umweltbedingungen zu erfassen, damit sie bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden können. Die Auswahl der verwendeten Materialien an Geräten und Gefäßen muss an den Verwendungszweck angepasst sein, um ihren Einfluss auf die Probe gering zu halten. Eine Lagerung beeinflusst meistens die Probe und sollte wenn möglich vermieden werden. Eine zentrale Rolle für die Qualitätssicherung spielen dabei die Dokumentation während des gesamten Prozesses und die Verwendung standardisierter Arbeitsanweisungen (engl. SOP = Standard Operation Procedure).

Die Validierung ist ein integraler Bestandteil der Qualitätssicherung (GOWIK et al. 1998b). Validierung ist nach DIN ISO/IEC 17025:2000 „die Bestätigung durch Untersuchung und die Erbringung eines effektiven Nachweises, dass die jeweiligen Anforderungen eines bestimmten Verwendungszwecks erfüllt sind“. Somit ist Validierung die Messung der Leistungsmerkmale eines Verfahrens und der Vergleich mit den Anforderungen für den geplanten Einsatzbereich. Die Ermittlung der Messunsicherheit („measurement uncertainty“) spielt dabei eine bedeutende Rolle, da eine „fehlerfreie“ Analytik nur ein Ideal ist und in der Realität Abweichungen zum „wahren“ Wert auftreten. Auch externe Einflüsse

werden in die Validierung mit einbezogen, damit sie bei der Interpretation und Anwendung der Prüfergebnisse Berücksichtigung finden können.

Der statistischen Auswertung mit der Software des in dieser Studie verwendeten ELISA-Automaten liegt das Messunsicherheitskonzept („Measurement Uncertainty Concept“) zu Grunde, das aus dem Bereich der Qualitätssicherung in der industriellen Produktion stammt und als ISO-Richtlinie (ISO 1993) vorliegt. Dieses Messunsicherheitskonzept erlaubt die über eine statistische Auswertung von Messwerten hinausgehende Einbeziehung von Einflussfaktoren, welche eine laborinterne Validierung (in-house Validierung) ermöglichen. Diese in-house Validierung ist eine wertvolle Ergänzung der Qualitätssicherungssysteme und lässt sich gut auf Immunoassays anwenden (SCHNEIDER et al. 2001). Das Prinzip des Messunsicherheitskonzeptes besteht darin, mögliche Fehlerquellen in der analytischen Untersuchung zu kategorisieren und zu quantifizieren. Dabei wird versucht, die Messabweichung einerseits dem Laborfehler und andererseits dem zufallsbedingten Messfehler zuzuordnen. Nach diesem Modell kann sich der Messwert aus den Komponenten wahrer Wert, Abweichungen abhängig von Methode, Matrix, Zeit, Labor und Zufall zusammensetzen (GOWIK et al. 1998b). Durch die Ermittlung der labor- und methodenspezifischen Einflussgrößen kann ein gut durchdachter (vollständig oder teilweise) faktorieller Versuchsplan zur Quantifizierung dieser Einflüsse erstellt werden. Somit kann die Anzahl der für die Validierung notwendigen Versuche reduziert werden. Dies spart Material, Zeit und Kosten und ermöglicht eine Validierung mit möglichst geringem Aufwand. Die Quantifizierung der Einflussgrößen ist notwendig, um die Robustheit einer Methode angeben zu können und damit die Bereiche, in denen die Einflussfaktoren variieren können, ohne dass das Messergebnis signifikant verfälscht wird (DESHPANDE 1996).

Bezogen auf die Analytik sind wichtige Elemente der Qualitätskontrolle das Monitoring der Präzision sowie Kenntnisse über den optimalen Messbereich und den Variationskoeffizienten. Die in dieser Arbeit berücksichtigten Kenngrößen der Validierung sind:

- die Genauigkeit,
- die Präzision,
- die Sensitivität (Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze)
- die Selektivität,
- der Arbeits- oder Messbereich und
- die Robustheit in Bezug auf Matrixeffekte.

Zur Überprüfung der realen Leistungsfähigkeit einer Methode ist die Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze bzw. der Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichungen in einer Matrix noch nicht ausreichend. Erforderlich ist zusätzlich die Evaluierung der Robustheit einer Methode hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit unter einer

gewissen Bandbreite der Bedingungen sowie die Ermittlung des Wertes für  $CC_{\beta}^{29}$  des validierten Konzentrationsbereiches (GOWIK et al. 1998b).

Grundlegende und weiterführende Arbeiten sind zu diesem Thema vielfältig durchgeführt worden (KÜPPERS 1997; GOWIK et al. 1998a, b; JÜLICHER 1998; UHLIG und LISCHER 1998; VAN DER VEEN et al. 1998; SCHNEIDER et al. 2001; BORG et al. 2002; UHLIG et al. 2003). In diesen Beiträgen wird gezeigt, dass der Aspekt der (in-house) Validierung bedeutend für die Qualitätssicherung der Messergebnisse ist. Insbesondere in der Spurenanalytik, wo kleinste Fehler große Auswirkungen haben, ist die Implementierung eines Qualitätssicherungskonzeptes unabdingbar, wenn die Methoden eine breite Akzeptanz erreichen sollen.

### 2.3.9 Matrixeffekte

Die Matrix wird bestimmt durch Art und Zusammensetzung der Probe und kann viele, den Assay beeinflussende Stoffklassen beinhalten. Aus der Literatur ist bekannt, dass verschiedene Anionen und Kationen, Tenside, Schwermetalle, Huminstoffe, Proteine, Lipide, Lösungsmittel und andere organische Verbindungen Immunoassays, mitunter abhängig vom Assay und Assayformat, beeinflussen können. Typische, besonders häufig in Wasserproben vorkommende Huminstoffe sind makromolekulare Verbindungen wie Humin- und Fulvinsäuren.

Die Matrix kann in unterschiedlicher Weise den Assay beeinflussen. Matrixkomponenten können sich auf den Antikörper und seine Bindungsfähigkeit bezüglich des Analyten auswirken. Das kann durch Veränderung der Struktur der Bindungstasche (Substanzen, welche die Tertiärstruktur von Proteinen beeinträchtigen können), oder Blockierung bzw. Abschirmung der Bindungsstellen geschehen (HUANG und SEDLAK 2001). Es ist bekannt, dass die Bindung des Antikörpers an Huminstoffe zu falsch positiven Ergebnissen führen kann (RUPPERT et al. 1992). Der Analyt kann an verschiedene Matrixkomponenten adsorbieren, so dass keine Bindung an den Antikörper mehr möglich ist. Es könnten auch an die Matrix gebundene Analytmoleküle von den Antikörpern erkannt werden und bezüglich der Bestimmung der gelösten Analyten zu falsch positiven Ergebnissen führen. Dieser Effekt wurde bei Pestiziden beobachtet und kann möglicherweise auch bei Hormonen auftreten (JAHN et al. 1999). Als dritte Assaykomponente kann der Tracer bzw. das an den Tracer gebundene Enzym beeinträchtigt werden, so dass die Signalstärke beeinflusst wird.

---

<sup>29</sup>  $CC_{\beta}$  ist der kleinste Gehalt eines Stoffs, der mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit  $\beta$  nachgewiesen, identifiziert und/oder quantifiziert werden kann (Entscheidung 2002/67/EG).

In dem hier vorgestellten ELISA kann es in der Probe, durch Schwächung des Signals in Folge von Matrixeinflüssen bei einer Kalibration in Reinstwasser, zu einer Überbestimmung des Analyten kommen. Man erhält dann „falsch positive“ Ergebnisse, das heißt auch Proben in denen kein Analyt vorkommt, könnten als positiv bestimmt werden. Wird die Signalintensität in der Probe durch Matrixeffekte erhöht (z.B. durch Adsorption des Analyten), kann es zu „falsch negativen“ Ergebnissen kommen, das heißt, die Analyt-Konzentration in der Probe wird unterbestimmt. Diese Unterbestimmung kann dazu führen, dass Gefahrenquellen übersehen werden und ist daher gefährlicher als die Überbestimmung.

Ebenso kann Probenmatrix die Sensitivität und die Messgenauigkeit des Assays beeinflussen, so dass durch ein erhöhtes Untergrundrauschen und/oder durch Veränderung der Steigung der Kalibrationskurve das Ergebnis fehlerhaft wird. Unterschiedliche Analysemethoden sind auch bezüglich Matrixeffekten unterschiedlich empfindlich. Daher sollten alle Methoden auf ihre Beeinflussbarkeit in Hinsicht auf die wichtigsten Matrixkomponenten untersucht werden.

Auf Grund der bei Umweltproben häufig vorkommenden Matrixeinflüsse stellt sich die Frage, wie dieser Einfluss evaluiert oder besser eliminiert werden kann. Um falsche Ergebnisse auf Grund von Matrixeffekten zu vermeiden, ist es sinnvoll, die Standards für die Kalibrationskurve in einem der Probe möglichst ähnlichen Medium anzusetzen (GLASS et al. 2004). Für den optimalen Einsatz einer solchen „Matrixkalibration“ ist das Vorhandensein einer Analyt-freien Probe mit repräsentativer Matrix erforderlich. Insbesondere bei Substanzen, die in der Umwelt quasi ubiquitär vorliegen, ist das jedoch kaum möglich. Eine Abhilfe könnte dabei durch eine Art Referenzmatrix geschaffen werden, die entweder garantiert Analyt-frei ist, oder ein Referenzmaterial, bei dem eine zertifizierte Analytkonzentration vorliegt. Somit könnte der Einfluss der Matrix bei unterschiedlichen Analyt-Konzentrationen (durch Spiken der Matrix) untersucht werden. GLASS et al. (2004) schlagen eine alternative Methode zur Reduzierung von Matrixeffekten auf den ELISA vor, die bisher aber nur bei einem indirekten ELISA getestet wurde. Dazu wurden nicht markierte Antikörper im Überschuss in die Probe gegeben, die den Analyten binden, so dass dieser im ELISA nicht detektiert werden kann. Es wird damit eine quasi künstlich erzeugte Analyt-freie Probe geschaffen, mit welcher die Matrixeffekte auf den Assay bestimmt werden können.

Eine weitere Möglichkeit zur Reduzierung des Matrixeinflusses ist eine möglichst hohe Verdünnung der Probe und damit auch der Matrix (DENG et al. 2003). Entsprechend wäre eine Verringerung der eingesetzten Probenmenge. Für beides ist jedoch eine ausreichende Sensitivität des Assays notwendig, bzw. eine hohe Konzentration des Analyten in der Probe, damit die Analyt-Konzentration nachweisbar bleibt.

Ausgehend davon, dass der TOC-Gehalt den Effekt der Matrix maßgeblich bestimmt schlagen TSCHMELAK et al. (2005) ein Verfahren zur Korrektur von Matrixeffekten mit Hilfe eines kommerziellen TOC-Standards (entspricht ISO/CEN EN 1484) vor. Bei dieser Methode wurde durch den Vergleich von der Bestimmung des Blanks im Reinstwasser mit der Bestimmung des Blanks bei verschiedenen TOC-Gehalten ein Korrekturfaktor für die jeweiligen TOC-Gehalte berechnet. Die Kontrolle dieses Verfahrens mit Analyt gespickten TOC-Lösungen ergab, nach Berücksichtigung des Korrekturfaktors, Wiederfindungsraten in dem von den Richtlinien des AOAC International geforderten Bereichs zwischen 70 und 120 % (TSCHMELAK et al. 2005).

Ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die negative Beeinträchtigung des Assays durch eine Schädigung des an den Tracer gebundenen Enzyms auftritt, kann eine Umstellung auf ein indirektes Assayformat, bei dem die Probe und das Enzym nicht in direkten Kontakt treten können, in Erwägung gezogen werden.

Ist das nicht möglich, verbleibt die Aufreinigung der Proben, die zumeist auch mit einer Aufkonzentrierung verbunden werden kann, wie es in dieser Arbeit für den manuellen Assay durchgeführt wurde.

### **2.3.10 Lösungsmittel und Konservierungsmethoden**

Aus verschiedenen Gründen kann es vorkommen, dass Lösungs- oder Konservierungsmittel über die Proben in Kontakt mit den Assaykomponenten kommen und einen Einfluss auf den Assay haben. Daher ist es notwendig diese Effekte zu quantifizieren. Der Einsatz von Lösungsmitteln kann unausweichlich sein, wenn z.B. der Analyt mit Hilfe organischer Lösungsmittel aus der Probe extrahiert werden muss. Bereits in anderen Studien wurden die Auswirkungen des Lösungsmiteleinsatzes auf den Immunoassay untersucht. In diesen Arbeiten wurde eine Abnahme der Sensitivität des Assays abhängig vom eingesetzten Lösungsmittel und der verwendeten Konzentration festgestellt (DENG et al. 2003; SCHNEIDER et al. 2004).

Der Einsatz von Konservierungsmethoden ist notwendig, wenn die Lagerung von Proben unvermeidbar ist. Dieser Fall kann eintreten, falls aus Zeitknappheit oder Mangel an Arbeitskapazität eine Bearbeitung und Messung der Proben innerhalb von 24 h nicht möglich ist oder Rückstellproben erforderlich sind. Während der Lagerung der Proben können verschiedene biologische, chemische und physikalische Prozesse stattfinden, die den messbaren Gehalt an Analyt verändern. Hauptsächlich spielen dabei Abbau und Sorptionsprozesse eine Rolle, die durch die Konservierungsmethoden verhindert bzw. weitestgehend reduziert werden müssen.

Daraus ergeben sich folgende Anforderungen an die Konservierungsmethode:

- Abbauvorgänge von E2 zu reduzieren bzw. zu verhindern,
- Sorptionsprozesse von E2 zu reduzieren bzw. zu verhindern und
- den ELISA in seiner Eignung zur präzisen und genauen Bestimmung von E2 nicht zu beeinträchtigen.

In den folgenden Abschnitten werden die für diese Arbeit relevanten Konservierungsmethoden aufgeführt.

Mit Hilfe der Filtration der Proben können zum einen das Sorptionspotential der Proben für E2 verringert und um zum anderen die oben beschriebenen Matrixeffekte reduziert werden. Dabei wird davon ausgegangen, dass die gelöste Menge an E2 in der Probe durch Filtration nicht beeinträchtigt wird (HUANG und SEDLAK 2001).

Des Weiteren verhindert die Lagerung der Proben lichtgeschützt in Braunglasgefäßen photolytische Prozesse, durch die Matrixkomponenten unter Lichteinfluss zur Bildung von Radikalen beitragen können, welche wiederum zum Abbau von E2 führen können (STEINBERG et al. 2000; GRAY 2003).

Eine weitere Möglichkeit zur Verringerung der Sorptions- und Abbauprozesse ist die gekühlte Lagerung der Proben bei 4°C im Kühlschrank oder bei -20°C im Gefrierschrank, weil durch niedrige Temperaturen chemische, physikalische und biologische Prozesse verlangsamt werden. Ist für eine gekühlte bzw. eingefrorene Lagerung der Proben kein Platz, sind alternative Konservierungsmethoden wie z.B. der Einsatz von Konservierungsmitteln von Interesse.

Das Biozid Formaldehyd wird zur Konservierung eingesetzt, da es ein breites Wirkungsspektrum bezüglich seiner abtötenden Wirkung auf Bakterien und Pilze hat. Formaldehyd wird als Bestandteil von Desinfektionsmitteln verwendet und wurde bereits in anderen Studien zur Konservierung von Proben eingesetzt (BARONTI et al. 2000; D'ASCENZO et al. 2003).

### **2.3.11 Automatisierung von Immunoassays**

Im umweltanalytischen Bereich haben oft kleinste Mengen an Chemikalien bereits ein hohes Gefährdungspotential, so dass besonders geringe Nachweisgrenzen erforderlich sind. Untersuchungen haben ergeben, dass bei manueller Durchführung von Immunoassays die Nachweisgrenze entscheidend vom Pipettierschema, der Fachkompetenz der durchführenden Person (Operator) und der Laborumgebung abhängt (SCHNEIDER et al. 2001).



Als wichtigster Umgebungsfaktor kann dabei die Temperatur betrachtet werden, da die Geschwindigkeit aller Reaktionen temperaturabhängig ist. Daher können Temperaturunterschiede während des Assays auf einer MTP zu Positionseffekten führen (DENG et al. 2003). Positionseffekte können bei manueller Durchführung des ELISA zum einen durch Umgebungs- und Platteneffekte entstehen und zum anderen durch den Pipettiervorgang des Operators hervorgerufen werden. Die manuell randomisierte Durchführung des ELISA bedeutet zusätzlichen Stress für den Operator und ist sehr fehleranfällig (SCHNEIDER et al. 2001). Aus diesen Gründen kann das Pipettierschema die Ergebnisse beeinflussen.


Bei manueller Durchführung eines ELISA ist der Operator für die Gleichbehandlung aller Kavitäten verantwortlich. Dabei ist eine manuelle Taktung des Pipettiervorgangs sehr schwierig. Durch das Verwenden gleicher Pipetten kann die Geschwindigkeit aller Pipettiervorgänge für die gesamte MTP weitestgehend konstant gehalten werden, doch können Unterschiede zwischen den Inkubationszeiten in den einzelnen Kavitäten auftreten. Sowohl Stressfaktoren als auch die Fachkompetenz des Operators beeinflussen die Präzision der Ergebnisse und wirken sich somit auf die Qualität der Ergebnisse aus (SCHNEIDER et al. 2001).

Diese oben genannten Faktoren haben somit alle einen Einfluss auf die Präzision der Ergebnisse und wirken sich damit auf die Nachweisgrenze aus. Durch eine automatisierte Durchführung des ELISA können sie jedoch weitestgehend ausgeschlossen werden:

- Die Umgebungsbedingungen können bei der Verwendung eines Automaten mit Einhausung und Temperatursteuerung konstant gehalten werden.
- Die Automatisierung bietet die Möglichkeit, sowohl die Messungen auf der MTP randomisiert zu verteilen, als auch diese randomisiert abzuarbeiten. Dadurch ist das Pipettierschema zufallsbedingt und unvermeidbare Positionseffekte (z.B. durch Qualitätsschwankungen bei der Herstellung von MTPs oder automatenbedingte Einflüsse) können zufällig verteilt werden. So werden systematische Fehler (z.B. durch Positionseffekte) in zufällige überführt. Im Unterschied zu systematischen Fehlern, die über alle Messungen hin konstant auftauchen, variieren zufällige Fehler und sind nicht vorhersagbar. Sie können sich somit bei einer ausreichend großen Anzahl an Messungen ausgleichen.
- Durch Automatisierung können mit einer Taktung der Arbeitsschritte die Inkubationszeiten gleich gehalten werden, wodurch die Gleichbehandlung aller Kavitäten möglich wird.
- Der Automat arbeitet unabhängig von den Stressbedingungen und der Fachkompetenz des Operators, so dass diese Faktoren keinen Einfluss auf die Präzision der Messergebnisse haben und somit der durch den Operator bedingte Effekt wegfällt.

Neben der Qualitätssteigerung der Ergebnisse hat die Automatisierung zudem den Vorteil, dass die Ansprüche an die Laborausstattung geringer sind. In Tabelle 2.9 sind die Vorteile der Automatisierung von Immunoassays der manuellen Durchführung gegenübergestellt.

**Tabelle 2.9:** Gegenüberstellung von manuell durchgeführten und automatisierten Immunoassays

	<b>manueller ELISA</b>	<b>Automat</b>
<b>Pipettierschema</b>	einfach, sonst sehr zeitaufwändig und fehleranfällig	randomisierte Versuchsanordnung möglich:
<b>Positionseffekte</b>	vorhanden, durch Pipettierschema Einflussnahme auf die Auswahl der betroffenen Messungen	- Positionseffekte werden zufällig auf Messungen verteilt - somit sind Fehler zufällig <b>wichtige Voraussetzung für die statistische Auswertung</b>
<b>exakte Gleichbehandlung aller Kavitäten</b>	kaum möglich	durch Taktung der Arbeitsschritte möglich <b>Verbesserung der Präzision</b>
<b>Umgebungsbedingungen</b>	je nach Klimatisierung des Labors, abhängig von der Außentemperatur	konstant durch Temperierung des Automaten <b>Verbesserung der Präzision</b>
<b>Auswertung und Validierung</b>	extra Software notwendig	<b>Auswertung und Validierung implementiert in das Messprogramm</b>
<b>Fazit</b>		 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Verbesserte Nachweisgrenze</b></li> <li>▪ <b>Implementiertes Qualitätssicherungskonzept</b></li> </ul>

Für die Durchführung von Immunoassays gibt es viele verschiedene Automaten, die sich bezüglich ihres Automatisierungsgrades und ihrer Ausstattung unterscheiden. Dem entsprechend können auch Kosten und Qualität der Messungen schwanken. Arbeitsstationen für die Durchführung von ELISAs sind z.B. TekBench™ der Firma TekCel, Freedom

EVO® und Freedom EVOlyzer® der Firma Tecan, Elecsys® der Firma Roche sowie Biomek®1000 der Firma Beckmann. Darüber hinaus gibt es verschiedene ELISA-Messsysteme, die bereits automatisiert sind. Ein Beispiel dafür ist die Automatisierung eines ELISA unter Verwendung von Magnetpartikeln mit einer Biomembranschicht als Träger der Antikörper (TANAKA et al. 2004). Des Weiteren gibt es Geräte, die mit Biosensoren arbeiten und sich damit zum online-Monitoring eignen (TSCHMELAK et al. 2004a; TSCHMELAK et al. 2004b, 2005).

Die Auswahl des Automaten systems hängt in der Regel von den angestrebten Zielen, dem Einsatzgebiet und den finanziellen, räumlichen und personellen Gegebenheiten ab (SOKOLL und CHAN 2001). Die Anforderungen durch den Markt bzw. die Kunden an die Automatisierung bestimmen ihrerseits die Entwicklung der Automaten. Entscheidend für die Ausprägung der Automatisierungsmodelle ist die individuelle Gewichtung der folgenden Faktoren:

- Zeitersparnis,
- Kostenreduzierung (Einsparungen beim Personal, günstige Verbrauchsmaterialien),
- hohe Präzision,
- ausführliche und anwenderfreundliche Auswertung,
- vielfältige Anwendbarkeit,
- hohe Verlässlichkeit,
- einfachere Handhabung,
- Netzverbindung mit dem Hersteller zur verbesserten Qualitätskontrolle und „trouble-shooting“,
- Multi-Analyt-Fähigkeit (HUCKLE und WILD 2001).

Für den Bereich der Umweltanalytik, der eine hohe Sensitivität erfordert, jedoch oft nur einen sehr begrenzten finanziellen Rahmen hat, ist bei der Automatisierung die Abwägung beider Ansprüche notwendig. Die auf einen hohen Probendurchsatz, wie es die klinische Anwendung oft fordert, ausgerichteten Geräte sind bei einer geringeren Auslastung oft nicht finanzierbar. Für diesen Bereich, z.B. Kläranlagenbetreiber oder Wasserversorger, die zwar regelmäßig, aber oft nur eine geringe Anzahl an Proben untersuchen müssen und deren Personal oftmals weniger spezialisiert ist, sind niedrige Kosten und eine einfache Handhabung Voraussetzung für den Einsatz eines Automaten. Darüberhinaus ist das Erreichen einer ausreichenden Sensitivität hier Bedingung. Diese Prioritäten, die in der Industrie oft eine untergeordnetere Rolle spielen, müssen bei der Konzeption eines Automaten für den Bereich der Umweltanalytik berücksichtigt werden.

### 3 Material

Die benötigten Materialien werden in diesem Kapitel getrennt nach Geräten und Chemikalien aufgelistet. Sie sind nach den einzelnen Arbeitsschwerpunkten: Entwicklung und Optimierung des ELISA, Entwicklung und Optimierung des ESTR-A-LISER sowie Feldstudie geordnet. Die Auflistung in den Tabellen erfolgte alphabetisch.

#### 3.1 Entwicklung und Optimierung des ELISA

In diesem Kapitel sind die Geräte und Chemikalien für die Durchführung der Immunoassays in Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 aufgelistet

**Tabelle 3.1** : Auflistung der für die Immunoassays verwendeten Geräte und ihre Hersteller. Geräte, die auch bei der Benutzung des ESTR-A-LISER verwendet wurden, sind mit \* gekennzeichnet.

Bezeichnung	Hersteller
8-Kanal Microplate Washer FlexiWash	Asys HiTech GmbH
8-Kanal Proline <sup>®</sup> Electronic Pipettor 1200	Biohit Oyj
Biohit Proline Tip 1200	Biohit Oyj
Combitips <sup>®</sup> plus 1,0 mL und 0,5 mL	Eppendorf AG
Cryovial <sup>®</sup> Sterile 4 mL	Simport Plastics Ltd.
Elektronikrührer Multipoint HP 15 *	H+P Labortechnik GmbH
epT.I.P.S. Standard 0,5-10 µL, 10-100 µL, 200-1000 µL, 2500 µL *	Eppendorf AG
Flasche G10, braun mit Teflonseptum	CS-Chromatographie Serv.
Flaschenaufsatzdispenser Varispenser plus 4961 25 bzw. 50 mL	Eppendorf AG
MµLTI <sup>™</sup> Reaktionsgefäße 0,65 mL	Carl Roth GmbH & Co.
MµLTI <sup>™</sup> Twist Top Vials + Caps	Carl Roth GmbH & Co
Mikrotiterplatten, ImmunoPlate F 96 Cert. Maxisorp *	Nunc <sup>™</sup> Brand Products
Mikrotiterplattenschüttler	VEB MLW Prüfgerätewerk
MS2 Minishaker	IKA <sup>®</sup> Works Inc.
Multipette <sup>®</sup> plus	Eppendorf AG
Parafilm <sup>®</sup> *	Pechinay Plastic Packaging
Reference <sup>®</sup> variabel 100-1000µL *	Eppendorf AG

Safe-Lock Tubes 2,0 mL	Eppendorf AG
Sephadex™ PD 10 columns G25-M	Amersham Biosciences
Software: Softmax® Pro for Windows®	Molecular Devices Corp.
THERMOstar + Microplate Incubator/Shaker *	BMG LabTechnologies
Tischzentrifuge Z 200 M/H	Hermle Labortechnik GmbH
Varipette® 4810 0,5-10µL, 10-100 µL, 200-1000µL, 500-2500 µL *	Eppendorf AG
Vmax® Kinetic Microplate Reader	Molecular Devices Corp.

**Tabelle 3.2:** Auflistung der für die Immunoassays verwendeten Chemikalien, ihre Hersteller und Bestellnummern. Chemikalien, die auch bei der Benutzung des ESTR-A-LISER verwendet wurden, sind mit \* gekennzeichnet.

Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
17β-Estradiol-6-carboxy-methyloxim	Sigma-Aldrich	
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, research grade (TMB)	Fluka	MOLEM88604857
3,3',5,5' Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for ELISA	Sigma	T0440
4-Aminobenzoessäurehydrazid, 95 %	Aldrich	A-4,190-9
Ammoniaklösung 25 %, p.a.	Merck	1.054.322.500
Ammoniumacetat, 99 %	Merck	1.161.030.250
Anti-Rabbit IgG-POD	Sigma	A8275
Blocking Solution	NEOGEN	300375
Casein Natriumsalz	Sigma	C-8654
Casein Natriumsalz	Sigma	C8654
Dikaliumhydrogenphosphat, MicroSelect 99,5 %	Fluka	60353
Dinatriumhydrogenphosphat, Dihydrat, MicroSelect 99 %	Fluka	71644
E2-17-Glucuronid Natriumsalz	Steraloids	E1073-060
E2-17-Sulfat Natriumsalz	Steraloids	E1103-000
E2-3-Glucuronid Natriumsalz	Steraloids	E1072-060
E2-3-Sulfat Natriumsalz	Steraloids	E1100-000
E2-6-Carboxymethyloxim:BSA	Sigma-Aldrich	E5630
EE2-17-Glucuronid Natriumsalz	Steraloids	
EE2-3-Glucuronid Natriumsalz	Steraloids	E1560-000
EE2-3-Sulfat Natriumsalz	Steraloids	E1576-000
Enhanced K-Blue® Substrate (TMB)	NEOGEN	308171
Essigsäure (Eisessig), 100 %, wasserfrei	Merck	1.595.200.100

Essigsäure, 99,5 %, p.a.	Fluka	45730
Estradiol (E2) 99,8 %	Sigma-Aldrich	46550
Estriol (E3)	Steraloids	E2600-000
Estron (E1)	Steraloids	E2300-000
Ethanol, wasserfrei, 99,5 %	Merck	1.590.090.050
Ethinylestradiol	Sigma-Aldrich	E4876-1G
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dikaliumsalz Dihydrat, puriss., p.a., 99,0 %	Fluka	3660
Ethylenglycol, 99,8 %, Riedel-de Haën®	RdH	34907
Glutaraldehyd 25 % Lösung in Wasser	Aldrich	G400-4
Glutarsäureanhydrid zur Synthese	Merck	8.206.040.005
Guardian™ (Stabilisierungspuffer)	Perbio	37548
Huminsäure	Roth	7821.1
Kaliumdihydrogencitrat, p.a.	Fluka	60215
Kaliumdihydrogenphosphat, MicroSelect 99,5 %	Fluka	60219
K-Blue® Aqueous Substrate (TMB)	NEOGEN	307171
K-Blue® Low Activity Substrate (TMB)	NEOGEN	306171
K-Blue® MAX Substrate (TMB)	NEOGEN	304171
Meerrettichperoxidase (POD)	Roche	814393
N,N'-Dimethylacetamid	Merck	8.03235.1000
N,N'-Dimethylformamid, puriss. 99,8 %	Fluka	40248
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, 99 %	Aldrich	D-8,000-2
Natriumcarbonat, MicroSelect 99,5 %	Fluka	71345
Natrium(meta)periodat, ultra, 99,5 %	Fluka	71859
Natriumacetat, wasserfrei, p.a.	Merck	4090520
Natriumazid, reinst	Merck	66.880.100
Natriumborhydrid 99 %	Aldrich	21,346-2
Natriumchlorid, ultra, MicroSelect 99,5 %	Fluka	71378
Natriumdihydrogenphosphat, Dihydrat, MicroSelect 99 %	Fluka	71502
Natriumhydrogencarbonat, MicroSelect 99,5 %	Fluka	71627
N-Hydroxysuccinimid, zur Synthese	Merck	8.045.180.025
Red Stop Solution	NEOGEN	301474
Rinderserumalbumin (BSA)	VWR	7341313
Schwefelsäure 95-97 %, p.a.	Merck	1.007.312.511
Sorbinsäure Kaliumsalz, p.a. 99 %	Fluka	85520
SuperBlock®	Perbio	37515
Tetrabutylammonium-borhydrid, purum,	Fluka	86855

Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Fluka	93362
Tween® 20, reinst	Serva	S3740
Wasserstoffperoxid 30 %, p.a.	Fluka	95302

### 3.2 ESTR-A-LISER

Die hier aufgelisteten Geräte (Tabelle 3.3) und Chemikalien (Tabelle 3.4) sind speziell für die Verwendung des Automaten erforderlich. Hinzu kommen die in Kapitel 3.1 aufgelisteten Geräte und Chemikalien für die Durchführung des Immunoassays.

**Tabelle 3.3:** Auflistung der Geräte, die für den ESTR-A-LISER und seine Nutzung verwendet wurden. Bestandteile des ESTR-A-LISER Automaten sind mit \* gekennzeichnet.

Geräte	Hersteller
Behälter für Abwasser, 2,5 L	
Behälter für Waschpuffer, 2,5 L	
Glasvials 1,5 - 2 mL $\varnothing \leq 12$ mm	Roth
Glasvials 15 mL 200 St. 52 x 24 mm (h x $\varnothing$ )	Roth
MiniPrep 60*	TECAN
Pasteur Pipetten	Roth
Programmiertool Delphin5.01*	Borland
Schnappdeckelgläser 30 mL 45 St. 64 x 31 mm (h x $\varnothing$ )	VWR
Steuersoftware*	quo data
Sunrise™ Reader*	TECAN
Temperierung etc. nach Peltier, Eigenentwicklung *	SBU Waldheim

**Tabelle 3.4:** Auflistung der Chemikalien, die speziell für die Anwendung des Immunoassays auf dem ESTR-A-LISER verwendet wurden.

Chemikalien	Hersteller	Bestellnummer
Liquid Cleaning Daily System Clear	TECAN	30000938
Liquid Cleaning Setup Clean	TECAN	30000937
Methanol	Roth	4627.2

### 3.3 Feldstudie

Bei der Probenahme für die Feldstudie wurden folgende Geräte verwendet: Eimer 10 L Edelstahl, Glastrichter, Schöpfkelle Edelstahl, Seil und Vorratsflaschen für die Proben. Die Geräte für die Filtration (Tabelle 3.5) sowie Geräte und Chemikalien (Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7) für die Festphasenextraktion (SPE) sind im Anschluss in Tabellen aufgelistet.

**Tabelle 3.5.:** Auflistung der bei der Probenfiltration verwendeten Geräte.

Geräte	Hersteller
100 Sterican Ø 1,20 × 40 mm Einmalkanüle,	Braun Melsungen AG
Faltenfilter 615 1/4, Ø 18,5 cm, 85 g m <sup>-2</sup>	Macherey-Nagel GmbH
GHP Acrodisc® 13 mm, 0,2 µm Membran	Gelman Lab., Pall Corp.
Glasfaserfilter GF 8 Rundfilter Ø 10 cm	Schleicher & Schuell GmbH
Injekt-F 5 mL Feindosierungsspritze	Braun Melsungen AG
Membranfilter ME 25, 0,45 µm Mischester	Schleicher & Schuell GmbH
Selectron Glas-Vakuum-Filtrationsgerät GV 100	Schleicher & Schuell GmbH
Sephadex™ PD 10 columns G25-M	Amersham Biosciences

**Tabelle 3.6:** Auflistung der bei der Festphasenextraktion (SPE) verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller
Adapter für Säulen, Teflon	Alltech Associates, Inc.
Auslassnadeln: Teflon Nadeln	Alltech Associates, Inc.
Durchflusshähne, Vacuum Stopcocks	Roth
Schläuche 1/8 " OD Teflon Tubing	Alltech Associates, Inc.
SLS 02 Evaporator	SLS Färber-Skutlarek GbR
Strata X™ 200 mg/6 mL Part. No. 8B-S100-FCH	Phenomenex Ltd.
Vakuumkammer 16 Port	Alltech Associates, Inc.
1 L Weck-Gläser, Tulpenform	Weck GmbH

**Tabelle 3.7:** Auflistung der bei der Festphasenextraktion (SPE) verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Bestellnummer
Aceton RotiSolv® HPLC	Roth	7328.2
Hexan RotiSolv® HPLC	Roth	7339.1
Methanol, RotiSolv® HPLC Gradient Grade	Roth	7342.1
Silicagel Si60 Partikelgröße 63 - 200µm	Merck	1.07734.1000
Stickstoff 5.0	Praxair	



## 4 Methoden

Die Methoden dieser Arbeit sind in den folgenden Kapiteln gegliedert nach Arbeitsschwerpunkten: Entwicklung und Optimierung des ELISA, Entwicklung und Optimierung des ESTR-A-LISER und Feldstudie. Die häufig erwähnten Parameter A, B, C, und D entstammen der 4-Parameter-Kurve (Kapitel 2.3.6.1) und wurden mit Hilfe des Programms „Softmax Pro“ der Firma Molecular Devices Corp am Photometer ermittelt, wenn die Daten von einer MTP stammen. Daten von verschiedenen MTPs oder normierte Daten wurden durch Kurvenanpassung mit dem Programm Origin (Version 6.1, OriginLab Corporation) erstellt.

### 4.1 Entwicklung und Optimierung des ELISA

Ausgangspunkt dieser Arbeit war ein kompetitiver Immunoassay mit Doppelantikörpertechnik<sup>30</sup>, basierend auf einem kommerziellen Anti-Rabbit-Antikörper sowie dem E2-Antikörper und dem dazugehörigen Tracer der Arbeitsgruppe Meyer, Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel, Weihenstephan, Technische Universität München (TUM). Im Hinblick sowohl auf die geplante Automatisierung als auch auf ein möglichst gut handhabbares Assayformat für die manuelle Bearbeitung wurde das Assay-Protokoll (siehe Tabelle 4.7) angepasst. Ziel der Optimierungsansätze war das Erreichen einer sehr guten Empfindlichkeit des ELISA bei ausreichend großer optische Dichte (OD).

Im Folgenden wird zunächst die Herstellung der verwendeten Lösungen beschrieben. Im Anschluss daran folgt die Beschreibung der Entwicklung und Optimierung des ELISA.

#### 4.1.1 Pufferlösungen

Für die Durchführung der Immunoassays wurden verschiedene Puffer benötigt. Zum Ansetzen der Lösungen wurde stets Reinstwasser<sup>31</sup> verwendet. Die im folgenden aufgeführten Mengenangaben beziehen sich immer auf ein Volumen von 500 mL. Die Angaben der ersten Spalte beschreiben einfach konzentrierte Gebrauchslösungen, die

---

<sup>30</sup> Als Doppelantikörpertechnik werden ELISA-Formate bezeichnet, bei denen die MTP mit einem sogenannten „sekundären Antikörper“ beschichtet wird, der den sogenannten „primären Antikörper“ bindet.

<sup>31</sup> Reinstwasser ist deionisiertes Wasser, welches mit Hilfe einer Milli-Q Anlage zusätzlich gereinigt wurde (inklusive UV-Bestrahlung und Filtration durch 0,2 µm).

zweite Spalte enthält Angaben für eine höher konzentrierte Vorratslösung. Die Vorratslösungen wurden bei 4°C gelagert, die Gebrauchslösungen bei Raumtemperatur (RT). Lediglich die Zitratlösung für den Substratpuffer wurde als einfach konzentrierte Gebrauchslösung angesetzt und bei 4°C gelagert.

Zur Beschichtung der Mikrotiterplatten (MTP) wurde der Antikörper im sogenannten Coating-Puffer (Tabelle 4.1) verdünnt.

**Tabelle 4.1:** Einwaage zur Herstellung der Gebrauchslösung (1 x) und der Vorratslösung (10 x) des Coating-Puffers pH 9,6.

Konzentration	1 x	10 x
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,80 g	7,95 g
NaHCO <sub>3</sub>	1,47 g	14,65 g
NaN <sub>3</sub>	0,10 g	1,0 g

Zum Auswaschen der Kavitäten und zur Entfernung überschüssiger Reagenzien wurde ein tensidhaltiger Phosphatpuffer verwendet. Im Folgenden wird dieser Waschpuffer als PBS 1<sup>32</sup> (Tabelle 4.2) bezeichnet. Da von diesem Puffer ein großes Volumen benötigt wurde, empfiehlt es sich, ein Konzentrat, z.B. 60-fach, anzusetzen. Die Gebrauchslösung wurde jeweils kurz vor der Verwendung aus der Vorratslösung angesetzt.

**Tabelle 4.2:** Einwaage zur Herstellung der Vorratslösung (60 x) des PBS 1 – Wasch-Puffer pH 7,6.

Konzentration	60 x
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,95 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	32,66 g
Kaliumsorbat	0,10 g
Tween 20	15 mL

Die Antikörper-Tracer Wechselwirkung ist in einem physiologischen Assay-Puffer optimal. Dieser Puffer wurde hier mit dem Kürzel PBS 2 (Tabelle 4.3) bezeichnet.

<sup>32</sup> PBS steht für phosphate buffered saline.

**Tabelle 4.3:** Einwaage zur Herstellung der Gebrauchslösung (1 x) und der Vorratslösung (5 x) des PBS 2 – Assay-Puffers pH 7,6.

Konzentration	1 x	5 x
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,78 g	3,90 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6,23 g	31,15 g
NaCl	4,25 g	21,25 g

Der für die Substratreaktion benötigte Puffer basiert auf einer Zitratlösung (Tabelle 4.4).

**Tabelle 4.4:** Einwaage zur Herstellung der Gebrauchslösung (1 x) der Zitratlösung pH 4,0. Lagerung bei 4°C.

Konzentration	1 x
KH <sub>2</sub> -Zitrat	25,59 g
Kaliumsorbat	0,05 g

Der eigentliche Substratpuffer beruht auf einer Lösung von stabilisiertem Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid in Zitratlösung (FREY et al. 2000). Das TMB wurde in Gegenwart von Tetrabutylammoniumborhydrid (TBABH) in Dimethylacetamid (DMA) gelöst. Das Hydrid verhindert eine vorzeitige Oxidation des TMB, DMA als polares aprotisches Lösungsmittel verhindert eine Ausfällung des TMB bei langer Lagerung. In gemischter Form ist die Stabilität der Lösung auf wenige Stunden begrenzt, getrennt sind die Komponenten über Monate haltbar. In Tabelle 4.5 ist die Zusammensetzung der TMB-Lösung aufgeführt; Tabelle 4.6 beschreibt die Mischungsverhältnisse der drei Komponenten mit Angaben für eine MTP mit 96 Kavitäten.

**Tabelle 4.5:** Einwaage zur Herstellung der Gebrauchslösung (1 x) der stabilisierten TMB-Lösung.

Konzentration	1x
TMB	9,86 g
TBABH	2,11 g
DMA	1000 mL

**Tabelle 4.6:** Herstellung der Gebrauchslösung (1 x) des Substrat-Puffers.

Konzentration	1x
Zitratlösung	21,0 mL
Wasserstoffperoxid <sup>33</sup>	8,3 µL
TMB-Lösung	540,0 µL

<sup>33</sup> Perhydrol, 30 %ig.

### 4.1.2 Stammlösungen und Verdünnungen

Die E2-Standardlösungen für die ELISA-Messungen wurden aus Verdünnungen der Stammlösungen (E2 gelöst in Ethylacetat) hergestellt. Dazu wurden 10,00 mg in 100 mL Ethylacetat gelöst. Die im Test eingesetzten wässrigen Lösungen liegen im Konzentrationsbereich von 0,001 - 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Der höchste Standard wurde direkt aus der Stammlösung hergestellt, wobei der Gehalt an Ethylacetat 1 % beträgt. Um eine logarithmische Skala äquidistant einzuteilen, wurden die weiteren Standards durch sechs Verdünnungsschritte des Faktors 10 mit Reinstwasser erstellt.

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivitäten wurden von folgenden Substanzen methanolische Stammlösungen hergestellt: Estron (E1), Estriol (E3), Ethinylestradiol (EE2), E2-3-Glucuronid, E2-3-Sulfat, E2-17-Sulfat, E2-17-Glucuronid, EE2-3-Sulfat, EE2-3-Glucuronid und EE2-17-Glucuronid. Dazu wurden, je nach Verfügbarkeit der Substanzen, zwischen 1 und 1000 mg eingewogen, in möglichst wenig Methanol gelöst und anschließend auf 25 mL im Messkolben mit Reinstwasser aufgefüllt.

Die Verdünnungen wurden in 10 mL Braunglasflaschen mit Teflonseptum angesetzt und bei + 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Diese Verdünnungen waren über mehrere Wochen stabil und wurden nach Erschöpfung des Vorrats neu aus den Stammlösungen angesetzt. Vor der Messung wurden die Lösungen auf Raumtemperatur gebracht.

### 4.1.3 Ausgangssituation der Optimierung und Entwicklung des ELISA

Das ursprüngliche Assay-Protokoll (Tabelle 4.7) der Arbeitsgruppe Prof. Meyer (TUM) war der Ausgangspunkt für die Optimierung des ELISA.

Sowohl für den Einsatz bei Routineuntersuchungen als auch für die Anwendung mit dem ESTR-A-LISER sollte das Assay-Format möglichst einfach und kurz sein. Dazu musste ausgehend vom ursprünglichen Arbeitsprotokoll zum einen die Dauer des Assays von mehr als einem Tag, insbesondere die Inkubationszeit über Nacht, auf wenige Stunden verkürzt werden. Zum anderen sollten die im ursprünglichen Testprotokoll vorgesehenen tiefen Temperaturen während der Inkubation vermieden werden.

Aus diesen Vorgaben heraus ergab sich Assay-Protokoll 1 (siehe Tabelle 4.8), mit dem die weiteren Optimierungsschritte erfolgten. Dazu wurden:

- verschiedene kommerziell erhältliche sekundäre Anti-Rabbit-Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen mit einander verglichen sowie
- die Erhöhung des Beschichtungsvolumens pro Kavität von 100 auf 200  $\mu\text{L}$  untersucht.

Mit diesem Assay konnte für unsere Zielsetzung keine ausreichende Optimierung erreicht werden, daher wurden sowohl die Gewinnung von Antikörpern in Auftrag gegeben (Kapitel 4.1.4), als auch der Tracer neu synthetisiert (Kapitel 4.1.7).

**Tabelle 4.7:** Assay-Protokoll Weihenstephan (Mündliche Mitteilung der Arbeitsgruppe Meyer, TUM, 2002), fett kursiv markiert sind die zu ändernden Parameter (IgG wird als Abkürzung für Antikörper verwendet).

Arbeitsschritt:	Substanz	Konzentration Verdünnung	Menge [ $\mu\text{L}$ ]	Zeit	Temperatur
<b>Beschichtung</b> (sekundärer IgG)	Anti-Rabbit-IgG	1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$	100	über Nacht	5°C
<b>Blocking</b>	PBS mit 0,1 % BSA		100	30 min	RT
<b>Standards/Probe</b>	Probe bzw. E2	0-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$	20		
<b>Tracer</b>	Enzym-Hormon- Konjugat	1:40 000	100	<i>über Nacht</i>	<b>6-8°C</b>
<b>primärer IgG</b>	Anti-E2-IgG	1:200 000	100		
<b>Substrat</b>	Zitrat-/TMB- Lösung		150	40 min	25°C
<b>Stopplösung</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2M	50		RT
Messung der optischen Dichte (450 nm)					

**Tabelle 4.8:** Assay-Protokoll 1, Waschschritte erfolgten jeweils vor dem Hinzugeben des Standards und des Substrates. IgG wird als Abkürzung für Antikörper verwendet.

Arbeitsschritt:	Substanz	Konzentration Verdünnung	Menge [ $\mu\text{L}$ ]	Zeit [min]	Temperatur
<b>Beschichtung</b> (sekundärer IgG)	Anti-Rabbit-IgG	1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$	100	über Nacht	20°C
<b>Blocking</b>	PBS mit 0,1% BSA		110	30	RT
<b>primärer IgG</b>	Anti-E2-IgG	1:200 000	100	10	RT
<b>Standards/Probe</b>	Probe bzw. E2	0-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$	20	15	RT
<b>Tracer</b>	Tracer Meyer	1:40 000	100	30	RT
<b>Substrat</b>	nach FREY et al. (2000)		150	40	25°C
<b>Stopplösung</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 M	50		RT
Messung der optischen Dichte (450 nm)					

Während der Optimierung, basierend auf dem neuen Antikörper mit der Bezeichnung „BN 2578“, wurde das Assay-Protokoll 2 (Tabelle 4.9), angepasst an die jeweilige Fragestellung, verwendet. Im Unterschied zu dem vorherigen Protokoll wird die MTP direkt

mit dem E2-Antikörper beschichtet. Da während der Testentwicklung zwei verschiedene Tracer verwendet wurden, wird das Assay-Protokoll unter Verwendung von Tracer 1 hier Assay-Protokoll 2a genannt. Wenn Tracer 2 verwendet wurde, ist das Assay-Protokoll mit 2b gekennzeichnet.

**Tabelle 4.9:** Assay-Protokoll 2, Waschschritte erfolgten jeweils vor dem Hinzugeben des Standards und des Substrates. Es wurde entweder Tracer 1 in der Verdünnung 1:30 000 (Assay-Protokoll 2a) oder Tracer 2 in der Verdünnung 1:100 000 (Assay-Protokoll 2b) verwendet.

Arbeitsschritt:	Substanz	Konzentration Verdünnung	Menge [ $\mu\text{L}$ ]	Zeit [min]	Temperatur
<b>Beschichtung</b>	BN 2578	1:10 000	100	über Nacht	20°C
<b>Standard</b>	E2	0-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$	100	20	RT
<b>Tracer</b>	Tracer 1	1:30 000	100	30	RT
	Tracer 2	1:100 000	100	15	RT
<b>Substrat</b>	nach FREY et al. (2000)		200	30	RT
<b>Stopplösung</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 M	50		RT
Messung der optischen Dichte (Differenzmessung von 450 nm-650 nm)					

Entsprechend den Fragestellungen wurden während der Optimierung ein oder mehrere Parameter des Assay-Protokolls variiert und miteinander verglichen. Grundsätzlich wurden die Versuche so angelegt, dass alle Varianten mindestens in zweifacher Wiederholung ( $n = 2$ ) auf jeder MTP vorkamen sowie die MTP mindestens doppelt vorlagen. Wenn nur eine MTP zu einer Fragestellung verwendet wurde, wurden alle Varianten mindestens dreifach, meist jedoch vierfach wiederholt ( $n = 4$ ).

#### 4.1.4 Immunisierung und Gewinnung von Antikörpern

Zur Gewinnung von Antikörpern wurden Kaninchen mit einem Proteinkonjugat des E2 immunisiert. Bei diesem Konjugat handelt es sich um E2-6-Carboxymethyloxim gekoppelt an BSA, welches käuflich erworben wurde. Bei den Kaninchen handelte es sich um "New Zealand White Rabbits". Die gesamte Antikörperproduktion wurde vom Anbieter Eurogentec (EGT Group, Belgien) durchgeführt und folgte einem zweimonatigem Protokoll (siehe Tabelle 4.10).

Zur Kontrolle des Immunisierungsfortschritts wurde ein indirekter Immunoassay durchgeführt. Dazu wurde die MTP mit dem bereits zur Immunisierung verwendeten Proteinkonjugat des E2 beschichtet. Die in den Blutproben enthaltenen Antikörper binden

sich entsprechend ihres Antikörpergehalts an das Proteinkonjugat und wurden mit Hilfe eines käuflich erworbenen Antikörper-Peroxidase-Konjugats, welches an Kaninchen-Antikörper bindet, detektiert.

**Tabelle 4.10:** Immunisierungsprotokoll. Vor Beginn der Immunisierung wurden zur Bestimmung des bereits vorhandenen IgG-Titers Präimmunsereen entnommen und dienten im Rahmen der Immunisierung als Kontrolle zu den Proben, die am Tag 38 und 66 der Immunisierung entnommen wurden. Injektionen des Proteinkonjugats in Mischung mit Freund's Adjuvantien erfolgten zu den mit X gekennzeichneten Terminen.

Tag	0	14	28	38	56	66
Injektion	X	X	X		X	
Blutung [ml]	2			2		50

Dieser Immunoassay wurde in Form einer „Checkerboard-Titration“ durchgeführt um festzustellen, ob spezifische Antikörper gegen E2 im Serum vorliegen. Dabei wurden auf der MTP spaltenweise die Verdünnung des Immunogens (E2-6-Carboxymethyloxim gekoppelt an BSA) erhöht und gleichzeitig reihenweise das Serum stärker verdünnt (siehe Abbildung 4.1).

Verdünnung des E2-6-CMO-BSA;		1:100		1:500		1:1000		1:5000		1:10000		Kein E2-6-CMO-BSA	
Verdünnung des Serums		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:100	A												
1:500	B												
1:1000	C												
1:5000	D												
1:10 000	E												
1:50 000	F												
1:100 000	G												
Kein Serum	H												

**Abbildung 4.1:** Pipettierschema zur Checkerboard-Titration für die Überprüfung der gelieferten Blutseren auf spezifische E2-Antikörper. Die Verdünnung des Serums erfolgte reihenweise, die Verdünnung des E2-6-CMO:BSA spaltenweise.

Der Assay wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

**Tabelle 4.11:** Assay-Protokoll zur Checkerboard-Titration für die Überprüfung des gelieferten Blutserums auf spezifische E2-Antikörper.

Arbeitsschritt: Substanz	Konzentration Verdünnung	Menge [ $\mu\text{L}$ ]	Zeit [min]	Temperatur
<b>Beschichtung</b> E2-6-CMO-BSA	0 - 1:10 000	100	über Nacht	20°C
<b>Blocking</b> Casein	1 %	110	60	RT
<b>Antikörper</b> BN 2578	0 - 1:100 000	100	120	RT
<b>Anti-Rabbit IgG-POD</b> Sigma A8275	1:170 000	100	30	RT
<b>Substrat</b> nach FREY et al. (2000)		200	10	RT
<b>Stopplösung</b> $\text{H}_2\text{SO}_4$	2 M	50		RT
<b>Messung der optischen Dichte</b> (Differenzmessung von 450 nm-650 nm)				

#### 4.1.5 Verdünnung und Volumen des Antikörpers

In diesem Arbeitsschritt wurden verschiedene Verdünnungen und Volumina des Antikörpers untersucht und miteinander verglichen. Im weiteren werden aber nur die wichtigsten Optimierungsschritte aufgezeigt, in denen das Serum hinsichtlich seiner Affinität bezüglich E2 untersucht wurde. Um herauszufinden welche Antikörperverdünnung für das direkte Beschichten optimal ist, wurde das Serum in vier verschiedenen Verdünnungsstufen (1:10 000, 1:20 000, 1:30 000 und 1:40 000) getestet. Dies erfolgte anhand des Assay-Protokolls 2a (siehe Tabelle 4.9) und des unten aufgeführte Pipettierschemas (siehe Abbildung 4.2). Die Auswirkungen des Beschichtungsvolumens (100  $\mu\text{L}$ , 150  $\mu\text{L}$  und 200  $\mu\text{L}$ ) wurden ebenfalls in Anlehnung an das Assay-Protokoll 2a genauer untersucht.

Serum (Verdünnung)	BN 2578 (1:10 000)			BN 2578 (1:20 000)			BN 2578 (1:30 000)			BN 2578 (1:40 000)		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>E2- [<math>\mu\text{g/L}</math>]</b>												
0 A												
0,001 B												
0,01 C												
0,1 D												
1 E												
10 F												
100 G												
1000 H												

**Abbildung 4.2:** Typisches Pipettierschema für vier verschiedene Untersuchungsvarianten am Beispiel der Antikörperverdünnungen.



#### 4.1.6 Lagerung der Seren

Drei verschiedene Lagerungsvarianten wurden zunächst getestet und dann umgesetzt. Dabei handelt es sich um folgende Maßnahmen:

- Einfrieren des Serums bei  $-20^{\circ}\text{C}$  (im folgenden Kontrolle genannt),
- Konservierung mit 0,1 % Azid und Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$  sowie
- Lyophilisierung mit anschließender Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Diese drei Varianten konnten in vierfacher Wiederholung auf jeder MTP nach dem Assay-Protokoll 2a miteinander verglichen werden. Die Untersuchung erfolgte auf drei verschiedenen MTP und Parameter A und C wurden für alle Varianten mit Hilfe der 4-Parameter-Funktion berechnet.

Zum Vergleich der Auswirkungen der Lagervarianten auf den ELISA wurde der prozentuale Anteil der Parameter A und C bezogen auf die Kontrolle für jede MTP einzeln nach Gleichung 4.1 berechnet.

$$\text{Parameter}_{(\text{prozentual})} = \frac{\text{Parameter}_{(\text{Variante})} * 100}{\text{Parameter}_{(\text{Kontrolle})}}$$

**Gleichung 4.1:** Berechnung des prozentualen Anteils der Parameter bezüglich der Kontrolle

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Für die Kontrolle konnte jedoch keine Standardabweichung angegeben werden, da sie auf jeder MTP die jeweilige Bezugsgröße war.

Für die Lagerung wurde das Serum in Aliquots unterschiedlicher Volumina ( $50\ \mu\text{L}$ ,  $100\ \mu\text{L}$ ,  $500\ \mu\text{L}$  und  $2\ \text{mL}$ ) aufgeteilt und in den drei untersuchten Lagerungsvarianten aufbewahrt. Die Untersuchungen in dieser Arbeit erfolgten mit bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagertem Serum. Für die Größe des aufgetauten Aliquots war die Anzahl der folgenden Tests entscheidend, da einmal aufgetaute Seren nicht mehr eingefroren, sondern möglichst bald aufgebraucht wurden.

#### 4.1.7 Tracersynthese: Kopplung von 3,17 $\beta$ -Dihydroxy-1,3,5(10)-17estratrien-6-on-(carboxymethyloxim) an Meerrettichperoxidase (E2-POD)

Im Laufe der Untersuchungen fanden zwei verschiedene Tracer Verwendung. Zuerst wurde der im weiteren Verlauf Tracer 1 genannte Tracer synthetisiert, welcher bis Juli

2004 verwendet wurde. Der nachfolgende Tracer, Tracer 2 genannt, wurde nach der Carbodiimid-Methode synthetisiert.

Für Tracer 1 erfolgte die Kopplung von 3,17 $\beta$ -Dihydroxy-1,3,5(10)-17estratrien-6-on-(carboxymethyloxim) (E2-6-CMO) an Meerrettichperoxidase (POD) in Analogie zu einer Synthese für entsprechende Konjugate des Progesterons (MUNRO und STABENFELDT 1984). Diese Synthese basiert auf der „Gemischtes-Anhydrid-Methode“, bei der zunächst unter wasserfreier Reaktionsführung ein Carbonsäurederivat des Steroids (E2-6-CMO) mit einem Säurechlorid (Isobutylchloroformat) zum gemischten Anhydrid kondensiert. In einem zweiten Reaktionsschritt reagiert das Anhydrid mit endständigen Aminofunktionen der Lysinreste des Enzyms unter Ausbildung von Amidbindungen ab.

Das E2 Derivat (0,939 mg) wurde in Gegenwart von 0,4  $\mu$ L *N*-Methylmorpholin in 50  $\mu$ L *N,N*-Dimethylformamid (DMF) bei  $-15^{\circ}\text{C}$  unter Schutzgas mit 0,327  $\mu$ L Isobutylchloroformat aktiviert. Nach dreiminütigem Rühren wurde die Lösung (tropfenweise) zu einer POD-Lösung (2,5 mg) in einem Gemisch bestehend aus 25  $\mu$ L Wasser und 15  $\mu$ L DMF bei ebenfalls  $-15^{\circ}\text{C}$  pipettiert. Die rötliche Lösung wurde über eine Stunde gerührt und langsam auf  $0^{\circ}\text{C}$  erwärmt, das Rühren wurde bei  $0^{\circ}\text{C}$  für zwei weitere Stunden fortgesetzt. Anschließend wurde der Ansatz vollständig auf eine mit TBS-Puffer (pH 7,5; 0,1 M Tris; 0,15 M NaCl) konditionierte Sephadex G-25 Säule gegeben. Zur Elution fand gleichfalls der TBS-Puffer Verwendung. Es wurden Fraktionen zu je 4 Tropfen in einer MTP gesammelt; die Identifikation des Konjugats erfolgte photometrisch anhand der Absorption der Peroxidase bei 405 nm (sog. Soret-Bande). Zur Stabilisierung wurde eine 1:2 Mischung des Konjugats mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung erstellt.

Für die Synthese von Tracer 2 erfolgte die Kopplung von E2-6-CMO an POD nach der Carbodiimid-Methode (SCHNEIDER und HAMMOCK 1992). Im Unterschied zu der oben genannten Methoden wird für die Aktivierung die Säuregruppe des Haptens zunächst mit *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) verestert. In einem zweiten Reaktionsschritt findet die Kopplung des reaktiven Esters an die Meerrettichperoxidase statt.

Zur Aktivierung wurden 2,5  $\mu$ mol des Haptens E2-6-CMO (3,754 mg) und je 2,5  $\mu$ mol NHS (1,16 mg) und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC, 2,04 mg) in 120  $\mu$ L wasserfreiem DMF gelöst. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am nächsten Tag konnte die Lösung 10 min bei  $14.000 \text{ U min}^{-1}$  zentrifugiert (Abtrennung des schwerlöslichen Dicyclohexylharnstoff-derivats) werden. Die Lösung von 6,8 mg POD erfolgte in 600  $\mu$ L Carbonatpuffer (0,13 M  $\text{NaHCO}_3$ ). In diese Lösung wurden 60  $\mu$ L vom Überstand des aktivierten Esters tropfenweise hinzugegeben und das Gemisch 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Die Aufreinigung erfolgte analog zu Tracer 1. Die Fraktionen 16-24 mit der höchsten Absorption bei 405 nm wurden vereinigt und später zu einer zweiten Aufreinigung erneut über eine mit TBS-Puffer konditionierte Sephadex G-25 Säule gegeben. Wiederum wurden die Fraktionen mit der höchsten Absorption (Fraktionen 7 bis 10) vereinigt. Zur Stabilisierung wurde eine 1:1 Mischung des Konjugats mit kommerziell erworbenem Stabilisierungspuffer (Guardian™, Perbio) verwendet. In dieser Arbeit werden für den Tracer die relativen Verdünnungen, bezogen auf das aufgereinigte Produkt der Tracersynthese, angegeben.

#### **4.1.8 Verdünnung des Tracers sowie Vorinkubationszeiten und Inkubationszeiten von Standards und Tracer**

Ziel der weiteren Optimierungsschritte war es zum einen, ein möglichst empfindliches Testformat zu finden, welches eine Automatisierung mit Hilfe einer Pipettierstation ermöglicht. Für diese Automatisierung ist aus technischen Gründen eine Mindestdauer für jeden Pipettierschritt von 32 min notwendig. Zum anderen sollte ein möglichst sensitiver Assay für die manuelle Durchführung entwickelt werden, der nicht an die Restriktionen des Automaten gebunden ist. Neben der Sensitivität war hier auch die Kürze der Testdurchführung entscheidend.

Im weiteren Vorgehen wurden Versuche zu den Assay-Parametern Vorinkubationszeit der Standards, Inkubationszeiten der Tracer sowie Verdünnung des Tracers durchgeführt. Die ersten Versuche waren einfaktoriell angelegt, die nicht untersuchten Testparameter entsprachen dem Assay-Protokoll 2a. Die Kalibrationskurven zu den verschiedenen Testbedingungen wurden berechnet und die Parameter A, C und D miteinander verglichen. Die Verdünnung des Tracers 1 wurde zunächst einfaktoriell über verschiedene Verdünnungsstufen (1:10 000 – 1:50 000) untersucht. Bei Tracer 2 war die Ermittlung der geeigneten Tracer-Verdünnung Bestandteil eines mehrfaktoriellen Versuchs, auf den in Kapitel 4.2.2 weiter eingegangen wird.

In einer Testreihe wurden die Vorinkubationszeiten der Standards von 0, 15, 30 und 45 min miteinander verglichen. In einer zweiten Testreihe betrugen die Inkubationszeiten des Tracers 15, 30, 45 und 60 min.

#### 4.1.9 Blocking

Der Blockingschritt wird eingesetzt um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Daher wurden in dieser Arbeit die folgenden Substanzen auf ihre Blocking-Eigenschaften hin untersucht:

- PBS 2 (Kontrolle),
- Casein 1 % in PBS 2,
- BSA 0,1 % in PBS 2,
- Tween 0,5 % in PBS 2,
- Superblock (Perbio) und
- Blocking Solution (Neogen).

In Abweichung zum Assay-Protokoll 2a wurde das Blocking in drei verschiedenen Varianten getestet:

- I. 30 min Blocking mit anschließendem Waschschrift nach dem Beschichten mit dem Antikörper und vor der Zugabe der Standards,
- II. während der Tracer-Inkubation (Ansetzen des Tracers in der Blocking-Lösung) und
- III. eine Kombination aus Variante I und Variante II.

Diese Varianten wurden in zweifacher Wiederholung auf jeweils zwei verschiedenen MTP untersucht. Nach Berechnung der Kalibrationskurven konnten im Folgeschritt Mittelwerte und Standardabweichungen der Parameter A, C und D berechnet werden.

#### 4.1.10 Substrat

Grundsätzlich wurde bei allen Untersuchungen für die Substratreaktion das TMB-System in der Variante nach FREY und Mitarbeitern verwendet (2000). Das jeweils verwendete Volumen betrug für jede Kavität 200 µL, die Entwicklungszeit dauerte 30 min. Um die Frage zu klären, ob kommerziell angebotene Substrate insbesondere auch für die Anwendung im Automaten Vorteile hinsichtlich der Handhabbarkeit, der Signalintensität und Signalstabilität haben, wurden folgende Substrate getestet:

- Variante nach FREY et al. (2000)
- TMB-Lösung der Firma Sigma
- K-Blue® Aqueous
- Enhanced K-Blue®
- K-Blue® MAX
- K-Blue® Low Activity.

Die letzten vier Substrate basieren ebenfalls auf TMB und werden von der Firma Neogen angeboten. Der ELISA erfolgte nach Assay-Protokoll 2a, abgesehen von der Änderung,

dass auf Grund der gering verfügbaren Menge der kommerziellen Substrate nur 150  $\mu\text{L}$  für jede Kavität eingesetzt wurden. Auf jeder MTP lagen alle sechs Varianten über den gesamten Konzentrationsbereich der Standardkurve in zweifacher Wiederholung vor. Insgesamt wurden zwei MTP verwendet.

Um die Entwicklung und die Stabilität des Substrates besser beobachten zu können, wurde sofort nach der Substratzugabe eine kinetische Messung über 60 min (im 3-Minuten-Takt) bei 650 nm im Photometer durchgeführt. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  erfolgte die Endpunktbestimmung wie üblich mit einer Differenzmessung bei 450 nm und 650 nm und die Kalibrationskurven wurden ermittelt. Zum Vergleich der Auswirkungen der Substratvarianten auf den Parameter A wurde der prozentuale Anteil bezogen auf die Variante nach FREY et al. (2000) für jede MTP einzeln nach Gleichung 4.1 berechnet. Daraufhin erfolgte die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen. Für die Kontrolle (Variante nach FREY et al. (2000)) konnte jedoch keine Standard-abweichung angegeben werden, da sie auf jeder MTP die jeweilige Bezugsgröße war.

#### 4.1.11 Stopplösungen

Zur Überprüfung der Stabilität der OD nach dem Abstoppen der Substratreaktion, fand der Vergleich verschiedene Stopplösungen statt. Basis hierfür war wiederum das Assay-Protoll 2a. Für alle untersuchten Varianten wurden die Standardkurven in vierfacher Wiederholung auf jeder MTP aufgetragen. Auf der ersten MTP wurden die Varianten 1 M HCl, 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  untersucht, auf der zweiten das kommerziell bei der Firma Neogen erhältliche Produkt Red Stop Solution in zwei unterschiedlichen Volumina (50  $\mu\text{L}$  pro Kavität im Vergleich zu 100  $\mu\text{L}$  ). Die OD-Messung der zweiten MTP erfolgte auf Grund der Rotfärbung bei 650 nm.

In beiden Fällen wurde nach dem Abstoppen zunächst eine Endpunktmessung durchgeführt, die der Berechnung der vier Parameter diene. Anschließend folgten 60 Minuten lang im 3-Minuten-Takt weitere Messungen der OD. Um die Veränderung der OD über die Zeit zu erfassen, wurde in einem Diagramm die OD (Ordinate) gegen die Zeit in Minuten (Abszisse) abgetragen und für jede der untersuchten Stopplösungen die Trendlinie mit Hilfe des Programms Microsoft Excel™ berechnet. Die Steigung der Trendlinie beschreibt die Veränderung der OD bezogen auf die Zeit.

#### 4.1.12 Optimierung des Assays bei 5 % Methanol

Auf der Basis der Ergebnisse sowohl zum Einfluss organischer Lösungsmittel (siehe Kapitel 4.4) als auch der mehrfaktoriellen Untersuchungen (siehe Kapitel 4.2.2) wurde der Assay für einen Methanolgehalt von 5 % optimiert. Dazu wurden in einer mehrfaktoriellen Versuchsanordnung die Faktoren Inkubationszeit (1, 20 und 40 min), Methanolgehalt (0 und 5 %) sowie Tracer-Verdünnung (1:50 000, 1:70 000 und 1:100 000) untersucht. Da der Umfang dieses Versuchs möglichst gering gehalten werden sollte, wurde der Methanolgehalt 0 % nur in Kombination mit der Variante Tracer-Verdünnung 1:50 000, jedoch in Kombination mit allen Inkubationszeiten untersucht. Als Grundlage für diese Messungen diente das Assay-Protokoll 2a.

## 4.2 Charakterisierung des Immunoassays

### 4.2.1 Kreuzreaktivität

Für die Charakterisierung des Antiserums wurde eine umfassende Studie zur Kreuzreaktivität durchgeführt. Hierzu wurden Verdünnungsreihen der zu untersuchenden Stoffe in Wasser angesetzt (siehe Kapitel 4.1.2) und der ELISA nach Assay-Protokoll 2a durchgeführt.

Im einzelnen erfolgte die Untersuchung der Substanzen: Estron (E1), Estriol (E3), Ethinylestradiol (EE2), E2-3-Glucuronid, E2-3-Sulfat, E2-17-Sulfat, E2-17-Glucuronid, EE2-3-Glucuronid, EE2-3-Sulfat und EE2-17-Glucuronid. Auf jeder MTP konnten maximal fünf zu testende Substanzen und die Standards des E2 in allen Verdünnungsstufen und in jeweils zweifacher Wiederholung aufgetragen werden. Alle Substanzen wurden auf mindestens vier MTP getestet (mit Ausnahme der nur zweifachen Messung des E2-3-Sulfats). Zusätzlich zu Parameter C wurde der E2-Konzentrationswert bei 80 % maximaler OD (80 %-Wert) anhand der 4-Parameter-Gleichung ermittelt.

Die Berechnung der molaren Kreuzreaktivität erfolgte für beide Parameter (C und 80 %-Wert) nach der in Kapitel 2.3.7 beschriebenen Methode. Die auf jeder MTP berechneten Kreuzreaktivitäten wurden mit Hilfe des Dixontests (Kapitel 4.6.1) auf Ausreißer untersucht und anschließend gemittelt.

#### **4.2.2 Mehrfaktorielle Untersuchung zum Einfluss verschiedener Faktoren auf den ELISA**

Unabhängig von etwaigen Restriktionen der Inkubationszeiten sollte der Einfluss verschiedener Faktorenkombinationen auf den E2-Assays ermittelt werden. In Ergänzung zu den in Kapitel 4.1.8 genannten Untersuchungen wurden die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Verdünnungen von Antikörper und Tracer sowie verschiedenen Inkubationszeiten untersucht.

Die Strategie dieser Optimierung ist an den Grundsätzen der Affinitätslimitierung orientiert, d.h. eine stärkere Verdünnung von Antikörper und Tracer geht bis zu einer bestimmten Grenze - dem Affinitätslimit - mit einer verbesserten Sensitivität einher. Die Auswahl der untersuchten Inkubationszeiten des Tracers (5, 10, 20 und 40 min) blieb in den Experimenten gleich.

Im ersten Experiment werden weite Konzentrationsbereiche sowohl des Antikörpers als auch des Tracers untersucht, um den affinitätslimitierten Bereich des ELISA zu erfassen.

Die Untersuchung umfasste die Antikörperverdünnungen 1:10 000, 1:20 000, 1:30 000 und 1:40 000. Mit jeder Antikörperverdünnung wurden für jede der oben genannten vier Inkubationszeiten zwei MTP beschichtet. Das Experiment war so angelegt, dass auf jeder MTP vier verschiedene Verdünnungen des Tracers (1:10 000, 1:50 000, 1:100 000 und 1:200 000) nebeneinander in dreifacher Wiederholung aufgetragen wurden. Analog zum Pipettierschema in Abbildung 4.2 (hier mit variierender Tracer-Verdünnung) erfolgte die Untersuchung jeder Variante über den Konzentrationsbereich der ganzen Kalibrationskurve. Die nicht untersuchten Parameter sind mit Assay-Protokoll 2b identisch.

In einem zweiten Experiment wurde entsprechend dem ersten Experiment für die Antikörperverdünnung von 1:10 000 der Bereich der Tracer-Verdünnungen 1:20 000, 1:50 000, 1:80 000 und 1:100 000 näher untersucht. Das Pipettierschema, die Inkubationszeiten und die Anzahl der Wiederholungen blieben dabei gleich dem vorangegangenen Experiment. Nach der Bereinigung von Ausreißern (sie wurden durch den Mittelwert ersetzt) fand die Analyse der Daten mit dem Programm SPSS (SPSS Inc., Version 12.0) statt.

#### **4.2.3 Ermittlung der Kenndaten**

Die Kenndaten des Assays geben Auskunft über seine Sensitivität und seinen Messbereich, damit der Anwender die Eignung des Tests für den Verwendungszweck überprüfen kann. Die Grundlagen zu diesem Thema sind in Kapitel 2.3.6.2. ausführlicher beschrieben. Die Parameter A, C und D entstammen der jeweiligen Kalibrationskurve und

wurden mit der 4-Parameter-Funktion berechnet. Diese ermöglichen dem erfahrenen Anwender eine direkte Bewertung des dargestellten Assays.

Zur Beschreibung der Sensitivität des Assays wurden des weiteren nach DIN 32654, die Nachweisgrenze (LOD) als dreifacher Signal-Rauschabstand (signal-to noise ratio) und die Bestimmungsgrenze (LOQ) als zehnfacher Signal-Rauschabstand berechnet.

Auf Grund des sigmoidalen Kurvenverlaufs der 4-Parameter-Funktion liegt eine heteroskedastische Fehlerverteilung vor, so dass der Fehler des Signals nicht unmittelbar in einen Fehler der Konzentration übertragen werden kann. Daher wird in dieser Arbeit zusätzlich das Präzisionsprofil, entwickelt von EKINS (1981), berechnet. Für den Fehler in der Konzentration gilt, dass er proportional der Standardabweichung der Signalmessung ist und von der Steigung der Kalibrationskurve abhängt (Gleichung 4.2). Der Zusammenhang zur Kalibrationskurve bedingt die Transformation des Vertrauensbereiches.

$$\Delta c \sim s \quad \text{und} \quad \Delta c \sim dOD / dc_{E2}$$

**Gleichung 4.2:** Proportionalität des Fehlers der Konzentration ( $\Delta c$ ) und der Standardabweichung des Signalwertes ( $s$ ), wobei  $\Delta c$  auch proportional zur ersten Ableitung der Kalibrationskurve ist. Mit ( $dOD$ ) ist die Veränderung der OD und mit ( $dc_{E2}$ ) die Veränderung der E2-Konzentration bezeichnet.

Für die 4-Parameter-Funktion (Gleichung 2.3) ergibt sich die erste Ableitung zu:

$$\frac{dY}{dc_{E2}} = \frac{B(D - A)}{C} * \left( \frac{C}{c_{E2}} \right)^{1-B} * \left( 1 + \left( \frac{c_{E2}}{C} \right)^B \right)^{-2}$$

**Gleichung 4.3:** Ableitung zu Gleichung 2.3,  $c_{E2}$  entspricht hierbei der E2-Konzentration ( $x$ ).

Der relative Fehler der bestimmten Konzentration, dessen Verlauf über die Konzentrationsachse als Präzisionsprofil bezeichnet wird, ergibt sich dann durch die Berechnung der Stützpunkte nach Gleichung 4.4.

$$\Delta c = \frac{s}{c_{E2} \cdot dOD / dc_{E2}} \cdot 100 \%$$

**Gleichung 4.4:** Berechnung des Präzisionsprofils nach EKINS et al. (1981) aus dem Fehler der Konzentration ( $\Delta c$ ), der sich konzentrationsabhängig aus der Standardabweichung des Signalwertes ( $s$ ) und der Steigung der Kalibrierkurve ( $dOD/dc_{E2}$ ) ergibt.



Durch die Wahl eines Schwellwertes für den relativen Fehler, in dieser Arbeit 20 %, wurde der Messbereich festgelegt, und am dazugehörigen Präzisionsprofil abgelesen. Dieser Messbereich (analytical range) umfasst damit den Konzentrationsbereich, in dem der relative Fehler kleiner als 20 % ist. Er wird als Ergänzung zur Beschreibung der Sensitivität mittels Nachweis- und Bestimmungsgrenze in dieser Arbeit angegeben.

### 4.3 Einfluss von Matrixeffekten

Die Matrixeffekte wurden zunächst über Verdünnung und Dotierung von einer Kläranlagenzu- und -ablaufprobe untersucht. Aus den filtrierten Proben wurden die Verdünnungsvarianten: unverdünnt, 1:2, 1:4 und 1:10 mit Reinstwasser erstellt. Anschließend erfolgte die Dotierung mit E2 zu den Dotierungsstufen 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2 und 2,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Dieser Konzentrationsbereich wurde ausgewählt, damit die Proben im E2-Konzentrationsbereich nahe dem Testmittelpunkt (Parameter C) liegen. Die Durchführung des ELISA erfolgte nach Assay-Protokoll 2a. Bestimmt wurde die Wiederfindungsrate der dotierten Probe mittels gewichteter linearer Regression.

In einem weiteren Experiment wurde die Beeinflussung des E2-Assays durch Matrixkomponenten mit einer kommerziell erhältlichen Huminsäure (Roth) betrachtet, da Huminsäuren einen bedeutenden Bestandteil der Matrix ausmachen. Hierzu wurden Standardreihen von E2 in Lösungen mit verschiedenen Huminsäurekonzentrationen erstellt und untersucht. Die Huminsäurekonzentrationen variierten zwischen 0,5 und 20  $\text{mg L}^{-1}$ . Die Messungen erfolgten nach Assay-Protokoll 2b. Auf einer MTP wurden in Reinstwasser sowie in drei verschiedenen Huminsäurekonzentrationen angesetzte Standardreihen in jeweils dreifacher Wiederholung miteinander untersucht. Das erste Pipettierschema beinhaltete die Standardreihen mit den Huminsäurekonzentrationen 0; 1; 5 und 10  $\text{mg L}^{-1}$  und das zweite die Huminsäurekonzentrationen 0; 0,5; 2 und 20  $\text{mg L}^{-1}$ . Jedes Plattendesign wurde viermal wiederholt. Nach Überprüfung der Daten auf Ausreißer mit dem Dixontest erfolgte eine ausführliche statistische Auswertung mit Hilfe der Software SPSS (SPSS Inc., Version 12.0). Um die Daten auf den vier verschiedenen MTP miteinander vergleichbar zu machen, wurden sowohl Parameter A als auch C einer jeden Huminsäurekonzentrationen auf A bzw. C der Kalibrationskurve in Reinstwasser der jeweiligen MTP bezogen.

## 4.4 Einfluss organischer Lösungsmittel

Organische Lösungsmittel können als Eluent während einer Probenaufarbeitung oder als Solvent im Rahmen einer Probenanreicherung in einer Immunoassayanalyse auftreten. Da die Antikörper-Antigen-Bindung vom Medium der Reaktion beeinflusst wird, ist es wichtig, den Einfluss organischer Lösungsmittel zu quantifizieren. Hierzu wurde der Einfluss von Aceton, Acetonitril und Methanol auf den Assay getestet. Die Untersuchung erfolgte anhand der üblichen E2-Standardverdünnungsreihen in wässrigen Mischungen unterschiedlicher Lösemittelgehalte (0, 1, 5, 10 und 25 %) nach dem Assay-Protokoll 2a. Die ermittelten 4-Parameter-Kurven basieren auf vierfachen Messwiederholungen ( $n = 4$ ) der einzelnen Standards auf jeder MTP, wobei die gesamte Testreihe mindestens einer Wiederholung ( $n = 2$ ) unterlag.

## 4.5 Konservierung von Realproben

Es wurden verschiedene Konservierungsmethoden bezüglich ihrer Auswirkungen auf den ELISA und die messbaren E2-Gehalte in den Proben untersucht. Diesen Tests liegt das Assay-Protokoll 2a zu Grunde. Untersucht wurden Realproben, versetzt mit unterschiedlichen Konzentrationen an Azid und Formaldehyd sowie das Einfrieren bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Auf jeder MTP liegen Standardreihen der untersuchten Varianten in dreifacher bzw. vierfacher Messwiederholung vor ( $n = 3$  bzw.  $4$ ).

Bei einem ersten Screening wurde getestet, welche der Varianten sich grundsätzlich eignen. Dazu wurden E2-Standardreihen in einer Oberflächenwasserprobe mit verschiedenen Konzentrationen von Formaldehyd (0,5 %, 1 %, 2 %) angesetzt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht gelagert. Zusätzlich erfolgte der Ansatz zweier weiterer E2-Standardreihen aus der Oberflächengewässerprobe, von denen die eine bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , die andere als Kontrolle bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden. Die Messung fand am darauf folgenden Tag statt.

Der Signalbereich (A - D) wurde berechnet. Zur Veranschaulichung der Auswirkung der Konservierungsmaßnahmen wurden sowohl der Signalbereich als auch der C-Wert einer jeden Variante auf die Kontrolle einer jeden MTP bezogen und in % angegeben. Bei diesem Screeningversuch wurde pro Variante nur eine Kalibrationskurve ermittelt.

In der sich anschließenden Testreihe wurden ähnlich dem vorangegangenen Experiment neben einem Oberflächengewässer auch ein Kläranlagenablauf mit folgenden Konservierungsvarianten untersucht:

- Formaldehyd (0,5 % und 1 %),
- Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und
- Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$ .

In diesem Experiment wurden für beide Proben Dotierungsstufen von 0,01, 0,1, 1 und  $10\ \mu\text{g L}^{-1}$  E2 zu Beginn angesetzt. Die einzelnen E2-Dotierungsstufen wurden entsprechend ihrer Konservierungsvariante mit Formaldehyd versehen und nach einer Aufteilung in verschiedene Aliquots gelagert, so dass Änderungen der Ergebnisse nicht durch unterschiedliche Standardansätze begründet sein können. Die Messungen fanden über einen Zeitraum von 14 Tagen an den Tagen 1 (nach 24 Stunden Lagerung), 7 und 14 statt. An jedem der Untersuchungstermine wurde für die Lagerungsvariante bei  $-20^{\circ}\text{C}$  ein frisches Aliquot aufgetaut und verwendet.

Das Ziel dieses Experiments war, die Auswirkung der Konservierungsmethoden über einen E2-Konzentrationsbereich von  $0,01\text{-}10\ \mu\text{g L}^{-1}$  und einer Lagerungsdauer von bis zu 14 Tagen zu erfassen. Dazu wurden die einzelnen E2-Konzentrationen der oben genannten Varianten einer jeden MTP mit der jeweiligen Kalibrationskurve in Reinstwasser berechnet. In dieser Untersuchung war nur die Veränderung der E2-Konzentrationen einer jeden Variante über die Zeit relevant, so dass das Ergebnis nach 24 Stunden Lagerung als Bezugsgröße eingesetzt wurde. Dadurch konnten matrixspezifische Effekte und die Auswirkung der Konservierungsmethode auf den ELISA weitestgehend relativiert und die Konservierungswirkungen der verschiedenen Methoden beurteilt werden. Die einzelnen Ergebnisse der folgenden Messungen an Tag 7 und 14 werden nach Gleichung 4.5 berechnet und in % des Mittelwertes der Ergebnisse von Tag 1 angeben. Die Standardabweichung zu den Mittelwerten der Messungen am Tag wurde angegeben, um die Schwankungen der Ergebnisse besser einordnen zu können.

$$E2_{\text{prozentual}} = \frac{E2_{\text{Variante}} * 100}{\text{MW} [\text{Tag } 1_{\text{Variante}}]}$$

**Gleichung 4.5:** Berechnung des prozentualen Anteils der gemessenen E2-Konzentrationen ( $E2_{\text{prozentual}}$ ) bezogen auf den Mittelwert der frischen Proben ( $\text{MW}[\text{Tag } 1_{\text{Variante}}]$ ). Die Variante ist dabei die Kombination aus Konservierungsmethode, E2-Dotierung und Lagerungsdauer.

## 4.6 Auswertung der manuellen Tests

Zur Auswertung der Messergebnisse wurde zunächst nach Bereinigung der Messdaten von Ausreißern die 4-Parameter-Kurve berechnet (siehe Kapitel 2.3.6.1), bevor bei ausreichender Datengrundlage weitere statistische Auswertungen statt fanden.

### 4.6.1 Dixontest

Grundsätzlich wurden alle Ergebnisse mit dem Ausreißertest nach Dean und Dixon untersucht (DIXON 1953) bevor eine weitere Auswertung erfolgte. Dazu wurde mit den nach der Größe sortierten Werten der Q-Testwert berechnet (Gleichung 4.6). Anhand der Tabelle 4.12 konnten die Ausreißer identifiziert werden, wobei in dieser Studie mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  gearbeitet wurde.

$$Q = \frac{|x_1 - x_2|}{|x_1 - x_n|}$$

**Gleichung 4.6:** Ermittlung der Ausreißer, wobei  $x_1$  den „verdächtigen“ Wert,  $x_2$  der dem verdächtigen Wert nächste und  $x_n$  der äußerste Wert auf der anderen Seite der sortierten Daten darstellt. Je nachdem ob der kleinste oder der größte Wert ausreißerverdächtig ist, werden die Daten entweder aufsteigend oder absteigend sortiert.

**Tabelle 4.12:** Q-Werte für den Ausreißertest nach Dean und Dixon. Ist der nach Gleichung 4.6 berechnete Q-Wert größer als der in der Tabelle angegebene Wert, handelt es sich um einen Ausreißer mit der angegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit

n	$\alpha = 0,1$	$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,01$
3	0,89	0,94	0,99
4	0,68	0,77	0,89
5	0,56	0,64	0,76
6	0,48	0,56	0,70

### 4.6.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung des Datenmaterials erfolgte bei mindestens dreifacher Wiederholung mit Hilfe des Software-Paketes SPSS. Bei einigen Versuchen wurde die Regressionsanalyse mit dem Programm OptiVal der Firma quo data durchgeführt.

Die statistische Auswertung gliederte sich in die Abschnitte:

- Test auf Normalverteilung mit dem Kolmogoroff-Smirnoff-Test,
- Test auf Homogenität der Varianzen mit der Levené-Statistik,
- Varianzanalyse mit Post Hoc-Test (Student-Newman-Keuls-Test, im Falle von homogenen Varianzen, und andernfalls dem Tamhane-Test)
- Korrelationsanalyse mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearmans-Rho und
- Regressionsanalyse.

Der Korrelationskoeffizient ist ein Maß für die Stärke des linearen Zusammenhangs. Je höher der Betrag des Korrelationskoeffizienten, desto stärker ist der lineare Zusammenhang. Die Ergebnisse der Korrelation werden nach BROSIUS (2002) interpretiert (Tabelle 4.13).

**Tabelle 4.13:** Übersicht zur Interpretation der Korrelationskoeffizienten nach BROSIUS (2002):

Betrag des Korrelationskoeffizienten	Interpretation
0-0,05	Keine Korrelation
>0,05-0,2	Sehr schwache Korrelation
0,2-0,4	Schwache Korrelation
0,4-0,6	Mittlere Korrelation
0,6-0,8	Starke Korrelation
0,8-1	Sehr starke Korrelation
1	Perfekte Korrelation

Die Regressionsanalyse stellt die Art des Zusammenhanges zwischen Variablen fest. Mit Hilfe der multiplen Regressionsanalyse kann festgestellt werden, in welchem Maß eine Variable von mehreren unabhängigen Variablen abhängt. In der multiplen Regressionsanalyse wurde die Bedeutung der einzelnen unabhängigen Faktoren (z.B.: Antikörperverdünnung, Tracer-Inkubationszeit, etc.) für die Parameter (abhängige Faktoren, z.B.: Parameter A oder C) abgeschätzt.

Zusammenhänge wurden ab einem Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ) > 0,6 als bedeutend interpretiert. Bei den Ergebnissen wird jeweils das korrigierte  $r^2$  angegeben, welches den Stichprobenumfang und die Anzahl der unabhängigen Variablen mit berücksichtigt.

Der standardisierte Regressionskoeffizient ( $\beta$ ) lässt die Wichtigkeit der unabhängigen Variablen für die Erklärung der abhängigen Variablen erkennen. Durch die Standardisierung werden die unterschiedlichen Messdimensionen der Variablen, die sich in den Regressionskoeffizienten niederschlagen, eliminiert und diese somit vergleichbar

gemacht (BACKHAUS 1990). Das Signifikanzniveau wurde bei allen Tests auf  $p < 0,05$  festgelegt.

Für die Regressionsanalyse der in Kapitel 4.1.12 und 4.2.2 beschriebenen Versuche fand das Programm OptiVal der Firma quo data Verwendung. Die hier zusammengestellten Informationen basieren auf den Aussagen des Programmentwicklers Dr. Steffen Uhlig, quo data.

Dieses Programm erstellt für die zu untersuchenden abhängigen Variablen ein multiples lineares Regressionsmodell. Dabei wird die Bedeutung der einzelnen unabhängigen Faktoren (z.B.: Antikörperverdünnung, Tracer-Inkubationszeit, etc.) für die abhängigen Variablen (z.B.: Parameter A oder C) geschätzt. In das Modell werden sowohl die unabhängigen Faktoren wie auch deren Wechselwirkungen und quadratische Effekte mit einbezogen. Im Gegensatz zu gängigen Statistikprogrammen erfolgt die Auswahl der Haupteffekte und Wechselwirkungen in automatisierter Weise über ein statistisches Expertensystem. Da die Faktoren meist in sehr unterschiedlichen Einheiten vorliegen, wird eine Standardisierung der Faktoren vorgenommen. Die Standardisierung erfolgt, indem die höchste Faktorstufe den Wert eins erhält und die kleinste Faktorstufe den Wert minus eins. Zur Beschreibung des Modells werden die Regressionsgleichung, sowie eine Tabelle mit  $\beta$  und der Signifikanz ( $p$ ) für die jeweiligen unabhängigen Faktoren, die Wechselwirkungen und die quadratischen Effekte angegeben. Ist der  $p$ -Wert eines Faktors, einer Wechselwirkung oder eines quadrierten Faktors  $< 0,05$ , ist dieser als signifikant für die Variable zu bezeichnen.

Mit Hilfe der Regressionsgleichung wird für signifikante Faktoren jeweils der Minimal- und der Maximal-Wert der Variablen berechnet und die dazugehörigen Faktorstufen angegeben. Die Überprüfung und Darstellung der Qualität des berechneten Modells erfolgt über:

- die Standardabweichung der Residuen, welche die mittlere Abweichung des Modells von den Messwerten anzeigt muss möglichst klein sein,
- das korrigierte  $r^2$ , für das gilt: je größer  $r^2$  ist, desto besser passen sich die Werte der Regressionsgeraden an,
- der „lack-of-fit“ Test, welcher überprüft ob die Streuung der gemessenen Werte mit der in dem Modell berechneten Streuung übereinstimmt. Gibt es dort keine signifikanten Unterschiede d.h. der mit dem F-Test ermittelte  $p$ -Wert ist größer als 0,05, so kann das Modell als adäquat bezeichnet werden.

Zur Veranschaulichung des Modells können für alle Faktorkombinationen neben verschiedenen 2D-Diagrammen auch 3D-Graphiken mit Oberflächen oder Höhenlinien erstellt werden. Mit der sogenannten „Effects chart“ kann zum einen die Bedeutung der verschiedenen Faktoren auf die einzelnen Variablen veranschaulicht, als auch die

Bedeutung eines Faktors auf verschiedene Variablen (multivariat) dargestellt werden. Veranschaulicht wird dabei die absolute Veränderung des Wertes der Variablen (bzw. des Faktors) von deren Mittelwert anhand unterschiedlichen Faktorstufen. Auf Grund der Symmetrie kann auf die Art des Effektes Rückschlüsse gezogen werden. Liegt ein symmetrischer Verlauf vor, handelt es sich dabei um lineare Effekte.

## 4.7 ESTR-A-LISER

In diesem Kapitel werden die Erstellung der Arbeitsstation ESTR-A-LISER und die Implementierung des ELISA auf dem Automaten beschrieben. Der Zusammenbau der Hauptkomponenten zu der unten beschriebenen Arbeitsstation wurde von der Firma SBU Waldheim durchgeführt. Alle Arbeiten an der Software, welche die Hauptkomponenten miteinander vernetzt und eine Steuerung des Gerätes ermöglicht, erfolgten von Mitarbeitern der Firma quo data. Die Kalibriermethode für die Auswertung der Daten wurde von Dr. Steffen Uhlig (quo data) entwickelt. Die Implementierung des ELISA auf dem Automaten wurde an der Universität Bonn von mir im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Dabei wurden während der Entwicklung in Zusammenarbeit aller Beteiligten die Begrenzungen und Möglichkeiten des ELISA sowie der Hard- und Software aufeinander abgestimmt.

### 4.7.1 Arbeitsstation

Die Arbeitsstation ESTR-A-LISER besteht aus drei zusammen eingehausten Hauptkomponenten:

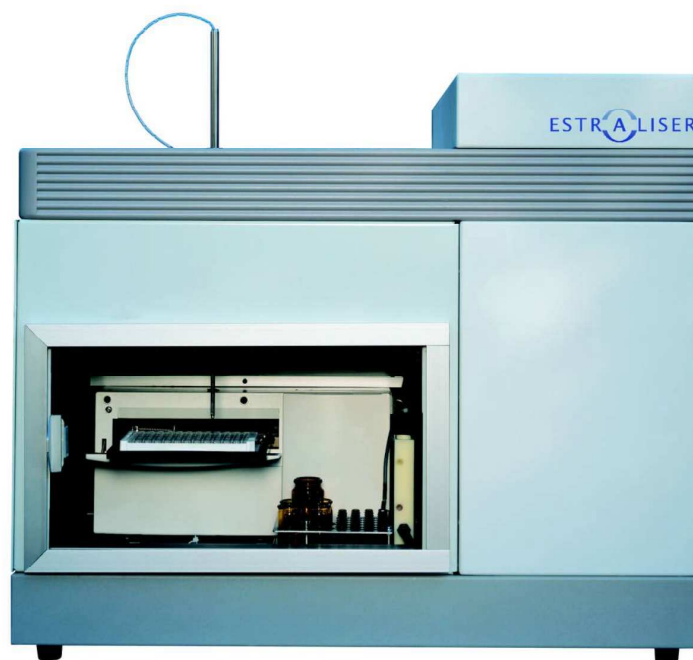
- der Pipettierroboter „Miniprep 60“ der Firma TECAN,
- das Mikrotiterplatten-Photometer „Sunrise Reader“ der Firma TECAN und
- die Temperierung als Eigenentwicklung durch die Firma SBU Waldheim,

sowie einem Computer mit drei seriellen Schnittstellen.

Basis des ESTR-A-LISER ist der Pipettierroboter, der eine zeit- und mengenexakte Pipettierung der immunochemischen Reagenzien sowie der Proben und Standards ermöglicht. Der Automat (siehe Abbildung 4.3) ist ausgerüstet mit einer Doppelnadel für das Befüllen und Leeren der Kavitäten. Zwischen den einzelnen Pipettierschritten wird die Nadel in einer Reinigungsstation gewaschen, so dass Kontaminationen minimiert werden. Durch die zusätzlich eingebaute Peltier-Kühlung ist eine konstante Innenraum-Temperatur während der Analyse gewährleistet. Die Temperatur lässt sich innerhalb eines Bereiches

von 18°C bis 40 °C vorgeben. Alle für den Immunoassay benötigten Reagenzien stehen innerhalb des Gerätes im temperierten Bereich. Der notwendige Systempuffer (PBS 1), der für die Waschschriffe benötigt wird, befindet sich in einem Vorratsgefäß außerhalb der Station.

In den ESTR-A-LISER ist das Mikrotiterplatten-Photometer integriert, so dass am Ende des Tests die optische Dichte automatisch gemessen werden kann. Während ihrer Bearbeitung liegt die MTP auf der Schublade des Photometers in der Pipettierposition (Abbildung 4.3). Nach jedem vierten Pipettierschritt findet eine Schüttelschritt statt, der ebenfalls in dem Photometer erfolgt.



**Abbildung 4.3:** Die Arbeitsstation ESTR-A-LISER

#### 4.7.2 Software

Die Software des ESTR-A-LISER wurde von der Firma quo data entwickelt und steuert sowohl die einzelnen Komponenten als auch deren Zusammenspiel. Für die Anpassung an den Automaten wurden zunächst die Steuereinheiten der Arbeitsstation an die aus der immunochemischen Prozedur entstehenden Ansprüche angepasst. Dazu fand eine spezielle Steuersoftware unter Einbindung seitens des Komponentenanbieters angebotenen Module Verwendung. Konzipiert wurde die Ansteuersoftware für den gesamten ESTR-A-LISER bestehend aus den mechanisch-elektrischen Komponenten: Pipettierroboter, dem Photometer und der Temperatursteuerung. Alle drei Komponenten



haben eine eigene Ansteuersoftware, die im Rahmen des Projektes zu einer gemeinsamen Ablaufsteuerung zusammengeführt werden mussten. Dabei waren folgende Funktionen zu berücksichtigen:

- Bewegungssteuerung des Roboterarms,
- Ansteuerung der Pumpen zum Befüllen und Entleeren von Kavitäten,
- Temperatursteuerung und –kontrolle,
- optische Messung der Proben zur Konzentrationsbestimmung und
- Speicherung der Messergebnisse.

Entsprechend dieser Erfordernisse wurde ein Programm entwickelt, das alle genannten Funktionen integriert, und in einzelnen Modulen implementiert. Als Programmierwerkzeuge fanden Verwendung: das Programmierwerkzeug Dephi 5.01 (Borland), die Schnittstellenbibliotheken für den Messroboter MiniPrep 60 (TECAN) und die Schnittstellenbibliotheken für das optische Messgerät Sunrise Reader (TECAN).

Die Ansteuersoftware wurde an das Gerät ESTR-A-LISER angepasst, indem im einzelnen folgende Arbeiten realisiert wurden:

- Systementwurf und Festlegung des Datenflusses
- Festlegung der Mensch-Maschine-Schnittstellen, Oberflächendesign
- Festlegung der Datenbasis
- Programmspezifikation, einschließlich Systemtest-Spezifikation
- Programmierung der Bewegungs- und Pumpensteuerung in Abhängigkeit von den einzelnen Arbeitsschritten innerhalb des Versuchsplanes

Es wurden dazu die nachfolgenden Module entwickelt:

- Modul zur Definition der Arbeitsschritte für Versuchsabläufe,
- Modul zur Umsetzung des Versuchsplanes,
- Modul zur Temperatursteuerung und –kontrolle und
- Kalibrier- und Auswertungsmodul.

Somit gestattet die entwickelte Software eine nutzerfreundliche Definition der immunochemischen Sequenz und ist in der Lage eine zeit- und mengengenaue Pipettierung zu gewährleisten. Um eine Optimierung der immunochemischen Prozedur mittels des ESTR-A-LISER zu ermöglichen, wurde die Software mit weitreichenden Freiheitsgraden versehen, die eine flexible Gestaltung der Arbeitsschritte ermöglicht (UHLIG et al. 2005).

### 4.7.3 Optimierung des ELISA am ESTR-A-LISER

Ausgangspunkt für die Optimierung des Assays auf dem ESTR-A-LISER war die manuelle Durchführung nach Assay-Protokoll 2a. Ziel der Automatisierung war es, optimale Bedingungen für die Durchführung eines ELISA zu schaffen, die bei manueller Durchführung kaum zu verwirklichen sind. Dazu gehört die Gewährleistung einer konstanten Raumtemperatur, das randomisierte Arbeiten und eine exakte Taktung der Arbeitsschritte, damit alle 96 MTP-Kavitäten exakt gleich abgearbeitet werden. Auf Grund der Assaykinetik war regelmäßiges Schütteln der MTP während des ELISA notwendig. Ebenfalls war Bedingung, dass keine der Kavitäten über längere Zeit trocken steht. Auf der Basis dieser Voraussetzungen wurde die Optimierung begonnen. Das Ziel war ein Assay mit guten Kenndaten, der die Messung umweltrelevanter E2-Konzentrationen ermöglicht.

Die Durchführung der ersten Tests auf dem ESTR-A-LISER fand nur mit Standards in 4 - 6-facher Wiederholung statt. Der Vorgang des Schüttelns wurde zuerst optimiert. Dabei sollte festgestellt werden, wie oft geschüttelt werden muss, bei welcher Intensität und für wie lange, um eine gute Kalibrationskurve zu erhalten. Ein weiterer kritischer Punkt waren mögliche Verschleppungen von Standards mit höherer Konzentration in die Blindwerte oder in Standards geringerer E2-Konzentration. Um das zu verhindern wurde die Reinigung der Nadel in der Waschstation optimiert. Dabei musste auf ausreichendes Spülen der Nadel von innen und außen geachtet werden. Zudem wurde dieser Nadelreinigungsschritt nach jeder Pipettierung eines E2-Standards durchgeführt.

Auf Grund der Notwendigkeit, die MTP gleichmäßig zu schütteln und die Nadel regelmäßig zu reinigen erfolgte unter der Prämisse, dass alle Kavitäten gleich behandelt werden müssen, eine Taktung für jeden Arbeitsschritt von 20 Sekunden. Für das Assay-Protokoll ergibt sich daraus bei 96 Kavitäten eine Gesamtdauer für jeden Pipettierschritt von 32 min, d.h. Inkubationszeiten kürzer als 32 min konnten hierbei nicht realisiert werden.

Um die Vergleichbarkeit von Assays auch an unterschiedlichen Tagen zu gewährleisten, ist eine konstante Temperierung wichtig, da die chemischen Vorgänge während des Assays temperaturabhängig sind. Die Messung der Temperatur erfolgte an vier Messfühlern zu jedem Arbeitsschritt und wurde im Ablaufprotokoll notiert, so dass die Temperierung kontinuierlich überprüft werden konnte. Von diesen Messfühlern befand sich ein Fühler an der Doppelnadel, ein weiterer in einem Probengefäß mit Reinstwasser im Proben-Rack, der dritte befand sich vorne auf dem Photometer und der vierte war in der Nähe des Petierelementes befestigt. Des Weiteren war es, insbesondere im Sommer, notwendig, zu überprüfen welche Kühlleistung realisierbar war, ohne dass es zu Kondensation im Gerät kam.

Im Gegensatz zur manuellen Bearbeitung wurden im Anschluss an den Waschschrift mit dem Automaten die Kavitäten mit 200 µL PBS 1 gefüllt, um ein Austrocknen während der

gesamten Bearbeitungsdauer der MTP zu vermeiden. Erst unmittelbar vor dem nächsten Befüllen wurde die jeweilige Kavität geleert.

Im Laufe der Optimierung musste die auf dem ESTR-A-LISER eingesetzte Standardreihe verändert werden. Da die zu erwartenden Gehalte an E2 in den Proben deutlich unter  $1000 \text{ ng L}^{-1}$  lagen, wurden die Standards ab einer Konzentration von  $1000 \text{ ng L}^{-1}$  bis  $1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  nur noch einfach auf der MTP gemessen und schließlich endete der Bereich der Standardreihe bei  $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ . Im Gegenzug konnte ein zusätzlicher Standard mit  $0,5 \text{ ng L}^{-1}$  mit einbezogen werden, um den Bereich niedriger Konzentrationen besser abzudecken. Auch die Anzahl der Wiederholungen der einzelnen Standards in den einzelnen Entwicklungsstadien variierten (siehe Tabelle 4.14).

**Tabelle 4.14:** Konzentrationen der Standards und die Anzahl ihrer Wiederholungen für den ESTR-A-LISER in den unterschiedlichen Stadien der Entwicklung.

E2 Konzentration ng/L	Anzahl der Standards auf einer MTP		
	Stadium 1	Stadium 2	Stadium 3
<b>0</b>	20	10	10
<b>0,5</b>	-	10	8
<b>1</b>	16	10	8
<b>10</b>	8	4	3
<b>100</b>	8	4	1
<b>1.000</b>	1	1	1
<b>10.000</b>	1	1	1
<b>100.000</b>	1	1	-
<b>1.000.000</b>	1	1	-
<b>Anzahl der Proben auf einer MTP</b> [Anzahl der Wiederholungen]	4 [10]	6 [9]	8 [8]

Über die statistische Auswertung wurde trotz reduzierter Wiederholungen der Standards und trotz des eingeschränkteren Konzentrationsbereichs die Qualität der Messung kontrolliert und erhalten. Diese Veränderungen ermöglichten, dass von anfänglich 4 letztendlich 8 Proben pro MTP untersucht werden konnten.

Während der ersten Phase wurde mit Tracer 1 gearbeitet. Tracer 2 konnte ebenso wie bei den manuellen Tests erst ab Juli 2004 eingesetzt werden. Der für die Verwendung mit dem ESTR-A-LISER optimierte ELISA wurde nach dem Assay-Protokoll 3 (Tabelle 4.15) durchgeführt.

Nachdem der Assay an den Automaten angepasst worden war, wurde der Automat im Rahmen des EU-Projektes<sup>34</sup> an die Partner zunächst in Wien/Österreich und anschließend in Aveiro/Portugal übergeben. Dort sollten der Automat und der E2-Assay zur Messung von Feldproben zum Einsatz kommen und getestet werden. Für die dortigen Messungen wurde das in Tabelle 4.15 beschriebene Assay-Protokoll 3 verwendet. Auf Grund verschiedener Probleme, hauptsächlich mit der Hard- und Software, fanden die letzten Optimierungen nach der Rückkehr des Automaten an der Universität Bonn statt. Im Anschluss daran konnte die in Kapitel 4.8 beschriebene Feldstudie durchgeführt werden.

**Tabelle 4.15:** Assay-Protoll 3 für die Messung von E2 am ESTR-A-LISER in der frischen Probe. Waschschritte fanden vor der Zugabe der Standards und des Substrates statt. Es wird entweder Tracer 1 in der Verdünnung 1:30 000 (Assay-Protokoll 3a) oder Tracer 2 in der Verdünnung 1:70 000 (Assay-Protokoll 3b) verwendet.

Arbeitsschritt: Substanz	Konzentration Verdünnung	Menge [µL]	Zeit [min]	Temperatur
<b>Beschichtung</b> BN 2578	1:10 000	100	über Nacht	20°C
<b>Standard</b> E2	0-1000 µg/L	100	32	22°C
<b>Tracer</b> Tracer 1	1:30 000	100	32	22°C
Tracer 2	1:70 000	100	32	
<b>Substrat</b> nach FREY et al. (2000)		200	32	22°C
<b>Stopplösung</b> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 M	50		22°C
Messung der optischen Dichte (Differenzmessung von 450 nm - 650 nm)				

#### 4.7.4 Messung mit dem ESTR-A-LISER

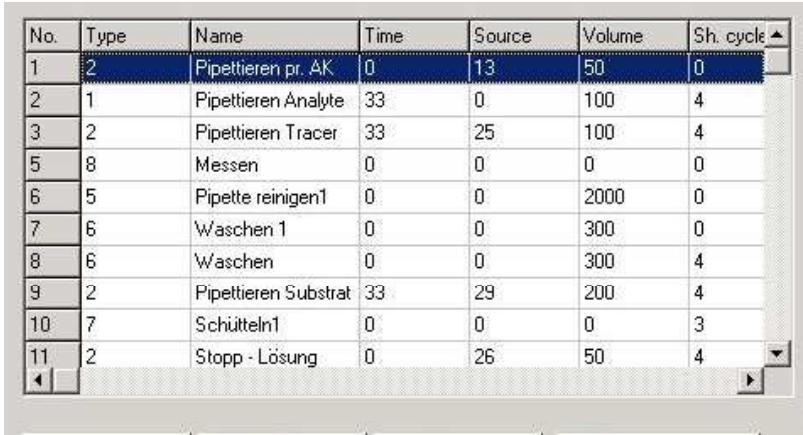
Vor der Messung erfolgte zur Vorbereitung des Automaten die Spülung des Systems mit 200 ml des PBS 1-Puffers, welcher ebenfalls während der Messung als Waschpuffer für die Kavitäten der MTP und zur Reinigung der Nadel verwendet wurde.

Nachdem die mit Antikörper beschichtete MTP sowie die Vorratsgefäße für Proben und Reagenzien in den Automaten gestellt wurden, konnte der weitere Prozessablauf über die Software definiert und gesteuert werden (Abbildung 4.4). Individuelle Arbeitsabläufe für unterschiedliche ELISA waren somit möglich. Zu jedem Prozessschritt des ELISA konnten die Positionen der Standards, Proben und eingesetzten Reagenzien, die erforderlichen

<sup>34</sup> EU-Förderprogramm LIFE III - Umwelt (Projekt LIFE00ENV/D/000346) ESTR-A-LISER

Volumina, die zeitliche Reihenfolge der Pipettierung (randomisiert oder geordnet), die Anzahl der Waschschrte sowie die Häufigkeit und Dauer der Nadelreinigung zwischen einzelnen Pipettierschritten definiert werden. Anschließend erfolgte der Start der Messung und nach Beendigung konnte die Auswertung abgespeichert und weiter genutzt werden.

Die Reinigung des Automaten nach jeder Messung erfolgte in drei Spülschritten. Dazu wurde anstelle von Waschpuffer ca. 50 mL der Reinigungslösung „Liquid Cleaning Daily System Clear“ (TECAN) durch das System gespült. Nach einigen Minuten Einwirkdauer wurde gründlich mit mindestens 1 L Reinstwasser nachgespült. Erfolgte anschließend keine Weiternutzung des Gerätes, wurden zum Abschluss noch 50 ml Reinstwasser mit 5% Methanol durch das System gepumpt. Sofern eine weitere Messung folgte konnte das System, wie oben beschrieben, mit 200 mL des PBS1-Puffers gespült und die nächste Messung in Gang gesetzt werden. In regelmäßigen Abständen erfolgte eine zusätzliche Reinigung des Automaten mit „Liquid Cleaning Setup Clean“ (TECAN).



No.	Type	Name	Time	Source	Volume	Sh. cycle
1	2	Pipettieren pr. AK	0	13	50	0
2	1	Pipettieren Analyte	33	0	100	4
3	2	Pipettieren Tracer	33	25	100	4
5	8	Messen	0	0	0	0
6	5	Pipette reinigen1	0	0	2000	0
7	6	Waschen 1	0	0	300	0
8	6	Waschen	0	0	300	4
9	2	Pipettieren Substrat	33	29	200	4
10	7	Schütteln1	0	0	0	3
11	2	Stopp - Lösung	0	26	50	4

**Abbildung 4.4:** Steuer-Software des ESTR-A-LISER. Fenster zur Einstellung der Prozessparameter (erforderliche Volumina, Anzahl der Waschschrte, Häufigkeit und Dauer der Nadelreinigung)

#### 4.7.5 Auswertung

Die Kalibriermethode, entwickelt von Dr. Steffen Uhlig (quo data), basiert auf einer für eine Trendkorrektur um bis zu 7 Parameter erweiterten Standard-4-Parameter-Kurve. In dieser Arbeit wurde für die Auswertung des ESTR-A-LISER die 4-Parameter-Kurve um Parameter für die Trendanalyse erweitert. Dazu werden die Parameter  $\gamma_1$  bis  $\gamma_7$  eingeführt, bei denen es sich um die Parameter eines Korrekturterms handelt, der vor der eigentlichen Ermittlung der Parameter der 4-Parameter-Kurve von der logarithmierten optischen Dichte abgezogen wird (siehe Gleichung 4.7). Bei dieser Betrachtung werden Spalten- und Zeileneffekte, inklusive quadratischer Effekte, berücksichtigt.

$$\ln OD(\text{korr}) = \ln(OD) - \gamma_1 - \gamma_2 * \exp(-\gamma_3 * well_i) + \gamma_4 * row_i + \gamma_5 * row_i^2 + \gamma_6 * col_i + \gamma_7 * col_i^2$$

**Gleichung 4.7:** Trendkorrektur bei der Auswertung mit dem ESTR-A-LISER entwickelt von Uhlig, quo data<sup>35</sup>. Dabei gilt:  $row_i$  ist die Reihe, in der sich  $well_i$  befindet und  $col_i$  ist die Spalte, in der sich  $well_i$  befindet.

Die Effektgröße ist dabei proportional zum  $\gamma$ -Wert, wobei  $\gamma=0$  bedeutet, dass der entsprechende Effekt nicht signifikant ist. Sind  $\gamma_6=0$  und  $\gamma_7=0$ , so bedeutet dies, dass keine Spalteneffekte, auch keine quadratischen, vorliegen.

Für das Kalibriermodul des ESTR-A-LISER konnten statistische Modelle entwickelt werden, bei denen robuste Auswertemethoden auf die 4-Parameterkurve Anwendung finden. Unterschiedliche Ansätze wurden getestet, um systematische Trends (räumlich, zeitlich) innerhalb einer Mikrotiterplatte zu analysieren und zu korrigieren. Dabei kam das Verfahren des Maximum-Likelihood-Schätzers (MLE) zur Regression zum Einsatz. Die Parameter der Kalibrierfunktion werden mit Hilfe eines statistischen Modells, welches auf dem Maximum-Likelihood-Verfahren (MLE) aufbaut, für jede Mikrotiterplatte neu geschätzt. Bei dieser Auswertung gingen sowohl die Kalibrierstandards als auch die Reihenfolge der Messungen und die Position der Kavitäten auf der Platte in die Berechnung ein.

Zur Berechnung der Nachweisgrenze und des Vertrauensintervalls für jede Probe konnte ein neues Verfahren entwickelt werden, das die Werte konsistent mit dem MLE-Verfahren berechnet. Mit der Bootstrapmethode wurden die 95 %- und 99 %- kritischen Werte für den Likelihood-Ratio-Test ermittelt.

Zwischen Gerät und Auswertesoftware wurde ein Datenaustauschformat definiert und in das Softwarepaket integriert. Die implementierte Auswerte-Software erstellt automatisch einen Ergebnisbericht, aus dem alle wichtigen Informationen zur Beurteilung der Analyse entnommen werden konnten.

## 4.8 Feldstudie

Der ELISA konnte im Rahmen einer Feldstudie angewendet werden. Hierzu wurden Wasserproben aus Oberflächengewässern und Kläranlagenabflüssen entnommen und ihr Gehalt an E2 mit Hilfe des Immunoassays sowohl manuell als auch mit dem ESTR-A-LISER gemessen. Zusätzlich erfolgte eine Bestimmung mit einem etablierten instrumentellen Verfahren (LC-MS/MS) (ZÜHLKE et al. 2004) am Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit der Universität Bonn.

---

<sup>35</sup> Persönliche Kommunikation

### 4.8.1 Feldproben

Die Feldproben wurden in der Region Bonn sowie im nördlichen Teil von Rheinland-Pfalz im Zeitraum von Januar bis Februar 2005 genommen. Die Lage der Standorte ist in der Abbildung 4.5 verzeichnet.

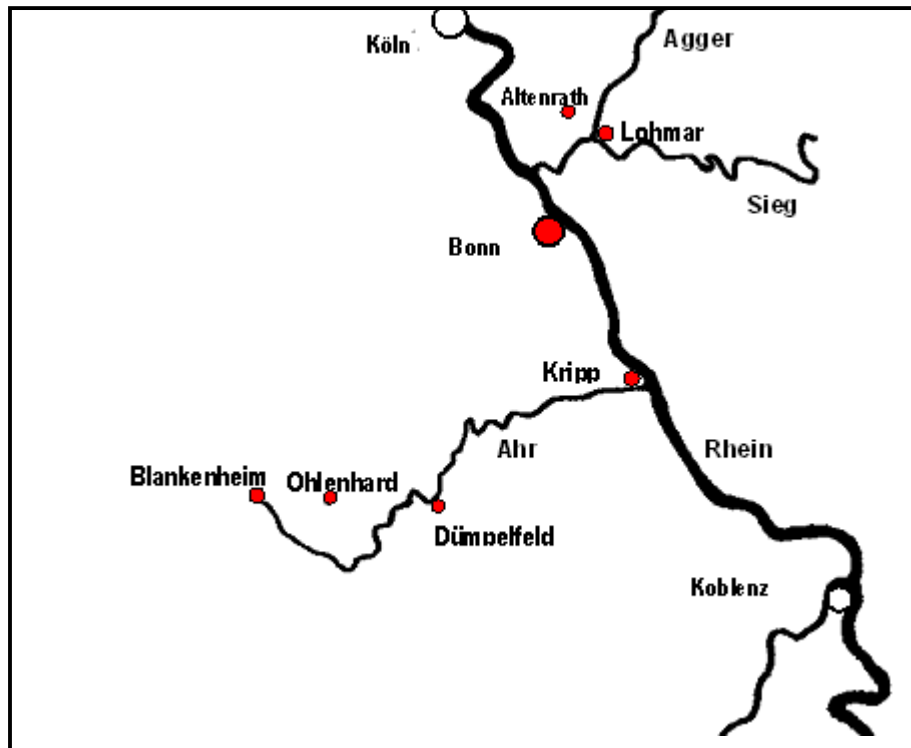


Abbildung 4.5: Kartenausschnitt der Probenahmestellen.

#### 4.8.1.1 Oberflächengewässer

Die fünf Probenahmestellen der Oberflächengewässer lagen im Umkreis von 60 km um Bonn in den Bundesländern Nordrhein-Westfalen und Rheinland-Pfalz. Das Oberflächenwasser wurde in Stichproben aus den Flüssen Rhein (bei Bonn), Agger (bei Lohmar) und Ahr (bei Blankenheim, Dümpelfeld und Kripp) entnommen. Die Probenahmestellen an der Ahr liegen entlang des Flussverlaufs, beginnend mit der Quelle (Blankenheim), eine Stelle ungefähr in der Mitte des Flussverlaufs (Dümpelfeld) und an der Mündung in den Rhein (Kripp). Jede der Probenahmestellen ist anthropogen beeinflusst, meist durch einleitende Kläranlagen in unmittelbarer Nähe.

Die Quelle der Ahr besteht aus vier einzelnen Quellen, die aus einem Keller eines zentral gelegenen Gebäudes in der Stadt Blankenheim austreten. Das Einzugsgebiet dieser Quellen hat einen gut durchlässigen, karstigen Grundwasserleiter und ist stark landwirtschaftlich geprägt. Grund- und Oberflächenwasser liegen eng beieinander. Laut

der Karte für Biologische Gewässergüte in Nordrhein-Westfalen aus dem Jahr 2003 ist die Ahr in ihrem Oberlauf als mäßig belastet (Güteklasse II) anzusehen. Aufgrund der günstigen Fließverhältnisse können die Belastungen durch häusliche Abwässer, die weitestgehend durch Kläranlagen eingeleitet werden, abgebaut werden. So ist die Ahr in ihrem weiteren Verlauf als gering belastet (Güteklasse I-II) einzustufen (MUNLV 2005).

Die Probenahmestelle in Dümpelfeld liegt nur kurz hinter der Mündung des Adenauer Bachs und der Einleitung des Kläranlagenablaufs der Kläranlage „Adenauer Bach“ in Dümpelfeld und hat auch dort die Gewässergüteklasse mäßig belastet (MINISTERIUM DES INNERN UND FÜR SPORT 2003).

Im Gegensatz zu den ländlichen, schwach besiedelten Gebieten, in denen die ersten beiden Probenahmestellen liegen, ist der Bereich der Ahrmündung als kritisch belastet (Gewässergüteklasse II-III) zu bezeichnen (MINISTERIUM DES INNERN UND FÜR SPORT 2003). Hier ist die anthropogene Beeinflussung zunehmend durch industriell-gewerbliche Direkteinleiter und durch kommunale Kläranlagen geprägt. Die Mündung der Ahr bei Kripp in den Rhein liegt im Einflussbereich der Städte Bad Neuenahr-Ahrweiler und Sinzig.

Die Probenahmestelle am Rhein befindet sich bei Rheinkilometer 656,6 am rechten Rheinufer im nördlichen Stadtbereich von Bonn und liegt im Einflussbereich der weiter unten erwähnten Kläranlage Beuel. Dem Rhein wird in diesem Bereich die Gewässergüteklasse mäßig belastet (Gewässergüteklasse II) zugeordnet (MUNLV 2005).

Die fünfte Oberflächenwasserprobe wurde aus der Agger am Pegel in Lohmar entnommen. Die Probenahmestelle liegt im Einflussbereich der Kläranlagen „Troisdorf Altenrath“, „Lohmar“ und „Lohmar Donrath“ und weist die Gewässergüteklasse mäßig belastet (Gewässergüteklasse II) auf (MUNLV 2005).

#### **4.8.1.2 Kläranlagen**

Die beprobten Kläranlagen spiegeln sowohl ländliche wie auch städtische Einzugsgebiete wieder. Eine städtische Ausprägung mit geringem industriellen Anteil liegt in den vier Kläranlagen der Stadt Bonn vor (Tabelle 4.16). Eher ländlich beeinflusst sind die Kläranlagen Dümpelfeld, Blankenheim, Ohlenhard und Altenrath (Tabelle 4.17).

Unterschiede bestehen auch in der Bauart der einzelnen Kläranlagen. Bei der Anlage in Ohlenhard handelt es sich um eine Teichkläranlage, die in Form von drei hintereinanderliegenden, miteinander verbundenen Klärteichen ohne Bewuchs betrieben wird.

Die Kläranlage Troisdorf Altenrath ist eine Pflanzenkläranlage. Das Verfahren der Abwasserbehandlung in solchen Anlagen unterscheidet sich stark von dem der konventionellen Anlagen. Statt der üblichen unterschiedlichen Klärstufen durchfließt das



Abwasser hier lediglich verschiedene Absetzbecken, um eine Abtrennung des Feststoffanteils zu gewährleisten. Anschließend wird die Wasserphase auf ein möglichst dicht bewachsenes Schilffeld (*Phragmites australis*) verrieselt, in welchem durch Adsorption, Filtration und mikrobiellen Abbau eine Reinigung des Abwassers geschieht. Nach einer gewissen Zeit, die das Wasser benötigt um die verschiedenen Bodenschichten zu passieren, wird das Perkolat abgepumpt und einem kleinen Bach als Vorfluter zugeführt. Ein Teil des geklärten Abwassers wird zur Verdünnung des Zulaufwassers diesem wieder zugeführt und gelangt so nochmals auf das Rieselfeld.

**Tabelle 4.16:** Details zu den Kläranlagen der Stadt Bonn und Troisdorf. (\*Das Einzugsgebiet der Anlage Duisdorf hat sowohl eine ländliche als auch städtische Prägung. Nur 42 % des Abwassers stammen aus Bonn selbst, 58% werden aus angrenzenden, ländlichen Gemeinden eingeleitet.)

	<b>Bonn Bad-Godesberg</b>	<b>Bonn Beuel</b>	<b>Bonn Duisdorf</b>	<b>Salierweg</b>
<b>Typ</b>		mechanisch-biologisch		
<b>Einwohner-Gleichwerte</b>	110 000	72 000	30 000	307 000
<b>Abwasseranfall [m<sup>3</sup> Tag<sup>-1</sup>]</b>	31 995	17 118	9 445	66 324
<b>Einzugsgebiet</b>	städtisch	städtisch	ländlich/ städtisch*	städtisch
<b>Reinigungsprozesse</b>				
<b>Mechanisch</b>		Siebung, Sandfang, Ölabscheider		
<b>Biologisch</b>		Belebtschlamm		
<b>P-Fällung</b>		ja		

Die Kläranlagen in Bonn, Blankenheim und Dümpelfeld sind konventionelle, mechanisch-biologische, dreistufige Kläranlagen. Diese haben in der Regel ein Reinigungsverfahren mit einer mechanischen Vorreinigung, einer biologischen Klärstufe, bestehend aus aeroben Belebungsbecken zur Nitrifikation, sowie ein anoxisches Absetzbecken zur Denitrifikation. Je nach Größe der Anlage existieren die biologischen Stufen in verschiedenen parallelen Straßen.

**Tabelle 4.17:** Details der ländlich geprägten Kläranlagen.

	<b>Altenrath</b>	<b>Blankenheim</b>	<b>Dümpelfeld</b>	<b>Ohlenhard</b>
<b>Typ</b>	Pflanzenklär- anlage	mechanisch- biologisch	mechanisch- biologisch	Klärteiche
<b>Einwohner- Gleichwerte</b>	150	4 500	12 000	150
<b>Abwasser- anfall [m<sup>3</sup> Tag<sup>-1</sup>]</b>	12	3 200	3 500	21
<b>Einzugsgebiet</b>	ländlich			
<b>Reinigungsprozesse</b>				
<b>Mechanisch</b>	Siebung	Siebung Sandfang Ölabscheider	Siebung Sandfang Ölabscheider	Siebung
<b>Biologisch</b>	Belüftung	Belebtschlamm	Belebtschlamm	Belüftung saisonale Entleerung
<b>P-Fällung</b>	keine	keine Angaben	keine	keine

#### 4.8.2 Probenahme

Die Probenahme erfolgte in der Regel in einem Abstand von mindestens zwei Wochen an jeder Probenahmestelle zweimal. Die Proben wurden in braunen Glasflaschen transportiert und bei 4 °C gelagert. Die Aufarbeitung und Analyse der Proben wurde am Folgetag durchgeführt, die maximale Lagerdauer der Proben betrug 24 h.

#### 4.8.3 Bestimmung des DOC

Die Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) erfolgte mit Hilfe des Continuous-Flow-Analyser (Technicon Autoanalyser II, Bran & Lübbe, Hamburg). Die filtrierten Proben (siehe 4.8.5) wurden zunächst mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> angesäuert und im N<sub>2</sub>-Strom von gelöstem CO<sub>2</sub> befreit. Anschließend wurde der organische Kohlenstoff im alkalischen Milieu durch Kaliumperoxodisulfat unter UV-Licht zu CO<sub>2</sub> oxidiert. Das CO<sub>2</sub> diffundiert dann über eine Dialysemembran in eine Phenolphthalein-Lösung, deren Entfärbung bei 520 nm photometrisch gemessen wird.

#### 4.8.4 Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeit der Proben wurde mit dem Multiline F/Set 3 der Firma WTW bestimmt.

#### 4.8.5 Anreicherungsverfahren

Mit der Anreicherung der Wasserproben wurden zwei Ziele verfolgt: zum einen die Aufkonzentration der Proben und zum anderen die Abtrennung störender Matrixkomponenten. Für manuelle Messungen mit dem ELISA wurden je 500 mL einer Wasserprobe mittels Festphasenextraktion (SPE) angereichert. Die verwendete Anreicherungsverfahren (Tabelle 4.18) basiert auf zwei Protokollen aus der Literatur (QUINTANA et al. 2004; ZÜHLKE et al. 2005):

**Tabelle 4.18:** Protokoll der SPE-Methode zur Anreicherung der Wasserproben (Verändert nach QUINTANA et al. (2004) und ZÜHLKE et al. (2005)).

1. Filtrieren der Proben durch Papier-Faltenfilter
2. Filtrieren der Proben durch Glasfaserfilter (GF 8) und Membranfilter ME 25 (Mischester), 0,45 µm
3. Einstellen von pH 7, Portionieren der Proben in 500 mL Aliquots, Versetzen mit 2,5 mL Methanol,
4. SPE Säulen (Strata X, Phenomenex) konditionieren mit 2 × 4 mL Methanol und 2 × 4 mL MilliQ-Wasser / Methanol (0,5%)
5. Durchsaugen der Proben mit angelegtem Unterdruck von 650 mbar (5,5 mL min<sup>-1</sup>), Abstimmen der einzelnen Säulen aufeinander
6. Nachspülen der Probengefäße mit 10 mL deionisiertem Wasser
7. Waschen der Säulen bei 650 mbar Unterdruck
  - a) 2 × 5 mL Methanol / MilliQ-Wasser (1:1)
  - b) 2 × 5 mL Aceton / MilliQ-Wasser (1:2)
  - c) 2 × 5 mL Hexan
8. Trocknen der Säulen mit Stickstoff
9. Elution mit 2 × 3,5 mL Methanol
10. Abblasen des Methanols mit Stickstoff über einem Wasserbad (40 °C)
11. Aufnehmen in 500 µL Hexan / Aceton (65:35, v/v)
12. Adsorptionschromatographie der Lösung aus 11) an 500 mg Silicagelsäulen, Säulen vorher mit 2,5 mL Hexan / Aceton (65:35, v/v) konditionieren; Nachspülen des Reagenzglas mit 8 mL Hexan / Aceton (65:35, v/v) und kurzzeitige Behandlung im Ultraschallbad; ebenfalls Eluieren dieser 8 mL
13. Eindampfen der Lösung mit Stickstoff über einem Wasserbad
14. Aufnehmen in 500 µL Methanol und Einlagerung bei 4°C

Im Rahmen der Anreicherung konnte eine Aufkonzentration um den Faktor 1000 erzielt werden. Zur Durchführung der ELISA Messung wurde dieser rein methanolische Extrakt allerdings 1:20 auf einen 5%igen Methanolgehalt verdünnt, so dass eine "Netto"-Anreicherung um den Faktor 50 erreicht werden konnte. Die Verdünnung der Extrakte mit Reinstwasser fand jeweils unmittelbar vor der Messung statt.

#### 4.8.6 Bestimmung der Wiederfindungsraten

Für jedes Messverfahren wurden die Wiederfindungsraten mit Hilfe dotierter Proben bestimmt. Vor der Feldstudie erfolgte die Ermittlung der Wiederfindungsraten in Leitungswasser und Reinstwasser, jeweils mit  $2 \text{ ng L}^{-1}$  E2 dotiert, sowohl für die Bestimmung mit dem ESTR-A-LISER als auch für die Referenzmethode (LC-MS/MS).

Während der Feldstudie konnte die Wiederfindung der Anreicherungsstufe bestimmt werden, indem einzelne Proben aliquotiert und mit 3, 6 bzw.  $9 \text{ ng L}^{-1}$  E2 dotiert wurden. Die dotierten Proben wurden mit zweifacher Wiederholung ( $n = 2$ ) je Dotierungsstufe angereichert und gemessen, ebenso wie die originale Probe ohne E2-Zusatz. Für Messungen mit dem ESTR-A-LISER erfolgte die Bestimmung der Wiederfindungsraten analog, jedoch ohne Anreicherung, die Proben wurden direkt gemessen. Aus den Werten jeder Dotierungsstufe wurden Mittelwert und Standardabweichung errechnet. Mit den Mittelwerten konnte eine lineare Regression durchgeführt werden, wobei eine Gewichtung der Mittelwerte unter Berücksichtigung der Standardabweichung vorgenommen wurde.

#### 4.8.7 Messung der Feldproben

Die Feldproben wurden in zwei verschiedenen Varianten gemessen. Zum einen erfolgte die Messung innerhalb von 24 Stunden nach der Probenahme direkt auf den Filtrationsschritten folgend mit Hilfe des ESTR-A-LISER. Zum anderen wurden die angereicherten Proben manuell gemessen. Für die manuelle Messung wurde das für den Methanolgehalt von 5 % in der Probe optimierte Assay-Protokoll 4 verwendet, welches in der unten aufgeführten Tabelle beschrieben ist. Die Messung am ESTR-A-LISER erfolgt anhand Assay-Protokoll 3b (siehe Tabelle 4.15).

**Tabelle 4.19:** Assay-Protoll 4 für die manuelle Messung von Realproben nach der Anreicherung mit einem Methanolgehalt von 5 %.

Arbeitsschritt:	Substanz	Konzentration Verdünnung	Menge [ $\mu\text{L}$ ]	Zeit [min]	Temperatur
<b>Beschichtung</b>	BN 2578	1:10 000	100	über Nacht	20°C
<b>Standard</b>	E2	0-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$	100	20	RT
<b>Tracer</b>	Tracer 2	1:70 000	100	15	RT
<b>Substrat</b>	nach FREY et al. (2000)		200	30	RT
<b>Stopplösung</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 M	50		RT
Messung der optischen Dichte (Differenzmessung von 450 nm - 650 nm)					

#### 4.8.8 Referenzmessungen

Referenzmessungen wurden durch das Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit der Universität Bonn durchgeführt. Die verwendete LC-MS/MS Methode stellt eine Adaptation bereits beschriebener Verfahren dar (ZÜHLKE et al. 2005). Zur Messung der einzelnen Proben wurde stets ein Aliquot von 500  $\mu\text{L}$  verwendet, die Aufarbeitung dieser Proben erfolgte durch das Referenzlabor. Nach Korrektur der Messwerte mit Hilfe der Surrogatstandards d<sub>4</sub>-Estron und d<sub>4</sub>-Estradiol ergab sich, basierend auf einem Signal-Rauschverhältnis von drei, die Nachweisgrenze von E2 zu 0,3  $\text{ng L}^{-1}$ .

## 5 Ergebnisse

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der durchgeführten Experimente dargestellt. Versuche, die in der Diskussion (Kapitel 6) nicht ausführlich behandelt werden, werden bereits in diesem Kapitel, im Anschluss an die Darstellung ihrer Ergebnisse, diskutiert.

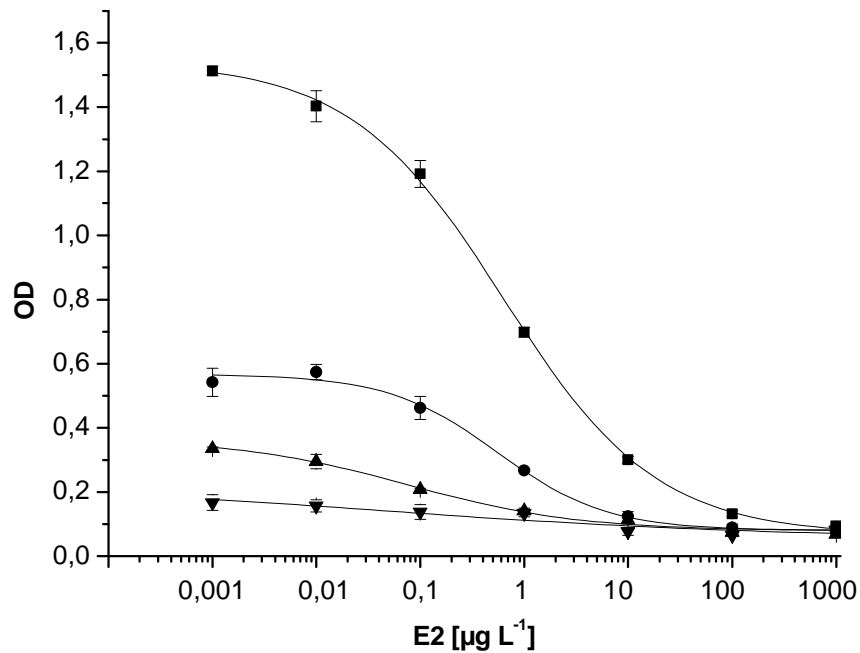
### 5.1 Entwicklung und Optimierung des Immunoassays

Entscheidende Kriterien bei der Entwicklung und Optimierung des Immunoassays waren zum einen der Signalbereich (Bereich der Kalibrierfunktion zwischen der oberen, Parameter A, und der unteren Asymptote, Parameter D) und zum anderen Parameter C (die E2-Konzentration am Wendepunkt der Kalibrationskurve). Dieser liegt im Bereich maximaler Steigung und ermöglicht damit die größte Messgenauigkeit. Daher bietet der Parameter C für die Optimierung einen guten Vergleichspunkt für verschiedene Kalibrationskurven. Das Ziel der Optimierung war ein maximaler Signalbereich bei gleichzeitiger Minimierung von C.

Ausgangspunkt dieser Arbeit war ein kompetitiver Immunoassay mit Doppelantikörpertechnik, entwickelt von der Arbeitsgruppe Prof. Meyer, TU München-Weihenstephan. Da unter der Anforderung, einen möglichst kurzen und einfachen ELISA zu entwickeln, die notwendige Empfindlichkeit im Test nicht erreicht werden konnte, wurde eine eigene Immunisierung zur Gewinnung von E2-Antikörpern in Auftrag gegeben und ein eigener Tracer synthetisiert. Die Ergebnisse der Entwicklung und Optimierung des ELISA, beruhend auf dem Antikörper BN 2578 sowie den Tracern 1 und 2, sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

#### 5.1.1 Antikörper

Das Serum BN 2578 zeigte bei der Checkerboard-Titration, beschrieben in Kapitel 4.1.4, spezifische Bindungen mit E2 und eignete sich damit zur Verwendung als Antikörper für den ELISA. Bei der Umstellung des Assays auf das unmittelbare Beschichten mit dem E2-Antikörper wurden verschiedene Verdünnungen des Antikörperserums getestet und miteinander verglichen (Abbildung 5.1 und Tabelle 5.1).



**Abbildung 5.1:** 4-Parameter-Kurven bei Antikörperserum-Verdünnungen von 1:10 000 (Quadrate), 1:20 000 (Kreise), 1:30 000 (Dreiecke) und 1:40 000 (umgedrehte Dreiecke). Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt ( $n = 3$ ).

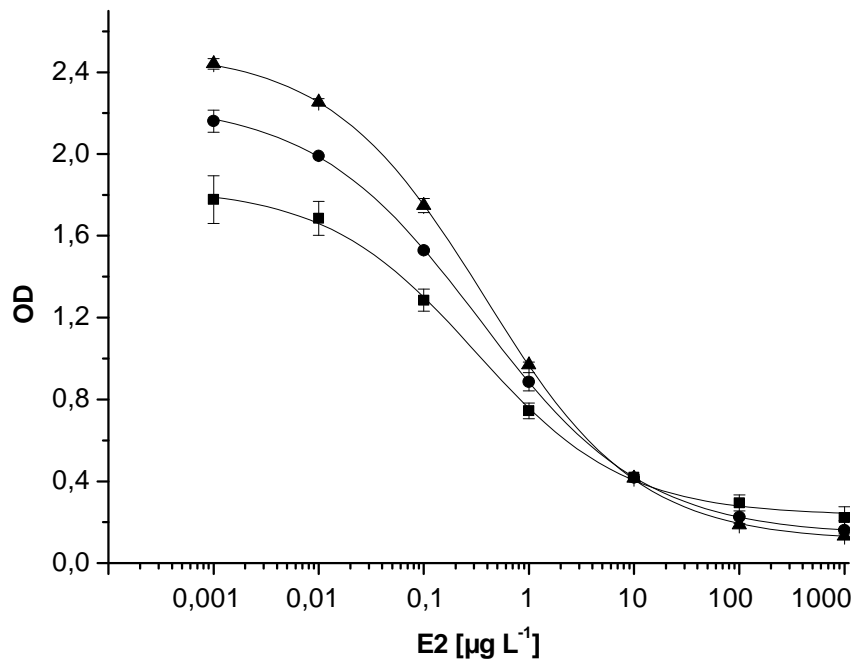
Auffällig war der große Unterschied zwischen der Verdünnung 1:10 000 und 1:20 000, der sich in den Parametern der Kurven widerspiegelte. Die Kurve bei einer Verdünnung des Serums von 1:40 000 war auf Grund ihres flachen Verlaufs und einem Signalbereich (A - D) < 0,2- OD nicht auswertbar.

**Tabelle 5.1:** Parameter A, C, D und der Signalbereich (A - D) bei verschiedenen Verdünnungen des Antikörperserums.

Verdünnung Antikörperserum	A [OD]	C E2 [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	D [OD]	Signalbereich A-D [OD]
1:10 000	1,54	0,63	0,07	1,47
1:20 000	0,57	0,55	0,08	0,49
1:30 000	0,37	0,08	0,08	0,29
1:40 000	0,23	0,05	0,06	0,17

In den weiteren Versuchen wurde mit einer Serumsverdünnung von 1:10 000 gearbeitet, da im Vergleich zu einem niedrigen, ein hoher A-Wert mehr Möglichkeiten für die Optimierung der Sensitivität zulässt, bei welcher die Signalstärke zumeist verringert wird. Diese Ergebnisse wurden mit Tracer 1 erzielt, mit Tracer 2 wurden später im Rahmen der Charakterisierungsversuche ausführlichere Tests durchgeführt (siehe Kapitel 5.2.2).

Mit dem Ziel, einen möglichst großen Signalbereich bei einem kleinen Parameter C zu erreichen, wurden Versuche zu verschiedenen Beschichtungsvolumina durchgeführt.



**Abbildung 5.2:** Vergleich verschiedener Beschichtungsvolumina von 100  $\mu\text{L}$  (Quadrate), 150  $\mu\text{L}$  (Kreise) und 200  $\mu\text{L}$  (Dreiecke). Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt ( $n = 3$ ).

Aus Abbildung 5.2 und Tabelle 5.2 wird deutlich, dass mit höheren Beschichtungsvolumina der Signalbereich größer und der Parameter C höher wurde. Dies ist durch die erhöhte Anzahl von Antikörperbindungsstellen erklärbar, welche die Sensitivität des Tests verringern (siehe auch Kapitel 2.3.3).

**Tabelle 5.2:** Vergleich verschiedener Beschichtungsvolumina bezüglich der Parameter A, C und D.

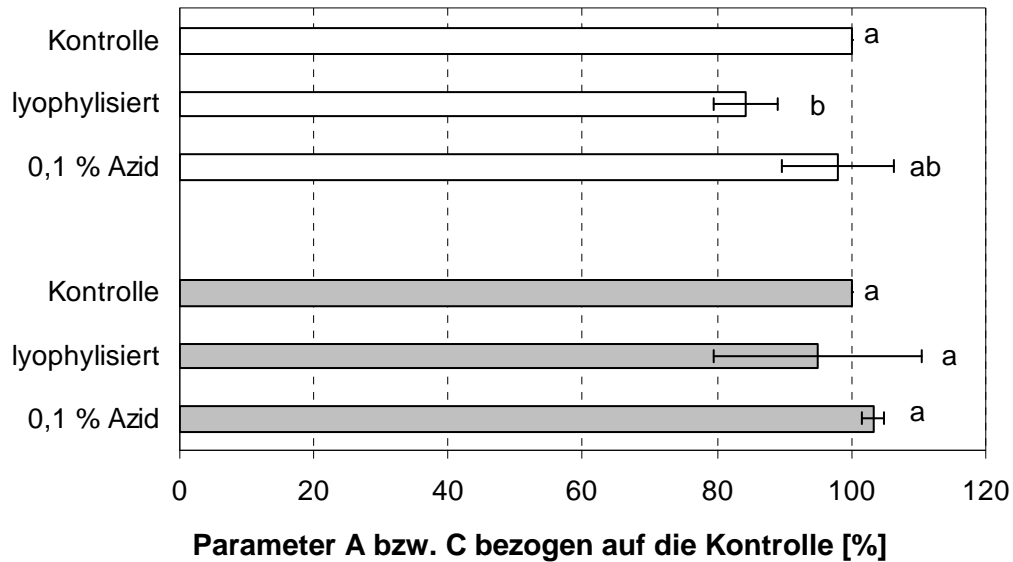
Beschichtungsvolumen [ $\mu\text{L}$ ]	A [OD]	C E2 [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	D [OD]
100	1,84	0,31	0,23
150	2,25	0,33	0,14
200	2,51	0,37	0,11

Insbesondere im Hinblick auf den ESTR-A-LISER, bei dem die Signalstärke im Vergleich zum manuellen Test geringer ausfiel, wurde das Beschichtungsvolumen auf 200  $\mu\text{L}$  pro Kavität festgelegt, auch wenn dies mit einem geringen Anstieg von Parameter C verbunden war.

Die Untersuchung zu den verschiedenen Lagerungsvarianten der Antikörper, beschrieben in Kapitel 4.1.6, ergaben nach der statistischen Analyse mittels t-Test, dass der Parameter



A des lyophilisierten Serums signifikant kleiner war als in der Kontrolle (Abbildung 5.3). Weiteren signifikante Unterschiede konnten nicht festgestellt werden. Da die Kontrolle die Bezugsvariante war, konnte bei ihr keine Standardabweichung dargestellt werden<sup>36</sup>.



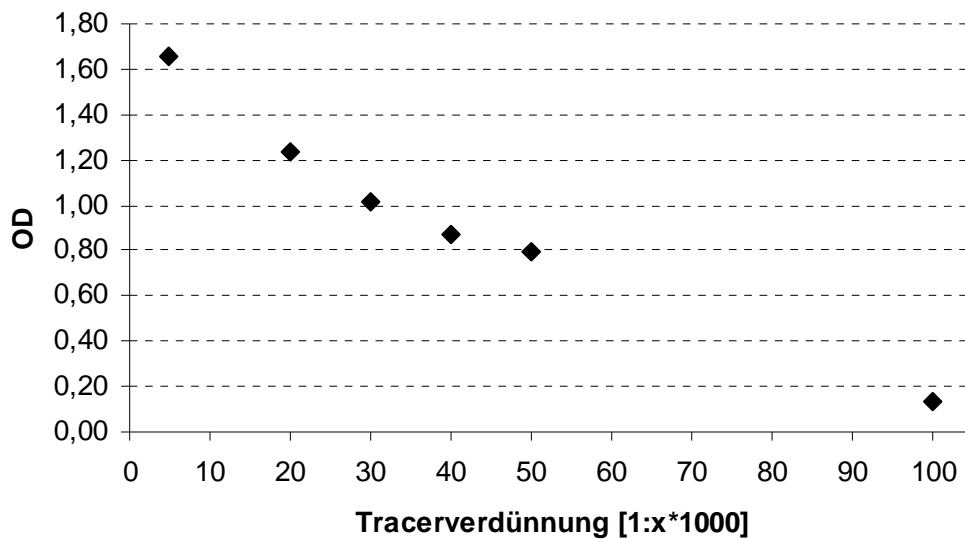
**Abbildung 5.3:** Parameter A und C bei verschiedenen Lagerungsvarianten bezogen auf die Kontrolle (Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ), Parameter A (weiße Balken) und Parameter C (graue Balken). Die Standardabweichung von A- bzw. C bezüglich der Kontrolle sind als Fehlerbalken dargestellt. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet ( $n = 3$ ). Die Lagerungsdauer betrug 10 Tage.

Als Konsequenz aus diesen Versuchen wurde das Serum auf die drei hier untersuchten Lagerungsweisen aufgeteilt, um es sicher aufzubewahren.

### 5.1.2 Tracer

Zur Herstellung des **Tracers 1** erfolgte die Kopplung von Peroxidase (POD) an das 6-CMO-Derivat des E2, basierend auf der „Gemischtes-Anhydrid-Methode“ (engl.: mixed anhydride), nach der Kopplungsvariante beschrieben in MUNRO und STABENFELDT (1984). Dieser Tracer wurde zunächst auf seine Affinität gegenüber dem E2-Antikörper getestet, indem ein Assay mit verschiedenen Tracer-Konzentrationen ohne Hinzugabe von E2 (Blindwert) durchgeführt wurde. Dabei zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit zwischen Tracer-Verdünnung und Signalstärke (Abbildung 5.4).

<sup>36</sup> Dieses Experiment wurde auf drei verschiedenen MTP durchgeführt (Kapitel 4.1.6). Es wurden die Anteile der zu testenden Varianten an der Kontrolle miteinander verglichen. Daher erhält die Kontrolle als Bezugsgröße den Wert 100 und es kann keine Standardabweichung angegeben werden.



**Abbildung 5.4:** Zusammenhang von Tracer-Verdünnung und Optischer Dichte des Tracers 1.

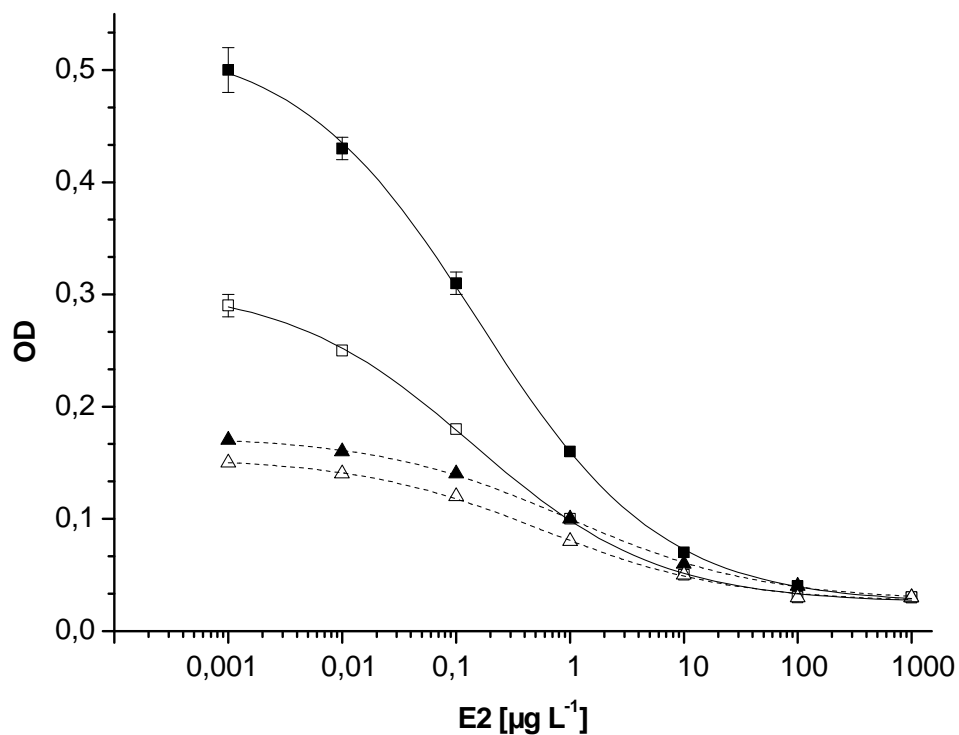
Die gewünschte Signalstärke 1,0 OD für den Blindwert wurde mit einer Tracer-Verdünnung von 1:30 000 erreicht. Die Ergebnisse weiterer Optimierungsschritte mit Tracer 1 sind in Kapitel 5.1.3 dargestellt.

Der **Tracer 2** wurde nach der Carbodiimid-Methode synthetisiert. Die Parameter A, C und D der Kalibrationskurven bei verschiedenen Tracer-Verdünnungen nach der ersten gelchromatographischen Aufreinigung sind in Tabelle 5.3 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass trotz höherer Verdünnungen der Parameter C nicht ausreichend verringert werden konnte, ohne dass der Signalbereich zu klein wurde. Die D-Werte weisen auch bei starker Verdünnung noch auf unspezifischer Bindungen hin. Nach der Wiederholung des Aufreinigungsschrittes mit einer Sephadex G-25-Säule zeigte der Tracer 2 einen ausreichend großen Signalbereich bei guter Sensitivität (Abbildung 5.5 und Tabelle 5.3). In Abweichung zum Assay-Protokoll wurde das Volumen der Standards auf 150  $\mu\text{L}$ /Kavität erhöht und das Volumen des Tracers auf 50  $\mu\text{L}$  reduziert, daher sind die Werte von A und C im Vergleich zu Ergebnissen anderer Untersuchungen relativ klein.

**Tabelle 5.3:** Parameter A, C, und D der Kalibrationskurven mit unterschiedlicher Tracer-Verdünnung des einfach und zweifach aufgereinigten Tracers 2 (\* bedeutet, dass abweichend vom Assay-Protokoll das Tracer-Volumen 50  $\mu\text{L}$  und das Volumen der Standards 150  $\mu\text{L}$  betrug).

Tracer-Verdünnung		A [OD]	C E2 [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	D [OD]	Signalbereich A-D [OD]
<b>Einfach aufgereinigt</b>	1:50 000	1,34	12,4	0,33	1,01
	1:100 000	0,97	4,87	0,20	0,77
	1:200 000	0,58	1,89	0,16	0,42
	1:300 000	0,50	1,58	0,09	0,41
	1:400 000	0,17	0,97	0,03	0,14
	1:500 000	0,15	0,57	0,03	0,12
<b>Zweifach aufgereinigt*</b>	1:50 000	0,53	0,16	0,03	0,5
	1:100 000	0,31	0,14	0,03	0,28



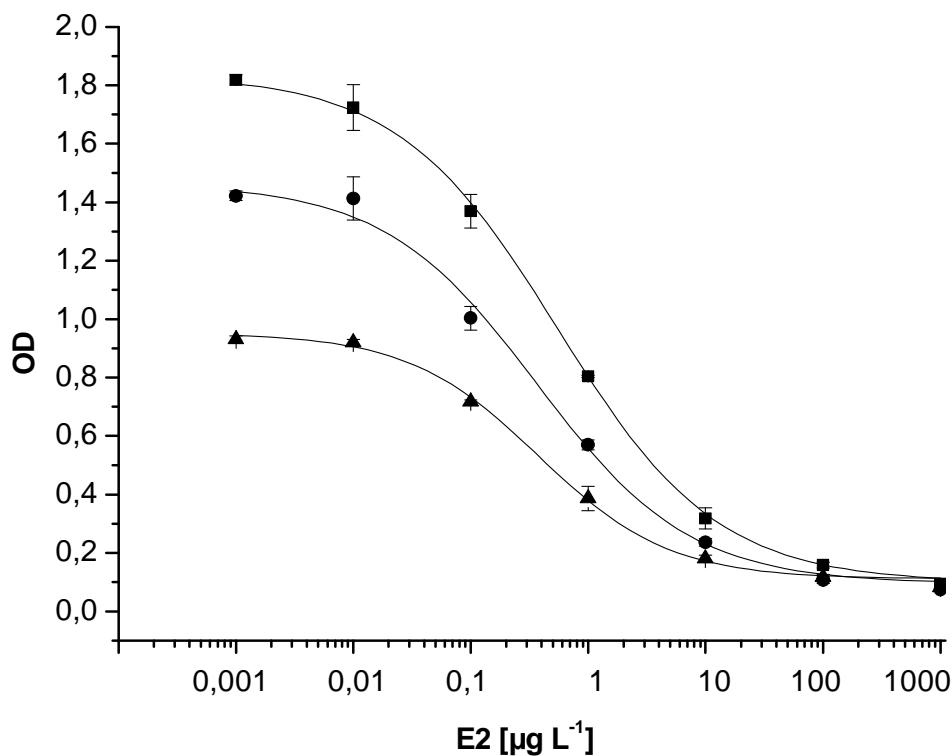
**Abbildung 5.5:** Kalibrationskurven unter Verwendung von Tracer 2. Einfach aufgereinigt: 1:400 000-fach (gestrichelte Linie Dreiecke ausgefüllt) und 1:500 000-fach verdünnt (gestrichelte Linie, leere Dreiecke) sowie zweifach aufgereinigt 1: 50 000-fach (Linie, ausgefüllte Quadrate) und 1:100 000-fach (Linie, leere Quadrate) verdünnt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt ( $n = 3$ ).

Weitere Ergebnisse zur Optimierung des Tests unter Verwendung von Tracer 2 im Rahmen der mehrfaktoriellen Untersuchung sind in Kapitel 5.2.2 dargestellt.

### 5.1.3 Optimierung von Verdünnungen und Inkubationszeiten

In diesem Kapitel werden zuerst die Ergebnisse bezüglich unterschiedlicher Verdünnungsstufen des Tracers 1 aufgezeigt. Im Anschluss daran werden die Ergebnisse zu den Versuchen zum Einfluss verschiedener (Vor-)Inkubationszeiten von Standards und Tracern dargestellt.

Wie aufgezeigt, haben die Verdünnungen von Tracer und Antikörper einen deutlichen Einfluss auf die Optimierungsparameter C und Signalbereich. Für Tracer 1 wurde die Auswirkung der Verdünnungsstufen 1:20 000, 1:30 000 und 1:40 000 auf den Signalbereich und C untersucht. Dabei verschob sich die 4-Parameter-Kurve bei höherer Tracer-Konzentration in den Bereich höherer E2-Konzentrationen (Abbildung 5.6).



**Abbildung 5.6:** Auswirkung der Tracer-Verdünnungen 1:20 000 (Quadrate), 1:30 000 (Kreise) und 1:40 000 (Dreiecke). Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt (n = 4).

In Tabelle 5.4 sind die Parameter A, C und D aufgeführt. Wie zu erwarten war, sank der Wert von A analog zum Versuch in Kapitel 5.1.2 mit zunehmender Verdünnung des Tracers, während die Werte von D annähernd konstant blieben. Der C-Wert sank nur deutlich zwischen den Verdünnungsstufen 1:20 000 und 1:30 000, während sich die beiden höheren Verdünnungen kaum voneinander unterschieden. Daher kann bei Tracer 1 davon ausgegangen werden, dass bei einer Tracer-Verdünnung im Bereich von 1:30 000 das Affinitätslimit erreicht wurde. Daher wurde bei den folgenden Versuchen mit einer Tracer-Verdünnung von 1:30 000 gearbeitet.

**Tabelle 5.4:** Auswirkung der Tracer-Verdünnung auf die Parameter A-, C-, und D-Wert.

<b>Tracer-Verdünnung</b>	<b>A</b> [OD]	<b>C</b> E2 [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	<b>D</b> [OD]
<b>1:20 000</b>	1,84	0,55	0,10
<b>1:30 000</b>	1,46	0,37	0,10
<b>1:40 000</b>	0,95	0,38	0,11

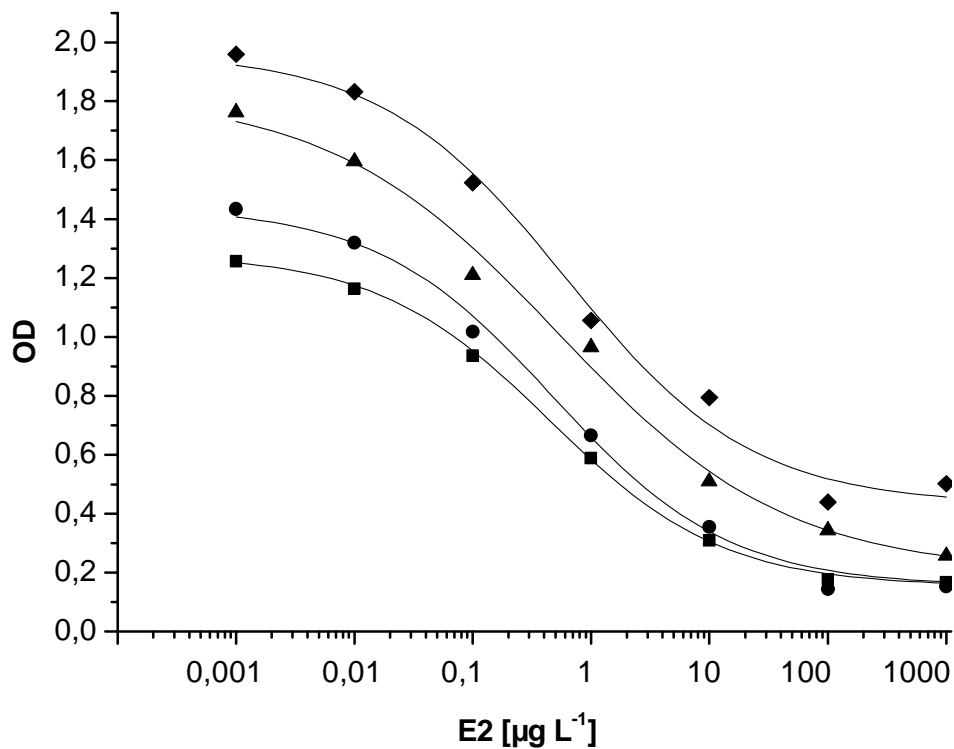
In den folgenden Versuchen wurde untersucht, inwiefern die Inkubationszeiten von Standard und Tracer eine Rolle spielten. Zunächst wurde die Inkubationszeit der Standards, auch Vorinkubationszeit genannt, betrachtet. Diese dient dazu, dem Analyten in der Konkurrenz um Antikörperbindungsstellen gegenüber dem Tracer einen Vorteil zu verschaffen und Unterschiede aus der Pipettierreihenfolge auszugleichen. Grundlage war das Assay-Protokoll 2a, variiert wurden die Standard-Inkubationszeiten von 0, 15, 30 und 45 min. Die Parameter A, C und D der vier Varianten wurden miteinander verglichen (Tabelle 5.5).

**Tabelle 5.5:** Auswirkung der Inkubationszeit der Standards auf die Parameter A-, C-, und D-Wert.

<b>Inkubationszeit Standards [min]</b>	<b>A</b> [OD]	<b>C</b> E2 [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	<b>D</b> [OD]
<b>0</b>	1,77	0,43	0,19
<b>15</b>	1,84	0,34	0,12
<b>30</b>	1,84	0,40	0,16
<b>45</b>	2,02	0,32	0,11

Abgesehen von einem tendenziellen Anstieg der A-Werte mit zunehmender Inkubationszeit der Standards waren keine deutlichen Tendenzen bei den Parametern C und D erkennbar. Daher wurde die Inkubationszeit der Standards für den manuellen Test wegen der guten Handhabbarkeit auf 20 Minuten festgelegt. Besonders wichtig war das Ergebnis in Bezug auf den ESTR-A-LISER, da bestätigt wurde, dass eine Inkubationszeit der Standards von 32 min keinen Verlust bezüglich der Empfindlichkeit bedeutete.

Die Untersuchung zum Einfluss der Tracer-Inkubationszeit erfolgte analog. Miteinander verglichen wurden Inkubationszeiten von 15, 30, 45 und 60 min. Mit Hilfe der 4-Parameter-Kurven (Abbildung 5.7) wird der deutliche Einfluss der Inkubationszeit des Tracers graphisch dargestellt.



**Abbildung 5.7:** Auswirkung verschiedener Inkubationszeiten des Tracers auf die 4-Parameter-Kurven. 15 min (Quadrate), 30 min (Kreise), 45 min (Dreiecke) und 60 min (Rauten).

Es zeigte sich, dass die Tracer-Inkubationszeit, im Unterschied zur Vorinkubationszeit, die Parameter A, C und D deutlich beeinflusste (Tabelle 5.6)

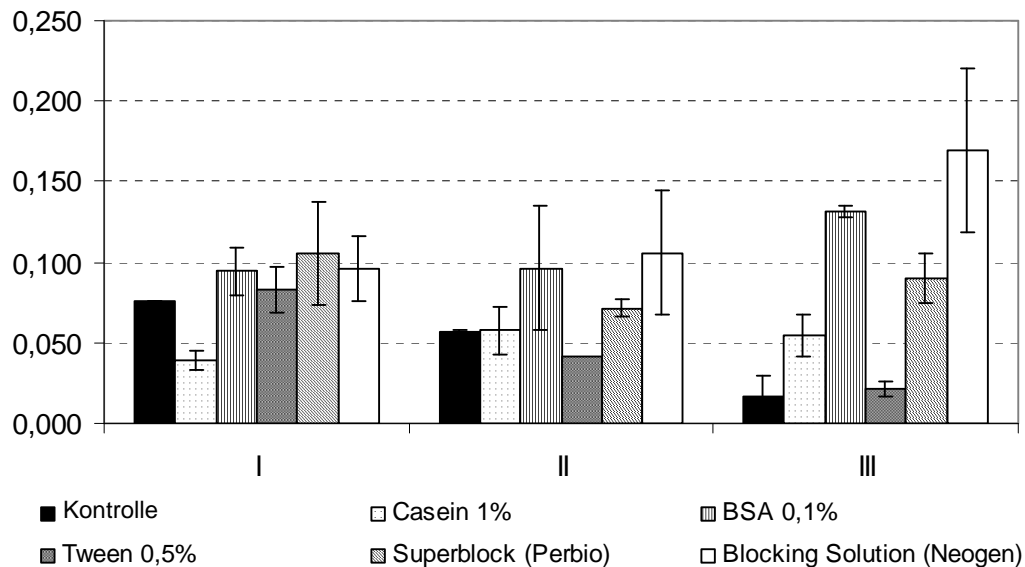
**Tabelle 5.6:** Auswirkung der Inkubationszeit des Tracers auf die Parameter A, C, und D.

Inkubationszeit Tracer [min]	A-Werte [OD]	C-Werte E2 [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	D-Werte [OD]
15	1,28	0,45	0,15
30	1,44	0,47	0,15
45	1,82	0,53	0,20
60	1,97	0,62	0,43

Parameter A und D wiesen mit zunehmender Inkubationszeit eine höhere OD auf bei gleichzeitigem Anstieg der E2-Konzentration am Testmittelpunkt (C). Somit verschob sich die 4-Parameter-Kurve mit steigender Inkubationszeit in den Bereich höherer E2-Konzentrationen. Diese Zusammenhänge sind in Kapitel 4.2.2 mit Tracer 2 in einem mehrfaktoriell angelegten Versuch ausführlicher behandelt.

### 5.1.4 Blocking

Die Wirkung der Blocking-Varianten lässt sich in erster Linie am Parameter D erkennen (Abbildung 5.8), aber auch die Auswirkungen auf A und C wurden berücksichtigt, um negative Auswirkungen auf den Signalbereich und die Sensitivität des ELISA durch das Blocking zu vermeiden (die Ergebnisse der Parameter A und C sind nicht einzeln dargestellt).



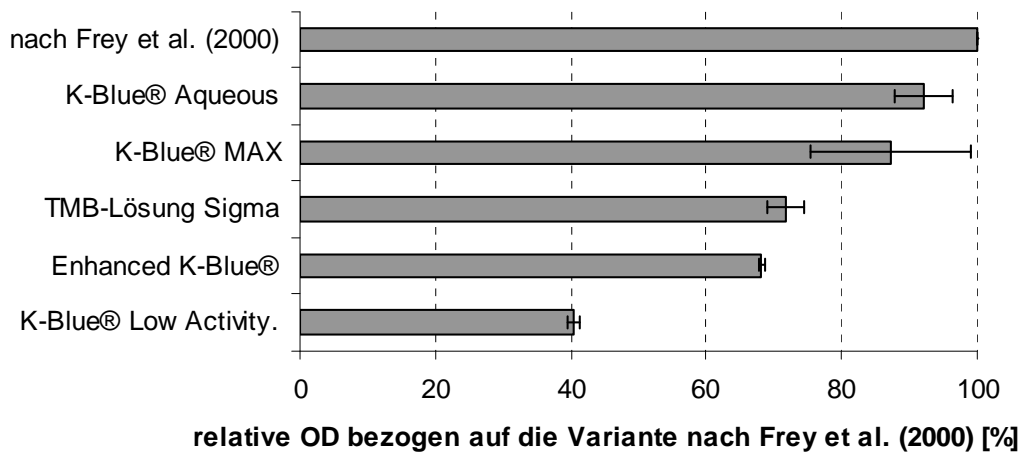
**Abbildung 5.8:** Parameter D der verschiedenen Blocking-Mittel bei den jeweiligen Blocking-Varianten (I: 30 min Blocking nach Beschichtung, II: Blocking-Mittel gleichzeitig mit dem Tracer, III: Kombination aus Variante I und Variante II). Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt (n = 4).

Die Untersuchungen zu den verschiedenen Blocking-Varianten ergaben für die Verwendung kommerzieller Blocking-Mittel keinen Vorteil, zum Teil ergaben sie sogar einen höheren Wert für Parameter D als ohne Blocking. Ebenso verhielt es sich mit der Variante 0,1 % BSA. Mit dem Einsatz von 0,5 % Tween waren die D zwar geringer, insbesondere beim Blocking während der Tracer-Inkubation, der A-Wert sank aber sehr deutlich bei gleichzeitigem Anstieg des C-Werts. Da sich durch den Einsatz von Tween der Signalbereich verkleinerte und der Test unempfindlicher wurde, ist diese Variante daher unbrauchbar. Keine negativen Auswirkungen auf A und C zeigte der Einsatz von 1 % Casein.

In Folge dieser Ergebnisse wurde auf das Blocking grundsätzlich verzichtet, da der Blockingschritt für diesen ELISA keine deutlichen Vorteile zeigte, jedoch bei der Blockingvariante I und III zusätzlich Zeit beanspruchte. Das Blocking mit Casein während der Tracer-Inkubation (Blockingvariante II) zeigte ebenfalls keine Vorteile.

### 5.1.5 Substrate

In dieser Untersuchung wurden fünf kommerzielle und eine selbst angesetzte Substratlösung bezüglich Parameter A miteinander verglichen (Abbildung 5.9).



**Abbildung 5.9** A-Werte nach dem Abstoppen der Substratreaktion nach 60 Minuten relativ zu der Substratvariante nach FREY et al. (2000). Die dargestellten Werte liegen in zweifacher Wiederholung ( $n = 2$ ) vor. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

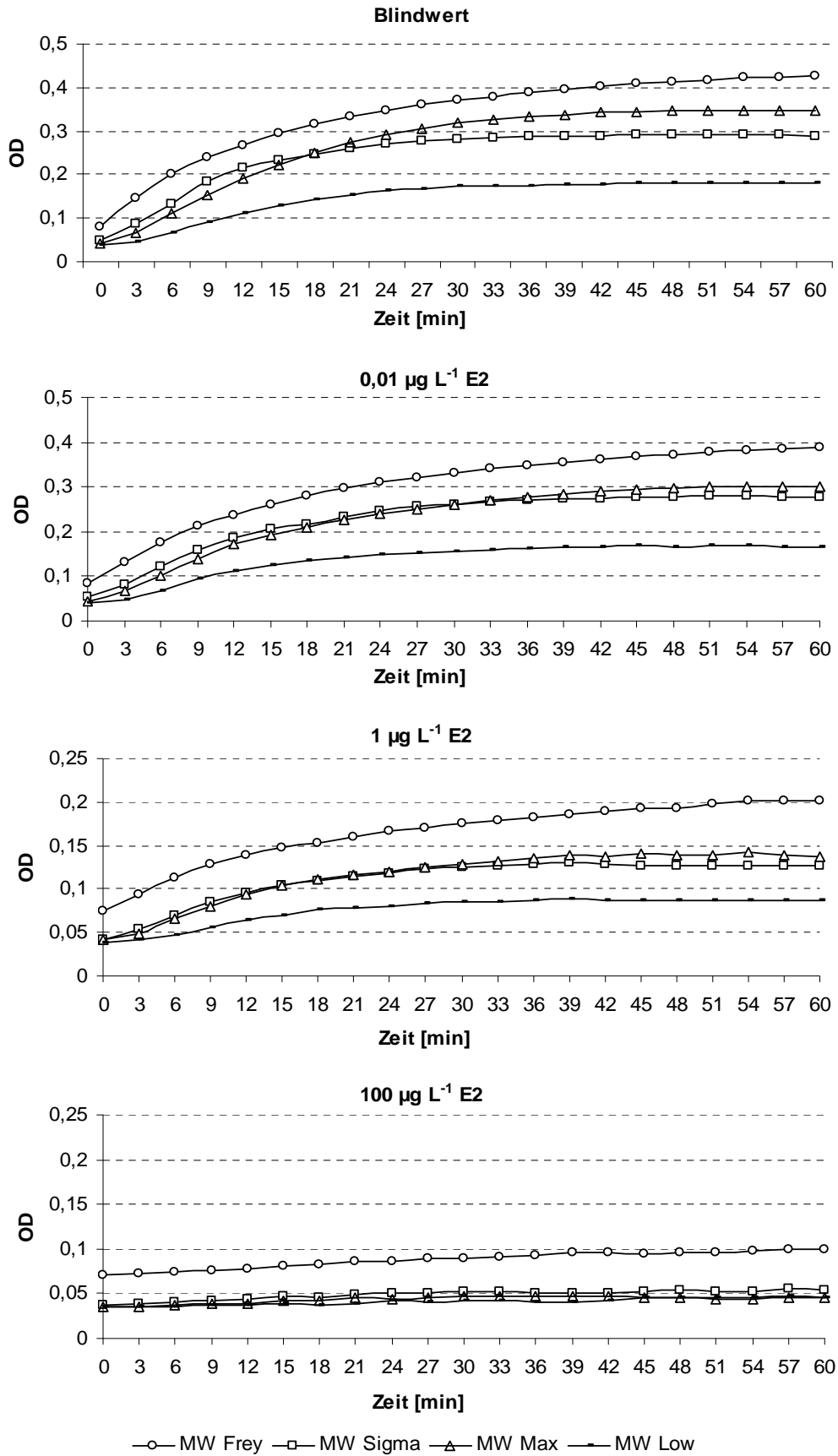
Die Ergebnisse zeigen, dass die kommerziell erhältlichen Substrate weniger gut geeignet sind als das nach FREY et al. (2000) selbst erstellte. Annähernd gleichwertig erscheinen lediglich die kommerziellen Varianten K-Blue® Aqueous und K-Blue® MAX.

Vergleicht man die OD-Werte der Standards verschiedener E2-Konzentrationen über den Zeitraum von einer Stunde miteinander (Abbildung 5.10), fällt auf, dass bei steigender E2-Konzentration der Anstieg der OD-Werte mit längerer Inkubationszeit geringer ausfällt. Da sich die kommerziellen Varianten kaum voneinander unterscheiden, sind in Abbildung 5.10 die Varianten Enhanced K-Blue® und Varianten K-Blue® Aqueous nicht dargestellt.

Im Unterschied zu der Substratvariante nach FREY et al. (2000) nähern sich die Kurvenverläufe der kommerziellen Varianten in Abbildung 5.10 bei zunehmender E2-Konzentration einander an und flachen früher ab. Entsprechend ihrer Ausrichtung zeigte die Variante K-Blue® Low Activity bei allen E2-Konzentrationen die geringste OD und dementsprechend die flachste Kurve. Im Vergleich aller Kurven weist das Substrat nach FREY et al. (2000) die größte OD und die steilsten Kurven auf und zeigt damit die beste Eignung.

Besonders wichtig war diese Untersuchung im Hinblick auf die Automatisierung, da zunächst geplant war, ein kommerzielles Substrat einzusetzen, um die Handhabung zu vereinfachen. Für die Automatisierung wurde ein Substrat gesucht, das eine möglichst hohe OD lange konstant halten kann. Auf Grund der deutlich höheren Preise der beiden





**Abbildung 5.10:** Farbentwicklung der verschiedenen Substrate über 60 Minuten bei unterschiedlichen E2-Konzentrationen (MW bedeutet Mittelwert, n=3).



Die Steigungen der Trendlinien aller Varianten sind mit unter 0,003 OD/min sehr gering, so dass von einer guten Stabilität der abgestoppten Substratlösungen ausgegangen werden kann. Ein negatives Vorzeichen bedeutet, dass die OD mit der Zeit bezüglich Zeitpunkt 0 geringer wurde. Die kommerziellen Varianten der Red Stopp Solution wiesen einen deutlich kleineren Signalbereich auf als die untersuchten Säuren (Tabelle 5.7). Im Vergleich zur Salzsäure zeigten die untersuchten Schwefelsäurevarianten einen größeren Signalbereich und eine bessere Stabilität und damit eine bessere Eignung zum Abstoppen von TMB-Substratlösungen. Auf Grund der vernachlässigbaren Unterschiede zwischen der 1 M und der 2 M Schwefelsäure wurde im Folgenden wegen der besseren Handhabbarkeit mit 1 M Schwefelsäure gearbeitet. Die bessere Stabilität der OD der kommerziellen Stopplösung kompensieren nicht die höheren Kosten und nicht den geringeren Signalbereich, so dass diese Varianten keine weitere Verwendung fanden.

## 5.2 Charakterisierung des Assays

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Versuche zur Kreuzreaktivität und zu den Grenzen des Assays dargestellt. Im Anschluss daran werden die ermittelten Kenndaten des ELISA aufgezeigt.

### 5.2.1 Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivität wurde (wie in Kapitel 2.3.7 beschrieben) aus den unterschiedlichen Konzentrationen, die für strukturverwandte Verbindungen nötig sind, um am Antikörper 50 % der Tracer-Bindung zu unterbinden, über den Kurvenverlauf sowohl am Testmittelpunkt (C) als auch bei 80 % OD ermittelt (Tabelle 5.9).

Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen unterschieden sich die Kreuzreaktivitäten bei 80 % OD nur gering von denen am C-Wert. Bei einigen Substanzen war die Kreuzreaktivität bei 80 % OD kleiner als am Testmittelpunkt, so dass unter diesen Messbedingungen auch im unteren  $\text{ng L}^{-1}$  Bereich von einer hohen Selektivität ausgegangen werden kann. Für die meisten Metaboliten des E2 und EE2 lagen die Kreuzreaktivitäten unter 1 %. Wesentliche Kreuzreaktivitäten zeigten sich lediglich für Metaboliten des E2, die an der Hydroxyfunktion in Position 3 konjugiert sind: E2-3-Sulfat und E2-3-Glucuronid zeigten Kreuzreaktivitäten von 27 % bzw. 9 %. Diese geringere Selektivität hinsichtlich der an Position 3 konjugierten E2-Metaboliten kann in Anlehnung an die Arbeit von SCHNEIDER (2005) durch den sterischen Anspruch des im Rahmen der

Immunisierung verwendeten E2-BSA-Konjugats erklärt werden. Die räumliche Nähe des Trägerproteins, gebunden mittels der Oximbrücke an Position 6, zur Hydroxygruppe an Position 3 verhindert eine gute Diskriminierung des Sulfats und Glucuronids an Position 3 des Östradiols. (Der Antikörper ist an dieser Stelle „blind“ und erkennt den Unterschied zwischen dem E2 und den an Position 3 derivatisierten Konjugaten schlecht (SCHNEIDER 2005). Im Gegensatz dazu weisen die an Position 17 konjugierten E2-Metaboliten sowie EE2 und seine Metaboliten eine geringe Kreuzreaktivität von < 0,5 % auf. Abgesehen von dem Konjugat E2-3-SO<sub>4</sub> lag die Selektivität des Antikörperserums deutlich unter dem in der DIN-Norm angegebenen Grenzwert von 10 % (DIN ISO 15089 2000).

**Tabelle 5.9:** Übersicht der Kreuzreaktivitäten. Angegeben ist die molare Kreuzreaktivität in Prozent bezogen auf Östradiol.

	<b>Kreuzreaktivität C-Wert</b> (± Standardabweichung)	<b>Kreuzreaktivität bei 80 % OD</b> (± Standardabweichung)
<b>Östradiol (E2)</b>	100	100
<b>Östron (E1)</b>	0,7 ± 0,7	< 0,1
<b>Östriol (E3)</b>	0,8 ± 0,7	0,3 ± 0,3
<b>Ethinylöstradiol (EE2)</b>	< 0,1	0,1 ± 0,1
<b>E2-3-Glucuronid</b>	9,2 ± 1,9	6,6 ± 4,5
<b>E2-3-SO<sub>4</sub></b>	26,9 ± 9,5	16,6 ± 4,0
<b>E2-17-SO<sub>4</sub></b>	< 0,1	< 0,1
<b>E2-17-Glucuronid</b>	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0
<b>EE2-3-Glucuronid</b>	0,1 ± 0,1	< 0,1
<b>EE2-3-SO<sub>4</sub></b>	< 0,1	< 0,1
<b>EE2-17-Glucuronid</b>	0,1 ± 0,1	< 0,1

Da diese Substanz jedoch nur in sehr geringen Mengen ausgeschieden und durch Sulfatasen während der Abwasserreinigung in seine Ausgangsprodukte aufgespalten wird (BARONTI et al. 2000), waren keine weiteren Maßnahmen zur Konjugatspaltung in den Kläranlagenablauf- und Gewässerproben als Aufbereitungsschritt notwendig.

### 5.2.2 Mehrfaktorielle Untersuchung zum Einfluss verschiedener Faktoren auf den ELISA: Experiment I

Die Daten dieser Untersuchung liegen in zweifacher Wiederholung ( $n = 2$ ) vor und konnten daher lediglich eingeschränkt statistisch ausgewertet werden. Da sie dennoch wichtige Trends aufzeigten, werden sie hier vorgestellt. Um die Daten übersichtlicher darzustellen, wurden die Ergebnisse nach der verwendeten Antikörperverdünnung sortiert und in verschiedenen untereinander folgenden Diagrammen angeordnet (Abbildung 5.11, Abbildung 5.12).

Auf Grund der Ergebnisse dieses Experimentes lassen sich folgende Aussagen über Parameter A machen:

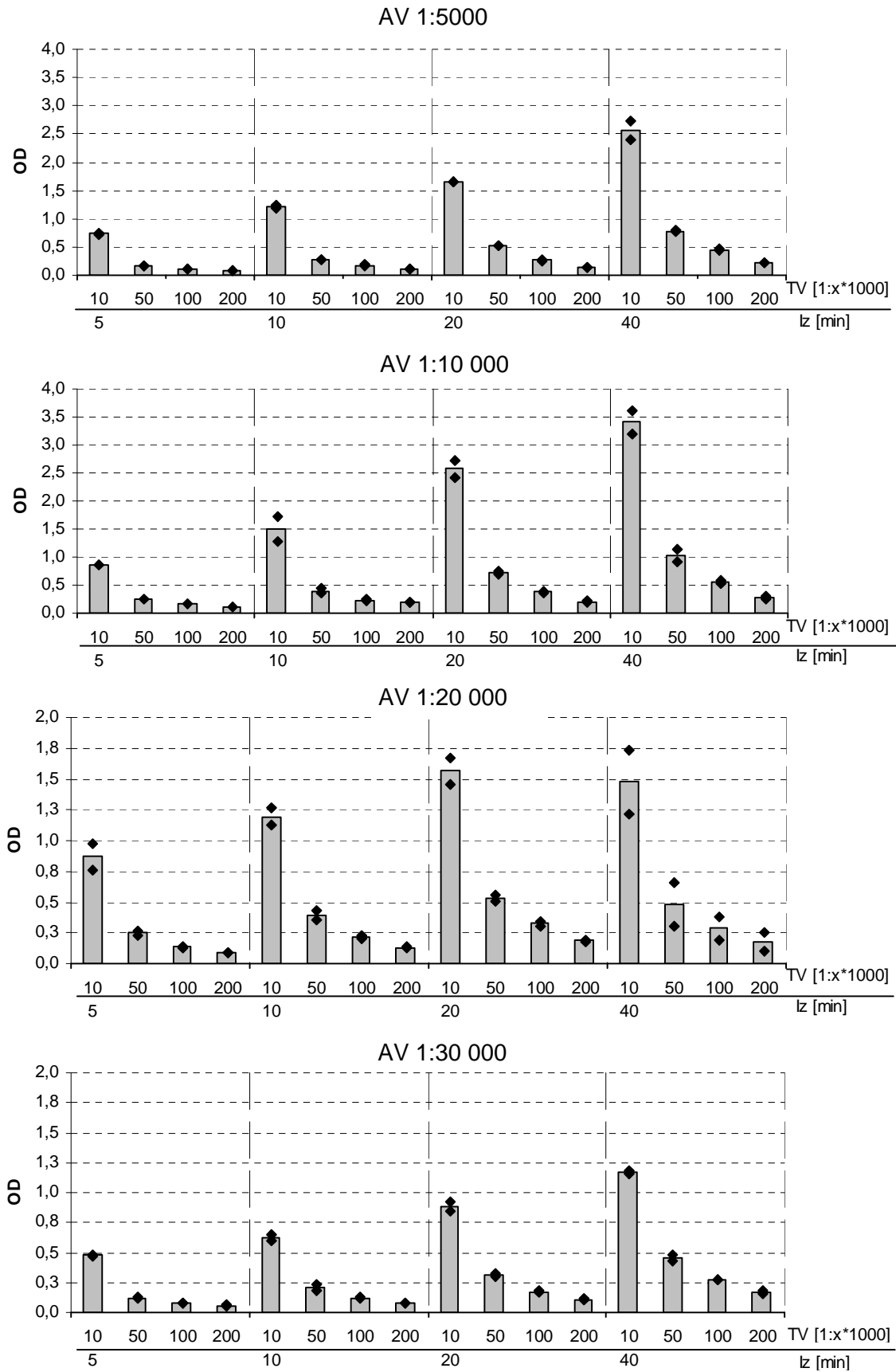
- A nahm mit zunehmender Tracer-Verdünnung, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen in Kapitel 5.1.3, ab.
- Der Unterschied zwischen den jeweiligen Tracer-Verdünnungen bezüglich A wurde tendenziell mit zunehmender Inkubationszeit größer (Hinweis auf eine Wechselwirkung).
- A stieg mit zunehmender Inkubationszeit an und zwar stärker bei geringeren Tracer-Verdünnungen, d.h. die Inkubationszeit war umso relevanter je niedriger die Tracer-Verdünnung war. Bei hoher Tracer-Verdünnung war die Inkubationszeit bezüglich A weniger entscheidend (Hinweis auf eine Wechselwirkung).
- Mit zunehmender Antikörperverdünnung wurde A kleiner<sup>37</sup>.

Aus den Ergebnissen zum Parameter C (Abbildung 5.12) lassen sich folgende Tendenzen zusammenfassen:

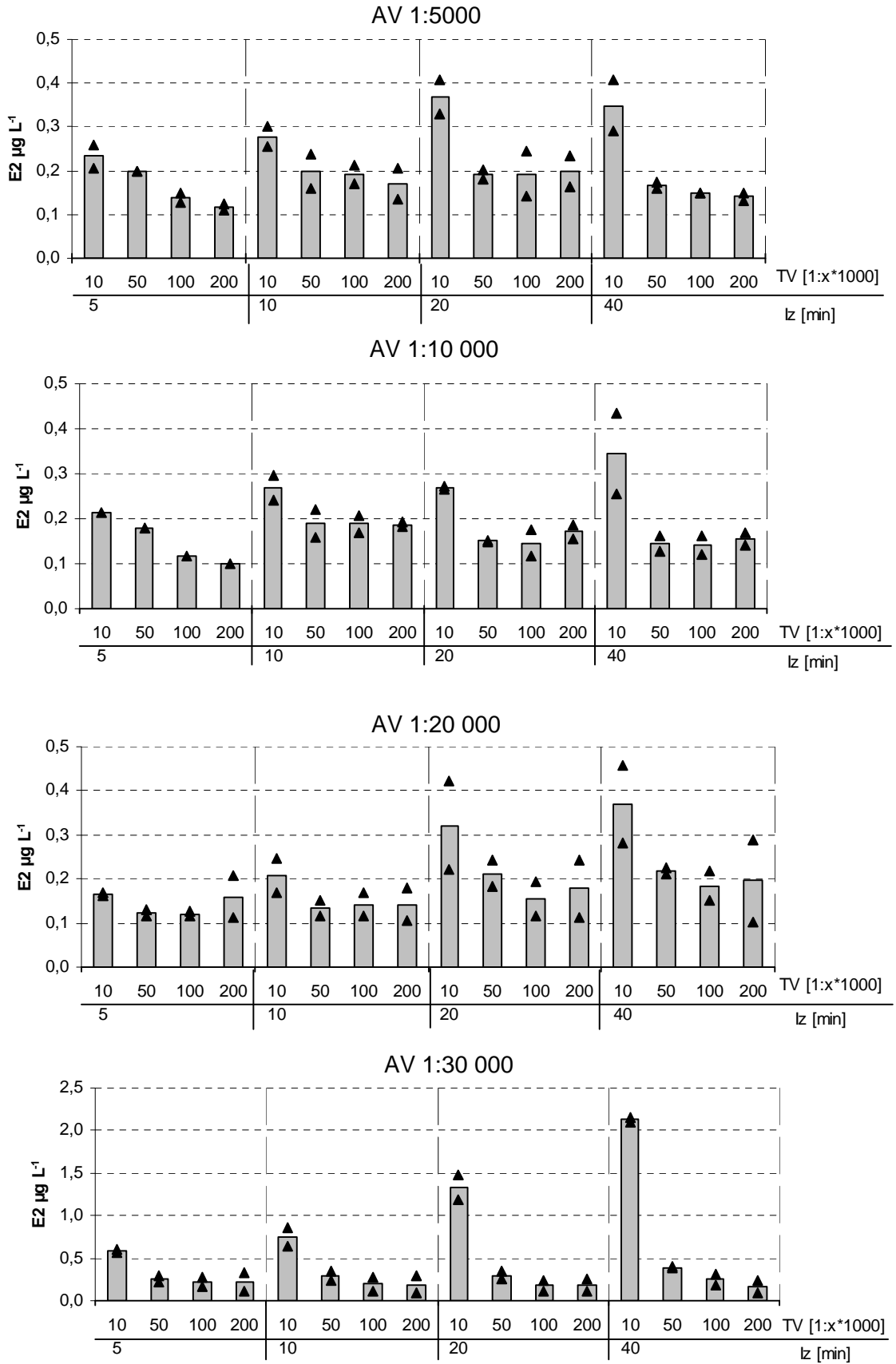
- C wurde tendenziell mit zunehmender Tracer-Verdünnung kleiner. Der deutlichste Unterschied zeigte sich zwischen der Tracer-Verdünnung 1:10 000 und 1:50 000.
- Nur bei der kürzesten Inkubationszeit (5 min) und den Antikörperverdünnungen von 1:5 000 und 1:10 000 wurde C kontinuierlich kleiner.
- Bei der niedrigsten Tracer-Verdünnung (1:10 000) wurde C insbesondere bei höheren Antikörperverdünnungen mit steigender Inkubationszeit größer, während sich die C-Werte bei den höheren Tracer-Verdünnungen nur wenig veränderten (Hinweis auf eine Wechselwirkung).
- Bei der Antikörperverdünnung von 1:30 000 waren die C-Werte im Vergleich zu den anderen Antikörperverdünnungen sehr hoch. Hier zeigte sich besonders deutlich, dass bei der kleinsten Verdünnung des Tracers die C-Werte am größten waren.

---

<sup>37</sup> Die geringeren A-Werte bei der Antikörperverdünnung von 1:5 000 im Vergleich zu der nächst höheren Antikörperverdünnung könnten durch die Verwendung eines anderen Antikörper-Aliquots verursacht worden sein.



**Abbildung 5.11:** A-Werte sortiert nach Antikörperverdünnung (AV), Tracer-Verdünnung (TV) und Inkubationszeit des Tracers (Iz). Die Mittelwerte sind als Balken dargestellt, die einzelnen Messergebnisse als Rauten.



**Abbildung 5.12:** C-Werte sortiert nach Antikörperverdünung (AV), Tracer-Verdünung (TV) und Inkubationszeit (lz). Die Mittelwerte sind als Balken dargestellt, die einzelnen Messergebnisse als Dreiecke.

### 5.2.2.1 Auswertung mit OptiVal® Experiment I

Die Daten mit dem Programm OptiVal® wurden, wie in Kapitel 4.6.2 beschrieben, analysiert, um mehr über die Wechselwirkungen der Einflüsse von Verdünnungen und Inkubationszeiten zu erfahren. Die Ergebnisse dieser Regressionsanalyse sind in Tabelle 5.10 und Tabelle 5.11 zusammengefasst. Die Faktoren und ihre Wechselwirkungen sind in den Tabellen absteigend nach ihrer Bedeutung, dargestellt durch den Regressionskoeffizienten ( $\beta$ ), für den untersuchten Parameter sortiert.

**Tabelle 5.10:** Ergebnisse der Auswertung der Regressionsanalyse des Experimentes I mit OptiVal® für den Parameter A.  $\beta$  ist der standardisierte Regressionskoeffizient und p die Signifikanz für die jeweiligen Faktoren ( $p < 0,05$  gilt als signifikant bedeutend).

Faktoren und deren Wechselwirkungen		$\beta$	p
Tracer-Verdünnung (TV)		-0,622	0,000
Tracer-Verdünnung <sup>2</sup> (TV <sup>2</sup> )		0,682	0,000
Inkubationszeit (Iz)		0,219	0,000
Tracer-Verdünnung * Inkubationszeit (TV*Iz)		-0,257	0,000
Antikörperverdünnung (AV)		-0,175	0,000
Tracer-Verdünnung * Antikörperverdünnung (TV*AV)		0,196	0,000
Inkubationszeit * Antikörperverdünnung (Iz*AV)		-0,143	0,002
Antikörperverdünnung <sup>2</sup> (AV <sup>2</sup> )		-0,160	0,015
<b>Regressionsgleichung</b>	Y= 0,202-0,622*TV+0,682*TV <sup>2</sup> +0,219*Iz-0,257*TV*Iz-0,175*AV+0,196*TV*AV-0,143*Iz*AV-0,160*AV		
<b>Faktorenkombination maximale OD</b>	<b>Maximum geschätzt [OD]</b>	<b>Faktorenkombination minimale OD</b>	<b>Minimum geschätzt [OD]</b>
AV:1:5 000*Iz:40 min* TV 1:10 000	2,33	AV:1:30 000*Iz:5 min* TV 1:100 000	-0,20
<b>residuale Standardabweichung</b>	<b>korrigiertes r<sup>2</sup> [%]</b>		<b>p (lack-of-fit Test)</b>
0,304	80,0		0,000

Dieses Modell zeigt anhand von  $\beta$ , dass für beide Parameter der Faktor Tracer-Verdünnung den größten Einfluss hat. Mit zunehmender Tracer-Verdünnung sinken sowohl der Parameter A als auch C, das heißt, dass die OD abnimmt und die 4-Parameter-Kurve sich nach links in den Bereich kleinerer E2-Konzentrationen verschiebt. Für A ist die Inkubationszeit die zweitwichtigste Einflussgröße, während für C die Antikörperverdünnung eine größere Rolle spielt. Das Modell bestätigt die oben gemachte Annahme, dass Signifikante Wechselwirkungen für beide Parameter zwischen allen drei untersuchten Faktoren vorliegen. (Im folgenden Kapitel (5.2.3.1) wird näher auf die Wechselwirkungen zwischen den Faktoren eingegangen.)



Fasst man die Modellaussagen zusammen, lässt sich sagen, dass mit:

- steigender Tracer-Verdünnung sowohl A als auch C sanken,
- längerer Inkubationszeit sowohl A als auch C stiegen und
- höherer Antikörperverdünnung A sank und C stieg.

**Tabelle 5.11:** Ergebnisse der Auswertung der Regressionsanalyse des Experimentes I mit OptiVal® für den Parameter C.  $\beta$  ist der standardisierte Regressionskoeffizient und p die Signifikanz für die jeweiligen Faktoren ( $p < 0,05$  gilt als signifikant bedeutend).

Faktoren und deren Wechselwirkungen		$\beta$	p
Tracer-Verdünnung (TV)		-0,190	0,000
Tracer-Verdünnung <sup>2</sup> (TV <sup>2</sup> )		0,217	0,000
Tracer-Verdünnung * AV-Verdünnung (TV*AV)		-0,160	0,000
IgG-Verdünnung (AV)		0,122	0,000
IgG-Verdünnung <sup>2</sup>		0,170	0,000
Inkubationszeit * IgG-Verdünnung (Iz*AV)		0,099	0,002
Tracer-Verdünnung * Inkubationszeit (TV*Iz)		-0,098	0,002
Inkubationszeit (Iz)		0,065	0,008
<b>Regressionsgleichung</b>	Y= 0,035-0,190*TV+0,217*TV <sup>2</sup> -0,160*TV*AV+0,122*AV+0,170*AV <sup>2</sup> +0,099*Iz*AV-0,098*TV*Iz+0,065*Iz		
<b>Faktorenkombination Maximum</b>	<b>Maximum geschätzt E2 [<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>]</b>	<b>Faktorenkombination Minimum</b>	<b>Minimum geschätzt E2 [<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>]</b>
AV 1:30 000*Iz:40 min* TV:1:10 000	1,16	AV 1:20 000* Iz:5 min*TV:1:100 000	-0,01
<b>residuale Standardabweichung</b>	<b>korrigiertes r<sup>2</sup> [%]</b>		<b>p (lack-of-fit Test)</b>
0,202	57,8		0,000

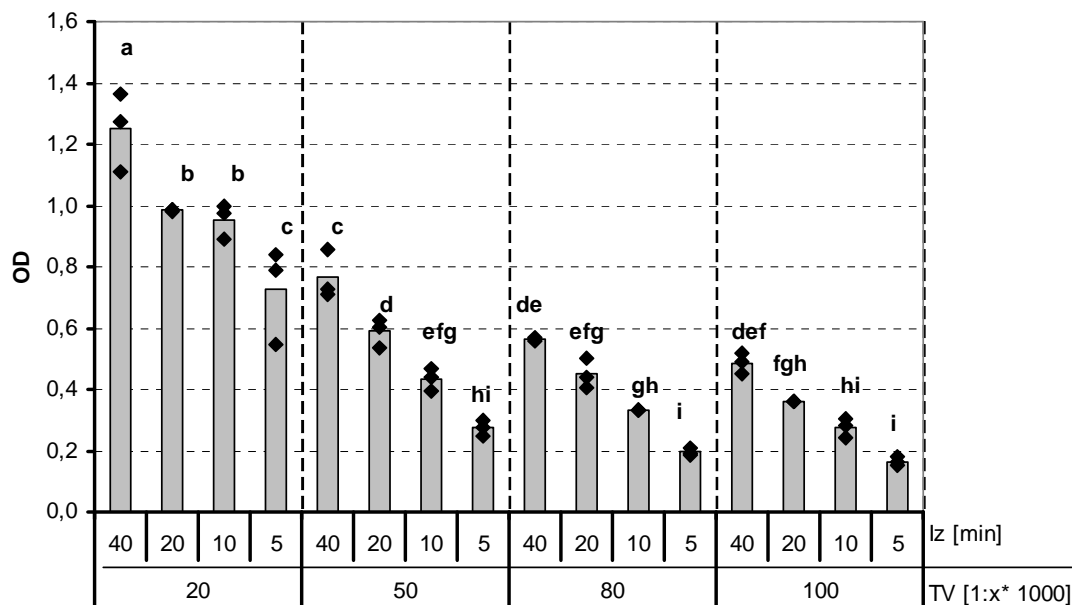
Die Datenbasis für dieses Model war mit  $n=2$  sehr gering und muss bei der Bewertung der Aussagen berücksichtigt werden. Bei beiden Parametern waren die residualen Standardabweichungen größer als 0,2 und somit als hoch einzustufen. Auch der lack-of-fit Test wurde nicht bestanden, d.h. die Modellanpassung ist nicht ausreichend. Die durch das Modell erklärte Varianz (korrigiertes  $r^2$ ) lag beim A-Wert bei 80 % und beim C-Wert bei 58 %. Daher waren Abweichungen der Messwerte von dem Modell zu erwarten. Besonders auffällig waren hier die geschätzten Minimum-Werte, die für beide Parameter negativ waren und den gemessenen damit nicht entsprachen. Die Modellaussage, dass der C-Wert mit höherer Antikörperverdünnung stieg, widersprach der Theorie (Kapitel 2.3.3) und den Ergebnissen in Kapitel 5.1.1 und ist möglicherweise auf die geringe Datengrundlage zurückzuführen.

### 5.2.3 Mehrfaktorielle Untersuchung zum Einfluss verschiedener Faktoren auf den ELISA: Experiment II

Die Ergebnisse der ersten Untersuchung zeigten, dass die größten Differenzen sowohl bei Parameter A als auch C im Bereich der Tracer-Verdünnung bis 1:100 000 auftraten. So wurden für das Experiment II Tracer-Verdünnungen von 1:20 000, 1: 50 000, 1:80 000 und 1:100 000 ausgewählt. Auf Basis der Ergebnisse des vorangegangenen Experimentes wurde im Experiment II nur mit einer Antikörperverdünnung von 1:10 000 gearbeitet.

Trotz der Erhöhung der Anzahl an Wiederholungen von  $n = 2$  im Experiment I auf  $n = 3$  blieb die Datenbasis gering, so dass die statistischen Analysen kritisch zu betrachten sind, sie wurden aber dennoch als hilfreich eingeschätzt. Wegen der geringen Anzahl an Wiederholungen konnte die mit dem K-S-Test untersuchte Hypothese, dass eine Normalverteilung vorliegt, nicht abgelehnt werden. Die von SPSS angegebene Levené-Statistik ergab keine Homogenität der Varianzen. Daher wurde der bei inhomogenen Varianzen empfohlene Tamhane Test (T2-Test) durchgeführt.

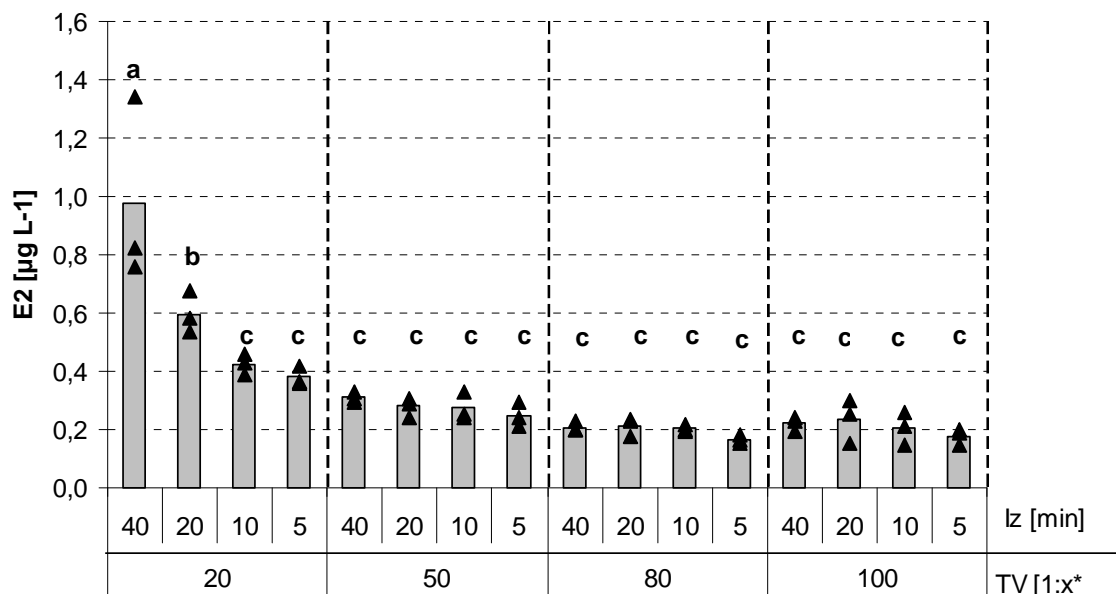
Die einfaktorielle ANOVA bestätigte für alle Parameter das Vorkommen von signifikanten Parametern (der F-Test ergab für alle Parameter eine Signifikanz  $< 0,05$ ), so dass ein Post-hoc-Test durchgeführt wurde. Signifikante Unterschiede zwischen den Varianten sind in Abbildung 5.13 und Abbildung 5.14 durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet.



**Abbildung 5.13:** Parameter A, signifikante Unterschiede bei  $p = 0,05$  werden durch den Buchstaben angezeigt. Die Daten sind nach absteigender Inkubationszeit (Iz) und zunehmender Tracer-Verdünnung (TV) sortiert. (Mittelwerte als Balken dargestellt, Messergebnisse als Rauten)

Die Ergebnisse dieses Experimentes bestätigten die des vorausgegangenen Versuches. Bezüglich Parameter A (siehe Abbildung 5.13) ließen sich folgende Aussagen treffen:

- Mit kürzeren Inkubationszeiten und steigender Tracer-Verdünnung verringerte sich die OD.
- Die signifikant höchsten A-Werte wurden bei einer Tracer-Verdünnung von 1:20 000 erreicht.
- Die kürzeste Inkubationszeit (5 min) wies bei jeder Tracer-Verdünnung die signifikant kleinsten A-Werte auf (mit Ausnahme der Tracer-Verdünnung 1:100 000, bei der zwischen den Inkubationszeiten 5 min und 10 min kein signifikanter Unterschied bestand).
- Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den gleichen Inkubationszeiten der Tracer-Verdünnungen 1:80 000 und 1:100 000.
- Mit zunehmender Tracer-Verdünnung wurden die signifikanten Unterschiede zwischen den Inkubationszeiten geringer (Hinweis auf eine Wechselwirkung).
- Verschiedene Faktorkombinationen von Tracer-Verdünnungen und Inkubationszeiten konnten zu Werten von Parameter A führen, die sich jedoch nicht signifikant voneinander unterschieden.



**Abbildung 5.14:** Parameter C, signifikante Unterschiede bei  $p = 0,05$  werden durch den Buchstaben angezeigt. Die Daten sind nach absteigender Inkubationszeit ( $I_z$ ) und zunehmender Tracer-Verdünnung (TV) sortiert. (Mittelwerte als Balken dargestellt, Messergebnisse als Dreiecke)

Betrachtet man das Ergebnis von Parameter C (Abbildung 5.14), so zeigte die statistische Auswertung signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationszeiten lediglich bei der Tracer-Verdünnung von 1:20 000, wobei sich auch dort die Ergebnisse der Inkubationsdauer von 5 und 10 min nicht signifikant unterschieden. Dieses Ergebnis weist

ebenfalls Wechselwirkung von Tracer-Verdünnung und Inkubationszeit hin, da mit zunehmender Tracer-Verdünnung die Inkubationszeit keinen signifikanten Einfluss mehr auf Parameter C hat (siehe unten).

### 5.2.3.1 Auswertung mit OptiVal® Experiment II

Um die Faktoren und ihre Effekte auf die Parameter A und C zu analysieren, wurde mit Hilfe des Programms OptiVal® eine weitergehende Untersuchung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.12 und Tabelle 5.13 dargestellt.

**Tabelle 5.12:** Ergebnisse der Auswertung des Experimentes II mit OptiVal® für den Parameter A.  $\beta$  ist der standardisierte Regressionskoeffizient und p die Signifikanz für die jeweiligen Faktoren ( $p < 0,05$  gilt als signifikant bedeutend).

Faktoren und deren Wechselwirkungen		$\beta$	p
Tracer-Verdünnung (TV)		-0,324	0,000
Inkubationszeit (Iz)		0,203	0,000
Tracer-Verdünnung <sup>2</sup> (TV <sup>2</sup> )		0,199	0,000
Inkubationszeit <sup>2</sup> (Iz <sup>2</sup> )		-0,083	0,002
Tracer-Verdünnung*Inkubationszeit (TV*Iz)		-0,045	0,012
<b>Regressionsgleichung</b> $Y=0,551-0,324*TV+0,203*Iz+0,199*TV^2-0,083*Iz^2-0,045*TV*Iz$			
Faktorenkombination Maximum	Maximum geschätzt [OD]	Faktorenkombination Minimum	Minimum geschätzt [OD]
TV 1:20 000 * Iz 40 min	1,24	TV 1:80 000 * Iz 5 min	0,18
residuale Standardabweichung	korrigiertes r <sup>2</sup> [%]		p (lack-of-fit Test)
0,070	94,9		0,041

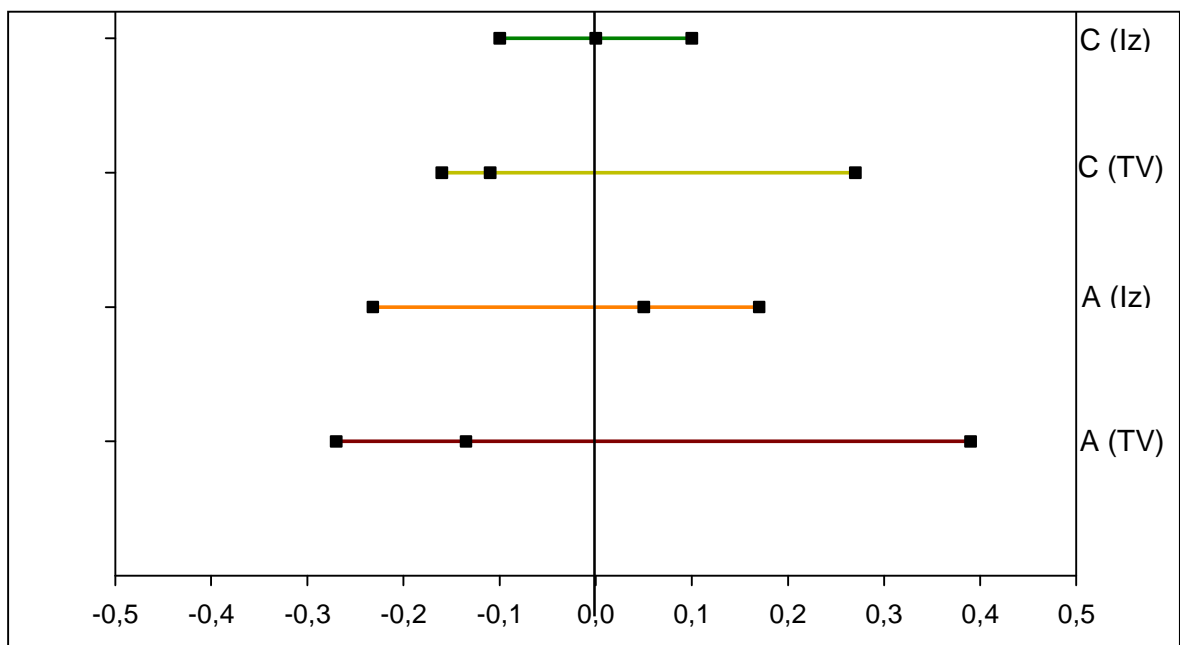
Die residualen Standardabweichungen beider Modelle waren kleiner als 0,1. Die durch das Modell erklärte Varianz, bezeichnet als korrigiertes r<sup>2</sup>, lag für A sogar bei 95 % und für C bei 82 %. Der lack-of-fit Test wurde nur von A nicht bestanden.

In Übereinstimmung mit dem Experiment I war der Effekt der Tracer-Verdünnung, dargestellt durch  $\beta$  in Tabelle 5.12 und Tabelle 5.13, bei Parameter A und C am stärksten. Mit steigender Tracer-Verdünnung sanken A und C. Die Inkubationszeit wirkte sich ebenfalls auf beide Parameter aus, wobei der Effekt auf A stärker war als auf C. Mit längerer Inkubationszeit erhöhten sich die Werte der beiden Parameter. Die Effekte der Tracer-Verdünnung und der Inkubationszeit sind für beide Parameter in Abbildung 5.15 dargestellt. Im Vergleich war die Auswirkung der Tracer-Verdünnung auf den A- und

C-Wert größer als die der Inkubationszeit. Die Effekte waren, abgesehen von dem der Inkubationszeit auf den C-Wert, nicht symmetrisch und somit nicht linear.

**Tabelle 5.13:** Ergebnisse der Auswertung des Experimentes II mit OptiVal® für den Parameter C-Wert.  $\beta$  ist der standardisierte Regressionskoeffizient und p die Signifikanz für die jeweiligen Faktoren ( $p < 0,05$  gilt als signifikant bedeutend).

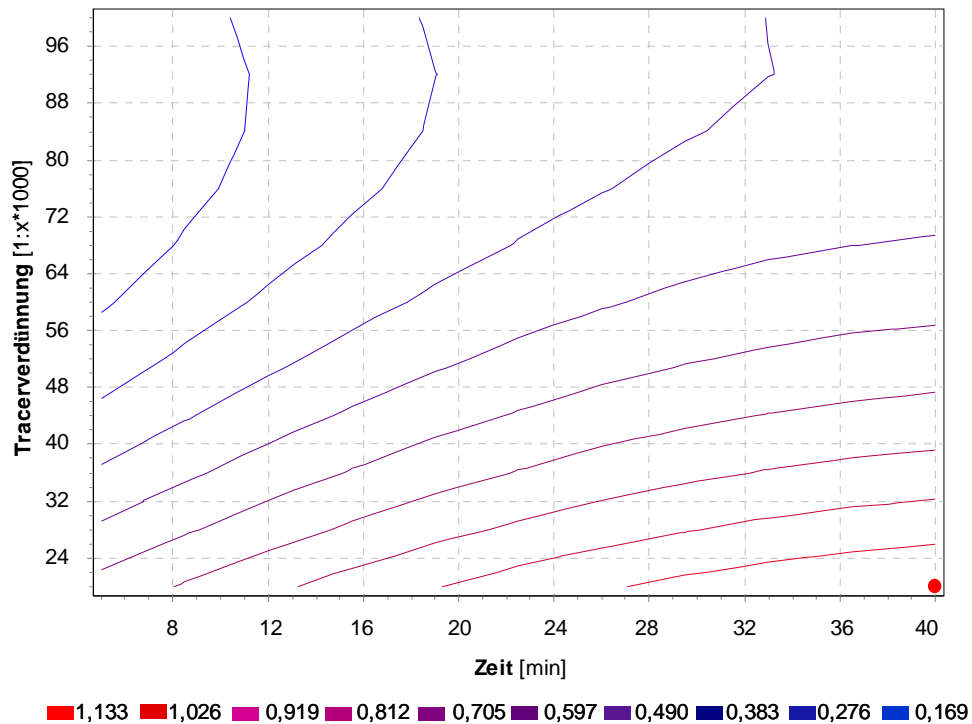
Faktoren und deren Wechselwirkungen		$\beta$	p
Tracer-Verdünnung (TV)		-0,216	0,000
Tracer-Verdünnung*Inkubationszeit (TV*Iz)		-0,135	0,000
Inkubationszeit (Iz)		0,100	0,000
Tracer-Verdünnung <sup>2</sup> (TV <sup>2</sup> )		0,170	0,002
<b>Regressionsgleichung</b> $Y=0,255-0,216*TV -0,135*TV*Iz +0,1*Iz +0,170*TV^2$			
Faktorenkombination Maximum	Maximum geschätzt E2 [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Faktorenkombination Minimum	Minimum geschätzt E2 [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]
Iz 40 * TV 1:20 000	0,88	Iz 5 * TV 1:80 000	0,16
residuale Standardabweichung	korrigiertes $r^2$ [%]	p (lack-of-fit Test)	
0,097	81,6	0,107	



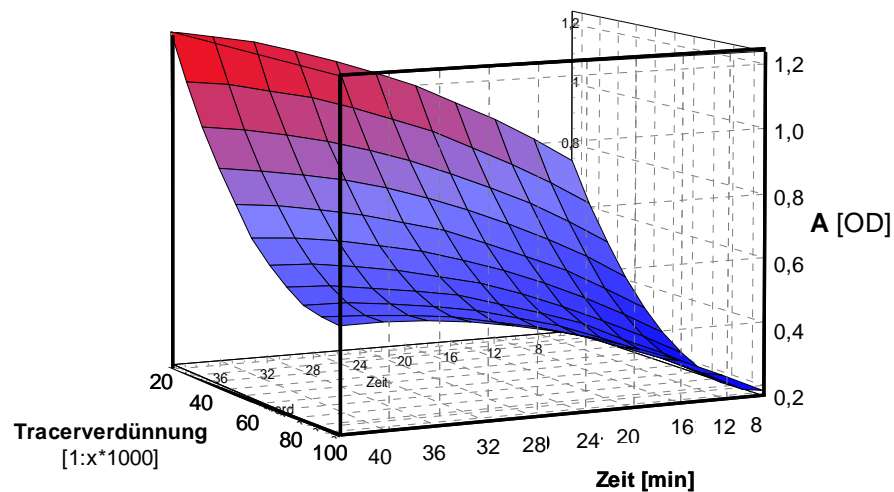
**Abbildung 5.15:** Abbildung der signifikanten Effekte aus dem Programm OptiVal®. Bei den Tracer-Verdünnungen (TV) sind jeweils die Effektstärke für die Werte 1:20 000, 1:60 000 und 1:100 000 mit Hilfe der Quadrate dargestellt. Die Quadrate stellen bei den Inkubationszeiten (Iz) die Werte 5, 22,5 und 40 min dar.

Aus den Modellen für beide Parameter, wie auch aus dem vorangegangenen Experiment I, lässt sich erkennen, dass Wechselwirkungen zwischen den Faktoren Tracer-Verdünnung und Inkubationszeit vorliegen (im Modell:  $TV \cdot Iz$ ). Dabei bedeutet Wechselwirkung, dass eine erklärbare Varianz übrig bleibt, welche nicht durch die Addition der Hauptfaktoren erklärt werden kann. Für beide Parameter ist die Wechselwirkung zwischen Tracer-Verdünnung und Inkubationszeit signifikant. Dies wird neben den Modelldaten in den oben aufgeführten Tabellen sowohl anhand der graphische Darstellungen der Iso-Linien (Abbildung 5.16 und Abbildung 5.18) als auch anhand der 3-D Abbildungen (Abbildung 5.17 und Abbildung 5.19) verdeutlicht. Für den Parameter A ist erkennbar, dass mit steigender Tracer-Verdünnung der Einfluss der Inkubationszeit geringer wird. Die Bedeutung dieser Wechselwirkung ist jedoch für Parameter A geringer als für Parameter C (Tabelle 5.12 und Tabelle 5.13), worauf bereits im vorherigen Kapitel die zweidimensionale Abbildung 5.13 und Abbildung 5.14 hindeuteten. Anhand der dargestellten Iso-Linien von Parameter A (Abbildung 5.17) und C (Abbildung 5.19) ist die Empfindlichkeit bezüglich der Faktoren Tracer-Verdünnung und Inkubationszeit gut erkennbar. Beide Parameter zeigten mit höherer Tracer-Verdünnung eine steigende Unempfindlichkeit gegenüber der Inkubationszeit. Dies ist für C bedeutsamer als für A, da C minimiert werden sollte und somit das Optimum im Bereich der größeren Unempfindlichkeit liegt. Diese Tatsache ermöglicht dem Benutzer des Assays einen größeren Handlungsspielraum bezüglich der Faktorkombination. Eine Anpassung ist leichter möglich. Der Parameter A hingegen wird beim Optimieren maximiert und liegt im Bereich der größten Empfindlichkeit bezüglich der Optimierungsfaktoren. Da für die Optimierung des Assays beide Parameter entscheidend sind, wurde für A ein Richtwert für eine Untergrenze von 0,4 OD festgelegt. Überträgt man diesen Bereich auf C, so erhält man die Faktorkombinationen bei denen A nicht wesentlich kleiner als 0,4 OD ist. In diesem Bereich kann C minimiert werden. Weitere Bedingungen wie z.B. vorgegebene Inkubationszeiten können ebenfalls berücksichtigt werden.

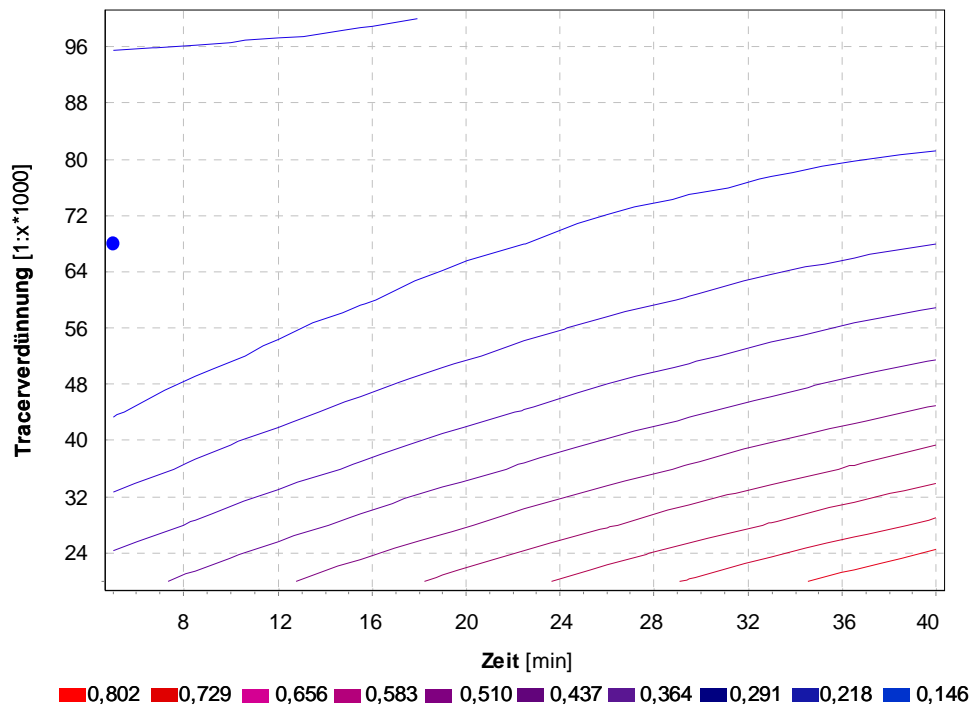
Die Daten dieses mehrfaktoriellen Versuches zeigen, dass bei Annäherung an das Affinitätslimit des Tracers, die Inkubationszeit keine bedeutende Rolle mehr spielt. Folglich bedeutet das: wird der Assay im Bereich des Affinitätslimits durchgeführt ist die Sensitivität (bezogen auf Parameter C) auch durch längere Inkubationszeiten, wie sie z.B. bei der automatisierten Messung unvermeidbar sind, nicht beeinträchtigt.



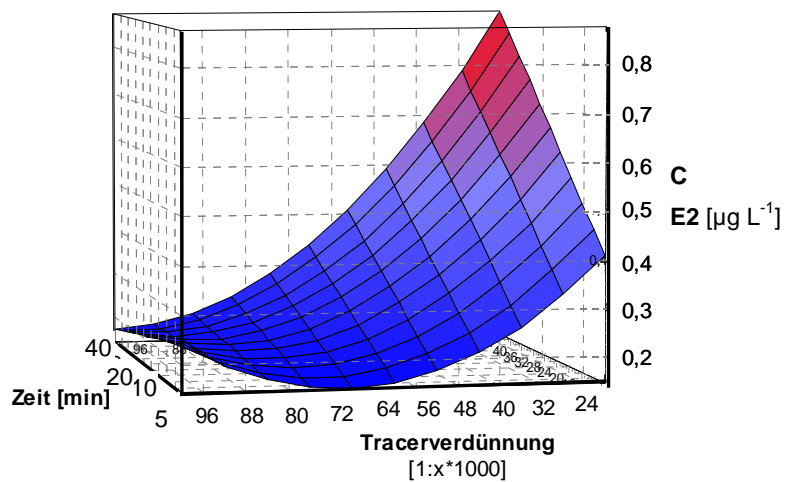
**Abbildung 5.16** Linien gleichen A-Wertes (Iso-Linien für Parameter A) der jeweiligen Faktorkombinationen im OptiVal® Modell. Der dazugehörige A-Wert steht rechts neben der jeweiligen Farbe, der maximale A-Wert ist als roter Punkt angegeben.



**Abbildung 5.17:** Dreidimensionale Darstellung des Parameters A im OptiVal® Modell. Dargestellt sind die Zusammenhänge der Faktoren Zeit (Inkubationszeit) und Tracer-Verdünnung auf A. In Rot sind die maximalen OD Werte dargestellt, die mit abnehmender Höhe in Blau übergehen.



**Abbildung 5.18:** Linien gleichen C-Wertes (Iso-Linien für Parameter C) der jeweiligen Faktorkombinationen im OptiVal® Modell. Der dazugehörige C-Wert steht rechts neben der jeweiligen Farbe. Der minimale C-Wert ist als blauer Punkt angegeben.



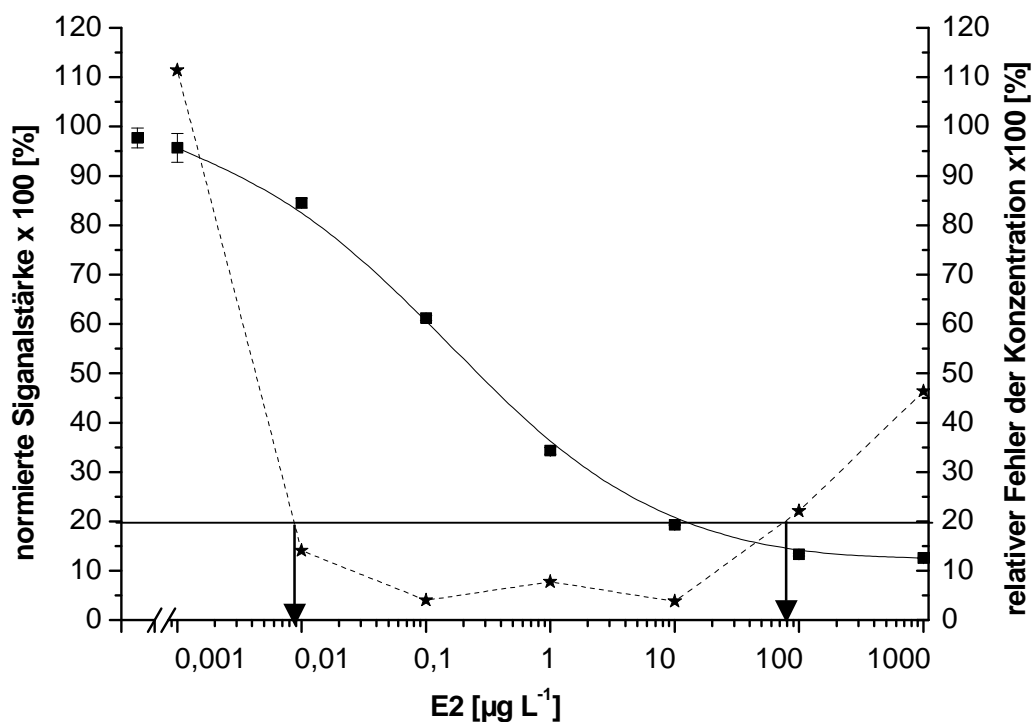
**Abbildung 5.19:** Dreidimensionale Darstellung des Parameters C im OptiVal® Modell. Dargestellt sind die Zusammenhänge der Faktoren Zeit (Inkubationszeit) und Tracer-Verdünnung auf C. In Rot sind die maximalen E2-Konzentrationen dargestellt, die mit abnehmender Höhe in Blau übergehen.



Fasst man die Auswertung mit OptiVal® zusammen, lässt sich sagen, dass die Modelle für den A- und den C-Wert Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit den Messdaten lieferten. Verdeutlicht wurde das durch die hohen erklärten Varianzen und die Übereinstimmung der geschätzten Maximal- und Minimal-Werte mit den tatsächlich gemessenen Werten. Das Programm OptiVal® bietet daher eine sehr gute Hilfe die Effekte und die Stärke der auf die Parameter wirkenden Faktoren herauszufinden und graphisch darzustellen.

#### 5.2.4 Kenndaten

Die Berechnung der analytischen Kenndaten des Assays basiert auf den Daten einer repräsentativen Kalibrationskurve des manuell durchgeführten E2-ELISA. Der analytische Bereich der Kalibrationskurve wurde mit Hilfe des Präzisionsprofils bei einem maximal zugelassenen relativen Fehler der Konzentration von 20 %, wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben, bestimmt (Abbildung 5.20).



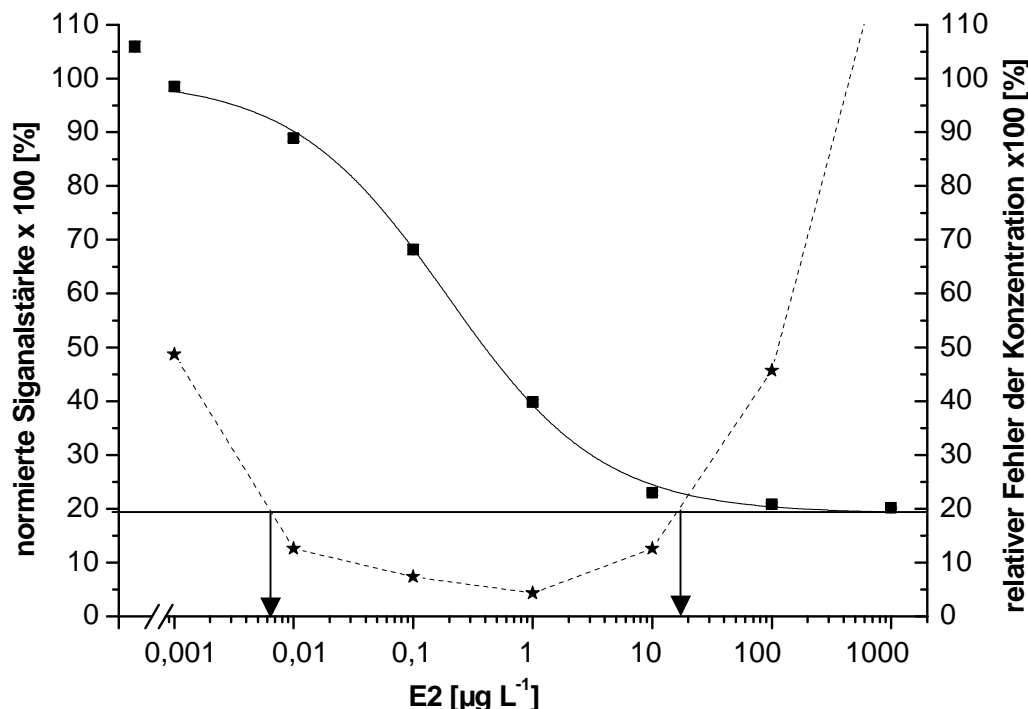
**Abbildung 5.20:** Repräsentative Kalibrationskurve des E2-ELISA (durchgezogene Linie, Quadrate) mit dazugehörigem Präzisionsprofil (gepunktete Linie). Die Standards sind in Reinstwasser angesetzt. Der Messbereich bei dem Variationskoeffizienten von 20 % ist mit Pfeilen markiert.

Die Kenndaten zu dieser Kalibrationskurve sind in Tabelle 5.14 zusammengestellt. Die vier Parameter der Kalibrationskurve betragen A (100 % normierte Signalstärke), B (0,58), C (0,15  $\mu\text{g L}^{-1}$  E2) und D (12 % normierte Signalstärke). Die Nachweisgrenze<sup>38</sup> lag bei 11  $\text{ng L}^{-1}$  E2 während die Bestimmungsgrenze 43  $\text{ng L}^{-1}$  E2 ergab. Der Messbereich, definiert durch den Variationskoeffizienten von 20 %, war auf Grund der geringen Standardabweichungen im Bereich hoher E2-Konzentrationen sehr weit und lag zwischen 9  $\text{ng L}^{-1}$  und 80  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Deshalb sind Messungen von E2-Konzentrationen unterhalb von 9  $\text{ng L}^{-1}$  als kritisch zu betrachten, da der zugelassene relative Fehler von 20 % dann überschritten wird.

**Tabelle 5.14:** Analytische Kenndaten des E2-ELISA, basierend auf Standards in Reinstwasser. Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden nach DIN 32654 bestimmt, der Messbereich wurde aus dem Präzisionsprofil abgelesen.

<b>Nachweisgrenze</b>	11 $\text{ng L}^{-1}$
<b>Bestimmungsgrenze</b>	43 $\text{ng L}^{-1}$
<b>Messbereich</b>	9 - 80*10 <sup>+3</sup> $\text{ng L}^{-1}$

Für den E2-ELISA bei einem Gehalt von 5 % Methanol in den Standards ist das Präzisionsprofil in Abbildung 5.21 dargestellt.



**Abbildung 5.21:** Repräsentative Kalibrationskurve des E2-ELISA (durchgezogene Linie, Quadrate) mit dazugehörigem Präzisionsprofil (gepunktete Linie). Die Standards sind in Reinstwasser mit 5% Methanol angesetzt. Der Messbereich bei dem Variationskoeffizienten von 20 % ist mit Pfeilen markiert.

<sup>38</sup> Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden nach 32654 ermittelt.

Die Kenndaten für die Messungen der Standards bei einem Gehalt von 5 % Methanol in der Probe, wie es bei der Feldstudie in dieser Arbeit der Fall war, werden in Tabelle 5.15 gezeigt. Die vier Parameter der Kalibrationskurve betragen A (100 % normierte Signalstärke), B (0,67), C (0,19  $\mu\text{g L}^{-1}$  E2) und D (19 % normierte Signalstärke).

**Tabelle 5.15:** Analytische Kenndaten des E2-ELISA, basierend auf Standards mit 5 % Methanol. Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden nach DIN 32654 bestimmt, der Messbereich wurde aus dem Präzisionsprofil abgelesen.

<b>Nachweisgrenze</b>	8 ng L <sup>-1</sup>
<b>Bestimmungsgrenze</b>	28 ng L <sup>-1</sup>
<b>Messbereich</b>	7 - 11*10 <sup>+3</sup> ng L <sup>-1</sup>

Der Messbereich lag zwischen 7 ng L<sup>-1</sup> und 11  $\mu\text{g L}^{-1}$  und war damit kleiner als der Messbereich der oben gezeigten Kalibrationskurve ohne Methanol. Wenn man eine Anreicherung der zu untersuchenden Proben in Betracht zieht, sind auch Messungen von Konzentrationen deutlich unter 1 ng L<sup>-1</sup> möglich.

### 5.3 Einfluss von Matrixeffekten

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente zum Einfluss von Matrix auf den ELISA gezeigt. Im ersten Experiment sollte geklärt werden, ob das Verdünnen der Proben zur Eliminierung von Matrixeffekten ausreichend ist. In einem zweiten Experiment wurde die Auswirkung verschiedener Huminsäurekonzentrationen auf den ELISA untersucht.

#### 5.3.1 Verdünnung und Dotierung von Proben zur Reduzierung von Matrixeffekten

Die Stärke des Matrixeinflusses auf die Wiederfindungsrate wurde mit jeweils einer Probe aus einem Kläranlagenzulauf und einem Kläranlagenablauf anhand von Verdünnungen und Dotierung untersucht. Dazu wurde die prozentuale Wiederfindung bezogen auf die jeweilige Dotierung bei allen Verdünnungsstufen berechnet. Die Ergebnisse für beide Proben sind in den Tabelle 5.16 und Tabelle 5.17 aufgelistet. Der untersuchte Konzentrationsbereich war zuvor so ausgewählt worden, dass die Dotierungsstufen im E2-Konzentrationsbereich nahe dem Testmittelpunktes (Parameter C) lagen.

**Tabelle 5.16:** Relative Wiederfindungsraten bezogen auf die jeweiligen Dotierungsstufen in der Originalprobe des Ablaufs und Verdünnungsstufen 1:2, 1:4 und 1:10, sowie die gesamte Wiederfindungsrate aus der linearen Regression (n.v.= nicht vorhanden). Wiederfindungsraten unterhalb von 70 % und oberhalb von 120 % sind kursiv dargestellt.

<b>Dotierungsstufe</b> [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	<b>Ablauf</b> [%]	<b>Ablauf 1:2</b> [%]	<b>Ablauf 1:4</b> [%]	<b>Ablauf 1:10</b> [%]
<b>0,1</b>	96	<i>149</i>	<i>122</i>	97
<b>0,5</b>	<i>57</i>	95	107	94
<b>1</b>	78	117	97	92
<b>1,5</b>	88	116	107	94
<b>2</b>	84	105	107	97
<b>2,5</b>	96	n.v.	90	95
<b>Wiederfindungsrate gesamt</b>	<b>96</b>	<b>114</b>	<b>106</b>	<b>94</b>

Über den gesamten Konzentrationsbereich der Dotierungen zeigte die Probe aus dem Kläranlagenablauf bereits unverdünnt ein gutes Ergebnis. Bei Betrachtung der einzelnen Dotierungsstufen war in der unverdünnten Probe eine leichte Unterbestimmung erkennbar, während bei den Verdünnungsstufen 1:2 und 1:4 eine leichte Überbestimmung vorlag. Die Verdünnungsstufe 1:10 zeigte über den gesamten Dotierungsbereich eine gute Wiederfindungsrate.

**Tabelle 5.17:** Relative Wiederfindungsraten bezogen auf die jeweiligen Dotierungsstufen in der Originalprobe des Zulaufs und Verdünnungsstufen 1:2, 1:4 und 1:10, sowie die gesamte Wiederfindungsrate aus der linearen Regression (n.v.= nicht vorhanden). Wiederfindungsraten unterhalb von 70 % und oberhalb von 120 % sind kursiv gedruckt.

<b>Dotierungsstufe</b> [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	<b>Zulauf</b> [%]	<b>Zulauf 1:2</b> [%]	<b>Zulauf 1:4</b> [%]	<b>Zulauf 1:10</b> [%]
<b>0,1</b>	<i>277</i>	<i>415</i>	<i>147</i>	91
<b>0,5</b>	<i>47</i>	<i>176</i>	<i>75</i>	80
<b>1</b>	113	<i>159</i>	101	91
<b>1,5</b>	<i>187</i>	<i>132</i>	101	90
<b>2</b>	<i>172</i>	118	98	97
<b>2,5</b>	<i>164</i>	109	92	73
<b>Wiederfindungsrate gesamt</b>	<b>192</b>	<b>95</b>	<b>99</b>	<b>93</b>

Die Ergebnisse der untersuchten Zulaufprobe zeigten, dass durch Verdünnen über den gesamten Bereich der Dotierungsstufen zufriedenstellende Wiederfindungsraten erreicht werden konnten. Bei der untersuchten unverdünnten Probe lag jedoch, abgesehen von der

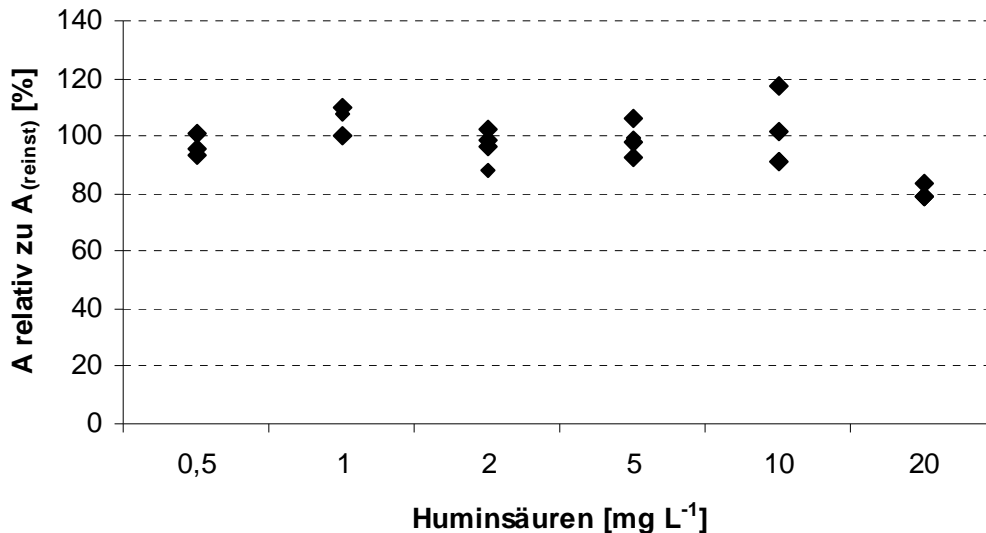
Dotierungsstufe mit  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  E2, eine sehr starke Überbestimmung vor. Die größte prozentuale Überbestimmung liegt bei der jeweils kleinsten Dotierungsstufe vor. Abgesehen von der kleinsten Dotierungsstufe, zeigte bereits eine Verdünnung von 1:4 über den gesamten Bereich eine gute Wiederfindungsrate. Da die Konzentrationen in Proben häufig im unteren Konzentrationsbereich liegen, ist eine 1:10-fache Verdünnung auf Grund der besseren Wiederfindungsraten (Tabelle 5.17) von Zulaufproben notwendig. Abweichungen der durch lineare Regression ermittelten gesamten Wiederfindungsrate von der durchschnittlichen Wiederfindungsrate der einzelnen Dotierungsstufen ist durch die Gewichtung der Regression zu erklären.

### 5.3.2 Huminsäuren

Die Huminsäurekonzentrationen in den Standards wirkten sich auf die Kalibrationskurven und damit auf die Parameter A und C aus. In Abbildung 5.22 und Abbildung 5.23 sind die A- und C-Werte aller 4-Parameter-Kurven jeweils bezogen auf den A- bzw. C-Wert der Kalibrationskurve in Reinstwasser einer jeden MTP dargestellt. Diese Darstellung in % wurde gewählt um zu verhindern, dass Platteneffekte die Effekte der unterschiedlichen Huminsäurekonzentrationen überdecken.

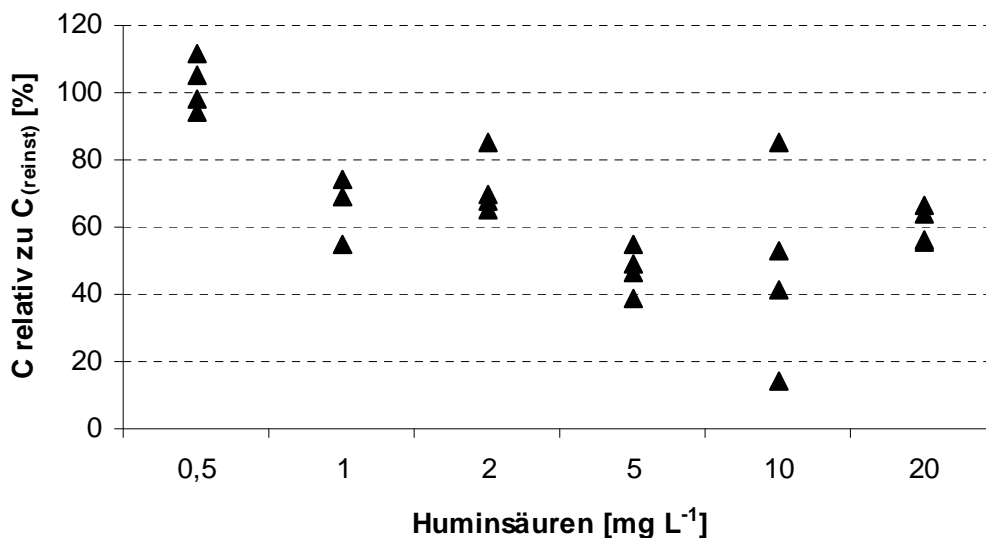
Die Ergebnisse der Varianzanalyse sind nicht graphisch dargestellt.

Aus Abbildung 5.22 lässt sich lediglich ein Trend zu geringeren A-Werten bei steigender Huminsäurekonzentration erkennen, der besonders deutlich anhand der höchsten Huminsäurekonzentration zu erkennen ist. Die statistische Auswertung der Mittelwerte und Standardabweichungen aller Messungen ergab für den Parameter A, dass sich die drei Varianten  $1,0$ ,  $5,0$  und  $10 \text{ mg L}^{-1}$  signifikant von der Variante  $20 \text{ mg L}^{-1}$  Huminsäure unterscheiden, während die Varianten  $0$ ,  $0,5$  und  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  keinerlei signifikanten Unterschiede aufwiesen.



**Abbildung 5.22:** Einfluss der untersuchten Huminsäurekonzentrationen auf den A-Wert. Dargestellt sind die einzelnen A-Werte jeweils relativ zu dem A-Wert der Kalibrationskurve in Reinstwasser ( $A_{(reinst)}$ ) einer jeden MTP.

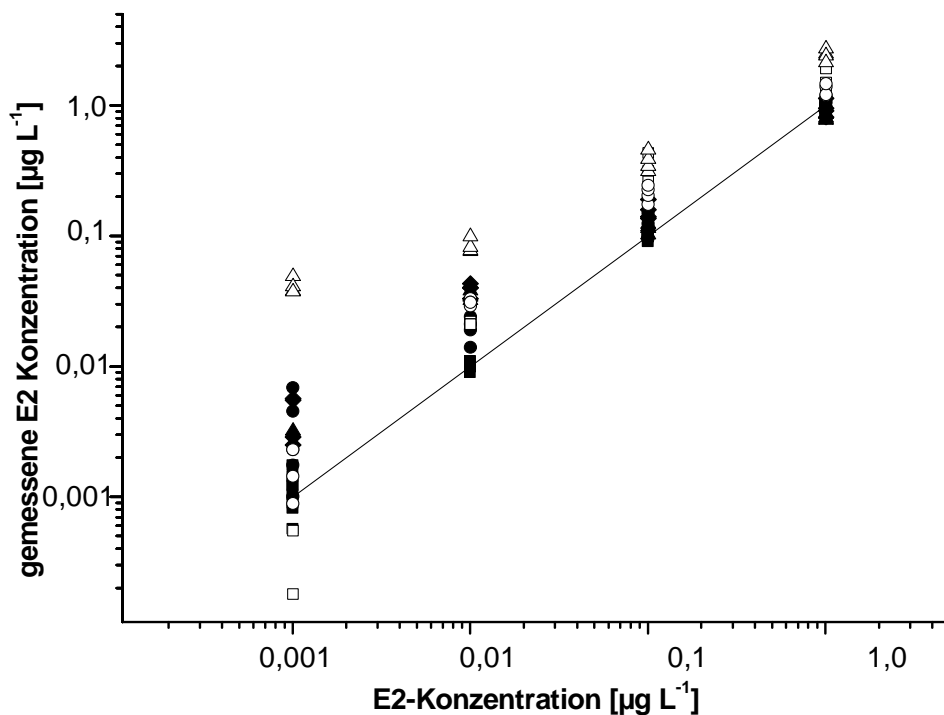
Betrachtet man die C-Werte in Abbildung 5.23 ist ebenfalls ein Trend zu kleineren C-Werten mit steigender Huminsäurekonzentration erkennbar. Die statistische Auswertung der Daten ergab, dass die Varianten 0 und 0,5 mg L<sup>-1</sup> Huminsäure signifikant höher waren als die Varianten mit höheren Huminsäurekonzentrationen, die sich untereinander nicht signifikant unterschieden.



**Abbildung 5.23:** Einfluss der untersuchten Huminsäurekonzentrationen auf den C-Wert. Dargestellt sind die einzelnen C-Werte jeweils relativ zu dem C-Wert der Kalibrationskurve in Reinstwasser ( $C_{(reinst)}$ ) einer jeden MTP.

Die Korrelationsanalyse der A- und C-Werte ergab in beiden Fällen eine negative mittlere Korrelation mit den Huminsäuregehalten, signifikant auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig), das heißt, dass mit steigenden Huminsäuregehalten sowohl der A-Wert als auch der C-Wert sanken und somit der Signalbereich kleiner und der Test empfindlicher zu werden

schien. Um zu überprüfen, wie sich der Test tatsächlich insbesondere im Bereich kleiner  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  E2 verhielt, wurden in Abbildung 5.24 die Messwerte, der in den verschiedenen Huminsäurelösungen dotierten Standards, gegen den Sollwert aufgetragen. In dieser Abbildung ist erkennbar, dass die Messwerte der höchsten Huminsäurekonzentration am meisten vom Sollwert abweichen. Besonders stark zeigte sich dieser Effekt bei den kleinsten E2-Konzentrationen. Die Daten dieser Untersuchung zeigen, dass erhöhte Huminsäuregehalte in der Regel zu Überbestimmung führten. Bei einer E2-Konzentration von  $0,001 \mu\text{g L}^{-1}$  traten auch Unterbestimmungen auf. Die starken Streuungen in den Bereichen niedriger E2-Konzentrationen und Konzentrationen  $> 10 \mu\text{g L}^{-1}$  E2 sind durch den dortigen flachen Verlauf der sigmoidalen Kalibrationskurve zu erklären. Präzision und Genauigkeit der Messwerte wurden durch Huminsäure verringert, wohingegen beide mit steigender E2-Konzentration im Bereich um den Testmittelpunkt der Kalibrationskurve zunahm (Abbildung 5.24).

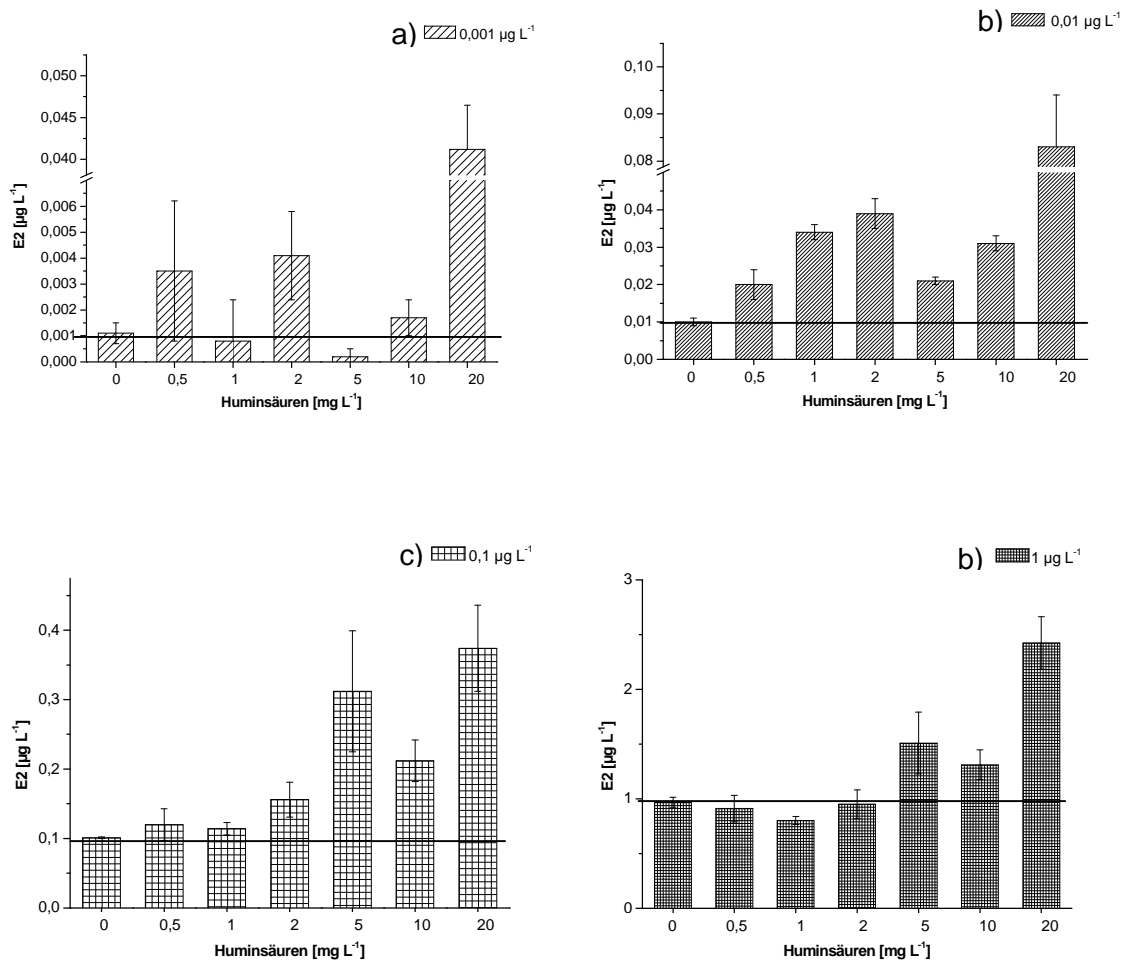


**Abbildung 5.24:** Darstellung der gemessenen E2-Konzentrationen im Vergleich zur Dotierung. Reinstwasser (gefüllte Quadrate),  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  Huminsäure (gefüllte Kreise),  $1 \text{ mg L}^{-1}$  Huminsäure (gefüllte Dreiecke),  $2 \text{ mg L}^{-1}$  Huminsäure (gefüllte Rauten),  $5 \text{ mg L}^{-1}$  Huminsäure (ungefüllte Quadrate),  $10 \text{ mg L}^{-1}$  Huminsäure (ungefüllte Kreise) und  $20 \text{ mg L}^{-1}$  (ungefüllte Dreiecke). Die durchgezogene Linie stellt die 1:1 Linie dar.

Die Bedeutung der Huminsäuregehalte für die einzelnen E2-Konzentrationen wurde in den Abbildung 5.25 a-d veranschaulicht. Dort werden Mittelwerte und Standardabweichungen der E2-Konzentrationen an verschiedenen Huminsäuregehalten in Säulendiagrammen getrennt nach den jeweiligen E2-Konzentrationen dargestellt und verdeutlichen die oben genannten Ergebnisse.

Die Korrelations- und Regressionsanalyse, dargestellt in Tabelle 5.18, ergaben für die E2-Konzentrationen bis zu  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  eine sehr starke positive Korrelation auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig), während die beiden höheren Konzentrationen nur eine sehr schwache bzw. keine Korrelation mit den Huminsäuregehalten zeigten.

Das korrigierte Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ) der Regressionsanalyse gab in diesem Fall den Anteil der Varianz des E2-Messwertes an, der durch die Huminsäuregehalte erklärt wurde. Die Zusammenhänge wiesen bei E2-Konzentrationen bis zu  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  ein  $r^2$  von  $> 0,6$  auf und können somit als bedeutend eingestuft werden. Der Standardfehler des Schätzers, der ein Maß für die Güte der Regression ist, stieg mit zunehmender E2-Konzentration an, d.h. die Abweichung von Regressionsmodell und Messdaten wurde größer.



**Abbildung 5.25 a-d:** Messwerte der jeweiligen E2-Konzentrationen bei verschiedenen Huminsäuregehalten im Vergleich. Mittelwerte sind als Balken dargestellt, Standardabweichungen als Fehlerbalken. Die gestrichelte Konzentration ist als Linie eingezeichnet.



**Tabelle 5.18:** Ergebnisse der Korrelations- und Regressionsanalyse zum Einfluss der Huminsäuregehalte auf die Bestimmung der E2-Konzentrationen.  $r^2$  ist das korrigierte Bestimmtheitsmaß der Regressionsanalyse und  $\beta$  der standardisierte Regressionskoeffizient (\* bedeutet auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant).

E2-Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Korrelation	$r^2$	Standardfehler des Schätzers	$\beta$
0,001	sehr stark*	0,720	0,007	0,854
0,01	sehr stark*	0,722	0,012	0,855
0,1	sehr stark*	0,656	0,062	0,817
1	sehr stark*	0,830	0,218	0,914
10	sehr stark*	0,777	2,747	0,885
100	sehr schwach	-0,018	80,03	0,121
1000	keine	-0,020	263, 7	-0,115

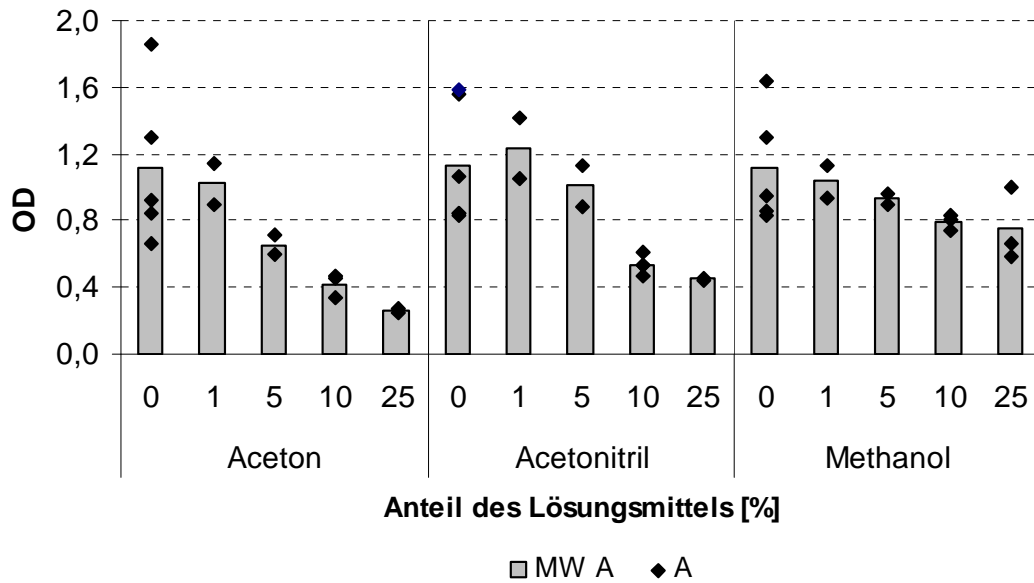
Der standardisierte Regressionskoeffizient ( $\beta$ ) bestätigte die große Wichtigkeit der Huminsäuregehalte für die Erklärung der E2-Messwerte bis zu einer E2-Konzentration größer  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . Insgesamt ließen sich die Messwerte bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  sehr gut mit Hilfe des Regressionsmodells erklären, für höhere E2-Gehalte waren das Modell und der Assay aufgrund des sigmoidalen Kurvenverlaufs unpassend.

## 5.4 Einfluss organischer Lösungsmittel

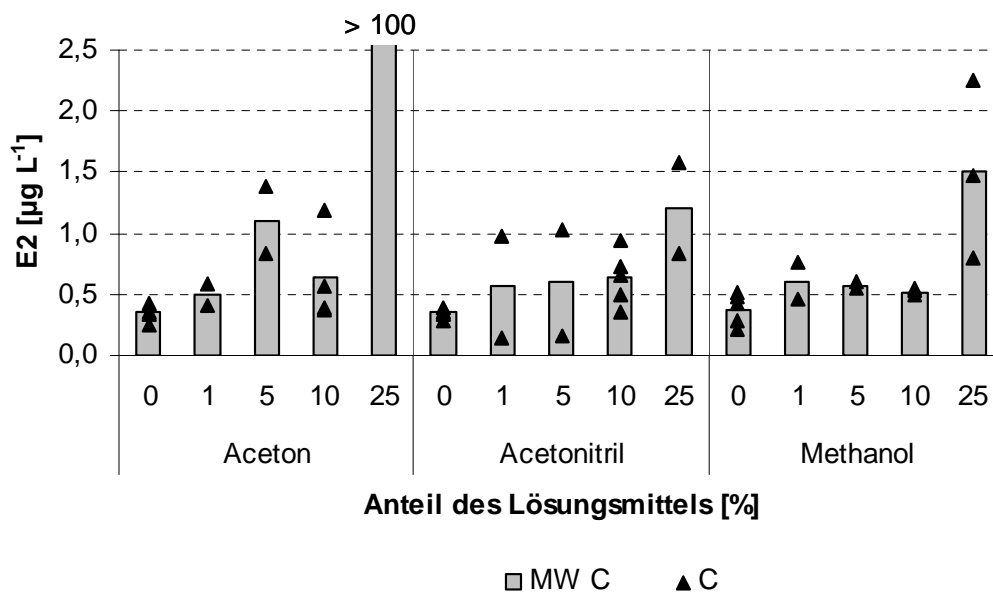
Der Einfluss der Lösungsmittel Aceton, Acetonitril und Methanol auf Parameter A und C der 4-Parameter-Kurve ist in Abbildung 5.26 und Abbildung 5.27 dargestellt.

Alle drei Lösungsmittel zeigten mit steigendem Anteil einen negativen Effekt auf A. Der Testmittelpunkt stieg mit zunehmendem Lösungsmittelgehalt und zeigte einen tendenziellen Anstieg bereits bei 1 % Lösungsmittelanteil. In Bereichen zwischen 1 und 10 % Lösungsmittel waren kaum deutliche Unterschiede erkennbar. Ein stärkerer Anstieg des Testmittelpunktes erfolgte bei einem Lösungsmittelanteil von 25 %.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es mit zunehmendem Anteil an organischen Lösungsmitteln zu einem Verlust an Empfindlichkeit bei gleichzeitiger Einschränkung des Signalbereichs kam. Ein Grund für den Verlust der Empfindlichkeit könnte eine negative Beeinträchtigung des Tracers bzw. der POD sein. Eine weitere Ursache könnte eine Beeinträchtigung der Bindung von Tracer und Analyten an den Antikörper durch die Lösungsmittel sein.



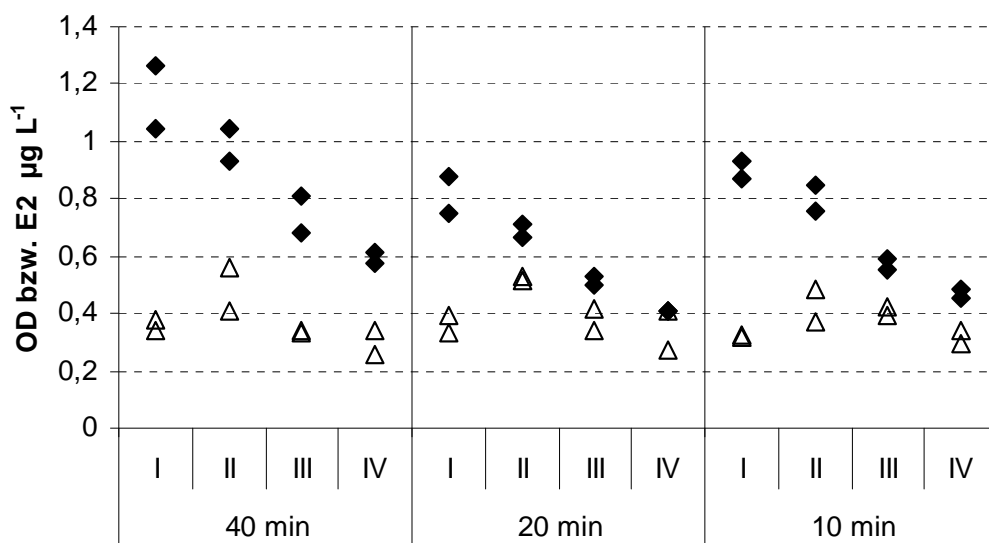
**Abbildung 5.26:** Einfluss organischer Lösungsmittel auf den A-Wert. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte (Rauten) und die Mittelwerte (Säulen) bei unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Lösungsmittel.



**Abbildung 5.27:** Einfluss organischer Lösungsmittel auf den Testmittelpunkt. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte (Dreiecke) und die Mittelwerte (Säulen) bei unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Lösungsmittel.

## 5.5 Optimierung des Assays bei 5 % Methanol-Anteil

Durch die Probenaufarbeitung und Anreicherung wurde ein bestimmter Restgehalt an Methanol in Probe und Standard unumgänglich. Auf der Grundlage der oben genannten Untersuchungen zu den Lösungsmittelleffekten (Kapitel 5.4) wurde bei den angereicherten Proben mit einem Methanolgehalt von 5 % gearbeitet. Für die Optimierung des ELISA bei 5 % Methanolgehalt in der Probe wurden, ähnlich der Untersuchung zur Charakterisierung des Assays (Kapitel 4.2.2), drei Inkubationszeiten von 10, 20 und 40 min sowie Tracer-Verdünnungen von 1:50 000, 1:70 000 und 1:100 000 auf ihren Einfluss bezüglich Parameter A und C untersucht (Abbildung 5.28).



**Abbildung 5.28:** Ergebnisse von Parameter A (ausgefüllte Rauten) und C (leere Dreiecke) sortiert nach unterschiedlichen Inkubationszeiten [min], Tracer-Verdünnungen (TV) und Methanolgehalten. Variante I: TV von 1:50 000, ohne Methanol; Variante II: TV 1:50 000 und 5 % Methanol; Variante III: TV 1:70 000 und 5 % Methanol; Variante IV: TV 1:100 000 und 5 % Methanol.

Die A-Werte (Abbildung 5.28) wurden durch den Einsatz von Methanol und mit zunehmender Tracer-Verdünnung geringer. Betrachtet man den Effekt der Inkubationszeit, so zeigte sich eine Verringerung von A nach Verkürzung der Inkubationszeit von 40 auf 20 min. Zwischen den Inkubationszeiten von 20 und 10 min war hingegen keine weitere Verringerung von A zu verzeichnen. Die C-Werte (Abbildung 5.28) werden durch den Einsatz von 5 % Methanol größer, nehmen aber mit höherer Tracer-Verdünnung wieder ab. Ein Einfluss der Inkubationszeit ist hier nicht erkennbar.

Die Effekte der Faktoren Tracer-Verdünnung, Methanolgehalt und Inkubationszeit wurden genauer bestimmt, indem eine Analyse der Daten mit dem Programm OptiVal® durchgeführt wurde (Tabelle 5.19 und Tabelle 5.20).

**Tabelle 5.19:** Ergebnisse der Auswertung des Experimentes „Optimierung des Assay mit 5%MeOH“ mit OptiVal® für den Parameter A.  $\beta$  ist der standardisierte Regressionskoeffizient und p die Signifikanz für die jeweiligen Faktoren ( $p < 0,05$  gilt als signifikant bedeutend).

Faktoren	$\beta$	p	
Tracer-Verdünnung (TV)	-0,169	0,000	
Inkubationszeit (Iz)	0,092	0,000	
Inkubationszeit <sup>2</sup> (Iz <sup>2</sup> )	0,159	0,000	
Methanolgehalt (MeOH)	-0,065	0,002	
Tracer-Verdünnung <sup>2</sup> (TV <sup>2</sup> )	0,084	0,021	
<b>Regressionsgleichung</b>	Y=0,537-0,169*TV+0,092*Iz+0,159*Iz <sup>2</sup> -0,065*MeOH +0,084*TV <sup>2</sup>		
Faktorenkombination Maximum	Maximum geschätzt [OD]	Faktorenkombination Minimum	Minimum geschätzt [OD]
TV: 1:50 000*Iz: 40 min* MeOH: 0 %	1,11	TV: 1:100 000*Iz: 20 min* MeOH: 5 %	0,38
Residuale Standardabweichung	Korrigiertes r <sup>2</sup> [%]	p (lack-of-fit Test)t	
0,06	87,2	0,75	

Die Analyse mit dem OptiVal® Modell ergab, dass die Effekte der Faktoren Tracer-Verdünnung, Inkubationszeit und Methanolgehalt signifikant waren und in dieser Reihenfolge eine abnehmende Bedeutung (Betrag von  $\beta$ ) zeigten. Ähnlich den Ergebnissen der vorangegangenen Untersuchungen (Kapitel 4.2.2 und 5.2.3) und entsprechend der Abbildung 5.28 wurde der Parameter A mit steigender Tracer-Verdünnung kleiner und mit zunehmender Inkubationszeit größer. Auch hier hatte die Tracer-Verdünnung den stärksten Einfluss. In Übereinstimmung zu den Ergebnissen in Kapitel 5.4 bestätigt das Modell den negativen Zusammenhang von Methanolgehalt und Parameter A. Das Modell zeigte eine gute Anpassung an die Messdaten, 87 % der Varianzen wurden erklärt und der lack-of-fit Test wurde bestanden, so dass von einer zufriedenstellenden Modellanpassung ausgegangen werden kann.

Das Modell (Tabelle 5.20) zeigte für den Parameter C nur signifikante Effekte für die Tracer-Verdünnung und den Methanolgehalt. In Übereinstimmung mit der Abbildung 5.28 war eine Abnahme des C-Wertes mit steigender Tracer-Verdünnung erkennbar, aber kein signifikanter Effekt der Inkubationszeit. Die Verdünnung wirkte sich stärker aus, als die Inkubationszeit, siehe Kapitel 4.2.2 und 5.2.3. Das Modell bestätigt ebenfalls in Übereinstimmung zu Kapitel 5.4, dass durch den Zusatz von 5 % Methanolgehalt der Wert des Parameters C ansteigt. Im Vergleich zum Modell für Parameter A war der Anteil der erklärten Varianzen für C geringer, aber der lack-of-fit Test wurde ebenfalls bestanden.

**Tabelle 5.20:** Ergebnisse der Auswertung des Experimentes „Charakterisierung des Assay I“ mit OptiVal® für den Parameter C.  $\beta$  ist der standardisierte Regressionskoeffizient und p die Signifikanz für die jeweiligen Faktoren ( $p < 0,05$  gilt als signifikant bedeutend).

Faktoren		$\beta$	p
Tracer-Verdünnung (TV)		-0,077	0,000
Methanolgehalt (MeOH)		0,056	0,001
<b>Regressionsgleichung</b>		Y= 0,329-0,077*TV+0,217*TV <sup>2</sup> + 0,056*MeOH	
Faktorenkombination Maximum	Maximum geschätzt E2 [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	Faktorenkombination Minimum	Minimum geschätzt E2 [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]
TV: 1:50 000* MeOH: 5	0,46	TV: 1:100 000 * MeOH: 0 %	0,20
Residuale Standardabweichung	korrigiertes r <sup>2</sup> [%]		p (lack-of-fit Test)
0,06	61,1		0,16

Das Ergebnis dieser Optimierung war ein Assay mit 15 min Inkubationszeit und einer Tracer-Verdünnung von 1:70 000, der sich für den Einsatz bei Proben mit 5 % Methanol eignete.

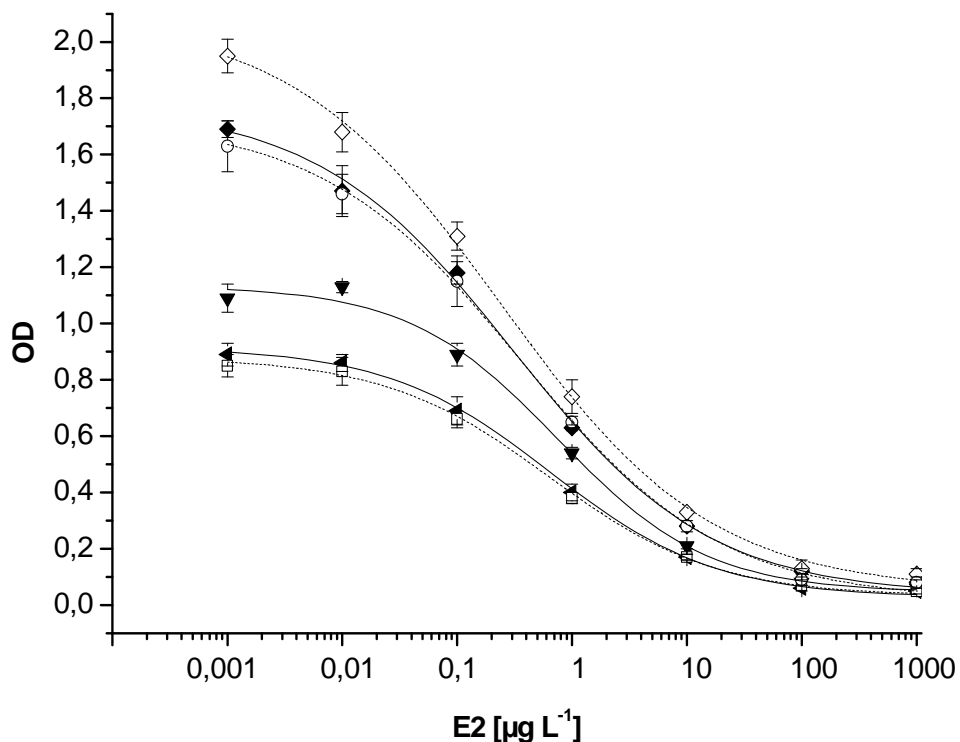
## 5.6 Konservierung von Proben

Proben unterliegen während ihrer Lagerung vielfältigen physikalischen, chemischen und biologischen Prozessen, die den messbaren E2-Gehalt der Probe beeinflussen können. Daher muss für eine repräsentative Aussage über die in der Umwelt vorliegenden Analyt-Konzentration in der Regel die Messung des Analyten innerhalb von 24 h erfolgen. Da diese Arbeitsspitze oftmals schwer zu bewältigen ist, könnte hier eine Methode zur Erhaltung des zum Zeitpunkt der Probenahme vorliegenden Analyt-Gehaltes Abhilfe schaffen.

In dieser Arbeit wurde die Notwendigkeit von Konservierungsmaßnahmen besonders deutlich, nachdem die verdünnten und dotierten Proben aus dem ersten Versuch zu Matrixeffekten (Kapitel 5.3.1) nach fünf Tagen Lagerung bei 4°C wiederholt gemessen wurden. Die Wiederfindungsraten der Probe aus dem Kläranlagenablauf hatten sich nur geringfügig verändert. Bei den dotierten Zulaufproben lag die Wiederfindungsrate selbst bei einer 1:10-fachen Verdünnung unter 2 % der anfangs dotierten E2-Konzentration (Diese Ergebnisse sind nicht im einzelnen dargestellt).

Um mikrobiellen Abbau zu verhindern bzw. zu reduzieren, wurden Versuche zu verschiedenen Konservierungsmöglichkeiten gemacht. Das Ziel war, trotz Konservierungsmaßnahmen die Sensitivität des Assays zu erhalten und den Abbau von E2 zu verhindern. Durch Filtration sollte die Adsorption an Partikel ausgeschlossen werden.

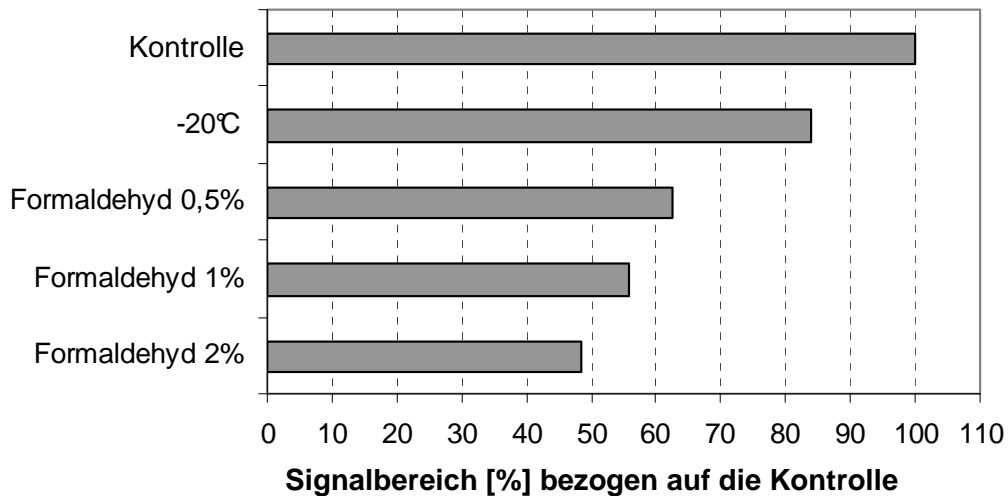
In einem ersten Schritt wurde der Einfluss der Zusätze verschiedener Konzentrationen von Formaldehyd sowie das Einfrieren bei  $-20^{\circ}\text{C}$  von Realproben auf den Assay untersucht. Die 4-Parameter-Kurven von Standards in Oberflächenwasser mit unterschiedlichen Konservierungsmethoden werden in Abbildung 5.29 gezeigt. Die Veränderung der 4-Parameter-Kurven im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle verdeutlicht den Effekt der Konservierungsvariante bezüglich der untersuchten E2-Konzentrationen. Besonders bei den kleineren Konzentrationen macht sich der Einfluss der Konservierungsmethoden bemerkbar.



**Abbildung 5.29:** 4-Parameter-Kurven bei unterschiedlichen Konservierungsmethoden in Oberflächenwasser gemessen auf 2 MTP. (Erste MTP, ausgefüllte Symbole und durchgezogene Linien und zweite MTP, gepunktete Linien und leere Symbole) Dargestellt sind: die Kontrolle (auf beiden MTP als Raute); die Variante 0,5 % Formaldehyd (ausgefülltes, umgedrehtes Dreieck); 1 % Formaldehyd (ausgefülltes, seitliches Dreieck); 2 % Formaldehyd (leeres Quadrat) und Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  (leerer Kreis). Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

Die wichtigen Parameter Signalbereich (A – D) und Parameter C sind zusätzlich einzeln in Abbildung 5.30 und Abbildung 5.31 dargestellt. Um die Ergebnisse verschiedener MTP miteinander vergleichbar zu machen, wurden die Signalbereiche und die C-Werte jeder

Variante auf die Kontrolle (Standardreihe in Oberflächengewässer, bei 4°C gelagert) einer jeden MTP bezogen und in % angegeben.



**Abbildung 5.30:** Signalbereich der verschiedenen Konservierungsmethoden bezogen auf die Kontrolle, die auf jeder MTP mitgemessen wurde.

Die Signalbereiche (Abbildung 5.30) der verschiedenen Konservierungsmethoden waren bei allen Varianten im Verhältnis zur Kontrolle kleiner. Die geringste Abweichung bezüglich der Kontrolle zeigte die bei -20°C eingefrorene Probe. Je mehr Formaldehyd hinzugegeben wurde, umso kleiner wurde der Wert von Parameter A, so dass sich bei fast konstant bleibendem D-Wert der Signalbereich reduzierte.



**Abbildung 5.31:** C-Werte der verschiedenen Konservierungsmethoden bezogen auf die Kontrolle, die auf jeder MTP mitgemessen wurde. Sortiert nach größer werdendem C-Wert.

Den kleinsten C-Wert (Abbildung 5.31) wies die Kontrolle auf. Auch das Einfrieren führte im Vergleich zur Kontrolle zu einem höheren C-Wert. Die Varianten mit Formaldehyd zeigten bezüglich der Kontrolle ebenfalls einen höheren C-Wert, aber unterschieden sich kaum voneinander.

Im Folgeexperiment wurde die Konservierungswirkung der einzelnen Varianten auf je eine Probe mit Kläranlagenablauf und Oberflächenwasser über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht. Die Proben wurden unterschiedlich dotiert und die Veränderung der messbaren E2-Gehalte über die Lagerungszeit miteinander verglichen. Um diese Veränderung bei den verschiedenen Konservierungsmethoden untereinander zu vergleichen war es notwendig, die E2-Gehalte jeder Variante und Zeitpunkt in % bezogen auf die jeweiligen frischen Proben anzugeben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.21 aufgezeigt. Dabei werden für den Tag 1 (der Messung der Varianten nach 24 Stunden Lagerung) nur die Standardabweichungen in % angegeben, da die frische Probe die jeweilige Bezugsgröße war. Mit der Standardabweichung wurde ein Anhaltspunkt für die Streuung der Messwerte in der frischen Probe (berechnete E2-Gehalte anhand der Kalibrationskurve in Reinstwasser) gegeben, um damit die Streuung der Messwerte an den weiteren Terminen besser einordnen zu können. Vergleicht man die Standardabweichungen fällt auf, dass:

- in den meisten Fällen die Streuungen in der Oberflächenwasserprobe größer waren als bei der Probe aus dem Kläranlagenablauf,
- die prozentuale Standardabweichung der geringsten E2-Konzentrationen meistens nicht am größten war,
- die Standardabweichung der Varianten mit Formaldehyd oft kleiner waren als die ohne Formaldehyd.

Die Konservierungswirkung der verschiedenen Varianten war in beiden Gewässerproben unterschiedlich. In der Probe mit Oberflächenwasser lag nach sieben Tagen Lagerung bei 4°C bei allen E2-Konzentrationen eine Abnahme der E2-Gehalte vor. Nach 14 Tagen war nur noch ein geringer Anteil des E2-Ausgangsgehaltes messbar. Hier unterschieden sich jedoch die E2-Konzentrationen voneinander. Bei den kleineren E2-Konzentrationen war tendenziell ein noch geringerer Anteil messbar als bei den höheren E2-Gehalten. Das Ergebnis der Lagerungsvariante bei -20°C zeigte insbesondere bei den höheren E2-Gehalten eine deutlich bessere konservierende Wirkung als die Lagerung bei 4°C. Die Varianten mit Formaldehyd unterschieden sich untereinander kaum, jedoch deutlich zu den Varianten ohne Formaldehyd. Mit Formaldehyd war sowohl nach sieben als auch nach 14 Tagen Lagerung ein hoher Anteil der Ausgangskonzentration noch nachweisbar, der meist oberhalb von 70 % lag.



Im Kläranlagenablauf ist bei den Lagerungsvarianten 4°C und –20°C nach 7 Tagen ein tendenzieller Anstieg der E2-Gehalte im Vergleich zum Ausgangsgehalt auffällig, der bei kleineren E2-Ausgangskonzentrationen besonders hoch war. Nach 14 Tagen war bei diesen Varianten ein deutlich geringerer Anteil nachweisbar als nach 7 Tagen, der jedoch bei höheren Ausgangsgehalten größer war. In der Variante Konservierung mit Formaldehyd war der gemessene E2-Gehalt nach 7 Tagen ebenfalls höher als in der frischen Probe, wobei dieser weniger anstieg als bei den beiden anderen Lagerungsvarianten. Auch bei den Varianten mit Formaldehyd war nach 14 Tagen deutlich weniger E2 nachweisbar.

**Tabelle 5.21:** Vergleich der Konservierungsvarianten: Lagerung bei 4°C und Lagerung bei -20°C (in je vierfacher Wiederholung) sowie Zugabe von 0,5 und 1 % Formaldehyd, gelagert bei 4°C in je dreifacher Wiederholung. („\*“ bedeutet, dass diese Messung fehlt, „#“ bedeutet OD lag unterhalb des D-Wertes der Kalibrationskurve und ist damit nicht auswertbar.)

E2 [µg L- 1]		prozentualer Anteil der gemessenen E2-Konzentration bezogen auf den gemessenen Mittelwert der frischen Proben [%]											
		4°C			-20°C			0,5% Formaldehyd			1% Formaldehyd		
		STABW %			STABW %			STABW %			STABW %		
1.Tag	7.Tag	14.Tag	1.Tag	7.Tag	14.Tag	1.Tag	7.Tag	14.Tag	1.Tag	7.Tag	14.Tag		
Oberflächengewässer	0,01	31	89	<10	46	98	26	19	125	76	3	81	78
			66	<10		91	<10		107	76		75	78
			52	<10		81	<10		90	74		72	74
			51	<10		81	<10						
	0,1	34	60	24	40	123	48	13	159	141	4	91	108
			52	13		107	32		116	113		80	102
			45	10		89	27		103	97		71	96
			40	<10		87	20						
	1	29	68	25	56	82	74	7	99	88	4	84	68
			68	24		76	56		97	87		84	68
			55	22		75	50		91	80		74	61
			50	21		72	45						
10	27	71	33	31	117	125	26	#	73	#	#	#	
		69	28		108	98		#	70		#	#	
		62	26		99	70		#	63		#	#	
		52	22		77	65							
Kläranlagenablauf	0,01	7	125	<10	114	>200	107	5	67	51	4	126	77
			92	<10		>200	67		63	51		112	73
			64	<10		>200	50		57	40		102	69
			58	<10		>200	*						
	0,1	16	158	63	42	189	69		100	82	8	109	69
			127	60		111	46	6	94	74		90	66
			85	43		95	44		86	72		88	57
			81	42		*	34						
	1	6	153	83	12	107	77	2	101	67	10	130	49
			126	72		102	75		79	66		105	48
			101	70		98	73		90	63		76	42
			76	64		75	56						
	10	3	118	90	38	98	99	#	#	#	#	#	#
			100	80		92	85		#	#		#	#
			97	71		65	65		#	#		#	#
			93	69		47	51						

## 5.7 ESTR-A-LISER

Bevor der Immunoassay auf dem Automaten implementiert werden konnte, wurden die einzelnen Funktionen des Pipettierroboters „Miniprep 60“ überprüft und entsprechend den Anforderungen eingestellt. Dabei mussten einige Schwierigkeiten bezüglich der Kommunikation von Hard- und Software überwunden werden. Dazu wurden die einzelnen Komponenten dieses Automaten mit Hilfe der Software oder durch technische Änderungen aufeinander abgestimmt. Diese Abstimmung erforderte regelmäßige Neuerungen der Software, die von der Firma „quo data“ weiterentwickelt wurde. Getestet wurde die Software an der Universität Bonn. Besondere Schwierigkeiten bereitete die Doppelnadel der Pipettierstation durch:

- unregelmäßige Ausbildung von Tropfen an ihrer Außenseite und
- teilweises Nicht-Aufziehen von Lösungen, so dass nur Luft pipettiert wurde.

Ursächlich dafür kann eine fehlerhafte oder beschädigte Beschichtung der Nadel gewesen sein, so dass die Nadel früh ausgetauscht werden musste. Die Tropfen außen an der Nadel führten zu deutlichen Verschleppungen von E2 und damit zu großen Standardabweichungen der Messwiederholungen. Durch ein regelmäßiges Abreiben der Nadel mit Methanol konnte die Tropfenbildung reduziert werden.

Das Pipettieren von Luft könnte durch Schwierigkeiten bei der kapazitiven Messung der Nadel erklärt werden, mit deren Hilfe die Nähe der Nadel zur Flüssigkeitsoberfläche bestimmt wird. Durch die Optimierung der Größe des sogenannten „Air gaps“ der die Größe der Luftblase zwischen Systemflüssigkeit und aufziehender Lösung bestimmt, konnte dieses Problem behoben werden.

Um ein möglichst kontinuierliches Schütteln der MTP während des Assays zu ermöglichen, wurde die MTP nach dem Pipettieren jeder vierten Kavität für eine Sekunde auf höchster Stufe im Photometer geschüttelt. Nach Beenden des gesamten Arbeitsschritts wurde nochmals für 40 Sekunden bei größter Intensität geschüttelt. Im Unterschied zu dieser Schüttelweise konnte beim manuellen Test, der eine deutlich kürzere Mindestzeit für das Pipettieren einer gesamten MTP benötigt<sup>39</sup>, die MTP fast über die gesamte Inkubationszeit geschüttelt werden. Die Ursache für die längere Bearbeitungszeit lag im randomisierten Arbeiten des Automaten, welches nach jedem Pipettierschritt das Reinigen der Nadel erfordert. Das randomisierte Arbeiten ist jedoch einer der bedeutenden Vorteile der Automatisierung. Somit stellt das regelmäßige Schütteln einen guten Kompromiss dar, obwohl es zu einer hohen Beanspruchung des Photometers führt, so dass die Schublade

---

<sup>39</sup>Das Pipettieren einer Lösung über eine MTP kann bei einer Mehrkanalpipette innerhalb von 2 Minuten erfolgt sein. Für das Pipettieren unterschiedlicher Standards und Proben, bei dem regelmäßig die Pipettenspitzen gewechselt werden, müssen bis zu 15 Minuten einkalkuliert werden.

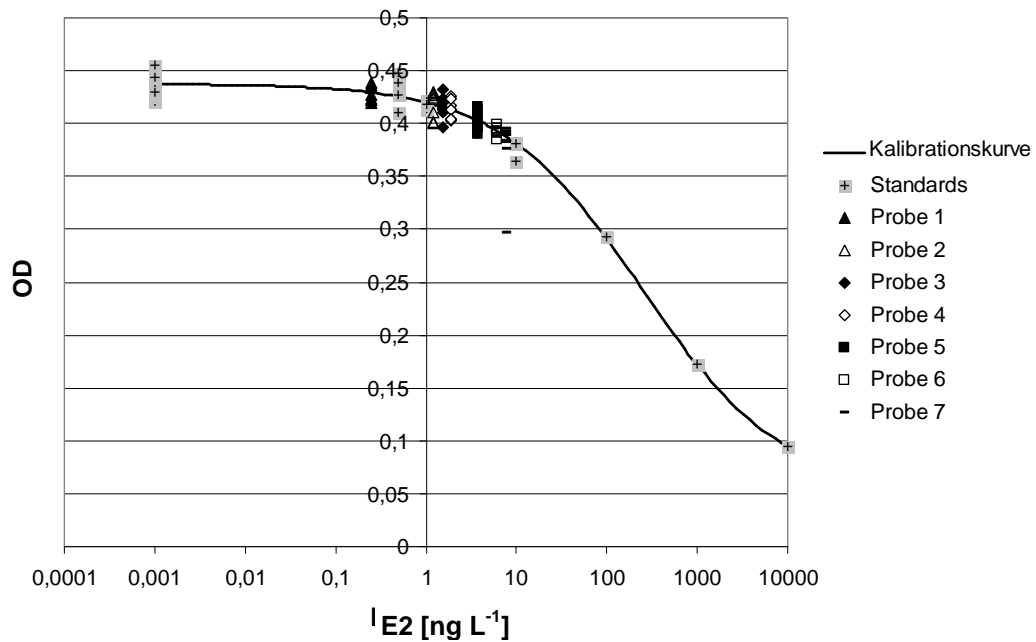
(siehe Abbildung 4.3), welche die Mikrotiterplatte aufnimmt, öfter als bei normaler Beanspruchung ausgewechselt werden musste.

Die Untersuchungen bei verschiedenen Temperaturen zeigte, dass mit dem Kühlsystem Temperaturunterschiede zwischen Raumtemperatur und Geräteinnenraumtemperatur von bis zu 5°C zuverlässig überwunden werden konnten. Deutlich kühlere Temperaturen konnten aber damit nicht durchgehend gehalten werden. Aus diesen Gründen wurde eine Temperatur zwischen 20 und 25°C, je nach äußeren Bedingungen, eingestellt. Temperaturen deutlich unter 20°C waren schwer zu realisieren und führten zusätzlich zu Kondensation von Luftfeuchtigkeit im Gerät.

Das Ergebnis der Anpassung des Immunoassays an den Automaten ist das Assay-Protokoll 3, das in Tabelle 4.15 dargestellt ist. Es wurde bei der direkten Messung der Feldproben verwendet. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 5.29 dargestellt.

### 5.7.1 Auswertung

Analog zum manuell durchgeführten Assay wurden anhand der gemessenen Standards die Kalibrationskurven ermittelt und die E2-Konzentrationen in den Proben berechnet. Das Ergebnis der Auswertung zeigte neben der graphischen Darstellung von Standards, Kalibrationskurve und Proben eine Auflistung der Parameter A, B, C und D sowie der Messergebnisse und deren statistische Kenndaten. Beispielhaft wird hier das Ergebnis einer Messung in Abbildung 5.32, Tabelle 5.22 und Tabelle 5.23 dargestellt. In den graphischen Darstellungen sind die OD-Werte der Messwiederholungen der Standards der jeweiligen dotierten Konzentrationen auf der x-Achse zugeordnet. Bei den Proben wurden die Messwiederholungen einer Probe dem errechneten E2-Konzentrationswert der jeweiligen Probe auf der x-Achse zugeordnet.



**Abbildung 5.32:** Diagramm der Auswertung mit dem ESTR-A-LISER. Die Standards (schwarze Kreuze auf grauem Viereck) bilden die Berechnungsgrundlage für die Kalibrationskurve. Die E2-Konzentrationen der Proben werden anhand der Kalibrationskurve berechnet.

Zusätzlich wurden in tabellarischer Form die OD-Werte für den Blindwert und die Standards angegeben, auf denen die Schätzung der ebenfalls aufgezeigten vier Parameter beruht (Tabelle 5.22).

**Tabelle 5.22:** Beispiel einer Auswertung I: 4-Parameter der Kalibrationskurve und die dazugehörigen Standards mit Anzahl der Messwiederholungen sowie mittlerer OD und Standardabweichung.

Parameter Kalibrationskurve	A [OD]	B	C [µg L <sup>-1</sup> ]	D [OD]
	0,44	0,55	0,24	0,05
Standard	E2- Konzentration [ng L <sup>-1</sup> ]	Anzahl Messwieder- holungen	Mittelwert [OD]	Standardab- weichung [OD]
Blindwert	0	10	0,43	0,02
1	0,5	8	0,43	0,03
2	1	8	0,42	0,01
3	10	3	0,38	0,03
4	100	1	0,29	
5	1000	1	0,17	
6	10000	1	0,09	

Zu jeder Probe (Tabelle 5.23) gibt das Auswertungsprogramm die Anzahl der Messwiederholungen, den Mittelwert und die Standardabweichung der OD-Werte sowie den minimalen und maximalen OD-Wert an. Neben der mit der Kalibrationskurve für jede einzelne Probe errechneten Konzentration und Nachweisgrenze (LOD) werden zusätzlich der Minimal- und Maximal-Wert des Vertrauensintervalls bei 95 % angegeben. Damit ist der Bereich dargestellt, in dem sich mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit der wahre Wert der Probe befindet.

**Tabelle 5.23:** Beispiel einer Auswertung II: Ergebnisse der einzelnen Proben zu der in Abbildung 5.32 und Tabelle 5.22 gezeigten Messung.

Probenbezeichnung	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7
Anzahl Wiederholungen	8	8	8	8	8	8	8
Mittelwert der OD	0,43	0,42	0,42	0,41	0,40	0,39	0,38
Standardabweichung OD	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,01	0,04
Min. OD	0,42	0,41	0,41	0,40	0,39	0,38	0,38
Max. OD	0,44	0,43	0,43	0,42	0,41	0,40	0,40
Berechnete Konzentration E2 [ng L <sup>-1</sup> ]	<b>&lt; 0,4</b>	<b>1,2</b>	<b>1,5</b>	<b>1,9</b>	<b>3,7</b>	<b>6,2</b>	<b>7,9</b>
LOD E2 [ng L <sup>-1</sup> ]	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5
Min. E2 [ng L <sup>-1</sup> ]	0,0	0,3	0,5	0,7	2,0	3,8	5,0
Max. E2 [ng L <sup>-1</sup> ]	1,1	2,7	3,1	3,6	6,1	9,1	11,4

## 5.8 Feldstudie

Im Rahmen der Feldstudie wurde die Anwendbarkeit des ELISA und des ESTR-A-LISER für Messungen von Realproben untersucht. Die E2-Konzentrationen in den Feldproben wurden zum einen nach Anreicherung mit Hilfe der SPE-Methode manuell gemessen und zum anderen mit Hilfe des ESTR-A-LISER direkt bestimmt. Parallel zur Bestimmung mittels ELISA wurden auch Messungen in einem Referenzlabor durchgeführt.

### 5.8.1 Feldproben

Bei allen Feldproben wurde der Gehalt an gelöstem organischem Kohlenstoff (DOC) bestimmt und die Leitfähigkeit gemessen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 5.24 und Tabelle 5.25 dargestellt. Vor der Anreicherung der Proben wurde jeweils der pH-Wert bestimmt. Die pH-Werte aller Proben lagen im Bereich zwischen pH 6,2 und pH 7,0. Es gab dabei keine Auffälligkeiten, so dass die pH-Werte nicht im einzelnen aufgeführt werden.

**Tabelle 5.24:** Leitfähigkeit (Lf.) und DOC –Gehalte in den Proben der Oberflächengewässer.

	Ahr Blankenheim		Ahr Dümpelfeld		Ahr Kripp		Agger Lohmar		Rhein Bonn	
	Jan.	Feb.	Jan.	Feb.	Jan.	Feb.	Jan.	Feb.	Jan.	Feb.
<b>Lf.</b> [ $\mu\text{S cm}^{-1}$ ]	417	453	345	304	327	321	211	272	428	434
<b>DOC</b> [ $\text{mg L}^{-1}$ ]	1,0	1,9	2,2	22	17	17	17	30	3,5	60

**Tabelle 5.25:** Leitfähigkeit (Lf.) und DOC-Gehalte in den Proben der Kläranlagenabläufe

	Bad Godesberg		Beuel		Duisdorf		Dümpel- feld		Blanken- heim		Ohlen- hard		Altenrath	
	Jan	Feb	Jan	Feb	Jan	Feb	Jan	Feb	Jan	Feb	Jan	Feb	Jan	Feb
<b>Lf.</b> [ $\mu\text{Scm}^{-1}$ ]	343	639	335	651	379	865	615	652	668	735	650	532	343	639
<b>DOC</b> [ $\text{mg L}^{-1}$ ]	9,5	4,6	212	4,7	96	4,1	7,0	7,3	4,2	4,5	10	9,3	9,5	4,6

Die Leitfähigkeit in den Oberflächengewässern variierte zwischen beiden Terminen nur geringfügig. Im Unterschied dazu, zeigten die Proben der Kläranlagenabläufe, zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den Terminen im Januar und Februar. Mit einer Korrelationsanalyse konnten zwischen den E2-Gehalten in den Proben und der Leitfähigkeit nur schwache, nicht signifikante Zusammenhänge festgestellt werden.

Die DOC-Gehalte variierten dagegen zum Teil beträchtlich. In den Oberflächengewässern sind die Werte im Februar bezüglich der Werte im Januar unterschiedlich stark erhöht. Im Unterschied dazu waren in den Kläranlagen bei der Mehrzahl der Proben der DOC-Gehalt im Januar größer als im Februar. Abgesehen von den Werten im Januar in den Kläranlagen Beuel und Duisdorf lagen die DOC-Gehalte zwischen 4,1 und 10  $\text{mg L}^{-1}$ . Im Gegensatz dazu schwanken die DOC-Werte der Oberflächengewässerproben stärker

(zwischen 1,0 und 60 mg L<sup>-1</sup>). Bei einer Korrelationsanalyse von DOC-Gehalten mit den gemessenen E2-Gehalten in den Proben konnte für die Oberflächengewässer nur eine sehr schwache Korrelation (Korrelationskoeffizient < 0,2) festgestellt werden. Ohne Berücksichtigung der außergewöhnlich hohen DOC-Gehalte in den Kläranlagen Beuel und Duisdorf konnte für die Zusammenhänge von E2-Gehalt und DOC-Gehalt in den Kläranlagenabläufen eine schwache aber nicht signifikante Korrelation gezeigt werden.

### 5.8.2 Wiederfindungsraten

Vor Beginn der Feldstudie wurden die Wiederfindungsraten für die Referenzanalytik und die direkte Messung am ESTR-A-LISER in Reinst- und Leitungswasser bestimmt (siehe Tabelle 5.26). Die Wiederfindungsraten der direkten Messung mit dem ESTR-A-LISER waren dabei besser als die der Referenzanalytik.

**Tabelle 5.26:** Vergleich der Wiederfindungsrate (Wdfr.) von 2,0 ng L<sup>-1</sup> E2 der Referenzanalytik und dem automatisierten ELISA.

Probe	nominell	ESTR-A-LISER		LC-MS/MS	
	E2 [ng L <sup>-1</sup> ]	E2 [ng L <sup>-1</sup> ]	Wdfr [%]	E2 [ng L <sup>-1</sup> ]	Wdfr [%]
Reinstwasser	2,0	1,7	85	1,6	80
Leitungswasser	2,0	1,9	95	1,2	60

Auf Grund der großen Matrixunterschiede wurde zusätzlich die Wiederfindung in exemplarischen Feldproben bestimmt (Tabelle 5.27 und Tabelle 5.28). Dazu wurde jeweils ein Oberflächengewässer und ein Kläranlagenablauf ausgewählt. Die Wiederfindungsrate der Feldproben wurde mit Hilfe der linearen Regression der Ergebnisse von dotierten Proben berechnet.

Die Wiederfindungsrate des dotierten Leitungswassers nach Anreicherung mit der SPE-Methode lag bei 94 %, während beim Oberflächenwasser und beim Kläranlagenablauf mit 115 % bzw. 112 % eine leichte Überbestimmung festzustellen war (Tabelle 5.27).



**Tabelle 5.27:** Wiederfindungsrate (Wdfr.) nach Anreicherung mit der SPE-Methode und manueller Messung. Dargestellt ist das Ergebnis der Regressionsanalyse mit Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ) und Signifikanz ( $p$ ). Die Wiederfindungsrate entspricht der Steigung der Regressionsgeraden in %, deren Fehler kursiv angegeben ist. Der Y-Achsenabschnitt gibt den mit der Regressionsgerade berechneten E2-Gehalt der undotierten Probe an.

	<b>Wdfr.</b> [%]	<b>Y-Achsenabschnitt</b> E2 [ng L <sup>-1</sup> ]	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>p</b>
<b>Leitungswasser</b>	<b>94 ± 5</b>	0,03	1	<0,0001
<b>Oberflächenwasser</b>	<b>115 ± 5</b>	1,38	0,9997	0,0156
<b>Kläranlagenablauf</b>	<b>112 ± 2</b>	0,75	0,9846	0,0154

Um zu überprüfen, wie gut die Wiederfindung der E2-Gehalte bei der direkten Messung der Proben mit dem ESTR-A-LISER war, wurde dort die Wiederfindungsrate analog zu der Bestimmung der Wiederfindungsrate nach Anreicherung bestimmt (Tabelle 5.28).

**Tabelle 5.28:** Wiederfindungsrate (Wdfr.) bei der direkten Messung mit dem ESTR-A-LISER. Dargestellt ist das Ergebnis der Regressionsanalyse mit Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ) und Signifikanz ( $p$ ). Die Wiederfindungsrate entspricht der Steigung der Regressionsgeraden in %, deren Fehler kursiv angegeben ist. Der Y-Achsenabschnitt gibt den mit der Regressionsgerade berechneten E2-Gehalt der undotierten Probe an.

	<b>Wdfr.</b> [%]	<b>Y-Achsenabschnitt</b> E2 [ng L <sup>-1</sup> ]	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>p-Wert</b>
<b>Oberflächenwasser</b>	119 ± 27	0,95	0,9991	<0,0001
<b>Kläranlagenablauf</b>	142 ± 10	2,77	0,9975	0,0450

Die Wiederfindungsraten beider Gewässertypen lagen mit 119 % im Oberflächewasser und 142 % im Kläranlagenablauf deutlich über 100 % und waren damit höher als die bei der manuellen Messung ermittelten Wiederfindungsrate.

Im Fall des LC-MS/MS Verfahrens wurde mit Hilfe deuterierter Surrogatstandards eine Nachweisgrenze von 0,3 ng L<sup>-1</sup> errechnet. Messungen dotierter Proben verdeutlichten allerdings wesentliche Schwierigkeiten beim Erzielen einer hinreichend quantitativen Anreicherung der Wasserproben im Referenzlabor. Berücksichtigt man für die Realproben die Wiederfindungsraten von 54 bzw. 50 % (mündliche Mitteilung Dirk Skutlarek, Referenzlabor, Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit der Universität Bonn), so muss für die Feldproben eine Nachweisgrenze von 0,6 ng L<sup>-1</sup> angenommen werden.

### 5.8.3 Messwerte

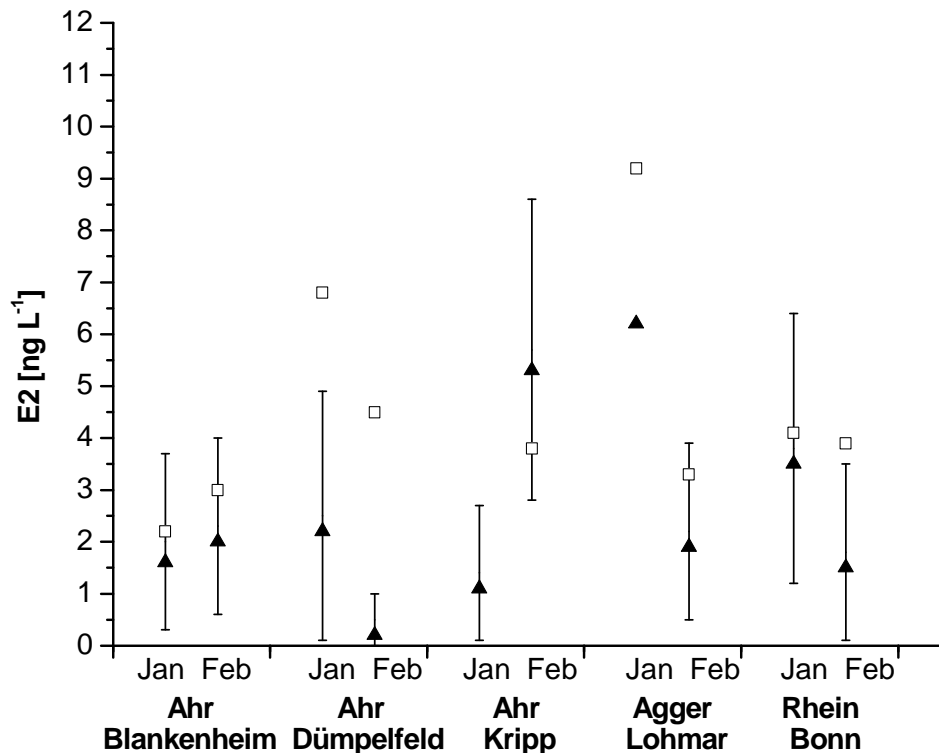
Die Tabelle 5.29 sowie Abbildung 5.33 und Abbildung 5.34 geben einen Überblick über die Ergebnisse der Feldstudie. Im Falle der Messung mittels manuellem ELISA wurden die Nachweisgrenzen jeweils anhand der zugehörigen Kalibrationskurven ermittelt. Die Nachweisgrenzen und der Bereich der erweiterten Messunsicherheit für die Messungen mit dem ESTR-A-LISER wurden von der dazugehörigen Auswertungssoftware für jede Probe einzeln berechnet. Die Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ), die bei der manuellen Messung bestimmt wurden, sind um den Anreicherungsfaktor von 50 bereinigt worden.

Die manuell gemessenen E2-Konzentrationen in den Oberflächengewässern (Abbildung 5.33) lagen zwischen  $2,2 \text{ ng L}^{-1}$  und  $9,2 \text{ ng L}^{-1}$ . Die mit dem ESTR-A-LISER gemessenen Konzentrationen lagen zwischen  $0,2 \text{ ng L}^{-1}$  und  $6,2 \text{ ng L}^{-1}$ . Bezieht man den Bereich der erweiterten Messunsicherheit mit ein, erweitert sich der Bereich der E2 Konzentrationen nur relativ gering auf bis zu  $8,5 \text{ ng L}^{-1}$ . Bei beiden Messmethoden wird der höchste E2-Gehalt an dem Termin im Januar an der Probenahmestelle Lohmar im Fluss Agger gemessen.

**Tabelle 5.29:** Ergebnisse der E2-Messungen in den Proben, manuell nach Anreicherung und mit dem ESTR-A-LISER gemessen. Der Bereich zwischen der unteren (Min.) und oberen (Max.) Grenze beinhaltet den Bereich der erweiterten Messunsicherheit bei 95 % Wahrscheinlichkeit. Die Abkürzung KA steht für Kläranlage. Es handelt sich stets um Stichproben, mit Ausnahme der mit einer Raute (#) gekennzeichneten 24 h-Mischprobe. Die mit einem Stern (\*) gekennzeichnete Probe konnte aufgrund von Glasbruch nicht im E2-ELISA gemessen werden. Die Standardabweichungen der manuell gemessenen Proben sind kursiv angegeben. (Aufgrund der Höhe der LOD kann bei den Messungen mit dem ESTR-A-LISER nur eine Nachkommastelle angegeben werden.)

		SPE manuell <sup>40</sup>			ESTR-A-LISER			
		LOD [ng L <sup>-1</sup> ]	LOQ [ng L <sup>-1</sup> ]	E2 [ng L <sup>-1</sup> ]	E2 [ng L <sup>-1</sup> ]	LOD [ng L <sup>-1</sup> ]	Min. [ng L <sup>-1</sup> ]	Max. [ng L <sup>-1</sup> ]
Ahr Blankenheim	Jan	0,01	0,18	<b>2,2 ± 0,4</b>	<b>1,6</b>	0,8	0,3	3,7
	Feb	0,04	0,34	<b>3,0 ± 0,3</b>	<b>2,0</b>	0,9	0,6	4,0
Ahr Dümpelfeld	Jan	0,01	0,18	<b>6,8 ± 0,9</b>	<b>2,2</b>	0,6	0,1	5,0
	Feb	0,04	0,34	<b>4,5 ± 0,2</b>	<b>0,2</b>	0,9	0,0	1,1
Ahr Kripp	Jan			*	<b>1,1</b>	1,0	0,1	2,8
	Feb	0,04	0,34	<b>3,8 ± 0,3</b>	<b>5,3</b>	1,0	2,8	8,5
Agger Lohmar	Jan	0,01	0,18	<b>9,2 ± 0,9</b>	<b>6,2</b>	1,7	6,2	6,2
	Feb	0,04	0,34	<b>3,3 ± 0,3</b>	<b>1,9</b>	0,9	0,6	3,9
Rhein Bonn	Jan	0,01	0,18	<b>4,1 ± 0,7</b>	<b>3,5</b>	0,7	1,2	6,4
	Feb	0,04	0,34	<b>3,9 ± 0,3</b>	<b>1,5</b>	0,6	0,1	3,6
KA Salierweg	Jan	0,21	2,0	<b>3,1 ± 0,6</b>	<b>2,8</b>	0,3	1,4	4,5
	Feb	0,22	1,9	<b>6,5 ± 0,9</b>	<b>2,8</b>	0,5	1,0	6,0
KA Bad Godesberg #	Jan	0,21	2,0	<b>1,5 ± 0,1</b>	<b>1,2</b>	0,3	0,4	2,4
	Feb	0,22	1,9	<b>0,80 ± 0,1</b>	<b>0,6</b>	0,5	0,0	2,2
KA Beuel #	Jan	0,21	2,0	<b>3,8 ± 0,8</b>	<b>1,8</b>	0,5	0,6	3,2
	Feb	0,04	0,33	<b>8,3 ± 0,4</b>	<b>2,9</b>	0,5	1,0	6,1
KA Duisdorf #	Jan	0,21	2,0	<b>3,0 ± 0,4</b>	<b>1,9</b>	0,3	0,8	3,3
	Feb	0,04	0,33	<b>10 ± 0,4</b>	<b>6,5</b>	0,6	2,9	11
KA Dümpelfeld	Jan	0,21	2,0	<b>12 ± 0,7</b>	<b>3,9</b>	0,9	2,1	6,2
	Feb	0,04	0,33	<b>12 ± 1,0</b>	<b>2,9</b>	1,0	1,2	5,1
KA Blankenheim	Jan	0,02	0,12	<b>10 ± 0,2</b>	<b>2,7</b>	1,0	1,1	5,0
	Feb			*	<b>2,3</b>	0,9	1,0	4,2
PKA Altenrath	Jan	0,04	0,33	<b>3,8 ± 0,5</b>	<b>12</b>	1,0	8,5	16
	Feb	0,21	2,0	<b>3,1 ± 0,4</b>	<b>2,0</b>	0,6	0,8	3,9
TKA Ohlenhard	Jan	0,04	0,33	<b>51 ± 3,4</b>	<b>34</b>	1,6	26	41
	Feb	0,21	2,0	<b>15 ± 0,9</b>	<b>6,5</b>	0,6	4,0	9,6

<sup>40</sup> Die Proben wurden mit SPE angereichert und anschließend manuell mit dem ELISA gemessen.

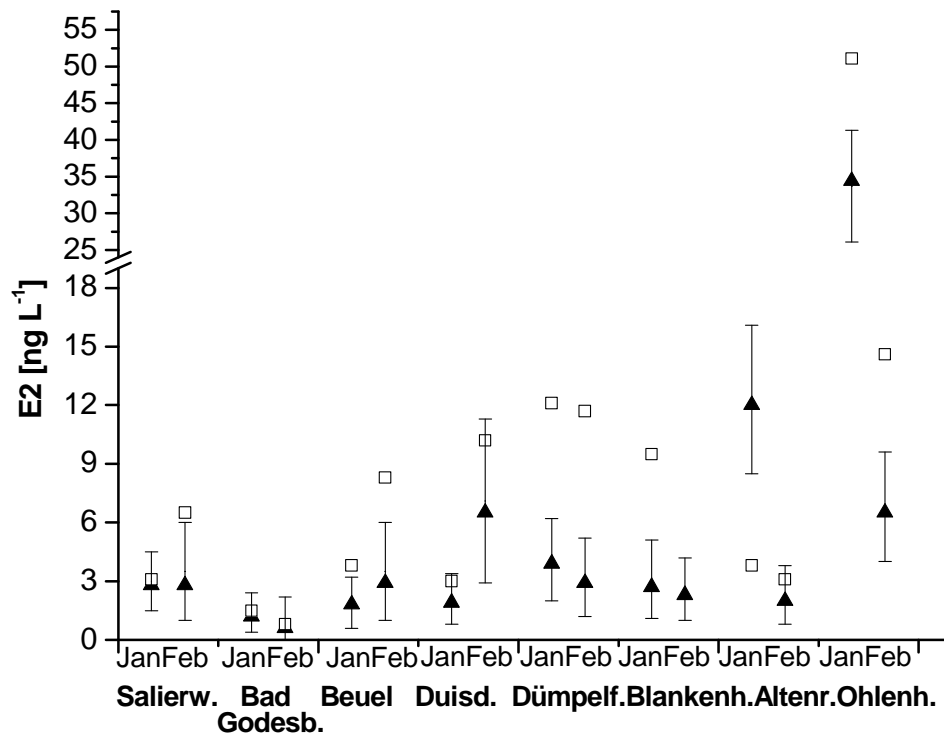


**Abbildung 5.33:** Ergebnisse der Oberflächengewässerproben. Die Ergebnisse der Messungen mit dem E2-ELISA nach der Anreicherung mit der SPE-Methode (ungefüllte Quadrate) und die Ergebnisse der Messung mit dem ESTR-A-LISER (Bereich erweiterter Messunsicherheit bei 95 % Wahrscheinlichkeit als Fehlerbalken dargestellt, Messergebnis als ausgefülltes Dreieck).

Die manuell bestimmten E2-Gehalte in den Kläranlagenabläufen (Abbildung 5.34) lagen zwischen  $0,8 \text{ ng L}^{-1}$  und  $12 \text{ ng L}^{-1}$  und für die Teichkläranlage bis zu  $51 \text{ ng L}^{-1}$ .

Mit dem ESTR-A-LISER wurden Konzentrationen zwischen  $0,6 \text{ ng L}^{-1}$  und  $12 \text{ ng L}^{-1}$  bzw.  $34 \text{ ng L}^{-1}$  für die Teichkläranlage gemessen. Der Bereich der erweiterter Messunsicherheit spannte sich von  $< \text{LOD}$  bis  $16 \text{ ng L}^{-1}$  bzw. für die Teichkläranlage bis  $41 \text{ ng L}^{-1}$ .

Vergleicht man beide Messmethoden fällt auf, dass die Messwerte, bestimmt mit dem ESTR-A-LISER, tendenziell niedriger waren als die manuell gemessenen Werte. Etwas über die Hälfte der manuell gemessenen Werte lagen im Bereich der erweiterter Messunsicherheit der ESTR-A-LISER-Ergebnisse.



**Abbildung 5.34:** Ergebnisse der Kläranlagenproben. Die Ergebnisse der Messungen mit dem E2-ELISA nach der Anreicherung mit der SPE-Methode (ungefüllte Quadrate) und die Ergebnisse der Messung mit dem ESTR-A-LISER (Bereich erweiterter Messunsicherheit bei 95 % Wahrscheinlichkeit als Fehlerbalken dargestellt, Messergebnis als ausgefülltes Dreieck).

Mit Hilfe der LC-MS/MS Referenzmessungen konnte nur bei den Proben aus der Teichkläranlage in Ohlenhard E2 nachgewiesen werden. Im Januar wurden  $13 \text{ ng L}^{-1}$  E2 gemessen und im Februar ebenfalls  $13 \text{ ng L}^{-1}$ . Die Ergebnisse aller anderen Proben lagen unterhalb der Nachweisgrenze von  $0,6 \text{ ng L}^{-1}$ .

## 6 Diskussion

In diesem Kapitel werden die in der Einleitung genannten Themen diskutiert. Dabei wird im folgenden nur auf die Schwerpunkte eingegangen. Hier nicht diskutierte Ergebnisse wurden bereits in Kapitel 5 behandelt.

### 6.1 Entwicklung und Optimierung des E2-ELISA

Die Untersuchungen zur Entwicklung und Optimierung des hier beschriebenen ELISA waren ein zentrales Element dieser Arbeit. Im Anschluss daran wurde eine ausführliche Charakterisierung des ELISA vorgenommen, um Möglichkeiten und Limitierungen des Assays weiter auszuloten. Dabei wurden in mehrfaktoriellen Versuchen die Zusammenhänge zwischen den Faktoren: Tracer-Inkubationszeit, sowie Tracer- und Antikörperverdünnung bezüglich der Sensitivität des Assays untersucht. Anhand dieser Daten konnten die Kenndaten des Assays ermittelt werden.

Ausgangsmaterial dieser Arbeit war ein Antikörper der Arbeitsgruppe Meyer in Weihenstephan (Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel, Technische Universität München), der dort für Messungen von Östradiol<sup>41</sup>, wie auch für die Anreicherung von Östradiol aus Rinderserum (MEYER et al. 1990) verwendet wurde. Die analytischen Kenndaten genügten den Erfordernissen im Bereich der Tierphysiologie, waren jedoch für den hier vorgesehenen Einsatz nicht ausreichend sensitiv. Die vorgesehene Inkubation des Tracers über Nacht entsprach nicht dem Anspruch an einen schnell durchführbaren Assay.

Die Anforderungen an den Assay, der sich für routinemäßige Bestimmung von E2 in Wasserproben eignen sollte, waren:

- eine möglichst einfache Handhabung,
- eine möglichst kurze Durchführungsdauer,
- Nachweisgrenzen unter  $10 \text{ ng L}^{-1}$  und
- die Möglichkeit zur Automatisierung.

Während der Optimierung wurde deutlich, dass diese Ansprüche mit dem vorhandenen Assay der Arbeitsgruppe Meyer (TUM) nicht erfüllt werden konnten. Mit dem Einsatz von

---

<sup>41</sup> Der Assay diente der Quantifizierung von Östradiol in Rinderserum. Die Proben wurden hierzu chromatographisch aufgereinigt und nachfolgend im ELISA quantifiziert. [Prof. H.H.D. Meyer, persönliche Mitteilung]

neuem Antikörperserum und neuem Tracer konnte der Test vereinfacht werden, da sowohl die Beschichtung der MTP mit sekundärem Antikörper als auch das Blocking wegfiele. Der Wegfall dieser Arbeitsschritte bedeutete nicht nur eine Zeitersparnis, sondern reduzierte auch die Materialkosten und mögliche Fehlerquellen. Die Inkubationszeit des Tracers konnte verkürzt werden, so dass der Assay bei manueller Durchführung, ausgehend von bereits mit Antikörper beschichteten MTP, innerhalb von 90 min beendet werden konnte und der Assay damit als ausreichend schnell durchführbar eingestuft werden kann.

Die beiden entscheidenden Parameter für die Optimierung des Assays waren A und C der 4-Parameter-Kurve. Der A-Wert gibt die maximale OD an und sollte nach Möglichkeit im Bereich von 1,0 OD oder höher liegen. Um einen für die Messung ausreichenden Signalbereich<sup>42</sup> zu gewährleisten, wurde dessen Untergrenze auf 0,4 OD festgelegt. Als Kriterium für die Sensitivität des Assays diente Parameter C, da er die E2-Konzentration am Testmittelpunkt beschreibt und auf der Kalibrationskurve im Bereich der größten Steigung liegt. In diesem Bereich haben Messergebnisse die kleinsten Standardabweichungen und damit die beste Präzision. Ziel der Optimierung war ein C-Wert im möglichst niedrigen E2-Konzentrationsbereich.

Die Haupteinflussfaktoren auf diese beiden Parameter waren Tracer-Verdünnung und Tracer-Inkubationszeit. Sie wurden in mehrfaktoriellen Versuchen auf ihre Kombinationswirkungen hin getestet. Dazu wurde eine Quantifizierung ihrer Effekte vorgenommen. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse getrennt nach den Parametern A und C diskutiert.

Den Ergebnissen der einfaktoriellen Untersuchungen entsprechend sank Parameter A mit steigender Tracer-Verdünnung auf Grund der geringer werdenden Menge an Tracer-gebundener Peroxidase, welche für die Bildung des Signals bei Bindung an den Antikörper zur Verfügung steht. Dieser Effekt war deutlich größer als die Auswirkung der Inkubationszeit. Dennoch stieg mit längerer Inkubationszeit auch der A-Wert an. Der steilere Verlauf der Iso-Linien (siehe Abbildung 5.16) bei geringerer Tracer-Verdünnung im Vergleich zu höherer Verdünnung wies darauf hin, dass die Inkubationszeit bei geringerer Tracer-Verdünnung um so relevanter war. Ursache für die Wechselwirkung von Tracer-Verdünnung und Inkubationszeit kann die mit längerer Inkubationszeit vermehrte Bindung des Tracers an den Antikörper sein. Der Tracer (E2-6-CMO an POD gekoppelt) ähnelt in seiner Struktur mehr dem Immunogen (E2-6-CMO an BSA gekoppelt) als E2. Daher ist die Affinität des Antikörpers für den Tracer groß, so dass mit der Zeit E2 zunehmend vom Tracer aus den Bindungen mit dem Antikörper verdrängt werden könnte (SCHNEIDER

---

<sup>42</sup> Dieser Signalbereich bezeichnet die Differenz zwischen A-Wert und D-Wert.

2005). Somit braucht es bei hoher Tracer-Verdünnung länger für die Verdrängung der gleichen Menge an E2 als bei niedriger Tracer-Verdünnung. Dies erklärt nicht nur den mit längerer Inkubationszeit steigenden A-Wert, sondern auch die zunehmende Unempfindlichkeit des Tests (steigender C-Wert).

Ähnlich dem Parameter A sank C in beiden Experimenten mit höher werdender Tracer-Verdünnung. Jedoch im Unterschied zum A-Wert, wurde das Affinitätslimit, d.h. die Tracer-Konzentration an dem trotz höherer Verdünnungen keine weitere Absenkung des C-Wertes mehr möglich war (siehe Kapitel 2.3.4), erreicht. Auf der Datengrundlagen von Experiment I und II kann davon ausgegangen werden, dass das Affinitätslimit für den Tracer (bei einer Antikörperverdünnung von 1:10 000) im Bereich zwischen einer 1:70 000fachen und einer 1:100 000fachen Verdünnung zu finden ist. Der Einsatz von höheren Tracer-Verdünnungen verbesserte nicht die Sensitivität, sondern verkleinerten nur den Signalbereich. Auf Grund dieser Ergebnisse lagen die verwendeten Tracer-Verdünnungen im Bereich zwischen 1:70 000 und 1:100 000<sup>43</sup>.

Sowohl die Darstellung der signifikanten Effekte als auch die entsprechenden Iso-Linien (Abbildung 5.18) weisen auf den Zusammenhang zwischen Inkubationszeit und Parameter C hin: je kürzer die Inkubationszeit war desto kleiner wurde der C-Wert. Bei geringer Tracer-Verdünnung war ebenso wie beim A-Wert der Einfluss der Inkubationszeit relevanter als bei hoher Tracer-Verdünnung. Ursache dafür kann die bereits genannte Verdrängung von E2 aus dem Standard durch den Tracer sein. Die in diesem Versuch festgestellte Linearität des Effekts der Inkubationszeit, könnte auf eine konstante Geschwindigkeit dieses Verdrängungsprozesses hinweisen. Dieser Assay findet unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen<sup>44</sup> statt. Daher wurde durch Verkürzen der Inkubationszeit der Tracer, im Vergleich zum Analyten, in der Konkurrenzreaktion um Antikörperbindungsplätze kinetisch benachteiligt, um somit eine Sensitivitätssteigerung zu erzielen (SCHNEIDER 2005). Je höher die Tracer-Konzentration ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass das bereits am Antikörper gebundene E2 verdrängt wird und umso kürzer muss die Inkubationszeit sein, damit der C-Wert nicht ansteigt. Diese Annahme wurden von den hier vorgestellten Ergebnissen bestätigt. Entscheidend ist somit die Affinität des Antikörpers zu E2 aus dem Standard und seiner Affinität zum Tracer. Je höher die Affinität zum E2, umso höher kann bei gleichbleibendem C-Wert die Tracer-Verdünnung sein. Die anhand der zweidimensionalen Abbildungen vermuteten Wechselwirkungen zwischen Tracer-Verdünnung und Inkubationszeit wurden von dem Regressionsmodell aus dem Programm OptiVal® bestätigt. Der mit zunehmender Tracer-

---

<sup>43</sup> Diese Optimierung wurde nur für Tracer 2 durchgeführt und ermöglicht keine Aussagen zum Affinitätslimit des Antikörpers bei Verwendung von Tracer 1.

<sup>44</sup> Nicht-Gleichgewichtsbedingungen bedeuten, dass die Inkubationszeiten in diesem Assay so kurz sind, dass das Reaktionsgleichgewicht nicht erreicht wird.



Verdünnung geringer werdende Einfluss des Faktors Tracer-Inkubationszeit war im Bereich des Affinitätslimits nicht mehr erkennbar. Ursache dafür kann die auf Grund der geringen Tracer-Konzentration im Bereich des Affinitätslimits nicht mehr durch die Inkubationszeit zu beeinflussende Konkurrenzsituation von Analyt und Tracer sein.

Die Optimierungsziele hoher A-Wert auf der einen Seite und kleiner C-Wert auf der anderen Seite sind, wie beschrieben, konträr zueinander und werden bei der Optimierung des Assays gegeneinander abgewogen. Dabei bedeutet die Quantifizierung der Faktoren mit Hilfe des Programms OptiVal® eine Erleichterung der Arbeit. Eine Erweiterung des Programms, welche eine Kalkulation der optimalen Faktorenkombination auch unter vorgegeben Bedingungen (z. B. Mindest-Inkubationszeiten wie beim ESTR-A-LISER) ermöglicht, würde die Optimierung deutlich vereinfachen. In dieser Arbeit wurde durch die Erhöhung der Anzahl an Messwiederholungen von zwei auf drei bestätigt, dass mit einer breiteren Datengrundlage die Qualität des Modells verbessert werden kann.

Die bei der Durchführung mit dem ESTR-A-LISER ausgewählte Faktorenkombination von einer Tracer-Verdünnung von 1:70 000 und einer Inkubationszeit von 32 min wurde auch durch das OptiVal®-Modell bestätigt. Dagegen hat sich für die manuelle Durchführung eine Tracer-Verdünnung, höher als im Modell vorgeschlagen, als praktikabel erwiesen

Die Optimierung des Assays konnte erfolgreich beendet und hierfür die Kenndaten bestimmt werden. In Reinstwasser lag für diesen ELISA ohne Anreicherung die Nachweisgrenze<sup>45</sup> für E2 mit  $11 \text{ ng L}^{-1}$  in einem Konzentrationsbereich entsprechend dem von SHAPPELL (2006) ( $9 \text{ ng L}^{-1}$ ) angegebenen Bereich und etwas höher als die von WICKS et al. (2004) ( $4,8 \text{ ng L}^{-1}$ ) und VALENTINI et al. (2002) ( $5 \text{ ng L}^{-1}$ )<sup>46</sup> angegeben Nachweisgrenzen. Der mit dem Präzisionsprofil bei 20 % akzeptierter Irrtumswahrscheinlichkeit ermittelte Messbereich lag zwischen  $9$  und  $80 \mu\text{g L}^{-1}$  E2. Beide Kenndaten weisen auf einen sensitiven ELISA hin, reichten jedoch für eine präzise Bestimmung der E2-Gehalte in den untersuchten Wasserproben nicht aus. Die unterschiedliche Matrixzusammensetzung der Proben erhöhte zusätzlich die Wahrscheinlichkeit für Resultate mit hoher Ergebnisunsicherheit (Kapitel 6.3), so dass eine Anreicherung und Aufreinigung der Proben mittels SPE-Methode im Rahmen der Feldstudie (Kapitel 6.5) durchgeführt wurde. Auf Grund dieser Anreicherung war ein Methanolgehalt von 5 % in den Proben während der Messung mit dem ELISA unvermeidbar. Untersuchungen zum Einfluss von Lösungsmitteln (vgl. Kapitel 5.4) haben gezeigt, dass der A-Wert bereits bei 5 % Methanol verringert wurde und der C-Wert anstieg. Daher wurde der Assay für diese

---

<sup>45</sup> Nachweisgrenze ermittelt nach DIN 32654.

<sup>46</sup> berechnet mit dem Mittelwert der Blindwerte abzüglich der zweifachen Standardabweichung

Arbeitsbedingungen neu optimiert. Auch in anderen Untersuchungen werden diese Zusammenhänge bestätigt (DENG et al. 2003; SCHNEIDER 2005). Der reduzierte A-Wert ist möglicherweise durch eine Schädigung der an den Tracer gebundenen POD durch Methanol zu erklären. Als Konsequenz daraus wurde die Tracer-Verdünnung reduziert, damit ein ausreichend großer Signalbereich vorhanden war. Der Assay mit 5 % Methanol konnte eine Nachweisgrenze von  $8 \text{ ng L}^{-1}$  erreichen und hatte einen Messbereich, ermittelt mit dem Präzisionsprofil, zwischen  $7 \text{ ng L}^{-1}$  und  $11 \mu\text{g L}^{-1}$ . Für die mit der SPE-Methode um den Faktor 50 angereicherten Proben reichte diese Nachweisgrenze aus, um E2-Konzentrationen bis  $0,15 \text{ ng L}^{-1}$  nachzuweisen. Somit eignet sich der in dieser Studie entwickelte E2-ELISA für den Einsatz in der Umweltanalytik.

Nachdem bisher die verschiedenen Kennwerte für den Assay diskutiert wurden, soll nachfolgend das Für und Wider dieser verschiedenen Methoden noch einmal gegenübergestellt werden.

Der Parameter C gibt die E2-Konzentration am Testmittelpunkt an und veranschaulicht damit in welchem Konzentrationsbereich sich der Bereich höchster Messgenauigkeit befindet. Er gibt jedoch keine Auskunft darüber, wie groß dieser Bereich ist und eignet sich somit nicht für die Festlegung von Nachweisgrenzen. Dennoch eignet sich Parameter C als einfacher Vergleichspunkt für verschiedene Kalibrationskurven. Je kleiner die E2-Konzentration am Testmittelpunkt ist, umso sensitiver ist der Assay. Daher wurde Parameter C hier insbesondere bei der Optimierung des Assays sowie bei der Bestimmung der Einflüsse von Matrix und Konservierungsmethoden eingesetzt.

Die Nachweisgrenze, definiert als E2-Konzentration, die über das dreifache Signal/Rausch-Verhältnis ermittelt wurde (siehe Kapitel 2.3.6.2), hat den Vorteil, dass sie einfach definiert und schnell zu berechnen ist. Nachteilig ist, dass sie nur auf der Standardabweichung des Blindwertes basiert und Matrixeinflüsse der Proben sowie konzentrationsabhängige Streuungen der Messwerte nicht berücksichtigt werden. Daher wurde zusätzlich das Präzisionsprofil (Kapitel 2.3.6.2 und 4.2.3) ermittelt. In ihm werden die konzentrationsabhängigen Unterschiede der Standardabweichungen und die Steigung der Kalibrationskurve mit einbezogen. Von Vorteil ist, dass der Messbereich anhand einer Irrtumswahrscheinlichkeit festgelegt werden kann. Welche Irrtumswahrscheinlichkeit dafür herangezogen wird, kann von Fall zu Fall abhängig von der geforderten Genauigkeit entschieden werden. Das Präzisionsprofil gibt Auskunft darüber, in welchem Konzentrationsbereich mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Ergebnis mit der geforderten Präzision bzw. Irrtumswahrscheinlichkeit gemessen werden kann.

## 6.2 Automatisierung des E2-ELISA mit dem ESTR-A-LISER

Ziel der Automatisierung war die Konzeption eines Gerätes, welches im Vergleich zu den im klinischen Bereich eingesetzten, auf Hochleistungsdurchsatz ausgerichteten Automaten, eine kostengünstigere Alternative für die Umweltanalytik darstellt. Der ESTR-A-LISER ist auf den umweltanalytischen Bereich ausgerichtet, in dem ca. 20 Proben pro Tag anfallen und wo mit wenig Kapital- und Personalaufwand zuverlässige Untersuchungen mit geringer Nachweisgrenze durchgeführt werden sollen. Mögliche Anwender der automatisierten E2-Messung sind Klärwerke und Wasserversorger. Unter diesen Voraussetzungen wurde die technische Ausstattung ausgewählt und optimiert.

In diesem Kapitel wird diskutiert, welche Aspekte umgesetzt werden konnten und welche die kritischen Punkte bzw. Schwierigkeiten der hier durchgeführten Automatisierung waren. Zunächst wird dabei auf die technischen Aspekte eingegangen, später auf die entscheidenden Punkte der Auswertung.

Eine wichtige Anforderung an den Automaten, reproduzierbare Umgebungsbedingungen während der Messung zu schaffen, konnte mit Hilfe der Einhausung des Gerätes und des über Messfühler kontrollierten Kühlsystems erfüllt werden. Da eine Beheizung des Gerätes nicht möglich ist, kann das Kühlsystem nur einen Temperaturanstieg im Gerät vermeiden bzw. eine Verringerung der Temperatur herbeiführen. Durch das Kühlsystem können Temperaturen bis zu 5°C unterhalb der Raumtemperatur konstant gewährleistet werden, so dass eine Anpassung an die räumlichen Gegebenheiten möglich ist. Der als Systemflüssigkeit verwendete Waschpuffer kann wegen des großen Volumens nicht im System temperiert werden. Die Anwendung einer sogenannten „Schlauchwendel“, welche die Systemflüssigkeit während des Arbeitsablaufs im Gerät temperieren sollte, zeigte sich als technisch unbrauchbar. Der Waschpuffer kann jedoch vom Anwender vor Messbeginn temperiert und in einem isolierten Gefäß bereit gestellt werden, um eine gleichmäßige Temperierung zu gewährleisten. Die anderen Lösungen wurden in kleinen Mengen benötigt und im Gerät temperiert, so dass von konstanten Bedingungen ausgegangen werden konnte.

Generell ist das Schütteln der MTP während der Inkubationszeiten für eine kontinuierliche Durchmischung der Lösungen in den Kavitäten relevant, damit in kurzer Zeit möglichst viel Tracer und Analyt an den Antikörper gebunden werden können. In dieser Studie machte die Dauer des Pipettiervorgangs ein regelmäßiges Schütteln zwischen dem Pipettieren einzelner Kavitäten notwendig. Daher wurde nach jeder vierten Kavität ein kurzer Schüttel-Zwischenschritt eingeführt. Für den Assay war das Ergebnis damit akzeptabel, aber das Photometer war für die starke mechanische Belastung durch das Schütteln nicht ausgelegt. Durch das häufige Schütteln wurde die Halterung der Schublade beschädigt, so dass eine genaue Positionierung der MTP nicht mehr garantiert werden konnte und

Fehlpiptierungen auftraten, die einen Austausch der Schublade des Photometers erforderlich machten. Auf Grund dieser Erfahrungen ist es sinnvoll bei einer zukünftigen Konzeptionierung eines ELISA-Automaten einen gesonderten Schüttler einzubauen, auf dem sich die MTP während des Messablaufs befindet und kontinuierlich geschüttelt werden kann. Das bedeutet jedoch, dass für die photometrische Messung die MTP entweder manuell in ein Photometer gestellt oder ein Greifarm implementiert werden muss, der dies automatisch erledigt. Letzteres ist technisch machbar, bedeutet aber einen höheren Kostenaufwand.

Dagegen ließ sich die exakte Taktung der Pipettierschritte erfolgreich implementieren. Diese sorgte dafür, dass alle Inkubationszeiten während des Assays in allen Kavitäten identisch waren. Die Taktung wurde auf ein Intervall von 20 Sekunden eingestellt, so dass während dieses Intervalls neben der Pipettierung auch die Reinigung der Nadel und das Schütteln der MTP erfolgen konnte. Zu jedem einzelnen Arbeitsschritt wurde der Zeitpunkt protokolliert, damit die Taktung durch den Anwender überprüft werden kann.

Größere Schwierigkeiten bereitete die verwendete Doppelnadel, mit der sowohl pipettiert, als auch die Kavitäten geleert und gereinigt wurden. Es zeigte sich, dass unregelmäßig Tropfen an der Außenseite der Nadel auftraten, die zu Verschleppungen führten. Diese Tropfen konnten einzig durch Abreiben der Nadel mit Methanol vor Messbeginn reduziert werden. Auch die Verwendung einer neuen Nadel zeigte keine zufriedenstellende Behebung dieses Phänomens. Eine Konsequenz daraus war in dieser Studie die optische Kontrolle, ob Tropfen während des Assays auftraten und gegebenenfalls die erneute Reinigung der Nadel mit Methanol. Dies ist jedoch für Routinemessungen nicht praktikabel. Ein weiterer Schritt, in Übereinstimmung mit der Auswertung, war die reduzierte Messung von Standards höherer E2-Konzentrationen. So konnte das Ausmaß an Kontaminationen ausreichend gemindert werden. Die Ursache dieses Problems konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt und behoben werden.

Das Ziel der Automatisierung war eine zuverlässige und niedrige Nachweisgrenze, die trotz möglicher Matrixeffekte in Umweltproben eine direkte Messung der E2-Konzentrationen ermöglicht. Wichtige Voraussetzungen für die Messung von Proben im niedrigen Konzentrationsbereich (hier unter  $10 \text{ ng L}^{-1}$ ) sind hohe Präzision und Genauigkeit. Mit Hilfe der Automatisierung wurden alle Kavitäten identisch behandelt und Umgebungsbedingungen räumlich und zeitlich konstant gehalten. So konnten Streuungen der Signalwerte auf einer MTP und zwischen verschiedenen MTPs stark reduziert und damit Präzision und Genauigkeit erhöht werden.

Die Nachweisgrenze wurde für jede Probe anhand der ESTR-A-LISER-Auswertungssoftware, entwickelt von Dr. Steffen Uhlig, der Firma quo data, auf Basis des

neu entwickelten Kalibriermoduls, berechnet. Die Bestimmung der Nachweisgrenze und der erweiterten Messunsicherheit bei 95 % Nachweiswahrscheinlichkeit (95 % Konfidenzintervall) basierten auf dem Maximum-Likelihood-Verfahren und der Bootstrap-Methode. Systematische Trends (räumlich und zeitlich) wurden korrigiert, so dass die Genauigkeit der Messergebnisse erhöht wurde. Dazu war es notwendig, Platteneffekte und Trends zu erkennen und diese zum einen durch eine Korrekturfunktion zu berichtigen und zum anderen durch randomisiertes Arbeiten zufällig zu verteilen. So wurden systematische Fehler in zufällige Fehler umgewandelt, die sich bei einer ausreichend großen Anzahl an Messwiederholungen ausgleichen können. Das randomisierte Arbeiten wurde vom ESTR-A-LISER erfolgreich umgesetzt. Indem die Bearbeitungsreihenfolge der Kavitäten bei der Auswertung angegeben wurde, konnte eine Überprüfung des Messablaufs auf Platteneffekte und Trends durchgeführt werden, die zu den angewendeten Korrekturfunktionen führte und die Genauigkeit der Messergebnisse deutlich verbesserte. Bei der Bestimmung der probenspezifischen Nachweisgrenze wurde der jeweilige Matrixeinfluss berücksichtigt, so dass die Nachweisgrenze an die Proben angepasst werden konnte. Durch vermehrte Messwiederholungen wurde die Genauigkeit des Ergebnisses zusätzlich verbessert. Für den Anwender bietet dieses Verfahren eine größere Sicherheit bei der Bewertung seiner Ergebnisse als die Bestimmung der Nachweisgrenzen anhand des dreifachen Signal/Rausch-Verhältnisses, welches auf der Standardabweichung des Blindwertes beruht. Ein Auswertungsmodell, bei dem Matrixeffekte berücksichtigt werden, ist besonders im Bereich der Umweltanalytik äußerst vielversprechend. Zukünftig könnte mit Hilfe von Kalibrationen in verschiedene Matrices eine ausreichende Datengrundlage geschaffen werden, so dass durch Korrekturfunktionen für die entsprechende Matrix die Genauigkeit der Ergebnisse weiter verbessert würde (siehe Kapitel 6.3).

Durch die Angabe des Konfidenzintervalls wird gleichzeitig auch ein Qualitätskriterium für die Auswertung mit angegeben. Für den Anwender ist die Aussage, in welchem Konzentrationsbereich sich der Messwert mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit befindet, umfassender als die bloße Angabe eines Messwertes.

Da die oben genannten technischen Schwierigkeiten viel Zeit in Anspruch nahmen, verzögerte sich die Optimierung des ESTR-A-LISER und eine ausgiebige Validierung des automatisierten ELISA konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Erschwerend kam die unzureichende Qualität der Referenzanalytik hinzu. Dennoch konnte eine Feldstudie durchgeführt werden, bei welcher der ESTR-A-LISER erfolgreich auf seine Eignung zur direkten Messung von E2 in Oberflächengewässern und Kläranlagenabläufen hin getestet wurde. Die Ergebnisse der mit dem ESTR-A-LISER gemessenen Proben

(Kapitel 6.5) zeigten Nachweisgrenzen für Oberflächengewässer zwischen 0,6 und 1,7 ng L<sup>-1</sup> und für Kläranlagenabläufe zwischen 0,3 und 1,6 ng L<sup>-1</sup>. Diese niedrigen Nachweisgrenzen verdeutlichen, dass der ELISA in Kombination mit Automatisierung und einer Auswertungsmethode, die in der Lage war, Trends der Methode zu korrigieren, ausreichend empfindlich für die direkte Messung von E2 in Oberflächenwasser und Kläranlagenabläufen war. Die in Kapitel 6.5 diskutierten Ergebnisse der Messungen mit dem ESTR-A-LISER im Vergleich zu den manuellen Messungen und den Daten aus der Literatur, lassen auf eine gute Qualität der Messergebnisse schließen.

Die Feldstudie zeigte, dass die Automatisierung dieses ELISA mit dem ESTR-A-LISER erfolgreich war. Durch die Automatisierung konnte bei zeit- und räumlich konstanten Umgebungsbedingungen randomisiert gearbeitet werden. Durch diesen Vorteil kann, bei richtiger Bedienung des Gerätes, der Einfluss menschlicher Fehler auf den Assay minimiert werden. Somit sind in Kombination mit der optimierten Auswertung beste Voraussetzungen für hohe Präzision und Genauigkeit der Messergebnisse auch im unteren ng L<sup>-1</sup> Bereich gegeben.

### 6.3 Matrixeffekt

„Matrixeffekt“ ist ein Begriff für die Auswirkungen vielfältiger Substanzen, die sich neben dem Analyten in den zu untersuchenden Proben befinden. Matrixeffekte können sowohl den messbaren Anteil des Analyten in der Probe als auch den ELISA selber beeinflussen. Für die richtige Interpretation der Ergebnisse ist es notwendig, zu wissen, wie sich die vorhandene Matrix auswirkt.

Das erste Experiment dazu war darauf ausgelegt, zu untersuchen, ob durch Verdünnung der Proben (Kläranlagenzu- und -ablauf) die Matrixeffekte ausreichend eliminiert werden konnten. Die Wiederfindungsraten der dotierten Kläranlagenablaufprobe (0,1-2,5 µg L<sup>-1</sup>) waren bei einer Verdünnung von 1:4 bzw. 1:10 hoch. Die Kläranlagenzulaufprobe mit einem deutlich größeren Matrixanteil zeigte ebenfalls bei Verdünnungen bis zu 1:10 hohe Wiederfindungsraten. Das Verdünnen von Proben zur Reduzierung von Matrixeffekten ist eine einfache und häufig angewendete Herangehensweise, die jedoch nur funktioniert, wenn die Analyt-Konzentration in der Probe ausreichend hoch ist (DENG et al. 2003; RAMON-AZCON et al. 2006). Da die in der Umwelt vorkommenden E2-Konzentrationen meist unter 0,01 µg L<sup>-1</sup> liegen, führen Verdünnungen von undotierten Proben schnell zu Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze. Die Aufdotierung verdünnter Proben, damit der Analytgehalt sicher oberhalb der Nachweisgrenze liegt, birgt weitere Risiken für Fehler und stellt daher auch keine zufriedenstellende Alternative dar. Daher ist das

Verdünnen von Proben in dieser Arbeit keine adäquate Methode, Matrixeffekte zu eliminieren.

In einem weiteren Versuch wurde mit Hilfe von einer kommerziell erhältlichen Huminsäure als Beispielsubstanz zur Simulation von Matrixeffekten untersucht, wie sich unterschiedliche Konzentrationen von Huminsäuren auf die Bestimmung verschiedener E2-Konzentrationen auswirken. Diese wurde bereits in anderen Studien für ähnliche Zwecke verwendet, so dass Vergleichsdaten vorhanden sind (PFORTNER et al. 1998; STEINBERG et al. 2000; DENG et al. 2003; SCHNEIDER 2005). In dieser Studie wurde der Einfluss verschiedener Huminsäurekonzentrationen auf die Kalibrationskurve untersucht, um die Interpretation von Messergebnissen zu erleichtern und eine Datengrundlage zur Einschätzung von Matrixeffekten zu schaffen. Es sollte geklärt werden, inwieweit die Auswirkungen verschiedener Huminsäurekonzentrationen abhängig von der E2-Konzentration waren. Dabei zeigte sich, dass mit steigenden Huminsäuregehalten der Signalbereich der Kalibrationskurven kleiner wurde und sich der Testmittelpunkt in den Bereich höherer E2-Konzentrationen verschob. Die bei gleichen E2-Konzentrationen unter dem Einfluss der Huminsäuregehalte geringere Signalstärke führt bei einer Kalibration in Reinstwasser zu Überbestimmungen<sup>47</sup>. In Übereinstimmung mit der Korrelations- und Regressionsanalyse zeigten die Ergebnisse aller Versuche, dass die OD-Werte in der Regel (bei E2-Konzentrationen bis  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) mit zunehmender Huminsäurekonzentration geringer wurden und somit eine Überbestimmung der E2-Konzentration in Proben mit Huminsäureanteilen wahrscheinlich ist.

Ursache für die kleineren OD-Werte auf Grund von Huminsäure oder anderen Matrixbestandteilen kann die Blockierung von Antikörperbindungsstellen sein. Es wird angenommen, dass diese Blockierung durch Huminsäure erfolgen kann, die sich an die Wand der MTP oder an den Antikörper mit Hilfe von Wasserstoffbrücken, hydrophoben- oder ionischen Wechselwirkungen anlagern (DENG et al. 2003). Andere Untersuchungen zur Sorption von E2 an gelöstem organischem Material haben dagegen ergeben, dass hydrophobe Wechselwirkungen nicht der dominante Sorptionsmechanismus sind, sondern die phenolischen Gruppen des E2 und der organischen Substanz für die Sorption entscheidend sind (YAMAMOTO et al. 2003). Wird an Huminsäure sorbiertes E2 von einem Antikörper gebunden, könnte die Huminsäure auf Grund ihrer Größe die benachbarten Antikörperbindungsstellen blockieren. In jedem Fall kommt es zu einer verringerten Verfügbarkeit der Antikörperbindungsstellen, so dass weniger Tracer gebunden werden kann und das Signal schwächer wird. Diese Annahme wird in dieser Studie ebenfalls durch

---

<sup>47</sup> Auf Grund des Verlaufs der Kalibrationskurve (höchste OD-Werte bei kleinster Konzentration), treten Überbestimmungen durch die Verringerung der Signalstärke auf.

den mit zunehmender Huminsäurekonzentration kleiner werdenden C-Wert unterstützt. Im Kapitel 2.3.3 wurde gezeigt, dass eine Reduzierung der Antikörperbindungsstellen zu einer Reduzierung des C-Wertes führt.

Eine andere Erklärung für die geringere OD ist die Beeinträchtigung der Aktivität der an den Tracer gebundenen POD durch Huminsäure, so dass nach der Substratzugabe ein geringeres Signal entsteht.

Die große Spannweite der gemessenen E2-Konzentration bei der Dotierung von  $1 \text{ ng L}^{-1}$  sind durch den dort flach verlaufenden Bereich der Kalibrationskurven zu erklären. Dies führt dazu, dass kleinste Änderungen des Signals zu großen Änderungen in der Konzentration führen und somit die gemessenen E2-Konzentrationen stärker streuen. Im Bereich der größten Steigung der Kalibrationskurven (bei allen Huminsäurekonzentrationen) zwischen  $10$  und  $1000 \text{ ng L}^{-1}$  wurde dementsprechend die Streuung der gemessenen E2-Konzentrationen kleiner.

Unterbestimmungen<sup>48</sup> traten bei niedrigen E2-Konzentrationen auf, wenn die Signalstärke z.B. durch Platten- oder Matrixeffekte höher war als die Signalstärke der entsprechende E2-Konzentration in Reinstwasser. Im Vergleich zu höheren E2-Konzentrationen macht es sich bei niedrigen Konzentrationen eher bemerkbar, wenn E2 an Huminsäure oder anderen Matrixkomponenten gebunden wird, weil sich die Konkurrenzsituation um die Antikörperbindungsstellen stärker zu Gunsten des Tracers verschiebt. Unter diesen Voraussetzungen kann sich mehr Tracer an die Antikörper binden und damit das optische Signal verstärken.

Die Ergebnisse zeigen, dass gerade im umweltrelevanten Bereich geringer E2-Konzentrationen die Beeinträchtigungen durch Huminsäure in der Probe beträchtlich sein können. Beispielsweise waren bei  $10 \text{ ng L}^{-1}$  E2 und einem durchaus realistischen Huminsäuregehalt von bis zu  $10 \text{ mg L}^{-1}$  E2-Konzentrationen mehr als 3-fach überbestimmt. Auf Grund starker Streuungen bei niedrigeren E2-Konzentrationen können dort je nach Huminsäuregehalt fehlerhafte Bestimmungen zwischen 50 % Unterbestimmung und 600 % Überbestimmung vorkommen. Die Genauigkeit der Messwerte nimmt sowohl mit zunehmender Huminsäurekonzentration als auch zu den beiden asymptotisch verlaufenden Enden der Kalibrationskurve hin ab. Ähnlich wie in den Arbeiten von SCHNEIDER (2005) und DENG et al. (2003) zeigte sich, dass eine Kombination verschiedener Effekte vorlag, die zudem eine Abhängigkeit von der Analytkonzentration aufwies.

Aus den Ergebnissen dieser und anderer Arbeiten ergeben sich verschiedene Möglichkeiten, Matrixeffekte zu quantifizieren und bei der Berechnung des Analytgehaltes

---

<sup>48</sup> Auf Grund des Verlaufs der Kalibrationskurve (höchste OD-Werte bei kleinster Konzentration), treten Unterbestimmungen durch die Erhöhung der Signalstärke auf.



in den Proben zu berücksichtigen. Einige werden im folgenden Abschnitt genannt. Welcher Umgang mit Matrix jeweils adäquat ist, hängt von Faktoren ab wie Art der Matrix, Anspruch an die Genauigkeit des Ergebnisses, Laborausstattung sowie Zeit- und Kostenspielraum.

### **I. Charakterisierung von Proben und ELISA einschließlich Matrixkalibration**

Grundsätzlich ist es sinnvoll, die Proben vor der Messung von E2 möglichst ausführlich zu charakterisieren. Wichtige Parameter sind dabei neben dem pH-Wert und der Leitfähigkeit vor allem der TOC- oder DOC-Gehalt, mit deren Hilfe die Matrixeffekte eingeschätzt werden können. Dies ist jedoch in der Praxis bei Routineuntersuchungen meist nicht praktikabel, so dass auf Erfahrungswerte zurückgegriffen werden muss. Ebenso sollte auch der Assay auf seine Empfindlichkeit gegenüber möglichst verschiedenen Matrixkomponenten getestet sein. In dieser Arbeit wurde das im Rahmen der Untersuchungen zu Auswirkungen von Lösungsmitteln und Huminsäure getan. Da auch Fulvinsäure ein großer Bestandteil der Huminstoffe sind, wäre es zusätzlich sinnvoll, analog zu den Untersuchungen über die Auswirkungen von Huminsäure auch deren Effekt auf den ELISA zu untersuchen. Ebenfalls zweckmäßig, aber zeit- und kostenaufwändig, wäre die Extraktion von organischer Substanz aus möglichst unbelasteten Gewässertypen unterschiedlichster Art, um mit deren Hilfe Matrixkalibrationen durchzuführen. Für die Messung von E2 mit Hilfe des hier vorgestellten ELISA z.B. in Meerwasser, müsste der Einfluss von typischen Salzgehalten untersucht werden.

Sind bereits Kenntnisse über die in den Proben vorkommenden Matrixeffekte vorhanden, könnte eine Matrixkalibration beruhend auf wenigen, nahe dem erwarteten Konzentrationsbereich des Analyten liegenden Dotierungen ausreichen. Das wäre besonders zweckdienlich bei einer hohen Anzahl verschiedener Proben, die möglichst schnell gemessen werden sollen.

In den für die Matrixkalibration in den Proben angesetzten Standards können bei unbekanntem Analytgehalt der Probe, die Effekte auf den messbaren Anteil des Analyten nicht mehr von den Effekten auf das Messverfahren unterschieden werden. E2 in den Standards könnte, wie in Kapitel 6.4 beschrieben, Abbau- und Sorptionsprozessen unterliegen und zu Verfälschungen der Messergebnisse führen. Dieses Risiko lässt sich jedoch durch frisches Ansetzen der Standards minimieren. Solange aber so wenig über Effekte unterschiedlicher Probenmatrices bekannt ist und keine Referenzmatrix für viele verschiedene Probenarten vorliegt, ist die Untersuchung der Matrixeffekte notwendig. Hier bietet die Matrixkalibration zumindest eine Möglichkeit, die Genauigkeit der Messergebnisse zu erhöhen.

## **II. Entwicklung eines mathematischen Matrix-Korrekturmodells**

Bei einer ausreichenden Datengrundlage bezüglich der Auswirkungen verschiedener Matrixzusammensetzungen und -konzentrationen auf den ELISA könnte ein mathematisches Modell zur Einbeziehung der Matrixeffekte bei der Berechnung der Proben erstellt werden. Die Proben müssten anhand von Parametern (z.B. DOC-Gehalt und Salzgehalt), die signifikante Effekte auf den Assay zeigen, charakterisiert werden. Für die Auswertung der Proben wäre dann nur die Auswahl der passenden Korrekturfunktion notwendig. Ansatzweise wurde das im Rahmen des ESTR-A-LISER-Projektes von der Firma quo data begonnen. Ein Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass die Daten zu den Matrixeffekten für jeden Assay nur einmal erhoben und validiert werden müssen und somit eine Möglichkeit besteht, Analytgehalte in Proben unterschiedlicher Matrixzusammensetzungen möglichst genau zu bestimmen. Einfacher, aber nur nach dem TOC-Gehalt ausgerichtet, ist das von TSCHMELAK et al. (2005) vorgestellte Verfahren, welches auf der Verwendung eines Korrekturfaktors beruht. Andere Matrixkomponenten und Wechselwirkungen werden dabei aber nicht berücksichtigt.

## **III. Entwicklung noch sensitiverer ELISA-Techniken**

Um Matrixeffekte möglichst einfach durch Verdünnen zu reduzieren, ist die Entwicklung noch sensitiverer ELISA-Techniken wie z.B. des CLEIA (SCHNEIDER 2005) notwendig. Ein weiterer Ansatz ist die in dieser Arbeit durchgeführte Automatisierung mit deren Hilfe die Nachweisgrenzen ausreichend gesenkt werden konnten, so dass die Proben ohne weitere Anreicherung auch nach Verdünnung gemessen werden konnten.

## **IV. Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Proben**

Mit einer Aufreinigung bei gleichzeitiger Aufkonzentrierung, wie sie in dieser Arbeit zur manuellen Messung durchgeführt wurden, können störende Matrixbestandteile entfernt werden. Diese und viele andere Arbeiten (HUANG und SEDLAK 2001; VALENTINI et al. 2002; SCHNEIDER 2005) haben gezeigt, dass damit den Anforderungen entsprechende Ergebnisse erzielt werden können. Als nachteilig erwies sich dabei der Zeit- und Kostenaufwand. Ebenso bedeuten zusätzliche Arbeitsschritte weitere potentielle Fehlerquellen.

Matrixeffekte spielen auch bei chromatographischen Verfahren eine große Rolle (HUANG und SEDLAK 2001). Da bei diesen Verfahren meist auf Grund zu hoher Nachweisgrenzen Aufkonzentrierungsschritte notwendig sind, werden Matrixeffekte jedoch oft gleichzeitig eliminiert oder zumindest reduziert.

Unabhängig davon, mit welcher Methode falsche Ergebnisse auf Grund von Matrixeffekten vermieden werden sollen, ist eine regelmäßige Validierung des Verfahrens, z.B. über Bestimmung von Wiederfindungsraten, zur Qualitätskontrolle überaus wichtig.

## 6.4 Konservierung von Proben

Bei einer großen Anzahl an Proben ist eine sofortige Aufbereitung aller Proben oft nicht möglich, bzw. erfordert einen hohen Personalaufwand. Daher sind Maßnahmen zur Konservierung von Proben relevant. Die Schwierigkeit dabei ist, den Assay in seiner Sensitivität nicht negativ zu beeinträchtigen, jedoch den Abbau oder die Adsorption von E2 zu verhindern. In dieser Studie fand daher die Untersuchung der Varianten Zusatz verschiedener Konzentrationen an Formaldehyd sowie Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  auf ihre Konservierungseignung hin in einer Oberflächenwasser- und einer Kläranlagenablaufprobe statt. Bei der anschließenden Bewertung wurden sowohl die Matrixeinflüsse der jeweiligen Proben als auch die Auswirkungen der Konservierungsmethoden berücksichtigt.

Die konservierende Wirkung bezüglich der E2-Konzentration in den Proben wurde durch die Wiederfindungsraten nach Lagerung, bezogen auf die E2-Gehalte in den frischen Proben, verdeutlicht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Wiederfindungsraten abhängig von der Konservierungsmethode unterschiedlich stark von der E2-Konzentration in der Probe und der Matrixzusammensetzung beeinflusst war.

Eine gekühlte Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$  ohne Zusatz von Formaldehyd reichte nicht aus, um mikrobiologische, chemische und physikalische Abbauprozesse ausreichend zu unterbinden. Die bei  $4^{\circ}\text{C}$  tendenziell höheren Wiederfindungsraten im Kläranlagenablauf als im Oberflächengewässer könnten unter anderem durch Substanzen mit biozider Wirkung, die den mikrobiellen Abbau von E2 reduzieren, verursacht worden sein. Wahrscheinlich haben sich vielfältige, die Wiederfindungsrate beeinflussende Effekte, z.B. Matrix und Temperatur, überlagert. Diese Effekte waren teilweise bei  $4^{\circ}\text{C}$  deutlich höher als bei anderen Varianten.

Nach 14 Tagen Lagerung ohne Zusatz von Formaldehyd (bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $-20^{\circ}\text{C}$ ) zeigte sich bei beiden Gewässertypen eine tendenziell von der E2-Ausgangskonzentration abhängige Konservierungswirkung. Ursache für die geringen Wiederfindungsraten bei niedrigen E2-Ausgangskonzentrationen können bereits kleinste Veränderungen durch Sorptions- oder Abbauprozesse sein, die sich bezogen auf die Ausgangskonzentration schneller bemerkbar machen als bei größeren Ausgangskonzentrationen. Konzentrationsabhängige Abbau- und Sorptionsprozesse wurden auch in anderen Untersuchungen beobachtet (FÜRHACKER et al. 1999; TERNES et al. 1999a). Durch das Absenken der Temperatur

wurden diese Prozesse verlangsamt, so dass ihre Wirkung erst nach 14 Tagen zu erkennen war.

Bei den mit Formaldehyd konservierten Proben war der Einfluss der E2-Ausgangskonzentration nicht erkennbar. Möglicherweise liegt das an einer Überlagerung dieses Effektes durch andere Faktoren oder daran, dass der konzentrationsabhängige Abbau von E2 mikrobieller Natur ist. Dieser kann durch das Formaldehyd gehemmt worden sein, so dass andere, weniger konzentrationsabhängige Prozesse überwogen. Die trotz allem verringerten Wiederfindungsraten sind durch langsamer verlaufende Abbau- und Sorptionsprozesse zu erklären, die nicht durch die Zugabe von Formaldehyd in der angewendeten Konzentration zu verhindern waren. Ein reduzierter mikrobieller Abbau könnte die im Oberflächenwasser höheren Wiederfindungsraten beim Einsatz von Formaldehyd im Vergleich zu der Lagerung bei 4°C ohne Formaldehydzusatz erklären. Im Kläranlagenablauf überwiegen wahrscheinlich andere matrixbedingte Effekte, welche die im Vergleich zum Oberflächenwasser schlechtere Konservierung mit Formaldehyd verursachen. Das kann möglicherweise an dem Vorkommen unterschiedlicher Mikroorganismenpopulationen liegen. Mikroorganismen in Kläranlagen sind möglicherweise besser als die Mikroorganismen in Oberflächengewässern an die Anwesenheit von potentiell giftigen Stoffen wie Formaldehyd angepasst und können auf den Abbau von E2 spezialisiert sein (LAYTON et al. 2000). Neben den unterschiedlichen Mikroorganismenpopulationen können Matrixkomponenten wie der Anteil und die Zusammensetzung der organischen Substanz entscheidend sein.

Nachdem bisher die möglichen Prozesse in den Proben während der Lagerung diskutiert wurden, werden in den folgenden Abschnitten die Konservierungsmethoden bewertet und gegeneinander abgewogen.

Die Lagerung bei 4°C zeigte sowohl bei der Oberflächenwasserprobe als auch im Kläranlagenablauf keine ausreichende Konservierungswirkung. Auf der Basis der hier vorliegenden Daten ist sowohl für Oberflächenwasserproben als auch für die Proben aus dem Kläranlagenablauf die Lagerung bei -20°C zu bevorzugen, vorausgesetzt eine sofortige Bearbeitung der Proben ist nicht möglich. Abbau- und Sorptionsprozesse können jedoch auch bei -20°C nicht ausgeschlossen werden.

In dieser Untersuchung zeigte sich, dass der Zusatz von Formaldehyd (im Vergleich zur Lagerung ohne Formaldehyd) nur bei Oberflächenwasser und einer Lagerung länger als sieben Tage Vorteile bezüglich der Konservierungswirkung aufwies. Sollte eine Lagerung länger als sieben Tage notwendig sein, ist der Zusatz von Formaldehyd trotz der entstehenden Nachteile eine mögliche Alternative, die besonders bei niedrigen E2-Konzentrationen bessere Wiederfindungsraten zeigte als die Lagerung bei -20°C.

Der entscheidende Vorteil der Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  ist die Vermeidung von Einflüssen des Formaldehyds auf den ELISA und somit die Vermeidung von Fehlerquellen und einer extra anzusetzenden Kalibrationskurve. Außerdem ist die Verwendung von Formaldehyd gesundheitsgefährdend, da es im Verdacht steht, krebserregend zu sein. Auch die dabei entstehenden Abfälle müssten gesondert entsorgt werden. Grundsätzlich gilt es, die Beeinträchtigung des ELISA und die gesundheitsgefährdende Wirkung gegen die möglichen Vorteile einer Konservierungswirkung durch Formaldehyd abzuwägen. Daher ist diese Methode nur dann zu empfehlen, wenn die Proben nicht frisch verarbeitet werden können und gleichzeitig nicht ausreichend Kapazität für eine Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  vorhanden ist.

## 6.5 Feldstudie

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln gezeigt, hat die Matrix sowohl einen Einfluss auf den messbaren Anteil des vorhandenen E2, als auch auf den ELISA (HUANG und SEDLAK 2001; TSCHMELAK et al. 2005; RAMON-AZCON et al. 2006). Um mögliche Matrixeinflüsse einschätzen zu können, wurde die Leitfähigkeit und der DOC-Gehalt aller Proben gemessen, wie im Kapitel 6.3 vorgeschlagen. In dieser Studie zeigten sich trotz der zum Teil deutlich unterschiedlichen Leitfähigkeiten der Proben nur schwache, nicht signifikante Korrelationen zwischen den gemessenen E2-Gehalten und den Leitfähigkeiten. Daher konnte auf der hier vorliegenden Datengrundlage kein Zusammenhang nachgewiesen werden. Ursache dafür kann die Überlagerung mehrerer Effekte sein, welche die Wirkung der Leitfähigkeit überdeckten.

Die Unterschiede der DOC-Gehalte sind zum Teil beträchtlich. Die hohen DOC-Werte in den Oberflächengewässern, insbesondere im Februar 2005, sind vermutlich durch Hochwasserereignisse zustande gekommen, in deren Folge ein hoher Anteil an organischer Substanz mitgeschwemmt wurde. Dafür spricht die auffällige Trübung dieser Proben, die bei der Probenahme registriert wurde. Die hohen DOC-Werte im Januar 2005 in den Kläranlagenabläufen von Beuel und Duisdorf können nur mit möglichen Messfehlern oder einer schlechten Homogenisierung der Probe erklärt werden.

Geht man von einem Anteil an Huminsäure am gesamten DOC zwischen 50 und 90 % aus (JANOS 2003), würde das für eine Probe mit einem DOC-Gehalt von  $10\text{ mg L}^{-1}$  bedeuten, dass  $5\text{-}9\text{ mg L}^{-1}$  an Huminsäure in der Probe vorhanden ist. Bringt man diese Werte in Zusammenhang mit den Ergebnissen aus Kapitel 5.3, kann bei der Messung von nicht aufgereinigten, unverdünnten Proben bereits bei einem niedrigen DOC-Gehalt,

insbesondere in Kombination mit geringen E2-Konzentrationen, von möglichen Über- oder Unterbestimmungen ausgegangen werden (siehe Kapitel 6.3).

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Wiederfindungsrate sowohl Matrixeffekte als auch Fehler der Messmethode weitestgehend korrigiert. Bei der Anreicherung der Proben können Überbestimmungen und damit Wiederfindungsraten  $> 100\%$  durch Volumenverluste im Zuge der Anreicherung entstehen. Diese sind beispielsweise durch Einengen und Lösen der Extrakte erklärbar (SCHNEIDER 2005). Idealerweise sollte für jede Probe eine Wiederfindungsrate bestimmt werden. Da dies zeit- und kostenaufwändig ist, wurden in dieser Feldstudie Wiederfindungsraten für die manuelle und die automatisierte Messung anhand der unterschiedlichen Probentypen Leitungswasser, Oberflächenwasser und Kläranlagenablauf, bestimmt.

Die Wiederfindungsraten nach Anreicherung mit der SPE-Methode (siehe Kapitel 4.8.6) des dotierten Leitungswassers lag mit  $94\%$  knapp unter  $100\%$ , während sie beim Oberflächenwasser und beim Kläranlagenablauf  $115\%$  bzw.  $112\%$  betragen. Im Vergleich dazu waren die gemessenen Wiederfindungsraten mit dem ESTR-A-LISER mit  $119\%$  im Oberflächenwasser und  $142\%$  im Kläranlagenablauf höher. Bei beiden Methoden lagen für die gemessenen Oberflächenwasser- und Kläranlagenablaufproben Überbestimmungen vor, die durch Matrixeffekte (Kapitel 6.3) erklärt werden können. Nach den Richtlinien der europäischen Kommission sollten die Ergebnisse der Wiederfindungsraten zwischen  $70$  und  $120\%$  liegen (EUROPEAN COMMISSION 2002). Somit lag lediglich die mit dem ESTR-A-LISER ermittelte Wiederfindungsrate im Kläranlagenablauf oberhalb dieser Grenze. Ursache für die zufriedenstellende Wiederfindungsrate nach der SPE-Methode kann der Aufreinigungseffekt sein, durch den ein Teil der Matrix aus den Proben entfernt wird. Die Wiederfindungsraten wurden gemäß den Richtlinien bei der Berechnung der E2-Konzentrationen in den Proben und für den Bereich der erweiterten Messunsicherheit berücksichtigt (EUROPEAN COMMISSION 2002).

Die Wiederfindungsrate im Fall der LC-MS/MS-Methode lag für Proben aus Oberflächenwasser bei  $54\%$  und für den Kläranlagenablauf bei  $50\%$  (mündliche Mitteilung Dirk Skutlarek, Referenzlabor, Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit, Universität Bonn). Diese geringen Wiederfindungsraten weisen auf wesentliche Schwierigkeiten beim Erzielen einer annähernd quantitativen Anreicherung der Wasserproben hin. Dies spiegelten auch die Ergebnisse der Feldstudie wieder, weshalb die E2-Konzentrationen bei allen Proben, abgesehen von denen der Teichkläranlage in Ohlenhard, unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Daher werden die Ergebnisse der Referenzanalytik nicht weiter diskutiert.

Die Ergebnisse bei manueller Durchführung (nach SPE) und des automatisierten ELISA stimmten sowohl bei den Oberflächengewässer- als auch den Kläranlagenablaufproben weitestgehend miteinander überein. Tendenziell lagen die Ergebnisse der manuellen Messung nach Anwendung der SPE-Methode etwas höher als die mit dem ESTR-A-LISER gemessenen Werte. Ursachen dafür könnten sein:

- Die Auswertungssoftware des ESTR-A-LISER, die möglicherweise durch Trendkorrekturen zu einer Unterbestimmung führen könnte.
- Matrixeffekte, die insbesondere bei geringen E2-Konzentrationen in Unterbestimmungen resultieren können (siehe Kapitel 6.3).
- Die angewendeten Wiederfindungsraten könnten entweder für die ESTR-A-LISER Messung zu hoch liegen, oder für die manuelle Messung nach SPE zu klein sein.
- Die tatsächlichen E2-Konzentrationen in den Messproben könnten auf Grund ihrer unterschiedlichen Behandlung (mit und ohne SPE) variieren.

Anhand der Daten dieser Studien kann keine dieser Fehlerquellen ausgeschlossen werden, da die Datenbasis dafür nicht umfassend genug ist. Jedoch sind die Unterschiede zwischen beiden Methoden so gering, dass die Aussagekraft der Messwerte nicht beeinträchtigt ist.

Die Ergebnisse beider hier angewendeter Messverfahren lagen in E2-Konzentrationsbereichen, die mit repräsentativen Daten aus der Literatur (siehe Tabelle 2.6 und Tabelle 2.7) übereinstimmen. In den Oberflächengewässern dieser Region wurden E2-Konzentrationen zwischen 1,1 und 9,2 ng L<sup>-1</sup> gefunden, die den Ergebnissen vergleichbarer Studien zu Oberflächengewässern entsprechen (TERNES et al. 1999a; KOLPIN et al. 2002; CARGOUET et al. 2004; PAWLOWSKI et al. 2004). Eine Bestätigung der Messmethoden dieser Arbeit ist die Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Untersuchung von PAWLOWSKI et al. (2004), bei welcher die E2-Konzentrationen im Rhein mit einem chromatographischen Verfahren (GC/MS-MS) gemessen wurden.

An allen drei Probenahmestellen entlang der Ahr konnte E2 nachgewiesen werden. Höher als zuerst erwartet waren die in der Ahrquelle, zwischen 1,6 und 3,0 ng L<sup>-1</sup>, gefundenen E2-Konzentrationen. Möglicherweise kann das dortige Vorkommen von E2 mit dem karstigen Ausgangsgestein erklärt werden, durch welches Stoffe wie E2 rasch ins Grundwasser und damit ins Quellwasser gelangen können. Eine weitere Ursache kann die horizontale Nähe von Grund- und Oberflächengewässer sein, durch die der Eintrag von E2 aus dem Oberflächenwasser ins Grundwasser erleichtert wird. Da sich die Ahrquelle in einem ländlich geprägtem Raum befindet, sind E2-Einträge in den Wasserkreislauf auf Grund landwirtschaftlicher Tierhaltung wahrscheinlich. Auch in anderen Studien wurden in Karstgebieten mit E2-Konzentrationen zwischen 6 und 80 ng L<sup>-1</sup> deutlich höhere

E2-Gehalte im Vergleich zu anderen Oberflächengewässern gemessen (PETERSON et al. 2000; WICKS et al. 2004). Die anderen Probenahmestellen der Ahr, in Dümpelfeld und Kripp, sowie der Agger bei Lohmar und des Rheins in Bonn sind durch kommunale Abwässer beeinträchtigt, so dass die gemessenen E2-Konzentrationen zwischen 0,2 und 9,2 ng L<sup>-1</sup> plausibel sind.

Zwischen den gemessenen E2-Konzentrationen in den Oberflächengewässern im Januar und Februar 2005 traten, wahrscheinlich witterungsbedingt, zum Teil deutliche Unterschiede auf. Ausnahmen sind hier die Proben der Ahrquelle und des Rheins. Witterungsbedingte Einflussfaktoren wie Temperatur und Niederschlagsereignisse beeinflussen die Ahrquelle nur indirekt, da sie aus dem Gestein entspringt und durch Bebauung geschützt ist. Sowohl die Größe des Rheins als auch die Größe seines Einzugsgebietes tragen dazu bei, dass sich Witterungseinflüsse weniger direkt bemerkbar machen als bei kleineren Flüssen wie der Ahr und der Agger. Die Ahr hat am Standort Dümpelfeld ebenso wie die Agger bei Lohmar höhere E2-Konzentrationen im Januar, wohingegen die Ahr am Standort Kripp im Februar die höheren E2-Konzentrationen aufweist. Erklärungen für diese Unterschiede können die verschiedenen Probenahmeterminale sein. Der Standort Kripp wurde jeweils eine Woche später beprobt als die anderen beiden Standorte, so dass sich Unterschiede möglicherweise durch andere Witterungsbedingungen erklären lassen.

Die mit Hilfe des manuellen ELISA und des ESTR-A-LISER bestimmten Messwerte der Kläranlagenablaufproben lagen mit Ausnahme der Teichkläranlage in Ohlenhard (6,5 - 51 ng L<sup>-1</sup>) alle im zu erwartenden E2-Konzentrationsbereich zwischen 0,6 und 12 ng L<sup>-1</sup>. Die Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Daten aus weltweit durchgeführten Untersuchungen (DESBROW et al. 1998; BARONTI et al. 2000; KUCH und BALLSCHMITER 2000; MATSUI et al. 2000; NASU et al. 2001; ANDERSEN et al. 2003; D'ASCENZO et al. 2003; CARGOUET et al. 2004). Die Teichkläranlage in Ohlenhard wies die größten Schwankungen zwischen den E2-Konzentrationen im Januar und Februar 2005 auf. Die dort hohen E2-Konzentrationen geben Anlass zur Vermutung, dass diese Teichkläranlage mit der geringsten Ausstattung an Klärstufen auch die niedrigste Eliminierungsrate aufweist. Auf Grund dieser geringen Ausstattung kann der jahreszeitliche Einfluss bei dieser Kläranlage besonders hoch sein. Die Probenahmeterminale lagen beide im Winter 2005, wobei die Außentemperaturen im Januar längere Zeit nahe dem Gefrierpunkt waren, so dass von einer geringeren mikrobiellen Aktivität ausgegangen werden kann. Da im Januar Eis und Schnee die Teichkläranlage in Ohlenhard zumindest teilweise bedeckte, kann auch von einer verminderten Sauerstoffzufuhr und verringertem Lichteinfall ausgegangen werden. Diese Bedingungen führen zu einer reduzierten mikrobiellen Aktivität (LAYTON et al. 2000).



Die stark verminderte Sonneneinstrahlung verhindert zusätzlich photolytische Abbauprozesse des E2 (STEINBERG et al. 2000; GRAY 2003). Somit können durch die Witterungsbedingungen zumindest teilweise die erhöhten E2-Konzentrationen erklärt werden. Zusätzlich können verstärkt Matrixeinflüsse eine tendenzielle Überbestimmung der Probe hervorgerufen haben (vgl. oben). Im Februar haben erhöhte Niederschläge zu einem erkennbar verstärkten lateralen Eintrag von organischer Substanz geführt, so dass eine stärkere Matrixbelastung in der Probe vorlag. Gleichzeitig verdünnte der größere Wassereintrag die vorhandene E2-Konzentration. Die Außentemperaturen waren im Vergleich zum Januar etwas erhöht und es lag kein Schnee mehr auf den Klärteichen, so dass von einer erhöhten mikrobiellen und photolytischen E2-Abbauraten ausgegangen werden kann.

Diese Witterungseinflüsse sind übertragbar auf die Eliminierungsraten der anderen Kläranlagen. Die auf Grund der geographischen Lage deutlich wärmeren Temperaturen an den Kläranlagen in Bonn (dazu gehören: Bad Godesberg, Beuel, Salierweg und Duisdorf), Dümpelfeld, Blankenheim und Altenrath verbesserten die Abbaubedingungen von E2 im Vergleich der Teichkläranlage in Ohlenhard. Auch die bessere Ausstattung, insbesondere der mechanisch-biologischen Systeme mit Nitrifizierungs- und Denitrifizierungsstufen (in Bonn, Dümpelfeld und Blankenheim), tragen zu einer besseren Eliminierungsleistung bei (ANDERSEN et al. 2003; JOSS et al. 2004; SERVOS et al. 2005). Eine Pflanzenkläranlage, wie in Altenrath, weist durch die Bedeckung mit abgestorbenen Pflanzenmaterial eine im Vergleich zur Außentemperatur erhöhte Temperatur auf, welche die mikrobielle Aktivität fördert. Auch das Pflanzenmaterial kann im Vergleich zur Teichkläranlage ohne Bepflanzung den Mikroorganismen eine bessere Nährstoffgrundlage bieten, so dass der biologische Abbau von E2 gefördert wird.

Der Einfluss der Kläranlagenausstattung wird anhand der Daten dieser Arbeit deutlich. Besonders unter extremeren Witterungsbedingungen bleiben die mechanisch-biologischen Kläranlagen und die Pflanzenkläranlage der Teichkläranlage bezüglich der E2-Eliminierung überlegen.

## 7 Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung eines Messverfahrens zum sensitiven Nachweis des Sexualhormons 17 $\beta$ -Östradiol (E2) in der aquatischen Umwelt. Die erfolgreiche Entwicklung und Optimierung dieses E2-ELISA ermöglicht bei manueller Durchführung Nachweisgrenzen im unteren ng L<sup>-1</sup>-Bereich, wobei nach Aufreinigung und Anreicherung (SPE-Methode) sogar Nachweisgrenzen im sub-ppt-Bereich möglich waren. Bei dem hier beschriebenen ELISA handelt es sich um einen schnell durchzuführenden und leicht zu handhabenden Immunoassay, der sich auch für die Automatisierung eignet.

Die Optimierung hat gezeigt, dass zum einen der Faktor Tracer-Verdünnung den größten Effekt auf den Signalbereich und die Sensitivität des Assays hat. Zum anderen wurde der mit zunehmender Tracer-Verdünnung geringer werdende Einfluss des Faktors Tracer-Inkubationszeit deutlich, welcher im Bereich des Affinitätslimits nicht mehr erkennbar war. Dieses Wissen über die zugrundeliegende Wechselwirkung kann zukünftige Optimierungen von ELISAs vereinfachen. Besonders hilfreich war in diesem Zusammenhang die Verwendung des Programms OptiVal®, welches die Auswertung der Optimierungsversuche erleichterte und es erlaubte, den Einfluss der untersuchten Faktoren zu visualisieren. Eine Erweiterung des Programms, mit welcher die bestmögliche Faktorenkombination unter vorgegebenen Bedingungen (z.B. Limitationen bezüglich Inkubationszeiten) berechnet werden könnte, würde die Optimierung von ELISAs zusätzlich vereinfachen.

Die Entwicklung einer automatisierten Immunoassay-Workstation, des sogenannten "ESTR-A-LISER", ermöglichte die automatisierte Durchführung des E2-ELISA. Damit konnte der ELISA, auch ohne Anreicherung und Aufreinigung ausreichend sensitiv ausgelegt werden und direkte Messungen von E2 in Oberflächengewässern und Kläranlagenabläufen wurden möglich. Voraussetzung dafür waren das randomisierte Arbeiten unter konstanten Bedingungen, insbesondere der Temperatur, und eine Trendkorrektur bezüglich der Anordnung von Standards und Proben auf der Mikrotiterplatte. Die durch die Streuung der Ergebnisse erfassten Matrixeffekte wurden weitestgehend bei der Berechnung der Kenndaten jeder einzelnen Probe berücksichtigt. Die Angabe der probenspezifischen Nachweisgrenze und des 95 % Konfidenzintervalls geben dem Anwender ein zuverlässiges Qualitätskriterium für jede Messung an die Hand. In dieser Arbeit stellte sich die Verwendung einer Doppelnadel für alle Pipettier- und Waschvorgänge als Schwachpunkt heraus. In diesem Punkt sind noch weitere Verbesserungen notwendig, bevor der ESTR-A-LISER in der Routine zum Einsatz kommen kann. Grundsätzlich ist mit diesem Automaten die Ausführung vielfältiger ELISAs möglich, so dass das Spektrum seiner Einsatzmöglichkeiten sehr weit ist. Mit Hilfe des

ESTR-A-LISER kann der Anwender die Vorteile des ELISA in Kombination mit den Vorteilen der Automatisierung zugunsten einer einfachen, für Routineuntersuchungen geeigneten Messmethode nutzen.

Schwierigkeiten in dieser Arbeit bereiteten Matrixeffekte, da sie sowohl einen Einfluss auf den ELISA, als auch auf den messbaren Anteil an E2 in der Probe haben. Es zeigte sich, dass die Qualität der Messergebnisse durch die von Huminsäure hervorgerufenen unterschiedlich starken Streuungen sowie Über- und Unterbestimmungen beeinflusst wurden, wobei diese Effekte stets konzentrationsabhängig zu betrachten sind und besonders deutlich bei niedrigen E2-Konzentrationen ins Gewicht fallen. Da diese Thematik insbesondere für die Spurenanalytik ein Problem darstellen kann, bedarf es weiterer Untersuchungen mit dem Ziel, eine breitere Datengrundlage über Matrixeffekte zu schaffen. Mit deren Hilfe könnten Korrekturfunktionen erstellt werden, welche die Präzision und Genauigkeit der Ergebnisse erhöhen und den Arbeits- und Kostenaufwand reduzieren. Bis dahin stellen Matrixkalibrationen und die Bestimmung von Wiederfindungsraten eine Alternative dar, um Präzision und Genauigkeit der Messergebnisse zu verbessern.

Die Konservierungsversuche zeigten, dass jede Art der Lagerung von Proben, wahrscheinlich auf Grund komplexer Matrixeffekte, einen vielfältigen Einfluss auf die messbare E2-Konzentration haben kann. Je länger die Proben gelagert wurden, umso geringer waren die Wiederfindungsraten, selbst bei einer Aufbewahrung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Grundsätzlich sollte daher die Dauer bis zur Messung oder Aufbereitung der Proben möglichst gering gehalten werden, bzw. nicht über 24 h hinaus gehen. Zur Beurteilung einer kurzfristigen Lagerung könnte in weiteren Versuchen getestet werden, ab welcher Lagerungsdauer erste signifikante Veränderungen des E2-Gehaltes auftreten. In den hier durchgeführten Versuchen zeigten sich dabei deutliche Unterschiede zwischen den Proben, so dass weitergehende Untersuchungen idealerweise an einem breiten Probenpektrum durchgeführt werden sollten, um falsche Schlussfolgerungen zu vermeiden.

Die Praxistauglichkeit der vorgestellten Verfahren für E2-Messungen in Oberflächenwässern und Kläranlagenabläufen wurde mit einer Feldstudie bestätigt. Die gemessenen E2-Konzentrationen für die Oberflächenwasserproben lagen zwischen 0,2 und  $9,2 \text{ ng L}^{-1}$ . Die E2-Konzentrationen in den Kläranlagenabläufen, abgesehen von den Proben einer Teichkläranlage ( $6,5 - 51 \text{ ng L}^{-1}$ ), lagen zwischen 0,6 und  $12 \text{ ng L}^{-1}$ . Ebenso wie diese Arbeit haben andere, weltweite Untersuchungen gezeigt, dass E2-Kontaminationen in Gewässern vorkommen. Bereits solch geringe E2-Konzentrationen können zu endokrinen Effekten führen, vor allem bei im Wasser lebenden Tieren, die einer kontinuierlichen Belastung ausgesetzt sind. Daher ist ein Monitoring-Netz zur Überwachung der E2-Gehalte in Gewässern wichtig, um ein mögliches Gefährdungspotential für Mensch und Umwelt aufzuzeigen. Damit könnten

E2-Eintragspfade in die Umwelt aufgeklärt und quantifiziert werden. Dies ist eine Voraussetzung, um dem Verursacherprinzip gerecht zu werden und zukünftige Grenzwerte überprüfen zu können.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass sich der hier vorgestellte ELISA zur Routineüberwachung von Gewässern eignet. E2 kann dabei auch als Indikator für die Verschmutzung durch kommunale Abwässer oder den Eintrag aus der Landwirtschaft betrachtet werden. Die im Vergleich zu chromatographischen Verfahren niedrigeren Kosten pro Probe machen diesen Test zusätzlich attraktiv. Von dem Einsatz des E2-ELISA in der Umweltüberwachung könnten auch Entwicklungsländer profitieren, die sich keine kostenintensiven Verfahren leisten können, jedoch häufig Probleme mit der Trinkwasserqualität und der Abwasserreinigung haben. Weitere zukünftige Einsatzbereiche des hier entwickelten ELISA ist die Messung der E2-Konzentrationen in tierischem Dünger, Klärschlamm und in Böden. Dazu müssten Aufreinigungsverfahren optimiert werden, die den Matrixeinfluss weitest gehend eliminieren. Die Ausweitung auf die Einsatzbereiche Boden, Klärschlamm und tierischer Dünger könnte das Umweltgefährdungspotenzial für Gewässer durch E2 frühzeitig erkennbar machen. Somit bestünde die Möglichkeit den Eintrag in die Umwelt umfassender zu überwachen sowie die Umweltgefährdung durch E2 zu quantifizieren und überprüfbar zu machen.

## 8 Literatur

- ABRAHAM G E (1969). Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 beta. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **29**(6): 866-870.
- ALCOCK R E, SWEETMAN A und JONES K C (1999). Assessment of organic contaminant fate in waste water treatment plants. I: Selected compounds and physicochemical properties. *Chemosphere* **38**(10): 2247-2262.
- ANDERSEN H, SIEGRIST H, HALLING-SORENSEN B und TERNES T A (2003). Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. *Environmental Science & Technology* **37**(18): 4021-4026.
- ANDERSSON A M und SKAKKEBAEK N E (1999). Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. *European Journal of Endocrinology* **140**: 477-485.
- ARRHENIUS S (1907). *Immunochemie*. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- ASKLUND C, JORGENSEN N, KOLD JENSEN T und SKAKKEBAEK N E (2004). Biology and epidemiology of testicular dysgenesis syndrome. *British Journal of Urology* **93**(3): 6-11.
- BACKHAUS K (1990). *Multivariate Analysemethoden*. Springer, Berlin.
- BARONTI C, CURINI R, D'ASCENZO G, DI CORCIA A, GENTILI A und SAMPERI R (2000). Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental Science & Technology* **34**(24): 5059-5066.
- BAY K, ASKLUND C, SKAKKEBAEK N E und ANDERSSON A M (2006). Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disrupters. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **20**(1): 77-90.
- BELFROID A C, VAN DER HORST A, VETHAAK A D, SCHAFER A J, RIJS G B, WEGENER J und COFINO W P (1999). Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Science of the Total Environment* **225**(1-2): 101-108.
- BERZOFKY J A und SCHECHTER A N (1981). The concepts of crossreactivity and specificity in immunology. *Molecular Immunology* **18**, 751-763. Great Britain, Pergamon Press, Ltd.
- BLOCKX P und MARTIN M (2001). Laboratory Quality Assurance. in: WILD D. (ed.) *The Immunoassay Handbook*. Nature Publishing Group, New York: 424-439.
- BOGI C, LEVY G, LUTZ I und KLOAS W (2002). Functional genomics and sexual differentiation in amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **133**(4): 559-570.
- BORG L, KRISTIANSEN J, CHRISTENSEN J M, JEPSEN K F und POULSEN L K (2002). Evaluation of accuracy and uncertainty of ELISA assays for the determination of interleukin-4, interleukin-5, interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **40**(5): 509-519.
- BROSIUS F (2002). *SPSS 11*. MITP-Verlag, Bonn.
- CAMPBELL N A und REECE J B (2006). *Biologie*. Pearson Studium, München.
- CARGOUET M, PERDIZ D, MOUATASSIM-SOUALI A, TAMISIER-KAROLAK S und LEVI Y (2004). Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of the Total Environment* **324**(1-3): 55-66.

- CASEY F X M, LARSEN G L, HAKK H und SIMUNEK J (2003). Fate and transport of 17 beta-estradiol in soil-water systems. *Environmental Science & Technology* **37**(11): 2400-2409.
- CASEY F X M, SIMUNEK J, LEE J, LARSEN G L und HAKK H (2005). Sorption, mobility, and transformation of estrogenic hormones in natural soil. *Journal of Environmental Quality* **34**(4): 1372-1379.
- CLAUS R, MÜNCH U, NAGEL S und SCHOPPER D (1989). Concentrations of 17beta-oestradiol, oestrone and testosterone in tissues of slaughterweight boars compared to barrows and gilts. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **40**: 121-144.
- COLUCCI M S, BORK H und TOPP E (2001). Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: I. 17 beta-estradiol and estrone. *Journal of Environmental Quality* **30**(6): 2070-2076.
- CURRIE L A (1999). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Analytica Chimica Acta* **391**: 105-126.
- D'ASCENZO G, DI CORCIA A, GENTILI A, MANCINI R, MASTROPASQUA R, NAZZARI M und SAMPERI R (2003). Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Science of the Total Environment* **302**(1-3): 199-209.
- DAUGHTON C G und TERNES T A (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives* **107**(6): 907-938.
- DAVIES C (2001a). Introduction to immunoassay principles. in: WILD D. (ed.). *The Immunoassay Handbook*. Nature Publishing Group, New York: 3-40.
- DAVIES C (2001b). Concepts. in: WILD D. (ed.). *The Immunoassay Handbook*. Nature Publishing Group, New York: 78-110.
- DAXENBERGER A, IBARRETA D und MEYER H H (2001). Possible health impact of animal oestrogens in food. *Human Reproduction Update* **7**(3): 340-355.
- DENG A, HIMMELSBACH M, ZHU Q Z, FREY S, SENGL M, BUCHBERGER W, NIESSNER R und KNOPP D (2003). Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC-MS. *Environmental Science & Technology* **37**(15): 3422-3429.
- DESBROW C, ROUTLEDGE E J, BRIGHTY G C, SUMPTER J P und WALDOCK M (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science & Technology* **32**(11): 1549-1558.
- DESHPANDE S S (1996). *Enzyme immunoassays: From concept to product development*. Chapman & Hall, New York.
- DIN ISO 15089 (2000). Wasserbeschaffenheit — Leitlinien für selektive Immunoassays zur Bestimmung von Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmitteln (ISO 15089:2000). *Deutsche Einheitsverfahren*. Gruppe T: Suborganismische Testverfahren T. Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (Hrsg.).
- DIXON W J (1953). Processing data for outliers. *Biometrics* **9**: 74-89.
- DORABAWILA N und GUPTA G (2005). Endocrine disrupter 17 beta-estradiol in Chesapeake Bay tributaries. *Journal of Hazardous Materials* **120**(1-3): 67-71.
- DUDLEY R A, EDWARDS P, EKINS R P, FINNEY D J, MCKENZIE I G, RAAB G M, RODBARD D und RODGERS R P (1985). Guidelines for immunoassay data processing. *Clinical Chemistry* **31**(8): 1264-1271.

- DUFT M, SCHULTE-OEHLMANN U, TILLMANN M, MARKERT B und OEHLMANN J (2003). Toxicity of triphenyltin and tributyltin to the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* in a new sediment biotest. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**(1): 145-152.
- EKINS R P (1960). The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic method. *Clinica Chimica Acta* **5**: 453-459.
- EKINS R P (1981). The "Precision Profile": Its use in RIA assessment and design. *The Ligand Quarterly* **4**(2): 33-44.
- ENGVALL E und PERLMANN P (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) - Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**: 871-874.
- EUROPEAN COMMISSION (2002). Commission Decision of 12 August 2002. Official Journal. **L 221**: 8-36.
- FINLAY-MOORE O, HARTEL P G und CABRERA M L (2000). 17 beta-estradiol and testosterone in soil and runoff from grasslands amended with broiler litter. *Journal of Environmental Quality* **29**(5): 1604-1611.
- FISCH H und GOLDEN R (2003). Environmental estrogens and sperm counts. *Pure and Applied Chemistry* **75**(11-12): 2181-2193.
- FREY A, MECKELEIN B, EXTERNEST D und SCHMIDT M A (2000). A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Immunological Methods* **233**(1-2): 47-56.
- FRY D M (1995). Reproductive Effects in Birds Exposed to Pesticides and Industrial-Chemicals. *Environmental Health Perspectives* **103**: 165-171.
- FÜRHACKER M, BREITHOFER A und JUNGBAUER A (1999). 17 beta-Estradiol: Behavior during waste water analysis. *Chemosphere* **39**(11): 1903-1911.
- GLASS T R, OHMURA N, SAIKI H und LACKIE S J (2004). A combination of labeled and unlabeled antibody enables self-calibration and reduction of sample matrix effects in immunoassay. *Analytical Biochemistry* **331**(1): 68-76.
- GOWIK P, JÜLICHER B und UHLIG S (1998a). Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high-performance liquid chromatography photodiode-array detection - Method description and comprehensive in-house validation. *Journal of Chromatography B* **716**(1-2): 221-232.
- GOWIK P, JÜLICHER B und UHLIG S (1998b). In-house-Validierung in der Spurenanalytik. *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium* **46**(9): 841-844.
- GRAY J L (2003). The detection and fate of 17 beta-estradiol and 17 alpha-ethinylestradiol in engineered treatment wetlands. *Dissertation*. Engineering-Civil and Environmental, University of California, Berkeley.
- GRIEL L C, KRADEL D C und WICKERSHAM E W (1969). *The Cornell Veterinarian* **59**: 226.
- GUILLETTE L J, GROSS T S, MASSON G R, MATTER J M, PERCIVAL H P und WOODWARD A R (1994). Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentration in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environmental Health Perspectives* **102**: 680-688.
- HAGGER J A, DEPLEDGE M H, OEHLMANN J, JOBLING S und GALLOWAY T S (2006). Is there a causal association between genotoxicity and the imposex effect? *Environmental Health Perspectives* **114 Suppl 1**: 20-26.
- HANSELMAN T A, GRAETZ D A und WILKIE A C (2003). Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: a review. *Environmental Science & Technology* **37**(24): 5471-5478.
- HEALY M J R (1972). Statistical analysis of radioimmunoassay data. *Biochemical Journal* **130**: 207-210.

- HEMMINGS S N und HARTEL P G (2006). Mineralization of hormones in breeder and broiler litters at different water potentials and temperatures. *Journal of Environmental Quality* **35**(3): 701-706.
- HENRICKS D M, GRAY S L und HOOVER J L B (1983). Residue levels of endogenous estrogens in beef tissues. *Journal of Animal Science* **57**: 247-255.
- HINTEMANN T, SCHNEIDER C, SCHÖLER HF, SCHNEIDER RJ (2006) Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment. *Water Research* **40** (12): 2267-2274
- HOFFMANN B und EVERS P (1986). Anabolic agents with sex hormone-like activities: problems of residues. in: Rico A G (ed.). *Drug Residues in Animals*. Academic Press, New York: 111-146.
- HOLBROOK R D, NOVAK J T, GRIZZARD T J und LOVE N G (2002). Estrogen receptor agonist fate during wastewater and biosolids treatment processes: A mass balance analysis. *Environmental Science and Technology* **36**(21): 4533-4539.
- HUANG C H und SEDLAK D L (2001). Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(1): 133-139.
- HUCKLE D und WILD D (2001). Market Trends. in: WILD D. (ed.). *The Immunoassay Handbook*. Nature Publishing Group, New York: 248-260.
- INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (2002). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. WHO, [www.who.int/ipcs/publications/new\\_issues/endocrine\\_disruptors/en/index.html](http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/index.html)
- IUPAC (1998). *Compendium of Analytical Nomenclature*. Blackwell, Oxford.
- JACOBSEN A M, LORENZEN A, CHAPMAN R und TOPP E (2005). Persistence of testosterone and 17 beta-estradiol in soils receiving swine manure or municipal biosolids. *Journal of Environmental Quality* **34**(3): 861-871.
- JAHN C, PETERSEN A und SCHWACK W (1999). Structure-specific detection of plant cuticle bound residues of chlorothalonil by ELISA. *Pesticide Science* **55**: 1167-1176.
- JANER G, LYSSIMACHOU A, BACHMANN J, OEHLMANN J, SCHULTE-OEHLMANN U und PORTE C (2006). Sexual dimorphism in esterified steroid levels in the gastropod *Marisa cornuarietis*: the effect of xenoandrogenic compounds. *Steroids* **71**(6): 435-444.
- JANOS P (2003). Separation methods in the chemistry of humic substances. *Journal of Chromatography A* **983**(1-2): 1-18.
- JECFA (1999). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Fifty-second Meeting, Rome, February 2-11: 1-24.
- JOBLING S, NOLAN M, TYLER C R, BRIGHTY G und SUMPTER J P (1998). Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science & Technology* **32**(17): 2498-2506.
- JOHNSON A C, BELFROID A und DI CORCIA A D (2000). Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Science of the Total Environment* **256**(2-3): 163-173.
- JOHNSON A C und SUMPTER J P (2001). Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environmental Science & Technology* **35**(24): 4697-4703.
- JOHNSON A C und WILLIAMS R J (2004). A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works. *Environmental Science & Technology* **38**(13): 3649-3658.



- JOSS A, ANDERSEN H, TERNES T, RICHLE P R und SIEGRIST H (2004). Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: consequences for plant optimization. *Environmental Science & Technology* **38**(11): 3047-3055.
- JÜLICHER (1998). Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. *Analyst* **123**: 173-179.
- KAISER H (1966). Zur Definition der Nachweisgrenze, der Garantiegrenze und der dabei benutzten Begriffe - Fragen und Ergebnisse der Diskussion. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie* **216**(1): 80.
- KAVLOCK R J, DASTON G P, DE ROSA C, FENNER-CRISP P, GRAY L E, KAATTARI S, LUCIER G, LUSTER M, MAC M J, MACZKA C, MILLER R, MOORE J, ROLLAND R, SCOTT G, SHEEHAN D M, SINKS T und TILSON H A (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives* **104**(4): 715-740.
- KOLPIN D W, FURLONG E T, MEYER M T, THURMAN E M, ZAUGG S D, BARBER L B und BUXTON H T (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science & Technology* **36**(6): 1202-1211.
- KÖRNER W, HANF V, SCHULLER W, KEMPTER C, METZGER J und HAGENMAIER H (1999). Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. *Science of the Total Environment* **225**(1-2): 33-48.
- KÖRNER W, SPENGLER P, BOLZ U, SCHULLER W, HANF V und METZGER J W (2001). Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 2. Biological analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(10): 2142-2151.
- KUCH H M und BALLSCHMITER K (2000). Determination of endogenous and exogenous estrogens in effluents from sewage treatment plants at the ng/L-level. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **366**(4): 392-395.
- KÜPPERS (1997). The application of the measurement uncertainty concept to in-process control in pharmaceutical development. *Accreditation and Quality Assurance*: 30-35.
- LAI K M, JOHNSON K L, SCRIMSHAW M D und LESTER J N (2000). Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. *Environmental Science & Technology* **34**(18): 3890-3894.
- LANDSTEINER K (1933). Die Spezifität der serologischen Reaktion. Julius Springer Verlag, Berlin.
- LANGE I und MEYER H H (2002). Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. *Analytica Chimica Acta* **473**: 27-37.
- LARSSON D G J (1999). Ethinyloestradiol — an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology* **45**: 91-97.
- LAYTON A C, GREGORY B W, SEWARD J R, SCHULTZ T W und SAYLER G S (2000). Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in Tennessee USA. *Environmental Science & Technology* **34**(18): 3925-3931.
- LEE H B und PEART T E (1998). *The Journal of AOAC International* **81**: 1209-1216.
- LEE L S, STROCK T J, SARMAH A K und RAO P S (2003). Sorption and dissipation of testosterone, estrogens, and their primary transformation products in soils and sediment. *Environmental Science & Technology* **37**(18): 4098-4105.

- LEGLER J, JONAS A, LAHR J, VETHAAK D, BROUWER A und MURK A (2002). Biological Measurement Of Estrogenic Activity in Urine and bile Conjugates with the in vitro ER-CALUX Reporter Gene Assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**(3): 473-479.
- LIEBIG M, EGEER P, OEHLMANN J und KNACKER T (2005). EE2 Bioakkumulation. *Chemosphere* **59**(2): 271-280.
- LIEHR J G (2000). Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocrine Reviews* **21**: 40-54.
- MALEKINEJAD H, SCHERPENISSE P und BERGWERFF A A (2006). Naturally occurring estrogens in processed milk and in raw milk (from gestated cows). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. in press.
- MATSUI S, TAKIGAMI H, MATSUDA T, TANIGUCHI N, ADACHI J, KAWAMI H und SHIMIZU Y (2000). Estrogen and estrogen mimics contamination in water and the role of sewage treatment. *Water Science and Technology* **42**(12): 173-179.
- METZGER J W, SCHNEIDER C, SCHULLERER S, SPENGLER P, KÖRNER W, BOLZ U, KUCH B, BRAUCH H J, LANGE F T und SACHER F (2003). Bestimmung endokrin wirksamer Substanzen und Pharmaka in der aquatischen Umwelt. Landwirtschaftliche Verwertung von Klärschlamm, Gülle und anderen Düngern unter Berücksichtigung des Umwelt- und Verbraucherschutzes BMU/BMVEL Wissenschaftliche Anhörung, Berlin, KTBL-Schrift 404: 117-130.
- MINISTERIUM DES INNERN UND FÜR SPORT (2003). Raumordnungsbericht 2003, Berichtszeitraum 1998 bis 2003. Mainz, Rheinland-Pfalz. <http://www.ism.rlp.de/Internet/nav/acc/acc40ed2-68cd-1b01-44b9-4618ada3b7d8.htm>
- MUNLV (2005). Entwicklung und Stand der Abwasserbeseitigung in Nordrhein-Westfalen. Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen, Düsseldorf.
- MÜLLER W (2004). Hormonale Steuerung. in: MÜLLER W (ed.). Tier- und Humanphysiologie. Springer, Berlin: 244-253.
- MEYER H H D, SAUERWEIN H und MUTAYOBA B M (1990). Immunoaffinity chromatography and a biotin-streptavidin amplified enzyme immunoassay for sensitive and specific estimation of estradiol - 17 beta. *Journal of Steroid Biochemistry* **101**(1): 41-49.
- MUNRO C und STABENFELDT G (1984). Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *Journal of Endocrinology* **101**(1): 41-49.
- NASU M, GOTO M, KATO H, OSHIMA Y und TANAKA H (2001). Study on endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants. *Water Science and Technology* **43**(2): 101-108.
- NIX B und WILD D (2001). Calibration Curve-Fitting. in: WILD D. (ed.). The Immunoassay Handbook. Nature Publishing Group, London: 198-210.
- OEHLMANN J, MARKERT B, STROBEN E, SCHULTE-OEHLMANN U, BAUER B und FIORONI P (1996). Tributyltin biomonitoring using prosobranchs as sentinel organisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **354**(5-6): 540-545.
- OTTINGER M A, QUINN M J, LAVOIE E, ABDELNABI M A, THOMPSON N, HAZELTON J L, WU J M, BEAVERS J und JABER M (2005). Consequences of endocrine disrupting chemicals on reproductive endocrine function in birds: Establishing reliable end points of exposure. *Domestic Animal Endocrinology* **29**(2): 411-419.
- PANTER G H, THOMPSON R S, BERESFORD N und SUMPTER J P (1999). Transformation of a non-oestrogenic steroid metabolite to an oestrogenically active substance by minimal bacterial activity. *Chemosphere* **38**(15): 3579-3596.

- PANTER G H, THOMPSON R S und SUMPTER J P (2000). Intermittent exposure of fish to estradiol. *Environmental Science & Technology* **34**(13): 2756-2760.
- PAWLOWSKI S, TERNES T A, BONERZ M, RASTALL A C, ERDINGER L und BRAUNBECK T (2004). Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. *Toxicology in Vitro* **18**(1): 129-138.
- PETERSON E W, DAVIS R K und ORNDORFF H A (2000). 17 beta-estradiol as an indicator of animal waste contamination in mantled karst aquifers. *Journal of Environmental Quality* **29**(3): 826-834.
- PFORTNER P, WELLER M G und NIESSNER R (1998). Immunological method for the detection of nitroaromatic residues covalently bound to humic acids. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **360**(2): 192-198.
- PURDOM C E, HARDIMAN P A, BYE V J, ENO N C, TYLER C R und SUMPTER J P (1994). Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology* **8**: 275-285.
- QUINTANA J B, CARPINTEIRO J, RODRIGUEZ I, LORENZO R A, CARRO A M und CELA R (2004). Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **1024**(1-2): 177-185.
- RAMAN D R, WILLIAMS E L; LAYTON A C, BURNS R T, EASTER J P, DAUGHERTY A S, MULLEN M D und SAYLER G S (2004). Estrogen content of dairy and swine wastes. *Environmental Science & Technology* **38**(13): 3567-73.
- RAMON-AZCON J, GALVE R, SANCHEZ-BAEZA F und MARCO M P (2006). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of the linear alkylbenzene sulfonates and long-chain sulfophenyl carboxylates using antibodies generated by pseudoheterologous immunization. *Analytical Chemistry* **78**(1): 71-81.
- RODGERS-GRAY T P, JOBLING S, KELLY C, MORRIS S, BRIGHTY G, WALDOCK M J, SUMPTER J P und TYLER C R (2001). Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. *Environmental Science & Technology* **35**(3): 462-470.
- ROSE J, HOLBECH H, LINDHOLST C, NORUM U, POVLSEN A, KORSGAARD B und BJERREGAARD P (2002). Vitellogenin induction by 17 beta-estradiol and 17 alpha-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **131**(4): 531-539.
- ROUTLEDGE E J, SHEAHAN D, DESBROW C, BRIGHTY G C, WALDOCK M und SUMPTER J P (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environmental Science & Technology* **32**(11): 1559-1565.
- RUPPERT T, WEIL L und NIESSNER R (1992). Influence of water contents on an enzyme immunoassay for Triazine herbicides. *Vom Wasser* **78**: 387-401.
- SCHNEIDER C, SCHÖLER H F und SCHNEIDER R J (2004). A novel enzyme-linked immunosorbent assay for ethinylestradiol using a long-chain biotinylated EE2 derivative. *Steroids* **69**(4): 245-253.
- SCHNEIDER C (2005). Entwicklung, Optimierung und Validierung eines Immunoassays zur sensitiven Detektion des endokrinen Disruptors 17 alpha-Ethinylestradiol. *Dissertation*. Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.
- SCHNEIDER C, SCHÖLER H F und SCHNEIDER R J (2005). Direct sub-ppt detection of the endocrine disruptor ethinylestradiol in water with a chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay. *Analytica Chimica Acta* **551**(1-2): 92-97.

- SCHNEIDER P und HAMMOCK B D (1992). Influence of the ELISA format and the haptten-enzyme conjugate on the sensitivity of an immunoassay for s-triazine herbicides using monoclonal antibodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**: 525-530.
- SCHNEIDER R J, GOLDBACH H E, UHLIG S und BECHER M (2001). Validierung neuer kostengünstiger Nachweisverfahren (Immunoassay) für Pestizide. Umweltbundesamt Texte 41/01, Berlin.  
<http://www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/1990.pdf>
- SERVICE R F (1998). New role for estrogen in cancer? *Science* **279**(5357): 1631-1633.
- SERVOS M R, BENNIE D T, BURNISON B K, JURKOVIC A, MCINNIS R, NEHELI T, SCHNELL A, SETO P, SMYTH S A und TERNES T A (2005). Distribution of estrogens, 17 beta-estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment* **336**(1-3): 155-170.
- SHAPPELL N W (2006). Estrogenic activity in the environment: Municipal wastewater effluent, river, ponds, and wetlands. *Journal of Environmental Quality* **35**(1): 122-132.
- SHARPE R M und SKAKKEBAEK N E (2003). Male reproductive disorders and the role of endocrine disruption: Advances in understanding and identification of areas for future research. *Pure and Applied Chemistry* **75**(11-12): 2023-2038.
- SHEEHAN D M, WILLINGHAM E, GAYLOR D, BERGERON J M und CREWS D (1999). No threshold dose for Estradiol-induced sex reversal of turtle embryos: How little is too much? *Environmental Health Perspectives* **107**(2): 155-159.
- SHORE L S, GUREVITZ M und SHEMESH M (1993). Estrogen as an environmental pollutant. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **51**: 361-366.
- SHORE L S, SHEMESH M und COHEN R (1998). The role of oestradiol and oestrone in chicken manure silage in hyperoestrogenism in cattle. *Australian Veterinary Journal* **65**(2): 68.
- SHORE L S und SHEMESH M (2003). Naturally produced steroid hormones and their release into the environment. *Pure and Applied Chemistry* **75**(11-12): 1859-1871.
- SOKOLL L J und CHAN D W (2001). Choosing an automated immunoassay system. *in*: Wild D. (ed.). *The Immunoassay Handbook*. Nature Publishing Group, New York: 261-265.
- SOTO A M, Sonnenschein C, Chung K.L., Fernandez M F, Olea N und Serrano F O (1995). *Environmental Health Perspectives* **103**: 113-122.
- STEINBERG C E W, PERMINOVA I, HAITZER M und WELKER M (2000). Huminstoffe zur Reduzierung von chemischen Stoffeinflüssen. *in*: BRÜGGEMANN R (ed.). *Chemische Stressfaktoren in aquatischen Systemen*. Schriftenreihe Wasserforschung, Berlin. **6**: 79-91.
- SUMPTER J P und JOHNSON A C (2005). Lessons from Endocrine Disruption and Their Application to other Issues Concerning Trace Organics in the Aquatic Environment. *Environmental Science & Technology* **39**(12): 4321.
- SUZUKI Y und MARUYAMA T (2006). Fate of natural estrogens in batch mixing experiments using municipal sewage and activated sludge. *Water Research* **40**(5): 1061-1069.
- TANAKA T, TAKEDA H, UEKI F, OBATA K, TAJIMA H, TAKEYAMA H, GODA Y, FUJIMOTO S und MATSUNAGA T (2004). Rapid and sensitive detection of 17beta-estradiol in environmental water using automated immunoassay system with bacterial magnetic particles. *Journal of Biotechnology* **108**(2): 153-159.
- TERNES T A (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research* **32**(11): 3245-3260.

- TERNES T A, KRECKEL P und MÜLLER J (1999a). Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Science of the Total Environment* **225**: 91-99.
- TERNES T A, STUMPF M, MÜLLER J, HABERER K, WILKEN R D und SERVOS M (1999b). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of the Total Environment* **228**(1): 87-87.
- TERNES T A, ANDERSEN H, GILBERG D und BONERZ M (2002). Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Analytical Chemistry* **74**(14): 3498-3504.
- THORPE K L, HUTCHINSON T H, HETHERIDGE M J, SCHOLZE M, SUMPTER J P und TYLER C R (2001). Assessing the biological potency of binary mixtures of environmental estrogens using vitellogenin induction in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Science & Technology* **35**(12): 2476-2481.
- THORPE K L, CUMMINGS R I, HUTCHINSON T H, SCHOLZE M, BRIGHTY G, SUMPTER J P und TYLER C R (2003). Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environmental Science & Technology* **37**(6): 1142-1149.
- TIJSEN P (1993). Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Elsevier, Amsterdam.
- TSCHEMELAK J, KUMPF M, PROLL G und GAUGLITZ G (2004a). Biosensor for seven sulphonamides in drinking, ground, and surface water with difficult matrices. *Analytical Letters* **37**(8): 1701-1718.
- TSCHEMELAK J, PROLL G und GAUGLITZ G (2004b). Ultra-sensitive fully automated immunoassay for detection of propanil in aqueous samples: steps of progress toward sub-nanogram per liter detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **379**(7-8): 1004-1012.
- TSCHEMELAK J, PROLL G und GAUGLITZ G (2005). Improved strategy for biosensor-based monitoring of water bodies with diverse organic carbon levels. *Biosensors & Bioelectronics* **21**(6): 979-983.
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES P H S, NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (2005). Report on Carcinogens. **Eleventh Edition**: <http://ntp.niehs.nih.gov>.
- UHLIG S und LISCHER P (1998). Statistically-based performance characteristics in laboratory performance studies. *Analyst* **123**(2): 167-172.
- UHLIG S, GOWIK P und RADECK W (2003). Performance of a matrix-comprehensive in-house validation study by means of an especially designed software. *Analytica Chimica Acta* **483**(1-2): 351-362.
- UHLIG S, SIMON K, GRAß B, BÄUML G, HINTEMANN T, SCHNEIDER C, HOHENBLUM P und SCHNEIDER R J (2005). ESTR-A-LISER: automatisierte Immunoassays zur Bestimmung der endokrin aktiven Substanzen 17 beta-Estradiol und 17 alpha-Ethinylestradiol in Oberflächenwasser und Abwasser. *Beiträge zu Abfallwirtschaft/Altlasten* **38**: 98-105.
- VALENTINI F, COMPAGNONE D, GENTILI A und PALLESCHI G (2002). An electrochemical ELISA procedure for the screening of 17 beta-estradiol in urban waste waters. *Analyst* **127**(10): 1333-1337.
- VAN DER VEEN A M H, BROOS A J M und ALINK A (1998). Relationship between performance characteristics obtained from an interlaboratory study programme and combined measurement uncertainty: a case study. *Accreditation and Quality Assurance* **3**: 462-467.
- WEHNER R und GEHRING W (1990). Hormonale Kontrolle. Zoologie. Thieme, Stuttgart: 324-339.

- WICKS C, KELLEY C und PETERSON E (2004). Estrogen in a karstic aquifer. *Ground Water* **42**(3): 384-389.
- WILLINGHAM E und CREWS D (2000). The red-eared slider turtle: An animal model for the study of low doses and mixtures. *American Zoologist* **40**(3): 421-428.
- YALOW R S und BERSON S A (1959). Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* **184**: 1648-1649.
- YAMAMOTO H, LILJESTRAND H M, SHIMIZU Y und MORITA M (2003). Effects of physical-chemical characteristics on the sorption of selected endocrine disruptors by dissolved organic matter surrogates. *Environmental Science & Technology* **37**(12): 2646-2657.
- YING G G und KOOKANA R S (2003). Degradation of five selected endocrine-disrupting chemicals in seawater and marine sediment. *Environmental Science & Technology* **37**(7): 1256-1260.
- YING G G, KOOKANA R S und DILLON P (2003). Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material. *Water Research* **37**(15): 3785-3791.
- ZÜHLKE S, DÜNNBIER U, HEBERER T und FRITZ B (2004). Analysis of endocrine disrupting steroids: Investigation of their release into the environment and their behavior during bank filtration. *Ground Water Monitoring and Remediation* **24**(2): 78-85.
- ZÜHLKE S, DÜNNBIER U und HEBERER T (2005). Determination of estrogenic steroids in surface water and wastewater by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **28**(1): 52-58.
- ZULLEI-SEIBERT N und SKARK C (2003). Gehalte an Pharmaka, Hormonen und endokrin wirksamen Substanzen in Klärschlamm, Kompost und Wirtschaftsdünger. Landwirtschaftliche Verwertung von Klärschlamm, Gülle und anderen Düngern unter Berücksichtigung des Umwelt- und Verbraucherschutzes BMU/BMVEL Wissenschaftliche Anhörung, Berlin, KTBL-Schrift **404**: 105-116.

Im Rahmen dieser Schriftenreihe sind bisher erschienen:

1. Joachim Clemens: Lachgasemissionen aus Fäkalien. ISBN 3-933865-00-X 10,- EURO
2. Anni Neu: Stickstoff-Immobilisations- und Mineralisationsprozesse im Boden während der Nachernte-Phase unter besonderer Berücksichtigung der mikrobiellen Biomasse. ISBN 3-933865-01-8 10,- EURO
3. Monika Wimmer: Untersuchungen zur Funktion von Bor im Apoplasten der Ackerbohne (*Vicia faba* L.). ISBN 3-933865-02-6 10,- EURO
4. Jürgen Roßbach: Einfluß von Ausgangsmaterial und Rottegrad auf N-Fractionen und N-Wirkung von Komposten. ISBN 3-933865-03-2 10,- EURO
5. Uwe Pihl: Bodenchemische Parameter als Prognose-kriterien des potentiellen Phosphat-Austrags in Drän- und Grundwasser. ISBN 3-933865-05-0 15,- EURO
6. Ulrich Ortseifen: Untersuchungen zur Variabilität und Stabilität der leicht löslichen organischen Stickstofffraktion in sandigen Böden des Münsterlandes sowie deren Eignung als Kriterium für das N-Nachlieferungs-potential in der  $N_{min}$ -gestützten Düngungs-empfehlung. ISBN 3-933865-06-9 15,- EURO
7. Udo Knauff: Umsetzung organischer Schwefelverbindungen in der Rhizosphäre verschiedener landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. ISBN 3-933865-04-2 15,- EURO
8. Thomas Eichert: Untersuchungen zur Aufnahme gelöster Stoffe durch Stomata. ISBN 3-933865-07-7 15,- EURO
9. Maren Frost: Bedeutung des Mykorrhiza-Pilzes *Glomus mosseae* für die Mobilisierung des spezifisch gebundenen Ammoniums. ISBN 3-933865-08-5 15,- EURO
10. Bert Jaeger Kennzeichnung von Störungen im Fe-Stoffwechsel bei Sonnenblumen (*Helianthus annuus* L.) und Mais (*Zea mays* L.) auf Carbonatböden und deren Behebung durch physiologisch aktives Sulfat nach dem "CULTAN"-Verfahren. ISBN 3-933865-09-3 15,- EURO
11. Manfred Trimborn: Denitrifikation, Produktion und Abbau von  $N_2O$  in Stauwasserböden. ISBN 3-933865-10-7 15,- EURO
12. Sebastian Wulf: Untersuchung der Emission von  $NH_3$ ,  $N_2O$  und  $CH_4$  nach der Ausbringung von Kofermentationsrückständen in der Landwirtschaft. ISBN 3-933865-11-5 15,- EURO
13. Dolors Baget-Pomés: Pflanzenbehandlungs- und Pflanzenschutzmittel in Kombination mit dem „CULTAN“-Verfahren. ISBN 3-933865-12-3 10,- EURO
14. Manfred Trimborn, Heiner Goldbach, Joachim Clemens, Carsten Cuhls, Andreas Breeger (2003): Reduktion von klimawirksamen Spurengasen in der Abluft von Biofiltern auf Bioabfallbehandlungsanlagen. ISBN 3-933865-30-1 10,- EURO
15. Ahmet Aydogan: Untersuchungen zur Aufnahme ausgewählter Blattdünger in verschiedene Kulturpflanzen. ISBN 3-933865-31-X 15,- EURO
16. S. Wulf, A. Brenner, J. Clemens, H. Döhler, P. Jäger, K-H Kromer, M. Maeting, C. Rieger, I. Schumacher, M. Tschepe, R. Vandr , P. Weiland: Untersuchung der Emission direkt und indirekt wirksamer Spurengase während der Lagerung und nach der Ausbringung von Kofermentations-rückständen sowie Entwicklung von Minderungsmaßnahmen. ISBN 3- 933865-32-8 20,- EURO
17. Maria M. Sonntag (2003): Accelerated Microbial Degradation of Fenamiphos (a.i. Namacur®) in Sollis: Soll Recovery Study with Identification of Some Microorganisms Responsible for Degradation. ISBN 3- 933865-33-6 15,- EURO

18. V. Kühnen (2004): Schwermetallflüsse und -bilanzen auf ausgewählten landwirtschaftlichen Betrieben unterschiedlicher Produktionsrichtungen. ISBN 3-933865-13-1 20,- EURO
19. Jean Pierre Irénée Bognonkpe (2004): Effect of Land Use on Soil N Dynamics at Watershed Scale in Africa. ISBN 3-937941-00-2 15,-EURO
20. Maria Hogrebe (2004): Entwicklung eines Depotdüngers im Zierpflanzenbau. ISBN: 3-937941-01-0 20,-EURO
21. A. Bastian, C. Bornemann, M. Hachenberg, M. Oldenburg, M. Schmelzer, A. Butzen, F. Werres, P. Balsaa, R.J. Schneider, J.M. Kaub, J. Londong, J. Simons, J. Clemens, A. Rechenburg, M. Hogrebe (2005): Nährstofftrennung und -verwertung in der Abwassertechnik am Beispiel der „Lambertsmühle“. ISBN 3-937941-02-9 20,- EURO
22. Svea Pacyna (2005): Bedeutung des Schwefels für den Ferredoxin- und Lehhämoglobin-Gehalt sowie die Energieversorgung in N<sub>2</sub>-fixierenden Leguminosen. ISBN: 3-937941-03-7 20,- EURO
23. Keshab Raj Pande (2005): Managing seasonal soil N-dynamic in rice-wheat rotation systems of Nepal. ISBN 3-937941-04-5 15,- EURO
24. Gustave Dieudonné Dagbenonbakin (2005): Productivity and water use efficiency of important crops in the Upper Oueme Catchment: influence of nutrient limitations, nutrient balances and soil fertility. ISBN 3-937941-05-3 15,- EURO
25. Kay Domeyer (2006): An- und Abreicherung von Schwermetallen in der Rhizosphäre und deren Entzug durch landwirtschaftliche Kulturpflanzen unter besonderer Berücksichtigung der Aspekte einer Phytosanierung. ISBN 3-937941-07-X 20,- EURO
26. Tropentag 2006: Prosperity & Poverty in a globalized world: Challenges for Agricultural Research, book of Abstracts, ISBN-3-937941-08-8 20,- EURO
27. Frank Gresens (2006): Untersuchungen zum Wasserhaushalt ausgewählter Pflanzenarten im Drâa-Tal – Südost Marokko. ISBN 3-937941-09-6 15,- EURO
28. Frank Mussgnug (2006): Potassium management in intensive, rice-based cropping systems on degraded soils in the Red River Delta of Vietnam: ISBN 3-937941-10-X 15,- EURO
29. Mohamed A. Hashim (2007): Differential degradation of the chiral pesticide metolachlor in soils and waters with different metabolic potential. ISBN 3-937941-12-6 15,-EURO
- Therese Hintemann (2007): Entwicklung, Optimierung, Validierung und Automatisierung eines Immunoassays zur sensitiven Detektion des endokrinen Disruptors 17 $\beta$ -Östradiol im Wasserkreislauf. ISBN 3-937941-11-8 15,- EURO

Die Bände sind im Selbstverlag erschienen und können bezogen werden über:

Verein zur Förderung der Agrikulturchemie e.V.

c/o Institut für Pflanzenernährung

Karlobert-Kreiten-Straße 13

53115 Bonn

Tel.: ++49 228 732851

Fax: ++49 228 732489