



universität  
wien

# DISSERTATION

Titel der Dissertation

„Quantifizierung von Saponinen in Oberflächen- und  
Abwasserproben mittels LC-MS/MS - deren Einfluss auf  
die Schaumbildung und toxikologische Bedeutung“

verfasst von

Mag. rer.nat. Michaela Theresa Lucia Kreuml

angestrebter akademischer Grad

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer.nat.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 791 474

Dissertationsgebiet lt. Studienblatt:

Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Karl-Heinz Wagner



## **DANKSAGUNG**

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner für die gewissenhafte und professionelle Betreuung bedanken.

Des Weiteren möchte ich den Mitarbeitern der Umweltbundesamt GmbH Wien danken, die dieses Projekt ins Leben gerufen und mich bei meiner Laborarbeit so tatkräftig unterstützt haben. Hier möchte ich speziell Stefan und Astrid erwähnen. Ich habe mich bei euch im Haus sehr wohl gefühlt.

Ao. Univ.-Prof. Dr. Matthias Zessner ein herzliches Dankeschön für die Unterstützung in wassergütewirtschaftlichen Fragestellungen und für die Zusammenarbeit bei der Entwicklung des Schäumungstests.

Vielen Dank auch an Tine Mölzer für die Einführung in die Methode des Ames Tests, die Rund um die Uhr Betreuung und ihre Unterstützung währenddessen.

Meiner Ames Test Kollegin Julia Rath danke ich für die gute Zusammenarbeit, ihre Verlässlichkeit und die reibungslosen Abläufe während der vielen Stunden im Zellkultur-Labor.

Ein weiteres großes Dankeschön gebührt meiner Familie und meinen Freunden, die mich während des ganzen Studiums begleitet und unterstützt haben. Hierbei gilt mein größter Dank meinen Eltern und Großeltern, die mir auch dieses weitere Studium ermöglicht haben und immer für mich da waren.

Danke auch an meinen Freund Michael, der mich in den letzten Jahren immer unterstützt, ermutigt und zu jeder Zeit an mich geglaubt hat. Du hast mir Kraft und Durchhaltevermögen gegeben.



<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>XV</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>XIX</b>
<b>1. Einleitung und Fragestellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht.....</b>	<b>3</b>
2.1. Saponine .....	3
2.1.1. Begriffsdefinition .....	3
2.1.2. Chemische Struktur und Einteilung der Saponine .....	4
2.1.2.1. Die Biosynthese und Klassifikation der Saponine .....	5
2.1.2.2. Die Klassen der Aglykone .....	8
2.1.3. Vorkommen in Pflanzen und Meerestieren.....	10
2.1.4. Allgemeine Eigenschaften von Saponinen .....	12
2.1.4.1. Hämolyse .....	12
2.1.4.2. Bitterkeit .....	13
2.1.5. Physikochemische Eigenschaften .....	13
2.1.6. Biologische und pharmakologische Eigenschaften von Saponinen.....	14
2.1.6.1. Antimikrobielle Wirkung .....	15
2.1.6.2. Zytotoxische und anti-tumor Wirkung .....	16
2.1.6.3. Antimutagene Wirkung .....	17
2.1.6.4. Fischtoxische Wirkung .....	17
2.1.6.5. Molluskizide Wirkung.....	18
2.1.6.6. Weitere pharmakologische Wirkungen.....	18
2.1.7. Ernährungsphysiologie .....	22
2.1.8. Ausgewählte relevante Saponine und deren Vorkommen .....	22
2.1.8.1. Digitonin .....	22
2.1.8.2. Diosgenin .....	23
2.1.8.3. Escin (Aescin) .....	24

2.1.8.4.	Hederacosid C .....	26
2.1.8.5.	Oleanolsäure (OA) .....	27
2.1.8.6.	Solanin .....	28
2.2.	Schaum .....	31
2.2.1.	Voraussetzung für die Schaumbildung .....	32
2.2.2.	Entstehung von Schäumen auf Oberflächengewässern .....	37
2.2.3.	Ökologische Bedeutung und Toxizität von Schaum .....	38
2.2.4.	Ursachen für eine Schaumbildung .....	39
2.2.4.1.	Natürliche Ursachen für eine Schaumbildung .....	39
2.2.4.2.	Anthropogene Ursachen für eine Schaumbildung .....	41
2.3.	Kopplung einer Flüssigkeitschromatographie mit der Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS) .....	44
2.3.1.	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	44
2.3.1.1.	Aufbau einer HPLC .....	44
2.3.2.	Massenspektrometrie (MS) .....	45
2.3.2.1.	Aufbau eines Massenspektrometers .....	46
2.3.3.	Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit der Massenspektrometrie (LC-MS) in der Praxis .....	52
2.3.3.1.	Der Analytische Prozess .....	53
2.4.	Ames Test .....	57
2.4.1.	Geschichte – Historischer Hintergrund .....	57
2.4.2.	Testprinzip .....	58
2.4.2.1.	Genotypen der <i>Salmonella typhimurium</i> -Teststämme .....	58
2.4.3.	Bakterienmetabolismus und Metabolische Aktivierung .....	61
2.4.3.1.	Oxidativer Metabolismus .....	61
2.4.3.2.	Reduktiver Metabolismus .....	61
2.4.4.	Einsatz von negativ und positiv Kontrollen im Ames Test .....	62
2.4.4.1.	Positiv Kontrolle - diagnostizierte Mutagene .....	62
2.4.4.2.	Negativ Kontrolle – Spontan-Revertanten .....	63
2.4.5.	Der Präinkubationstest .....	64
2.4.6.	Ames Test und Saponine .....	64
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>66</b>

INHALTSVERZEICHNIS

---

3.1.	Material.....	66
3.1.1.	Probenumfang - Jahresreihe .....	66
3.2.	Analytische Methoden .....	70
3.2.1.	Allgemeine Probenaufarbeitung – Festphasenextraktion (SPE)..	70
3.2.2.	Allgemeine Probenaufarbeitung – Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE) .....	73
3.2.3.	Flüssigkeits-Chromatographie – Massenspektrometrie (LC-MS/MS).....	77
3.2.3.1.	Allgemeines.....	77
3.2.3.2.	LC-MS/MS Messung im Positiv Modus (ESI +) .....	82
3.2.3.3.	LC-MS/MS Messung im Negativ Modus (ESI -) .....	88
3.2.3.4.	Erstellung einer Kalibration.....	90
3.2.3.5.	Durchführung der LC-MS/MS Analyse .....	91
3.2.3.6.	Methodenvalidierung .....	93
3.2.4.	Schäumungspotential .....	97
3.2.4.1.	Zu untersuchende Parameter.....	98
3.2.4.2.	Ergebnisse und Auswertung des Schäumungspotentials.....	99
3.2.5.	Ames Test .....	100
3.2.5.1.	Chemikalien und Reagenzien.....	101
3.2.5.2.	Geräte und Materialien .....	103
3.2.5.3.	Testprinzip.....	104
3.2.5.4.	Durchführung des Ames Test.....	105
3.2.5.5.	Auszählen der Kolonien .....	120
3.2.5.6.	Statistische Auswertung des Ames Tests .....	121
3.2.5.7.	Nicht statistische Auswertung des Ames Tests .....	121
3.3.	Methoden der statistischen Auswertung .....	123
3.3.1.	Prüfung auf Normalverteilung der Daten .....	123
3.3.2.	Prüfung auf Unterschiede.....	123
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>124</b>
4.1.	Quantitative Analyse von Saponinen mittels LC-MS/MS .....	125
4.1.1.	Bestimmung von Saponinen in Hintergrundmessstellen .....	133

---

4.1.2.	Bestimmung von Saponinen in Oberflächengewässern (Immissionsproben) .....	135
4.1.3.	Bestimmung von Saponinen in Abwässern von Kläranalgen (Emissionsproben).....	168
4.2.	Ergebnisse des Schäumungspotentials.....	172
4.2.1.	Ergebnisse des Schäumungspotentials der Hintergrundmessstellen .....	174
4.2.2.	Ergebnisse des Schäumungspotentials der Oberflächengewässer. .....	176
4.2.3.	Ergebnisse des Schäumungspotentials der Abwässer.....	183
4.2.4.	Ergebnisse des Schäumungspotentials der ausgewählten Standardsubstanzen.....	185
4.3.	Ergebnisse des Ames Test.....	187
4.3.1.	Ames Test auf Mutagenität (mutagenic testing) .....	187
4.3.1.1.	Resultate des <i>Salmonella typhimurium</i> Stamms TA 98 ohne S9.....	189
4.3.1.2.	Resultate des <i>Salmonella typhimurium</i> Stamms TA 98 mit S9.....	191
4.3.1.3.	Resultate des <i>Salmonella typhimurium</i> Stamms TA 102 ohne S9.....	193
4.3.1.4.	Resultate des <i>Salmonella typhimurium</i> Stamms TA 102 mit S9.....	195
<b>5.</b>	<b>Conclusio .....</b>	<b>197</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>204</b>
<b>7.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>207</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>210</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>220</b>
9.1.	Probenahme-Messstellen.....	220
9.2.	Pipettierschema zur Herstellung einer Kalibration .....	223
9.3.	Regelkarten für Kontrollstandards .....	223
<b>10.</b>	<b>Daten .....</b>	<b>227</b>

## INHALTSVERZEICHNIS

---

10.1.	Ergebnisse der LC-MS/MS Analytik.....	227
10.1.1.	Ergebnisse der LC-MS/MS Messungen der Hintergrundmessstellen Reichramingbach (OÖ) und Halterbach (W).....	227
10.1.2.	Ergebnisse der LC-MS/MS Messungen der Oberflächengewässer der 4 Bundesländer (OÖ, NÖ, STMK und VBG).....	228
10.1.3.	Ergebnisse der LC-MS/MS Messungen der Abwasser-messstellen Vorarlberg (Zulauf und Ablauf der ARA Ludesch und Tagesmischprobe des Abwassers einer Textilfabrik).....	242
10.2.	Ergebnisse des Schäumungspotentials .....	244
10.2.1.	Ergebnisse des Schäumungspotentials der Hintergrundmessstellen .....	244
10.2.2.	Ergebnisse des Schäumungspotentials der Oberflächengewässer. .....	244
10.2.3.	Ergebnisse des Schäumungspotentials der Abwässer .....	256
10.3.	Ergebnisse des Ames Test .....	257
10.3.1.	Testergebnisse TA 98_ohne S9 .....	257
10.3.2.	Testergebnisse TA 98_mit S9 .....	258
10.3.3.	Testergebnisse TA 102_ohne S9 .....	259
10.3.4.	Testergebnisse TA 102_mit S9 .....	260

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abb. 1: Grundstruktur der 3 Hauptklassen der Sapogenine [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].....	4
Abb. 2: Mono- und bidesmosidische Saponine [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].....	5
Abb. 3: Biosynthese der Triterpene und Steroide [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].....	6
Abb. 4: Strukturen der 11 Hauptklassen von Kohlenstoff-Gerüsten der Saponine [VINCKEN et al., 2007].....	7
Abb. 5: Die häufigsten Klassen der Steroidsapogenine [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].....	8
Abb. 6: Die zwei Klassen der Steroidalkaloide [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].....	9
Abb. 7: Die Hauptklassen der Triterpensapogenine [modifiziert nach: HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].....	9
Abb. 8: Die Nebenklassen der Triterpensapogenine [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].....	10
Abb. 9: Kladogramm der Pflanzensubklassen [VINCKEN et al., 2007].....	11
Abb. 10: Chemische Struktur des Digitonins [modifiziert nach: EID et al., 2012].....	23
Abb. 11: Chemische Struktur des Diosgenins [LEE et al., 2001] .....	24
Abb. 12: Chemische Struktur von Escin Ia, Ib und Isoescin Ia, Ib [WU et al., 2010].....	25
Abb. 13: Chemische Struktur von $\alpha$ -Hederin, Hederacosid B und Hederacosid C [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].....	26
Abb. 14: Chemische Struktur der Oleanolsäure [POLLIER und GOOSSENS, 2012].....	28
Abb. 15: Chemische Struktur von $\alpha$ -Solanin [modifiziert nach: ZYWICKI et al., 2005].....	29
Abb. 16: 3-dimensionaler Schaum mit Flüssigkeitsfilm bzw. -lamellen [WEAIRE und HUTZLER, 1999].....	31

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abb. 17: Kugelschaum wird durch Drainage zum Polyederschaum [modifiziert: <a href="http://www.wolfredo.at">www.wolfredo.at</a> ] .....	31
Abb. 18: Polyederschaum [ <a href="http://de.wikipedia.org">de.wikipedia.org</a> ] .....	32
Abb. 19: Koaleszenz aufgrund von Diffusion [WEAIRE und HUTZLER, 1999]	33
Abb. 20: Bildung von Micellen [ <a href="http://www.substech.com">www.substech.com</a> ] .....	33
Abb. 21: Kritische Konzentration an Mizellen (CMC) .....	34
Abb. 22: Drainage aufgrund von Gravitation und Druck [WEAIRE und HUTZLER, 1999] .....	36
Abb. 23: Zusammenhang zwischen Oberflächenspannung und Konzentration der oberflächenaktiven Substanzen [WEAIRE und HUTZLER, 1999] .....	36
Abb. 24: Aufbau einer HPLC-Anlage [ <a href="http://www.munich.linde.com">www.munich.linde.com</a> ] .....	45
Abb. 25: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers [BARKER, 2000] .....	46
Abb. 26: Kopplung einer HPLC mit MS über ein Elektrospray-Interface [MEYER, 2004] .....	48
Abb. 27: Schematischer Aufbau eines Quadrupols [ <a href="http://www.analyticjournal.de">www.analyticjournal.de</a> ] ...	50
Abb. 28: Erster Quadrupol eines Massenspektrometers von AB Sciex .....	50
Abb. 29: Scan Modus in der Tandem Massenspektrometrie (MS/MS) [BARKER, 2000] .....	51
Abb. 30: Kopplung HPLC-ESI-MS [OTTO, 2011] .....	53
Abb. 31: Ablauf von Analysen [OTTO, 2011] .....	54
Abb. 32: Spontanrevertanten der Negativkontrolle TA 98 ohne S9 .....	63
Abb. 33: Übersicht der Messstellen in Österreich .....	68
Abb. 34: Nernst'sches Verteilungsgesetz [ <a href="http://de.wikipedia.org">de.wikipedia.org</a> ] .....	74
Abb. 35: LC-MS/MS 1: LC Agilent 1100 Series gekoppelt mit einer Micromass Quattro Ultima™ API, Waters (Quellen: <a href="http://www.agilent.com">www.agilent.com</a> & <a href="http://www.krssltd.com">www.krssltd.com</a> ) .....	79
Abb. 36: LC-MS/MS 2: LC Agilent 1100 Series gekoppelt mit einer Micromass Quattro Micro™ API, Waters (Quellen: <a href="http://www.agilent.com">www.agilent.com</a> & <a href="http://www.bioon.com.cn">www.bioon.com.cn</a> ) .....	80
Abb. 37: LC-MS/MS 3 & 4: LC Agilent 1290 Infinity Series gekoppelt mit einer AB SCIEX 4000 Q TRAP .....	81

---

Abb. 38: Gradient ESI positiv auf der LC-MS/MS 2 .....	83
Abb. 39: Gradient ESI positiv auf der LC-MS/MS 1 .....	85
Abb. 40: Gradient ESI positiv auf der LC-MS/MS 3 & 4 .....	87
Abb. 41: Gradient ESI negativ auf der LC-MS/MS 2 .....	89
Abb. 42: Screenshot einer ausgewählten Sequenz (Batch) als ein Beispiel für eine Saponinanalyse mittels LC-MS/MS ESI <sup>+</sup> (Software: AB Sciex Analyst) .....	92
Abb. 43: Säule mit Durchflussmesser .....	98
Abb. 44: Parameter Schäumungspotential .....	99
Abb. 45: Laminar-Flow Werkbank .....	100
Abb. 46: Gießen der Minimal Glucose Agar Platten .....	109
Abb. 47: OVNC vor der Inkubation .....	110
Abb. 48: OVNC nach der Inkubation bei 37 °C .....	110
Abb. 49: Masterplates TA 98 (re) und TA 102 (li) .....	111
Abb. 50: Durchführung Präinkubationstest [RATH, 2013] .....	118
Abb. 51: Auszählen der Platten .....	120
Abb. 52: Platten der Negativkontrolle TA 98 .....	120
Abb. 53: Standardkalibration Solanin_1 gemessen auf der LC-MS/MS 4 (MultiQuant 2.1) .....	127
Abb. 54: Die Übergänge des Digitonins (Standardkonzentration c=100 ng/ml; RT=10,08 min) gemessen auf der LC-MS/MS 4 (Analyst) .....	128
Abb. 55: Die Übergänge des Diosgenins (Standardkonzentration c=100 ng/ml; RT = 18,85 min) gemessen auf der LC-MS/MS 4 (Analyst) .....	128
Abb. 56: Die Übergänge des Escins (Standardkonzentration c=100 ng/ml; RT = 10,60) gemessen auf der LC-MS/MS 4 (Analyst) .....	129
Abb. 57: Die Übergänge des Hederacosid C (Standardkonzentration c=100 ng/ml; RT = 8,54 min) gemessen auf der LC-MS/MS 4 (Analyst) .	129
Abb. 58: Die Übergänge des $\alpha$ -Solanins (Standardkonzentration c=100 ng/ml; RT = 7,68 min) gemessen auf der LC-MS/MS 4 (Analyst) .....	130
Abb. 59: TIC (Total Ion Current) der Oleanolsäure (Standard c=100 ng/ml; RT = 15,89 min) gemessen auf der LC-MS/MS 2 (MassLynx V4.1) .....	131

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abb. 60: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Reichramingbach im Jahresverlauf .....	133
Abb. 61: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Reichramingbach im Jahresverlauf .....	134
Abb. 62: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Ager 3 im Jahresverlauf .....	135
Abb. 63: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Antiesen 4 im Jahresverlauf .....	136
Abb. 64: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Dürre Aschach 2 im Jahresverlauf .....	137
Abb. 65: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Dürre Aschach 3 im Jahresverlauf .....	138
Abb. 66: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Dürre Aschach 3 im April 2011.....	139
Abb. 67: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Dürre Aschach 3 im August 2011.....	140
Abb. 68: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Feldaist 4 im Jahresverlauf .....	141
Abb. 69: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Große Rodl 3 im Jahresverlauf .....	142
Abb. 70: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Hörschingerbach 1 im Jahresverlauf .....	143
Abb. 71: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Innbach 2 im Jahresverlauf .....	144
Abb. 72: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Ipfbach 1 im Jahresverlauf .....	145
Abb. 73: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Krems 4 im Jahresverlauf .....	146
Abb. 74: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Pram 6 im Jahresverlauf .....	147
Abb. 75: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Ranna 1 im Jahresverlauf .....	148

Abb. 76: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Traun 2 im Jahresverlauf .....	149
Abb. 77: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle NÖ – oberhalb Agrana im Jahresverlauf .....	150
Abb. 78: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle NÖ – unterhalb Agrana im Jahresverlauf .....	151
Abb. 79: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle NÖ – oberhalb Jungbunzlauer im Jahresverlauf .....	152
Abb. 80: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle NÖ – unterhalb Jungbunzlauer im Jahresverlauf .....	153
Abb. 81: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Kainischtraun im Jahresverlauf .....	154
Abb. 82: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Mur 1 – oberhalb Frohnleiten im Jahresverlauf .....	155
Abb. 83: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Mur 2 - Weinzödlwehr im Jahresverlauf .....	156
Abb. 84: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Pöls im Jahresverlauf .....	157
Abb. 85: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Raab 1 - Wollsdorf im Jahresverlauf .....	158
Abb. 86: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Raab 2 - Feldbach im Jahresverlauf .....	159
Abb. 87: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Raab 3 - Ertlermühle im Jahresverlauf .....	160
Abb. 88: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Raab 4 - Hohenbrugg im Jahresverlauf.....	160
Abb. 89: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Thörlbach im Jahresverlauf .....	161
Abb. 90: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Vordernbergerbach im Jahresverlauf.....	162
Abb. 91: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle VBG - III vor Einleitung in die Kläranlage ARA Ludesch im Jahresverlauf.....	163

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abb. 92: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle VBG - III nach Einleitung in die Kläranlage ARA Ludesch im Jahresverlauf.....	164
Abb. 93: Die Anzahl der positiven Messwerte aller Hintergrund- und Oberflächengewässermessstellen der 6 untersuchten Saponine im Jahresverlauf .....	165
Abb. 94: <i>Ranunculus fluitans</i> als Wasserpflanze im Rhein und der dadurch verursachte Schaum am Rheinfluss bei Schaffhausen in der Schweiz (Quelle: <a href="http://www.schmitzens-botanikseite.de">www.schmitzens-botanikseite.de</a> & <a href="http://www.ibm.v.com">www.ibm.v.com</a> ).....	166
Abb. 95: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle VBG – Zulauf ARA Ludesch im Jahresverlauf .....	169
Abb. 96: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle VBG – Ablauf ARA Ludesch im Jahresverlauf .....	169
Abb. 97: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle VBG – Tagesmischprobe im Jahresverlauf .....	170
Abb. 98: Parameter Diosgenin im Verlauf der Jahresreihe der Messstelle VBG – Zulauf ARA Ludesch .....	171
Abb. 99: Anteile der Messstellen je Belastungskategorie Legende: Anzahl der Messstellen (links) und die Probenanzahl je Belastungsquelle (rechts) ..	172
Abb. 100: Das Schäumungsvermögen der Hintergrundmessstellen OÖ – Reichramingbach und W -Halterbach dargestellt als Mittelwert (* $p < 0,05$ ).....	174
Abb. 101: Das Schäumungsvermögen der beiden Hintergrundmessstellen OÖ – Reichramingbach und W -Halterbach dargestellt im Jahresverlauf	175
Abb. 102: Das Schäumungsvermögen der 13 Messstellen in Oberösterreich inkl. Reichramingbach dargestellt als Mittelwert (* $p < 0,05$ ) .....	176
Abb. 103: Das Schäumungsvermögen der 4 Messstellen in Niederösterreich inkl. Halterbach dargestellt als Mittelwert (** $p = 0,000$ ).....	177
Abb. 104: Das Schäumungsvermögen der 10 Messstellen in der Steiermark dargestellt als Mittelwert (* $p < 0,01$ ).....	178
Abb. 105: Das Schäumungsvermögen der 4 Messstellen flussabwärts der Raab (STMK) dargestellt als Mittelwert (* $p < 0,05$ ) .....	179

---

Abb. 106: Das Schäumungsvermögen der Immissionsmessstelle III vor und nach Einleitung der ARA Ludesch und eines Textilbetriebs dargestellt als Mittelwert .....	180
Abb. 107: Das Schäumungsvermögen der beiden Messstellen VBG – III vor Einleitung und VBG – III nach Einleitung dargestellt im Jahresverlauf....	181
Abb. 108: Einfluss auf die Schäumung unterteilt in die verschiedenen Einflussquellen .....	182
Abb. 109: Das Schäumungsvermögen der 3 Emissionsmessstellen der ARA Ludesch (Zulauf, Ablauf und Tagesmischprobe des Textilbetriebs) dargestellt als Mittelwert (* p < 0,05) .....	184
Abb. 110: Das Schäumungsvermögen der 3 Abwassermessstellen dargestellt im Jahresverlauf .....	185
Abb. 111: Resultate des TA 98_ohne S9 der Substanzen Diosgenin, Escin und $\alpha$ -Solanin .....	190
Abb. 112: Resultate des TA 98_ohne S9 der Substanzen Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure .....	191
Abb. 113: Resultate des TA 98_mit S9 der Substanzen Diosgenin, Escin und $\alpha$ -Solanin .....	192
Abb. 114: Resultate des TA 98_mit S9 der Substanzen Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure .....	192
Abb. 115: Resultate des TA 102_ohne S9 der Substanzen Diosgenin, Escin und $\alpha$ -Solanin .....	194
Abb. 116: Resultate des TA 102_ohne S9 der Substanzen Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure .....	194
Abb. 117: Resultate des TA 102_mit S9 der Substanzen Diosgenin, Escin und $\alpha$ -Solanin .....	195
Abb. 118: Resultate des TA 102_mit S9 der Substanzen Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure .....	196
Abb. 119: Übersicht der Messstellen in Westösterreich.....	220
Abb. 120: Übersicht der Messstellen in Oberösterreich.....	221
Abb. 121: Übersicht der Messstellen in Niederösterreich und Wien .....	221
Abb. 122: Übersicht der Messstellen in der Steiermark .....	222

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abb. 123: Übersicht der Messstellen in Vorarlberg .....	222
Abb. 124: Pipettierschema zur Herstellung der Standardkalibration .....	223
Abb. 125: Regelkarte für den Kontrollstandard Digitonin .....	223
Abb. 126: Regelkarte für den Kontrollstandard Diosgenin .....	224
Abb. 127: Regelkarte für den Kontrollstandard Escin .....	224
Abb. 128: Regelkarte für den Kontrollstandard Hederacosid C .....	225
Abb. 129: Regelkarte für den Kontrollstandard Oleanolsäure .....	225
Abb. 130: Regelkarte für den Kontrollstandard $\alpha$ -Solanin .....	226
Abb. 131: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Ager 3 im Jahresverlauf .....	245
Abb. 132: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Antiesen 4 im Jahresverlauf .....	245
Abb. 133: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Dürre Aschach 2 im Jahresverlauf .....	246
Abb. 134: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Dürre Aschach 3 im Jahresverlauf .....	246
Abb. 135: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Feldaist 4 im Jahresverlauf .....	247
Abb. 136: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Große Rodl 3 im Jahresverlauf .....	247
Abb. 137: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Hörschingerbach 1 im Jahresverlauf .....	248
Abb. 138: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Innbach 2 im Jahresverlauf .....	248
Abb. 139: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Ipfbach 1 im Jahresverlauf .....	249
Abb. 140: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Krems 4 im Jahresverlauf .....	249
Abb. 141: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Pram 6 im Jahresverlauf .....	250
Abb. 142: Das Schäumungspotential der Messstellen NÖ – ober- und unterhalb Agrana im Jahresverlauf .....	251

Abb. 143: Das Schäumungspotential der Messstellen NÖ – ober- und unterhalb Jungbunzlauer im Jahresverlauf .....	251
Abb. 144: Das Schäumungspotential der Messstelle STMK – Kainischtraun im Jahresverlauf .....	252
Abb. 145: Das Schäumungspotential der Messstellen STMK – oberhalb Frohnleiten und Weinzödlwehr (Mur) im Jahresverlauf.....	253
Abb. 146: Das Schäumungspotential der Messstelle STMK – Pöls im Jahresverlauf .....	253
Abb. 147: Das Schäumungspotential der Messstellen STMK – Wollsdorf, Feldbach, Ertlermühle und Hohenbrugg (Raab) im Jahresverlauf.....	254
Abb. 148: Das Schäumungspotential der Messstelle STMK – Thörlbach im Jahresverlauf .....	254
Abb. 149: Das Schäumungspotential der Messstelle STMK – Vordernbergerbach im Jahresverlauf.....	255
Abb. 150: Das Schäumungspotential der Messstellen VBG – III vor und nach Einleitung im Jahresverlauf.....	256

## TABELLENVERZEICHNIS

---

### TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Arten und Struktur der Tenside [de.wikipedia.org] .....	43
Tab. 2: Ionisation in der Massenspektrometrie [OTTO, 2011] .....	47
Tab. 3: Grundtypen von Massenanalytoren [GROSS, 2013] .....	49
Tab. 4: Genotypen der eingesetzten <i>Salmonella</i> Teststämme TA 98 und TA 102. * rfa = rough deep factor [MÖLZER, 2007] .....	60
Tab. 5: Ausgewählte Standardmutagene und die verwendeten Konzentrationen [modifiziert nach: MORTELMANS und ZEIGER, 2000] .....	62
Tab. 6: Spontanrevertanzahl bei den verwendeten Standard-Teststämmen [modifiziert nach: MORTELMANS und ZEIGER, 2000] .....	63
Tab. 7: Probenahme-Messnetz für die Jahresreihe .....	67
Tab. 8: Auflistung der im Rahmen des Schaummessnetzes untersuchten Messstellen (MSt.) .....	69
Tab. 9: Verwendete Geräte bei der SPE .....	71
Tab. 10: Verwendete Reagenzien und Chemikalien für die SPE .....	71
Tab. 11: Verwendete Geräte bei der LLE .....	74
Tab. 12: Verwendete Reagenzien und Chemikalien für die LLE .....	75
Tab. 13: Verwendete Geräte für die Standardvorbereitung und Durchführung der LC-MS/MS Analysen .....	77
Tab. 14: LC-MS/MS 1 .....	78
Tab. 15: LC-MS/MS 2 .....	79
Tab. 16: LC-MS/MS 3 und 4 .....	80
Tab. 17: Reagenzien für die LC-MS/MS .....	81
Tab. 18: Standardsubstanzen für die LC-MS/MS .....	82
Tab. 19: Gradient ESI pos. auf der LC-MS/MS 2 (Vorversuche) .....	83
Tab. 20: Inlet und MS File (LC-MS/MS 2) für Positiv-Ionenmodus .....	84
Tab. 21: Gradient ESI pos. auf der LC-MS/MS 1 .....	85
Tab. 22: Inlet und MS File (LC-MS/MS 1) für Positiv-Ionenmodus .....	86
Tab. 23: Gradient ESI pos. LC-MS/MS 3 und 4 .....	87
Tab. 24: UPLC Einstellungen und Source and Gas Parameters MS 3 und 4 ...	88
Tab. 25: Gradient ESI neg. auf der LC-MS/MS 2 für die Oleanolsäure .....	89

Tab. 26: Inlet und MS File (LC-MS/MS 2) für die Oleanolsäure (Negativ-Ionenmodus).....	89
Tab. 27: Standardsubstanzen.....	90
Tab. 28: Gerätenachweis- und Bestimmungsgrenzen der Standardsubstanzen .....	95
Tab. 29: Wiederfindungen der Probenaufbereitungen mittels SPE und LLE ....	95
Tab. 30: Chemikalien und Reagenzien für den Ames Test.....	102
Tab. 31: Geräte zur Ausführung des Ames Tests.....	103
Tab. 32: Materialien zur Ausführung des Ames Tests .....	104
Tab. 33: Stammspezifische Antibiotika für den NB .....	109
Tab. 34: Lagerdauer der Master Platten .....	112
Tab. 35: Agar Platten für die genetische Analyse der verwendeten <i>Salmonella typhimurium</i> Stämme.....	113
Tab. 36: Prüfung auf Abhängigkeiten und Resistenzen im Zuge der genetischen Analyse.....	114
Tab. 37: Mutagene für die Positivkontrolle.....	114
Tab. 38: Verwendete Positivkontrollen im Ames Test.....	115
Tab. 39: Einzelstammlösungen der Saponine .....	115
Tab. 40: Einzellösungen der verwendeten Saponine [c = 100 µg/ml] .....	116
Tab. 41: Verwendete Konzentrationen der Saponine im Ames Test .....	116
Tab. 42: Vorbereitungen für den Ames Test .....	117
Tab. 43: Pipettierschema: Test auf Mutagenität mit und ohne S9-Zugabe ....	119
Tab. 44: Nicht-statistische Klassifikation der analysierten Daten [nach: MORTELMANS und ZEIGER (2000)].....	121
Tab. 45: Zuteilung der 34 Messstellen zu den Belastungsquellen .....	173
Tab. 46: Schäumungsversuch mit den 6 ausgewählten Standardsubstanzen	186
Tab. 47: Übersicht der Daten des Tests auf Mutagenität (mutagenic testing). Die his <sup>+</sup> Revertanten wurden gelistet als Mittelwert ± Standardabweichung (* p < 0,05 zur Negativ Kontrolle).....	188
Tab. 48: LC-MS/MS Ergebnisse der Hintergrundmessstelle Reichramingbach (RR) in OÖ.....	227

## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 49: LC-MS/MS Ergebnisse der Hintergrundmessstelle Halterbach (HB) in Wien .....	227
Tab. 50: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Ager 3 - OÖ .....	228
Tab. 51: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Antiesen 4 - OÖ .....	228
Tab. 52: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Dürre Aschach 2 - OÖ .....	229
Tab. 53: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Dürre Aschach 3 - OÖ .....	229
Tab. 54: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Feldaist 4 - OÖ .....	230
Tab. 55: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Große Rodl 3 - OÖ .....	230
Tab. 56: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Hörschingerbach 1 - OÖ .....	231
Tab. 57: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Innbach 2 - OÖ .....	231
Tab. 58: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Ipfbach 1 - OÖ .....	232
Tab. 59: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Krems 4 - OÖ .....	232
Tab. 60: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Pram 6 - OÖ .....	233
Tab. 61: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Ranna 1 - OÖ .....	233
Tab. 62: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Traun 2 - OÖ .....	234
Tab. 63: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle oberhalb Agrana - NÖ .....	234
Tab. 64: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle unterhalb Agrana - NÖ .....	235
Tab. 65: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle oberhalb Jungbunzlauer - NÖ .....	235
Tab. 66: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle unterhalb Jungbunzlauer - NÖ .....	236
Tab. 67: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Kainischtraun - STMK .....	236
Tab. 68: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Mur oberhalb Frohnleiten - STMK .....	237
Tab. 69: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Mur Weinzödlwehr - STMK ..	237
Tab. 70: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Pöls - STMK .....	238
Tab. 71: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Raab 1 Wollsdorf - STMK ....	238
Tab. 72: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Raab 2 Feldbach - STMK ....	239
Tab. 73: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Raab 3 Ertlermühle - STMK	239
Tab. 74: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Raab 4 Hohenbrugg - STMK .....	240
Tab. 75: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Thörlbach - STMK .....	240

Tab. 76: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Vordernbergerbach - STMK 241	
Tab. 77: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle III vor Einleitung in die Kläranlage ARA Ludesch.....	241
Tab. 78: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle III nach Einleitung in die Kläranlage ARA Ludesch.....	242
Tab. 79: LC-MS/MS Ergebnisse der Abwassermessstelle Zulauf - ARA Ludesch Vorarlberg.....	242
Tab. 80: LC-MS/MS Ergebnisse der Abwassermessstelle Ablauf - ARA Ludesch Vorarlberg.....	243
Tab. 81: LC-MS/MS Ergebnisse der Abwassermessstelle Tagesmischprobe (TMP) Vorarlberg.....	243
Tab. 82: Werte des Schäumungspotentials der Hintergrundmessstellen .....	244
Tab. 83: Werte des Schäumungspotentials der oberösterreichischen Messstellen.....	244
Tab. 84: Werte des Schäumungspotentials der niederösterreichischen Messstellen.....	250
Tab. 85: Werte des Schäumungspotentials der Messstellen in der Steiermark .....	252
Tab. 86: Werte des Schäumungspotentials der Messstellen in Vorarlberg.....	255
Tab. 87: Werte des Schäumungspotentials der Abwassermessstellen in Vorarlberg.....	256

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>2-AA</b>	2-Aminoanthracene	
<b>ACN</b>	Acetonitril	
<b>ARA</b>	Abwasseraufbereitungsanlage	
<b>BG</b>	Bestimmungsgrenze	
<b>&lt; BG</b>	Kleiner Bestimmungsgrenze – nicht quantifizierbar	
<b>CAD</b>	Collision Gas Setting	Kollisionsgas Einstellung
<b>CC</b>	Collision Cell	Kollisionszelle
<b>CE</b>	Collision Energy	Kollisionsenergie
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Chloroform	Trichlormethan
<b>CMC</b>	Critical Micelle Concentration	Kritische Konzentration an Mizellen
<b>CPP</b>	Surfactant Critical Packing Parameter	Kritische Packrate oberflächenaktiver Substanzen
<b>CUR</b>	Curtain Gas	
<b>CXP</b>	Collision Cell Exit Potential	Kollisionszellen Ausgangspotential
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	
<b>EG</b>	Erfassungsgrenze	
<b>ESI</b>	Elektrospray-Ionisation	
<b>EtAc</b>	Ethylacetat	
<b>EtOH</b>	Ethanol	
<b>FIA</b>	Flow Injection Analysis	Fließ-Injektions-Analyse
<b>GA</b>	Glykoalkaloid	
<b>Glu-6-P</b>	Glucose-6-Phosphat	
<b>GS 1</b>	Nebulizer Gas	Zerstäubergas
<b>GS 2</b>	Heater Gas	
<b>HAc</b>	Eisessig (Essigsäure)	
<b>HCl</b>	Hydrogenchlorid	
<b>His<sup>+</sup></b>	Histidin unabhängig	
<b>HFA</b>	Formic Acid	Ameisensäure
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser	
<b>ihe</b>	Interface Heater	

<b>KA</b>	Kläranlage	
<b>KCl</b>	Kalziumchlorid	
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Kaliumphosphat	
<b>LDL</b>	Lower Detection Limit	Nachweisgrenze
<b>LLE</b>	Liquid/liquid-Extraction	Flüssig/Flüssig-Extraktion
<b>LM</b>	Lösungsmittel	
<b>LOD</b>	Limit of Detection	Nachweisgrenze
<b>LOQ</b>	Limit of Quantitation	Bestimmungs- bzw. Quantifizierungsgrenze
<b>LW</b>	Landwirtschaft	
<b>LC-MS/MS</b>	Liquid Chromatography – Tandem Massspectrometry	Flüssigkeitschromatographie – Tandem Massenspektroskopie
<b>IFEW</b>	Institut für Ernährungswissenschaften	
<b>IPA</b>	Isopropanol	2-Propanol
<b>IS</b>	Ion Spray Voltage	Ionensprüh-Spannung
<b>MeOH</b>	Methanol	
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid	
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Magnesiumsulfat	
<b>MMC</b>	Mitomycin C	
<b>MW</b>	Mittelwert	
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid	
<b>NADP</b>	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat	
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid	
<b>NB</b>	Nutrient broth	Nährbouillon
<b>NG</b>	Nachweisgrenze	
<b>NOAEL</b>	No Observed Adverse Effect Level	
<b>n.n.</b>	nicht nachweisbar	
<b>4-NOPD</b>	4-nitro-o-phenylenediamine	
<b>NMR</b>	Nuclear Magnetic Resonance	Kernspinresonanz
<b>OA</b>	Oleanolic Acid	Oleanolsäure
<b>OVNC</b>	Overnight Culture	Übernacht Kultur
<b>PBS</b>	Phosphatpuffer	
<b>ppt</b>	Parts per Trillion	1 Teil pro Billion
<b>RP</b>	Reversed Phase Chromatography	Umkehrphasen Chromatographie
<b>RT</b>	Retention Time	Retentionszeit

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

<b>SEV</b>	Sekundärelektronenvervielfacher	
<b>SD</b>	Standardabweichung	
<b>SIM</b>	Select Ion Monitoring	Ausgewähltes Ionen Monitoring
<b>SPE</b>	Solid Phase Extraction	Festphasenextraktion
<b>S9-Mix</b>	Rat liver homogenate	Rattenleberhomogenat
<b>TA</b>	Top Agar	
<b>TA 98</b>	Histidin auxotropher <i>Salmonella typhimurium</i> Teststamm 98	
<b>TA 102</b>	Histidin auxotropher <i>Salmonella typhimurium</i> Teststamm 102	
<b>TEM</b>	Temperatur	
<b>TOC</b>	Total Organic Carbon	Gesamter Organischer Kohlenstoff
<b>UBA</b>	Umweltbundesamt GmbH Wien	
<b>VK</b>	Variationskoeffizient	
<b>WF</b>	Wiederfindung	



## 1. Einleitung und Fragestellung

Schaum wird immer wieder auf unterschiedlichen Gewässern in ganz Österreich beobachtet, wobei dies meist ein optisches Problem darstellt und nicht zwangsweise als toxisch bzw. ökologisch bedenklich eingestuft werden kann. Schaumbildung deutet aber meist auf Verunreinigung durch Abwasser und andere organische Substanzen hin. Die Schaumproblematik an sich ist ein sehr komplexes Geschehen, geht mit einem hohen medialen Interesse einher und führt in einzelnen Fällen zu transnationalen Problemen. Die Ursachen für eine Schaumbildung können sehr vielfältig sein und viele bekannte und unbekannte Faktoren beeinflussen diese. Aus diesem Grund setzen sich das Umweltbundesamt und viele andere Institutionen aktiv mit diesem Thema auseinander. Die Beschäftigung mit der Schaumproblematik ist jetzt und wird auch in Zukunft wichtig sein und bleiben, um auch für nachfolgende Generationen die Erhaltung und die gute Qualität von österreichischen Frischwasser-Ökosystemen zu garantieren.

Das vorliegende Dissertationsvorhaben beleuchtet den Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Saponinen und der Entstehung von Schaum auf Fließ- und Oberflächengewässern. Es ist eine Kooperation zwischen dem Umweltbundesamt (Abteilung Organische Analysen), der Universität Wien (Department für Ernährungswissenschaften – Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner) und der Technischen Universität Wien (Institut für Wassergüte, Ressourcenmanagement und Abfallwirtschaft – Ao. Univ.-Prof. Dr. Matthias Zessner). Da es zur Zeit keine gesetzlichen Vorschriften für den Umgang mit Schaum auf Fließ- und Oberflächengewässern in Österreich bzw. Europa gibt, wurde das Schaumprojekt vom Umweltbundesamt bzw. dem Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, welches als Auftraggeber fungiert, ins Leben gerufen. Dieses Großprojekt, in das die vorliegende Dissertation eingegliedert ist, ist in zwei Phasen unterteilt, wobei die Erste bereits abgeschlossene Phase sich mit der Erarbeitung der fachlichen Grundlagen zum Thema Schaumproblematik beschäftigte und eine Zusammenfassung des aktuellen Wissenstandes ist

[DRAXLER et al., 2009]. Auf dieser Basis wurde eine zweite Phase ausgearbeitet, welche ein Untersuchungsprogramm für eine Vereinheitlichung der Bewertung des Schaumvorkommens und der Maßnahmen zur Vermeidung von Schaum auf Oberflächengewässern beinhaltet. Das allgemeine Ziel des Projektes liegt in der Schaffung einer geeigneten bzw. vergleichbaren Datenbasis und einem daraus resultierenden besseren Verständnis für die Schaumbildung auf österreichischen Fließgewässern. Wobei eine Standardisierung der Probenahme, der Bewertung und der Durchführung von Analysen angestrebt wird. In diesem Projekt eingegliedert ist die Entwicklung einer analytischen Labormethode zur quantitativen Bestimmung von Saponinen mittels Flüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) in Oberflächengewässern und vereinzelt auch in Abwässern, welche im Rahmen dieser Dissertation entwickelt wurde. In Zusammenarbeit mit der TU Wien wurde ein qualitätsgesicherter Test zur Bestimmung des Schäumungspotentials als Bewertungsgrundlage von Schaum auf Oberflächengewässern erarbeitet [KREUML et al., 2011; KREUML et al., 2012]. Des Weiteren wurden am Department für Ernährungswissenschaften genotoxische Untersuchungen in Form des Ames Tests auf Mutagenität und Oxidativität der ausgewählten Saponine in Zusammenarbeit mit Julia Rath einer Masterstudentin durchgeführt.

Um die Anwendbarkeit der entwickelten Labormethode zu prüfen, wurden 34 Messstellen (31 Immission- und 3 Emissionsmessstellen) in ganz Österreich über einen Zeitraum von einem Jahr monatlich beprobt und diese 481 Proben mittels LC-MS/MS auf die ausgewählten Saponine analysiert. Da Saponine oberflächenaktive Substanzen sind und stabile Schäume hervorrufen können, wurden diese Proben ebenfalls mit dem entwickelten Schäumungstest auf deren Schäumbarkeit untersucht. Danach wurde auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Saponine in den Proben und dem Auftreten von Schäumen geprüft. Da viele Saponine toxisch wirken, wurden die in den Oberflächengewässern detektierten Saponinkonzentrationen in einem Bakterienrückmutationstest, dem Ames Test getestet, um auch eine Aussage bezüglich deren toxikologischen Bedeutung zu machen.

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1. Saponine**

Der Name Saponin wurde erstmals 1819 im Gmelischen Handbuch der theoretischen Chemie erwähnt. Der Lateinische Wortstamm „SAPO“ bedeutet SEIFE. Man geht davon aus, dass die Bezeichnung Saponine davon hergeleitet wurde [PODOLAK et al., 2010]. Saponine sind eine sehr heterogene Gruppe von hochmolekularen Glykosiden, die natürlich in mehr als 100 Pflanzenfamilien und in einigen Meerestieren (Seegurke, Seestern, ...) vorkommen und zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zählen. Sie wurden aus unterschiedlichen Teilen verschiedenster Pflanzen isoliert und kommen meist in sehr nährstoffreichem Gewebe, wie Wurzeln, Knollen, Sprossachsen, Rinden, Blätter, Samen und Früchten vor [VINCKEN et al., 2007; MAN et al., 2010]. Aufgrund ihrer insektiziden, anthelmintischen und molluskiziden Eigenschaften dienen Saponine den Pflanzen wahrscheinlich als Abwehrstoffe gegenüber Tierfraß und mikrobiellen Befall [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

Die Bioverfügbarkeit von Saponinen ist sehr gering und in der Literatur mit unter 3 % angegeben [WATZL, 2001]. Allerdings ist die Datenlage nicht sehr überzeugend. Die meisten Komponenten werden nach oraler Aufnahme nur sehr schlecht absorbiert [PODOLACK et al., 2010]. In einer Studie von LI et al., 2005 wurde gezeigt, dass die absolute Bioverfügbarkeit von Dioscin nach oraler Gabe bei Ratten nur bei 0,2 % lag. Wie hoch die Absolutwerte beim Menschen sind, ist bisher unbekannt.

#### **2.1.1. Begriffsdefinition**

Die klassische Definition der Saponine basiert auf deren Oberflächenaktivität. Die meisten Saponine haben reinigende Eigenschaften, bilden stabile Schäume in wässriger Lösung, besitzen eine hämolytische Aktivität, sind in vielen Pflanzen für den bitteren Geschmack verantwortlich und wirken auf Fische

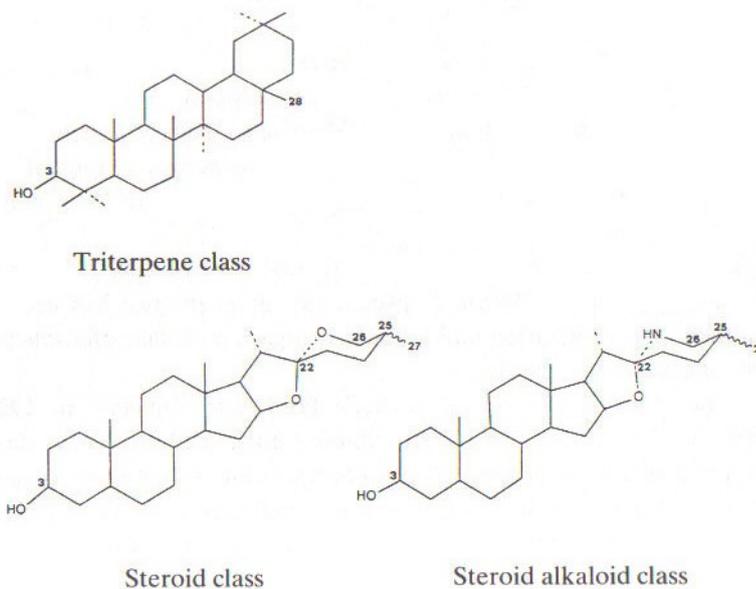
toxisch. Diese Attribute, welche zwar nicht für alle Saponine typisch sind, wurden dazu verwendet diese spezielle Stoffklasse zu charakterisieren [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

### 2.1.2. Chemische Struktur und Einteilung der Saponine

Die chemische Struktur der Saponine setzt sich aus einem lipophilen apolaren Aglykon, dem Genin oder Sapogenin, welches entweder ein Triterpen, Steroid oder Steroidalkaloid ist, gekoppelt mit einer oder mehreren hydrophilen polaren Monosaccharid-Seitenketten, dem Glykon zusammen [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

Die Einteilung der Saponine erfolgt in drei Hauptklassen (Abb. 1) basierend auf der Molekülstruktur des Sapogenins:

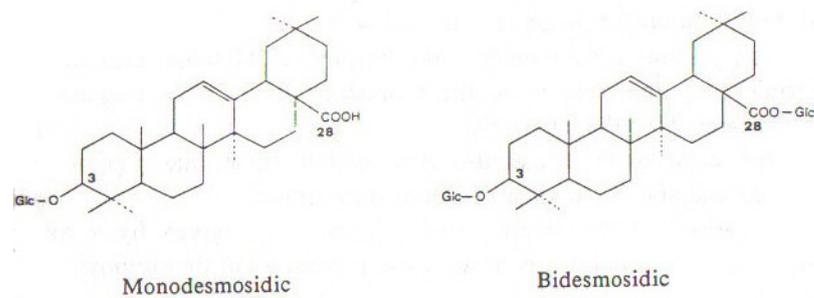
1. Triterpen Glykoside
2. Steroid Glykoside
3. Steroidalkaloidglykoside [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].



**Abb. 1: Grundstruktur der 3 Hauptklassen der Sapogenine [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995]**

## LITERATUR

Die Monosaccharid-Seitenketten des Glykons bestehen meist aus D-Glucose (Glc), D-Galactose (Gal), D-Fructose (Fru), L-Rhamnose (Rha), D-Xylose (Xyl), L-Arabinose (Ara) und D-Glucuronsäure (GlcA). Je nachdem wo, welche und wie viele Zuckerreste angelagert sind, unterscheidet man zwischen *monodesmosidischen* Saponinen, welche den Zuckerrest an der C3-Position haben und *bidesmosidischen* Saponinen, bei denen die Seitenketten über die C3- und C28 oder C26-Position an das Aglykon gebunden sind (Abb. 2). Des Weiteren gibt es noch *tridesmosidische* Saponine, welche 3 Zuckerkettenreste haben, aber nur sehr selten vorkommen [BÖTTGER, 2012; HASSAN et al., 2010; HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].



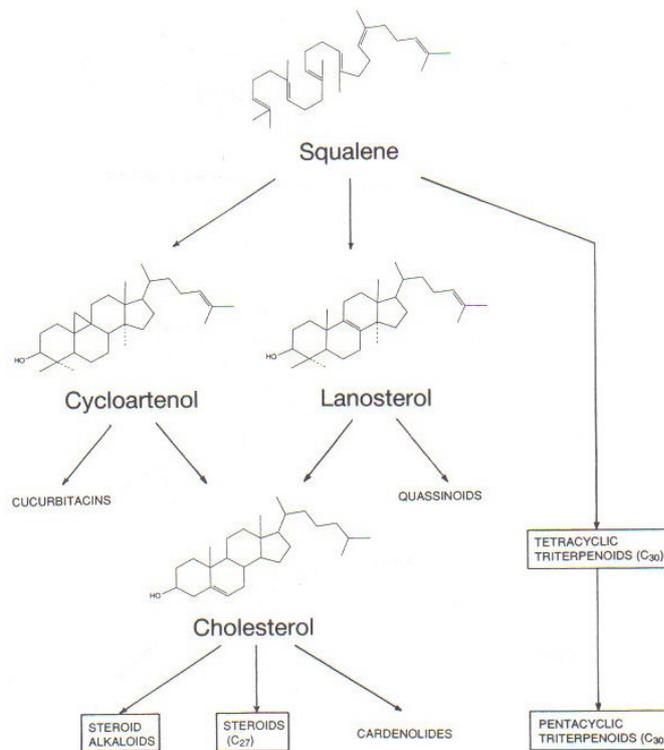
**Abb. 2: Mono- und bidesmosidische Saponine  
[HOSTETTMANN und MARSTON, 1995]**

### 2.1.2.1. Die Biosynthese und Klassifikation der Saponine

Die Biosynthese der Saponine verläuft über den Isoprenweg. Dabei werden immer 3 Isopreneinheiten, ein Molekül welches 5 C Atome beinhaltet, jeweils mit dem Kopf am Ende des vorigen verbunden (Abb. 3). Daraus entsteht ein Farnesylpyrophosphat, ein Molekül mit 15 C Atomen. Anschließend werden zwei dieser Einheiten Kopf an Kopf verbunden und daraus resultiert eine chemische Verbindung mit 30 Kohlenstoffatomen auch Squalen genannt. Squalen wird zu Oxidosqualen oxidiert, wobei dies der übliche Startpunkt für eine Zyklisierungsreaktion, zur Triterpenbiosynthese ist.

Das Oxidosqualen wird in ein zyklisches Derivat durch Protonierung und die Öffnung des Epoxidringes überführt. Dadurch wird ein Carbokation gebildet,

welches anschließend verschiedene zyklische Reaktionen durchläuft. Nach dem Ringschluss können viele verschiedene Umlagerungsreaktionen stattfinden. Dies geschieht über Übergänge von Wasserstoffatomen auf benachbarte Kohlenstoffe und/oder Methylgruppenwanderungen. Zum Schluss werden die neugebildeten Carbokationen neutralisiert. Die Neutralisation erfolgt meist durch Protonenelimination, wobei eine Doppelbindung oder ein zyklischer Propanylring entsteht oder durch eine Reaktion mit Wasser, bei der eine Hydroxylgruppe gebildet wird. Die Hauptzyklisierungs- und Umlagerungsreaktionen führen zu Triterpen- oder Steroid-Gerüsten [VINCKEN et al., 2007].



**Abb. 3: Biosynthese der Triterpene und Steroide**  
[HOSTETTMANN und MARSTON, 1995]

Die Art der Zykklase, die an dieser Reaktion beteiligt ist, bestimmt maßgeblich welches Saponingerüst gebildet wird. Die Zykklisierung von Oxidosqualen zu einem Saponin kann in zwei Variationen erfolgen, entweder über die Sessel-Sessel-Sessel oder die Sessel-Wanne-Sessel Konformation. Der bedeutende

## LITERATUR

Unterschied zwischen den beiden resultierenden Saponingerüsten liegt in der Stereochemie, dies ist am deutlichsten an der Konfiguration des C-8 und C-14 Atoms zu sehen. So entstehen die Strukturen der 11 Hauptklassen (Abb. 4) der Kohlenstoffgerüste der Saponine und deren verschiedene Derivate [VINCKEN et al., 2007].

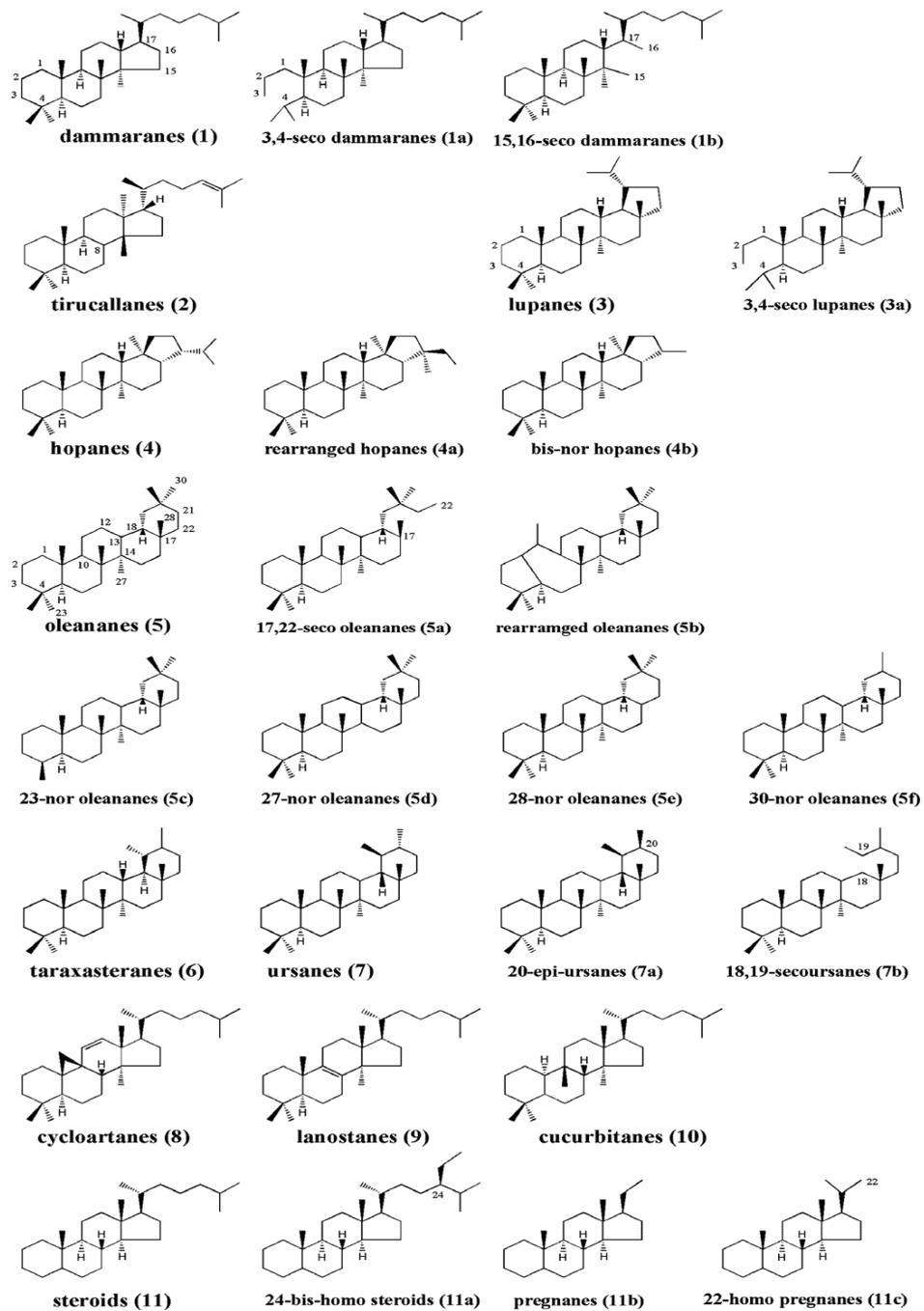


Abb. 4: Strukturen der 11 Hauptklassen von Kohlenstoff-Gerüsten der Saponine [VINCKEN et al., 2007]

### 2.1.2.2. Die Klassen der Aglykone

Es gibt 3 Hauptklassen der Aglykone; die Steroide, Steroidalkaloide und die Triterpene [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

#### 2.1.2.2.1 Steroide

Zurzeit sind über 100 Steroidsapogenine bekannt und die meisten von ihnen werden von dem Furostan- oder Spirostan-Gerüst abgeleitet (Abb. 5). In allen Fällen ist die am C-18 und C-19 Atom angewinkelte Methylgruppe  $\beta$ -orientiert und die Methylgruppe am C-21 weist eine  $\alpha$ -Konfiguration auf. Die Steroidsapogenine sind meist am C-3 hydroxyliert und verfügen über eine 5,6-Doppelbindung [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

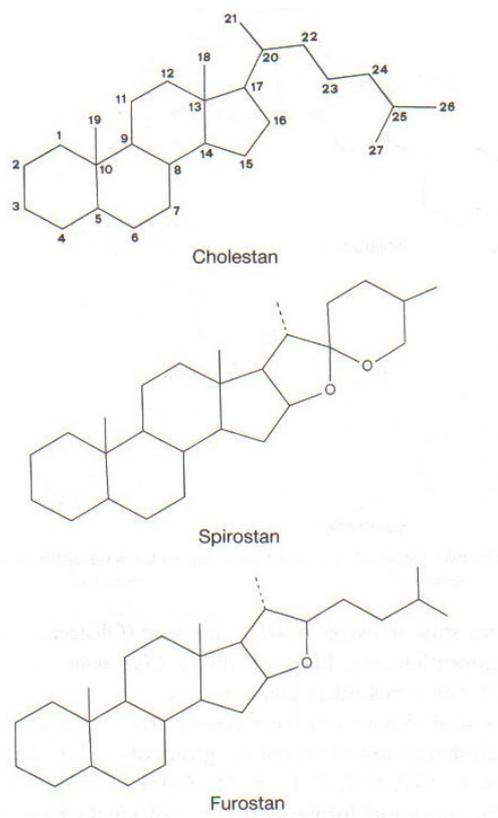


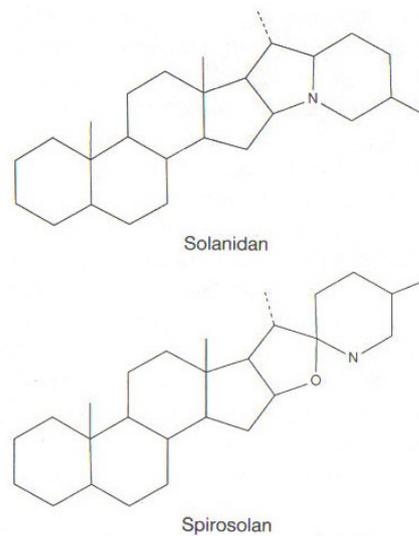
Abb. 5: Die häufigsten Klassen der Steroidsapogenine [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995]

## LITERATUR

---

### 2.1.2.2 Steroidalkaloide

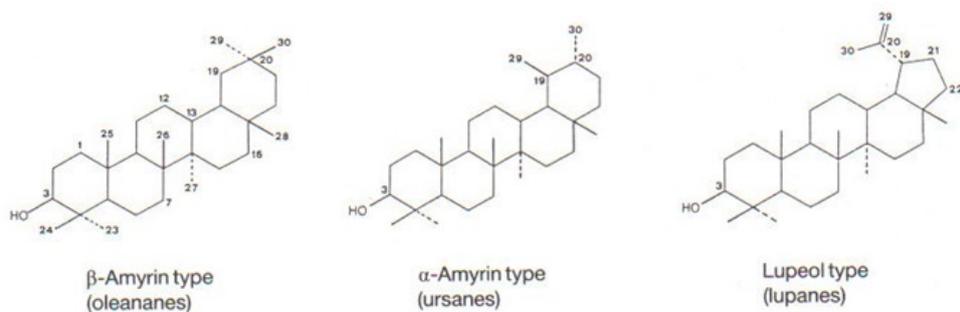
Es gibt 2 Klassen von Steroidalkaloidsapogeninen (stickstoffhaltige Steroide) und zwar den Solanidan- und den Spirosolan Typ (Abb. 6) [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].



**Abb. 6: Die zwei Klassen der Steroidalkaloide**  
[HOSTETTMANN und MARSTON, 1995]

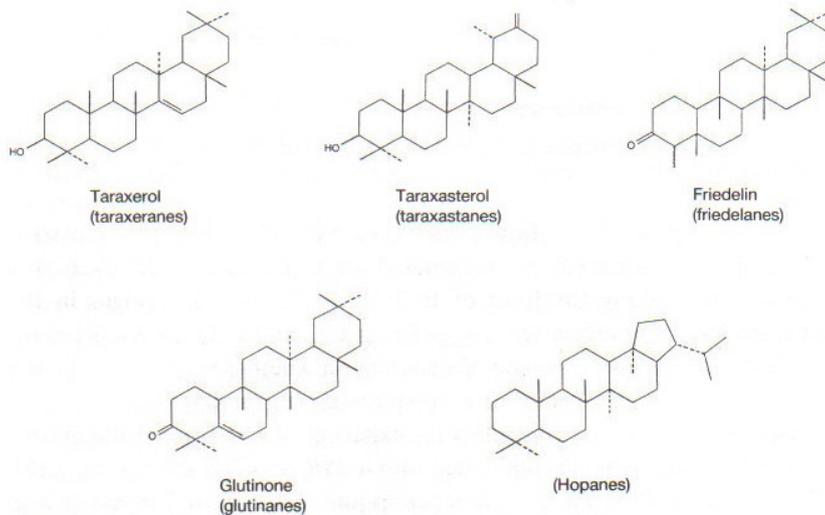
### 2.1.2.2.3 Triterpene

Die pentazyklischen Triterpene können in 3 Hauptklassen eingeteilt werden, abhängig davon ob sie ein  $\beta$ -Amyrin,  $\alpha$ -Amyrin oder Lupeol Gerüst enthalten (Abb. 7) [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].



**Abb. 7: Die Hauptklassen der Triterpensapogenine**  
[modifiziert nach: HOSTETTMANN und MARSTON, 1995]

Die am häufigsten vorkommenden Triterpensaponine sind die des  $\beta$ -Amyrin-Typs mit über 50 %, wobei das am weitverbreitetste Aglykon dieser Klasse die Oleanolsäure (OA) ist. Zu den Nebenklassen der Triterpensaponine zählen die Taraxerane, Friedelane, Glutinone und die Hopane (Abb. 8) [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].



**Abb. 8: Die Nebenklassen der Triterpensapogenine**  
[HOSTETTMANN und MARSTON, 1995]

### 2.1.3. Vorkommen in Pflanzen und Meerestieren

Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Pflanzen-Taxonomie und dem Saponintyp. Steroidsaponine sind in Liliopsida (Monokotyledonen = Einkeimblättrigen Pflanzen) und Triterpensaponine vorwiegend in Magnoliopsida (Dikotyledonen = Blütenpflanzen oder Angiospermen) enthalten, welche weitverbreitet sind. Abbildung 9 zeigt das Kladogramm von Pflanzensubklassen aus denen Saponine isoliert und charakterisiert wurden. Aufgrund der großen Auswahl an Saccharidseitenketten und der unterschiedlichen Typen von Monosacchariden entsteht eine große strukturelle Vielfalt, welche sich in ihren physiochemischen und biologischen Eigenschaften widerspiegelt [PODOLACK et al., 2010; VINCKEN et al., 2007].

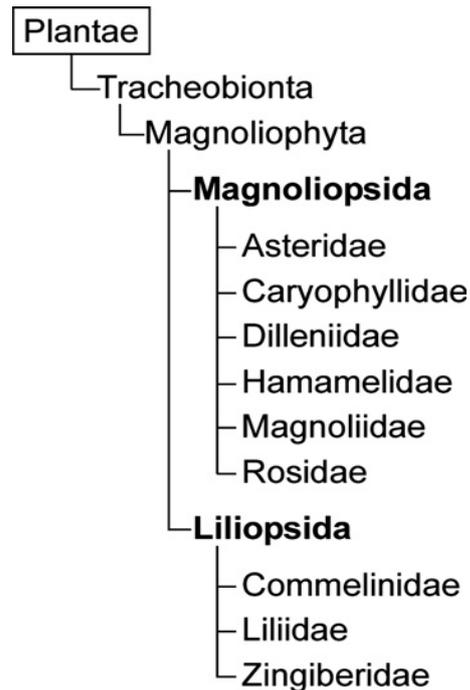


Abb. 9: Kladogramm der Pflanzensubklassen  
[VINCKEN et al., 2007]

Saponine sind im Pflanzenreich sehr weit verbreitet. Bereits im Jahre 1927 hat Kofler 472 saponinhaltige Pflanzen aufgelistet (Kofler, 1927) und es war bekannt, dass über 90 Pflanzenfamilien Saponine enthielten. GUBANOV et al. fand 1970 in einer systematischen Untersuchung von 1720 Pflanzen aus Zentralasien heraus, dass 76 % der untersuchten Pflanzenfamilien saponinhaltig waren. Saponine kommen in Pflanzen vor, welche als Nahrungsmittel genutzt werden: Sojabohnen, Kichererbsen, Erdnüsse, Mungbohnen, Saubohnen, Kidneybohnen, Linsen, Erbsen, Spinat, Hafer, Melanzani (Auberginen), Spargel, Bockshornklee, Knoblauch, Zuckerrüben, Kartoffeln, Grüner Pfeffer, Tomaten, Zwiebel, Tee, Cassava (Maniok), Yams (Yamswurzel, Discorea) und in hülsenfruchtartigem Futtermitteln wie zum Beispiel Alfalfa (Luzerne). Des Weiteren werden Saponine auch als pflanzliche Heilmittel in Arzneimitteln eingesetzt [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

#### 2.1.4. Allgemeine Eigenschaften von Saponinen

Die meisten Saponine sind in Wasser und Alkohol löslich, nur wenige in Ether, Chloroform, Benzol, Ethylacetat und Eisessig. Aufgrund ihrer hohen strukturellen Diversität ist es sehr schwierig generelle Aussagen über Saponine zu tätigen und diese über ihre physikalischen und biologischen Eigenschaften einzuteilen. Viele weisen hämolytische, fischtoxische, Cholesterolkomplexierende und schäumende Eigenschaften auf, aber die Besonderheiten der Strukturen machen den generellen Gebrauch dieser Kriterien zur Einteilung nahezu unmöglich. Einzig das oberflächenaktive Verhalten und die Interaktion von Saponinen mit Zellmembranen haben eine große Bedeutung bei den klassischen allgemeinen Eigenschaften von Saponinen [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

##### 2.1.4.1. Hämolyse

Die Fähigkeit der Saponine Hämolyse von Blut *in vitro* zu verursachen wurde erstmals 1887 von KOBERT beschrieben. Bereits niedrige Konzentrationen von Saponinlösungen sind in der Lage Erythrozytenmembrane zu zerstören und das darin enthaltene Hämoglobin freizusetzen. Dieses Phänomen beruht auf der Eigenschaft die Oberflächenspannung zwischen der wässrigen Phase des Blutes (Plasma) und der lipophilen Erythrozytenmembran zu reduzieren. Eine Emulsion der Lipide wird hervorgerufen und infolgedessen erfolgt eine Lyse der Membran. Durch die entstandenen Löcher diffundieren Natrium und Wasser in die Zelle, wogegen Kalium diese verlässt. Beim vollständigen Reißen der Membran läuft das Hämoglobin ins Plasma aus. Die Hämolyse kann zur quantitativen Bestimmung von Saponinen verwendet werden und beruht auf der Sensitivität der roten Blutkörperchen auf diese Stoffklasse. Der Hämolytische Index (HI) wird wie folgt berechnet:  $30000 \times a/b$ , wobei  $a$  die Menge eines Standardsaponins und  $b$  die Menge des getesteten Saponins (beide in Gramm) ist, welches für eine komplette Hämolyse von Blut benötigt wird. Die hämolytische Aktivität variiert beträchtlich, was auf die hohe strukturelle Vielfalt

## LITERATUR

---

und im Speziellen auf die Struktur der Glykoside zurückzuführen ist. Monodesmosidische Triterpen- und Steroidsaponine (außer Acylglycoside und Glycyrrhizin) und Estersaponine weisen eine sehr starke hämolytische Aktivität auf [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995; SPARG et al., 2004].

### 2.1.4.2. Bitterkeit

Viele Saponine sind für die Bitterkeit von Nutzpflanzen, die für den Verzehr geeignet sind, verantwortlich. Dazu zählen zum Beispiel Saponine in der Samenschale von Quinoa (*Chenopodium quinoa*, Chenopodiaceae), welche vor dem Kochen durch intensives Waschen entfernt werden müssen oder das acetylierte Sojasaponin der Sojabohne und Saponine des Spargels (*Asparagus officinalis*, Liliaceae). Das Tridesmosid der 16  $\alpha$ -Hydroxymedicagensäure (zahnig acid) isoliert aus der Alfalfa-Pflanze ist der bitterste und rachenreizenste Stoff aller reinen Saponine. Im Vergleich dazu gibt es auch Ausnahmen, wie das Hauptsaponin des Süßholzes *Glycyrrhiza glabra* (Lakritze) welches 50mal süßer als Saccharose ist [GÜÇLÜ-USTÜNDAĞ und MAZZA, 2007; HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

### 2.1.5. Physikochemische Eigenschaften

Saponine sind nichtflüchtige, oberflächenaktive Substanzen, wobei die Kombination von polaren und apolaren Strukturelementen, welche für den amphiphilen Charakter des Moleküls verantwortlich ist, das Seifverhalten bzw. die Schaumbildung in wässrigen Lösungen hervorruft [VINCKEN et al., 2007]. Aufgrund ihrer amphiphilen Molekülstruktur haben sie die Möglichkeit, mit lipophilen und hydrophilen Molekülen zu interagieren. Die hydrophilen Zuckerreste der Saponine sind meist Glukose, Galaktose, Glukuronsäure, Xylose, Rhamose, aber auch Arabinose, Fruktose und Quinovose. Als hydrophobe Aglykone (Sapogenin) kommen Triterpenoide, Steroide und Steroidalkaloide in der Natur vor [BÖTTGER, 2012].

Oberflächenaktive Substanzen reichern sich an der Oberfläche an und initiieren eine Absenkung der Oberflächenspannung und -energie, welche üblicherweise die Voraussetzung für eine Schaumbildung ist. Saponine finden in traditionellen (als Seifen, Fischgifte und Molluskizide) und industriellen Zweigen, wie der Lebensmittel-, Kosmetik-, Landwirtschafts- und Pharmaindustrie Anwendung. Sie werden als nicht-ionische natürliche Tenside, Emulgatoren, Süßstoffe, Schaumbildner, Reinigungs- und Waschmittel und als Rohmaterial für die Produktion von Arzneimittel und Kosmetikprodukte eingesetzt [GÜÇLÜ-USTÜNDAĞ und MAZZA, 2007; PODOLACK et al., 2010].

### **2.1.6. Biologische und pharmakologische Eigenschaften von Saponinen**

Saponine haben aufgrund ihrer weiten Verbreitung in der Natur und ihrer strukturellen Diversität eine Vielzahl an biologischen und pharmakologischen Eigenschaften, dazu zählen die hämolytische, entzündungshemmende, antimykotische, antibakterielle, antimikrobielle, antivirale, cholesterinsenkende, molluskizide und anthelmintische Aktivität sowie die Zytotoxizität. Außerdem wirken sie schleimlösend, hustenstillend, vasoprotektiv, hypoglykämisch und immunmodulierend [SPARG et al., 2004; VINCKEN et al., 2007; HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

Einzelne Studien zeigen einen Effekt von Saponinen auf die Cholesterolemie indem sie Komplexe mit Cholesterolemie bilden, wobei dies speziell bei den Triterpensaponinen der Alfalfa Pflanze und der Sojabohne zu beobachten ist. In einer Studie mit Affen wurde bewiesen, dass das Steroidsaponin Digitonin einer Hypercholesterolemie vorbeugt [SAUVAIRE et al., 1991; HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

Die Liste der biologischen Aktivitäten in Verbindung mit Saponinen ist sehr lang. Einige Attribute wie die fungiziden und fischtoxischen Effekte sind seit vielen Jahrhunderten bekannt, während laufend neue Eigenschaften festgestellt werden. Bitterkeit und das Auslösen von Gebärmutterkontraktionen sind nur zwei davon [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

## LITERATUR

---

### 2.1.6.1. Antimikrobielle Wirkung

Die Funktion der Saponine in Pflanzen wird aufgrund ihrer meist sehr hohen Vorkommen (bis zu 30 %) in verschiedenen Spezies in Frage gestellt. Eine der Theorien zielt auf den Schutz der Pflanzen gegen Pilzattacken. Dabei werden bidesmosidische Saponine vermehrt in den Pflanzenteilen, welche ständig verschiedensten Mikroorganismen ausgesetzt sind, wie zum Beispiel Wurzeln, Rinden und Samen, gefunden. Wird pflanzliches Gewebe beschädigt, werden Enzyme freigesetzt, welche bidesmosidische Saponine in ihre monodesmosidischen Derivate umwandeln, die die Pflanze vor einer mikrobiellen Invasion an den beschädigten Stellen schützen. Ein Beispiel dafür wäre das  $\alpha$ -Hederin, welches aus dem Hauptsaponin des Efeus (*Hedera helix*) dem Hederasaponin C gebildet wird. Der antimikrobielle Effekt wird bei allen Saponinen den Steroid, Steroidalkaloid und Triterpen Glykosiden beobachtet. Einzig das Furostanol Saponin (bidesmosidisch) hat keine antibiotische Wirkung [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995; SPARG et al., 2004].

### Fungizide Wirkung

Die stärksten fungiziden Effekte finden sich bei den monodesmosidischen Saponinen mit 4 bis 5 Monosacchariden, da kürzere Kohlenstoffketten zu einer geringeren Wasserlöslichkeit und somit zu einer schwächeren antimykotischen Aktivität führen. Verschiedene Ester-Saponine, wie zum Beispiel das Escin inhibieren Pilzwuchs, während andere bidesmosidische Substanzen dagegen weitgehend inaktiv sind. Die Mechanismen der Wirkung der Saponine gegen Pilze beruht auf der Bildung von Komplexen der Plasmamembran mit Sterolen (Aglykonstrukturen), welche die Semipermeabilität der Zellwände zerstören und in weiterer Folge zum Zelltod führen. Die Krankheitsresistenz von Kartoffelsorten wird auf die Anwesenheit von Glykoalkaloiden zurückgeführt.  $\alpha$ -Solanin ist aktiv gegen *Trichoderma viride*, *Helminthosporium carbonum*, *Fusarium caeruleum*, *Cladosporium fulvum* und andere Pilzstämme. Auch die verwendeten Saponine Diosgenin und Digitonin haben eine starke fungizide Wirkung [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995; SPARG et al., 2004].

### **Antibakterielle Wirkung**

Spirostanol Saponine der Pflanze *Dracaena mannii* (Agavaceae), welche ebenso sehr starke fungizide Effekte aufweisen, wurden auch auf ihre bakteriostatische Wirkung getestet. Sie waren zwar inaktiv in Bezug auf gram-negative Bakterien, aber es wurden schwach hemmende Effekte auf die gram-positiven Stämme *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes* belegt [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995; SPARG et al., 2004].

### **Antivirale Wirkung**

*In vitro* wurde bei einigen Glykosiden der azyklischen  $\beta$ -Amyrin-Aglykone eine Wirkung gegen Influenza Viren beobachtet. Diese *in vitro* Effekte manifestieren sich durch eine Hemmung der zytopathischen Aktivität und einer Reduktion der Viruspopulation. Die Glymnemicsäure A ist *in vivo* aktiv und kann in sehr frühen Stadien zur Prävention einer Virusinfektion eingesetzt werden. Auch Asterosaponine haben eine inhibierende Wirkung auf die Vermehrung von Influenzaviren. Bereits ab einer Dosis von 1  $\mu\text{g/ml}$  reduzieren Crossasteroides B und D von *Crossaster papposus* (Seesterne) die Plaquebildung des Pseudorabies Virus (Suid herpes virus 1, SHV-1) um 43 beziehungsweise 27 Prozent [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995; SPARG et al., 2004].

#### **2.1.6.2. Zytotoxische und anti-tumor Wirkung**

Ein Zusammenhang zwischen der Struktur und der zytotoxischen Aktivität wurde für Steroid- und Triterpenoidsaponine beschrieben. Durch ihren amphiphilen Charakter wirken speziell monodesmosidische Saponine zytotoxisch, da sie die Permeabilität der Zellmembrane erhöhen und dadurch die Zellyse begünstigen. Einige Saponine wirken auch aufgrund ihrer entzündungshemmenden Eigenschaften negativ auf die Tumorumgebung und verhindern somit die Entstehung und Progression von Krebs. Viele Triterpene und Steroidsaponine zeigten in „*in vivo*-Studien“ Anti Tumor Aktivitäten

## LITERATUR

---

[EID et al., 2012; POLLIER und GOOSSENS, 2012; PODOLAK et al., 2010; HOSTETTMANN und MARSTON, 1995; SPARG et al., 2004].

### **2.1.6.3. Antimutagene Wirkung**

Die antimutagenen Eigenschaften von einigen Saponinen wurden erst einmal mittels Ames Test untersucht, dazu wurde ein bekanntes Promutagen Benzo[a]pyrene (BaP) und ein mutagenes Urinkonzentrat eines Rauchers verwendet. Während Saponine von *Calendula arvensis* (Asteraceae) und *Hedera helix* (Araliaceae) die mutagene Aktivität von BaP hemmen, zeigt sich, dass nur die Saponine der Efeublätter die Mutagenität des Raucherurins herabsetzen. Die Resultate wurden mit denen eines bekannten Antimutagens Chlorophyllin verglichen, wobei die eingesetzte Dosis der Saponine mit 200 µg das Doppelte des Chlorophyllin entsprachen, um dieselben antimutagenen Effekte zu erzielen [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

### **2.1.6.4. Fischtoxische Wirkung**

Saponine wirken toxisch auf Fische und Frösche die Kiemen zum Atmen benutzen. Der Mechanismus dieser Toxizität erklärt sich dadurch, dass Saponine an die Kiemenmembrane binden und deren Permeabilität erhöhen. In weiterer Folge führt dies zu einem erhöhten Verlust an physiologisch wichtigen Elektrolyten. Die fischtoxischen Eigenschaften von Pflanzen wurden seit Jahrhunderten dazu verwendet, um Fische aus fließenden Gewässern und großen Aufzuchtteichen abzufischen. Dazu zählen Pflanzen der Gattungen Leguminosae, Sapindaceae, Polygalaceae, Euphorbiaceae, Loganiaceae, Rubiaceae, Balanitaceae und Primulaceae. Fischtoxische Saponine wurden aber auch in Meeresorganismen als Abwehrstoff gegen potentielle Räuber gefunden. Die toxischen Eigenschaften von Seegurken sind ebenso jahrhundertlang bekannt. Im Pazifischen Raum wurden diese traditionell zerdrückt oder gehackt als Fischgift in Gezeitentümpel eingesetzt [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

#### **2.1.6.5. Molluskizide Wirkung**

Da Saponine eine ausgeprägte Wirkung auf Weichtiere haben ist die molluskizide Wirkung auf Schnecken von großem Interesse, da diese als tropische Parasiten die Krankheit Schistosomiasis (Bilharziose) auslösen von der weltweit etwa 250 Millionen Menschen betroffen sind. Es gibt viele saponinhaltige Pflanzen die sehr effektiv gegen diese Schnecken und die von ihnen ins Wasser freigesetzten und so übertragenen Pärchenegel (*Schistosoma mansoni*) wirken. Dies ist speziell in ärmeren Gegenden von Bedeutung, da diese die teuren synthetischen Chemikalien nicht finanzieren können. Diese Pflanzen, welche Saponine enthalten, sind für großflächigen Einsatz geeignet, da sie eine hohe molluskizide Aktivität aufweisen, gut wasserlöslich sind, meist in großen Mengen und weit verbreitet in Pflanzen enthalten sind und die orale Toxizität für den Menschen größtenteils nur sehr gering ist [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995; SPARG et al., 2004].

#### **2.1.6.6. Weitere pharmakologische Wirkungen**

Saponine haben aufgrund ihrer strukturellen Diversität eine Reihe von gesundheitsfördernden Wirkungen und werden als Inhaltsstoffe von Medikamenten und in der homöopathischen Volksheilmedizin eingesetzt [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

#### **Spermizide und kontrazeptive Wirkung**

Im Bestreben neue Quellen für kontrazeptive Wirkstoffe zu finden wurden zahlreiche medizinische Pflanzen mit empfängnisverhütenden Effekten gefunden, die bereits einen langen Einsatz in der Ethnomedizin haben. Viele Saponine weisen eine spermizide Wirkung auf, wobei der Wirkungsmechanismus hierbei die Zerstörung der spermatozoiden Plasmazellmembran liegt, ähnlich des kommerziell erhältlichen Spermizids Nonoxynol-9 [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

## LITERATUR

---

### **Schleimlösende und hustenstillende Wirkung**

Saponine haben eine allgemeine und unspezifische Fähigkeit lokale Irritationen zu produzieren, speziell in den Schleimhäuten der Nasenhöhle und dem Rachenraum, den Bronchien, Lungen und im Nierenepithel. Durch diesen lokalen Reiz wird das Flüssigkeitsvolumen der Atemwege erhöht, es steht mehr Wasser für die Bronchialsekrete zur Verfügung und dadurch wird der Schleim verdünnt beziehungsweise seine Viskosität verringert. Durch die Oberflächenaktivität der Saponine wird das Sputum weniger viskös, besser mobilisiert, gelöst und ist leichter abhustbar. Als schleimlösende Hustenstiller werden die saponinhaltigen Pflanzen *Senegae radix*, *Primulae radix*, *Liquiritiae radix*, *Gypsophilia spp.* und Efeublätter (*Hederae folium*) verwendet [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995; MENDEL et al., 2011].

### **Uretische Wirkungen**

Die harntreibenden Effekte von vielen Saponinen können ebenfalls auf die lokale Irritation der Nierenepithel zurückgeführt werden. Pflanzen mit einer solchen Wirkung sind die Spezies *Ononis*, *Herniana*, *Betula* und *Solidago*, *Astragalus membranaceus*, *Herniara glabra*, *H. hirsuta*, *Solidago virgaurea*, *S. gigantea*, *S. candensis*, *Agropyron repensis*, *Betula pendula* und viele mehr [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

### **Entzündungshemmende, antiexudative und -ödematöse Wirkungen**

Das Anfangsstadium einer Entzündungsreaktion ist durch einen Anstieg der Blutgefäßpermeabilität und einer Freisetzung von Histamin, Serotonin, Polypeptiden und Proteinen charakterisiert. Dies ist begleitet von Hyperämie und Ödembildung. Darauf folgend kommt es zu einer zellulären Infiltration und Bildung von neuem Bindegewebe. Substanzen mit antiexudativen und antiödematösen Eigenschaften wirken entzündungshemmend und beeinflussen eben dieses Anfangsstadium der Inflammation. In einigen Fällen kommt die antientzündliche Wirkung durch den Einfluss auf die Hypophysen-Nebennieren-

Achse zustande, während andere Pharmaka (z.B.: die Glycyrrhetinsäure) direkt auf die Nebennierenrinde wirken. Eine Studie an Ratten zeigte eine Reduktion an Ödemen bei parenteraler Applikation des Saponinmixes Escin der Kastanienpflanze (*Aesculus hippocastanum*) welcher 600 Mal so effektiv ist wie Rutin. Bei oraler Gabe wurde jedoch kein Effekt beobachtet, da deacetylierte Derivate keine entzündungshemmende Wirkung aufweisen. Glycyrrhetinsäure-Glykoside wurden in westafrikanischen Pflanzen *Lonchocarpus cyanescens* und *Terminalia ivorensis* gefunden, während die Oleanolsäure in *Boerhavia diffusa*, *Gymnema sylvestre*, *Securidaca longepedunculata*, *Tetrapleura tetraptera* und *Phytolacca dodecandra* enthalten ist und alle in der traditionellen Medizin zur Behandlung von Entzündungen eingesetzt werden. Auch eine Reihe von Pflanzen welche Steroidglykoside enthalten wirken entzündungshemmend, dazu zählen die Gattungen Liliaceae, Burseraceae, Zingiberaceae, Cyperaceae und Solanaceae [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995; SPARG et al., 2004].

### **Wirkung gegen Geschwüre (Ulzera)**

Die wohl bekannteste saponinhältige Pflanze welches als antiulzerogenes Medikament eingesetzt wird ist die Glycyrrhiza (Süßholz, Lakritze), obwohl bekannt ist, dass neben dem Glycyrrhizin andere aktive Inhaltsstoffe wie verschiedene Flavonoide (Licoflavonol, Licoricon und Kumatekenin) enthalten sind. Die Wirkung gegen Geschwüre ist in diesem Fall nicht auf die Hemmung der Magensäuresekretion zurückzuführen, sondern wird vielmehr der Förderung der Schleimbildung, der direkten Aktivierung von magenwandschützenden Faktoren und den natürlichen Schutzmechanismen gegenüber der Magenschleimhaut zugeschrieben. Saponine der Ginsengblüten sind ebenso sehr effektiv um Magenulzera zu behandeln und es gibt Patente für antiulzerogene Pharmaka welche Quillajasaponine enthalten [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

## LITERATUR

---

### **Schmerzstillende und fiebersenkende Wirkung**

Der Extrakt der Wurzel der *Platycodon grandiflorum* (160 mg Platycodin/kg) hat eine stärkere analgetische Wirkung als 100 – 200 mg Acetylsalicylsäure (Wirkstoff des Aspirins) und auch andere saponinhaltige Pflanzen (*Dianthus barbatus*, *Panax notoginseng*, *Crossopteryx febrifuga*, uvm.) weisen einen schmerzstillenden und entzündungshemmenden Effekt auf. Des Weiteren wirken einige Saponine fiebersenkend, wobei die rektale Temperatur schneller zurückging im Vergleich zur untersuchten Kontrollgruppe [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

### **Immunmodulierende Wirkung**

Saponine gehören zu einer Klasse von Substanzen die einen positiven Effekt auf das Immunsystem des Menschen haben. Andere wichtige Immunregulatoren sind Lipide, Lektine, Polysaccharide und Pilzmetabolite. Diese beinhalten Immunstimulantien, welche das Immunsystem stärken und immunsuppressive Substanzen, welche das Immunsystem blockieren. Erstere kommen während einer Chemotherapie, bei der Behandlung von infektiösen Krankheiten und zur Stimulation der Immunantwort nach Schutzimpfungen zum Einsatz. Saponine werden zur Unterstützung gegen eine Infektion mit *Schistosoma mansoni* (Pärchenegel, siehe 2.1.6.5 Molluskizide Wirkung) verwendet. Immunregulatoren werden in zwei Kategorien eingeteilt: die spezifischen und unspezifischen Modulatoren und wirken auf die humorale und zelluläre Immunantwort. Spezifische inkludieren Wirkungsverstärker wie zum Beispiel Quillajasaponine, wogegen unspezifische Immunstimulantien die Resistenz gegenüber Pathogenen und Tumoren fördern. Immunsuppressive Wirkstoffe werden speziell nach Transplantationen gegen Abstoßungsreaktionen gegen das transplantierte Organ und bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Allergien eingesetzt [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995; GÜÇLÜ-USTÜNDAĞ und MAZZA, 2007].

### 2.1.7. Ernährungsphysiologie

Die physiologische Wirkung der Saponine ist abhängig von der chemischen Struktur der einzelnen Verbindungen und der angelagerten Glykone. Es ist also sehr schwierig hier allgemeine Aussagen zu treffen. Die Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation ist bei Mensch und Tier sehr gering und sie werden unverändert oder metabolisiert über den Darm ausgeschieden. Die Werte liegen für Dioscin bei 0,2 % bis zu 20 %, bei  $\alpha$ -Escin und 2 – 20 % bei Ginsenoiden [WATZL, 2001; PODOLAK et al., 2004; HOSTETTMANN und MARSTON, 1995; LI et al., 2005].

### 2.1.8. Ausgewählte relevante Saponine und deren Vorkommen

Die für diese Arbeit ausgewählten Saponine sind das Digitonin, Diosgenin, Escin, Hederacosid C, Oleanolsäure und  $\alpha$ -Solanin. Diese Saponine wurden ausgewählt, weil sie in Österreich heimischen Pflanzen enthalten sind und somit bei der natürlichen Schaumbildung in Gewässern eine Rolle spielen können.

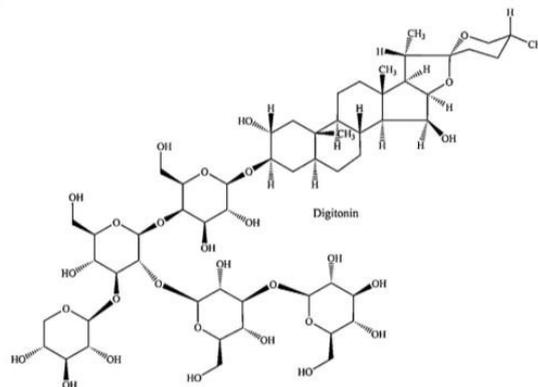
#### 2.1.8.1. Digitonin

Digitonin (Abb. 10) ist ein monodesmosidisches Steroidsaponin und kommt in der Pflanzengattung *Digitalis*, auch bekannt als Fingerhut, vor. Diese gehören zur Familie der *Plantaginaceae* und es gibt etwa 20 verschiedene Spezies der krautartigen mehrjährigen Stauden. Sie sind medizinisch und ökonomische bedeutende Pflanzen, da diese Herzglykoside enthalten, die ihren Einsatz als Herzmedikamente und als Wirksubstanz in Krebs-Chemotherapien finden. Die *Digitalis* ist in Europa, West Asien und im Mittelmeerraum heimisch. Aufgrund seines amphiphilen Charakters, wirkt das Digitonin als Detergens für Biomembrane und Proteine. In biologischen Systemen, werden die lipophilen Reste in Biomembranen eingebaut, während die hydrophilen Zuckerketten mit den Glykoproteinen und -lipiden der Außenseite der Zellwände interagieren.

## LITERATUR

---

Speziell monodesmosidische Saponine können die Integrität der Membrane zerstören indem sie die Permeabilität, Porenbildung und die Zellyse erhöhen und gleichzeitig die Absorption von größeren polaren Proteinen unterstützen. Digitonin weist also eine membranaktive zytotoxische Wirkung auf und kann die Aufnahme und Bioverfügbarkeit von anderen polaren zytotoxischen sekundären Metaboliten in Zellen (auch Krebszellen) erleichtern. Zugleich hemmt es die Aktivität der ABC-Transporter und verhindert somit den Transport von zytotoxischen Stoffen aus der Zelle. Des Weiteren besitzt Digitonin die Fähigkeit die Zellapoptose zu induzieren [EID et al., 2012; SAHIN et al., 2013].



**Abb. 10: Chemische Struktur des Digitonins**  
[modifiziert nach: EID et al., 2012]

### 2.1.8.2. Diosgenin

Das Diosgenin (Abb. 11) ist ein Sapogenin (Aglykon) der Steroidsaponine und wurde bisher aus vielen Pflanzen isoliert. Es ist im Chinaschilf (*Panicum virgatum* L.), Zierspargel (*Asparagus asparagoides*), Bockshornklee (*Trigonella foenum graecum* L.), der *Discorea* Spezies (Yamswurzel) und vielen mehr enthalten. Ebenso kommt das Diosgenin in Europa heimischen Pflanzen, wie etwa in Spargel und Futterklee, vor [LEE et al., 2001; SAUVAIRE et al., 1991; MAN et al., 2010].

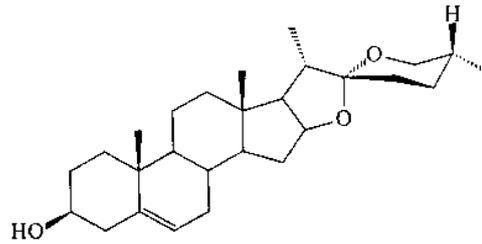


Abb. 11: Chemische Struktur des Diosgenins [LEE et al., 2001]

Pflanzen, welche Steroidsaponine enthalten, wurden in den 1950er Jahren kommerziell als Rohmaterialien für die Produktion von Steroidhormonen und anderen Arzneimitteln verwendet. Dazu zählen hauptsächlich die Wurzeln der *Dioscoreae Nipponicae*, Yams und der Bockshornklee. Die Synthese von Progesteron aus dem Sapogenin Diosgenin, gewonnen aus der mexikanischen Yamswurzel, wurde von MARKER et al. (1947) beschrieben und war der Beginn in der Ära der ersten oralen Kontrazeptiva im Jahre 1951 [GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ und MAZZA 2007; MU et al., 2012; QIN et al., 2009].

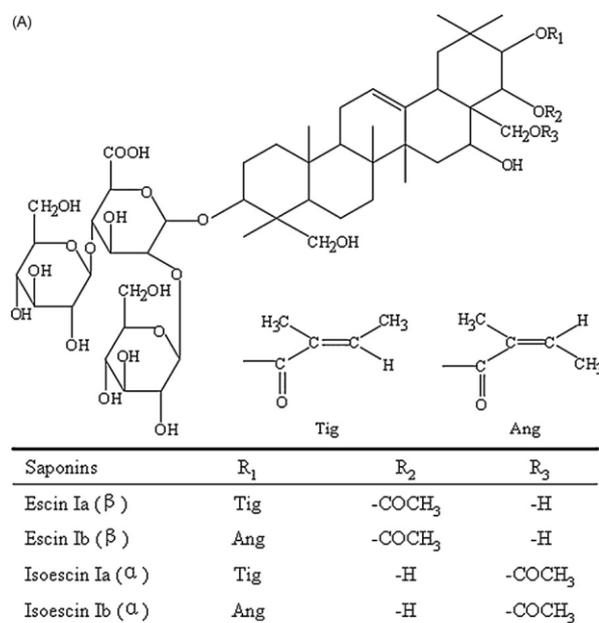
Saponine des Bockshornkleesamens gehören zu den Steroidsaponinen (Typ Furostanol) mit einem Diosgenin als Haupt Sapogenin. Diosgenin wirkt auch auf den Cholesterol-Metabolismus und verringert somit den Gehalt der Cholesterolkonzentration im Plasma. Der cholesterinsenkende Effekt basiert auf der Kapazität von Diosgenin die Cholesterol-Absorption zu hemmen, die Leber Cholesterol-Konzentration zu senken und die biliäre Cholesterol-Sekretion und dadurch die fäkale Ausscheidung von natürlichen Sterolen zu erhöhen [SAUVAIRE et al., 1991]. MAN et al., 2010 beschrieben eine anti-tumor Wirkung beim Saponin Dioscin und dessen Aglykon Diosgenin, diese haben einen Effekt auf den Zellzyklus und die Apoptose.

### 2.1.8.3. Escin (Aescin)

Das Escin ist eine Mischung von Triterpensaponinen, die in den Samen (Kastanien = *Hippocastani semen*) des Kastanienbaumes (*Aesculus hippocastanum* - *Sapindaceae*) enthalten sind. Die Samen und Rinden des

## LITERATUR

Kastanienbaums werden auch heute noch als phytotherapeutisches Produkt eingesetzt. Es wirkt entzündungshemmend, anti-ödematös, vasoprotektiv und hat eine beachtliche Wirksamkeit gegen chronische Venöse Insuffizienz (CVI), Hämorrhiden und postoperative Ödeme. Des Weiteren wird es in der Volksmedizin gegen Fieber, Malaria, Blasendysfunktion und Magen-Darm-Störungen eingesetzt. Die Isolation und Strukturcharakterisierung von Escin (Abb. 12) ergab, dass es 10 verschiedene chemische Verbindungen gibt. Dazu zählen Ia, Ib, IIa, IIb, IIIa, IIIb, IV, V und VI Escin wie auch Isoescin Ia und Ib. Die wesentlichen bioaktiven Hauptbestandteile sind das isomere Escin Ia und Ib ( $\beta$ -Escin) zusammen mit dem Isoescin Ia und Ib ( $\alpha$ -Escin) [SPARG et al., 2004; WU et al., 2010; FELIPE et al., 2013; SIRTORI, 2001; BHATTARAM et al., 2002].



**Abb. 12: Chemische Struktur von Escin Ia, Ib und Isoescin Ia, Ib**  
[WU et al., 2010]

$\alpha$ - und  $\beta$ -Escin sind unterschiedlich wasserlöslich und differieren bei der Resorption im Gastrointestinaltrakt nach oraler Verabreichung. Bei Ratten wird  $\alpha$ -Escin zu etwa 11 % aufgenommen, im Gegensatz dazu beträgt die Absorption von  $\beta$ -Escin nur 5 Prozent. Die maximalen Gehalte im Blut werden nach etwa 1 Stunde gemessen und die Elimination daraus erfolgt relativ rasch,

wobei ein Drittel über die Galle und etwa ein Drittel über die Nieren ausgeschieden werden [BHATTARAM et al., 2002; HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

#### 2.1.8.4. Hederacosid C

Zusammen mit *Liquiritiae radix* (= Süßholzwurzel) und *Primulae radix* (= Primelwurz) ist das *Hederae folium* (Efeublatt) eines der meist verwendeten saponinhaltigen Pflanzenarzneimittel zur Behandlung von Husten. Die Blätter des Gemeinen Efeus (*Hedera helix* L. - *Araliaceae*) enthalten das bidesmosidische Hederacosid C und das dazugehörige monodesmosidische  $\alpha$ -Hederin, welche zu den Triterpensaponinen gehören. Hederacosid B, ein Glykosid der Oleanolsäure kommt dagegen nur in sehr geringen Mengen vor (Abb. 13) [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995].

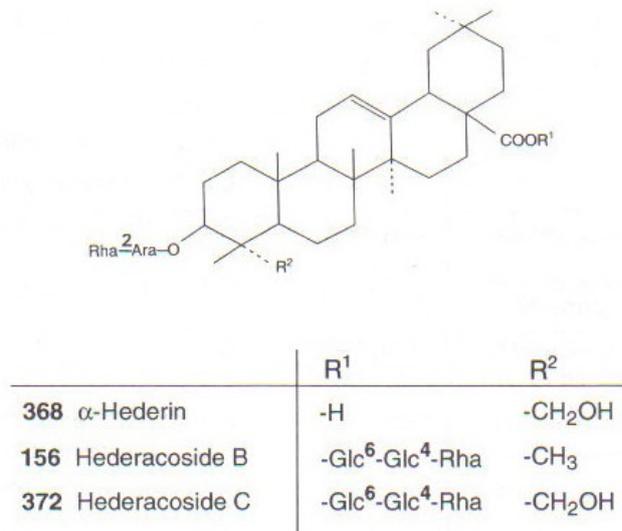


Abb. 13: Chemische Struktur von  $\alpha$ -Hederin, Hederacosid B und Hederacosid C [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995]

Der Extrakt von getrockneten Efeublättern mit den enthaltenen Saponinen, wird auch heute noch aufgrund seiner biologischen und pharmakologischen Eigenschaften in der Medizin eingesetzt. Er gilt als entzündungshemmend, antibakteriell, schleim- und krampflösend und wird aufgrund dessen zur

## LITERATUR

---

Behandlung von akuter und chronischer Bronchitis verwendet. Bei einer Intoxikation mit efeubasierenden Medikamenten (z.B.: Hederasal, Hederoin, Prospan) sind die am häufigsten beobachteten klinischen Symptome Atembeschwerden und Diarrhoe, da sie vor allem auf die glatte Muskulatur wirken. Das Hederacosid C zählt zu den toxischen Verbindungen im Efeublatt [MENDEL et al., 2011; HOSTETTMANN und MARSTON, 1995; GAILLARD et al., 2003].

### 2.1.8.5. Oleanolsäure (OA)

Die Oleanolsäure (3 $\beta$ -hydroxyolean-12-en-28-oic acid) (Abb. 14) gehört zu den am häufigsten vorkommenden Aglykonstrukturen der Triterpensaponine und ist im Pflanzenreich sehr weitverbreitet. Sie wurde bisher aus über 1620 Pflanzenspezies, darunter vielen Nahrungs- und Arzneipflanzen, isoliert und kommt vorwiegend in Pflanzen der Gattung Oleaceae (Ölbaumgewächse) vor. Zu den in österreichischen heimischen Pflanzen, welche die Oleanolsäure beinhalten, zählen der Salbei (*Salvia officinalis*), der Gemeine Efeu (*Hedera helix*), die Zucker- und Futterrüben (*Beta vulgaris*), Breitwegerichgewächse (*Plantago major*) und die Weißbeerige Mistel (*Viscum album*). Unkonjugierte Triterpene, wie die OA, finden sich meist in den Wachsen der Pflanzenhaut und schützen diese vor Wasserverlust und dienen als erstes Abwehrsystem gegen Pathogene. Auf Olivenblätter liegt die OA in kristalliner Form vor und fungiert zusätzlich als physische Barriere gegen Pilzattacken. Die Oleanolsäure liegt nicht nur als freie Säure vor, sondern dient auch als Aglykon für andere Triterpenoidsaponine, wobei hier ein oder mehrere Zuckerketten (Glykone) angebunden sind [POLLIER und GOOSSENS, 2012; GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ und MAZZA 2007; LIU, 1995].

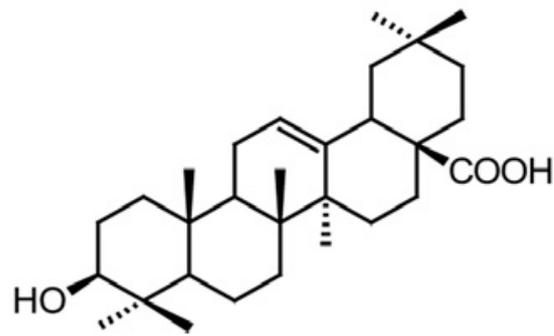
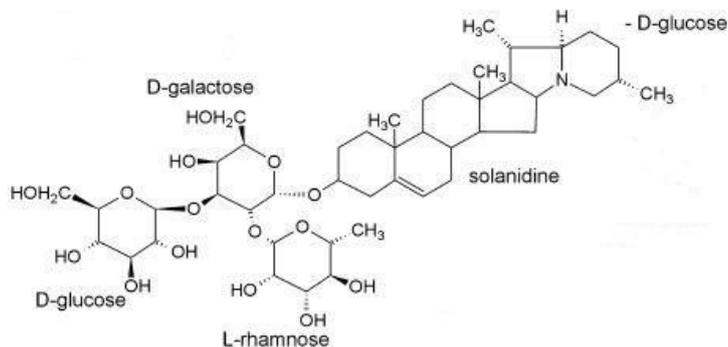


Abb. 14: Chemische Struktur der Oleanolsäure  
[POLLIER und GOOSSENS, 2012]

In Pflanzen dienen die verschiedenen glykokonjugierten Oleanolsäuremoleküle als Abwehrstoffe gegen Herbivoren (Pflanzenfresser) und Pathogene. Zu den wichtigsten pharmakologischen Eigenschaften der Oleanolsäure und ihren Derivaten zählen die hepatoprotektiven Effekte, zusätzlich wirken sie entzündungshemmend, antibakteriell, antiviral, antiulzeral, hypoglykämisch, antioxidativ, anti-hyperlipidämisch und anti-kanzerogen. Der hepatoprotektive Effekt bezieht sich nicht nur auf chemisch induzierte Leberschäden, sondern bietet auch Schutz gegen Fibrosen und Zirrhosen hervorgerufen durch chronische Lebererkrankungen (CKD). Des Weiteren greifen die OA und verwandte Triterpenoide Krebszellen an, indem sie Apoptose induzieren und durch ihre antiinflammatorischen Aktivitäten die Tumorumgebung negativ beeinflussen, da Entzündungen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von Krebs spielen [POLLIER und GOOSSENS, 2012; GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ und MAZZA 2007; LIU, 1995].

#### 2.1.8.6. Solanin

$\alpha$ -Solanin (Abb.15) ist gemeinsam mit  $\alpha$ -Chaconin eines von zwei Hauptglykoalkaloiden in der Kartoffelknolle (*Solanum tuberosum*) und zusammen machen sie rund 95 % des totalen Glykoalkaloid Gehaltes aus. Beide sind glykosylierte Derivate des Aglykons Solanidine [ZYWICKI et al., 2005].



**Abb. 15: Chemische Struktur von  $\alpha$ -Solanin**  
[modifiziert nach: ZYWICKI et al., 2005]

Aufgrund seiner chemischen Struktur zählt das Solanin zu den Steroidalkaloiden, welche im Steroidgerüst zusätzlich ein Stickstoffatom eingebaut haben und ist für die Toxizität roher Kartoffeln verantwortlich. Produziert wird das  $\alpha$ -Solanin in den bioaktiven Teilen der Kartoffelpflanze (Blüten, jungen Blättern, Trieben und Wurzelknollen), um die Pflanze vor Pilzbefall, Schädlingen und Herbivoren zu schützen.

Die toxische Wirkung der Glykoalkaloide (GA) basiert auf deren Einfluss auf die Zellmembrane und die Acetylcholinesterase. Erstere führt zum Zellaufschluss, wobei die GAs destabilisierende Komplexe mit den lipophilen Resten des Cholesterols in den Zellmembranen bilden. Viele Zellkultur- und experimentelle Studien zeigten, dass diese Saponine einen negativen Effekt auf die Permeabilität des Darmes haben. Die Glykoalkaloide der Kartoffeln sind ab einer Dosis von 2 mg/kg Körpergewicht für Menschen toxisch, dies äußert sich durch gastrointestinale Störungen, wie zum Beispiel Erbrechen, Diarrhoe und Unterleibsschmerzen. Diese Symptome neigen dazu unentdeckt zu bleiben, da sie anderen gastrointestinalen Intoxikationen und Krankheiten ähneln.

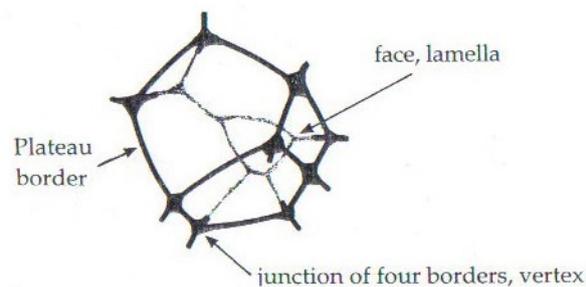
Des Weiteren hemmen GAs das Enzym Acetylcholinesterase und wirken folglich direkt auf das Nervensystem. Die Symptome sind neben übermäßigem Schwitzen, auch Erbrechen, Diarrhoe und Bronchospasmen. Heftige Vergiftungen führen zu ernsthaften unerwünschten Komplikationen wie etwa

Lähmungen, Atem- und Herzinsuffizienz und Koma. Fälle einer letalen Intoxikation wurden bei Dosen größer als 3 mg/kg Körpergewicht gemeldet.

Die Gehalte an GAs in Kartoffeln sind sehr unterschiedlich und variieren zwischen 90 und 175 mg/kg Frischgewicht (FW). Vereinzelt kann es auch zu viel höheren Gehalten in den Knollen kommen, wobei dies abhängig von der Sorte, den Lagerbedingungen, mechanischen Schäden,  $\gamma$ -Strahlung und Pilzbefall ist. In der Knolle selber ist der GA-Gehalt geringer und konzentriert sich in der Schale (12 – 543 mg/kg Frischgewicht). Grundsätzlich liegt das Upper Safety Limit bei 200 mg/kg Frischgewicht, wobei die JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) die Empfehlung auf 100 mg/kg FW beschränkt herausgegeben hat. Aufgrund der geringen Datenlage wurde bis dato noch kein NOAEL- (no observed adverse effect level) und TDI-Wert (tolerable daily intake level) festgelegt [MENSINGA et al., 2005; BALTES und MATISSEK, 2011].

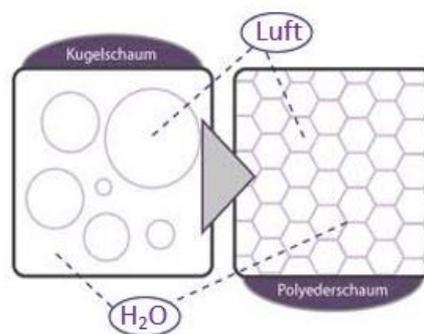
## 2.2. Schaum

Schaum ist ein Zwei-Phasen-System, in welchem Gaszellen von Flüssigkeit eingeschlossen sind und von dünnen Flüssigkeitsfilmen bzw. –lamellen getrennt werden (Abb. 16) [SCHILLING und ZESSNER, 2011; WEAIRE und HUTZLER, 1999].



**Abb. 16: 3-dimensionaler Schaum mit Flüssigkeitsfilm bzw. –lamellen**  
[WEAIRE und HUTZLER, 1999]

In einem ähnlich analogen Fall einer Emulsion werden die Gaszellen oft als feinstverteilte und kontinuierliche Phasen bezeichnet. Im Gegensatz zu den Gas-Flüssigkeitsschäumen sind in Emulsionen die Rollen der zwei Komponenten genau umgekehrt. Ein Schaum enthält also mehr oder weniger an Flüssigkeit und ist zuerst in Form von Kugelschaum zu beobachten, welcher sich durch einen hohen Wassergehalt auszeichnet (Abb. 17) [POMASSL, 2012; WEAIRE und HUTZLER, 1999].



**Abb. 17: Kugelschaum wird durch Drainage zum Polyederschaum**  
[modifiziert: [www.wolfredo.at](http://www.wolfredo.at)]

Nach weitgehender Drainage erhalten die meisten Schaumblasen die Form einer polyedrisch (vielflächigen) Zelle und es bildet sich Polyederschaum (Abb. 18) [POMASSL, 2012; WEAIRE und HUTZLER, 1999].



Abb. 18: Polyederschaum [de.wikipedia.org]

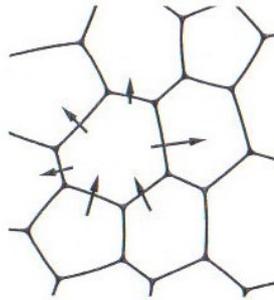
### 2.2.1. Voraussetzung für die Schaumbildung

Die meisten Schäume kommen nur in Anwesenheit von oberflächenaktiven Stoffen (Detergentien), welche sich ihrem Namen entsprechend an Oberflächen konzentrieren, zustande. Im Allgemeinen reduzieren sie die Oberflächenspannung und -energie, was die Voraussetzung für eine Schaumbildung ist, da reine Flüssigkeiten keine Schäume induzieren. Weitaus bedeutender ist die Tatsache, dass oberflächenaktive Substanzen dünne Filme stabilisieren und das Zerreißen der Lamellen verhindern. Somit kann bei Vorhandensein von Schaumblasen darauf geschlossen werden, dass eine Flüssigkeit Verunreinigungen enthält, da ohne oberflächenaktive Substanzen der hohe Energieaufwand, der für die Schaumbildung erforderlich ist, nicht überwunden werden kann. In aquatischen Ökosystemen werden Schaumblasen meist durch Wehre, Sohlenabstürze, Abwasserrohre, Bühnen und andere mechanisch wirksame Bauwerke, aber auch durch Wind, Wellenschlag und Brackwasserzonen hervorgerufen. Aufgrund der Oberflächenenergie und -spannung koaleszieren kleinere Blasen zu größeren, welche wieder durch

## LITERATUR

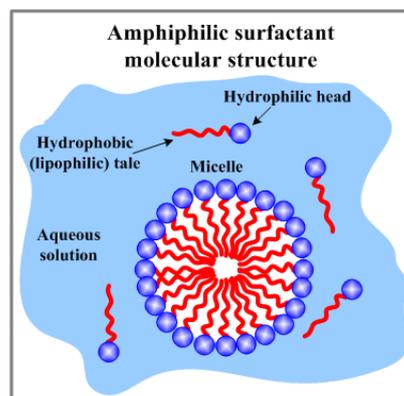
---

kinetische und mechanische Beanspruchung platzen. Der Druckunterschied zwischen den einzelnen Schaumzellen variiert und ermöglicht eine Diffusion des Gases durch die Zellwände, dadurch kommt es zu einer Vergrößerung der Blasen. Dieser Vorgang wird als Koaleszenz bezeichnet (Abb. 19) [POMASSL, 2012; SCHILLING und ZESSNER, 2011; WEAIRE und HUTZLER, 1999].



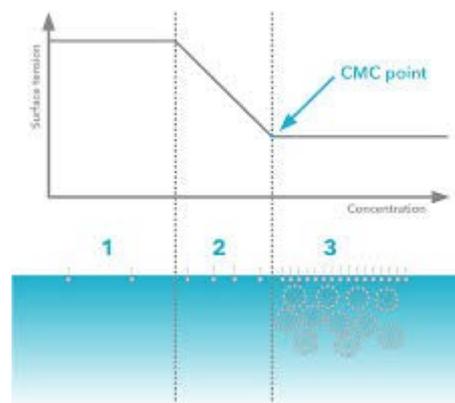
**Abb. 19: Koaleszenz aufgrund von Diffusion**  
[WEAIRE und HUTZLER, 1999]

Zu den oberflächenaktiven Substanzen zählen Partikel, Polymere, Anionen und Kationen von organischen Salzen, wobei schon geringe Konzentrationen ausreichen, um Schäume zu bilden. In einem flüssigen Schaum liegen oberflächenaktive Moleküle meist als Amphiphile vor und zeichnen sich durch eine hydrophobe Kohlenwasserstoffkette und einen hydrophilen Kopf aus und können anionisch, kationisch und zwitterionisch sein (Abb. 20) [POMASSL, 2012; SCHILLING und ZESSNER, 2011; WEAIRE und HUTZLER, 1999; GÜGLÜ-ÜSTÜNDAÇ und MAZZA, 2007].



**Abb. 20: Bildung von Micellen**  
[www.substech.com]

Über der kritischen Konzentration an Mizellen (CMC = critical micelle concentration) bilden sich sogenannte Assoziationskolloide aus, wobei die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten ein Aggregat bilden und sich die hydrophilen Köpfe nach der Flüssigkeit ausrichten (Abb. 21). Die Ausbildung der Mizellen wird durch Temperatur, Salzkonzentration und pH-Wert der Wasserphase beeinflusst [POMASSL, 2012; SCHILLING und ZESSNER, 2011; WEAIRE und HUTZLER, 1999; GÜGLÜ-ÜSTÜNDAÇ und MAZZA, 2007].



**Abb. 21: Kritische Konzentration an Mizellen (CMC)**

[[www.attension.com](http://www.attension.com)]

Natürliche Schäume werden meist durch Humin- und Flavinsäuren, feine kolloide Partikel, Lipide und Proteine von Wasser- oder Uferpflanzen, aber auch von Mikroorganismen, Saponinen (Pflanzenglykoside), der Absonderung von Kohlenhydraten und Proteinen bei der Zersetzung von Phytoplankton, Algenblüte und Sedimenten als natürliches Reservoir an organischem Material verursacht. Die größten Ansammlungen von natürlichem Schaum in der aquatischen Umwelt entstehen durch Zersetzung von organischem Material und ohne jegliche Funktion. Schaum anthropogenen Ursprungs wird hauptsächlich durch organische und anorganische Detergenzien, welche punktuell von der Industrie und den kommunalen Kläranlagen eingeleitet und diffus von Phosphaten die als Düngemittel in der Landwirtschaft eingesetzt werden verursacht. Phosphate wirken indirekt auf die Schaumbildung, da sie das Algenwachstum verstärken und dadurch eine toxische Algenblüte induzieren.

## LITERATUR

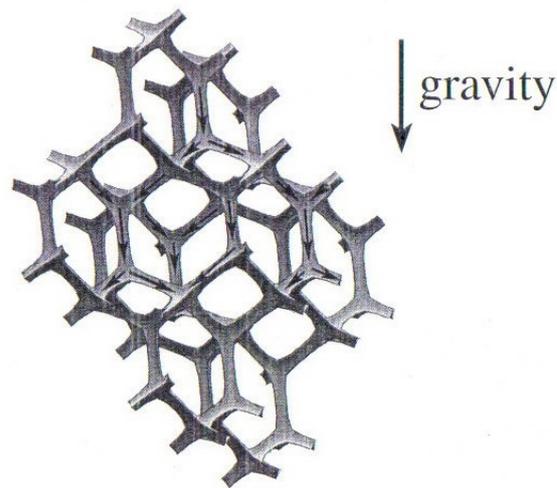
---

Meistens wirken mehrere oberflächenaktive Stoffe gemeinsam, sodass ein Summen- oder Kumulationseffekt entsteht [POMASSL, 2012; RUZICKA et al., 2009; SCHILLING und ZESSNER, 2011; SCHILLING et al., 2012; WEGNER und HAMBURGER, 2002].

Die Schaumbildung erfolgt an der Grenzschicht zwischen Wasser und Luft, die Surface Microlayer (SML) genannt wird und ist verantwortlich für den Stofftransport und die Speicherung von organischem und anorganischem Material. Diese gespeicherten Substanzen und Partikel sind weder mit den reinen aquatischen noch mit den atmosphärischen Bedingungen kompatibel, daher verbleiben sie in der Grenzschicht. So reichern sich neben natürlichen Ölen, organischen Säuren und Proteinen auch anthropogen eingetragene Stoffe, wie Erdölverbindungen, langkettige Alkohole, synthetische Tenside, Pestizide und Herbizide an der Grenzschicht an. An der Wasseroberfläche konzentrieren sich die Blasen und bilden Schäume. Nach und nach platzen sie und es kommt zu einer Freisetzung von Aerosolen in die Atmosphäre [POMASSL, 2012; RUZICKA et al., 2009; SCHILLING et al., 2012; SCHILLING und ZESSNER, 2011].

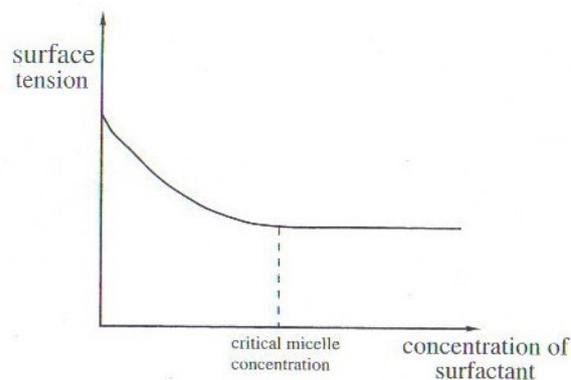
Die Stabilität von Schäumen ist hinsichtlich der hohen Grenzflächenspannung und –energie thermodynamisch begrenzt und kann in 2 Schaumtypen eingeteilt werden. Von metastabilem oder permanentem Schaum spricht man ab einer Dauer von Stunden bis Tagen, während instabiler oder flüchtiger Schaum nur ein paar Sekunden zu beobachten ist. Oberflächenaktive Substanzen vergrößern die Stabilität von Schäumen, da sie der Koaleszenz (Vergrößerung durch Aufeinandertreffen und Verschmelzen der Blasen mit gleichzeitiger Verringerung der Oberflächenspannung) entgegenwirken. Die Koaleszenz erfolgt in einem 3-Stufen Prozess: Blasenformation und die Bildung eines dünnen Films, die Drainage und das Zerplatzen der Blasen. In reinem Wasser bilden sich keine stabilen Schäume, da die Koaleszenz nur ein paar Millisekunden dauert und es daher zu keiner Blasenbildung kommt. Die Gravitation ist die wohl größte Kraft die auf den Schaum wirkt und führt zur vermehrten Drainage der Flüssigkeit in den Flüssigkeitslamellen zwischen den einzelnen Schaumblasen (Abb. 22). Die Drainage kann durch Teilchen im

Wasser und eine erhöhte Viskosität der Flüssigkeit reduziert werden und dies führt wiederum zu sehr stabilen Schäumen [SCHILLING und ZESSNER, 2011; SCHILLING et al., 2012; POMASSL, 2012; WEGNER und HAMBURGER, 2002; WAIRE und HUTZLER, 1999].



**Abb. 22: Drainage aufgrund von Gravitation und Druck [WEAIRE und HUTZLER, 1999]**

Der Einfluss der festen Partikel auf die Entstehung und die Stabilität von Schaum ist abhängig von der Oberflächenaktivität des Stoffes, der Partikelgröße und dessen Konzentration (Abb. 23).



**Abb. 23: Zusammenhang zwischen Oberflächenspannung und Konzentration der oberflächenaktiven Substanzen [WEAIRE und HUTZLER, 1999]**

## LITERATUR

---

Die Anwesenheit hydrophiler Partikel in der Wasserphase des Schaumfilms erhöht die Schaumstabilität, da sie die Drainage verzögern. Im Gegensatz dazu dringen hydrophobe Teilchen in die SML (Grenzschicht zwischen Wasser und Luft) des Schaumes ein und führen zu einer Destabilisierung über den Brückenbildungs-Entnetzungsmechanismus. Sehr kleine komplett disperse Partikel können in die Grenzschicht eingebaut werden und dadurch die Lamellen zusätzlich mechanisch stabilisieren, die Viskosität der Flüssigkeit wird dadurch erhöht und es bilden sich stabile Schäume. Große Teilchen wie etwa Kohlestaub, Schwefel, nicht benetzender Quarz wirken aufgrund ihres höheren hydrophoben Anteils destabilisierend.

In Kläranlagen wird die Schaumstabilität ferner auf hydrophobe Partikel wie zum Beispiel Bakterienzellen zurückgeführt, aber auch proteinartige oberflächenaktive Substanzen und kleine Silicium-, Calcium- und Eisen-Partikel stabilisieren Schäume. Ein weiterer Promotor für Schaum ist Salz, da bestimmte Salze zu einer ionenspezifischen Hemmung der Koaleszenz führen und die Packrate von oberflächenaktiven Substanzen (CPP = surfactant critical packing parameter) erhöht wird. Bei der Erhöhung der CPP wird die Oberflächenelastizität und Viskosität ergo die Schaumstabilität erhöht. Viele oberflächenwirksame Moleküle wirken kumulativ stärker schaumstabilisierend als separat, ein Beispiel hierfür sind Tannine und Heptansäuren. In Summe tragen sowohl die oberflächenaktiven Stoffe (Tenside), gelöste Partikel, bioorganische Schwebstoffe, Algen, kolloidal gelöste Substanzgemische und Salze zur Stabilität von Schäumen bei [SCHILLING und ZESSNER, 2011; POMASSL, 2012; WEGNER und HAMBURGER, 2002; WAIRE und HUTZLER, 1999].

### **2.2.2. Entstehung von Schäumen auf Oberflächengewässern**

In Flüssen und Seen kommt es zu einer Anreicherung von organischen und anorganischen Stoffen aus natürlichen und anthropogenen Quellen (Nährstoffe, Lipide, Proteine, Kohlenwasserstoffe, Schwermetalle, Pestizide, usw.) in der Grenzschicht zwischen Wasser und Luft (Surface Microlayer = SML). Diese

oberflächenaktiven Substanzen setzen die Oberflächen- und Grenzflächenspannung herab und begünstigen dadurch die Bildung von Schaum. Dieser Effekt dient der Selbstreinigung von Gewässern, da organische und anorganische Stoffe an der Oberfläche konzentriert sind und nicht mehr im darunterliegenden Wasser. Die Anreicherung wird berechnet über das Fraktionierungs- oder Anreicherungsverhältnis, welches aus dem Quotienten der Konzentration des einzelnen Parameters im Schaum und der Konzentration dessen im darunter befindlichen Wasser errechnet wird [POMASSL, 2012; SCHILLING und ZESSNER, 2011].

### **2.2.3. Ökologische Bedeutung und Toxizität von Schaum**

Aufgrund der Zusammensetzung und seiner Kapazität verschiedene Stoffe anzureichern hat Schaum einen großen Einfluss auf aquatische Frischwasser-Ökosysteme. Neben einer möglichen toxischen Wirkung dient Schaum als Quelle von Nährstoffen und Habitat für im Wasser lebende Biozöosen. Da sich im Schaum nicht nur Nähr- sondern auch Schadstoffe, wie etwa oberflächenaktive Toxine an der SML anreichern, sind Lebewesen die knapp unterhalb der Wasseroberfläche leben (Neuston) höheren Konzentrationen ausgesetzt als die in tieferen Wasserschichten lebenden aquatischen Organismen. Diese Schadstoffe können durch Plankton, Bakterien, Fische und Wasservögel in die Nahrungskette und durch das Freisetzen von Aerosolen beim Zerplatzen der Blasen in die Atmosphäre gelangen. Anorganische und organische Stoffe geraten so in die Luft und können durch den Wind über weite Strecken transportiert werden. Zusätzlich stellt die Anreicherung von Schwermetallen, wie zum Beispiel die essentiellen Zink, Kupfer, Eisen und Mangan sowie die gesundheitsschädlichen Blei und Cadmium sowie chlorierte Kohlenwasserstoffe auch eine potentielle Gefährdung für das Trinkwasser dar, falls der belastete Schaum in die Trinkwassereinspeisung gelangt [SCHILLING und ZESSNER, 2011; POMASSL, 2012].

### **2.2.4. Ursachen für eine Schaumbildung**

Oberflächenaktive Substanzen, welche einen großen Einfluss auf die Schaumbildung auf Oberflächen- und Fließgewässern haben, können aus natürlichen und anthropogenen Quellen stammen [POMASSL, 2012].

#### **2.2.4.1. Natürliche Ursachen für eine Schaumbildung**

Natürliches organisches Pflanzenmaterial wird bei der Photosynthese (Primärproduktion) aufgebaut, wobei die Grundstruktur dessen weitgehend aus Zellulose, Tannin, Lignin, Chitin, Proteinen, Lipiden und Kohlenhydraten besteht. Pflanzliches Material (Blätter, Zweige und Wasserpflanzen) zählt zu den natürlichen Quellen für den Eintrag von oberflächenaktiven Substanzen in Gewässer, da diese bei ihrer Zersetzung organische Stoffe freisetzen, die die Oberflächenspannung und –energie senken und Schäume verursachen. Gerbstoffe, Tannine, Saponine und Proteine gelangen durch den Abbau von organischem Material durch Mikroorganismen in das Flusswasser. Natürliche oberflächenaktive Substanzen werden nicht nur bei Abbauprozessen freigesetzt, sondern auch von aquatischen Pflanzen (insbesondere Algen) aktiv ausgeschieden. Dazu zählen Huminstoffe, Liganden und Zellwände von Algen und Bakterien, sowie gelöste organische Stoffe aus aquatischen und terrestrischen Quellen [POMASSL, 2012; DRAXLER et al., 2009].

Die erhöhte Anreicherung von organischen Substanzen und Nährstoffen in den Gewässern führt in weiterer Folge zu Eutrophierung, Komplexbildung von Schwermetallen, erhöhtem biologischen Wachstum und Belastung an organischen Schadstoffen. Der Eintrag der organischen Substanzen erfolgt punktuell oder diffus aus landwirtschaftlichen, industriellen, urbanen und natürlichen Quellen und wird über Aerosole und hydrologischen Transport (Regenwasser, Oberflächenabschwemmung, Grundwasser) in die aquatischen Ökosysteme eingetragen. Eine unnatürlich hohe Belastung an den Nährstoffen Phosphor und Stickstoff oder anderen organischen Stoffen kann zu toxischen Algenblüten, Sauerstoffmangel und –zehrung, einem Verlust an Biodiversität

und Fischsterben führen. Quellen für organisches Material sind autochthone (im Wasser produziert, z.B.: Algenblüte) und allochthone (Einträge durch Starkniederschläge und Schneeschmelze) Stoffe [POMASSL, 2012; ROSARIO-ORTIZ et al., 2007].

#### **2.2.4.1.1 Autochthone Quellen**

Im Wasser finden zahlreiche physikochemische Prozesse statt und somit ändert sich die ursprüngliche Zusammensetzung des organischen Materials, es kommt zu einem Abbau. Durch lange Aufenthaltszeiten, speziell in stehenden Oberflächengewässern, findet eine Homogenisierung statt, wobei hydrophobe und makromolekulare Bestandteile durch Mikroorganismen abgebaut werden. Die Sonneneinstrahlung hat bei diesen Umwandlungsprozessen einen wesentlichen Einfluss auf diesen Prozess. Dazu zählen die Algenblüte und andere Photosyntheseprozesse [POMASSL, 2012; ROSARIO-ORTIZ et al., 2007].

#### **2.2.4.1.2 Allochthone Quellen**

Die Ufervegetation ist die bedeutendste allochthone Quelle für den Eintrag von organischem Material in aquatische Ökosysteme. Durch heftige Niederschläge kommt es zu Auswaschungen aus dem Boden, dies führt zu einem gesteigerten Abschwemmung der ufernahen Vegetation und einem daraus resultierenden Eintrag an natürlichen organischen Substanzen in die Oberflächengewässer. Die ufernahe Flora und der Boden dienen als Nährstoffspeicher und Puffer von Pestiziden, Nitraten und ähnlichen aus der Landwirtschaft eingetragenen Substanzen und ist eine Übergangszone zwischen aquatischen und terrestrischen Ökosystemen [POMASSL, 2012].

#### 2.2.4.2. Anthropogene Ursachen für eine Schaumbildung

Oberflächen- und Fließgewässer spielen eine sehr große Rolle bei der Aufnahme von Industrieabwässer und Abwässer von kommunalen Kläranlagen sowie der Abschwemmungen des ausgebrachten Mistdungs von landwirtschaftlichen Nutzflächen und Straßen, welche mitverantwortlich für Flussverschmutzungen sind [POMASSL, 2012]. Zu den anthropogenen Ursachen für die Entstehung von Schäumen zählen zum Beispiel die Einleitung von Industrieabwässern und „aufbereitete“ Abläufe von kommunalen Kläranlagen, welche Tannine, Polyamide, Aminosäuren und Lipide enthalten [RUZICKA et al., 2009]. Stoffe aus anthropogenen Quellen stammen meistens vom Abfluss der Abwasserbehandlungsanlagen und dienen in aquatischen Biotopen als Kohlenstoffquelle. Dadurch wirkt es als Katalysator für indirekte Photolyse, wobei Schadstoffe aus anthropogenen Quellen (z.B.: Pestizide, Arzneimittel, usw.) abgebaut werden. Anthropogen beeinflusste Gewässer weisen einen deutlich höheren Anteil an aromatischen gegenüber aliphatischen Strukturen, sowie eine erhöhte Stickstoffkonzentration (Proteine, Aminosäuren), auf. Indikatorsubstanzen hierfür sind die bei der Pyrolyse entstehenden Substanzen, wie etwa 3-Methyl-Pyridine, 2-Methyl-Pyridine, Pyrrole und Acetamide [POMASSL, 2012; KALSCHEUR et al., 2012; QUARANTA et al., 2012].

Anthropogene Quellen werden in diffuse und punktuelle Einträge unterteilt. Zu den punktuellen Einleitern zählen Industrieanlagen, wie Papier- und Zellstoffwerke, Gerbereien und metallverarbeitende Betriebe und diffuse Quellen sind intensive Landwirtschaft (Düngemittel, Pestizide und Herbizide), Straßenabschwemmungen, Detergentien aus Siedlungsgebieten und kommunalen Kläranlagen. Abwasserbehandlungsanlagen können ebenfalls zum Eintrag oberflächenaktiver Substanzen beitragen, wie zum Beispiel die Actinomyceten, *Microthrix parvicella* im Schwimmschlamm [POMASSL, 2012; WEGNER und HAMBURGER, 2002]. Oberflächenaktive Substanzen aus anthropogenen Quellen umfassen synthetische Tenside, Emulgatoren, Wasch-, Reinigungs- und Netzmittel [POMASSL, 2012].

### 2.2.4.2.1 Wasch- und Reinigungsmittel (Tenside)

Tenside, im deutschen und englischen Sprachgebrauch auch als Detergentien, Amphiphile oder Surfactants bekannt, sind grenzflächenaktive Substanzen welche die Bildung von Schäumen begünstigen. Das Vorhandensein eines Tensids ist die Voraussetzung für die Schaumbildung, wobei diese eine Dispersion von einem relativ großen Gasvolumen in einem kleineren Flüssigkeitsvolumen ist [DÖRFLER, 1994]. Tenside werden neben dem Haupteinsatzbereich der Wasch- und Reinigungsmittel auch als Zusatzstoff zu Lacken und Farben, in der Metallbehandlung, Bauchemie, zur Papierherstellung und -verarbeitung, in Kunststoffen (Emulsionspolymerisation) und Pflanzenschutzmittel eingesetzt. Die Stabilisierung von Emulsionen (dispersen Systemen zwei oder mehrerer nicht mischbaren Phasen) ist hier mitunter ihre wichtigste Funktion [HILLENBRAND et al., 2003].

Früher waren Wasch- und Reinigungsmittel kaum biologisch abbaubar und enthielten Phosphate als Wasserenthärter zur Fixierung der im Wasser enthaltenen Kalzium- und Magnesium-Ionen. Algen und andere aquatische Pflanzen vermehrten sich dadurch sehr rasch, was zusätzlich zur erhöhten Schaumbildung beitrug. In kommerziellen Tensidgemischen sind vor allem Alkylbenzylsulfonate, Alkylethoxylate, Alkylphenylethoxylate und deren Isomere enthalten, wobei die heute am meisten benutzten synthetischen Tenside die linearen Alkylbenzolsulfonate (LAS) sind und auf den Verpackungen meist als Natrium- oder Ammoniumlaureth bzw. -laurylsulfat angeführt werden. Künstliche Tenside sind heute soweit modifiziert, dass diese gut biologisch abbaubar sind und statt Phosphaten Sulfate enthalten [POMASSL, 2012; DRAXLER et al., 2009].

Tenside können nach Art und Ladung des hydrophilen Molekülrestes in vier Gruppen eingeteilt werden (Tab. 1): Nichtionische Tenside (z.B.: Polyethergruppen), anionische Tenside (z.B.: Carboxylat-, Sulfat- oder Sulfonat-Gruppen), kationische Tenside (z.B.: quartäre Ammoniumgruppen) und amphotere Tenside (z.B.: enthalten sowohl anionische als auch kationische Gruppen) [HILLENBRAND et al., 2003].

## LITERATUR

Tab. 1: Arten und Struktur der Tenside [de.wikipedia.org]

Tenside	hydrophile Gruppe(n)	
nicht ionische Tenside	-OH (mehrfache Alkohole), -O- (Ether) oder die Kombination -O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH (z.B.: Etoxylate)	
anionische Tenside	-COO <sup>-</sup> (Carboxylate), -SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (Sulfonate) oder -OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (Sulfate)	
kationische Tenside	R <sub>4</sub> N <sup>+</sup> (quartäre Ammonium- Gruppe)	
amphotere Tenside (zwitterionische Tenside)	meist -COO <sup>-</sup> (Carboxylate) und R <sub>4</sub> N <sup>+</sup> (quartäre Ammonium- Gruppe)	

Bedenklich sind hier die Gruppe der Alkylphenoethoxylate (APEO) welche zu den nichtionischen Tensiden gehören, da ihre Metabolite toxisch wirken und sie eine östrogenähnliche Aktivität aufweisen. Viele Tenside wirken auf aquatische Mikroorganismen toxisch, da sie sich zwischen die lipidhaltigen Zellmembrane und dem wässrigen Medium anreichern und dadurch die Schutzfunktion der Membran aufheben [POMASSL, 2012]. APEOs können in vielen Bereichen durch andere Produkte ersetzt werden (z.B.: Haushalts- und Industriereiniger, Textil-, Flockungs-, Papier- und Lederhilfsmittel). Als Substitut werden vor allem Fettalkoholethoxylate, welche ebenfalls zu den nichtionischen Tensiden zählen, eingesetzt [HILLENBRAND et al., 2003].

Zum Schutz der Umwelt ist seit 2005 in Österreich die Verwendung und der Vertrieb von Detergentien auf vollständig biologisch abbaubare Tenside durch die Verordnung (EG) Nr. 648/2004 beschränkt. Des Weiteren wurde der Grenzwert für die Konzentration von anionischen und nichtionischen Tensiden im geklärten Abwasser nach kommunaler Abwasseremissionsverordnung auf 1 mg/L festgesetzt [POMASSL, 2012].

## **2.3. Kopplung einer Flüssigkeitschromatographie mit der Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS)**

Die Kopplung einer HPLC mit der Massenspektrometrie ist in der Spurenanalytik für nicht-flüchtige Substanzen das Mittel der Wahl, da die Sensitivität und Selektivität deutlich höher liegt als bei Kopplungen mit UV/VIS, Infrarot oder DAD Detektoren [BARKER, 2000].

### **2.3.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Die Flüssigkeitschromatographie (LC) ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, bei dem die Stofftrennung der Analyten zwischen einer stationären und einer mobilen Phase stattfindet. Die Substanzen werden in der mobilen Phase (hier ein Acetonitril-Wasser Gemisch) eingebracht und über eine stationäre Phase (Reversed Phase (RP)-Trennsäule (C18) mit Kieselgel = Silikagel gepackt) bewegt, wobei hier die Adsorption und folgend die Desorption erfolgt. Weitere Trennprinzipien der Flüssigkeitschromatographie neben der Adsorption wären die Verteilung, der Ionenaustausch und der Ausschluss. Die Auftrennung der Analyten geschieht aufgrund von unterschiedlicher chemischer und physikalischer Wechselwirkung der einzelnen Substanzen mit der stationären Phase. Infolge der unterschiedlichen Verweildauer der Stoffe in der Säule kommt es zu unterschiedlichen aber für jeden Analyten charakteristischen Retentionszeiten. Nach der Auftrennung können diese mit einem Detektor erfasst werden [OTTO, 2011; MEYER, 2004].

#### **2.3.1.1. Aufbau einer HPLC**

Die HPLC ist eine aus verschiedensten Modulen zusammengestellte Apparatur und besteht aus einem Elutionsmittelreservoir, die die Lösungsmittel für die mobile Phase enthalten, einer Zuleitung mit Fritte, einem Entgaser (Degasser), einer Hochdruckpumpe (meist Kolbenhubpumpe), einem

## LITERATUR

Probenaufgabensystem (Autosampler), einer analytischen Trennsäule (stationäre Phase) und einem Detektor (Abb. 24) [OTTO, 2011; MEYER, 2004].

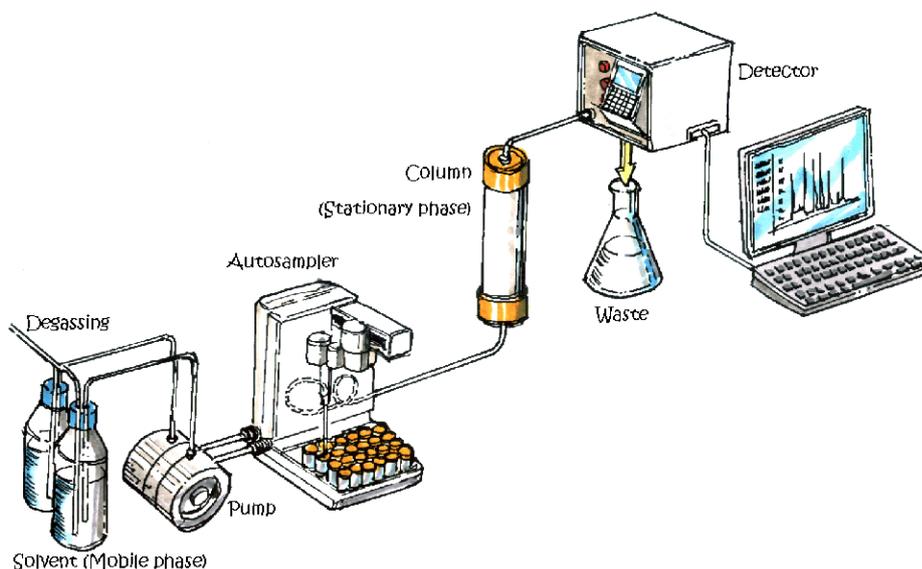


Abb. 24: Aufbau einer HPLC-Anlage [www.munich.linde.com]

### 2.3.2. Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektrometrie ist eine analytische Methode in welcher Atome oder Moleküle einer Probe ionisiert, nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) getrennt und dann detektiert werden. Das Instrument welches hierfür verwendet wird ist der Massenspektrometer. Die Massenspektrometrie unterscheidet sich deutlich zu den anderen gebräuchlichen Methoden der Analyse, wie etwa Infrarot-, UV/VIS- und NMR (Nuclear Magnetic Resonance = Kernspinresonanz) Spektroskopie. All diese Techniken beruhen auf dem Prinzip der Absorption von elektromagnetischer Strahlung, wobei die Moleküle vom Grundenergiezustand in einen angeregten Zustand überführt werden. Nach den Analysen können diese Moleküle wieder in ihren Ausgangszustand zurückkehren, daher werden diese Methoden als nicht-destruktiv bezeichnet und die Probe ist nach der Analyse noch intakt. Im Gegensatz dazu werden in dem Massenspektrometer Ionen aus den zu untersuchenden Molekülen erzeugt und die Überführung zurück zu dem Ausgangsmolekül der Probe ist unmöglich. Die

Massenspektrometrie wird daher als destruktive Methode der Analyse bezeichnet [BARKER, 2000; OTTO, 2011].

Die praktische Anwendung der MS liegt in der Strukturaufklärung von organischen Molekülen einschließlich der Bestimmung der Molmasse, der qualitativen und quantitativen Analyse organischer und anorganischer Proben und der Ermittlung der Isotopenverhältnisse eines Elements. Im Massenspektrum wird die Intensität, welche ein Maß für die Häufigkeit eines bestimmten Analyten ist, in Abhängigkeit vom Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) ausgewertet. In der Regel werden ein prominentes Pseudomolekülion, je nach Ionisierung im positiven Ionenmodus ein  $[M+H]^+$  und im negativen Ionenmodus ein  $[M-H]^-$  und deren Fragmentationen nach dem MS 2 mit charakteristischen Massendifferenzen ausgebildet. Im positiven Modus kommt es zu einer Wasserstoffanlagerung und das Fragment liegt als  $[M+H]^+$  vor und im negativ Modus kommt durch Abspaltung zu einem  $[M-H]^-$  [OTTO, 2011].

### 2.3.2.1. Aufbau eines Massenspektrometers

Ein Massenspektrometer besteht aus einem Einlasssystem, einer Ionenquelle mit einem Beschleunigungssystem der Ionen, einem Massenanalysator und einem Detektor in Verbindung mit einem Computer als Auswerteelektronik, wobei im MS ein Vakuum vorliegt (Abb. 25) [BARKER, 2000; OTTO, 2011].

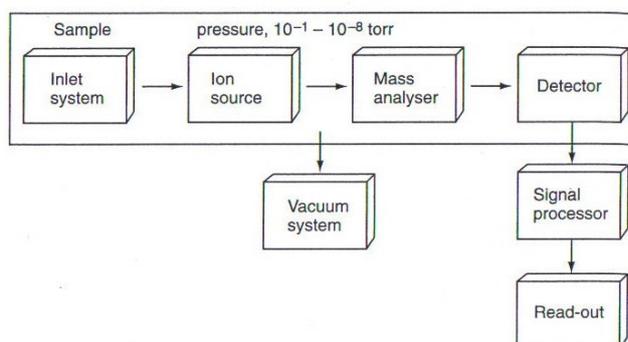


Abb. 25: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers  
[BARKER, 2000]

## LITERATUR

---

Die Ionenquelle erzeugt aus neutralen Molekülen und Elementen die zu trennenden Ionen und beschleunigen diese in den Massenanalysator. Es gibt verschiedene Ionisierungsarten, welche in Tabelle 2 ersichtlich sind [BARKER, 2000; OTTO, 2011].

**Tab. 2: Ionisation in der Massenspektrometrie [OTTO, 2011]**

Name	Abkürzung	Ionisationsquelle
Elektronenstoßionisation	EI	Elektronen
Chemische Ionisation	CI	Reagenz-Gasion
Feldionisation/Felddesorption	FI/FD	Hochspannung
Fast Atom Bombardement	FAB	Atome
Photoionisation	PI	UV-Licht
Funkenionisation	SSMS	Hochspannungsfunken
Induktiv gekoppeltes Plasma	ICP/MS	Thermisches Plasma
Sekundärionen-anregung	SIMS	Ionen

Zu den weicheren Ionisierungsverfahren zählen z. B.: ESI-MS, FAB-MS, APCI-MS, TSP-MS und sie werden in der Naturstoffanalytik bevorzugt eingesetzt, da die Fragmentierung vergleichsweise gering ausfällt und es dadurch leichter zuordenbare Fragmentionen erzielt. Geeignet sind diese auch für thermolabile Analyten und Makromoleküle [MEYER, 2004]. Hier ist die Elektrospray-Ionisation (ESI) das wohl bekannteste Verfahren der Atmosphärendruck-Ionisationsmethoden. Daher wird es auch als erste Wahl bei der Kopplung Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie verwendet [GROSS, 2013]. Ein Elektrospray (ES) wird in einem starken elektrischen Feld unter Atmosphärendruck erzeugt, indem die Flüssigkeit durch eine Kapillare gepresst wird. Zwischen der Kapillare und der Gegenelektrode herrscht eine Potentialdifferenz von 3 – 6 kV. Im Elektrospray bewirkt ein an der geladenen Flüssigkeitsoberfläche angelegtes elektrisches Feld das Zerplatzen der Tröpfchen, dadurch werden durch „Coulomb-Explosion“ Ionen  $[M+H]^+$  oder  $[M-H]^-$  erzeugt (Abb. 26) [OTTO, 2011; BARKER, 2000].

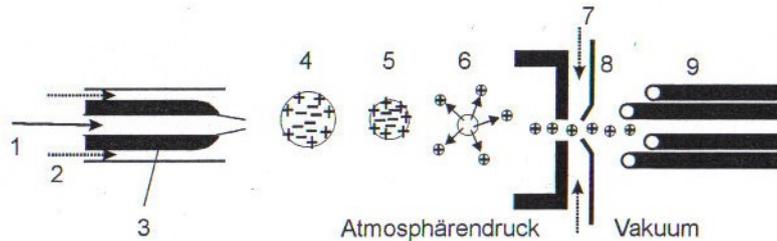


Abb. 6.17 HPLC-MS-Interface für ESI

1) Eluat aus HPLC; 2) Zerstäubergas; 3) Hochspannung; 4) geladenes Tröpfchen (zu groß gezeichnet); 5) Verdampfung; 6) Coulomb-Explosion; 7) Abschirmgas; 8) Skimmer; 9) Quadrupol.

**Abb. 26: Kopplung einer HPLC mit MS über ein Elektrospray-Interface [MEYER, 2004]**

Ein weiterer Vorteil dieser Ionisierungsmethoden ist, dass die größeren Flussraten aus bereits existierenden HPLC-Methoden nicht angepasst werden müssen und den Eluenten zur Erhöhung der Ionenausbeute lediglich ein gering konzentrierter Ionisierungszusatz (meist Ammoniumacetat, Ameisen- oder Essigsäure) zugesetzt werden muss. Als Massenanalysatoren werden hier vor allem Quadrupole und Ionenfallen eingesetzt [MEYER, 2004].

Im nachgeschalteten Massenanalysator werden die Ionen über ihr Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) unterschieden und sind das Trennsystem in der Massenspektrometrie [OTTO, 2011].

In der Tabelle 3 sind die gebräuchlichsten Massenanalysatoren für die analytische Massenspektrometrie zusammengefasst [GROSS, 2013].

## LITERATUR

Tab. 3: Grundtypen von Massenanalysatoren [GROSS, 2013]

Typ	Akronym	Funktionsprinzip
Flugzeit (time of flight)	TOF	Zeitdispersion eines gepulsten Ionenstrahls; Trennung nach Flugzeit
Magnetisches Sektorfeld	B	Ablenkung eines kontinuierlichen Ionenstrahls; Trennung nach Impuls im Magnetfeld infolge der Lorentz-Kraft
Linearer Quadrupol	Q	Kontinuierlicher Ionenstrahl in linearem Radiofrequenz-Quadrupolfeld; Trennung aufgrund der Instabilität der Ionentrajektorien
Lineare Quadrupol-Ionenfalle	LIT	Kontinuierlicher Ionenstrahl stellt Ionen für das Trapping bereit; Speicherung und letztlich Trennung in linearem Radiofrequenz-Quadrupolfeld durch Resonanzanregung
Quadrupol-Ionenfalle	QIT	Speicherung von Ionen; Trennung im dreidimensionalen Radiofrequenz-Quadrupolfeld durch Resonanzanregung
Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz	FT-ICR	Im Magnetfeld eingefangene Ionen (Lorentz-Kraft); Trennung nach Cyclotronfrequenz, Bildstrom-Detektion und Fourier-Transformation des transienten Signals
Orbitrap	Orbitrap	Axiale Oszillation in inhomogenen elektrischem Feld; Frequenzdetektion nach Fourier-Transformation des transienten Signals

Ein sehr kompakter wenig anfälliger Gerätetyp eines Massenanalysators sind Quadrupolgeräte. Im Quadrupol (Abb. 27 und 28) erfolgt die Ionentrennung, nach der vorangegangenen Ionisierung in der Ionenquelle, dynamisch. Die mit Spannung von etwa 5 bis 15 V beschleunigten Ionen werden zwischen den 4 Stabelektroden, welche aus diagonal angeordneten Metallstäben (0,6 x 15 cm) bestehen, injiziert. Diese sind an eine Gleichspannungsquelle angeschlossen, wobei an einem Paar eine positive und am anderen eine negative Gleichspannung angelegt ist. Zusätzlich zu dieser Gleichspannung wird eine Hochfrequenzspannung, die um 180° phasenverschoben ist, überlagert. Dadurch wird beim Durchlauf der Ionen in Längsrichtung der Stäbe die Frequenz und Spannung so geändert, dass nur Ionen eines gleichen Masse-zu-Ladungsverhältnisses ( $m/z$ ) das Feld durchlaufen können und auf einer bestimmten Bahn am Empfänger ankommen. Es gibt eine Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten der Massenanalysatoren Triple-Quadrupol (QqQ),

Doppel-Quadrupol (Qq), Tandem-TOF (TOF-TOF) und inzwischen auch TRAP-FT-ICR und TRAP-Orbitrap [OTTO, 2011; BARKER, 2000; GROSS, 2013].

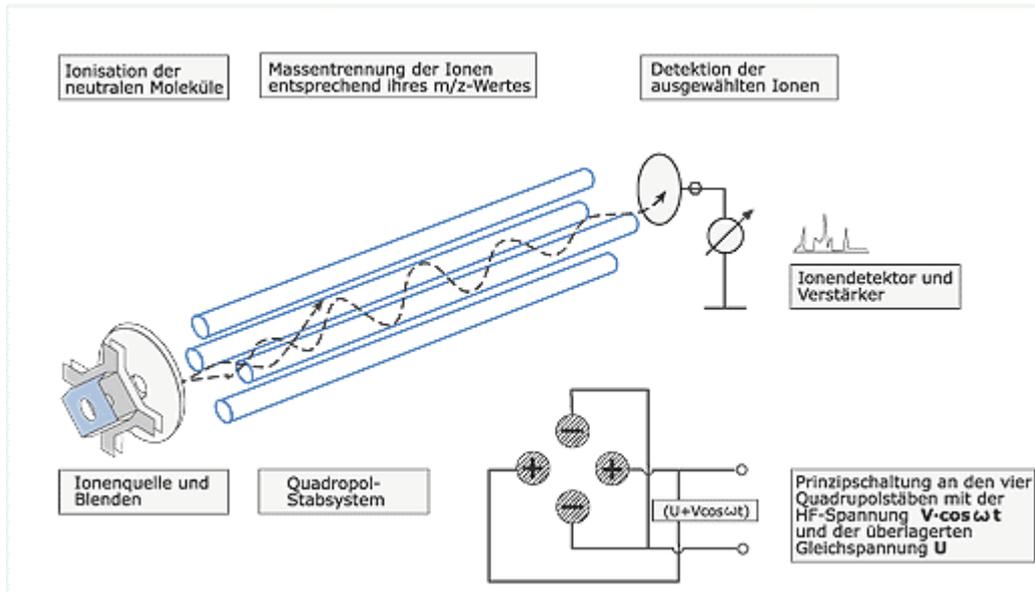


Abb. 27: Schematischer Aufbau eines Quadrupols [www.analyticjournal.de]

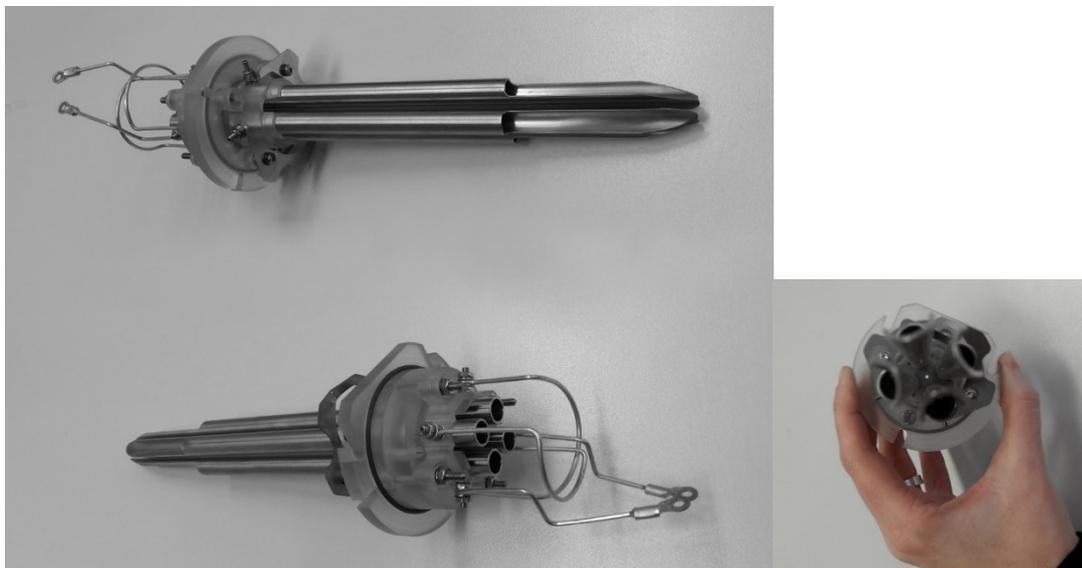
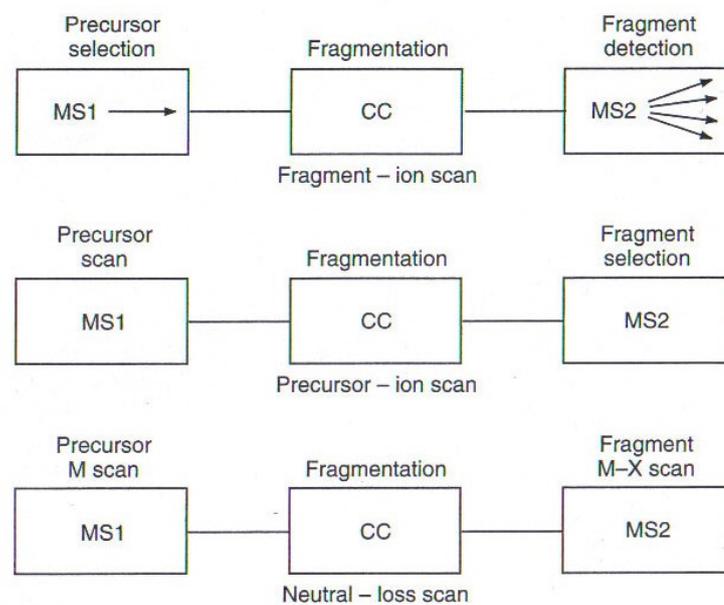


Abb. 28: Erster Quadrupol eines Massenspektrometers von AB Sciex

Die Tandem Massenspektrometrie ist eine Technik mit mehreren Massenanalysatoren hintereinander geschaltet. Der erste Analysator isoliert das Produkt-Ion (precursor ion), welches anschließend eine Fragmentierung

## LITERATUR

unterläuft wobei Produkt-Ionen  $[M+H]^+$  oder  $[M-H]^-$  und neutrale Fragmente entstehen. Ein typisches Instrument hat drei Quadrupole (Triple-Quadrupol), welche in Serie geschaltet sind. Hier fungieren der erste und dritte als Spektrometer und der mittlere als Inertgas-Kollisionszelle (CC). Andere Instrumente kombinieren elektrische und magnetische Sektoren und Quadrupole [BARKER, 2000].



**Abb. 29: Scan Modus in der Tandem Massenspektrometrie (MS/MS)**  
[BARKER, 2000]

Diese Instrumente können auf mehreren verschiedenen Arten scannen (Abb. 29). Der ersten Scan Modus beinhaltet die Selektion von Ionen mit dem gewählten Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ), dies geschieht im ersten Spektrometer (MS 1). Diese Ionen kollidieren im zentralen Quadrupol und fragmentieren. Die resultierenden Reaktionsprodukte werden im dritten Quadrupol, welcher als zweites Spektrometer fungiert, analysiert. Dies wird auch der „fragment-ion scan“ oder „daughter scan“ genannt.

Die zweite Möglichkeit besteht aus einer Fokussierung eines ausgewählten Ions am zweiten Spektrometer (MS 2), während der erste Spektrometer die Massen scannt. Alle Ionen welche ein Ion mit einer bestimmten Masse während der

Fragmentation produziert werden detektiert. Dies ist der „precursor-ion scan“ oder „parent-ion scan“.

Im dritten üblichen Scan Modus scannen beide Massenspektrometer, es wird die Massendifferenz  $X$  detektiert, wenn ein Ion mit der Masse  $M$  das MS 1 passiert und die Detektion im MS 2 erfolgt nachdem das Fragment-Ion der Masse  $[M-X]$  die Kollisionszelle verlassen hat. Dieser Scan Modus wird als „neutral-loss scan“ bezeichnet [BARKER, 2000].

Zur Umwandlung des erzeugten Ionenstroms in ein auswertbares Signal braucht man einen Detektor. Am Beginn der Entwicklung des MS wurde eine Fotoplatte eingesetzt. Heute setzt man als Flächendetektoren SEVs (Sekundärelektronenvervielfacher) ein, dessen Dynoden mit Cu/Be überzogen sind. Die konventionellen Detektoren in der Massenspektrometrie sind für den positiven Ion-Mode ausgelegt und zur Detektion negativer Ionen benötigt man eine Konversionsdiode vor dem Detektor, welcher den negativen Ionenstrom in positive Ionen umwandelt [OTTO, 2011].

### **2.3.3. Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit der Massenspektrometrie (LC-MS) in der Praxis**

Zur Analyse komplexer Gemische wird eine on-line Kopplung eines analytischen Trennverfahrens (HPLC) mit der Massenspektrometrie (MS) sehr häufig eingesetzt (Abb. 30). Analytische Kombinationsverfahren werden im Englischen als „hyphenated methods“ zusammengefasst. Es kommt zu einer verbesserten Identifizierungsmöglichkeit in Vielkomponentensystemen und es können auch hochpolare nicht flüchtige Verbindungen analysiert werden [BARKER, 2000; GROSS, 2013].

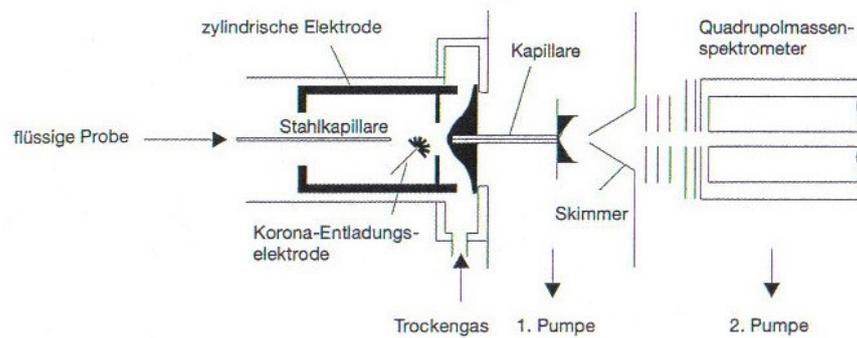


Abb. 30: Kopplung HPLC-ESI-MS [OTTO, 2011]

Mit Hilfe der Chromatographie werden die Komponenten eines Gemisches nach ihren Retentionszeiten getrennt und die gesammelten Fraktionen in das Massenspektrometer weitergeleitet, in welchem das Lösemittel verdampft wird und die Fraktionen der Ionisation zugeführt werden. In der Praxis wird zur Analyse unpolarer und mäßig polarer Substanzen das Partikelstrahl-Interface verwendet. Polare Verbindungen werden mit Thermospray oder APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) und stark polare, ionische und makromolekulare Analyten werden mit Elektrospray-Interface (ESI) ionisiert [BARKER, 2000; MEYER, 2004; GROSS, 2013]. Die Massenspektrometrie selbst erschließt weitere Dimensionen. Komplexe Probengemische können durch hohe Massenauflösung und Tandem Massenspektrometrie erschlossen werden. Hoch entwickelte massenspektrometrische Verfahren garantieren eine hohe analytische Selektivität und durch die Kopplung der Trenntechnik und Massenspektrometrie wird die Präzision und Zuverlässigkeit der analytischen Information garantiert [GROSS, 2013].

### 2.3.3.1. Der Analytische Prozess

Der Analytische Prozess (Abb. 31) umfasst ausgehend von der Fragestellung und dem daraus resultierenden analytischen Problems die Probenahme und –vorbereitung, die Analyse selbst, die Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse [OTTO, 2011].

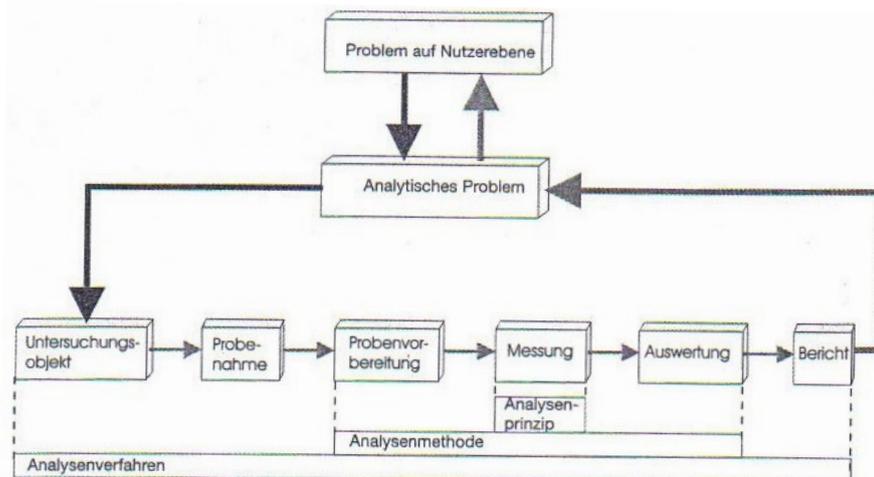


Abb. 31: Ablauf von Analysen [OTTO, 2011]

### 2.3.3.1.1 Probenahme

Die Probenahme muss repräsentativ für das Untersuchungsobjekt sein, Probenahmeort und -zeit sollten bekannt sein, die Probe muss homogen, nicht kontaminiert und bis zur Analyse stabil sein und für die analytische Untersuchung in ausreichender Menge zur Verfügung stehen [OTTO, 2011].

### 2.3.3.1.2 Probenvorbereitung

Eine Probenvorbereitung wird gemacht, um den zu untersuchenden Analyten anzureichern und durch Abtrennung der Matrix und Störionen die Probe zu reinigen (Clean up). Sie erfolgt meist durch physikalisch-chemische Techniken, wie etwa die Flüssig-Flüssig Extraktion oder die Festphasenextraktion [OTTO, 2011].

### 2.3.3.1.3 Validierung, Qualitätssicherung und statistische Bewertung

Die Validierung ist ein Verfahren, welches die Zuverlässigkeit und Präzision einer Methode, beweist. Dazu gibt es mehrere Punkte:

- **Selektivität (oder Spezifität):** Ist das System Selektiv genug die gesuchte Verbindung auch im Beisein von Begleitstoffen quantifizieren zu können.
- **Linearität:** Ist die Linearität der externen Kalibrierfunktion gegeben und geht diese durch den 0-Punkt.
- **Präzision und Richtigkeit:** Drückt die Fähigkeit aus Analysen mit kleiner Standardabweichung erneut durchführen zu können. Die Ergebnisse müssen reproduzierbar und wiederholbar sein.
- **Empfindlichkeit:** Sie geht einher mit der Fähigkeit auch kleine Konzentrationen zu bestimmen. Hier unterscheidet man die Nachweisgrenze (LOD = limit of detection) und die Bestimmungsgrenze (LOQ = limit of quantitation).
- **Robustheit:** Die erstellte Analysenmethode muss gegenüber äußeren Einflüssen (Probenvorbereitung, Analytiker, Temperatur, Zusammensetzung der mobilen Phase, Alter der Trennsäule, Detektoreigenschaften und Labor) unempfindlich sein. Hierbei ist die Dokumentation über das Gerät unabkömmlich [MEYER, 2004].

Für die Beurteilung der Qualität verwendeter Techniken und die Bewertung quantitativer Analysen müssen einige Kenngrößen erfasst werden. Diese ergeben sich aus der Kalibrierung und statistischen Bewertung und können unter Empfindlichkeit, Präzision und Richtigkeit sowie der Nachweis- und Bestimmungsgrenze ausgedrückt werden [OTTO, 2011].

Als Grundlage zur Bestimmung eines Analyten muss eine Kalibrierfunktion erstellt werden, um die Intensität des analytischen Signals in Abhängigkeit zur Konzentration einer Standardkomponente zu stellen. Diese wird separat mit den zu messenden Standards erstellt, soll wenn möglich linear sein und durch den

0-Punkt gehen. Die gefundenen Konzentrationen in den Proben werden dazu in Relation gestellt und können so quantifiziert werden.

Meist wird im Zuge der Analysen ein externer (äußerer) Kontrollstandard mitgemessen. Zusätzlich wird ein interner (innerer) Standard der Probe zu Kontrollzwecken zugesetzt (Dotation), um die Schritte der Probenvorbereitung bis zur Auswertung zu kontrollieren und um eine eventuelle Verfälschung des Analyseergebnisses durch die Probenmatrix festzustellen. Dadurch kann die Wiederfindungsrate in % errechnet werden.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze haben speziell in der Spurenanalytik eine große Bedeutung. Die Nachweisgrenze (NG) ist das kleinste erfassbare Signal und sollte für die quantitative Analyse ein Signal/Rausch-Verhältnis unter von 3 bis 5 nicht unterschreiten. Unter der Nachweisgrenze kann man das Signal nicht mehr vom Grundrauschen unterscheiden. Die Bestimmungsgrenze (BG) ist die geringste Konzentration eines Analyten, der mit festgelegter Richtigkeit und Wiederholbarkeit quantitativ nachgewiesen werden kann und wird mit einem Faktor von 10 gerechnet [OTTO, 2011; MEYER, 2004].

## 2.4. Ames Test

Der Ames *Salmonella typhimurium*/microsome mutagenicity assay (*Salmonella* Test; Ames Test) ist ein weit verbreiteter *in vitro* Bakterien Kurzzeit-Rückmutationstest, welcher speziell dafür entwickelt wurde eine große Anzahl von chemischen Substanzen, welche genetische Mutationen und Schäden hervorrufen können, zu erfassen. Der Ames Test ist ein kostengünstiges und zeitsparendes Verfahren zur Identifikation von Stoffen, welche im Stande sind *in vitro* Mutationen zu induzieren. Deshalb ist dieser im Bereich der Sicherheitsbeurteilung nicht mehr wegzudenken und Bestandteil der OECD Guidelines. Mutagene Chemikalien können Veränderungen hervorrufen, welche vor allem Fertilisationsprobleme, Mutationen in zukünftigen Generationen und Erbkrankheiten implizieren. In weiterer Folge können diese mutagenen Substanzen und deren Mutationen in den Körperzellen auch Auslöser von Krebs sein. *In vitro* bezeichnet Tests, welche außerhalb des lebenden Organismus stattfinden, z.B.: in der Petrischale [MORTELMANS und ZEIGER, 2000; GEE et al., 1994].

### 2.4.1. Geschichte – Historischer Hintergrund

Der originale Ames Test ist datiert auf das Jahr 1964, indem Bruce N. Ames ein amerikanischer Biochemiker und Genetiker verschiedene Mutanten von *S. typhimurium* fand, welche nicht in der Lage waren die Aminosäure Histidin zu synthetisieren. Nach Zugabe von mutagenen Substanzen revertierten die Bakterien zu ihren „Wildtypen“. Diese Forschung basierend auf Grundlage von Beobachtungen, schuf die Basis für den Ames Test, wie er heute noch verwendet wird. 1966 verwendeten Ames und Whitfield eine Anzahl von Histidin mutierten Bakterien, um Chemikalien und deren mutagenes Potential in einem Spot Test mit *E. Coli* Stämmen zu überprüfen. Hierbei wurden kleine Mengen der Testchemikalien direkt in das Zentrum von Selektiven Agar Medium Platten aufgebracht, welcher mit den Teststämmen beimpft war. Durch die Diffusion der Chemikalie in den Agar wurde ein Konzentrationsgradient geschaffen. Eine

mutagene Substanz würde einen Anstieg des Rings von Revertanten Kolonien in dem Bereich indem die Chemikalie aufgetragen wurde begünstigen. Während unter toxischen Bedingungen Wachstumshemmungen beobachtet werden konnten. Im Jahr 1973 entwickelten AMES *et al.* den Standard-Platten-Inkorporations-Test, welcher empfindlicher und quantitativer war als der Spot Test [MORTELMANS und Zeiger, 2000].

## **2.4.2. Testprinzip**

Der Ames Test wird weltweit als initiale Screening Methode verwendet, um das mutagene Potential von neuen Chemikalien und Medikamenten zu erfassen. Eine Substanz gilt im Ames Test als genotoxisch, wenn sie mehr als doppelt so viele Revertanten im Vergleich zur Negativkontrolle ausbildet und eine dosisbezogene Steigerung stattfindet. Als Negativkontrolle wird das Lösungsmittel verwendet indem die Testchemikalien gelöst sind [BULMER et al., 2007; MORTELMANS und ZEIGER, 2000; GEE et al., 1994].

### **2.4.2.1. Genotypen der *Salmonella typhimurium*-Teststämme**

Die beim Ames Test verwendeten *S. typhimurium* Teststämme TA 98 und TA 102 sind histidinabhängig, da sie aufgrund verschiedener Mutationsarten am Histidin-Operon dieses nicht mehr synthetisieren können. Zusätzlich enthalten die Teststämme noch andere mutationsabhängige bzw. genetische Veränderungen, dazu zählen *rfa*- und *uvrB*-Mutationen (Tab. 4) [MORTELMANS und ZEIGER, 2000].

#### **2.4.2.1.1 *rfa*-Mutation**

*Rfa*-Mutationen haben zur Folge, dass es zu einem Defekt in der Lipopolysaccharid (LPS)-Schicht kommt, welche die Bakterien umgibt. Dabei verliert diese ihre schützende Funktion und die Zellwand wird für Chemikalien

## LITERATUR

---

und andere Fremdstoffen durchlässig [AMES et al., 1973; MORTELMANS und ZEIGER, 2000].

### **2.4.2.1.2 uvrB-Mutation**

Die uvrB-Deletionsmutation unterdrückt den korrekten DNA-Reparaturmechanismus und ermöglicht in weiterer Folge die Behebung des Fehlers durch den „error-prone“ DNA-Reparaturmechanismus. Diese Genveränderung kommt bei allen Stämmen außer dem TA 102 vor. Eine Löschung der Biotingene macht die Bakterien biotinabhängig [MORTELMANS und ZEIGER, 2000].

### **2.4.2.1.3 pKm101-Plasmid**

Das pKm101-Plasmid verstärkt die durch Chemikalien und UV-Licht induzierte Mutagenese, wobei es zu einer Erhöhung des „error-prone“ Rückkombinations-DNA-Reparaturwegs kommt. Die Teststämme TA 97, TA 98, TA 100, TA 102 und TA 104 enthalten dieses Plasmid. Es verleiht den Bakterien eine Ampicillin-Resistenz, durch die die Anwesenheit des Plasmids detektiert werden kann [MORTELMANS und ZEIGER, 2000].

### **2.4.2.1.4 hisG428-Mutation**

Die hisG428-Mutation am „multicopy“ Plasmid pAQ1 im *Salmonella typhimurium* Stamm TA 102 hat zur Folge, dass die Anzahl der „target sites“ erhöht werden [MORTELMANS und ZEIGER, 2000].

### **2.4.2.1.5 Merkmale der verwendeten *S. typhimurium*-Stämme**

Der Stamm **TA 98** hat am hisD3052 Gen eine Frameshift Mutation und weist folgende DNA-Sequenz auf -C-G-C-G-C-G-C-G-. Die Reversion dieser Mutation zurück zum „wild type“-Status kann durch mehrere Frameshift-Mutagenen, wie

zum Beispiel 2-Nitrofluoren und verschiedene aromatische Nitrosoderivate erfolgen.

Während der TA 98 Stamm am *hisD3052* Gen GC Basenpaare aufweist, zeigt der Stamm **TA 102** in der Position des *hisG428* Gens AT Basenpaare. Diese Mutation ist im „multicopy“ Plasmid pAQ1, welches der Bakterienzelle des Stammes TA 102 eine Tetracyclin-Resistenz verleiht, lokalisiert. Die *hisG428*-Mutation kann von Mutagenen, welche in Zellen oxidative Schäden hervorrufen, umgekehrt werden. Zusätzlich können mit dem TA 102 Bakterienstamm Vernetzungsmittel wie zum Beispiel Bleomycin und Mitomycin C (MMC) nachgewiesen werden [MORTELMANS und ZEIGER, 2000].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der *S. typhimurium* Stamm TA 102 speziell verwendet wird, um Aussagen über Oxidativen Stress zu tätigen, wogegen der TA 98 Informationen über Frameshift Mutationen liefert, welche von chemischen Substanzen induziert werden [MÖLZER, 2007].

In der vorliegenden Untersuchung wurden die *Salmonella typhimurium* Teststämme TA 98 und TA 102 verwendet. Zum einen um verschiedene Frameshift-Mutationen zu erfassen und zum anderen um oxidativ wirksame Substanzen zu detektieren.

Tab. 4: Genotypen der eingesetzten *Salmonella* Teststämme TA 98 und TA 102.

\* rfa = rough deep factor [MÖLZER, 2007]

Mutation	Bio chID uvrB gal	LPS defect	Plasmid
<b>TA 98</b>			
hisD3052	Deletionsmutation	rfa *	pKM101 (Ampicillin-Resistenz)
<b>TA 102</b>			
hisG428	Wild type	rfa *	pKM101, pAQ1 (Tetracyclin-Resistenz)

### **2.4.3. Bakterienmetabolismus und Metabolische Aktivierung**

#### **2.4.3.1. Oxidativer Metabolismus**

Viele chemische Substanzen sind biologisch inaktiv, können aber durch den Stoffwechsel zu einer aktiven Form umgewandelt werden. Vice versa kann dies auch in umgekehrter Reihenfolge stattfinden, dass aktive Mutagene durch eben diesen inaktiviert werden. Diese Metabolisierung erfolgt bei Menschen und Tieren überwiegend durch das Cytochrom-C basierte P450 System, wobei diese hauptsächlich im Gewebe der Leber und zu einem weitaus geringeren Teil in der Lunge und der Niere stattfindet. Dort werden chemischen Stoffe zu DNA-reaktiven elektrophilen Formen umgewandelt. Aufgrund der Tatsache, dass Bakterien keine metabolische Kapazität besitzen, wird dieses üblicherweise in Form des Rattenleberhomogenisats (S9 mikrosomale Fraktion), zusammen mit der Testchemikalie und den Bakterien, in die Petrischalen zugegeben. Die S9 Fraktion enthält eine Reihe von Oxidase-Enzyme, wie zum Beispiel NADP und Kofaktoren für die NADPH-unterstützte Oxidation. Die S9 Fraktion kann auch von anderen Tierarten verwendet werden, wie zum Beispiel Mäusen, Hamster, Meerschweinchen und Affen, aber auch von der menschlichen Leber. Jedoch können Chemikalien effektiver mit Ratten-, Mäuse- oder Hamster-Leberhomogenisat als Mutagene erfasst werden [GLÖSL et al., 2004; MORTELMANS und ZEIGER, 2000].

#### **2.4.3.2. Reduktiver Metabolismus**

Das Stoffwechselaktivierungssystem beinhaltet auch reduktive Enzyme, welche speziell Azo- und Diazoverbindungen auffangen. Die Reduktion von chemischen Substanzen mittels Reduktasen erfolgt bei Säugetieren, inklusive dem Menschen, in der anaeroben Darmmikroflora, sowie in der Darmwand und der Leber. Im Allgemeinen werden bei *in vitro* Assays zwei Typen von reduzierenden Stoffwechselaktivierungssystemen verwendet, dazu zählen Leberhomogenisate mit FMN (Flavin Mononukleotid) und intestinale Mikroflora Präparate von Ratten [MORTELMANS und ZEIGER, 2000].

## 2.4.4. Einsatz von negativ und positiv Kontrollen im Ames Test

Um die Mutagenität der Testsubstanzen einordnen zu können wurden an jedem Testtag drei Platten mit Positivkontrolle und sechs Platten Negativkontrolle mitgemacht.

### 2.4.4.1. Positiv Kontrolle - diagnostizierte Mutagene

Als Positivkontrolle werden üblicherweise bekannte toxische Substanzen verwendet, um die Reversionseigenschaften der Teststämme und die Effizienz des S9-Mixes zu bestätigen. Die in unserer Untersuchung verwendeten Standardmutagene wurden nach einer weitgehenden Literaturrecherche aus dem Paper von MORTELMANS und ZEIGER (2000) ausgewählt (Tab. 5).

Tab. 5: Ausgewählte Standardmutagene und die verwendeten Konzentrationen [modifiziert nach: MORTELMANS und ZEIGER, 2000]

Stamm mit und ohne metabolischer Aktivierung	Standardmutagen mit den Richtkonzentrationen ( $\mu\text{g}/\text{Platte}$ )	Verwendete Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{Platte}$ )	Anzahl der Revertanten auf den Platten
TA 98 –S9	4-Nitro-o-phenylendiamine (2,5 $\mu\text{g}/\text{Platte}$ )	2 $\mu\text{g}/\text{Platte}$	200 - 300
TA 98 +S9	2-Aminoantracene (1 - 5 $\mu\text{g}/\text{Platte}$ )	0,1 $\mu\text{g}/\text{Platte}$	200 - 300
TA 102 –S9	Mitomycin C (0,5 $\mu\text{g}/\text{Platte}$ )	0,2 $\mu\text{g}/\text{Platte}$	1200 - 1500
TA 102 +S9	2-Aminoantracene (5 - 10 $\mu\text{g}/\text{Platte}$ )	5 $\mu\text{g}/\text{Platte}$	1600 - 1800

Zur genauen Auswahl der Konzentrationen wurde ein Vortest durchgeführt, wobei jeweils sechs Konzentrationen des Standardmutagens für jeden *Salmonella* Stamm mit und ohne metabolische Aktivierung getestet wurden. Als Richtwerte wurden die in der Literatur angegebenen Konzentrationen verwendet. Aufgrund der guten Löslichkeit und zum besseren Vergleich wurden die Mutagene 4-Nitro-o-phenylendiamine und Mitomycin C für die Tests ohne S9 Mix in der Negativkontrolle (Lösungsmittel) gelöst. Weil sich

## LITERATUR

---

2-Aminoantracene, welches für beide Stämme mit metabolischer Aktivierung verwendet wurde, im Lösungsmittel (H<sub>2</sub>O/MeOH) nicht löste, wurde dieses Mutagen in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt.

### 2.4.4.2. Negativ Kontrolle – Spontan-Revertanten

Jeder Bakterienteststamm weist eine für ihn charakteristische Frequenz an Spontanmutationen auf (Tab. 6), wobei es zu Variationen zwischen den einzelnen Testtagen, aber auch zwischen den unterschiedlichen Laboratorien kommt. Zusätzlich wirkt sich die Auswahl des Lösungsmittels auf die Spontanmutationen aus. Für jeden Mutationstest sollten mindestens 3 Kontrollplatten pro Stamm an jedem Testtag verwendet werden. Um tagesabhängige Abweichungen erfassen zu können, wurde jeder Test in Doppelbestimmung, meist am darauf folgenden Tag, durchgeführt.

Tab. 6: Spontanrevertanzahl bei den verwendeten Standard-Teststämmen [modifiziert nach: MORTELMANS und ZEIGER, 2000]

Teststamm	Anzahl der Revertanten	
	ohne S9	mit S9
<i>S. typhimurium</i> TA 98	20 - 50	20 - 50
<i>S. typhimurium</i> TA 102	100 - 300	200 - 400

Abbildung 32 zeigt die Spontanrevertanten des *Salmonella typhimurium* Stamms TA 98 ohne metabolische Aktivierung nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden.

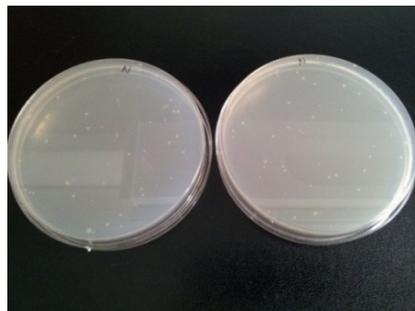


Abb. 32: Spontanrevertanten der Negativkontrolle TA 98 ohne S9

#### **2.4.5. Der Präinkubationstest**

Der Präinkubationstest ist eine Modifikation des Standard-Platten-Inkorporationstests und beinhaltet eine Vorinkubation der Teststämmen für 25 Minuten in einem kleinen Volumen (2,8 ml), welches die Testsubstanz, die Bakteriensuspension, den PBS-Puffer oder S9-Mix und den Top Agar enthält. Im Gegensatz dazu werden beim Standard-Platten-Inkorporationstest die Teststämmen und Testchemikalien direkt in den Minimalglukose Agar gegeben und auf die Platten ausgegossen. Der Präinkubationstest ist vor allem für kurzlebige mutagene Metabolite von Vorteil, da diese im kleineren Volumen des Präinkubationsmixes bessere Chancen haben mit den Teststämmen zu interagieren und die metabolische Aktivierung aufgrund der höheren effektiven Konzentration des Rattenleberhomogenats und dessen Kofaktoren wirksamer ist [MORTELMANS und ZEIGER, 2000].

#### **2.4.6. Ames Test und Saponine**

Bis dato gibt es eher wenig aussagekräftige Literatur über Saponine welche mittels Ames Test auf deren Mutagenität bzw. Oxidativität untersucht wurden. Wobei viele der gefundenen Studien eher saponinhaltige Pflanzenextrakte als die Reinsubstanzen getestet haben.

CZERCZOT et al. (1993) untersuchten die drei Hauptsaponine der Luzerne (Alfaalfa) Medicagensäure, Hederagenin und Soyasaponin I mittels Ames Test. Es wurden die *Salmonella typhimurium* Stämme TA 97, TA 98, TA 100 und TA 102 mit und ohne metabolische Aktivierung verwendet. Es wurden vier verschiedene Konzentrationen (50, 100, 250 und 500 µg/Platte) im Dreifachansatz getestet. Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Anstieg der Revertanten in allen vier eingesetzten Bakterienteststämmen [CZERCZOT et al., 1993].

In einer Studie von HUNG et al. (2007) wurden mutagene und antimutagene Effekte von mit Methanol extrahierten fermentierten und nicht fermentierten schwarzen Sojabohnen mit den Teststämmen TA 98 und TA 100, gegen

## LITERATUR

---

4-Nitroquinoline-N-oxid (4-NQO) als direktes und Benzo[a]pyrene (B[a]P) als indirektes Mutagen, in vier Konzentrationen (0,625 – 5 mg/Platte) getestet. Bei den beiden Teststämmen konnte keine Mutagenität der getesteten Extrakte beobachtet werden. Die Ergebnisse auf Antimutagenität zeigten beim TA 98 und TA 100 einen hemmenden Effekt der Extrakte gegen die beiden getesteten bekannten direkten und indirekt wirkenden Mutagene (4-NQO und B[a]P), wobei zusätzlich eine Dosisabhängigkeit beobachtet wurde. Des Weiteren wurden bei allen getesteten Konzentrationen bei den fermentierten Proben höhere antimutagene Effekte festgestellt [HUNG et al., 2007].

MA et al. (2011) untersuchten das Steroidsaponin DT-13 isoliert aus der Wurzelknolle der *Liriope muscari*. Ziel dieser Studie war es die Genotoxizität sowie die akute orale Toxizität und die allgemeine Sicherheit dieses Saponins zu beurteilen. Der Ames Test wurde mit den *S. typhimurium* Stämmen TA 97, TA 98, TA 100 und TA 102 in Anwesenheit und Abwesenheit eines Stoffwechselaktivierungssystems (Rattenleberhomogenat) und einem Konzentrationsbereich zwischen 0,05 und 500 µg/Platte durchgeführt. Die Testergebnisse bestätigten, dass das DT-13 keine Mutationen in den Histidinauxotrophen *Salmonella* Stämmen sowohl ohne als auch mit metabolischer Aktivierung induzierten [MA et al., 2011].

In der Studie von RAMOS et al. (1998) wurden Extrakte der *Calendula officinalis* L. mittels Ames Test auf deren Mutagenität bzw. Antimutagenität getestet. Durchgeführt wurde der Bakterienrückmutationstest in fünf verschiedenen Konzentrationen (50 – 5000 µg/Platte) im Dreifachansatz mit den *S. typhimurium* Stämmen TA 153S, TA 1537, TA 98 und TA 102. In den Ergebnissen konnte kein Anstieg der Revertanzahlen bei allen vier Bakterienstämmen beobachtet werden, weder mit als auch ohne metabolische Aktivierung. Beim Teststamm TA 100 (speziell ohne S9-Zugabe) konnte zwar in höheren Dosen (1500 – 5000 µg/Platte) eine Erniedrigung der Revertanten beobachtet werden, es war jedoch statistisch nicht signifikant und ist vermutlich auf das toxische Potential des Extrakts zurückzuführen [RAMOS et al., 1998].

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Probenumfang - Jahresreihe**

Über einen Zeitraum von einem Jahr (März 2011 bis April 2012) wurden mehrere Oberflächengewässer in fünf österreichischen Bundesländern (Wien, Steiermark, Vorarlberg, Ober- und Niederösterreich) und vereinzelt auch Zu- und Abläufe von Kläranlagen (Vorarlberg) beprobt (Tab. 7 und Abb. 33). Die Auswahl der insgesamt 34 Messstellen (31 Immission- und 3 Emissionsmessstellen) wurde von der Projektleitung des Schaumprojektes durchgeführt. Die Probenahme erfolgte monatlich durch Mitarbeiter der teilnehmenden Länder bzw. des Umweltbundesamtes.

Es wurden jeweils 2 Liter Oberflächenwasser- oder Abwasserprobe in zwei 1 Liter Glasflaschen gezogen, wobei 1 Liter für den Parameter Schäumungspotential und mindestens 200 ml für die Probenvorbereitung für die LC-MS/MS Analyse verwendet wurden. Zusätzlich wurden in Oberösterreich, Wien und Niederösterreich 500 ml Probe in 0,5 Liter Glasflaschen für den Parameter Oberflächen- und Grenzflächenspannung genommen. Einzig in Wien und Niederösterreich wurden außerdem noch je 100 ml Probe für die Parameter Anionen und Kationen und 100 ml für TOC den gesamten organischen Kohlenstoff (= engl. Total Organic Carbon) abgefüllt. Danach wurden die Proben umgehend an das Umweltbundesamt geschickt, bei 4 °C gekühlt gelagert und so bald wie möglich analysiert. In Oberösterreich, der Steiermark und in Vorarlberg wurden die zusätzlichen Parameter von den Labors der einzelnen Länder untersucht und die Ergebnisse übermittelt.

## MATERIAL UND METHODEN

Tab. 7: Probenahme-Messnetz für die Jahresreihe

Bundesland	Gewässer	Beeinflussung	Lage der Messstelle zum Einleiter
Oberösterreich	Ager 3	Papierfabrik	uh. ARA Lenzing/Attersee
	Antiesen 4	Kläranlage; LW	uh. KA Ried i. Innkreis
	Dürre Aschach 2	KA; Landwirtschaft	uh. ARA Neumarkt i. H.
	Dürre Aschach 3	Landwirtschaft	uh. ARA Neumarkt i. H.
	Feldaist 4	Kläranlage	uh. ARA Freistadt
	Große Rodl 3	KA; Landwirtschaft	uh. KA Zwettl a. d. Rodl
	Hörschingerbach 1	LW (Drainagen)	
	Innbach 2	KA; Landwirtschaft	uh. KA Gaspoltshofen
	Ipfbach 1	LW (Drainagen)	
	Krems 4	KA; Öllager; LW	uh. KA Oberes Kremstal
	Pram 6	Kläranlage; LW	uh. KA Taufkirchen
	Ranna 1	KA; Siedlung; LW	uh. KA in Bayern
	Traun 2	Kohlebergbau und Produktion von Graphitprodukten	
	Reichramingbach (Zöbelgrabenbach)	anthropogen un- bzw. gering belastet	vor Einmündung in den großen Weißenbach
Wien und NÖ	Halterbach	anthropogen un- bzw. gering belastet	Wien 14. Bezirk
	Rußbach 1	Landwirtschaft	oh. Agrana Zucker GmbH
	Rußbach 2	Zuckerproduktion	uh. Agrana Zucker GmbH
	Pulkau 1	KA; LW	oh. Jungbunzlauer Austria AG
	Pulkau 2	Chemische Industrie	uh. Jungbunzlauer Austria AG
	Erlauf *	Brauerei	uh. und oh. ARA Wieselburg
	Mühlbach *	Brauerei	uh. und oh. Egger
Url *	Molkerei	uh. und oh. Berglandmilch	
Steiermark	Kainischtraun	Gips-, Bergbau u. Prod. von Gipskartonplatten	uh. Firma Rigips
	Mur 1 (oh Frohnleiten)	Kläranlage	oh. Papierfabrik Sappi
	Mur 2 (Weinzödlwehr)	Papierfabrik	uh. Papierfabrik Sappi
	Pöls	Papierfabrik	uh. ARA Frohnsdorf
	Raab 1 (Wollsdorf)	Lederindustrie	uh. Schmidt Wollsdorf
	Raab 2 (Feldbach)	Lederindustrie; KA	oh. Boxmark Feldbach
	Raab 3 (Ertlermühle)	Lederindustrie	uh. Boxmark Feldbach
	Raab 4 (Hohenbrugg)	Diverse Industrie, LW	letzte Stelle vor dem Burgenland
	Thörlbach	Metallverarbeit. Industrie	uh. Stahlwerk Böhler Uddeholm
	Vordernbergerbach	Metallverarbeit. Industrie	uh. Voest Alpine Stahl

\* aufgelassene Messstellen

Bundesland	Gewässer	Beeinflussung	Lage der Messstelle zum Einleiter
Vorarlberg	Ill (Lutz)	vor Einleitung der KA	oh. ARA Ludesch
	Ill (Lutz)	KA; Textilindustrie	uh. ARA Ludesch
	Abwasser	Textilbetrieb	Tagesmischprobe
	Abwasser	ARA Ludesch Zulauf	(60 % Abwasser Textilbetrieb)
	Abwasser	ARA Ludesch Ablauf	

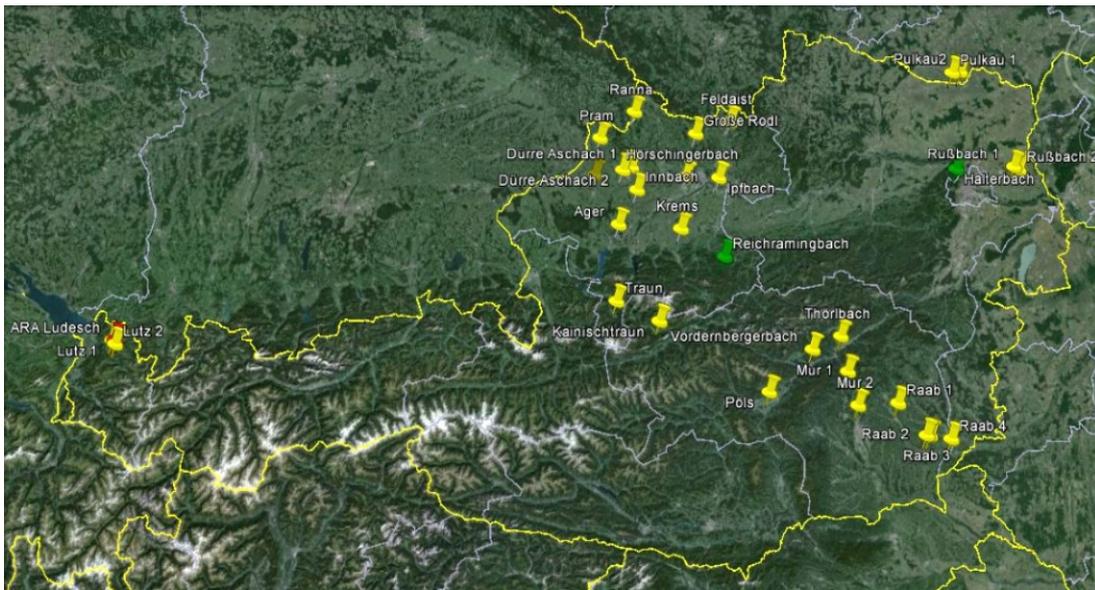


Abb. 33: Übersicht der Messstellen in Österreich

Die Auswahl der Messstellen erfolgte aufgrund möglicher Einflussfaktoren auf die Gewässerbeschaffenheit und somit auch auf die Schaumbildung. Des Weiteren sollte auch der Effekt punktueller und diffuser Belastungsquellen auf das Schaumbildungsvermögen österreichischer Gewässer berücksichtigt und untersucht werden. Dazu wurden verschiedene industrielle Einleiter differenter Industriebranchen, kommunale Kläranlagen und Gebiete mit intensiver Landwirtschaft ausgewählt. Wobei Standorte bevorzugt wurden, bei denen das Fließgewässer möglichst nur durch eine der genannten Belastungsquellen beeinflusst wird. Hierzu wurde als Kriterium zur Unterscheidung von landwirtschaftlichen oder durch kommunales Abwasser beeinflussten Messstellen der „Anteil der landwirtschaftlichen Nutzfläche an der gesamten Einzugsgebietsfläche“ und „Anteil des gesamten im

## MATERIAL UND METHODEN

Einzugsgebiet eingeleiteten Abwassers am Abfluss an der Messstelle“ herangezogen. Zum Vergleich waren auch zwei Hintergrundmessstellen inkludiert, welche anthropogen un- bzw. nur sehr gering belastet sind. Hier sollten im Speziellen mögliche jahreszeitliche Schwankungen des Schaumbildungsvermögens aufgrund biogener Ursachen, wie natürliche Veränderungen im Kohlenstoffkreislauf (z.B.: hervorgerufen durch absterbendes organisches Material, Algenblüte oder Schmelzwasser) untersucht werden.

In Tabelle 8 befindet sich eine Auflistung der untersuchten Messstellen geordnet nach den Haupteinflussfaktoren auf die Gewässerbeschaffenheit. Eine genaue Auflistung und Beschreibung derselbigen befindet sich im Anhang. Die Einteilung der Messstellen zu den Belastungsquellen erfolgte anhand eines geographischen Informationssystems und aufgrund der Informationen der einzelnen Bundesländer.

**Tab. 8: Auflistung der im Rahmen des Schaummessnetzes untersuchten Messstellen (MSt.)**

Hauptbelastungsquelle		Anzahl der MSt. oberhalb der Einleitung	Anzahl der MSt. unterhalb der Einleitung
Industrie	Papierindustrie	---	3
	Lederindustrie	---	4
	Textilindustrie *	1	1
	Metallverarbeitende Industrie	---	2
	Kohle und Bergbau	---	1
	Zuckerproduktion	1	1
	Zitronensäureproduktion	1	1
	Kommunale Kläranlagen	---	2
	Landwirtschaft	---	6
	Kommunale Kläranlagen und Landwirtschaft	---	5
	Hintergrundmessstellen **	---	3

\* Zusätzlich wurde bei der Textilindustrie der Abwasserablauf des Textilbetriebes, sowie der Zu- und Ablauf der kommunalen Kläranlage, in welche dieser einleitet, beprobt.

\*\* Die Hintergrundmessstellen wurden zusätzlich ausgewählt, um als Vergleich Informationen über anthropogen un- bzw. gering belasteten Gewässern zu haben.

### **3.2. Analytische Methoden**

Die analytische LC-MS/MS Methode zur Bestimmung ausgewählter Saponine in verschiedenen Oberflächengewässern und vereinzelt auch in Abwässern wurde im Rahmen einer Dissertation am Umweltbundesamt Abteilung Organische Analysen entwickelt. Die Analytik von Saponinen stellt eine große Herausforderung dar, da Saponine keine Chromophore enthalten, meist in sehr komplexen Gemischen vorliegen, sich teilweise strukturell nur sehr gering unterscheiden und es aufgrund der großen strukturellen Variabilität der Aglykone und der Glykone eine Unzahl an Strukturen gibt. Allein bei den Steroidsaponinen gibt es über 100 verschiedene Substanzen. Aufgrund des nichtflüchtigen Charakters der Moleküle und der hohen Sensitivität und Selektivität der Analysenart war die Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit einem Tandem Massenspektrometer (LC-MS/MS) das Mittel der Wahl. Als Probenvorbereitung wurden die Festphasenextraktion (SPE = Solid Phase Extraction) für Oberflächenwässer und die Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE = Liquid-Liquid Extraction) für Abwässer durchgeführt.

#### **3.2.1. Allgemeine Probenaufarbeitung – Festphasenextraktion (SPE)**

Die Extraktion und Anreicherung der Saponine aus den Oberflächenwasserproben wurde mit dem automatischen Festphasenextraktionssystem Auto Trace SPE Workstation (Zymark, Hopkinton, MA, United States) durchgeführt. Während der Festphasenextraktion kommt es wie bei der Flüssigkeitschromatographie zu einer Wechselwirkung der einzelnen Substanzen mit dem Packungsmaterial (Silikagel mit C 18 = Octadecyl Endketten) der Festphasenextraktionssäulchen. Durch die Wechselwirkung bleiben die Substanzen an der Oberfläche der SPE-Säulchen haften und werden anschließend durch entsprechende Eluenten von dieser eluiert und als

## MATERIAL UND METHODEN

Extrakte gesammelt. Mit dem Extrakt wurde danach weitergearbeitet. Die für die SPE verwendeten Geräte und Chemikalien sind in den Tabellen 9 und 10 zusammengefasst.

**Tab. 9: Verwendete Geräte bei der SPE**

Gerät	Hersteller und Infos
Analysenwaage	BP 210 D; Sartorius AG (Göttingen, Germany)
pH-Meter	pH 196; WTW GmbH (Weilheim, Germany)
Pipetten	Eppendorf Reference 100 – 1000 µl; 50 – 200 µl und 2 – 20 µl
Auto Trace	SPE Workstation; Zymark Corp. (Hopkinton, MA, USA)
Isolute Festphasen-extraktionssäulen	C18 (EC), Sorbent mass 3 g, Reservoir Volume 6 ml, PART No. 221-0300-C, International Sorbent Technology
Autosampler Vials	20 ml Glas für GC
TurboVap II	Concentration Workstation; Zymark Corp. (Hopkinton, MA, USA)
Vials für TurboVap	50 ml mit 0,5 ml Endvolumenvorrichtung
1 ml Messkolben	Volumen 1 ml, Trapezform, DURAN®; Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt, Germany)
Autosampler Vials und Kappen	1,5 ml, Gewinde: 8 – 425; 32 x 11,6 mm, Braunglas; Deckel 0,1 ml Mikroinsert/15 mm Spitze) Markus Bruckner Analysetechnik (Linz, Austria)

**Tab. 10: Verwendete Reagenzien und Chemikalien für die SPE**

Reagenzien und Chemikalien	Hersteller	Produktnummer (CAS Nr.)
Ammonium acetate (NH <sub>4</sub> Ac)	Merck	631-61-8
Wasser Optigrade for HPLC	Prochem	7732-18-5
Methanol for HPLC	VWR BDH Prolabo	67-56-1
Aceton	Pestnorm	67-64-1
Ethylacetat	Merck	141-78-6
Eisessig 98 – 100 % (Acetic acid glacial)	Merck	64-19-7

Die Festphasenextraktion (SPE) wurde zur Probenaufarbeitung von Oberflächengewässern und zur Anreicherung der darin enthaltenen Saponine verwendet, wobei hier ein Probenvolumen von 200 ml bzw. 100 ml in 500 ml Glasflaschen eingewogen wurde. Anschließend wurden diese mit 2 bzw. 1 ml

Acetatpuffer, bestehend aus 36 g Ammoniumacetat ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ ) gelöst in 500 ml MilliQ-Wasser, versetzt und mit HAc 100 % ein pH-Wert von 4,5 (pH Range 4,45 bis 4,55) eingestellt.

Für jeden Extraktionsdurchgang (6 AutoTrace Positionen) wurde immer zusätzlich eine Probe mit 200  $\mu\text{l}$  eines Mischstandard der zu analysierenden Substanzen (Saponine) als Wiederfindung dotiert, wobei die Konzentration des Mischstandards 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  betrug. Die Konzentration der Wiederfindung und des zusätzlich gemachten Kontrollstandards betrug somit 200  $\text{ng}/\text{ml}$  als Sollwert. Dieses Verfahren wurde angewandt, um die Verluste der Analyten während der Probenaufbereitung zu detektieren und diente zur Bewertung der Qualität des analytischen Verfahrens. Ist die Wiederfindungsrate geringer (z.B. 70 %), ist dies ein Hinweis auf Substanzverluste während der Probenvorbereitung. Die gefundenen Konzentrationen wurden mit der Wiederfindung [%] korrigiert und bei der Auswertung und Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt.

Für die Festphasenextraktion wurden Isolute-C18(EC) Festphasen-Extraktionssäulen mit 3 g Kieselgel-Packungsmaterial verwendet und als ersten Schritt im Auto Trace mit jeweils 5 ml Methanol (MeOH) und 5 ml HPLC-Wasser konditioniert. Anschließend wurden 250 bzw. 110 ml der Proben (maximal 6) mit einem Fluss von 10  $\text{ml}/\text{min}$  über die dazugehörigen Säulchen geladen, wobei hier die Adsorption der Analyten an der stationären Phase stattfand. Danach wurden die Säulen 75 min lang mit Stickstoff getrocknet, um diese für die Elution vorzubereiten, welche dann in mehreren Schritten mit 4 ml MeOH, 3 ml MeOH, 2 ml HPLC-Wasser und 5 ml Aceton erfolgte. Danach wurden die Säulen wieder 30 min mit Stickstoff getrocknet und nochmals mit 10 ml Ethylacetat (EtAc) eluiert. Dieser Schritt wurde aber später weggelassen, da die Überlegung diesen einzusetzen jene war, auch die letzten Reste der apolaren Substanzen (Diosgenin) von der Säule zu bekommen. Dieser Ansatz konnte jedoch nicht bestätigt werden. Eine weitere Änderung in der Probenvorbereitung, war das Reduzieren des Probenvolumens von 200 ml auf 100 ml, da angenommen wurde, dass das Solanin, die polarste Substanz durch die SPE-Säulchen gewaschen werden.

## MATERIAL UND METHODEN

---

Diese Änderungen konnten jedoch nicht verifiziert werden und so wurde weiterhin mit einem Probenvolumen von 200 ml gearbeitet. Zusätzlich wurde als dritter Eluent Ethylacetat statt Aceton verwendet, da letzteres die O-Ringe des AutoTrace angreift und nur in Ausnahmefällen verwendet werden sollte. Die Probenextrakte wurden nach der Extraktion in je einem 20 ml Glasvial gesammelt und in Turbovapvials überführt, wobei die 20 ml Glasvials dafür noch mit 1 ml MeOH gespült wurden. Es folgte ein Einengungsschritt auf dem Turbovap bei 40 °C, bei dem Stickstoff mit einem Druck von 1,2 bar eingeblasen und das Extrakt auf ein Volumen von 0,5 ml eingengt wurde. In weiterer Folge fand ein Lösungsmitteltausch auf 100 % MeOH statt. Dabei wurde die Glaswand mit 2 ml MeOH abgespült und nochmals auf 0,5 ml eingengt. Die Probenextrakte wurden anschließend in einen 1 ml Messkolben überführt, mit MeOH nachgespült und bis zur Markierung aufgefüllt. Danach wurden die fertigen Proben in Autosampler-Vials umgefüllt und mittels LC-MS/MS gemessen. Bis zur Analyse konnten diese im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt werden.

### **3.2.2. Allgemeine Probenaufarbeitung – Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE)**

Für die Probenaufarbeitung der Abwasserproben wurde eine Extraktion der Analyten mittels Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE = Liquid-Liquid Extraction) mit Trichlormethan (Chloroform =  $\text{CHCl}_3$ ) verwendet, da die Verunreinigung der Proben teilweise sehr hoch war und diese nicht über die eng gepackten Festphasenextraktionssäulchen geladen werden konnten. Die Flüssig-Flüssig Extraktion basiert auf der dem Prinzip Löslichkeit der Analyten in zwei nicht miteinander mischbaren Phasen (einer polaren hydrophilen - meist Wasser und einer apolaren lipophilen Lösung – organisches Lösungsmittel) und in beiden Phasen lösbaren Substanzen. Das Nernst'sche Verteilungsgesetz (Abb. 34) bietet hierfür die Grundlage [HEIN und Kunze, 1994]:

$$K = \frac{c_A(\text{Phase 2})}{c_A(\text{Phase 1})}$$

Abb. 34: Nernst'sches Verteilungsgesetz  
[de.wikipedia.org]

Die Gleichung lässt sich als Nernst'scher Verteilungssatz formulieren: „Ein Stoff verteilt sich so zwischen zwei nicht mischbaren Phasen, dass das Konzentrationsverhältnis in den beiden Phasen bei konstanter Temperatur einen konstanten Wert annimmt.“ [OTTO, 2011].

Die Tabellen 11 und 12 zeigen die für die LLE verwendeten Geräte, Reagenzien und Chemikalien.

Tab. 11: Verwendete Geräte bei der LLE

Gerät	Hersteller und Infos
Analysenwaage	BP 210 D; Sartorius AG (Göttingen, Germany)
pH-Meter mit Einstabmesskette	pH 196; WTW GmbH (Weilheim, Germany)
Kreisschüttler	Type LS20; Gerhardt Analysensysteme GmbH & Co. KG (Bonn, Germany)
Laborschüttler Vibrofix	IKA GmbH & Co. KG (Staufen im Breisgau, Germany)
Ultraschallbad	Sonorex; Bandelin GmbH (Berlin, Germany)
Pipetten	Eppendorf Reference 100 – 1000 µl und 50 – 200 µl
Finnpipetten	Thermo Scientific Finnpipette 2 – 10 ml und 1 – 5 ml
Glasflaschen	Pyrex 500 ml mit blauem Schraubverschluss
Scheidetrichter	Volumen 500 oder 1000 ml
TurboVap II	Concentration Workstation; Zymark Corp. (Hopkinton, MA, USA)
Vials für TurboVap	200 ml mit 1 ml Endvolumenvorrichtung
1 ml Messkolben	Inhalt 1 ml, Trapezform, DURAN®; Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt, Germany)
Autosampler Vials und Kappen	1,5 ml, Gewinde: 8 – 425; 32 x 11,6 mm, Braunglas; Deckel 0,1 ml Mikroinsert/15 mm Spitze Markus Bruckner Analysentechnik (Linz, Austria)

## MATERIAL UND METHODEN

**Tab. 12: Verwendete Reagenzien und Chemikalien für die LLE**

Reagenzien und Chemikalien	Hersteller	Produktnummer (CAS Nr.)
Reinstwasser	Milli-Q-Plus, Millipore	
Methanol für HPLC	VWR BDH Prolabo	67-56-1
Chloroform (Trichlormethan) für HPLC	VWR BDH Prolabo	67-66-3
Salzsäure 32%ig	Merck	7647-01-0
Natriumchlorid (NaCl)	Merck	7647-14-5
LAS (= lineare Alkylbenzolsulfonate) Marlon M 375	BOC Sciences	42615-29-2

Die Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE) wurde zur Probenaufarbeitung der Abwässer und Anreicherung der Saponine verwendet. Es wurden wieder jeweils 200 ml Probe in 500 ml Glasflaschen eingewogen und der pH-Wert mit 32%iger HCl auf einen pH-Wert von 4,5 (pH Range 4,45 bis 4,55) eingestellt. Anschließend folgte eine Zugabe von 10 g Natriumchlorid (NaCl) pro Probe und 40 µl LAS (= lineare Alkylbenzolsulfonate) auch Marlon M 375 genannt. Als Wiederfindung wurde für jeden Durchgang (max. 11 Proben) eine Probe mit 200 µl Mischstandard (Saponine c = 1000 ng/ml) dotiert, um die Qualität der Extraktion zu kontrollieren. Die Wiederfindungen in % wurden wiederum bei der Auswertung und Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt.

Für die Extraktion wurden die Proben mit 20 ml Chloroform (Trichlormethan =  $\text{CHCl}_3$ ) versetzt und etwa 10 Minuten lang auf dem Kreisschüttler geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung in einen Scheidetrichter überführt und nach der vollständigen Phasentrennung wurde der  $\text{CHCl}_3$ -Extrakt (untere Phase = organisch) in einem 200 ml Turbovial mit 1 ml Endvolumen gesammelt. Die restliche Wasserphase wurde in die Probenflaschen zurückgegeben, erneut mit 20 ml Chloroform versetzt und ein zweites Mal extrahiert. Der Extraktionsschritt wurde insgesamt 3 Mal durchgeführt, wobei man im Gesamten einen 60 ml  $\text{CHCl}_3$ -Extrakt erhält. Anschließend wurde in die jeweiligen Probenahmeflaschen als Waschschrift 10 ml Chloroform zugegeben, geschwenkt und danach in den dazugehörigen Scheidetrichter

überführt, auch dieser damit gespült und zum Schluss ins entsprechende Turbovial transferiert (Endvolumen 70 ml  $\text{CHCl}_3$ -Extrakt) und damit weitergearbeitet.

Zur Einengung des Extraktionsmittels wurden als nächstes die Extrakte am Turbovap bei 40° C und etwa 1,5 bar zur Trockene eingeengt und in 8 ml Chloroform aufgenommen. Hinterher erfolgte die Abtrennung der Störionen durch Rückextraktion mit Wasser. Dazu wurden dieser Lösung im Turbovial 4 ml Milli-Q-Wasser zugesetzt, die organische Phase mittels Vibrofix ausgeschüttelt und somit neutral gewaschen (Entfernung anionischer Verunreinigungen). Die Wasserphase wurde mittels Glaspipette so gut wie möglich abgezogen und verworfen. Dabei ist allerdings darauf zu achten, dass keinesfalls Schwebstoffe und Chloroform entfernt werden. Bei schlechter Phasentrennung wurden die Turbovials für ein paar Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Der Schritt des Neutralwaschens mit 4 ml MilliQ-Wasser wurde ebenfalls insgesamt 3 Mal wiederholt, um eine reinere organische Phase zu erhalten und dadurch eine bessere Analytik zu garantieren.

Danach wurde die Chloroform-Phase bei 40° C und etwa 1,5 bar am Turbovap unter Zusatz von MeOH abermals zur Trockene eingeengt. Anschließend erfolgte der Lösungsmitteltausch indem die Glaswand mit 2 bis 4 ml MeOH nachgespült und zum Schluss auf ein Volumen von ca. 0,3 ml eingeengt wurde.

Diese Lösung wurde mittels Glaspipette in einen 1 ml Messkolben überführt und unter Nachwaschen des Turbovials mit MeOH bis zur Marke aufgefüllt. Nach dem Schütteln lässt man einen Großteil der Schwebstoffe absetzen (ca. 15 min. stehen lassen) und zum Schluss wurde die Probe in ein Autosampler Vial abdekantiert. Die fertigen MeOH-Extrakte konnten wiederum bis zur LC-MS/MS Analyse im Kühlschrank bei etwa 4 °C gelagert werden.

### 3.2.3. Flüssigkeits-Chromatographie – Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

#### 3.2.3.1. Allgemeines

Die Proben wurden mit Festphasenextraktion (SPE) oder Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE) extrahiert und die Analyten mittels Flüssigkeitschromatographie = Liquid Chromatography (LC) mit Hilfe einer analytischen Reversed Phase (RP)-Trennsäule (C18) adsorptionschromatographisch aufgetrennt und mit einem Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) detektiert. Die Identifizierung der Peaks erfolgte durch den Vergleich der jeweiligen Retentionszeiten (RT) und den für die einzelnen Substanzen spezifischen Molekülmassen ( $m/z$  = Masse-zu-Ladungsverhältnis) und deren Fragmentationen (MS<sup>2</sup>), welche mit Hilfe der entsprechenden Standardsubstanzen im Mischstandard ermittelt wurden. Die Quantifizierung erfolgte nach dem Verfahren der externen Kalibrierung und deren bekannter Konzentration (c) über die Peakflächen (Areas). Die Messung erfolgte im MRM (Multiple Reaction Monitoring) Modus des Massenspektrometers bei dem die substanzspezifischen Massenübergänge gemessen wurden. Für die Analyse wurden analysenreine Chemikalien und für Spurenanalytik geeignetes Wasser verwendet (Tab. 13).

**Tab. 13: Verwendete Geräte für die Standardvorbereitung und Durchführung der LC-MS/MS Analysen**

Gerät	Hersteller und Infos
Analysenwaage	BP 210 D; Sartorius AG (Göttingen, Germany)
Ultraschallbad	Sonorex; Bandelin GmbH (Berlin, Germany)
pH-Meter	pH 196, Firma WTW GmbH (Weilheim, Germany)
Pipetten	Eppendorf Reference 100 – 1000 µl; 50 – 200 µl; 10 – 100 µl und 2 – 20 µl
Vortex	Vibrofix VF 1 Electronic; IKA GmbH & Co. KG (Staufen im Breisgau, Germany)

Gerät	Hersteller und Infos
HPLC Anlagen	Agilent 1100 Series LC (1 & vormals 2), 1200 Series (vormals 3 & 4, später 2) und 1290 Infinity Series (3 & 4); (Pumpe, Autosampler, Column Compartment, Degasser); Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Massenspektrometer	1: Micromass Quattro Ultima™ API, Waters Corp. (Milford, MA, USA) 2: Micromass Quattro Micro™ API, Waters Corp. (Milford, MA, USA) 3 & 4: AB Applied Biosystems MDS SCIEX 4000 Q TRAP LC/MS/MS System; AB Sciex Technologies (Framingham, MA, USA)
Autosampler Vials und Kappen	1,5 ml, Gewinde: 8 – 425; 32 x 11,6 mm, Braunglas; Deckel 0,1 ml Mikroeinsetz/15 mm Spitze Markus Bruckner Analysentechnik (Linz, Austria)

In den Tabellen 14, 15 und 16 werden die verwendeten Geräte für die Vorbereitung und Durchführung der LC-MS/MS Messungen beschrieben. Des Weiteren sind die LC-MS/MS-Anlagen in den Abbildungen 35, 36 und 37 ersichtlich.

**Tab. 14: LC-MS/MS 1**

<b>LC-MS/MS Anlage 1 (Abb. 35)</b>	
HPLC Anlage	Agilent 1100 Series LC inkl. Degasser, Pumpe, Autosampler und Column Compartment Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Säule	Phenomenex – Luna 5u C18(2) 100A, 150 x 3 mm, 5 micron PNo. OOF-4252-YO SNo. 411 346-5
Detektor	Massenspektrometer Micromass Quattro Ultima™ API Waters Corp. (Milford, MA, USA) (LIT = Lineare Quadrupol-Ionenfalle)
<b>HPLC Konditionen</b>	
Mobile Phase	A (%) = Wasser (H <sub>2</sub> O) mit 0,1 % Ameisensäure (HFA) B (%) = Acetonitril (ACN) mit 0,1 % HFA D (%) = Isopropanol (IPA) mit 0,1 % HFA
Modus	Gradientenelution
Temperatur	Säule: 40 °C Autosampler: 20 °C
Schleifenvolumen	20 µl
Flow (Flussrate)	0,2 bzw. 0,3 ml/min



**Abb. 35: LC-MS/MS 1: LC Agilent 1100 Series gekoppelt mit einer Micromass Quattro Ultima™ API, Waters (Quellen: [www.agilent.com](http://www.agilent.com) & [www.krssltd.com](http://www.krssltd.com))**

**Tab. 15: LC-MS/MS 2**

<b>LC-MS/MS Anlage 2 (Abb. 36)</b>	
HPLC Anlage	Agilent 1100 Series LC inkl. Degasser, Pumpe, Autosampler und Column Compartment Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Säule	Phenomenex – Luna 5u C18(2) 100A, 150 x 3 mm, 5 micron PNo. OOF-4252-YO SNo. 411 346-5
Detektor	Massenspektrometer Micromass Quattro Micro™ API Waters Corp. (Milford, MA, USA) (Q-TOF = Quadrupol - Time of Flight)
<b>HPLC Konditionen</b>	
Mobile Phase	A (%) = Wasser (H <sub>2</sub> O) mit 0,1 % Ameisensäure (HFA) B (%) = Acetonitril (ACN) mit 0,1 % HFA
Modus	Gradientenelution
Temperatur	Säule: 40 °C Autosampler: 20 °C
Schleifenvolumen	20 µl
Flow (Flussrate)	0,2 bzw. 0,3 ml/min



**Abb. 36: LC-MS/MS 2: LC Agilent 1100 Series gekoppelt mit einer Micromass Quattro Micro™ API, Waters**  
(Quellen: [www.agilent.com](http://www.agilent.com) & [www.bioon.com.cn](http://www.bioon.com.cn))

**Tab. 16: LC-MS/MS 3 und 4**

<b>LC-MS/MS Anlage 3 und 4 neu (Abb. 37)</b>	
UPLC Anlagen	Agilent 1290 Infinity Series (vormals 1200 Series) LC inkl. Degasser, Pumpe, Autosampler und TCC = Thermostatted Column Compartment Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Säule	Phenomenex – Luna 5u C18(2) 100A, 150 x 3 mm, 5 micron PNo. OOF-4252-YO SNo. 440 845-1
Detektoren	Massenspektrometer – AB Applied Biosystems MDS SCIEX 4000 Q TRAP LC/MS/MS System) AB Sciex Technologies (Framingham, MA, USA) (LIT = Lineare Quadrupol-Ionenfalle)
<b>HPLC Konditionen</b>	
Mobile Phase	A (%) = Acetonitril (ACN) mit 0,1 % Ameisensäure (HFA) B (%) = Wasser (H <sub>2</sub> O) mit 0,1 % HFA
Modus	Gradientenelution
Temperatur	Säule: 40 °C Autosampler: 20 °C
Schleifenvolumen	20 µl
Flow (Flussrate)	0,3 ml/min

## MATERIAL UND METHODEN



**Abb. 37: LC-MS/MS 3 & 4: LC Agilent 1290 Infinity Series gekoppelt mit einer AB SCIEX 4000 Q TRAP**

Die Tabellen 17 und 18 zeigen die für die LC-MS/MS Messungen verwendeten Reagenzien und Standardsubstanzen.

**Tab. 17: Reagenzien für die LC-MS/MS**

<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Produktnummer (CAS Nr.)</b>
Methanol for HPLC Gradient Grade; filtered 0,2 µm; 99,8 %	VWR BDH Prolabo	67-56-1
Acetonitril Optigrade for HPLC Gradient Grade 1; Filter 0,2 micron	Prochem	75-05-8
Propan-2-ol (Isopropanol) for HPLC, filtered 0,2 µm; mind. 99,8 %	VWR BDH Prolabo	67-63-0
Wasser Optigrade for HPLC; Filter 0,2 micron	Prochem	7732-18-5
Ameisensäure 98 – 100 % (Formic Acid) zur Analyse	Merck	64-18-6

Tab. 18: Standardsubstanzen für die LC-MS/MS

Standards	Produktnummer und Infos	Molekulargewicht laut Zertifikat	Hersteller
Digitonin (Digitin)	CAS: 11024-24; C <sub>56</sub> H <sub>92</sub> O <sub>29</sub> ; ~ 69,3 %	1229,31	Sigma-Aldrich
Diosgenin	CAS: 512-04-9; (3-β-Hydroxy-5 spirostene (25 R)-5-Spirosten-3β-ol); C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>3</sub> ; ~ 95 %	414,62	Sigma-Aldrich
Escin	CAS: 6805-41-0; C <sub>54</sub> H <sub>84</sub> O <sub>23</sub> ; ≥ 95 %	1101,23	Sigma-Aldrich
Hederacoside C	CAS: 14216-03-6; C <sub>59</sub> H <sub>96</sub> O <sub>26</sub> ; ≥ 90 %	1221,38	Fulka
α-Solanin	CAS: 20562-02-1; C <sub>45</sub> H <sub>73</sub> NO <sub>15</sub> ; ≥ 95 %	868,06	Sigma-Aldrich
Oleanolic Acid	CAS: 508-02-1; C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub> ; ≥ 97 %	456,70	Sigma-Aldrich

### 3.2.3.2. LC-MS/MS Messung im Positiv Modus (ESI +)

Die Standardsubstanzen Digitonin, Diosgenin, Escin, Hederacosid C und α-Solanin wurden mittels Elektrospray-Ionisation (= ESI) im positiv Modus gemessen. Zu Beginn der Methodenentwicklung mussten die Molekülmuttermassen (Pseudomolekularion) für jede Standardsubstanz erfasst werden, um eventuelle Adduktbildungen mit Wasserstoff, Natrium und Ammonium zu detektieren. Die laut Zertifikat angegebenen Molekulargewichte waren dabei Richtwerte. Dazu wurde von jedem Einzelstandard eine Konzentration von 10 µg/ml mit einer Spritzenpumpe (Harvard Pump 11 Plus) und einer 1 ml Hamilton-Spritze (Gastight® # 1001, Hamilton Co., Reno, Nevada) bei einem Flow von 20 µl/min direkt in das Massenspektrometer injiziert. Gleichzeitig wurde im MS2 auch nach Fragmentationen gesucht (für jede Substanz 2 Hauptübergänge) und die ersten Grobeinstellungen für die Messmethode ermittelt. Anschließend wurde eine Chromatographie mit den entsprechenden Einstellungen für die HPLC (= High Performance Liquid Chromatographie) erstellt (Tabelle 19). Neben den Geräteeinstellungen wurden zusätzlich Versuche mit verschiedenen Gradienten gemacht, um die bestmögliche Auftrennung der Analyten zu

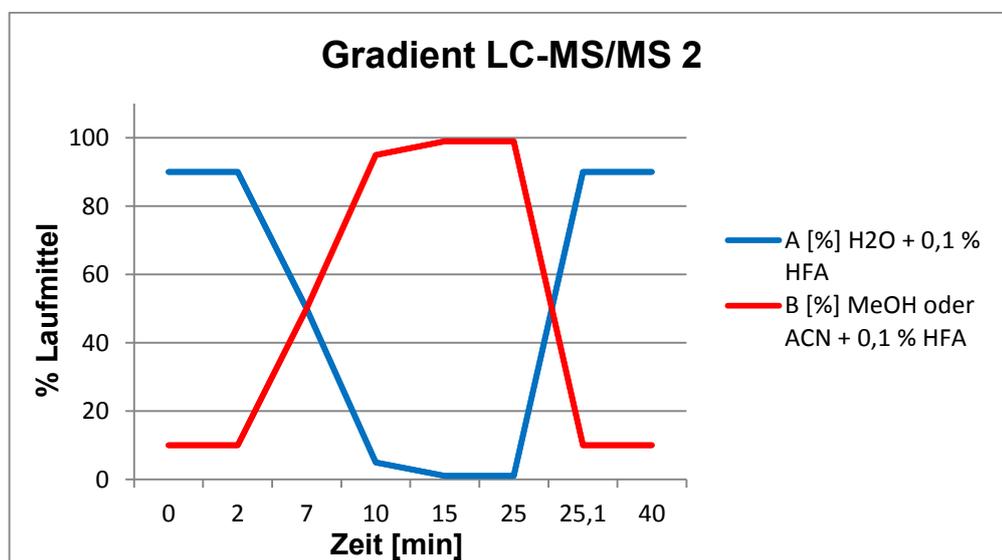
## MATERIAL UND METHODEN

gewährleisten. Tabelle 19 zeigt den Gradienten (Abb. 38) der Wahl bei einer Analysendauer von 40 Minuten pro Injektion.

Die ersten Versuche wurden auf der LC-MS/MS 2 einer Micromass Quattro Micro der Firma Waters Corp. (Milford, MA, United States) des Umweltbundesamtes unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

**Tab. 19: Gradient ESI pos. auf der LC-MS/MS 2 (Vorversuche)**

Time [min]	Flow [µl/min]	A [%] (H <sub>2</sub> O + 0,1 % HFA)	B [%] (MeOH oder ACN + 0,1 % HFA)
0	200	90	10
2	200	90	10
7	200	50	50
10	200	5	95
15	200	1	99
25	200	1	99
25,1	200	90	10
40	200	90	10



**Abb. 38: Gradient ESI positiv auf der LC-MS/MS 2**

**Tab. 20: Inlet und MS File (LC-MS/MS 2) für Positiv-Ionenmodus**

<b>HPLC 2 Einstellungen</b>	
Flow	0,200 ml/min
Stop Time	40 min
Säulentemperatur	40 °C
Autosampler Temperatur	20 °C
Druck	0 – 400 bar
Injection Volume	10 µl
<b>MS 2 Einstellungen</b>	
Ionenmodus	positiv
Capillary Voltage	2,90 Volt
Cone Voltage	92 Volt
Collision Energy	40 eVolt
Dwell Time	0,1 Secs
Source Temperature	120 °C
Desolvation Temperature	450 °C
Stop Time	40 min

Aufgrund der Verschleppung einzelner Substanzen in die nächsten Chromatogramme und geringe Sensitivität wurde auf die LC-MS/MS 1 eine Micromass Quattro Ultima ebenfalls von der Firma Waters gewechselt und als dritter Eluent Isopropanol (IPA) hinzugefügt, um eine stärkere Elutionskraft zu erlangen (Tab. 20 und 21). Des Weiteren wurde zur Erhöhung der Empfindlichkeit für jeden Standard eine direkt Infusion im SIM Mode = Select Ion Monitoring durchgeführt. Abbildung 39 zeigt den Gradienten der für die LC-MS/MS 1 verwendet wurde.

## MATERIAL UND METHODEN

Tab. 21: Gradient ESI pos. auf der LC-MS/MS 1

Time [min]	Flow [ $\mu$ l/min]	A [%] (ACN + 0,1 % HFA)	B [%] (H <sub>2</sub> O + 0,1 % HFA)	D [%] (IPA + 0,1 % HFA)
0	200	10	90	0
2	200	10	90	0
7	200	50	50	0
10	200	95	5	0
15	200	99	1	0
16	200	90	1	9
18	200	49	1	50
25	200	49	1	50
25,1	200	10	90	0
40	200	10	90	0

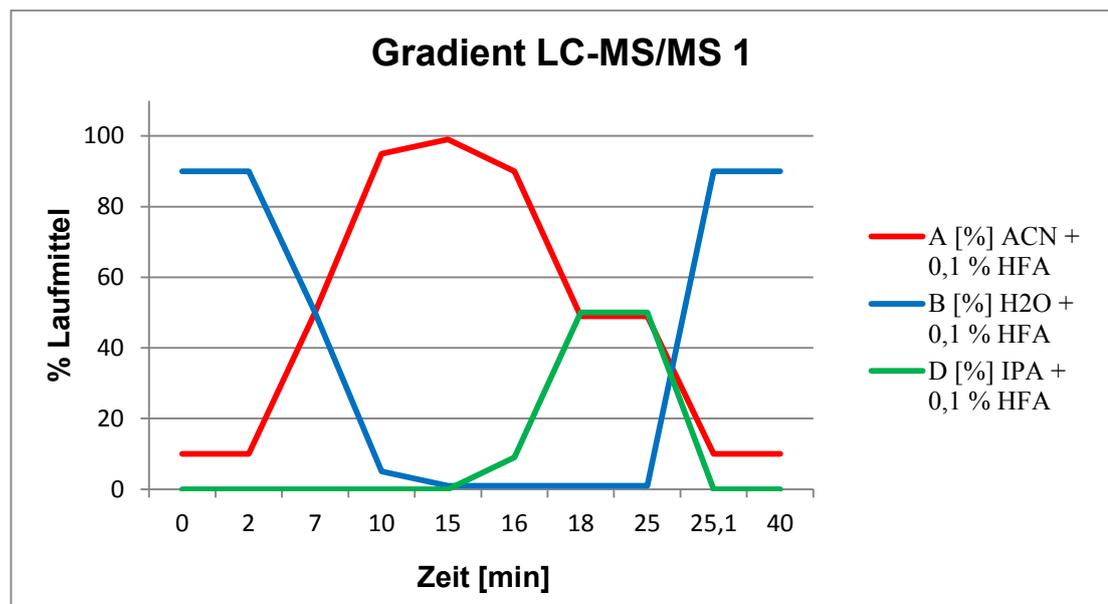


Abb. 39: Gradient ESI positiv auf der LC-MS/MS 1

**Tab. 22: Inlet und MS File (LC-MS/MS 1) für Positiv-Ionenmodus**

<b>HPLC 1 Einstellungen</b>	
Flow	0,200 ml/min
Stop Time	40 min
Säulentemperatur	40 °C
Autosampler Temperatur	20 °C
Druck	0 – 400 bar
Injection Volume	10 µl
<b>MS 1 Einstellungen</b>	
Ionenmodus	positiv
Capillary Voltage	3,70 Volt
Cone Voltage	70 Volt
Collision Energy	40 eVolt
Dwell Time	0,1 Secs
Source Temperature	120 °C
Desolvation Temperature	450 °C
Stop Time	40 min

Da es auch nach dieser Maßnahme noch Probleme mit der Konstanz und der Sensitivität gab, wurde auf die beiden neueren Geräte (LC von Agilent 1200 Series gekoppelt mit einer MS von ABSCIEX 4000 QTRAP) die LC-MS/MS 3 und 4 gewechselt. Mit Hilfe der FIA = Fließinjektionsanalyse (= Flow Injection Analysis) wurden die Ionenquellen-(Ion Source)-Parameter im MRM - Modus während des HPLC-Gradienten und einem Fluss von 300 µl/min optimiert. Zu diesen Parametern zählten das Curtain Gas, die Ion Spray Voltage, die Temperatur, Gas 1 (Nebulizer Gas = Zerstäubergas) und das Gas 2 (Turbo Gas). Die erhaltene FIA-Methode wurde dann als Basis-LC-MS/MS Methode adaptiert (Tabelle 23 und 24). Das Multiple Reactions Monitoring (MRM) ist ein Verfahren der Tandem-Massenspektrometrie und wird zur Ermittlung der Molekülmassen und der spezifischen Fragmentierungsprodukte der einzelnen zu analysierenden Substanzen verwendet. Im Dezember 2011 wurden vom Umweltbundesamt zwei neue UPLC Systeme (1290 Series) angeschafft und die vorherigen LC-MS/MS 3 und 4 Module (1200 Series) durch diese ersetzt, wobei die bestehenden

## MATERIAL UND METHODEN

Methoden im HPLC-Modus beibehalten wurden. Abbildung 40 stellt den Gradienten graphisch dar.

Tab. 23: Gradient ESI pos. LC-MS/MS 3 und 4

Time [min]	Flow [ $\mu\text{l}/\text{min}$ ]	A [%] (ACN + 0,1 % HFA)	B [%] (H <sub>2</sub> O + 0,1 % HFA)
0	300	10	90
2	300	10	90
7	300	50	50
10	300	95	5
15	300	99	1
25	300	99	1
25,1	300	10	90
40	300	10	90

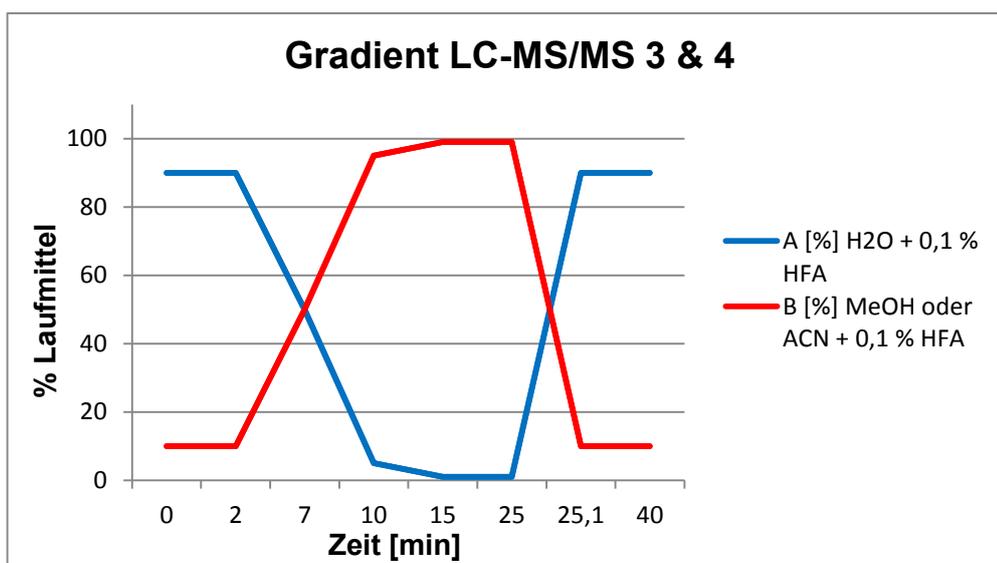


Abb. 40: Gradient ESI positiv auf der LC-MS/MS 3 & 4

**Tab. 24: UPLC Einstellungen und Source and Gas Parameters MS 3 und 4**

<b>UPLC 3 und 4 Einstellungen</b>	
Flow	0,300 ml/min
Stop Time	40 min
Säulentemperatur	40 °C
Autosampler Temperatur	20 °C
Druck	0 – 400 bar
Injection Volume	10 µl
<b>MS Einstellungen 3 und 4</b>	
Ionenmodus	positiv
CUR	10
CAD	High
IS	5000
Temperature	700 °C
GS 1	50
GS 2	50
Stop Time	40,012 min

### 3.2.3.3. LC-MS/MS Messung im Negativ Modus (ESI -)

Die Oleanolsäure (Oleanolic Acid = OA) wurde als einzige Standardsubstanz im ESI negativ Modus auf der Micromass Quattro Micro (LC-MS/MS 2) im Labor des Umweltbundesamtes gemessen, da es bei dieser Substanz das Problem der Verschleppung nicht gab. Der Gradient (Abb. 41) konnte somit auch auf 30 Minuten reduziert werden und die Eluenten wurden beibehalten (Tab. 25 und 26).

## MATERIAL UND METHODEN

Tab. 25: Gradient ESI neg. auf der LC-MS/MS 2 für die Oleanolsäure

Time [min]	Flow [ $\mu\text{l}/\text{min}$ ]	A [%] ( $\text{H}_2\text{O} + 0,1\% \text{ HFA}$ )	B [%] ( $\text{ACN} + 0,1\% \text{ HFA}$ )
0	300	90	10
2	300	90	10
7	300	5	95
10	300	1	99
15	300	1	99
16	300	90	10
30	300	90	10

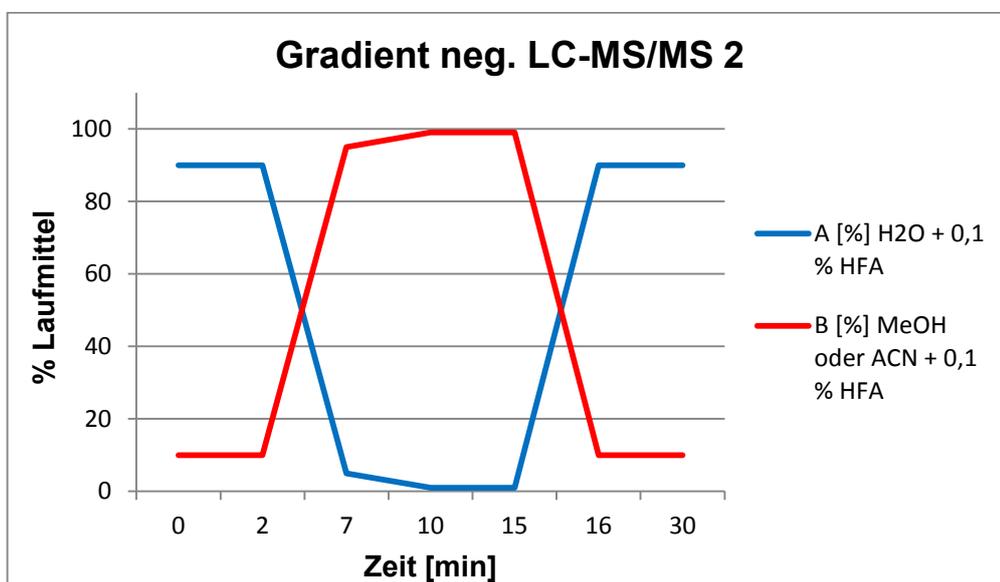


Abb. 41: Gradient ESI negativ auf der LC-MS/MS 2

Tab. 26: Inlet und MS File (LC-MS/MS 2) für die Oleanolsäure (Negativ-Ionenmodus)

HPLC 2 Einstellungen	
Flow	0,300 ml/min
Stop Time	30 min
Säulentemperatur	40 °C
Autosampler Temperatur	20 °C
Druck	0 – 400 bar
Injection Volume	10 $\mu\text{l}$

**MS 2 Einstellungen**

Ionenmodus	negativ
Capillary Voltage	3,70 Volt
Cone Voltage	70 Volt
Collision Energy	40 eVolt
Dwell Time	0,1 Secs
Source Temperature	120 °C
Desolvation Temperature	350 °C
Stop Time	30 min

**3.2.3.4. Erstellung einer Kalibration**

Die einzelnen Standardsubstanzen (Tab. 27) Digitonin, Diosgenin, Escin, Hederacosid C, Hederagenin, Oleanolsäure und  $\alpha$ -Solanin wurden eingewogen, in Methanol:Wasser 1:1 oder 100 % MeOH gelöst. Substanzen mit geringer Löslichkeit wurden zusätzlich ins Ultraschallbad gestellt.

**Tab. 27: Standardsubstanzen**

Standard-substanz	Ionen-modus	RT [min]	Massenza hl [m/z]	Fragment 1	Fragment 2	m/z laut Zertifikat
Digitonin	positiv	10,1	1252,48	928,6	633,4	1229,31
Diosgenin	positiv	19,1	415,32	253,1	271,2	414,62
Escin	positiv	10,7	1153,47	523,1	653,4	1101,23
Hederacosid C	positiv	8,6	1243,60	493,1	773,4	1221,38
Oleanolsäure	negativ	16,1	455	455	407,1	456,70
$\alpha$ -Solanin	positiv	7,8	868,5	98,0	398,4	868,06

## MATERIAL UND METHODEN

---

Danach wurde die Konzentrationen  $c = \text{mg/ml}$  der Einzelsubstanzen errechnet und ein Mischstandard  $c = 10 \mu\text{g/ml}$  für den positiven und negativen LC-MS/MS-Modus hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurde eine Kalibrierung von 0,1 bis 100 ng/ml in 16 Konzentrationen (0,1; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 5; 7,5; 10; 25; 50; 75, 100, 250 und 500 ng/ml) hergestellt und mittels LC-MS/MS im positiven und negativen Ionenmodus gemessen. Das Pipettierschema zur Herstellung einer Kalibration befindet sich im Kapitel 9. Anhang (9.2. Pipettierschema zur Herstellung einer Kalibration).

### 3.2.3.5. Durchführung der LC-MS/MS Analyse

Vor dem Beginn der Analysen wurde die HPLC mit den frisch hergestellten Eluenten ACN und H<sub>2</sub>O jeweils mit 0,1 % HFA (Zugabe HFA zur Verbesserung der Fragment-Bildung) zu 50:50 % 10 Minuten lang bei einem Flow von 5 ml/min gespült, um die Leitungen einlaufen zu lassen und eventuell im System befindliche Luft und Verunreinigungen zu beseitigen. Danach wurde die Methode geladen, um auf die Anfangsbedingungen des Gradienten ACN:H<sub>2</sub>O 10:90 % umzustellen und eine Minute lang equilibriert. Sobald der Druck konstant war, das Vakuum und die Empfindlichkeit des Geräts mit Vormessungen kontrolliert wurde, konnte die Analyse der Proben gestartet werden. Jede Sequenz enthielt etwa 50 Proben, einen Blank (Blindwert), 2 Kontroll- und die Kalibrationsstandards, wobei abwechselnd immer eine Serie von 2 Standards in unterschiedlichen Konzentrationen und 3 Proben gemessen wurden. Abbildung 42 zeigt ein Beispiel einer Sequenz.

	Sample Name	Rack Code	Rack Position	Plate Code	Plate Position	Vial Position	Data File	Inj. Volume (µl)
1	SAP 8_10 ng/ml	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	5	SPE Saponine	10.000
2	SAP 4_100	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	9	SPE Saponine	10.000
3	Blank	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	1	SPE Saponine	10.000
4	1110 4437	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	2	SPE Saponine	10.000
5	1110 4437_Krems 4 Dot	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	12	SPE Saponine	10.000
6	SAP 3_250 ng/ml	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	10	SPE Saponine	10.000
7	SAP 7_500 ng/ml	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	11	SPE Saponine	10.000
8	1110 4437_Krems 4	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	13	SPE Saponine	10.000
9	1110 4438_Antiesen 4	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	14	SPE Saponine	10.000
10	1110 4439_D. Aschach 2	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	15	SPE Saponine	10.000
11	SAP 9_7.5 ng/ml	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	4	SPE Saponine	10.000
12	SAP 5_75 ng/ml	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	8	SPE Saponine	10.000
13	1111 4441_Feldaist 4	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	17	SPE Saponine	10.000
14	1109 4151_Ager 3	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	19	SPE Saponine	10.000
15	KSt_12.6_200 ng/ml	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	53	SPE Saponine	10.000
16	SAP 10_5 ng/ml	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	3	SPE Saponine	10.000
17	SAP 6_50 ng/ml	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	7	SPE Saponine	10.000
18	1109 4151_Dot_Verd 1:10	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	3	SPE Saponine	10.000
19	1109 4151_Ager 3 DOT	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	18	SPE Saponine	10.000
20	1109 4156_Krems 4	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	20	SPE Saponine	10.000
21	SAP 9_7.5 ng/ml	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	4	SPE Saponine	10.000
22	SAP 5_75 ng/ml	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	8	SPE Saponine	10.000
23	1109 4156_Antiesen 4	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	21	SPE Saponine	10.000
24	1109 4156_lpfbach 1 mit Dot	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	24	SPE Saponine	10.000
25	1109 4145_Traun 2	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	22	SPE Saponine	10.000
26	SAP 12_1 ng/ml	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	1	SPE Saponine	10.000
27	SAP 11_2.5 ng/ml	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	2	SPE Saponine	10.000
28	1109 4155_Ranna 1	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	23	SPE Saponine	10.000
29	1109 4156_lpfbach 1	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	25	SPE Saponine	10.000
30	1110 4458_Kainischtraun	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	26	SPE Saponine	10.000
31	SAP 8_10 ng/ml	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	5	SPE Saponine	10.000
32	SAP 4_100 ng/ml	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	9	SPE Saponine	10.000
33	1110 4459_Thoerlbach	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	27	SPE Saponine	10.000
34	1110 4600_III vor Einleitung	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	28	SPE Saponine	10.000
35	KSt. 13.6_200 ng/ml	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	54	SPE Saponine	10.000
36	SAP 7_25 ng/ml	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	6	SPE Saponine	10.000
37	SAP 3_250 ng/ml	2 Well Plates	1	*54VialPlate*	1	10	SPE Saponine	10.000

Abb. 42: Screenshot einer ausgewählten Sequenz (Batch) als ein Beispiel für eine Saponinanalyse mittels LC-MS/MS ESI<sup>+</sup> (Software: AB Sciex Analyst)

Die Planung, Durchführung und Auswertung der LC-MS/MS-Ergebnisse erfolgte im MassLynx 3.3 für die LC-MS/MS 1, im MassLynx 4.0 für die LC-MS/MS 2, dem Analyst für die LC-MS/MS 3 und 4 und Excel 2010. Nach den Messungen wurden die Chromatogramme nachintegriert und die Konzentrationen der Proben in den Quantifizierungsprogrammen QuanLynx (MassLynx) und Quantitation Wizard (Analyst) ermittelt. Im Excel 2010 wurde alles weiter ausgewertet und die Wiederfindungen (%) berechnet. Diese diente als Grundlage zur weiteren Berechnung der Konzentrationen (ng/ml bzw. ng/L) der einzelnen Messwerte. Alle Werte, welche unter der Nachweisgrenze (NG) lagen wurden als nicht nachweisbar (n.n.) und alle unter der Bestimmungsgrenze (BG) als kleiner BG (< BG) angegeben.

### 3.2.3.6. Methodenvalidierung

Die Validierung ist der Nachweis, dass die Analysenmethode für ihren Einsatz geeignet ist und die besonderen Anforderungen für deren Gebrauch erfüllt werden. Sie dient der Qualitätssicherung der für einen bestimmten Anwendungszweck entwickelten Analysenverfahren.

Zu den wichtigsten Begriffen der Validierung gehört die Genauigkeit, welche das Maß für den Gesamtfehler einer Analyse und ein Oberbegriff für Richtigkeit und Präzision ist. Die Richtigkeit ist die Abweichung des Messwertes bzw. Mittelwerts mehrerer Messwerte vom „wahren“ Wert durch systematische Fehler und die Präzision gibt an, wie groß die Streuung (Standardabweichung) aufgrund der zufälligen Fehler ist. Hier wird unterschieden zwischen der Wiederhol- (Wiederholbarkeit in kurzen Zeitabständen) und der Vergleichspräzision (Extern durch Ringversuche). Des Weiteren gibt es die Messpräzision, welche ein Maß für die Schwankungen verursacht durch das Analysengerät ist und die Methodenpräzision, die die zufällige Streuung der Analysenergebnisse über die gesamte Methode angibt. Die festgelegten Kalibrierpunkte geben den Arbeitsbereich einer Kalibrierfunktion an, diese sollte einen größeren Bereich abdecken und linear sein. Die Linearität spiegelt den Konzentrationsbereich wieder, in dem das Messsignal direkt proportional zur Analytkonzentration ist. Das wichtigste Kriterium für die Linearität ist der Korrelationskoeffizient „r“ und dieser sollte möglichst größer als 0,999 sein. Des Weiteren werden die Gerätebestimmungs- und -nachweisgrenzen der Standardsubstanzen erfasst, mit denen die Anforderungen an die Präzision überprüft werden und die Quantifizierung erfolgen kann. Die Spezifität einer Methode beschreibt die Anfälligkeit eines Analysenverfahrens gegenüber Störionen und anderen Störkomponenten in den verschiedenen Probenmatrices. Der Begriff der Selektivität wird dabei häufig als Synonym dazu verwendet, beschreibt jedoch die Selektivität verschiedener nebeneinander zu bestimmender Analyten ohne gegenseitiger Wechselwirkung oder Störung also der Substanzen untereinander. Eine Analysenmethode sollte weiters robust sein

gegenüber Änderungen der analytischen Rahmenbedingungen, durch z.B.: Temperaturschwankungen. Zu guter Letzt gibt es noch den Begriff der Messunsicherheit, die angibt in welcher Größenordnung das Messergebnis schwankt.

#### **3.2.3.6.1 Kalibrierfunktionen**

Die Linearität der Analysenmethoden wurde durch eine externe Kalibrierfunktion aus Mischstandards in Methanol ermittelt. Zu diesem Zweck wurde aus einer Stammlösung eine Kalibrierung mit einem Arbeitsbereich von 0,05 bis 250 ng/ml in 18 Konzentrationen (0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 5; 7,5; 10; 25; 50; 75, 100 und 250 ng/ml) hergestellt. Die LC-MS/MS-Messungen wurden im positiven und negativen Ionenmodus durchgeführt. Bei allen Analyten wurde der Korrelationskoeffizient „r“ als Maß für die Linearität ermittelt und dieser lag bei allen durchgeführten Messungen im Bereich  $> 0,999$ .

#### **3.2.3.6.2 Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen**

Die Nachweisgrenze (NG; auch limit of detection - LOD) ist die kleinste nachweisbare und die Bestimmungsgrenze (BG; auch limit of quantitation - LOQ) die kleinste quantifizierbare Menge eines Analyten, die mit einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision quantifiziert werden kann (DIN 32645: Chemische Analytik – Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung). Generell wird zur Ermittlung der Nachweisgrenze ein Signal:Rausch-Verhältnis von 3:1 und für die Bestimmungsgrenze von 9:1 empfohlen.

In der vorliegenden Arbeit konnten anhand der Basisvalidierung, welche mit der Software zur statistischen Qualitätskontrolle analytischer Daten dem SQS 2000 Version 2.0 erstellt wurde, für jede Substanz eine Geräte-Nachweis (NG)- bzw. Bestimmungsgrenze (BG) ermittelt werden (Tab. 28).

## MATERIAL UND METHODEN

**Tab. 28: Gerätenachweis- und Bestimmungsgrenzen der Standardsubstanzen**

<b>Analyt</b>	<b>Nachweisgrenze NG [ng/ml]</b>	<b>Bestimmungsgrenze BG [ng/ml]</b>
Digitonin	0,274	1,043
Diosgenin	0,187	0,697
Escin	0,954	3,563
Hederacosid C	0,433	1,570
Oleanolsäure	0,633	2,341
$\alpha$ -Solanin	0,0944	0,347

### 3.2.3.6.3 Wiederfindungsraten und Wiederholbarkeit

Die Wiederfindungsraten wurden zur Überprüfung der Wiederholbarkeit und zur Erfassung eventueller Verluste der Analyten während der Probenvorbereitung mitbestimmt. Dazu wurde ein Kontrollstandard mit einer Konzentration von 200 ng/ml aus dem Mischstandard  $c = 1 \mu\text{g/ml}$  hergestellt und damit vor jeder Probenaufarbeitung (SPE oder LLE) eine Probe aufgespikt.

In Tabelle 29 befinden sich die Wiederfindungen in % der einzelnen Saponine nach der Probenvorbereitung mittels Festphasenextraktion (SPE) und Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE).

**Tab. 29: Wiederfindungen der Probenaufbereitungen mittels SPE und LLE**

<b>Saponin</b>	<b>Wiederfindung SPE [%]</b>	<b>Wiederfindung LLE [%]</b>
Digitonin	80 – 110	80 - 110
Diosgenin	20 - 40	60 - 80
Escin	70 - 110	50 - 100
Hederacosid C	70 - 110	30 - 50
$\alpha$ -Solanin	40 - 80	30 - 50
Oleanolsäure	20 - 80	20 - 70

#### 3.2.3.6.4 Präzisionstest der LC-MS/MS-Methode

Die Präzision ist ein Maß für die Überprüfung unabhängiger Analysenergebnisse untereinander bzw. ein Maß für die Streuung davon. Als Streuung wird die Standardabweichung (STABW) oder der Variationskoeffizient (relative Standardabweichung) verwendet. Hierbei werden die Wiederholbedingungen der Ergebnisse, die in kurzen Zeitabständen ermittelt wurden, untersucht. Als Messpräzision werden Mehrfachanalysen eines Standards gemacht, einmal im selben Batch „within day“ und einmal zwischen den Batches „day to day“. Der Variationskoeffizient für die Messpräzision in einem Batch sollte nach KROMIDAS, 1999 bei HPLC-Bestimmungen in der Umweltanalytik unter 15 % liegen. Für die Ermittlung dieser „within day“ Messpräzision wurde ein Mischstandard mit einer Konzentration von 100 ng/ml mehrfach in einem Batch gemessen. Diese Präzision wurde bei allen Messungen der ausgewählten Analyten erreicht.

Um die Präzision „day to day“, welche unter 20 % liegen sollte, zu ermitteln, wurden Kontrollstandards mit einer Konzentration von 200 ng/ml in jeder Sequenz mitgemessenen. Dieser dient neben der Kontrolle zur Wiederfindung der dotierten Proben auch als stetige Überprüfung der Analysenpräzision und die erhaltenen Ergebnisse wurden in eine sogenannte Regelkarte eingetragen. Die dazugehörigen Grafiken für die einzelnen Substanzen befinden sich im Kapitel 9. Anhang (9.3. Regelkarten für Kontrollstandards). Liegt ein Wert außerhalb dieser 20 % Messtoleranz, kommt es zu einer Außerkontroll-Situation mit der folgendermaßen verfahren wurde: Messergebnisse des Kontrollstandards bis zur 3-fachen Standardabweichung wurden toleriert, sofern keine positiven Befunde größer der Bestimmungsgrenze vorlagen. Sollte jedoch ein positiver Befund in einer Außerkontroll-Situation vorliegen wurde die Messung dieser Probe wiederholt.

### 3.2.4. Schäumungspotential

Der hier verwendete Begriff "Schäumungspotential" bezeichnet die Neigung einer Wasserprobe zur Bildung von Schäumen. Er wurde speziell für Oberflächengewässer (Immissionsproben) entwickelt, aber auch für Abwasserproben verwendet. Die Methode zur Erfassung des Schäumungspotentials ist vom Umweltbundesamt in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Wien entwickelt worden, um verschiedene Oberflächengewässer hinsichtlich ihrer Neigung zur Schäumung zu charakterisieren und objektiv zu bewerten. Bei dieser Methodik werden Wasserproben in einem Plexiglasstandzylinder über unter Druck eingebrachten gasförmigen Stickstoff zum Schäumen gebracht, über Gesamthöhen [mm] eine grundlegende Schäumungsaktivität erfasst und somit eine Vergleichbarkeit geschaffen. Der Prototyp des Plexiglaszylinders zur Bestimmung des Schäumungspotentials war eine Säule mit einem Durchmesser von 10 cm, einer Wanddicke von 0,5 cm und einer Höhe von 102 cm. Für die Belüftung sorgten unter Druck eingebrachter Stickstoff, welcher über ein Rückflussstopp-Ventil und 2 Belüftersteine eingeleitet wurde. Der Durchfluss von Stickstoff wurde auf 300 L/h eingestellt. Da es bei der ersten Säule ein Problem mit der gleichmäßigen Belüftung und dem Material gab wurde eine neue Säule konstruiert. Die weiterentwickelte 1 Liter Durchflusssäule (Abb. 43) war deutlich robuster und besteht aus einem 6,5 cm hohen Sockel mit einem Rückflussstopp-Ventil und einer 102 cm hohen Hartplastiksäule mit einem Durchmesser von 5 cm und einer Wanddicke von 0,5 cm. Im Sockel ist eine Sinterplatte integriert, welche für einen gleichmäßigen Gasstrom während der Belüftung sorgt.

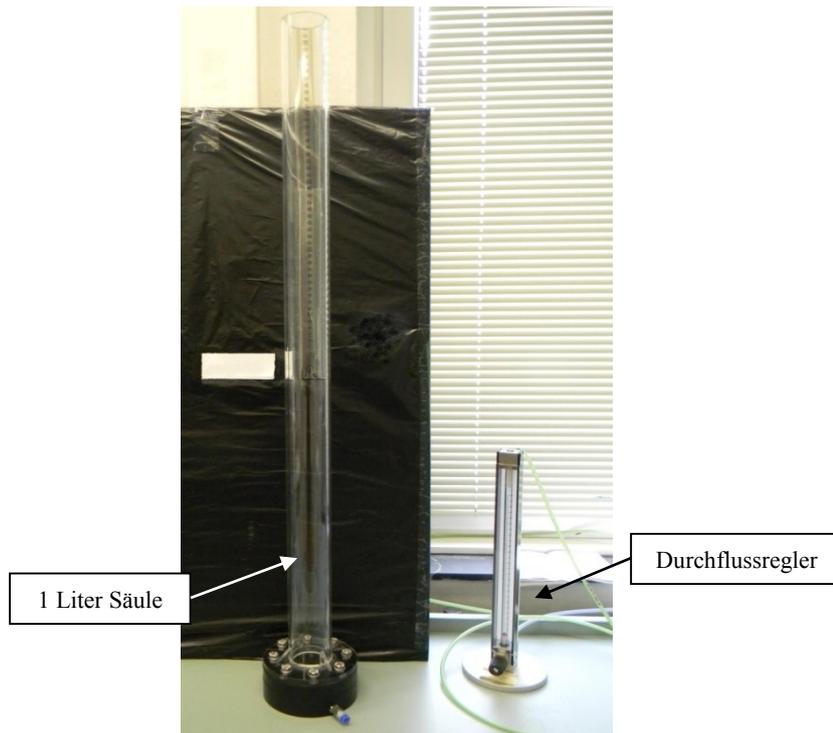


Abb. 43: Säule mit Durchflussmesser

#### 3.2.4.1. Zu untersuchende Parameter

Mit der Säule wurde 1 Liter Probe mit Stickstoff belüftet und die Parameter Gesamthöhe [mm] und Schaumfront [mm] des Schaumes abgelesen, anhand dieser beiden Kenngrößen kann die Blasenhöhe [mm] errechnet werden (Abb. 44). Als „Schaumfront“ bezeichnet man jenen dichten Bereich der Schaumphase in mm, der während der Messung einen metastabilen, scharf abgegrenzten, meist weißen Bereich über der Wasserphase bildet. Unter „Gesamthöhe“ des Schaumes ist die maximale Höhe der Schaumphase über der Wasserphase in mm zu verstehen. Die „Blasenhöhe“ ergibt sich schließlich aus der Differenz aus „Gesamthöhe“ und „Schaumfront“. Abgelesen werden die Parameter von den während der Messung gemachten Videos.

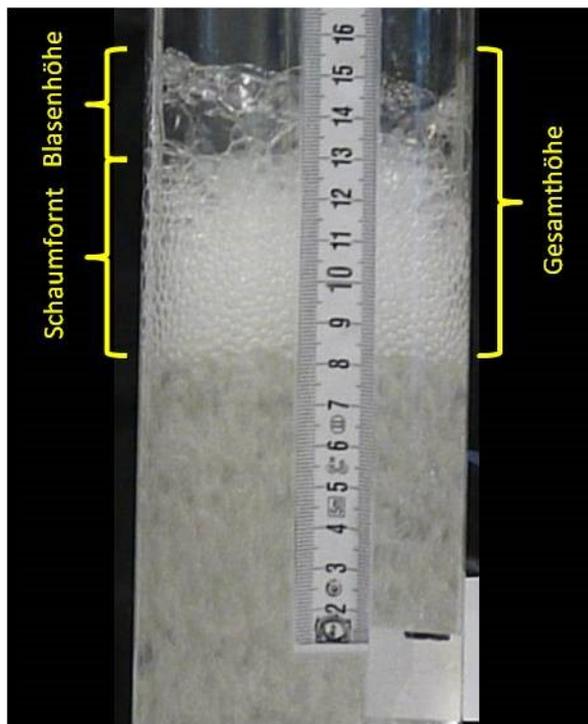


Abb. 44: Parameter Schäumungspotential

#### 3.2.4.2. Ergebnisse und Auswertung des Schäumungspotentials

Die durch die Messung erhaltenen Ergebnisse wurden in ein Excel-Auswertefile eingetragen und über die Gesamthöhe in mm verglichen. Aufgrund der besseren Vergleichbarkeit wurden die Messstellen in 8 Belastungsklassen (siehe Kapitel 4.2. Ergebnisse des Schäumungspotentials – Abb. 99) eingeteilt und statistisch ausgewertet. Hierfür wurden die Daten mit dem nichtparametrischen K-S-Test (KOLMOGOROV-SMIRNOV-Test) auf Normalverteilung geprüft. Anschließend wurden normalverteilte mittels „t-Test“ für unabhängige Stichproben nach LEVENE und nicht-normalverteilte Daten mit dem U-Test von MANN und WHITNEY auf signifikante Unterschiede untersucht.

### 3.2.5. Ames Test

Der Ames Test wurde auf Basis der Arbeitsanleitungen „The Ames Salmonella/microsome assay“ von MORTELMANS und ZEIGER (2000) und „Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test“ von MARON und AMES (1983) durchgeführt. Der Versuch im bakteriellen System wurde eingesetzt, um eventuelle mutagene Effekte von Saponinen mittels des Ames Tests zu untersuchen. Dazu wurden die *Salmonella typhimurium* Stämme TA 98 und TA 102 verwendet. Das Ziel eines zweiten Testansatzes war es mögliche oxidative Eigenschaften der Saponine zu erfassen, wobei hierfür der Stamm TA 102 als Marker verwendet wurde. TA 102 wird generell verwendet, um eine Aussage bezüglich Oxidativen Stress zu geben und durch den Teststamm TA 98 bekommt man Informationen über Frame-Shift Mutationen. Alle für den Ames Test erforderlichen Schritte wurden im Zellkulturlabor des Department für Ernährungswissenschaften der Universität Wien in einer sterilen Laminar-Flow Werkbank (Abb. 45) durchgeführt, wobei vor Arbeitsbeginn alle Oberflächen im Raum mit 75 %igem Ethanol (EtOH) desinfiziert wurden. Es ist aufgrund seines höheren Wassergehaltes besser geeignet als z.B. Isopropanol. Reiner Alkohol konnte nicht verwendet werden, da dieser aufgrund seines niedrigeren Wassergehaltes zu schnell verdunsten würde und dadurch die vorgegebene Einwirkdauer nicht erreicht werden könnte.



Abb. 45: Laminar-Flow Werkbank

## MATERIAL UND METHODEN

---

Des Weiteren mussten alle verwendeten Utensilien und Lösungen vor deren Gebrauch sterilisiert werden, dies geschah entweder durch Autoklavieren oder durch Sterilfiltration. Auch bei der Herstellung der Lösungen durfte nur destilliertes Wasser verwendet werden, um Kontaminationen zu vermeiden. Neben dem sterilen Arbeiten war es sehr wichtig Sicherheitsmaßnahmen einzuhalten, um sich selbst zu schützen. Es sollten alle Chemikalien mit großer Vorsicht behandelt werden, immer in Bedacht darauf, dass es sich dabei um Mutagene und/oder um Kanzerogene handeln könnte. Des Weiteren musste auf eine minimale Exposition durch die *Salmonella* Test Stämme geachtet werden, da wilde Salmonellenstämme Durchfall und Lebensmittelvergiftungen verursachen können. Der im Test verwendete Stamm TA 98 wurde als Sicherheitsmaßnahme durch das Entfernen von Polysaccharidseitenketten weitgehend apathogen gemacht. Beim Stamm TA 102 handelt es sich jedoch um einen pathogenen wilden Salmonellenstamm. Daher sollten zu jeder Zeit die Laborsicherheitsbestimmungen eingehalten werden [MORTELMANS und ZEIGER, 2000].

### 3.2.5.1. Chemikalien und Reagenzien

Die *Salmonella typhimurium* Stämme TA 98 und TA 102 wurden bei der Firma Discovery Partners International Inc. in San Diego, USA bestellt. Die Herkunft der restlichen Chemikalien, Reagenzien und Medien wird in der Tabelle 30 angeführt.

Tab. 30: Chemikalien und Reagenzien für den Ames Test

Substanz	Abkürzung	Hersteller	CAS-Nr.	Verwendung
Agar Nr. 1		Oxiod/Bertoni	LP011P	Platten, Top Agar
DL-Alanine		Acros Organics	159091000	MRP Aufarbeitung
2-Aminoanthracene	2-AA	Sigma	613-13-8	Mutagen (TA 98/102 +S9)
Ampicillin Trihydrate		Sigma	A6140	Genetische Analyse, Master Plates, OVNC
D-Biotin		Sigma	B4639	Genetische Analyse, Master Plates, Top Agar
DECONEX® 53 Instrument		Borer Chemie		Desinfektionsmittel
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma	D5879	Lösungsmittel
D-Glucose		Sigma	G8270	MG-Agar-Platten, Master Plates
Ethanol EU	EtOH	Brenntag CEE GmbH Wien	64-17-5	Sterilisieren
Glucose-6-Phosphat	Glu-6-P	Sigma	G7250	S9-Mix
Kaliumchlorid	KCl	Sigma	P5405	S9-Mix
Kaliumphosphat, dibasisch	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma	P3786	Vogel-Bonner-Lösung
L-Histidin		Sigma	H8125	Genetische Analyse, Top Agar, Master Plates
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub>	Sigma	M9272	S9-Mix
Magnesiumsulfat	MgSO <sub>4</sub>	Sigma	M9397	Vogel-Bonner-Lösung
Mitomycin C	MMC	Sigma	50-07-7	Mutagen (TA 102 –S9)
Natriumammonium- phosphat		Sigma	S9638	Vogel-Bonner-Lösung
Natriumchlorid	NaCl	Sigma	S5886	Top Agar
Natriumhydroxid	NaOH	Sigma	O6203	Ampicillin-Lösung
Nicotinamidadenindi- nucleotidphosphat	NADP	Sigma	N0505	S9-Mix
4-nitro-o- phenylendiamine	4-NOPD	Sigma	99-56-9	Mutagen (TA 98 –S9)
Nutrient Broth No2 CM 67	NB	Oxiod/Bertoni	CM067B	OVNC, Nährbouillon
Phosphatpuffer	PBS	PAA Laboratories	H15002	Präinkubationstest, S9- Mix

## MATERIAL UND METHODEN

Substanz	Abkürzung	Hersteller	CAS-Nr.	Verwendung
Rattenleber-homogenat	S9	Biomedical/ICN	50412	Standard-Platten-Inkorp.-Test mit S9 Metabol. Aktivierung
Tetracyclin		Sigma	T3383	Genetische Analyse, Master Plates, OVNC
Zitronensäuremonohydrat		Sigma	C1909	Vogel-Bonner-Lösung

### 3.2.5.2. Geräte und Materialien

In den Tabellen 31 und 32 sind die während des Ames Test benötigten Geräte und Materialien ersichtlich.

**Tab. 31: Geräte zur Ausführung des Ames Tests**

Geräte	Hersteller und Infos
Laminar Flow	Holten LaminAir HB 2472
Inkubator	Brutschrank Memmert
Autoklav klein	Melag Autoklav 23
Autoklav groß 1	H1CLAVE™ HV-85L HMC
Autoklav groß 2	
Laborwaage	Sartorius LC 4801 P (max. 4800 g)
Analysenwaage	Mettler AT 201 und AT 261
Laborwasser-Aufbereitungsanlage	EASYpure LF compact ultrapure water system, Barnstead USA
Magnetrührer mit Heizung	Heidolph MR 3001 K
Vortex	Heidolph Reax 2000
Wasserbad	GFL
Vollpipetten Glas	Volumina 5, 10 und 20 ml
Pipette	100 – 1000 µl Biohit Proline
Finnpipette	100 – 200 µl, Thermo Scientific
Pipettierhilfe	Biohit Proline Midi Plus
Stoppuhr TFA	
Kolonien-Counter	Upgreen Counters, Taiwan

Tab. 32: Materialien zur Ausführung des Ames Tests

Material	Hersteller und Infos
Petrischalen	90 x 15 mm, Steril, SPL Life Sciences
Zentrifugenröhrchen	SuperClear™, 50 ml, Steril
Zentrifugenröhrchen	SuperClear™, 50 ml, Unsteril
Indikatorband für Autoklaven	Tape Autoclave Indicator, A2549-6 EA; Sigma Aldrich
Indikatorband für Hitzesterilisation	Comply™ Dry Heat Indicator Tape, 3M Health Care; D-41453 Neuss, Germany
Kryoröhrchen	mit Außengewinde, sterilisiert, SPL Life Sciences
Eprouvetten mit Deckel	Glasröhrchen mit Plastikdeckel, Länge: , Durchmesser:
Eprouvettenständer	Kunststoff, 60 Positionen (5 x 12)
Spritzen	20 ml Einmalspritzen (steril), HSW NORM-JECT®, HENKE SASS WOLF, Germany
Spritzenvorsatz-Filter	Sterile Spritzenfilter, Durchmesser: 25 mm, Membran: Celluloseacetat CA, Porengröße : 0,45 µm; VWR International
Tubes	1,5 ml

### 3.2.5.3. Testprinzip

Der Ames *Salmonella*/microsome Assay, auch bekannt als Ames Test oder *Salmonella* Test, ist ein kurzzeitiger Rückmutationstest an Bakterien. Er wurde im Speziellen dafür einwickelt, um eine große Anzahl an chemischen Substanzen zu erfassen, welche genetische Schäden die zu Genmutationen führen können hervorrufen [MORTELMANS und ZEIGER, 2000]. Die *Salmonella* Test Stämme werden auf einen Minimal-Glucose-Agar, welcher Spuren der Aminosäure Histidin enthält, aufgetragen. Wobei nur jene Bakterien Kolonien bilden können, die eine gewisse Genfunktionen wiederherstellen und dadurch die Fähigkeit Histidin zu synthetisieren (his+) wiedererlangen. Diese neu mutierten Bakterienzellen können selbst in Abwesenheit der Aminosäure Histidin wachsen und dadurch Kolonien bilden. Auf Grund dessen wird der Ames Test oft als „reversion assay“ (Umkehrprüfung) bezeichnet. Wird ein Mutagen auf die Testplatte zugegeben, nimmt die Zahl der revertierenden Kolonien üblicherweise dosisbezogen zu. Der Ames Test wird weltweit als ein Initialtest eingesetzt, um das mutagene Potential neuer Chemikalien oder Medikamente zu

## MATERIAL UND METHODEN

---

untersuchen. Infolge dessen spielt er eine bedeutende Rolle in der Sicherheitsbeurteilung [MORTELSMANS und ZEIGER, 2000].

### **3.2.5.4. Durchführung des Ames Test**

Vor Arbeitsbeginn mussten alle Oberflächen im Zellkulturlabor und der Laminar-Flow Werkbank desinfiziert werden. Die Sterilbank sollte zumindest 30 Minuten vor Beginn des Testes eingeschaltet werden, um zu garantieren, dass die Luft vollständig abgezogen und erneuert wurde. Des Weiteren mussten alle Laborgeräte und Lösungen, welche im Testverfahren verwendet wurden, entweder autoklaviert oder sterilfiltriert werden.

#### **3.2.5.4.1 Herstellung der Lösungen**

Alle Lösungen wurden bei Bedarf oder nach Ablauf der Haltbarkeit während der gesamten Testzeit immer wieder neu hergestellt, vor jedem Gebrauch autoklaviert bzw. hitzeempfindliche Substanzen sterilfiltriert und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

##### **Vogel-Bonner Lösung**

670 ml deionisiertes Wasser wurde auf 45 °C erhitzt und die folgenden Salze nacheinander darin gelöst: 10 g Magnesiumsulfat, 100 g Zitronensäuremonohydrat, 500 g Kaliumphosphat dibasisch und 175 g Natriumammoniumphosphat. Die Lösung wurde vor jedem Gebrauch autoklaviert.

##### **Glukose Lösung**

Um eine 40 %ige Glukose Lösung zu erhalten wurden 400 g Glukose in 1000 ml kochenden entionisiertem Wasser gelöst und vor jeder Verwendung sterilisiert.

### **Ampicillin Lösung (0,8 %)**

Für die Ampicillin Lösung wurden 0,2 g Ampicillin in ein verschließbares Plastik Tube eingewogen und mit 25 ml 0,2 N Natriumhydroxid vermischt. Zum Schluss wurde die Lösung durch einen aseptischen Filter sterilisiert und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

### **Tetracyclin Lösung**

80 mg Tetracyclin wurde ebenfalls in ein 50 ml Tube eingewogen und in 10 ml 0,2 N Salzsäure gelöst. Anschließend wurde die Lösung mittels Sterilfiltration sterilisiert und kann für 2 Wochen bei 4 °C gelagert werden.

### **Histidin Lösung**

Um die Histidin Lösung herzustellen wurden 0,25 g L-Histidin in ein verschließbares 50 ml-Vial gegeben und mit 50 ml deionisiertem Wasser vermengt. Auch diese Lösung wurde mit einem aseptischen Filter sterilisiert und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

### **Biotin Lösung**

6,1 mg D-Biotin wurde in ein Tube eingewogen und mit 50 ml Deionat versetzt. Danach wurde die Biotin Lösung mittels Sterilfiltration entkeimt und ebenso bei 4 °C gelagert.

### **Histidin-Biotin Lösung**

Für die Erzeugung der Histidin-Biotin Lösung mussten 30,9 mg D-Biotin und 24 mg L-Histidin in zwei separate Wägeschiffchen eingewogen werden. Die beiden Aminosäuren wurden anschließend vorsichtig in eine 250 ml Pyrex Schottflasche gegeben und 250 ml entionisiertem Wasser zugegeben. Diese Mischung wurde jedes Mal vor deren Verwendung sterilisiert und konnte bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden.

## MATERIAL UND METHODEN

---

### **Herstellung der MgCl<sub>2</sub>/KCl Lösung**

Es wurden 61,5 g KCl und 40,7 g MgCl<sub>2</sub> in 500 ml Deionat gelöst und anschließend im Autoklaven sterilisiert.

### **Herstellung der Glukose-6-Phosphat Lösung (304 mg/ml)**

1 g Glukose-6-Phosphat wurde in 3,289 ml entionisiertem Wasser gelöst, vermischt und gleich danach mittels Sterilfiltration sterilisiert. Die Lösung wurde in 1 ml Portionen in Kryo-Tubes pipettiert und bei -20 °C eingefroren.

### **Herstellung der NADP Lösung (0,135 g/2 ml)**

1 g NADP wurde in 14,814 ml entionisiertem Wasser aufgelöst und durch einen aseptischen Filter sterilisiert. Anschließend wurde je 1 ml der sterilen Lösung in Kryoröhrchen pipettiert und bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

### **Herstellung des S9-Mix**

Um den Leberstoffwechsel *in vivo* während der Metabolisierung der Substanzen zu simulieren, wurde der S9-Mix zu dem *in vitro* Test zugegeben. Beim S9-Mix handelte es sich um eine enzymatische Mischung aus Rattenleber-Homogenisat und dieser musste zur metabolischen Aktivierung im Testansatz zugefügt werden, da Bakterien kein Cytochrom P450 System besitzen.

Die Mischung wurde wie folgt hergestellt: Es wurden 19,75 ml steriles Deionat, 25 ml PBS Puffer (ohne Ca und Mg), 1 ml einer MgCl<sub>2</sub>/KCl Lösung, 2 ml NADP und 250 µl einer Glukose-6-Phosphat Lösung in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Zum Schluss wurden 2 ml Rattenleberhomogenisat zugegeben. Die Menge dieses Gemisches reichte für etwa 100 Platten aus. Da die Lösung sehr empfindliche Enzyme enthält, war es erforderlich sie vor dem Beginn jedes Testansatzes frisch herzustellen. Des Weiteren musste der S9-Mix während der Durchführung

des Testes ständig auf Eis gekühlt werden und stand nur für maximal 60 Minuten zur Verwendung bereit.

#### **3.2.5.4.2 Herstellung der Glukose-Minimal (GM) Agar Platten**

Pro Herstellungsdurchgang konnten etwa 350 GM-Agar Platten gegossen werden, wobei zehn 1000 ml Erlenmeyerkolben benötigt wurden. In jeden Kolben wurden 11,25 g Oxoid Agar eingewogen und mit 700 ml destilliertem Wasser versetzt. Für die nachfolgende Sterilisation des Agars im Autoklaven wurden die Kolben mit einem Wattebausch und mit einem Stück Alufolie verschlossen. Um die Effektivität des Sterilisationsprozesses zu kontrollieren, wurde ein Indikatorklebestreifen auf dem Erlenmeyerkolben platziert. Zusammen mit dem Agar wurden Pyrex Glasflaschen, welche Glukose- und Vogel-Bonner Lösungen enthielten, autoklaviert (Herstellung dieser Lösungen: siehe 3.2.5.4.1.).

In der Zwischenzeit wurden sterile Petrischalen ausgepackt und mit dem Deckel nach oben in 10er Stapeln aufgeschichtet. Mit dem Plattengießen wurde unten im Stapel begonnen, wobei die Petrischalen darüber aufgehoben wurden. Nach der Sterilisation der Erlenmeyerkolben und der anderen Lösungen wurden sie umgehend in die Laminar-Flow Werkbank gebracht. Dort wurden 15 ml der Vogel-Bonner und 37,5 ml der Glukose Lösung zugegeben und geschwenkt. Der Glukose-Minimal Agar wurden in die Petrischalen gegossen (Abb. 46). Die Dicke der Agarschicht in der Platte sollte in etwa 0,5 cm betragen.

## MATERIAL UND METHODEN

---

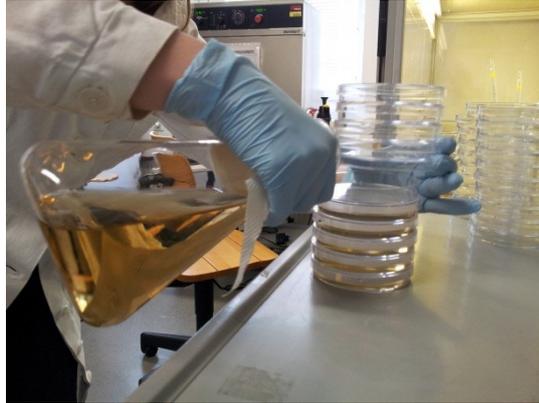


Abb. 46: Gießen der Minimal Glucose Agar Platten

Nach einer Trocknungsdauer von etwa 12 Stunden wurden die Glukose-Minimal Platten wieder eingepackt, möglichst luftdicht verschlossen und bei 4 °C im Kühlraum gelagert. Mit dem Datum versehen können sie für einige Monate gelagert werden.

### 3.2.5.4.3 Herstellung der Nährbouillon (NB = Nutrient Broth) für die OVNC (Overnight Culture)

Zur Kultivierung der Bakterien wurden 5 g des Nutrient Broth No. 2 in 250 ml Pyrex Glasflaschen eingewogen und mit 200 ml deionisiertem Wasser aufgefüllt. Nach dem Schütteln wurden die Deckel auf die Flaschen gegeben, mit einem Stück Alufolie verschlossen und mit einem Indikatorband versehen, um die Effektivität der Sterilisation zu kontrollieren. Die Lösung wurde dann im Autoklaven sterilisiert. In Abhängigkeit davon, welche *Salmonella* Stämme verwendet wurden, wurden verschiedene Antibiotika (Tab. 33) direkt in die abgekühlte Bouillon pipettiert.

Tab. 33: Stammspezifische Antibiotika für den NB

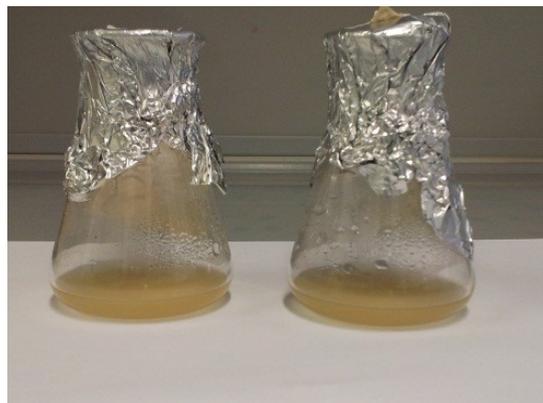
<i>Salmonella</i> Stamm	Antibiotika
TA 98	625 µl Ampicillin
TA 102	625 µl Ampicillin 156 µl Tetracyclin

Von dieser Nährbouillon mit den spezifischen Antibiotika wurden jeweils 12 ml in einen sterilen 100 ml Erlenmeyerkolben transferiert. Um dabei ganz sicherzugehen wurde die OVNC doppelt hergestellt. Anschließend wurde in jeden dieser Kolben eine Bakterienkolonie, welche von einer Masterplatte genommen wurde, hinzugefügt und vermengt (Abb. 47).



**Abb. 47: OVNC vor der Inkubation**

Danach wurden die Erlenmeyerkolben wieder mit einem Wattebausch und einer Alufolie verschlossen und für 12 Stunden bei 37 °C in den Inkubator gegeben. Die OVNC wurde dabei laufend am Laborrüttler bei Stufe 1 geschüttelt. Nach erfolgreicher Inkubation und Wachstum der Bakterien erscheint die Lösung nun trüb (Abb. 48).



**Abb. 48: OVNC nach der Inkubation bei 37 °C**

## MATERIAL UND METHODEN

---

### 3.2.5.4.4 Herstellung der Master Platten (MP)

Für die Herstellung von 2 Master Platten wurden 3,2 g Oxoid Agar in eine 250 ml Pyrex Schottflasche eingewogen und mit 200 ml entionisiertem Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde dann im Autoklaven sterilisiert. Nach der Entkeimung wurden unter sterilen Bedingungen 4,3 ml der Vogel-Bonner- und 10,8 ml der Glukose-Lösung beigegeben. Danach wurden 2,17 ml der Histidin und 1,3 ml der Biotin Lösung zugegeben. Die Flasche wurde geschwenkt um die Komponenten homogen zu verteilen. Bevor die Antibiotika dazu pipettiert werden konnten, musste der Agar abgekühlt werden, da die Antibiotika wärmeempfindlich sind. Für den Stamm TA 98 wurde 682 µl Ampicillin verwendet, wogegen zum TA 102 zusätzlich zum Ampicillin noch 54,3 µl der Tetracyclin Lösung zugegeben wurde. Nach erneutem Vermischen wurde der Agar in sterile Petrischalen gegossen, wobei die Dicke des Agars in etwa 1 cm betragen sollte. Die fertigen Master Platten wurden für 24 Stunden unter sterilen Bedingungen getrocknet. Danach wurden die vorgesehenen Bakterienstämme (von den gefrorenen Dauerkulturen oder einer Overnight Culture) auf die Platten gitterartig aufgebracht und für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert (Abb. 49).



Abb. 49: Masterplates TA 98 (re) und TA 102 (li)

Vor der Inkubation wurden die Master Platten mit einem Klebeband abgedichtet, um jede Art der Kontamination zu vermeiden. In Tabelle 34 ist die Lagerdauer der verschiedenen Masterplatten ersichtlich.

Tab. 34: Lagerdauer der Master Platten

<b>Salmonella Stamm</b>	<b>Lagerdauer</b>
TA 98	bis zu 2 Monaten
TA 102	2 Wochen

### 3.2.5.4.5 Herstellung des Top Agars (TA)

Für die Erzeugung des Top Agars wurden 1,2 g Oxoid Agar und 1 g Natriumchlorid in eine 250 ml Pyrex Schottflasche eingewogen und mit Aqua dest. auf 200 g aufgefüllt. Die Sterilisation des Top Agars erfolgte mittels Autoklavierung, jedes Mal bevor der Test gestartet wurde. Vor Verwendung des Agars wurden 20 ml der Histidin-Biotin Lösung hinzugefügt. Während des Ames Test musste die Pyrex Flasche in einem Wasserbad temperiert auf 55 °C gestellt werden.

### 3.2.5.4.6 Herstellung der Platten für die genetische Analyse der verwendeten Bakterienstämme (TA 98 und TA 102)

Die genetischen Analysen der beiden *Salmonella typhimurium* Stämme TA 98 und TA 102 wurden vor Beginn der eigentlichen Tests für jeden Stamm einmal durchgeführt, um ihre genetische Unversehrtheit und die spontane Mutationsrate zu überprüfen. Sie wurden auf Biotin- und Histidin-Abhängigkeit, die Kombination der Beiden, rfa Marker, uvrB-Löschung, das Vorkommen der Plasmide pKM101 (Ampicillin Resistenz) und pAQ1 (Tetracyclin Resistenz) und die Häufigkeit spontane Revertanten zu bilden in Anlehnung an das Paper publiziert von MORTELMANS und ZEIGER (2000), getestet.

Für jede Testvariante wurden jeweils 3 Platten hergestellt, wobei immer von einem Agar Mix ausgegangen wurden. Für diesen wurden immer 3,26 g Oxoid Agar eingewogen, mit 200 ml Aqua dest. aufgefüllt und gemeinsam mit einer Vogel-Bonner und einer Glukose-Lösung autoklaviert. Anschließend wurde dem Agar 4,3 ml Vogel-Bonner und 10,8 ml Glukose zugegeben. Es

## MATERIAL UND METHODEN

---

wurden 6 verschiedene Varianten durch Zugabe verschiedener Lösungen und Antibiotika aus dem Agar hergestellt (Tab. 35):

**Tab. 35: Agar Platten für die genetische Analyse der verwendeten *Salmonella typhimurium* Stämme**

<b>Agar Platten</b>	<b>Zugabe an Reagenzien</b>
Biotin-Platten	+ 1,74 ml Biotin Lösung 0,01 %ig (6,1 mg Biotin in 50 ml Aqua dest.)
Histidin-Platten	+ 1,74 ml Histidin Lösung 0,5 %ig (0,25 g Histidin in 50 ml Aqua dest.)
Biotin/Histidin-Platten	+ 1,74 ml Biotin Lösung + 1,74 ml Histidin Lösung
Biotin/Histidin/Ampicillin-Platten	+ 1,74 ml Biotin Lösung + 1,74 ml Histidin Lösung + 666 µl Ampicillin
Biotin/Histidin/Tetracyclin-Platten	+ 1,74 ml Biotin Lösung + 1,74 ml Histidin Lösung + 54 µl Tetracyclin
Biotin/Histidin/Ampicillin/Tetracyclin-Platten	+ 1,74 ml Biotin Lösung + 1,74 ml Histidin Lösung + 666 µl Ampicillin + 54 µl Tetracyclin

Die verschiedenen Agar-Platten wurden hergestellt, gegossen und anschließend getrocknet. Danach wurde mit beiden Stämmen eine „overnight culture“ (OVNC) gemacht und die Bakterien auf den vorbereiteten Platten ausgestrichen. Im Inkubator wurden die Platten für die Genetische Analyse bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert. Zur Auswertung wurde folgendes Schema herangezogen (Tab. 36):

Tab. 36: Prüfung auf Abhängigkeiten und Resistenzen im Zuge der genetischen Analyse

Prüfung der Platten	TA 98	TA 102
Biotin-Abhängigkeit	kein Wachstum	Wachstum, keine Biotin-Abhängigkeit
Histidin-Abhängigkeit	Kein Wachstum alle Stämme sind Histidin abhängig	
Biotin- und Histidin-Abhängigkeit	Wachstum auf allen Platten	
Ampicillin-Resistenz (Vorkommen des Plasmids pKM 101)	Wachstum auf allen Platten	
Tetracyclin-Resistenz (Vorkommen des Plasmids pAQ1)	kein Wachstum	Wachstum
Spontanrevertanten (Negativkontrolle)	kein Wachstum	

### 3.2.5.4.7 Positiv und negativ Kontrollen

Als **Positivkontrollen** wurden bekannte mutagene Substanzen [nach MORTELSMAN und ZEIGER, 2000] verwendet, welche spezifisch für jeden Stamm waren. Diese Stoffe sollten eine Reversion hervorrufen, die normalerweise nur dann auftritt, wenn Bakterien unter Einfluss von Mutagenen stehen. Im Test wurden folgende Mutagene als Positivkontrolle (Tab.37) eingesetzt:

Tab. 37: Mutagene für die Positivkontrolle

<i>Salmonella</i> Stamm	Ohne metabolischer Aktivierung (-S9 Mix)	Mit metabolischer Aktivierung (+S9 Mix)
TA 98	4-Nitro- <i>o</i> -phenylenediamine (4- NOPD)	2-Aminoanthracene (2-AA)
TA 102	Mitomycin C (MMC)	2-Aminoanthracene (2-AA)

Tabelle 38 zeigt die für die Positivkontrollen verwendeten Mutagene, welche für die einzelnen Tests verwendet wurden. Die angegebenen Konzentrationen wurden mittels Vortests ermittelt.

## MATERIAL UND METHODEN

Tab. 38: Verwendete Positivkontrollen im Ames Test

Mutagene	Lösungsmittel	Bakterienstamm	Konzentration [µg/100 µl]	Metabolische Aktivierung
2-Amino-anthracene (2-AA)	DMSO	TA 98	0,1 µg/100 µl	+S9
		TA 102	5 µg/100 µl	+S9
4-nitro-o-phenyldiamine (4-NOPD)	Negativkontrolle	TA 98	2 µg/100 µl	-S9
Mitomycin C	Negativkontrolle	TA 102	0,2 µg/100 µl	-S9

Die **Negativkontrolle** wurde grundsätzlich übernommen, um die Anzahl von spontanen Revertanten zu überprüfen. Da die Proben der Studie in einem HPLC-Wasser/Methanol-Gemisch gelöst wurden, wurde dieses Lösungsmittel auch als Negativkontrolle verwendet.

### 3.2.5.4.8 Herstellung der Saponin-Proben für den Ames Test

Die für den Ames Test verwendeten Saponinproben wurden aus den in Tabelle 39 angeführten Einzelstammlösungen (Ausgangsstandards) hergestellt.

Tab. 39: Einzelstammlösungen der Saponine

Saponin	Einwaage [mg]	Volumen [ml]	Lösungsmittel	Konzentration [mg/ml]
Digitonin	5,11	2	MeOH:H <sub>2</sub> O (1:1)	1,771
Diosgenin	2,29	2	MeOH	1,076
Escin	4,63	2	MeOH:H <sub>2</sub> O (1:1)	2,269
Hederacosid C	10,96	2	MeOH:H <sub>2</sub> O (1:1)	5,107
Oleanolsäure	3,15	2	MeOH	1,559
α-Solanin	1,34	2	MeOH	0,663

Aus diesen Stammlösungen wurde für jede Substanz eine Konzentration von 100 µg/ml durch Verdünnung mit Lösungsmittel MeOH:H<sub>2</sub>O im Verhältnis 9:1 hergestellt (Tab. 40).

Die Berechnung erfolgte laut nachstehender Formel:

$$\text{Endkonzentration [100 } \mu\text{g/ml]} / \text{Konzentration Einzelstammlösung [} \mu\text{g/ml]} * 1000 * \text{Endvolumen [10ml]}$$

**Tab. 40: Einzellösungen der verwendeten Saponine [c = 100  $\mu\text{g/ml}$ ]**

<b>Saponine</b>	<b><math>\mu\text{l}</math> Ausgangsstandard</b>	<b>Lösungsmittel MeOH:H<sub>2</sub>O 9:1</b>
Digitonin	564,65 $\mu\text{l}$	9935,35 $\mu\text{l}$
Diosgenin	929,37 $\mu\text{l}$	9070,63 $\mu\text{l}$
Escin	440,72 $\mu\text{l}$	9559,28 $\mu\text{l}$
Hederacosid C	195,81 $\mu\text{l}$	9804,19 $\mu\text{l}$
Oleanolsäure	641,44 $\mu\text{l}$	9358,56 $\mu\text{l}$
$\alpha$ -Solanin	1508,30 $\mu\text{l}$	8491,70 $\mu\text{l}$

Ausgehend von diesen Lösungen wurden die entsprechenden Konzentrationen für unsere Tests mittels HPLC-Wasser verdünnt (Tab. 41). Die geringste Konzentration basierte auf den Ergebnissen der LC-MS/MS Messungen der Proben im Umfang der Jahresreihe. Die Proben wurden vor jeder Verwendung sterilfiltriert.

**Tab. 41: Verwendete Konzentrationen der Saponine im Ames Test**

Konzentration 1	0,00038 ng/ml	0,0001ng/Platte
Konzentration 2	0,01 ng/ml	0,002 ng/Platte
Konzentration 3	0,1 ng/ml	0,02 ng/Platte
Konzentration 4	1 ng/ml	0,2 ng/Platte
Konzentration 5	10 ng/ml	2 ng/Platte
Konzentration 6	100 ng/ml	20 ng/Platte

### 3.2.5.4.9 Experimentelles Design

Alle Tests wurden anhand des Präinkubationstests nach MARON und AMES (1983) und MORTELMANS und ZEIGER (2000) durchgeführt. Beim Standard Platten Inkorporation Assay werden die Bakterien-Teststämme direkt der Testchemikalie ausgesetzt und auf eine Minimal-Glukose Agar

## MATERIAL UND METHODEN

---

Platte, normalerweise in An- und Abwesenheit von einem metabolisch aktivierten System (mit Rattenleber-Homogenisat = S9-Mix), aufgebracht. Der Testablauf erfolgt in mehreren Stufen nach einem strikten Schema, wobei die Einhaltung der vorgegebenen Zeitfenster essentiell ist, um etwaige Fehler zu minimieren und die Vergleichbarkeit der Testergebnisse zu gewährleisten.

Folgende in Tabelle 42 beschriebenen Schritte müssen vor jedem Testansatz getätigt werden.

**Tab. 42: Vorbereitungen für den Ames Test**

---

### **Am Vorabend des Testtages (ca. 14 Stunden vor Testbeginn)**

---

Laminar Flow einschalten

Für Overnight Culture benötigte Lösungen autoklavieren und abkühlen lassen (Dauer etwa 1 Stunde)

Herstellung der OVNC, Beimpfung mit der entsprechenden Bakterienkultur von der dazugehörigen Master Plate und Zugabe der für jeden Stamm benötigten Antibiotika

Beschriftung der bereitgestellten GM Agar Platten (aus dem Kühlraum), welche über Nacht zum Trocknen im Laminar Flow ausgebreitet wurden (63 Platten pro Test)

Beschriften der sterilen Teströhrchen (63 Stück pro Test):

- 6 Negativkontrollen
- 3 Positivkontrollen
- Je 3 Röhrchen für jede Substanz und Konzentration (3-fach Ansatz)

---

### **Am Testtag (ca. 1,5 Stunde vor Testbeginn)**

---

Top Agar herstellen und mit der vorbereiteten Histidin-Biotin Lösung autoklavieren

Top Agar mit 20 ml einer 0,05 mM Histidin-Biotin Lösung versetzen und im Wärmebad auf etwa 50 °C temperieren

Substanzen in den jeweiligen Konzentrationen und Positivkontrolle vorbereiten und sterilfiltrieren

Wenn ein Test mit metabolischer Aktivierung durchgeführt wurde, wurde kurz vor Testbeginn der S9-Mix hergestellt und auf Eis gestellt. Hierbei ist zu beachten, dass dieser Mix nur 60 Minuten haltbar ist.

---

Die verschiedenen Komponenten werden nach einem vorgegebenen Schema (siehe Tab. 43) in ein steriles Test Tube pipettiert und nach einer Präinkubation von 25 Minuten mit 2 ml Top Agar versetzt und auf die GM-Platten gegossen. Nach dem Aushärten des Agars wurden die Platten mit dem Agar nach oben für 48 Stunden bei 37 °C in den Inkubator gegeben und inkubiert.

#### 3.2.5.4.10 Beschreibung des Prä-Inkubationstest

Für den Präinkubationstest (Abb. 50) wurde der Standard Platten Inkorporationstest modifiziert, indem der Top Agar nach Zugabe der Bakterien und Testsubstanzen 25 Minuten lang inkubiert und danach erst auf die Platten aufgetragen wird. Man vermutet, dass die kurzlebenden mutagenen Metabolite eine bessere Reaktionsmöglichkeit mit den verwendeten Teststämmen haben.

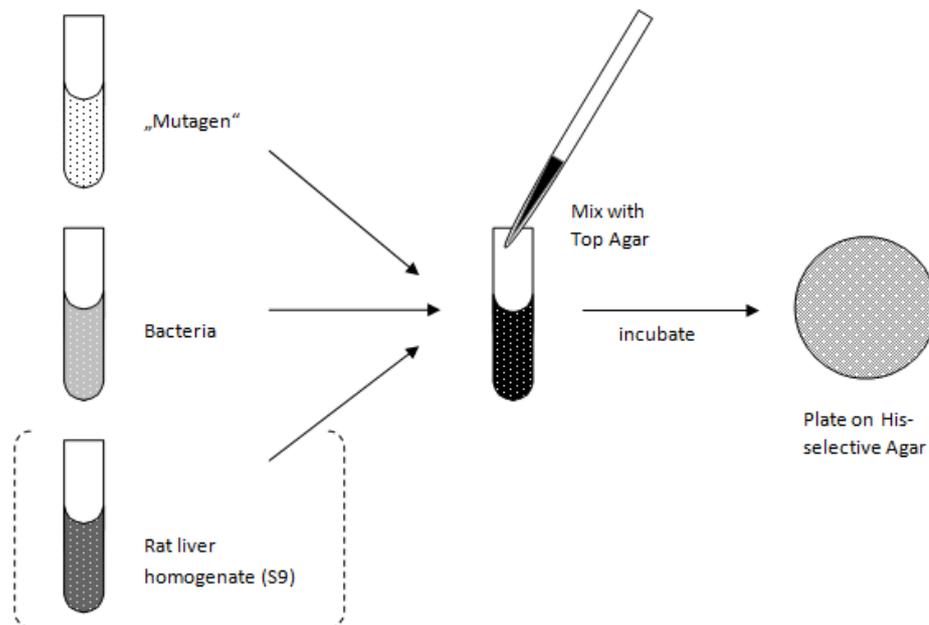


Abb. 50: Durchführung Präinkubationstest [RATH, 2013]

## MATERIAL UND METHODEN

Bei jedem Test wurden unter sterilen Bedingungen chronologisch 500 µl PBS Puffer, 100 µl der OVNC Nährbouillon/Bakteriensuspension (etwa  $1-2 \times 10^8$  Bakterien pro Röhrchen) und 200 µl der vorgesehenen Proben bzw. 100 µl Positivkontrolle in sterile Glasröhrchen (Eprovetten) pipettiert (Tab. 43). Als Negativkontrolle wurden 200 µl Lösungsmittel der Proben (H<sub>2</sub>O/MeOH) verwendet und auch bei der Positivkontrolle als Volumenausgleich (100 µl) zugegeben. Falls der Test mit metabolischer Aktivierung durchgeführt wurde, musste der PBS-Puffer durch 500 µl S9-Mix (Herstellung dieser Lösung: siehe 3.2.5.4.1.) ersetzt werden.

**Tab. 43: Pipettierschema: Test auf Mutagenität mit und ohne S9-Zugabe**

	PBS oder S9- Mix [µl]	Bakterien [µl]	Neg Kontr [µl]	Pos Kontr [µl]	Prob e [µl]	Volumens- ausgleich [µl]	Top Agar [ml]	Gesamt [ml]
Negativ Kontrolle	500	100	200	---	---	---	2	2,8
Positiv Kontrolle	500	100	---	100	---	100	2	2,8
Proben	500	100	---	---	200	---	2	2,8

Sobald die erste Probe beziehungsweise die Positivkontrolle zugesetzt wurde, wurde die Stoppuhr auf 25 Minuten gestellt. Nach Verschließen der Glasröhrchen und kurzem Schütteln wurde der Eprovettenständer bei 37 °C in den Inkubator gestellt und mit 55 UpM gerüttelt. Nach Ablauf der 25 Minuten wurden die Proben aus dem Brutschrank genommen und nacheinander unter sterilen Bedingungen je 2 ml Top Agar in jedes Tube gegeben. Nach erneutem Mischen am Vortex wurde der Inhalt jedes Testtubes sofort auf die passend beschrifteten Glukose-Minimal Agar Platten gegossen und darauf verteilt. Nach einer Trocknungszeit von etwa 2 Stunden wurden diese im Inkubator für 48 Stunden mit dem Agar nach oben bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der 2 Tage wurden die Kolonien auf den GM-Platten gezählt und das Ergebnis in Revertanten pro Platte ausgedrückt.

### 3.2.5.5. Auszählen der Kolonien

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die Platten aus dem Inkubator genommen und die Kolonien mithilfe eines Kolonienzählers ausgezählt. Die meist sehr kleinen Kolonien (weiße Flecken) konnten sehr viel einfacher erfasst werden, wenn die Platten auf eine flache Lampe gelegt und von unten beleuchtet werden (Abb. 51).



Abb. 51: Auszählen der Platten

Die Revertanten leiteten sich aus der gesamten Anzahl der Kolonien, welche sich auf der Platte gebildet haben ab (Abb. 52). Mutagenes Potential ist dann gegeben, wenn die Zahl der Revertanten auf einer Probenplatte größer ist als die doppelte Anzahl der Negativkontrolle.



Abb. 52: Platten der Negativkontrolle TA 98

## MATERIAL UND METHODEN

---

### 3.2.5.6. Statistische Auswertung des Ames Tests

Alle Daten wurden als Mittelwerte (MW) plus-minus der jeweiligen Standardabweichung (SD) dargestellt. Die Statistische Auswertung erfolgte mit der Statistik- und Analysen-Software „SPSS Statistics für Windows“ Version 19.0 (Statistical Package for the Social Science, SPSS Incorp., Chicago Ill. USA) und Microsoft Excel 2010.

Alle Werte wurden mit dem nichtparametrischen KOLMOGOROV-SMIRNOV-Test (K-S-Test) auf Normalverteilung geprüft. Werte größer als  $p > 0,05$  galten als normalverteilt und keine Normalverteilung war gegeben, wenn der Wert darunter lag ( $p < 0,05$ ). Die Prüfung auf Unterschiede der Daten aus den Mutagenitätstests wurde bei gegebener Normalverteilung die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Analysis of Variance) verwendet. Die Unterschiede der Mittelwerte wurden als statistisch signifikant betrachtet, wenn der Wert  $p < 0,05$  war.

### 3.2.5.7. Nicht statistische Auswertung des Ames Tests

Für die weitere Auswertung und Interpretation der analysierten Daten wurden die untersuchten Proben in folgende Gruppen (Tab. 44) eingeteilt.

**Tab. 44: Nicht-statistische Klassifikation der analysierten Daten [nach: MORTELMANS und ZEIGER (2000)]**

<b>Mutagen</b>	Substanzen welche in Diskussion stehen Mutagen zu sein, weil ihre Anzahl an His+ Revertanten Kolonien größer ist als die doppelte Negativkontrolle. Und zusätzlich eine Konzentrationsabhängigkeit vorliegt.
<b>Geringfügig mutagen</b>	Stoffe gelten als schwache Mutagene, wenn zum einen ihre Menge an His+ Revertanten Kolonien signifikant von der Konzentration abhängen, aber diese nicht die doppelte Zahl der Kolonien der Negativkontrolle erreichen.
<b>Nicht beweiskräftig</b>	Als nicht auswertbar werden jene Substanzen angesehen, welche nicht klar als mutagen oder nicht-mutagen identifiziert und die Ergebnisse somit nicht klassifiziert werden können.
<b>Nicht-mutagen</b>	Substanzen gelten dann als nicht-mutagen, wenn kein konzentrationsabhängiger Anstieg der Anzahl der His+ Revertanten bestimmt werden kann.

Die Klassifikation ist vergleichbar mit dem für den Ames Test spezifischen Kriterien von MORTELMANS und ZEIGER (2000). Hierbei gilt, dass eine Substanz dann als potentiell mutagen gilt, wenn in allen Testansätzen (mit und ohne metabolischer Aktivierung) die Anzahl der Revertanten mindestens doppelt so hoch ist wie die der Negativkontrolle und eine konzentrationsabhängige Erhöhung nachgewiesen werden kann.

### **3.3. Methoden der statistischen Auswertung**

Auch für die statistische Auswertung des Schäumungspotentials wurde das Statistikprogramm SPSS 19.0 für Windows (Statistical Package for the Social Science, SPSS Incorp., Chicago Ill. USA) und das Microsoft Excel 2010 verwendet.

#### **3.3.1. Prüfung auf Normalverteilung der Daten**

Alle Daten wurden in Gruppen aufgeteilt und mit dem nichtparametrischen KOLMOGOROV-SMIRNOV-Test (K-S-Test) auf Normalverteilung geprüft. Eine Gleichverteilung lag dann vor, wenn der Wert größer 0,05 war und keine Normalverteilung war gegeben, wenn der Wert darunter lag ( $< 0,05$ ).

#### **3.3.2. Prüfung auf Unterschiede**

Wenn eine Normalverteilung vorlag wurde der t-Test für unabhängige Stichproben nach LEVENE oder die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Analysis of Variance) angewandt. Bei einer nicht Normalverteilung der Daten oder zu geringem Stichprobenumfang kam der U-Test von MANN und WHITHNEY zur Anwendung.

Signifikante Unterschiede der Mittelwerte waren gegeben, wenn

- $p < 0,05$  (5 %) signifikant,
- $p < 0,01$  (1 %) hoch signifikant und
- $p < 0,001$  (0,1 %) höchst signifikant ( $p = 0,000$ ) war.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine LC-MS/MS Analysenmethode zur Quantifizierung von Saponinen in Oberflächengewässern und Abwässern von Kläranlagen entwickelt. Das Ziel dieses Vorhabens war es einen Überblick über mögliche Einflüsse für eine Schaumbildung auf österreichischen Gewässern zu bekommen. Dass Saponine als natürliche oberflächenaktive Substanzen, die Grenzflächenspannung bzw. –energie herabsetzen und dadurch die Schaumbildung initiieren, ist längst bekannt und war der Grund für die Entwicklung einer geeigneten Spurenanalytik. Hierfür wurden sechs Saponine, welche in Österreich heimischen Pflanzen natürlich enthalten sind, ausgewählt und 481 Umweltproben auf ebendiese untersucht. Die Analysen wurden im Labor der Umweltbundesamt GmbH in der Abteilung Organische Analysen durchgeführt, wo auch der gemeinsam mit der Technischen Universität Wien entwickelte Schäumbarkeitstest das „Schäumungspotential“ mit allen Proben ausgeführt wurde. Des Weiteren wurde für die selektierten Substanzen im Zellkulturlabor des Departments für Ernährungswissenschaften der Universität Wien gemeinsam mit der Masterstudentin Julia Rath ein Ames Test auf Mutagenität bzw. Oxidationsneigung durchgeführt. Dafür wurden die *Salmonella typhimurium* Stämme TA 98 und TA 102 mit und ohne Zugabe eines Rattenleberhomogenats zur metabolischen Aktivierung eingesetzt.

#### **4.1. Quantitative Analyse von Saponinen mittels LC-MS/MS**

Die allgemeinen Schwierigkeiten in der Analytik von Saponinen (breites Spektrum an Grundstrukturen mit geringen Unterschieden, amphiphiler Charakter und das relativ hohe Molekulargewicht) zum einen und die zu erwartenden niedrigen Saponinkonzentrationen in den Proben ließen die LC-MS/MS Kopplung als Mittel der Wahl zur Lösung dieses komplexen Problems erscheinen. Es wurden Voruntersuchungen mit Standardsubstanzen unter Anwendung dieser Technik getätigt und Pseudomolekülonen mit plausiblen Fragmentierungsmustern detektiert. Des Weiteren wurden Versuche zur Optimierung der Ionenausbeute für die 6 ausgewählten Saponine durchgeführt. So wurde beispielsweise durch Variation der Eluenten und Zugabe verschiedener Säuren die Ionenausbeute erhöht. ZHOU und HAMBURGER, 1995 beobachteten in ihren LC-MS-Versuchen beträchtliche Unterschiede bei dem Zusatz flüchtiger Puffersubstanzen zu den verschiedenen Laufmitteln. Ähnliches gilt für den Ionisierungsmodus (positiv oder negativ), wobei speziell Säuren, wie etwa die Oleanolsäure im negativen Ionenmodus besser ionisiert werden können. Es mussten also viele Optimierungsschritte auf instrumenteller Seite (Chromatographie und Massenspektrometrie) sowie auf Seiten der Probenvorbereitung getätigt werden, um eine bestmögliche Analytik zu garantieren. Für eine Quantifizierung der ausgewählten Saponine wurden neben einer chromatographischen Methode zwei MS-Methoden, eine im Positiv- und eine im Negativ-Ionenmodus, entwickelt um alle ausgewählten Substanzen mittels LC-MS/MS Kopplung zu erfassen.

Aufgrund der zu erwartenden geringen Konzentrationen der Analyten in den Oberflächenwässern wurde eine Probenvorbereitung zur Aufkonzentrierung der Analyten mit möglichst wenigen Schritten etabliert, wobei hier trotzdem die größten Fehlermöglichkeiten lagen. Um etwaige Fehler zu vermeiden, wurde ein Analysenbegleitbogen (Aufarbeitungsprotokoll) erarbeitet, nach dem strikt gearbeitet und alles genau dokumentiert wurde. Für die Fließgewässerproben wurde als Methode die Festphasenextraktion (SPE) gewählt, wobei zu diesem

Zweck 200 ml Probe benötigt wurden. Da die Abwasserproben vor allem mit organischen Schwebstoffen und anderen Verunreinigungen belastet waren und somit nicht auf die eng gepackten SPE-Säulchen geladen werden konnten, wurde hier eine Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) etabliert, welche ebenso eine Aufkonzentrierung bzw. eine Reinigung der Proben darstellt. Eine experimentelle Vorarbeit war bei beiden Probenvorbereitungsarten nötig, bevor die insgesamt 481 Proben aufgearbeitet werden konnten. Die Gesamtprobenmenge setzt sich aus 417 anthropogen (verschieden Industriezweige, intensive Landwirtschaft, kommunale Kläranlagen) beeinflussten Oberflächenwasserproben, 29 Proben anthropogen un- bzw. sehr gering belasteter Oberflächengewässer (Hintergrundmessstellen) und 35 Abwasserproben zusammen. Die Abwässer waren die Zu- und Abläufe einer Kläranlage und die Mischproben des Abwassers einer Textilfabrik, welche in eben diese eingeleitet wurden.

Um eine Quantifizierung vornehmen zu können, musste über eine externe Kalibration gearbeitet werden. Die Kalibrationskurven wurden mit Standardsubstanzen in bekannter Konzentration aufgenommen, wobei dadurch der Bezug zur Saponinkonzentration im Wasser über die Peakflächen (Areas) hergestellt werden konnten. Des Weiteren erfassten sie einen großen Arbeitsbereich (1 bis 500 ng/ml) in einer quadratischen Funktion. Nur die Abwässer wurden zusätzlich auch noch aus einer 1:10 Verdünnung gemessen, da Matrixeffekte hier nicht ausgeschlossen werden konnten. Die Spezifität der Methodik ist durch die dreidimensionale Trennung der Analyten (Molmasse, spezifische Fragmentationen und Retentionszeit) für jedes Saponin gegeben.

Zur Robustheit der entwickelten LC-MS/MS-Analysenmethode muss erwähnt werden, dass Lösungsmittel unterschiedlicher Hersteller keinen Einfluss auf die Trennung der Analyten haben. Bei Vorversuchen mussten jedoch für diese Analytik die am geeignetsten Eluenten eruiert werden, in unserem Fall HPLC-Wasser und Acetonitril mit jeweils 0,1 % Ameisensäure. Bei nachlassender Trennleistung der HPLC-Säule wurde diese durch eine Säule gleichen Typs und Herstellerfirma ersetzt, damit die Auftrennung reproduzierbar war. Aufgrund der Temperierung der Säule im Säulenofen auf 40 °C während der

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Chromatographie sind Schwankungen der Raumtemperatur trotz Klimaanlage vernachlässigbar. Es wurde überdies penibel darauf geachtet, dass alle Geräte in bestmöglichen Zustand waren. Die Proben waren aufgrund des nichtflüchtigen und amphiphilen Charakters der zu untersuchenden Analyten über längere Zeiträume in Lösung bei einer Lagerung bei 4 °C stabil. Während der Aufbewahrung musste jedoch eine Verdunstung des Lösungsmittels vermieden werden.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die Standardkalibration (Abb. 53), wobei die aus der Ionenausbeute resultierenden Peakflächen (Areas) in Zusammenhang mit der Konzentration in den Proben stehen.

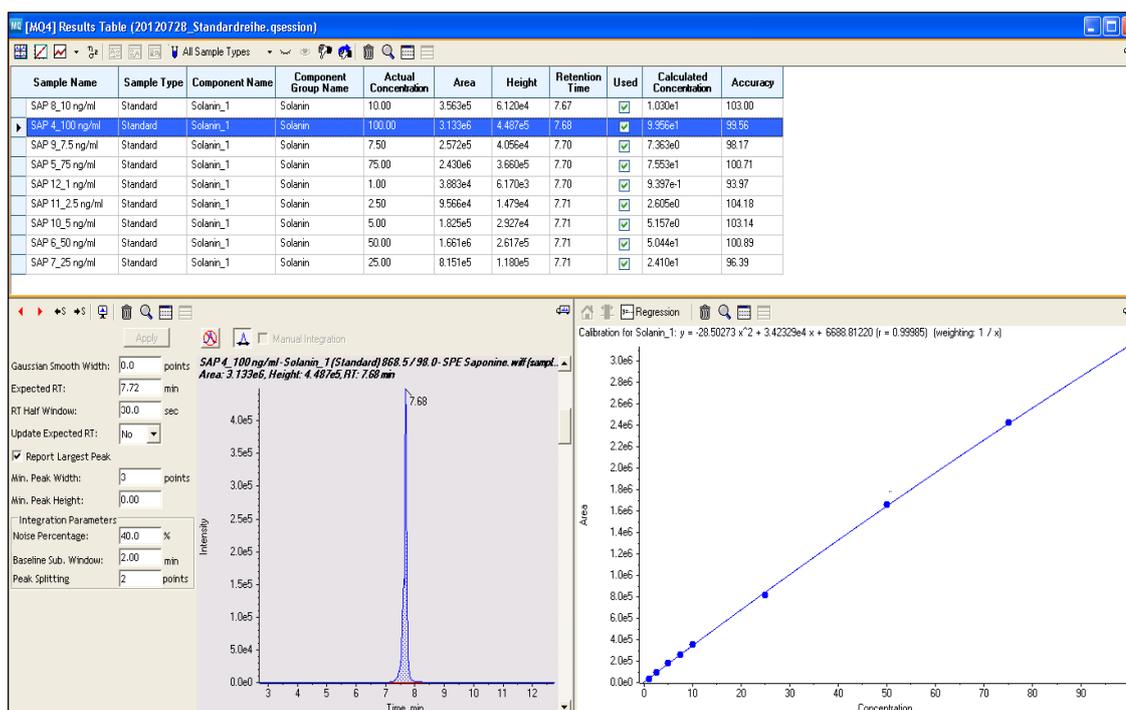
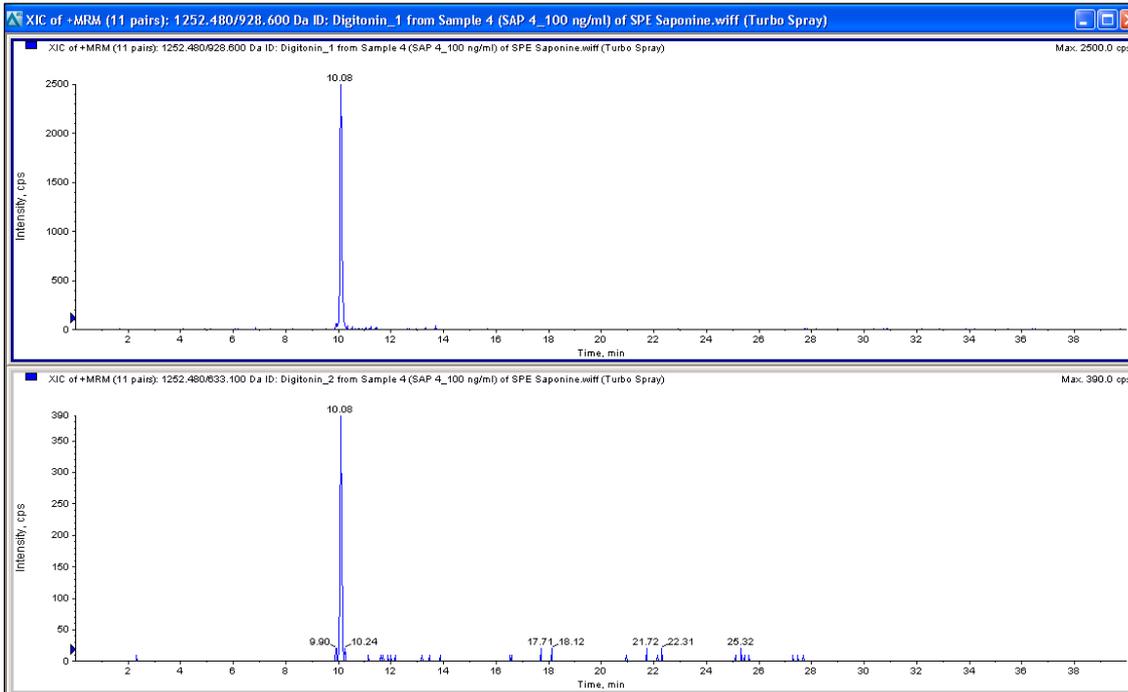
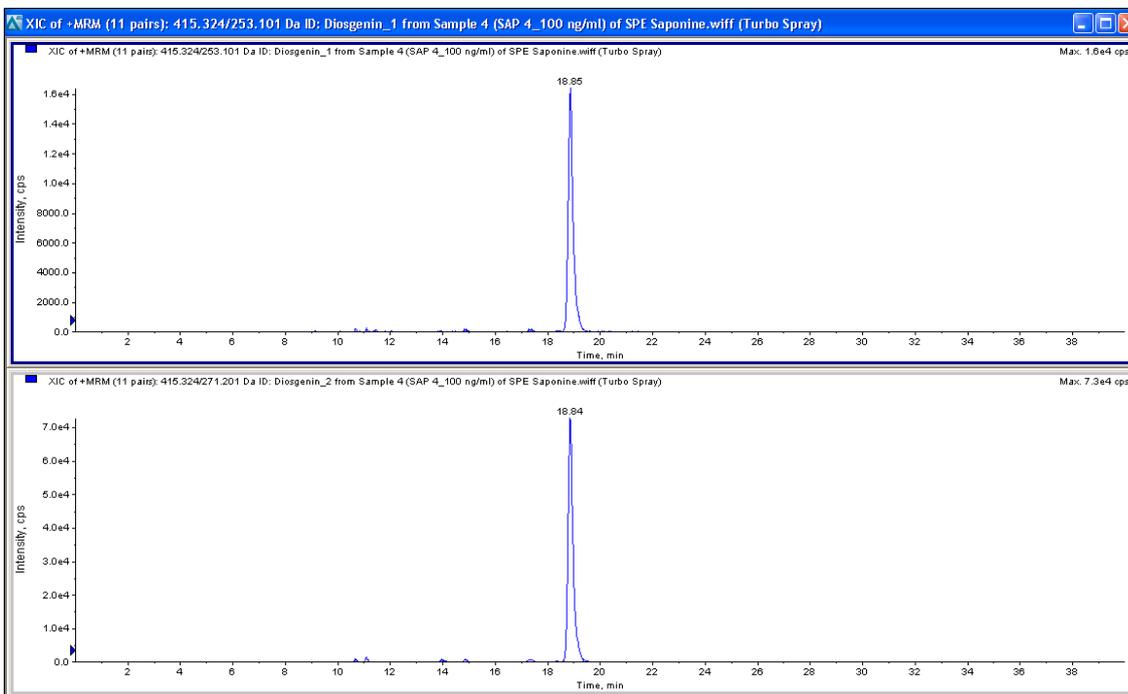


Abb. 53: Standardkalibration Solanin\_1 gemessen auf der LC-MS/MS 4 (MultiQuant 2.1)

Die Abbildungen 54 bis 58 zeigen die 2 intensivsten Ionenspuren der Molekularionen und ihre Fragmentionen zur jeweiligen Retentionszeit der im Positiv-Ionenmodus gemessenen Saponinstandardsubstanzen (Digitonin, Diosgenin, Escin, Hederacosid C und  $\alpha$ -Solanin).



**Abb. 54:** Die Übergänge des Digitonins (Standardkonzentration  $c=100$  ng/ml;  $RT=10,08$  min) gemessen auf der LC-MS/MS 4 (Analyt)



**Abb. 55:** Die Übergänge des Diosgenins (Standardkonzentration  $c=100$  ng/ml;  $RT = 18,85$  min) gemessen auf der LC-MS/MS 4 (Analyt)

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

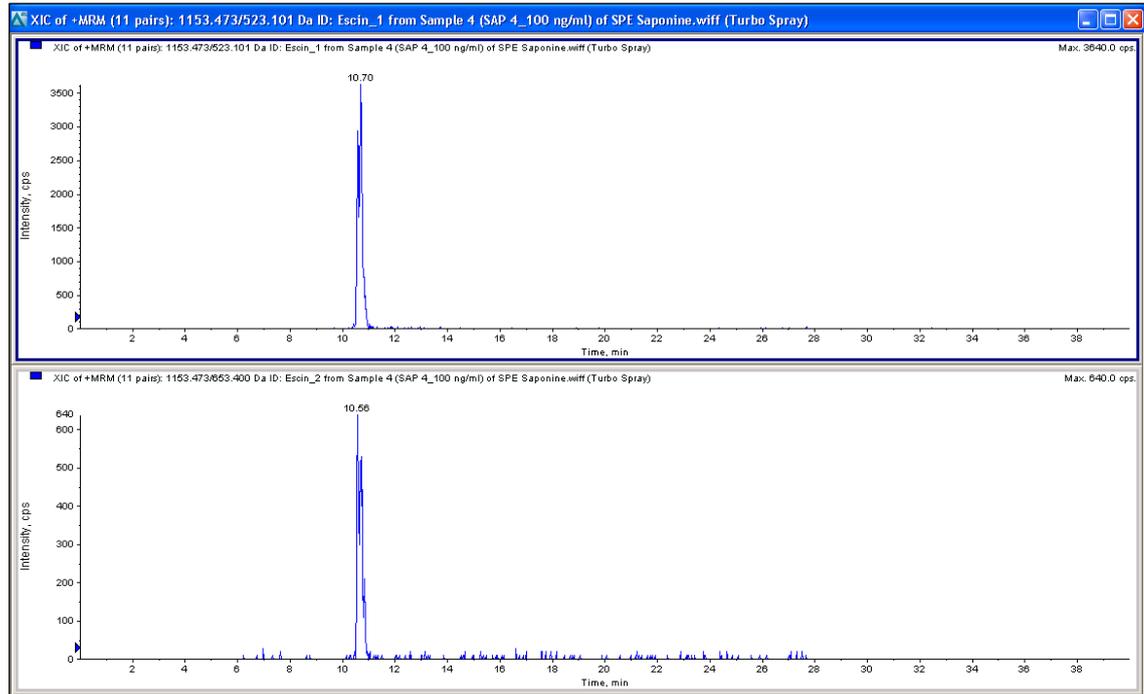


Abb. 56: Die Übergänge des Escins (Standardkonzentration  $c=100$  ng/ml; RT = 10,60) gemessen auf der LC-MS/MS 4 (Analyst)

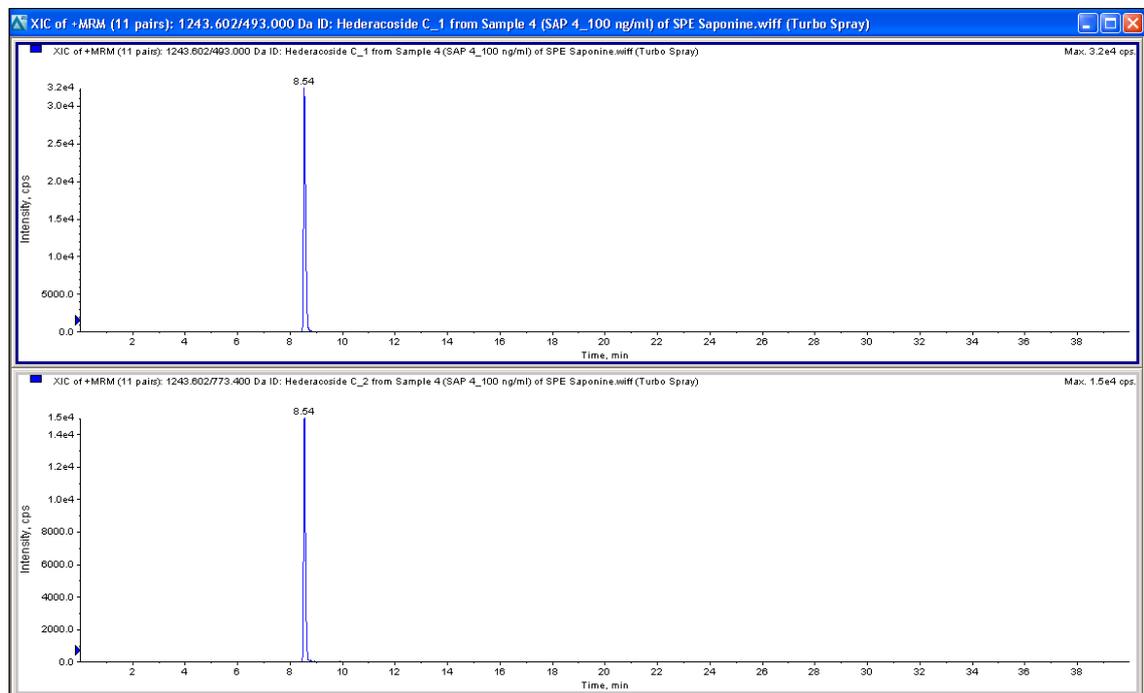
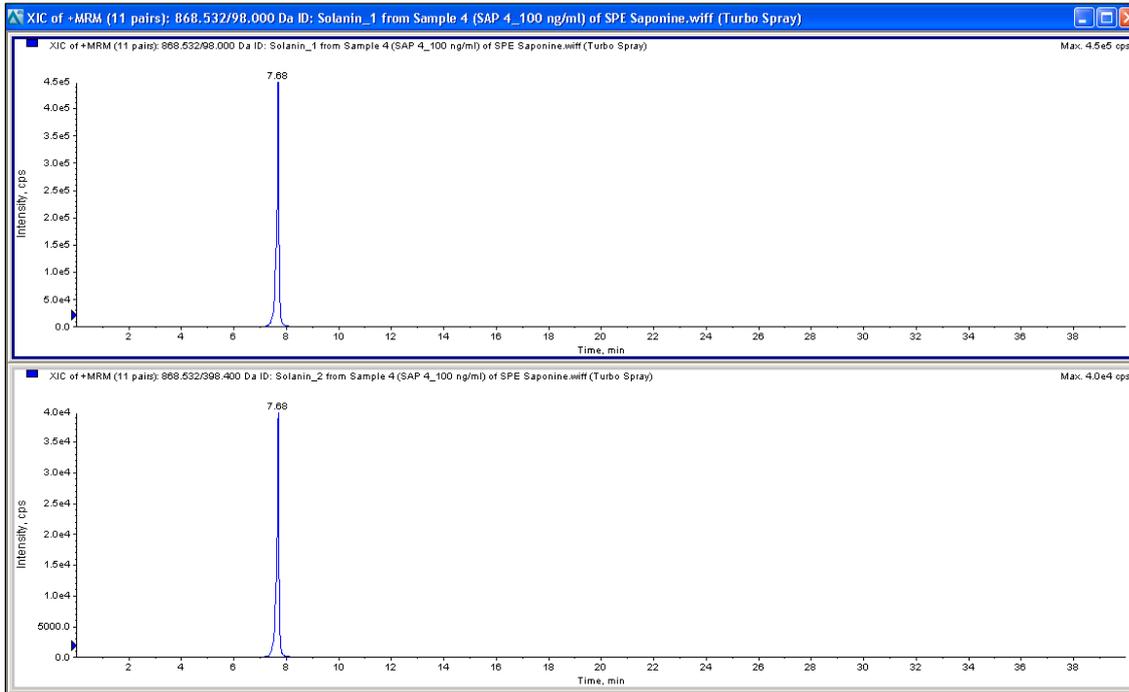


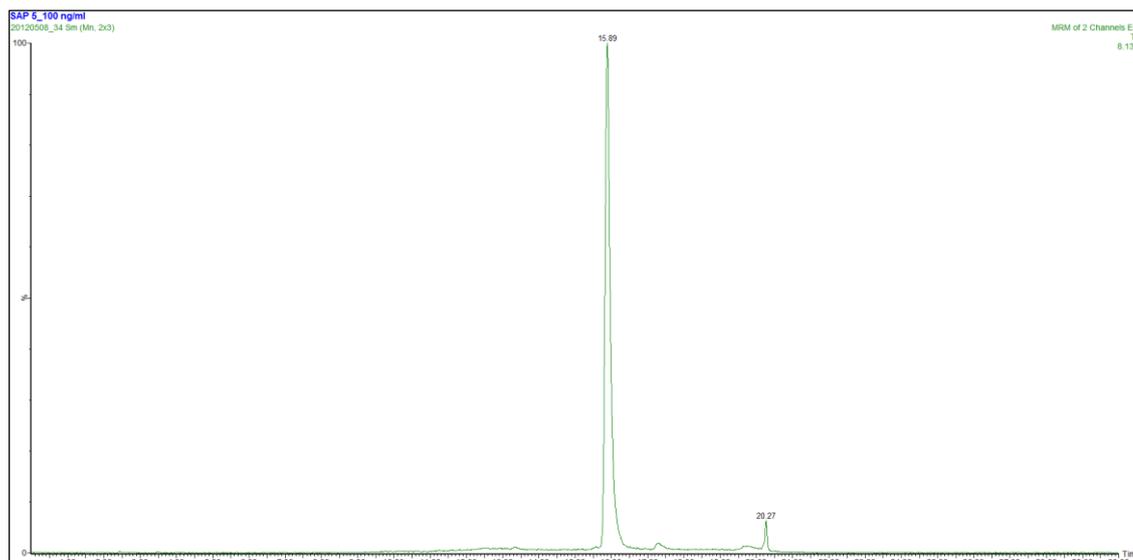
Abb. 57: Die Übergänge des Hederacosid C (Standardkonzentration  $c=100$  ng/ml; RT = 8,54 min) gemessen auf der LC-MS/MS 4 (Analyst)



**Abb. 58:** Die Übergänge des  $\alpha$ -Solanins (Standardkonzentration  $c=100$  ng/ml; RT = 7,68 min) gemessen auf der LC-MS/MS 4 (Analyt)

Bei der Oleanolsäure wurde im Gegensatz zu den Saponinen, welche im Positiv-Ionenmodus gemessen wurden, nur das Quasimolekülion  $[M-H]^-$  aufgezeichnet, da es hier zu keiner Fragmentierung kommt. Abbildung 59 zeigt den TIC (Total Ion Current) der Oleanolsäure mit der Retentionszeit 15,89 Minuten im MassLynx.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abb. 59:** TIC (Total Ion Current) der Oleanolsäure (Standard  $c=100$  ng/ml; RT = 15,89 min) gemessen auf der LC-MS/MS 2 (MassLynx V4.1)

Die LC-MS/MS Ergebnisse (ng/ml) wurden durch die Einwaage (200 ml) gerechnet und mit der jeweiligen Wiederfindung (%) der entsprechenden Aufarbeitung (SPE oder LLE) korrigiert, in ng/L (ppt = parts per trillion  $1 \cdot 10^{-12} = 1$  Teil pro Billion) umgerechnet, damit mit den Zahlen besser gearbeitet werden kann. Die gleiche Berechnung wurde mit den Gerätebestimmungs- (BG) und Nachweisgrenzen (NG) gemacht (siehe Kapitel 3.2.3.6.2 Tab. 28), um die Daten quantifizieren zu können. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden durch Vormessungen mit Standardkalibrationen für alle 6 Substanzen über eine Basisvalidierung mit dem SQS 2000, einer Software zur statistischen Qualitätskontrolle analytischer Daten, ermittelt. Alle Messwerte wurden auf zwei Stellen gerundet angegeben. Ergebnisse welche unter der Bestimmungsgrenze (BG) lagen wurden als kleiner Bestimmungsgrenze ( $< BG$ ) aufgeführt, da die genaue Quantifizierung unter der Quantifizierungsgrenze (LOQ = Limit of Quantitation) wie die BG noch genannt wird, nicht mehr verlässlich ist. Messergebnisse welche kleiner der Nachweisgrenze (NG) also der Limit of Detection (LOD) oder Lower Detection Limit (LDL) waren, wurden als nicht nachweisbar (n.n.) angegeben. Die Wiederfindungsraten für die ausgewählten Saponine befinden sich in Tabelle 29 im Kapitel 3.2.3.6.3 Wiederfindungsraten und Wiederholbarkeit.

Ziel dieser Studie war es das Vorkommen von ausgewählten Saponinen und jahreszeitliche (März 2011 bis April 2012) quantitative Unterschiede zu untersuchen. Bei erfolgreichem Nachweis und jahreszeitlichen Unterschieden, sollte weiters geklärt werden, ob diese mit den Ergebnissen des Schäumungspotentials korrelieren.

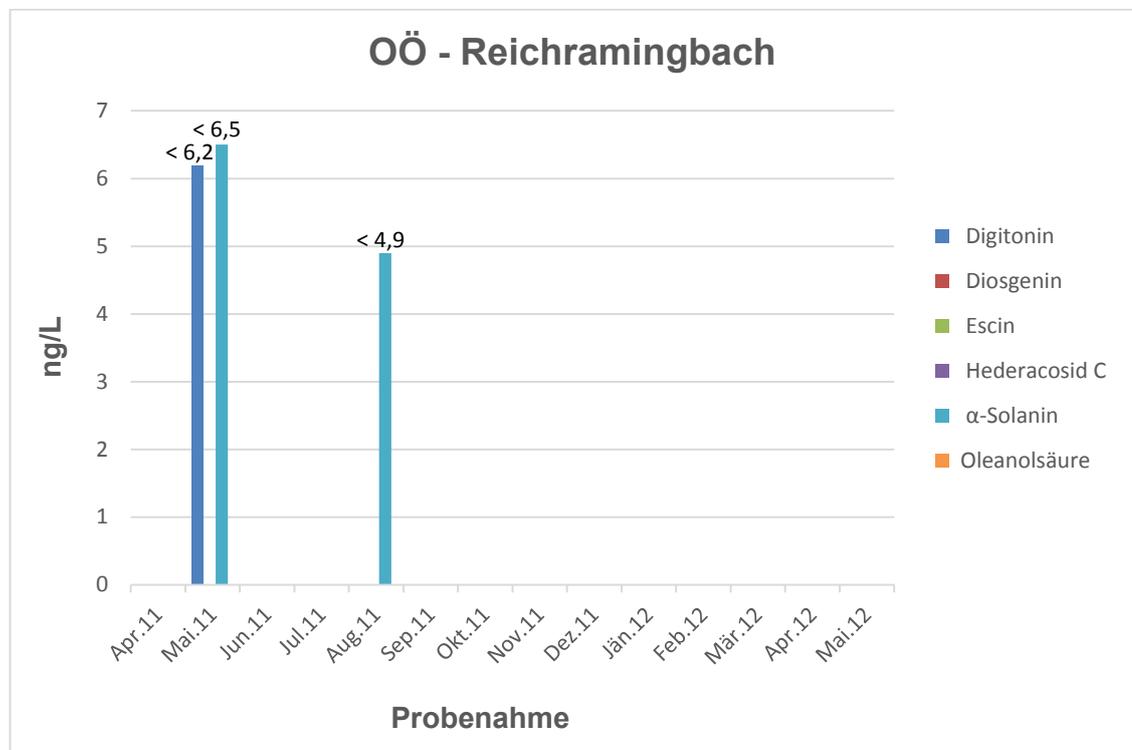
Die LC-MS/MS-Messergebnisse befinden sich in den folgenden Abbildungen, aber auch als Tabellen in Kapitel 10. Für eine bessere Veranschaulichung wurden in den folgenden Kapitel (4.1.1. bis 4.1.3.) Abkürzungen der Substanzen und Messstellen verwendet. In den folgenden Grafiken als Balkendiagramm dargestellt, sind jeweils die Messstellen im Jahresverlauf der Probenahme angegeben in Monat/Jahr gegen die LC-MS/MS-Messwerte in ng/L aufgetragen. Positive Messwerte sind fett gedruckt und Werte kleiner Bestimmungsgrenze als < Wert angegeben (z.B.: < 2,5), da diese nicht quantifizierbar waren. Aufgrund der hohen Selektivität dieser Methode wurden alle Proben nur einmal injiziert und gemessen, daher konnten keine Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und angegeben werden.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1.1. Bestimmung von Saponinen in Hintergrundmessstellen

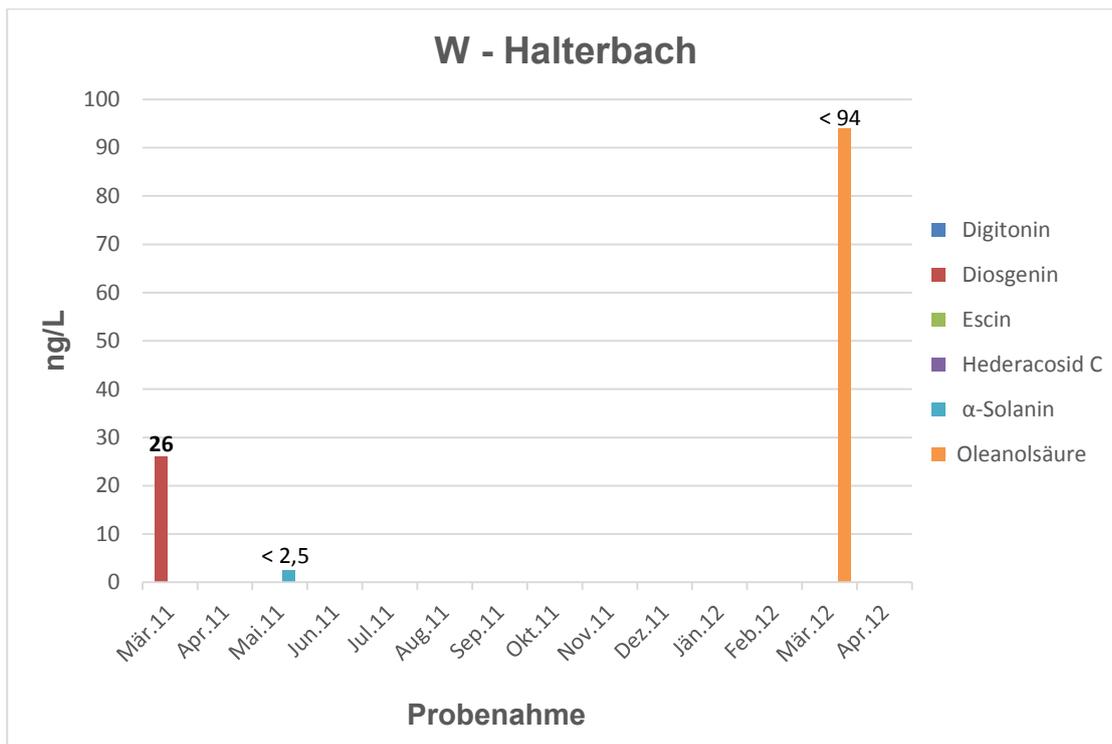
In den Abbildungen 60 und 61 sind die LC-MS/MS-Ergebnisse der beiden Hintergrundmessstellen in Oberösterreich (RR = Reichramingbach) und in Wien (HB = Halterbach) dargestellt.

Es ist ersichtlich, dass die untersuchten Saponine im Jahresverlauf meist nicht nachweisbar (n.n. = 0) waren. Bei der Messstelle Reichramingbach konnte lediglich im Mai und August 2011 bei den Saponinen Digitonin und  $\alpha$ -Solanin ein Wert kleiner Bestimmungsgrenze festgestellt werden.



**Abb. 60: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Reichramingbach im Jahresverlauf**

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der zweiten Hintergrundmessstelle dem Halterbach, wobei hier im März 2011 für Diosgenin sogar mit 26 ng/L ein Wert über der Bestimmungsgrenze gemessen wurde. Des Weiteren wurde im Mai 2011 und im Februar 2012 wieder ein Wert kleiner BG beim  $\alpha$ -Solanin und bei der Oleanolsäure beobachtet.



**Abb. 61: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Reichramingbach im Jahresverlauf**

Da die anthropogen un- bzw. nur sehr gering belasteten Hintergrundmessstellen zu den Oberflächengewässern zählen wurden die Ergebnisse dieser beiden Messstellen am Ende des nächsten Kapitel 4.1.2. mitdiskutiert.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1.2. Bestimmung von Saponinen in Oberflächengewässern (Immissionsproben)

Bei der Immissionsmessstelle OÖ – Ager 3 (Abb. 62) zeigt sich, dass in den Monaten April, Mai und Juli 2011 mehrere Werte kleiner als die Bestimmungsgrenze bei den Saponinen Digitonin, Hederacosid C und  $\alpha$ -Solanin waren und auch 2 positive Werte > BG im Mai 2011, Digitonin 6,0 ng/L und  $\alpha$ -Solanin 4,1 ng/L gemessen wurden. Im weiteren Jahresverlauf wurde noch im Oktober 2011 bei der Oleanolsäure, im Jänner 2012 beim Hederacosid C und im März 2012 beim  $\alpha$ -Solanin ein Wert < BG festgestellt. Im Vergleich zu den Hintergrundmessstellen wurden jedoch deutlich mehr Messwerte als positiv oder kleiner Bestimmungsgrenze detektiert.

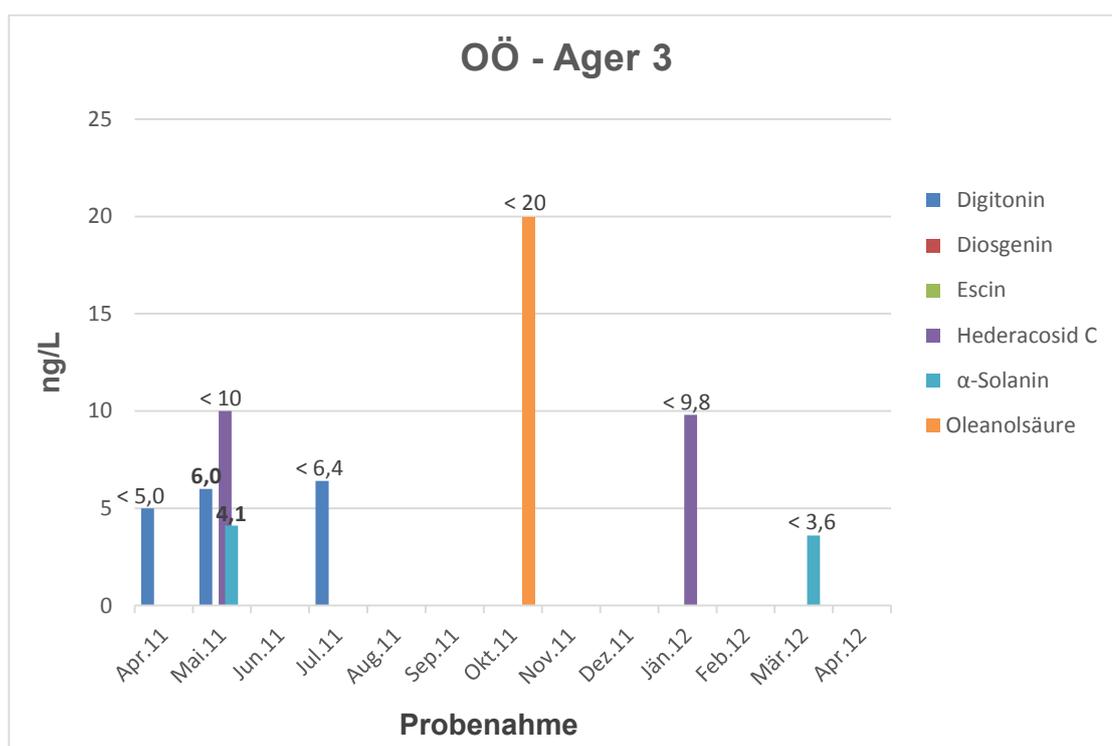
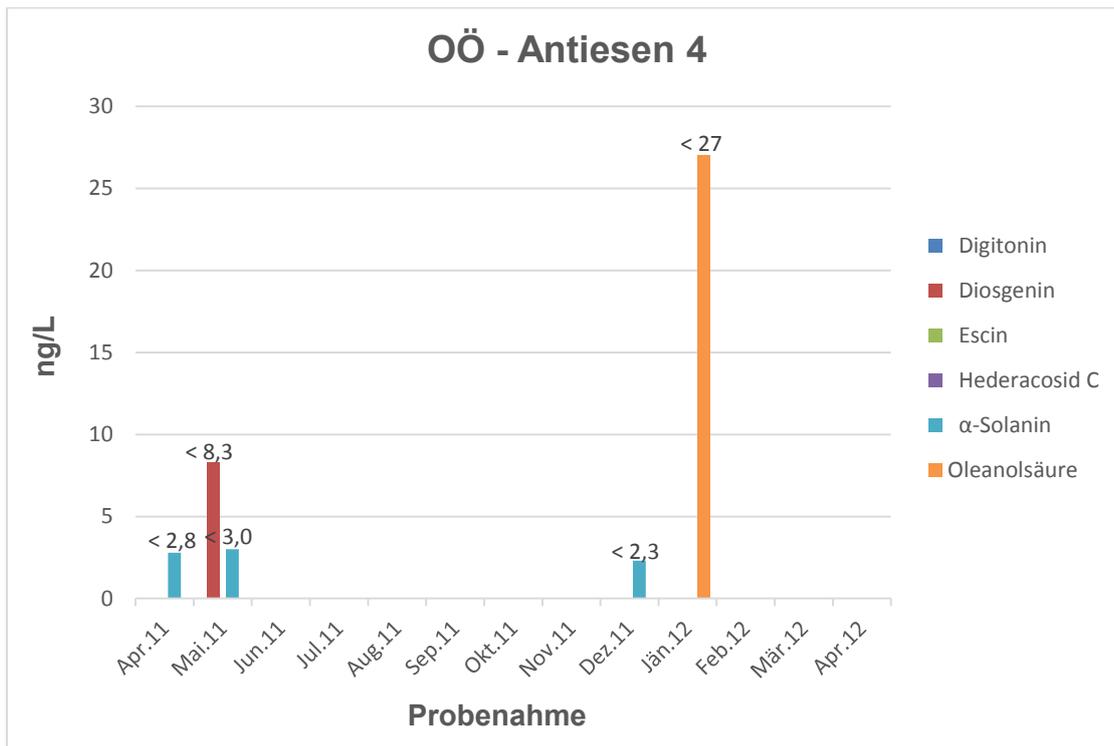


Abb. 62: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Ager 3 im Jahresverlauf

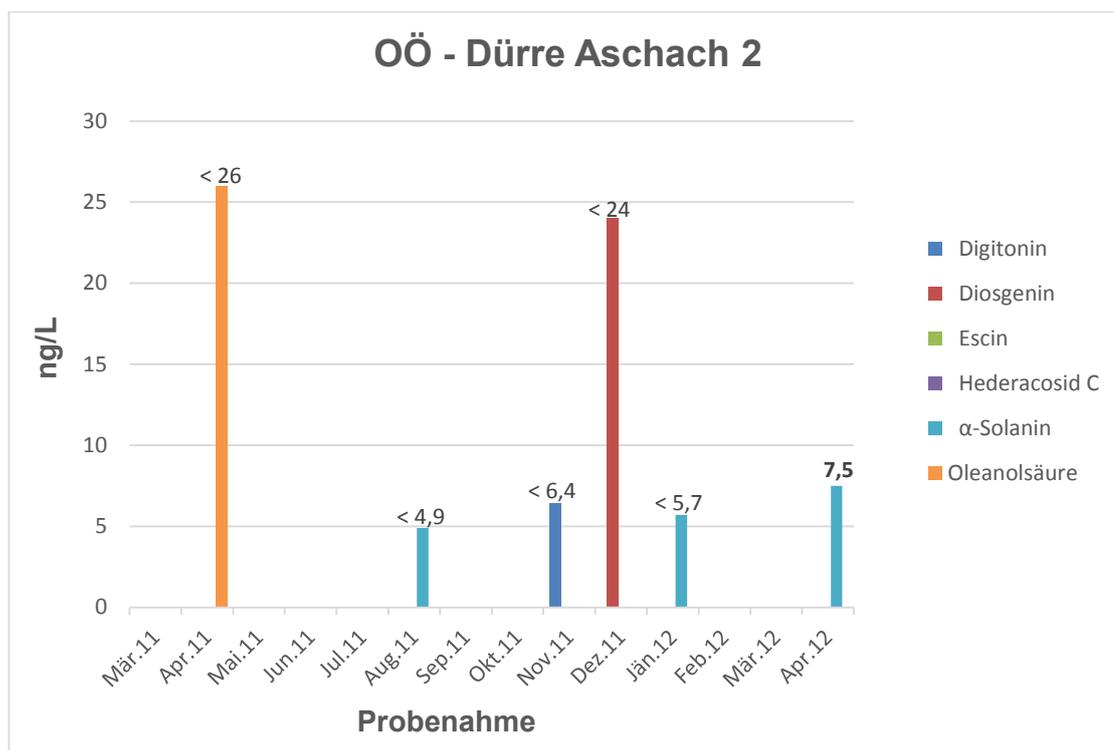
Bei der Messstelle OÖ – Antiesen 4 (Abb. 63) zeigt sich ein ähnliches Bild. Hier konnten ebenso im April und Mai 2011 bei den Saponinen  $\alpha$ -Solanin und Diosgenin Werte kleiner Bestimmungsgrenze gemessen werden. Des Weiteren findet man nach 6 Monaten auch im Dezember 2011 und im Jänner 2012 nicht quantifizierbare Konzentrationen ( $< BG$ ) bei den Saponinen  $\alpha$ -Solanin und der Oleanolsäure.



**Abb. 63: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Antiesen 4 im Jahresverlauf**

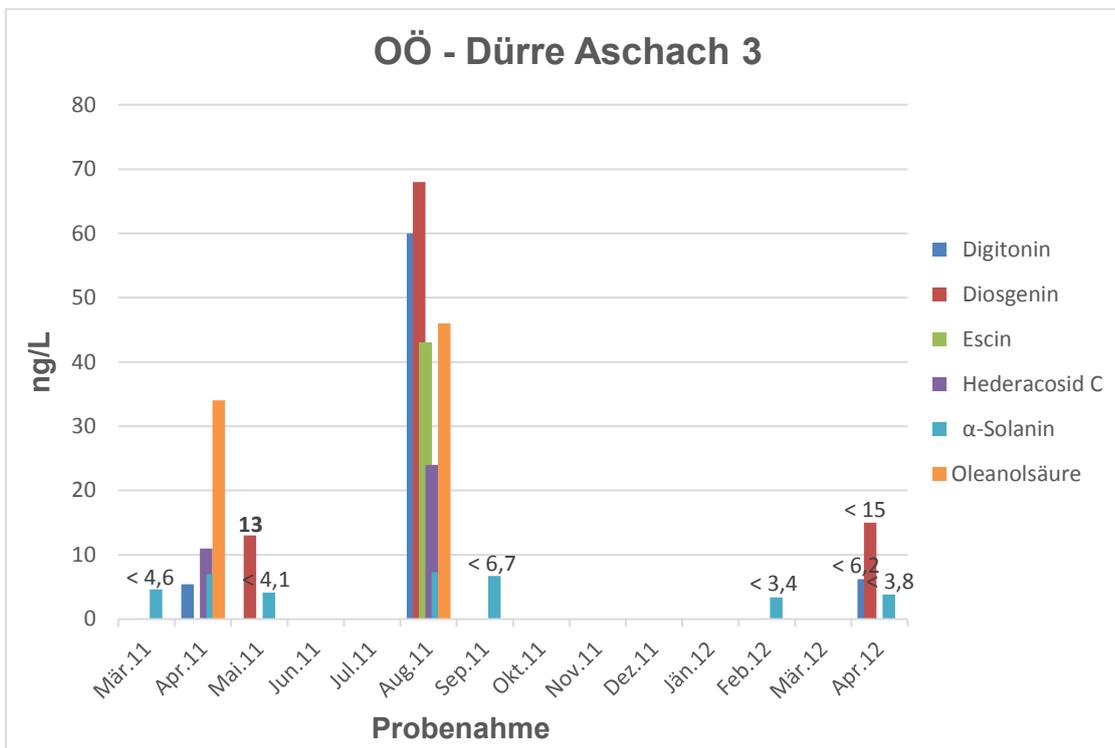
## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Auch bei der Immissionsmessstelle OÖ – Dürre Aschach 2 (Abb. 64) wurden im Jahresverlauf mehrere Saponine kleiner Bestimmungsgrenze nachgewiesen. 2011 im April die Oleanolsäure, im August  $\alpha$ -Solanin, im November Digitonin und im Dezember Diosgenin. Im Jahr 2012 wurde im Jänner ebenso  $\alpha$ -Solanin < BG und im April 2012 sogar positiv > BG mit einem Wert von 7,5 ng/L gemessen. Man kann auch hier wirkliches Muster erkennen.



**Abb. 64: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Dürre Aschach 2 im Jahresverlauf**

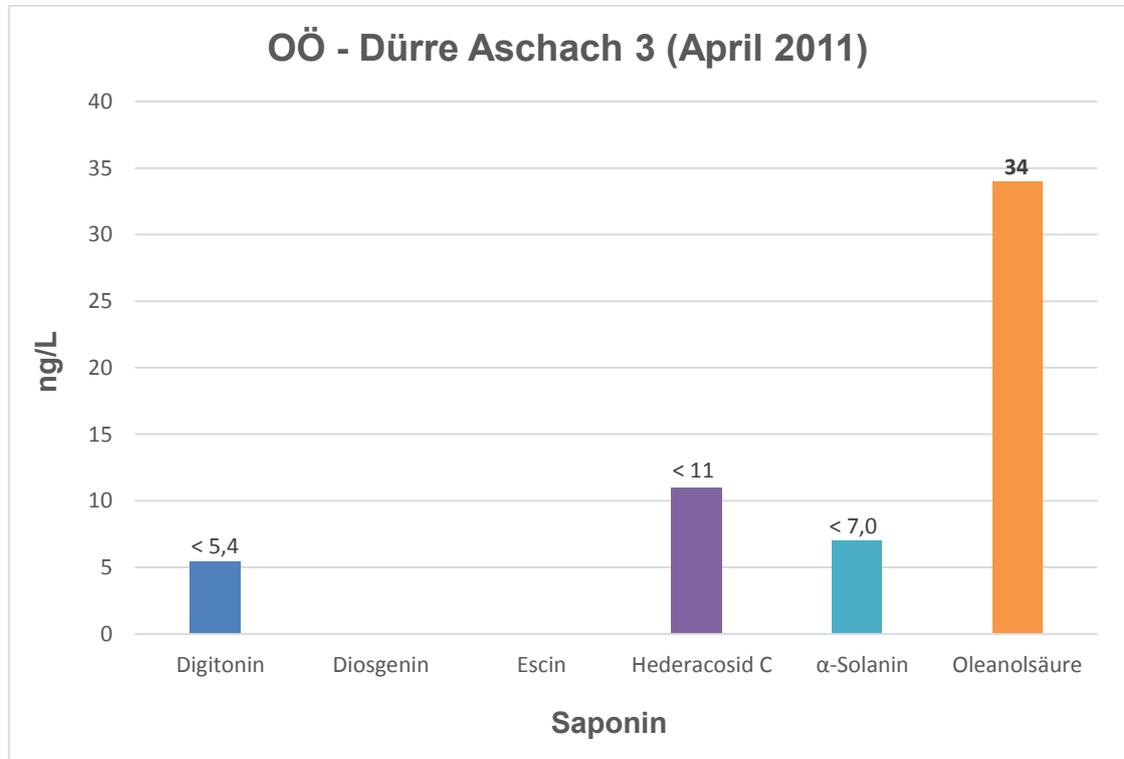
Bei der 2ten Messstelle der Dürren Aschach der OÖ – D. Aschach 3 (Abb. 65) konnten einige positive Werte nachgewiesen werden. Zur besseren Veranschaulichung wurde der April und August 2011 in separaten Grafiken (Abb. 65 und 66) darunter dargestellt. Es wurden positive Konzentrationen an verschiedenen Saponinen im April, Mai und im August 2011 detektiert. Alle anderen Messwerte waren wieder nicht nachweisbar oder kleiner als die Bestimmungsgrenze.



**Abb. 65: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Dürre Aschach 3 im Jahresverlauf**

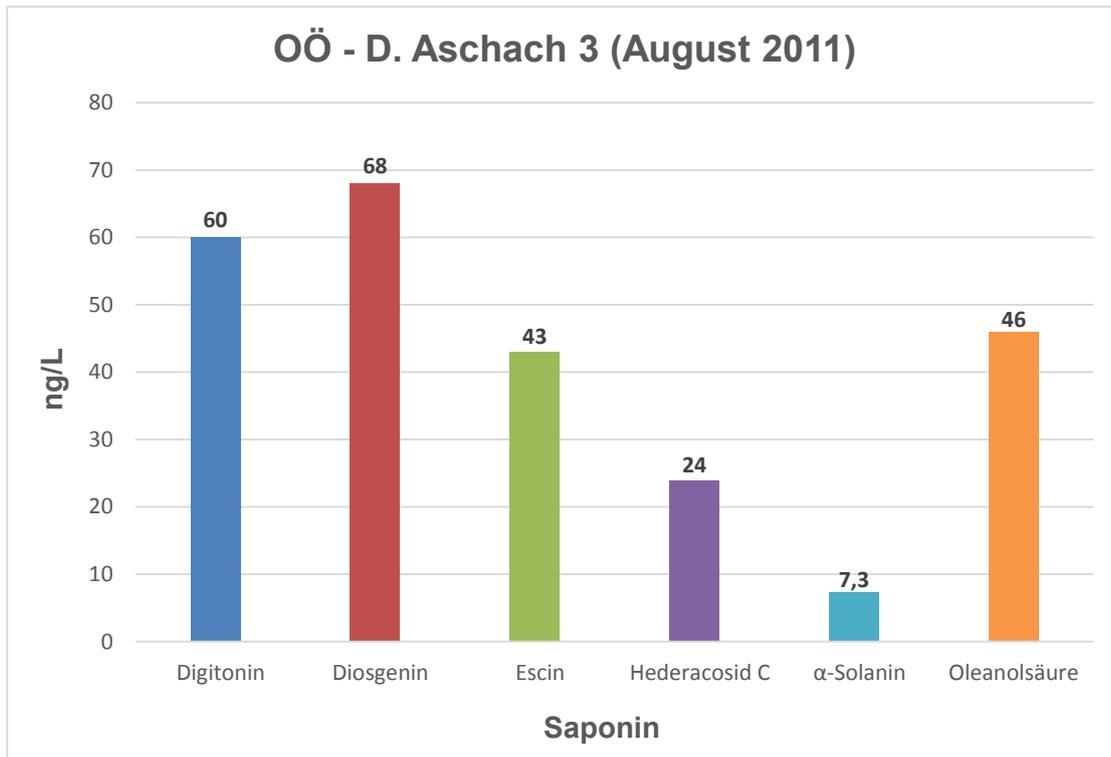
## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Im April 2011 (Abb. 66) konnten 4 Saponine erfasst werden, wobei Digitonin, Hederacosid C und  $\alpha$ -Solanin  $< BG$  waren und die Oleanolsäure mit 34 ng/L positiv und somit größer der Bestimmungsgrenze war.



**Abb. 66: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Dürre Aschach 3 im April 2011**

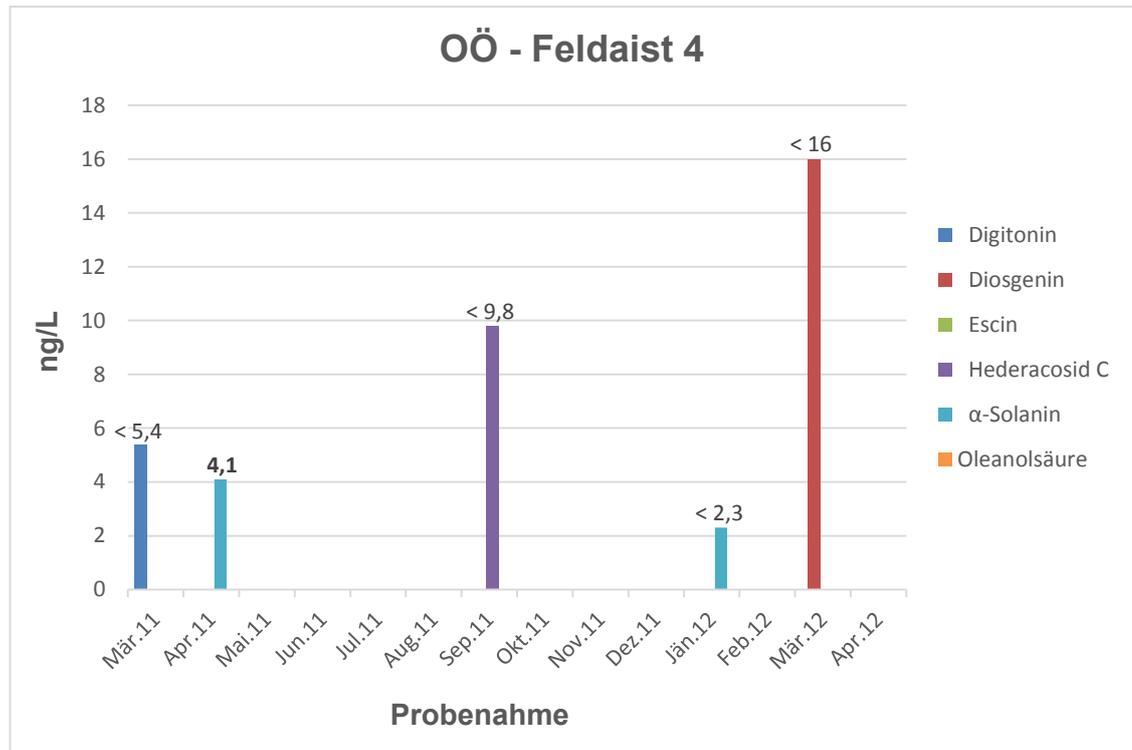
Auch 4 Monate später im August 2011 (Abb. 67) konnten diesmal alle Saponine positiv (> BG) nachgewiesen werden. Es waren 60 ng/L Digitonin, 68 ng/L Diosgenin, 43 ng/L Escin, 24 ng/L Hederacosid C, 7,3 ng/L  $\alpha$ -Solanin und 46 ng/L Oleanolsäure enthalten.



**Abb. 67: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Dürre Aschach 3 im August 2011**

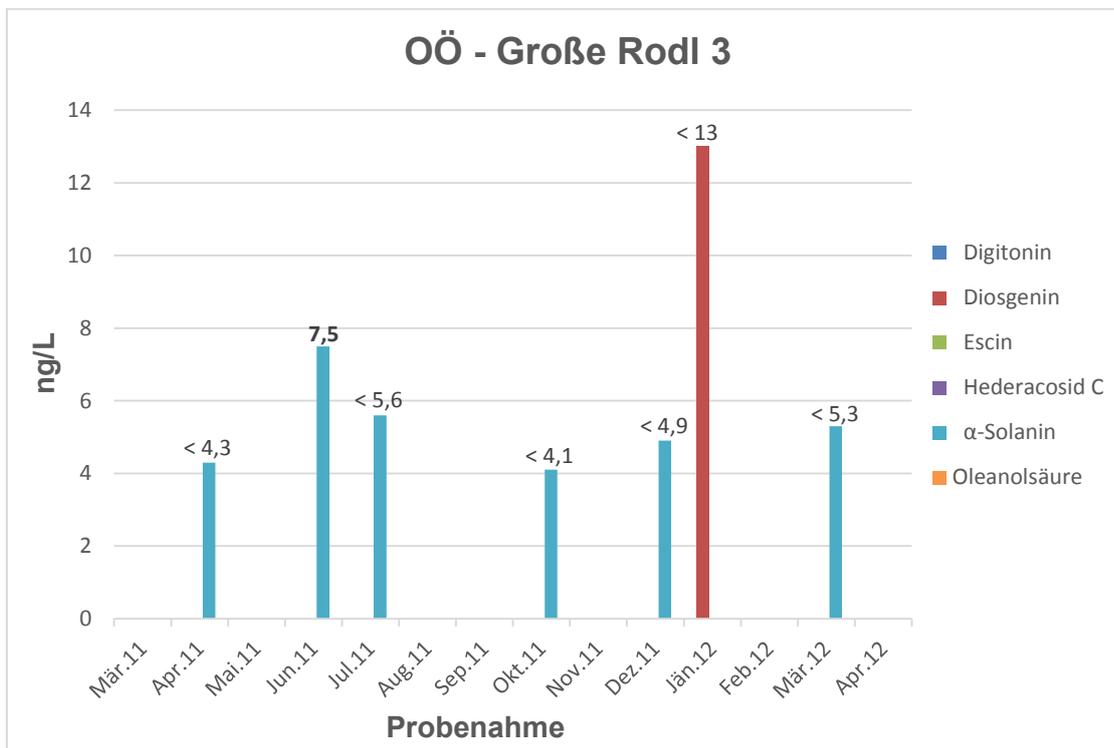
## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die nächste Messstelle in Oberösterreich war OÖ – Feldaist 4 (Abb. 68) hier wurden im Laufe der Jahresreihe mehrere Saponine als kleiner Bestimmungsgrenze und im April 2011 das  $\alpha$ -Solanin mit 4,1 ng/L als positiv nachgewiesen.



**Abb. 68: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Feldaist 4 im Jahresverlauf**

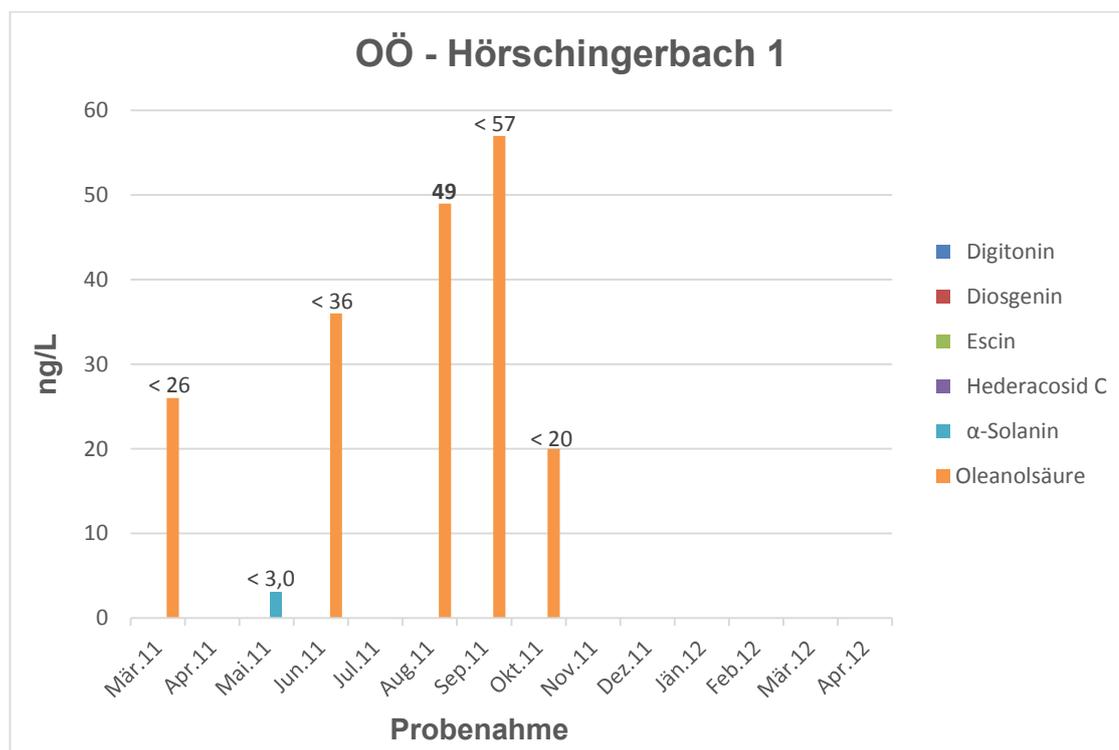
Abbildung 69 zeigt die Immissionsmessstelle OÖ – Große Rodl 3 im Jahresverlauf der Probenahme. Es ist ersichtlich, dass das Saponin  $\alpha$ -Solanin mehrmals zwischen April 2011 und März 2012 als kleiner Bestimmungsgrenze und einmal sogar positiv (Juni 2011: 7,5 ng/L) detektiert werden konnte. Es ist anzunehmen, dass irgendwo in der Nähe der Messstelle eine Eintragsquelle ist. Diese könnte ein Kartoffelacker oder eine Paradeiserkultur sein. Des Weiteren konnte Diosgenin im Jänner 2012 mit < BG erfasst werden.



**Abb. 69:** Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Große Rodl 3 im Jahresverlauf

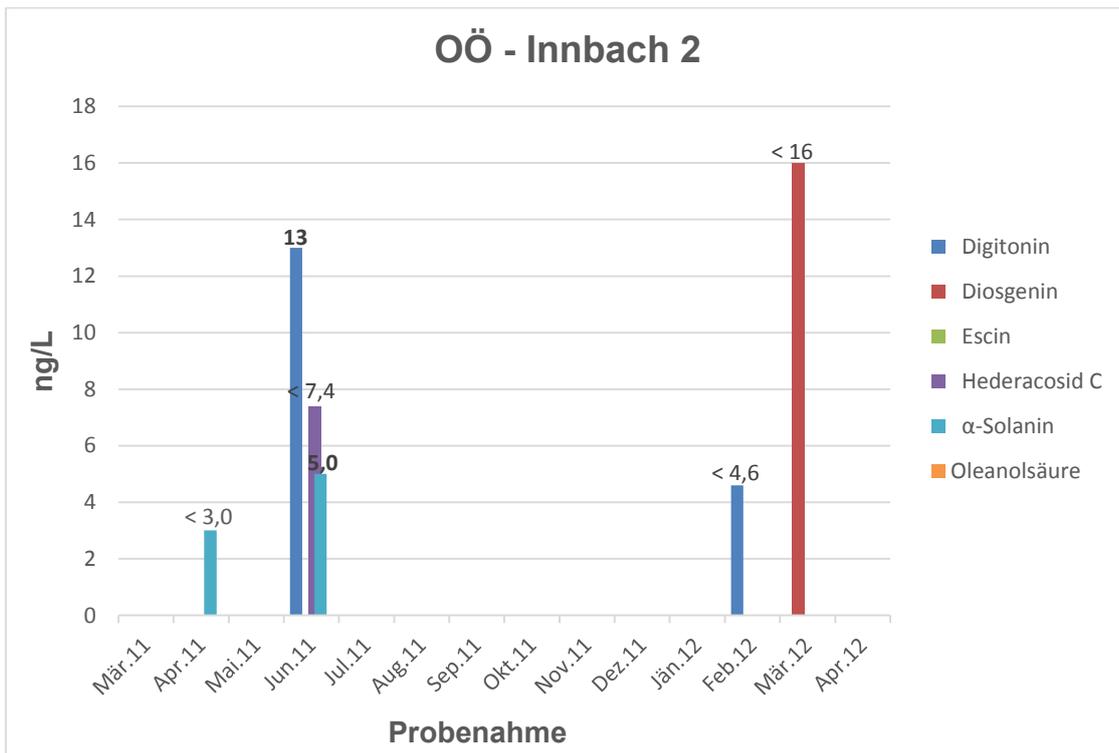
## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Im Jahresverlauf der Messstelle OÖ – Hörschingerbach 1 (Abb. 70) konnte die Oleanolsäure in den Monaten März bis Oktober 2011 des Öfteren unter Bestimmungsgrenze nachgewiesen werden. Im August 2011 wurde sogar eine positive Konzentration 49 ng/L detektiert. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass eine diffuse Eintragsquelle im Einzugsgebiet des Baches liegt. Zusätzlich wurde im Mai 2011 das  $\alpha$ -Solanin mit  $< BG$  erfasst.



**Abb. 70: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Hörschingerbach 1 im Jahresverlauf**

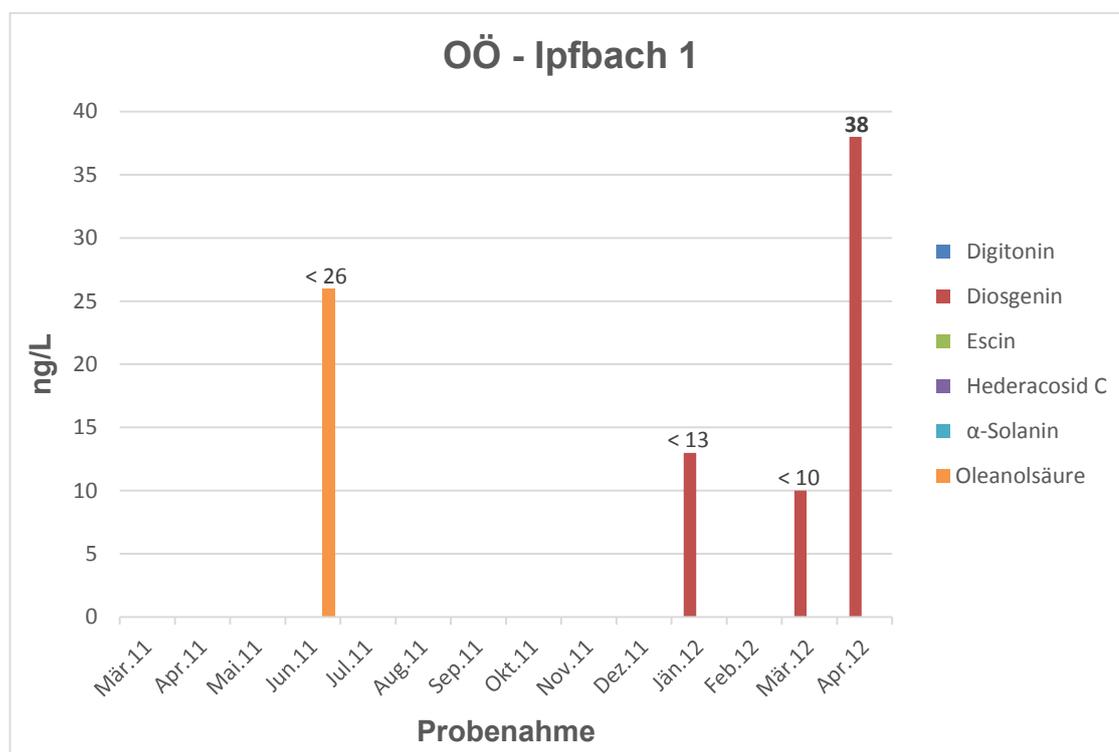
Abbildung 71 zeigt die Messstelle OÖ – Innbach 2 im Jahresverlauf. Das  $\alpha$ -Solanin wurde im April 2011 als < BG und im Juni 2011 positiv mit einer Konzentration von 5,0 ng/L nachgewiesen. Im Juni 2011 wurden weiters das Digitonin positiv mit 13 ng/L und das Hederacosid C mit kleiner Bestimmungsgrenze detektiert. Im Februar 2012 wurden die Saponine Digitonin und Diosgenin mit < BG erfasst.



**Abb. 71: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Innbach 2 im Jahresverlauf**

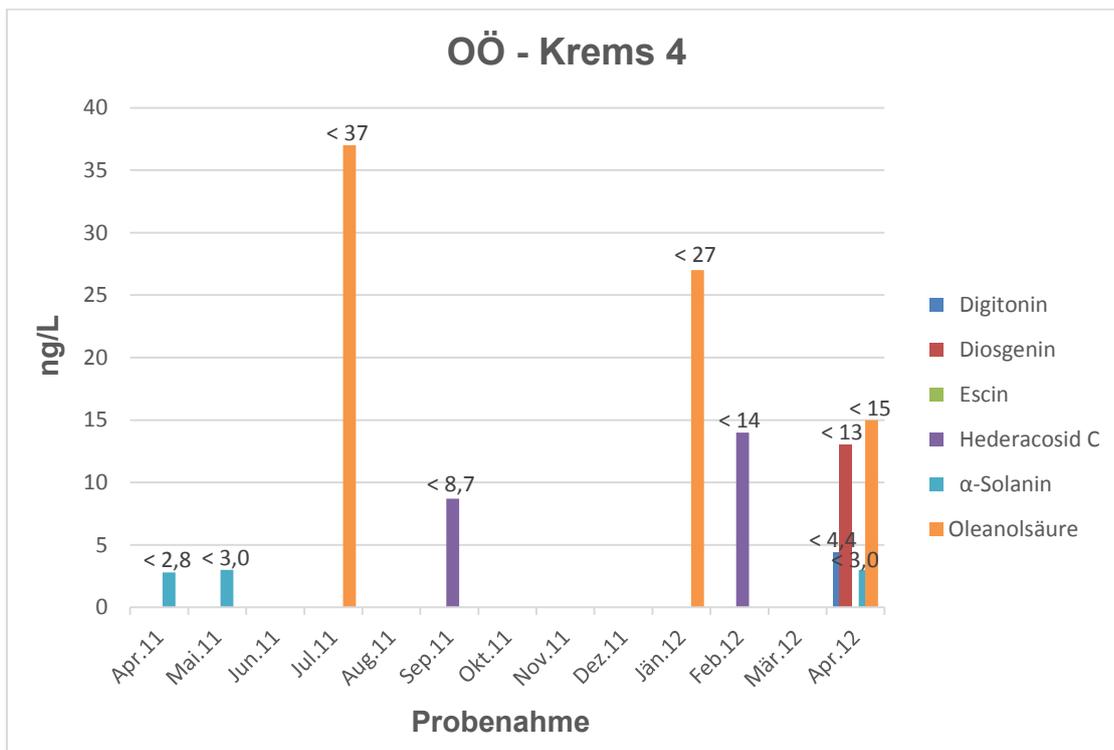
## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die nächsten Immissionsmessstelle in Oberösterreich OÖ – Ipfbach 1 (Abb. 72) zeigt, dass im Juni 2011 die Oleanolsäure unter der Bestimmungsgrenze nachgewiesen werden konnte. Das Saponin Diosgenin konnte im Zeitraum zwischen Jänner und April 2012 zweimal  $< BG$  und einmal positiv mit 38 ng/L detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt musste es zu einem Eintrag gekommen sein, welcher jedoch nicht jährlich beobachtet werden konnte da im Jahr 2011 kein Diosgenin gemessen wurde.



**Abb. 72: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Ipfbach 1 im Jahresverlauf**

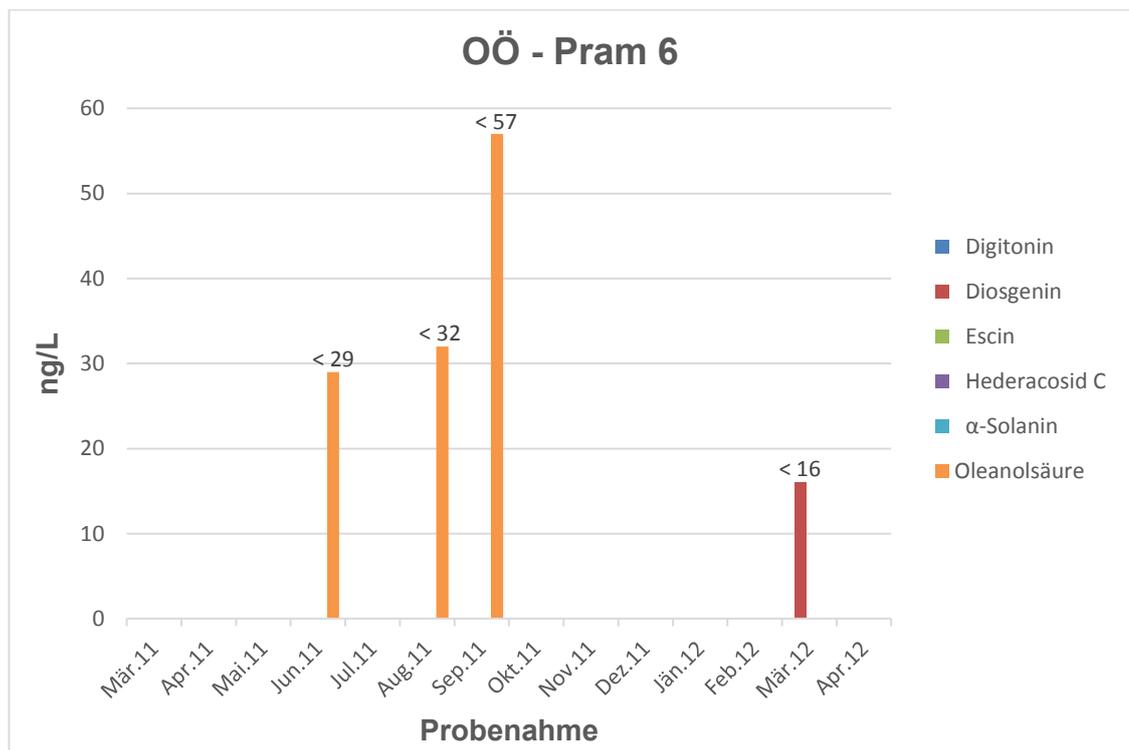
In der Abbildung 73 sind die LC-MS/MS-Ergebnisse der Messstelle OÖ – KREMS 4 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass alle erfassten Saponine im Jahresverlauf unter der Bestimmungsgrenze lagen und es keine positiven Ergebnisse gab. Das  $\alpha$ -Solanin wurde im Jahr 2011 im April und Mai sowie im Jahr 2012 im April nachgewiesen, dies deutet auf einen jahreszeitlichen Einfluss hin, da es in den restlichen Monaten der Jahresreihe nicht mehr detektiert wurde. Die Oleanolsäure wurde im Juli 2011 und im Jänner und April 2012 mit kleiner der Bestimmungsgrenze gemessen. Auch das Hederacosid C konnte zwei Mal im September 2011 und im Februar 2012 nachgewiesen werden. Im April 2012 waren 4 der 6 untersuchten Saponine mit  $< BG$  in der Probe enthalten.



**Abb. 73: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – KREMS 4 im Jahresverlauf**

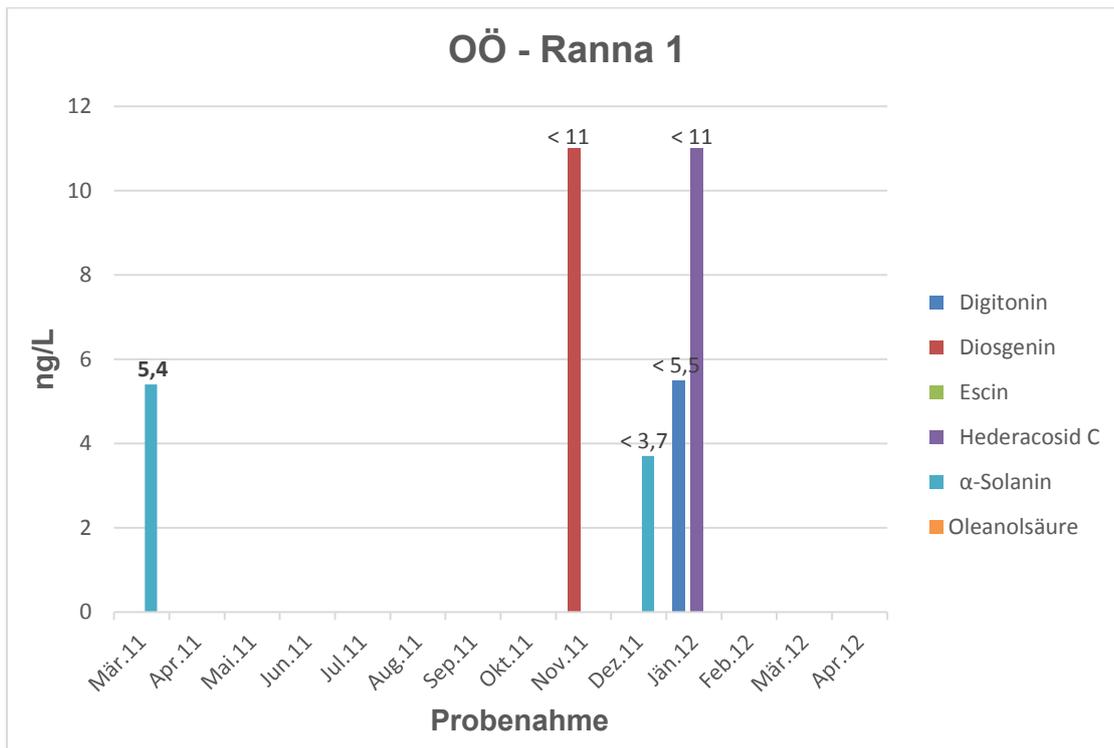
## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die nächste Immissionsmessstelle OÖ – Pram 6 (Abb. 74) zeigt, dass die Oleanolsäure zwischen Juni und September des Jahres 2011 jeweils mit < BG detektiert werden konnte. Es ist zu vermuten, dass diese in diesem Zeitraum durch Eintragsquellen, Abschwemmungen oder Flussbettbewuchs in die Pram gelangen. Im März 2012 konnte einmalig das Diosgenin mit einem Wert kleiner Bestimmungsgrenze gemessen werden.



**Abb. 74: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Pram 6 im Jahresverlauf**

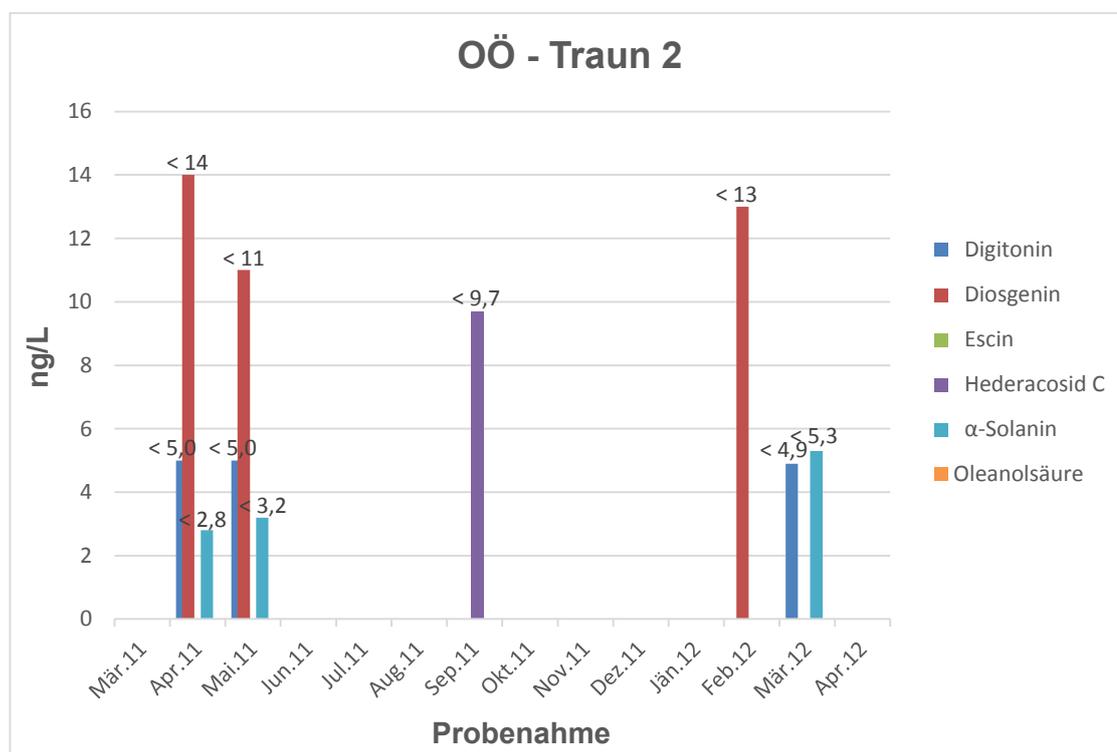
Abbildung 75 zeigt die nächste oberösterreichische Messstelle OÖ – Ranna 1 und es ist ersichtlich, dass die meisten Werte nicht nachweisbar (n.n. = 0) waren. Im März 2011 konnte das Saponin  $\alpha$ -Solanin positiv mit einem Wert von 5,4 ng/L detektiert werden. Im Zeitraum von November 2011 bis Jänner 2012 wurden vier Saponine (Diosgenin,  $\alpha$ -Solanin, Digitonin und Hederacosid C) mit Konzentrationen kleiner der Bestimmungsgrenze erfasst.



**Abb. 75: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Ranna 1 im Jahresverlauf**

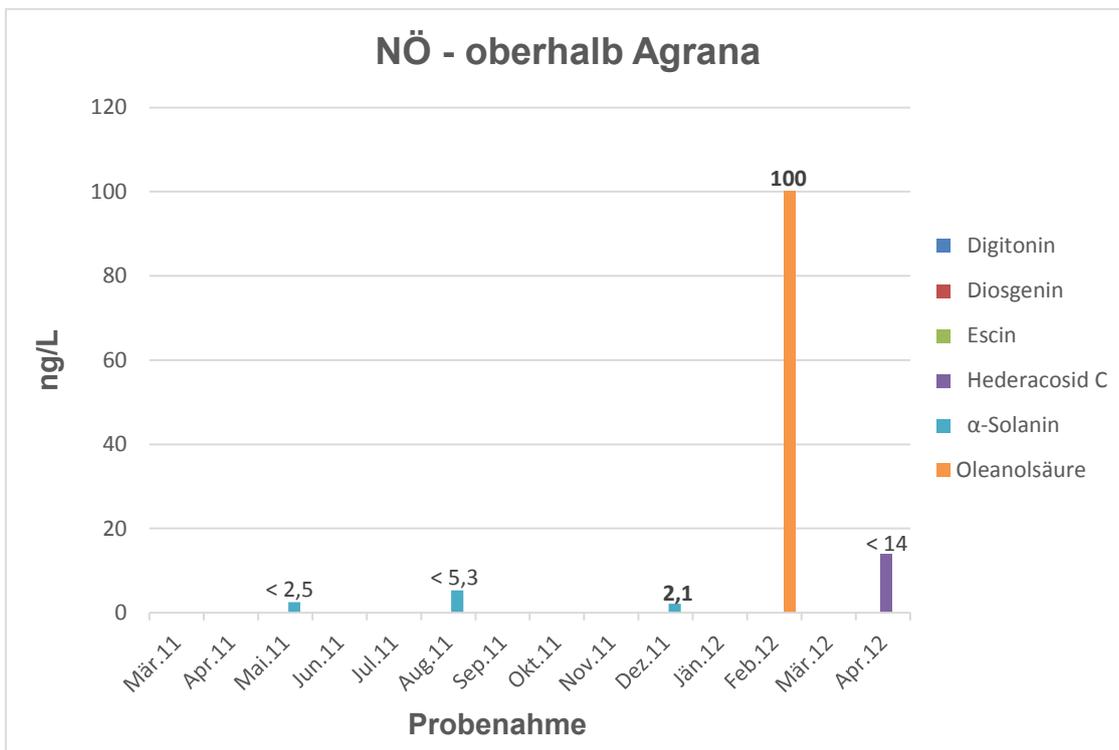
## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Ergebnisse der LC-MS/MS-Messungen der Messstelle OÖ – Traun 2 (Abb. 76) zeigen, dass immer in der ersten Jahreshälfte (April bis Mai 2011 und Februar bis März 2012) die Saponine Digitonin, Diosgenin und  $\alpha$ -Solanin mit Werten kleiner der Bestimmungsgrenze nachgewiesen werden können. Es ist sehr interessant, dass diese 3 Saponine in den besagten Proben vorhanden sind. Einzig das Hederacosid C wurde im September 2011 ebenfalls mit  $< BG$  detektiert.



**Abb. 76: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle OÖ – Traun 2 im Jahresverlauf**

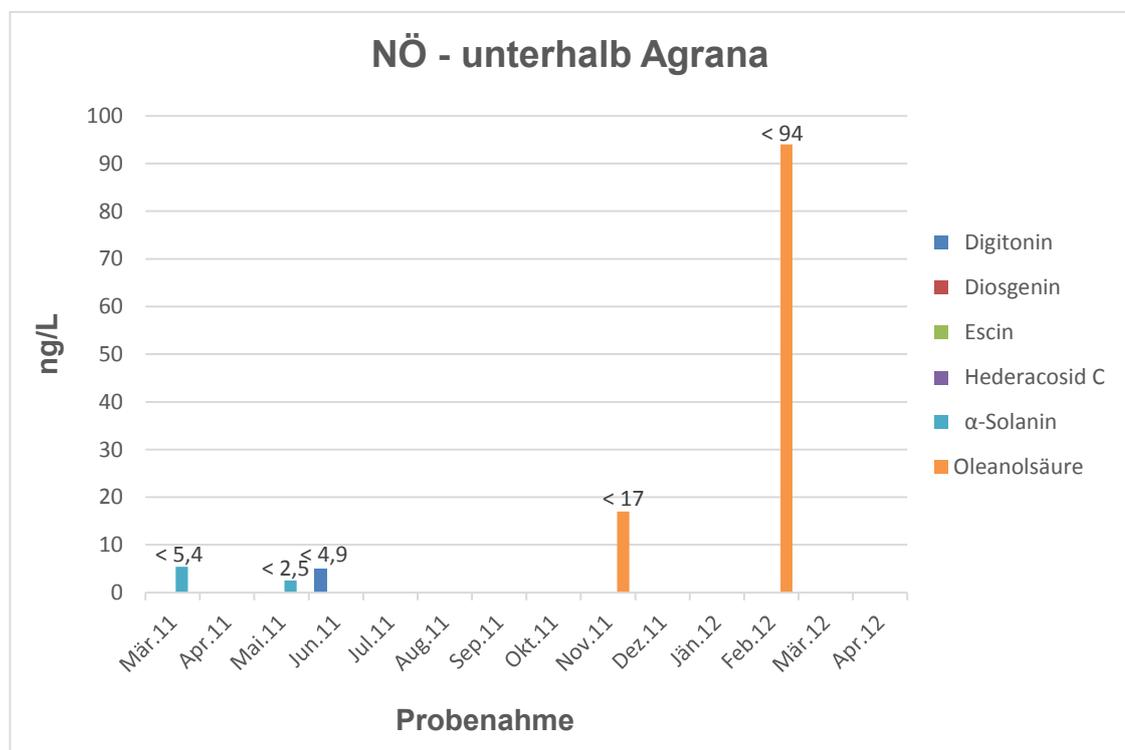
Abbildung 77 zeigt die Messstelle NÖ – oberhalb Agrana, wobei die Probe oberhalb der Agrana Zucker GmbH einem österreichischen Zuckerproduzenten im Rußbach genommen wurde. Im Mai und August 2011 wurde das  $\alpha$ -Solanin in den Proben mit kleiner Bestimmungsgrenze nachgewiesen und im Dezember 2011 sogar positive mit 2,1 ng/L. Des Weiteren wurde im Februar 2012 die Oleanolsäure mit 100 ng/L und im April 2012 das Hederacosid C als < BG detektiert.



**Abb. 77: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle NÖ – oberhalb Agrana im Jahresverlauf**

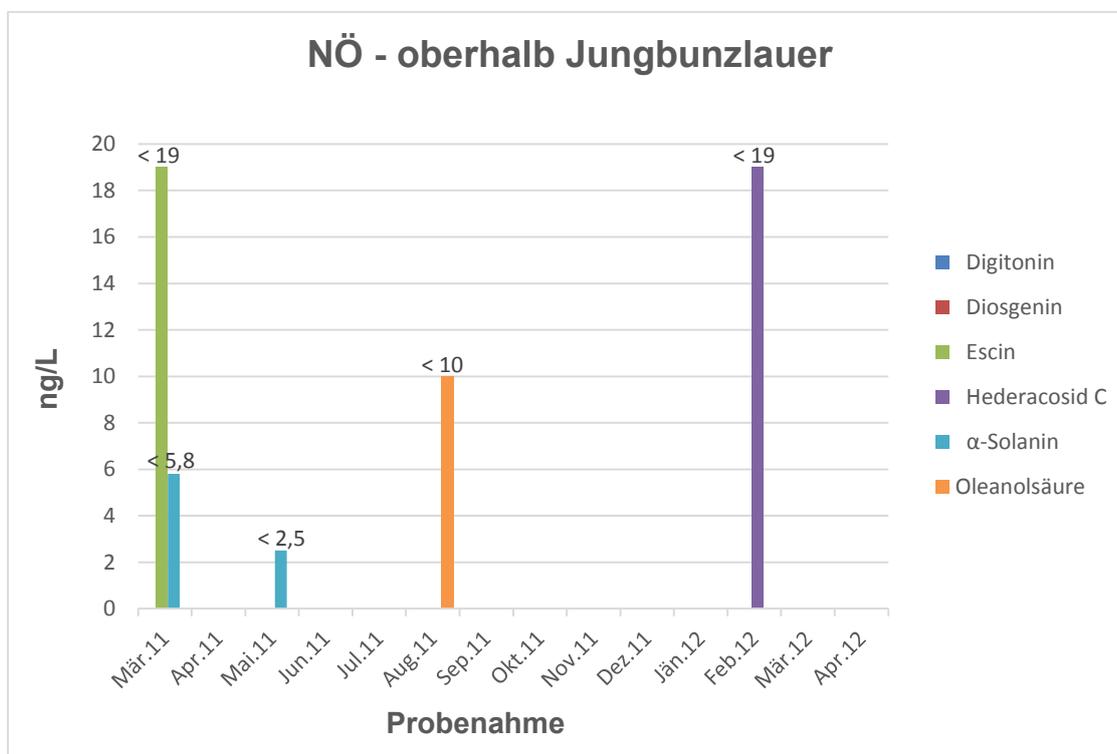
## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die zweite Messstelle im Rußbach, wurde unterhalb der Einleitung der Zuckerfabrik Agrana genommen und als NÖ – unterhalb Agrana (Abb. 78) bezeichnet. Auffällig war, dass analog zur Messstelle oberhalb der Zuckerfabrik im Mai 2011 ebenso  $\alpha$ -Solanin und im Februar 2012 Oleanolsäure mit Werten  $< BG$  in der Probe nachgewiesen werden konnten. Zusätzlich wurde das  $\alpha$ -Solanin noch im März 2011 und die Oleanolsäure im November 2011 detektiert. Des Weiteren wurde im Juni 2011 noch das Saponin Digitonin kleiner Bestimmungsgrenze erfasst.



**Abb. 78: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle NÖ – unterhalb Agrana im Jahresverlauf**

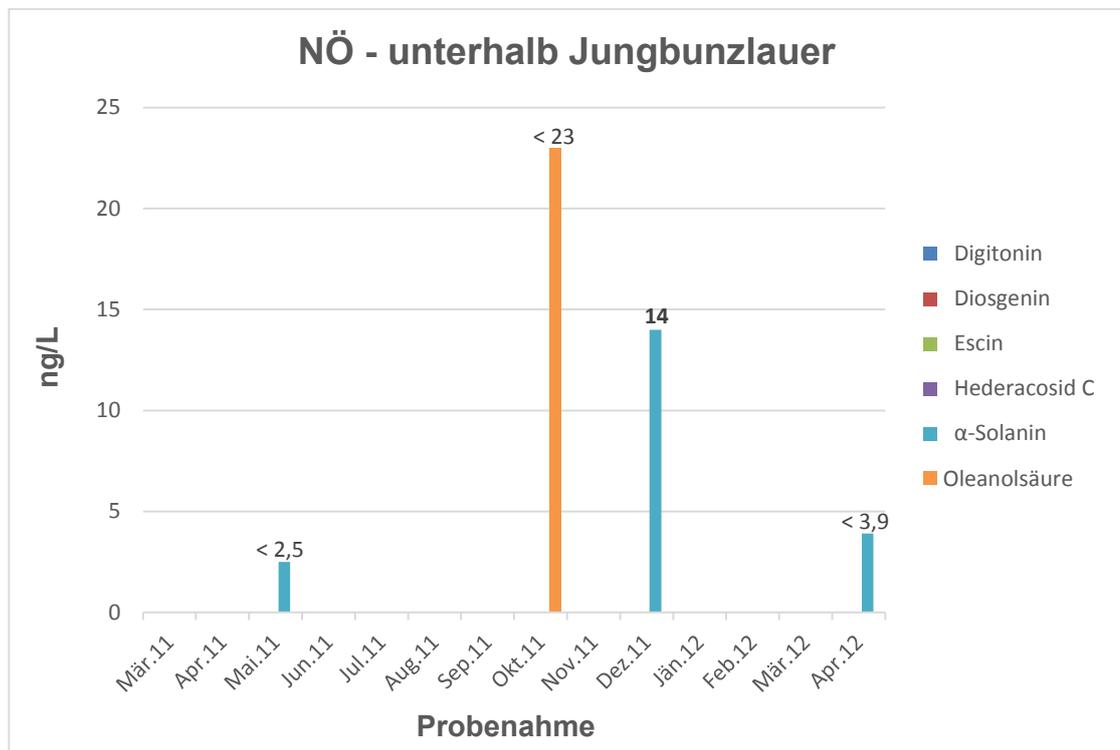
Die nächsten zwei niederösterreichischen Immissionsmessstellen wurden in der Pulkau oberhalb bzw. unterhalb der Jungbunzlauer Austria AG einem Produzenten der chemischen Industrie (Zitronensäure) genommen. Abbildung 79 zeigt die Messstelle NÖ – oberhalb Jungbunzlauer, wobei hier ersichtlich ist, dass die meisten Werte nicht nachweisbar und kleiner der Bestimmungsgrenze waren. Im März 2011 wurden Escin und  $\alpha$ -Solanin gemessen. Des Weiteren wurde das  $\alpha$ -Solanin noch im Mai 2011, die Oleanolsäure im August 2011 und das Hederacosid C im Februar 2012 nachgewiesen.



**Abb. 79: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle NÖ – oberhalb Jungbunzlauer im Jahresverlauf**

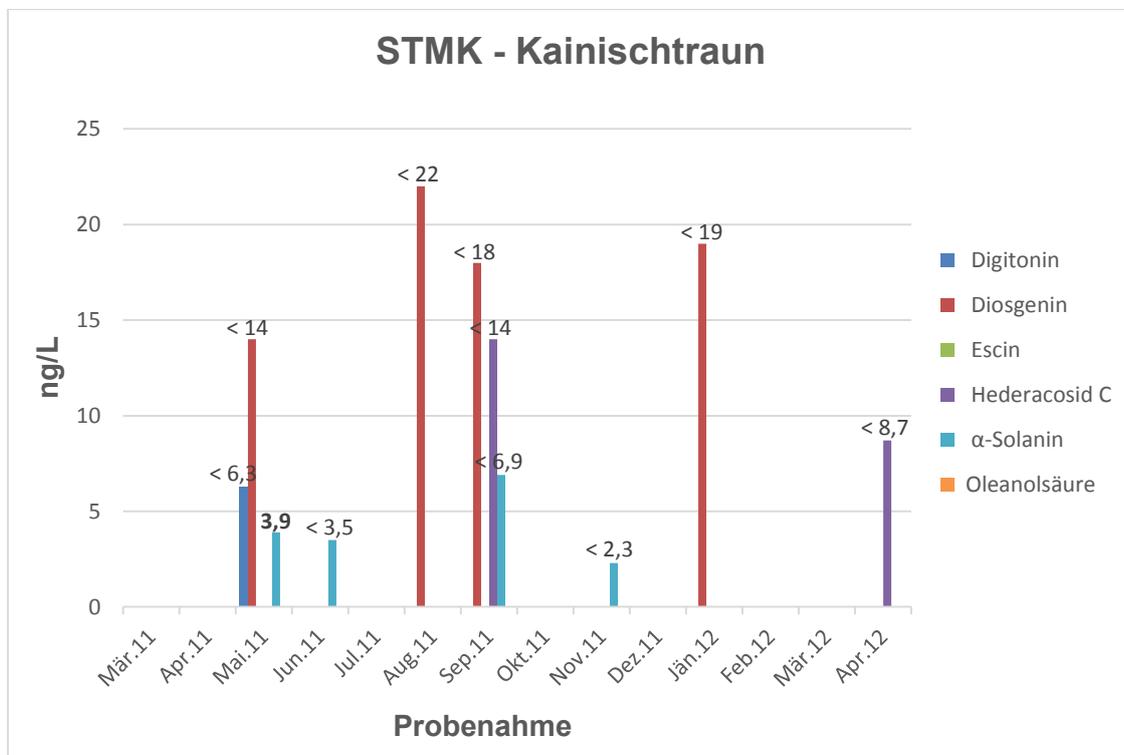
## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Vergleicht man die LC-MS/MS-Ergebnisse mit der nächsten Messstelle nämlich der NÖ – unterhalb Jungbunzlauer (Abb. 80) wurde im Mai 2011 ebenso das  $\alpha$ -Solanin < BG detektiert. Dieses Saponin wurde weiters im Dezember 2011 sogar positiv mit 14 ng/L und im April 2012 < BG nachgewiesen. Die Oleanolsäure konnte im Oktober 2011 in der Probe festgestellt werden. Dies stimmt zwar nicht mit der Messstelle NÖ – oberhalb Jungbunzlauer zusammen, da hier die OA bereits im August 2011 gemessen wurde.



**Abb. 80: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle NÖ – unterhalb Jungbunzlauer im Jahresverlauf**

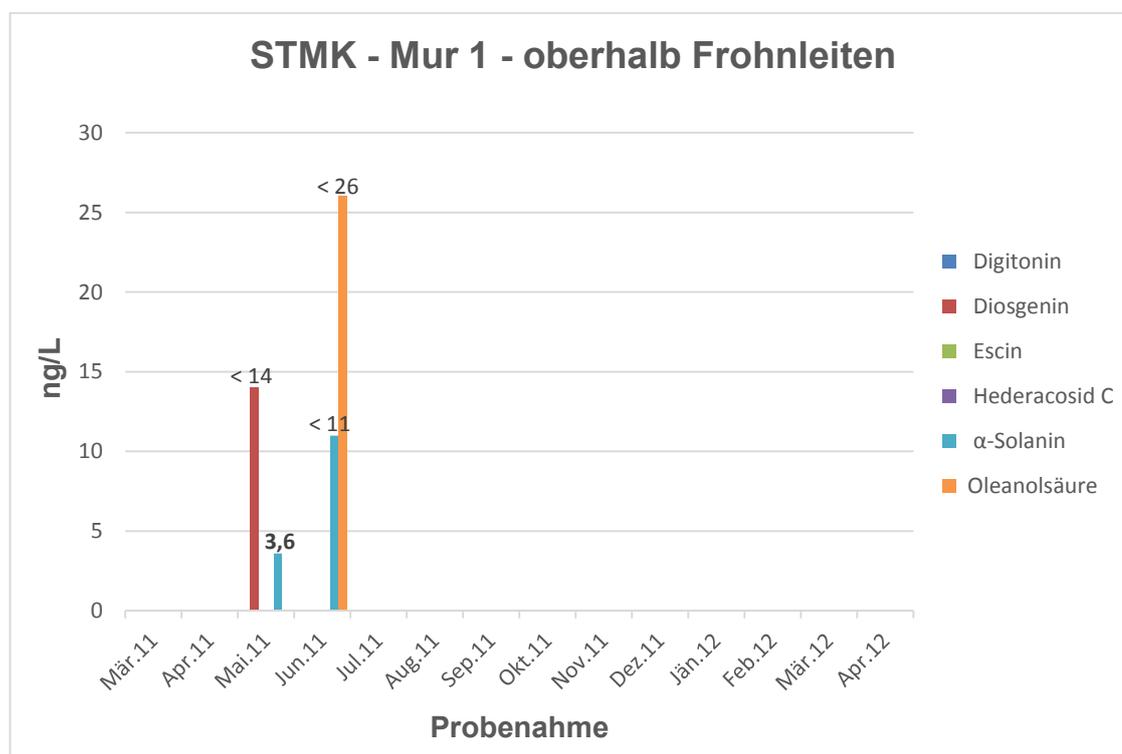
Die nächste Grafik (Abb. 81) zeigt die erste Messstelle in der Steiermark STMK – Kainischtraun. Der Großteil der Messwerte waren nicht nachweisbar, alle restlichen kleiner Bestimmungsgrenze und einzig das  $\alpha$ -Solanin im Mai 2011 mit 3,9 ng/L positiv. Das  $\alpha$ -Solanin wurde weiters im Juni, September und November 2011 detektiert. Ebenso wurde das Saponin Diosgenin im Jahresverlauf mehrmals nachgewiesen und zwar im Mai, August und September 2011 und im Jänner 2012. Vereinzelt wurde das Digitonin im Mai 2011 und das Hederacosid C im Mai 2011 und das Hederacosid C im September 2011 und im April 2012 mit Werten < BG erfasst.



**Abb. 81: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Kainischtraun im Jahresverlauf**

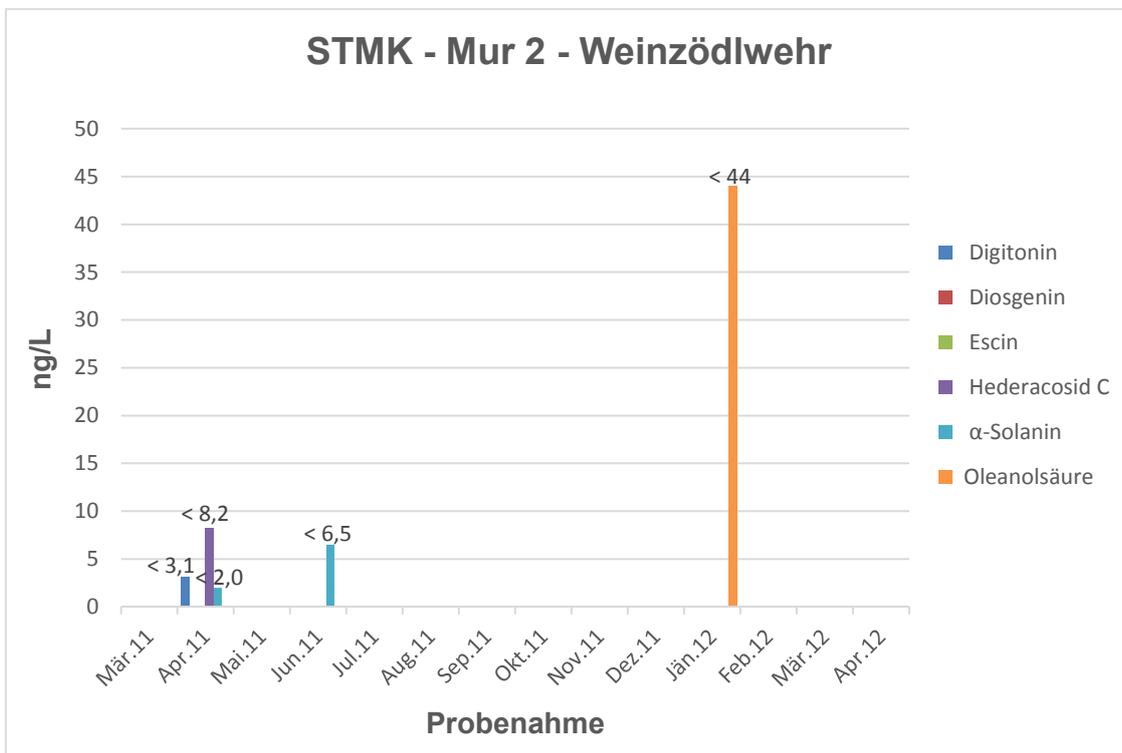
## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In der Steiermark wurde die Mur zweimal beprobt, einmal oberhalb der Papierfabrik Sappi und einmal unterhalb. Abbildung 82 zeigt die Messstelle STMK – Mur – oberhalb Frohnleiten. Es ist ersichtlich, dass nur im Mai und Juni 2011 Saponine in den Wasserproben nachgewiesen werden konnten. Im Mai das Diosgenin kleiner der Bestimmungsgrenze und das  $\alpha$ -Solanin mit 3,6 ng/L und im Juni  $\alpha$ -Solanin und Oleanolsäure < BG. Alle restlichen Saponine und Monate der Jahresreihe waren nicht nachweisbar.



**Abb. 82: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Mur 1 – oberhalb Frohnleiten im Jahresverlauf**

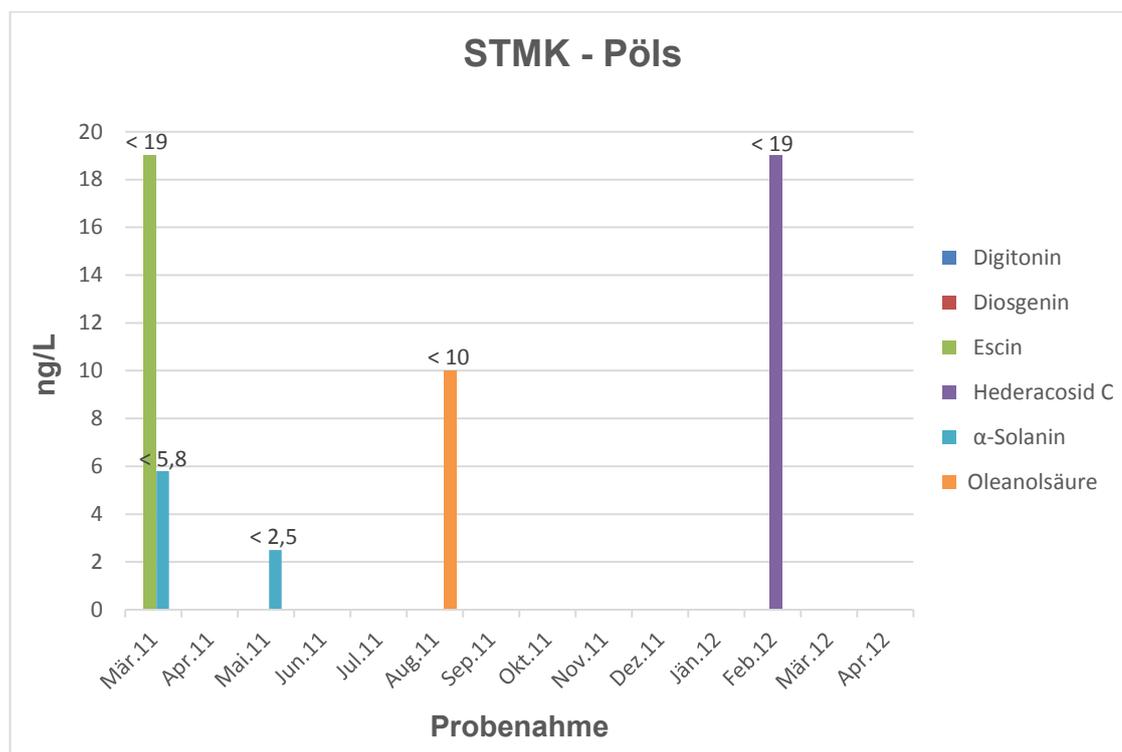
Ein ähnliches Bild zeigt die zweite Messstelle unterhalb der Papierindustrie als Einleiter STMK – Mur – Weinzödlwehr (Abb. 83). Hier wurde ebenso zu Beginn der Jahresreihe im Zeitraum zwischen April und Juni 2011 die Saponine Digitonin, Hederacosid C und  $\alpha$ -Solanin im April und das  $\alpha$ -Solanin im Juni kleiner als die Bestimmungsgrenze nachgewiesen und konnten daher nicht quantifiziert werden. Als einziger Unterschied ist hier die Oleanolsäure zu nehmen die mit  $< BG$  im Jänner 2012 detektiert wurde.



**Abb. 83: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Mur 2 - Weinzödlwehr im Jahresverlauf**

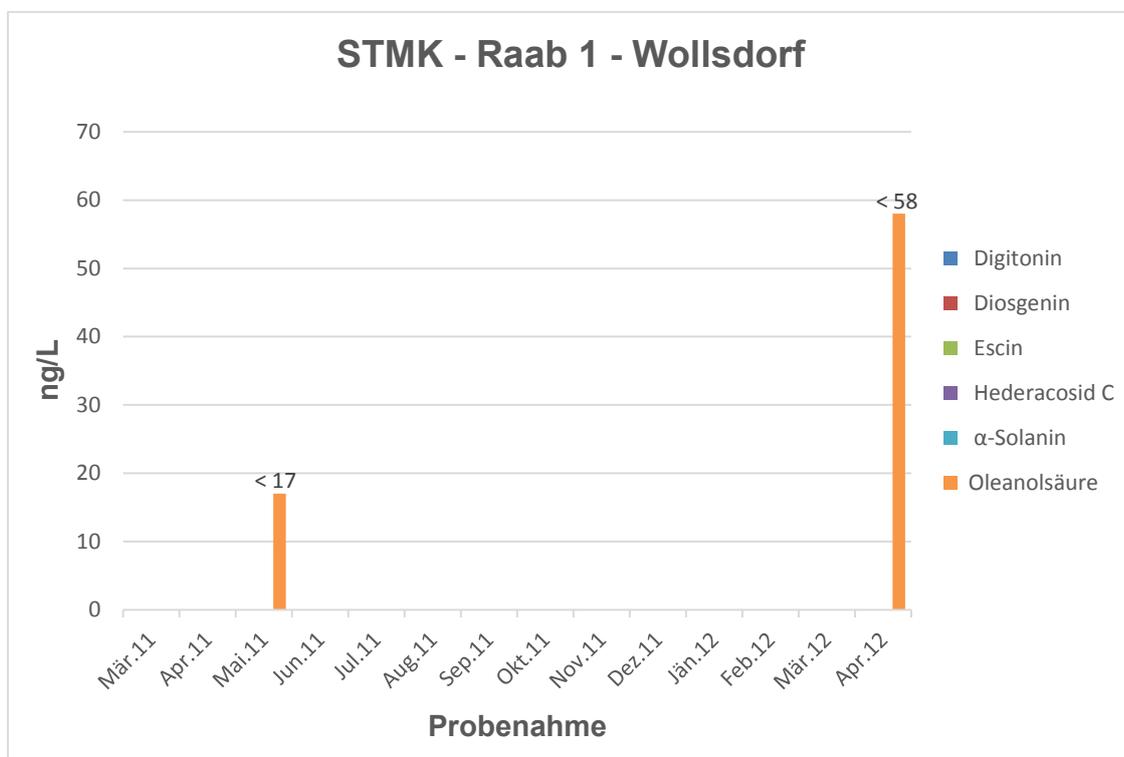
## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die LC-MS/MS-Ergebnisse der Messstelle STMK – Pöls (Abb. 84) zeigten, dass die meisten Saponine nicht nachweisbar waren und nur vereinzelt Konzentrationen kleiner Bestimmungsgrenze gemessen wurden. Im März 2011 das Escin und  $\alpha$ -Solanin, welches auch im Mai 2011 erfasst werden konnte. Die Oleanolsäure im August 2011 und das Hederacosid C im Februar nächsten Jahres.



**Abb. 84:** Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Pöls im Jahresverlauf

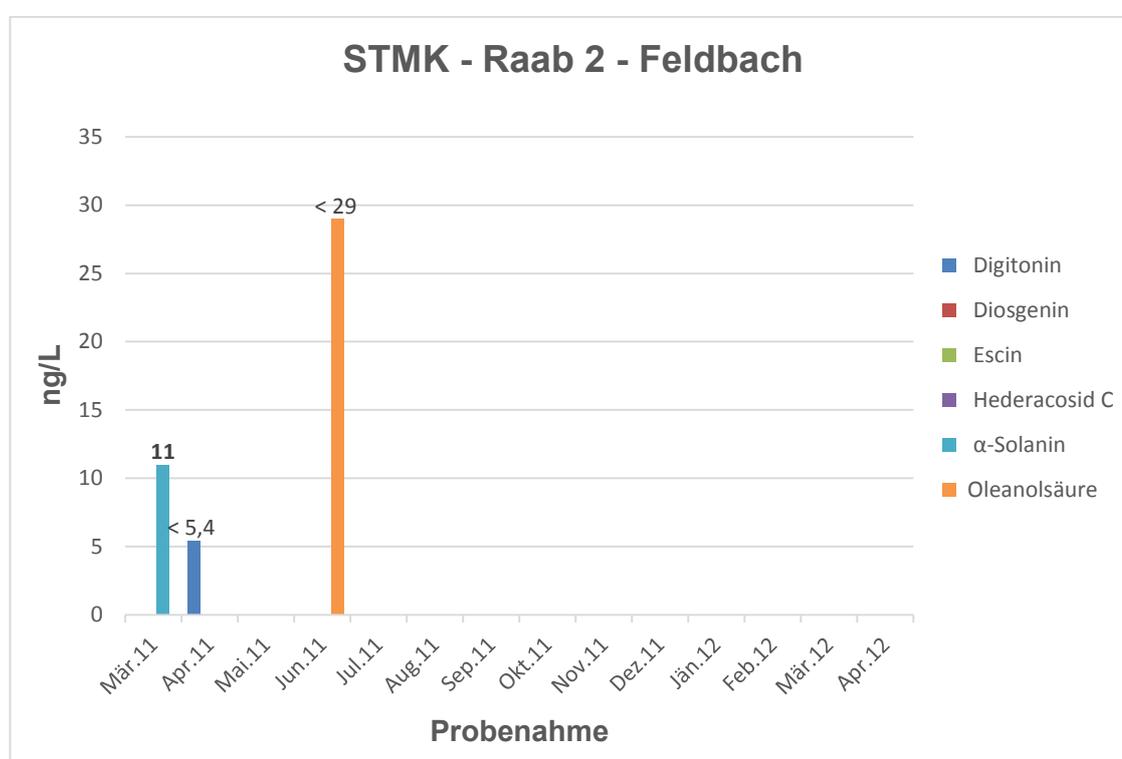
Die nächsten vier Grafiken (Abb. 85 bis 88) zeigen die Probenahmestellen entlang des Flussverlaufes der Raab in der Steiermark. Im Vergleich zu anderen österreichischen Messstellen waren hier verhältnismäßig viele Proben nicht nachweisbar, speziell in der Zeit Juli 2011 bis Februar 2012. Es konnte ebenfalls kein Zusammenhang der gemessenen Saponine im Verlauf des Flusses festgestellt werden. In Wollsdorf (Abb. 85) unterhalb der Lederfabrik Schmidt-Wollsdorf wurden im Mai 2011 und April 2012 die Oleanolsäure mit kleiner der Bestimmungsgrenze detektiert.



**Abb. 85: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Raab 1 - Wollsdorf im Jahresverlauf**

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In Feldbach (Abb. 86) oberhalb der Lederfabrik Boxmark mit Einleitung einer Kläranlage wurde zu Beginn der Messungen im März 2011 das  $\alpha$ -Solanin positiv mit 11 ng/L nachgewiesen. Im April das Digitonin und im Juni 2011 die Oleanolsäure mit < BG. Weiter Flussabwärts nach der Einleitung des Ledererzeugers Boxmark bei der Ertlermühle (Abb. 87) wurde nur das  $\alpha$ -Solanin < BG erfasst und in Hohenbrugg (Abb. 88) der letzten Stelle in der Steiermark vor dem Burgenland nur das Diosgenin ebenso mit einer nicht quantifizierbaren Konzentration.



**Abb. 86: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Raab 2 - Feldbach im Jahresverlauf**

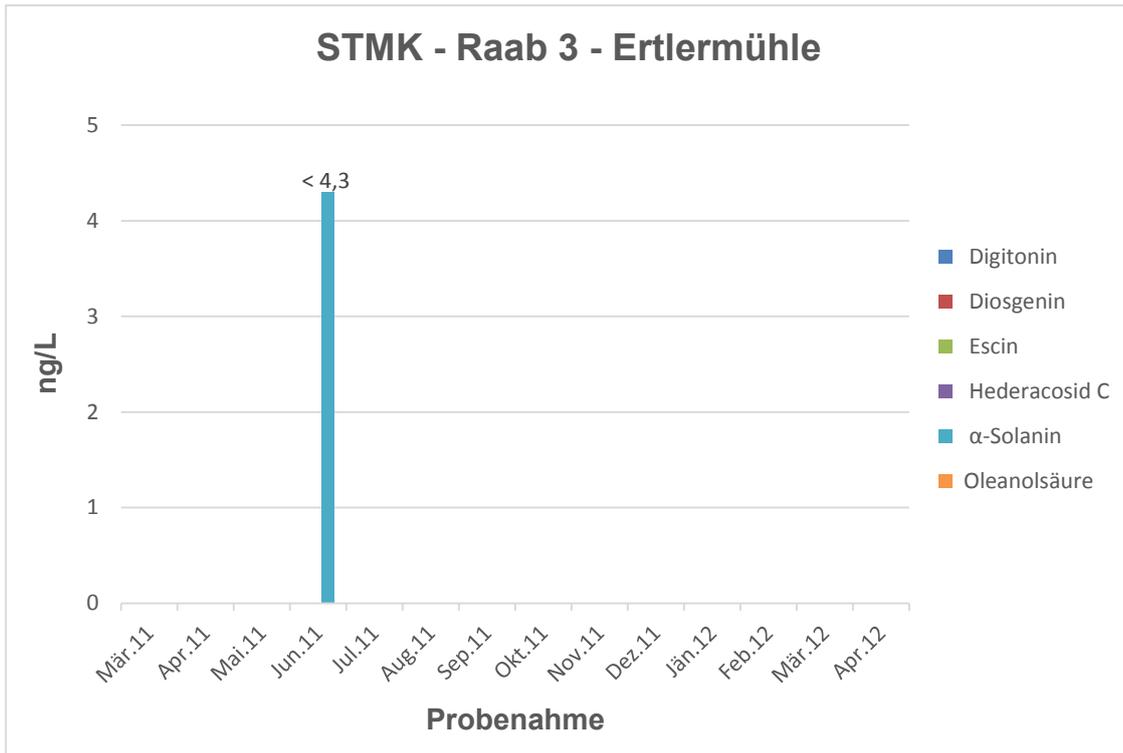


Abb. 87: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Raab 3 - Ertlermühle im Jahresverlauf

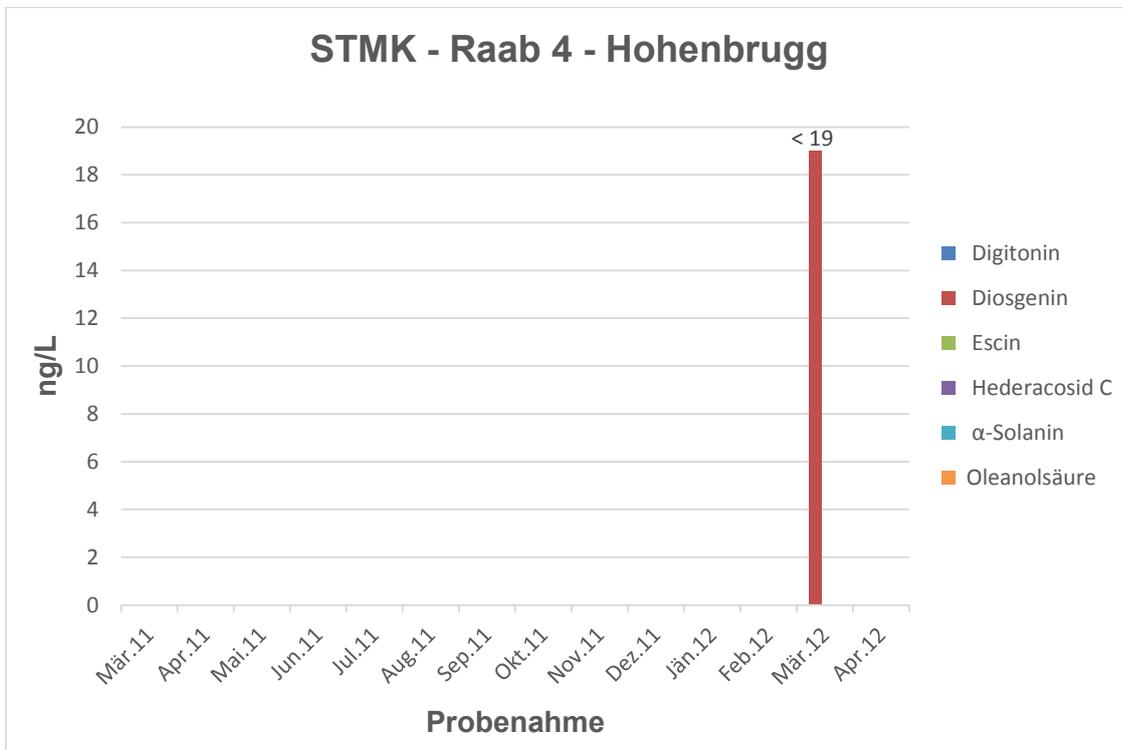
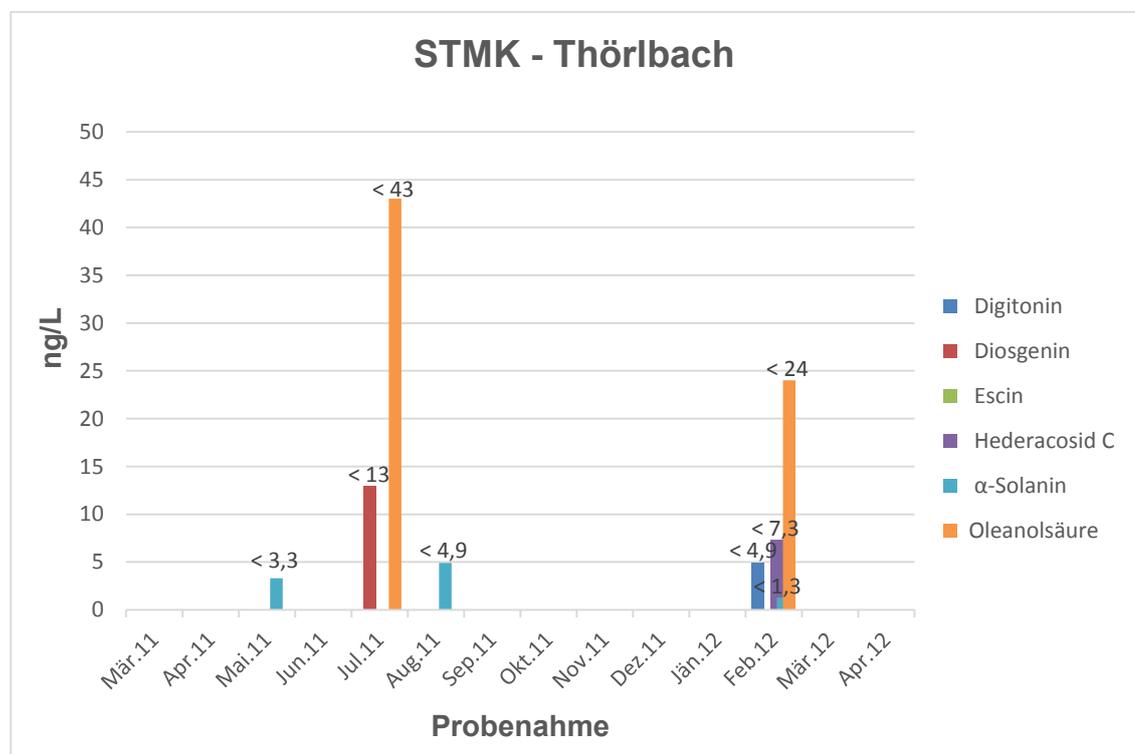


Abb. 88: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Raab 4 - Hohenbrugg im Jahresverlauf

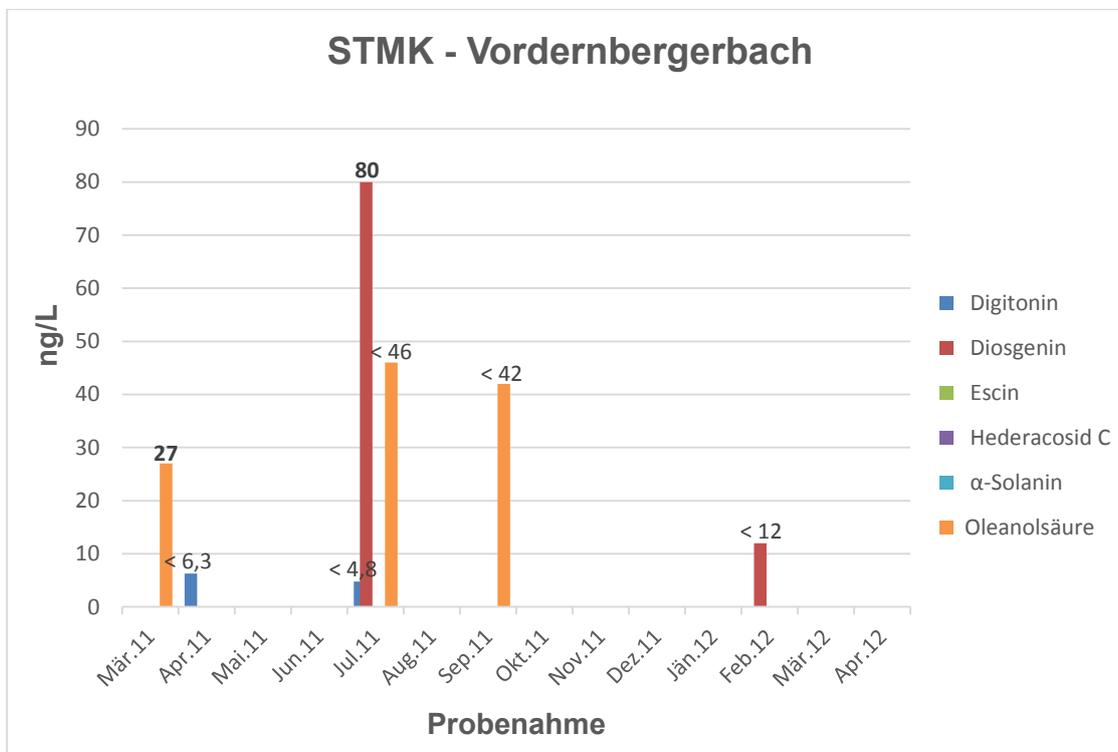
## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Abbildung 89 zeigt die Messstelle STMK – Thörlbach mit dem Einfluss der Stahlverarbeitenden Industrie (uh. Stahlwerk Böhler Uddeholm). Im Jahr 2011 der Probenahme konnte von Mai bis August zweimal  $\alpha$ -Solanin, einmal Diosgenin und einmal die Oleanolsäure jeweils unter der Bestimmungsgrenze erfasst werden. Ein halbes Jahr später im Februar 2012 konnten 4 der 6 untersuchten Saponine mit Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze detektiert werden, dazu zählen die Saponine Digitonin, Hederacosid C,  $\alpha$ -Solanin und die Oleanolsäure.



**Abb. 89: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Thörlbach im Jahresverlauf**

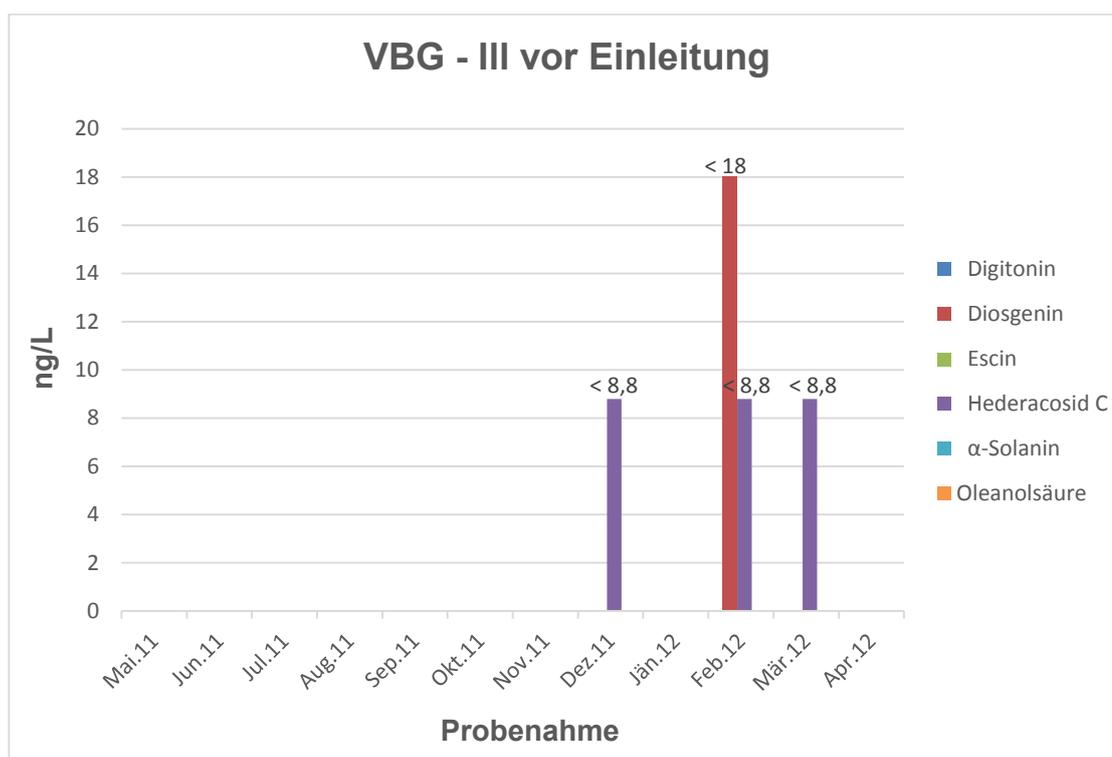
Die LC-MS/MS-Ergebnisse der Jahresreihe der Messstelle STMK – Vordernbergerbach (Abb. 90) zeigen, dass auch hier die meisten Saponine nicht nachweisbar waren. Die Oleanolsäure wurde im März 2011 mit 27 ng/L und im Juli und September 2011 kleiner Bestimmungsgrenze detektiert. Das Digitonin und das  $\alpha$ -Solanin wurden jeweils nur im April und Juli 2011 erfasst. Beim Diosgenin hingegen gab es im Juli 2011 ebenfalls einen positiven Messwert (80 ng/L) und es konnte auch im Februar 2012 nicht quantifizierbar nachgewiesen werden. Auch hier hatte die Metallverarbeitende Industrie keinen Einfluss auf die Saponingehalte im Wasser.



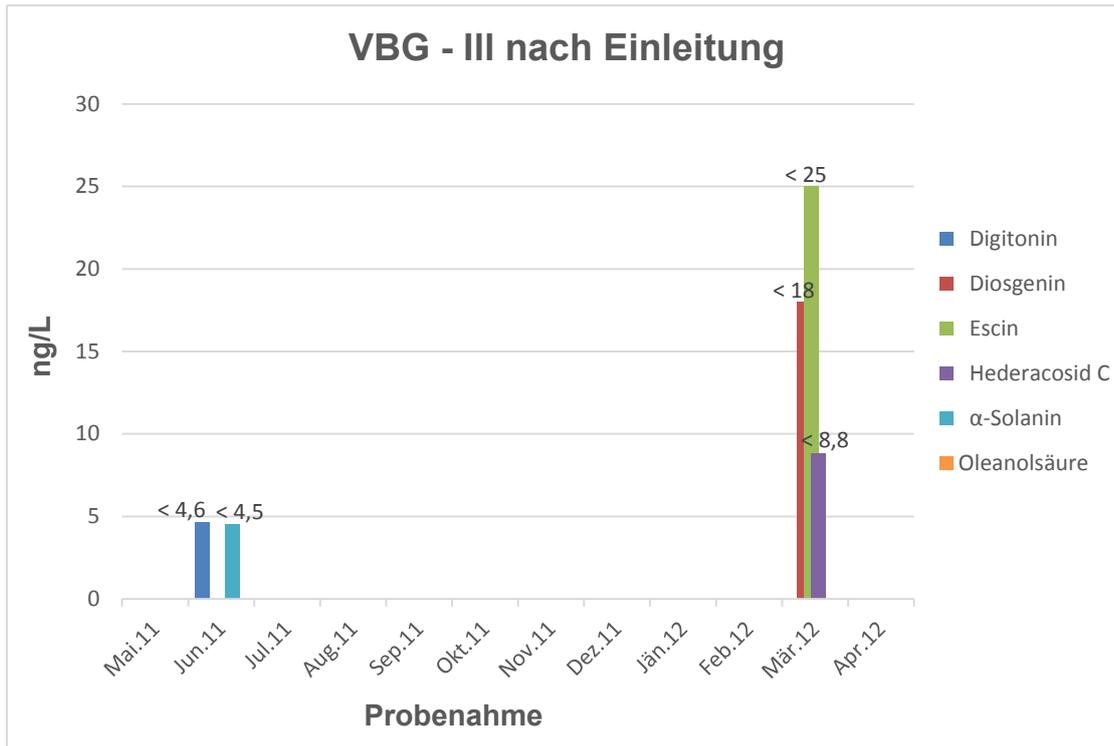
**Abb. 90: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle STMK – Vordernbergerbach im Jahresverlauf**

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Auch im Bundesland Vorarlberg wurden zwei Messstellen beprobt, vor der Kläranlage ARA Ludesch und einem Textilbetrieb und danach. Abbildung 91 zeigt die Messstelle VBG – III vor Einleitung und es ist ersichtlich, dass in den Monaten Mai bis November 2011 alle Saponine nicht nachweisbar waren. Im Dezember 2011, Februar und März 2012 konnte das Hederacosid C kleiner der Bestimmungsgrenze detektiert werden. Im Februar wurde zusätzlich das Diosgenin < BG gemessen. Im Gegensatz dazu konnte bei der Messstelle VBG – III nach Einleitung (Abb. 92) auch im Juni 2011 das Digitonin und  $\alpha$ -Solanin in nicht quantifizierbaren Konzentrationen erfasst werden. Erst 8 Monate später im März 2012 konnten wieder drei Saponine (Diosgenin, Escin und Hederacosid C) < BG detektiert werden.



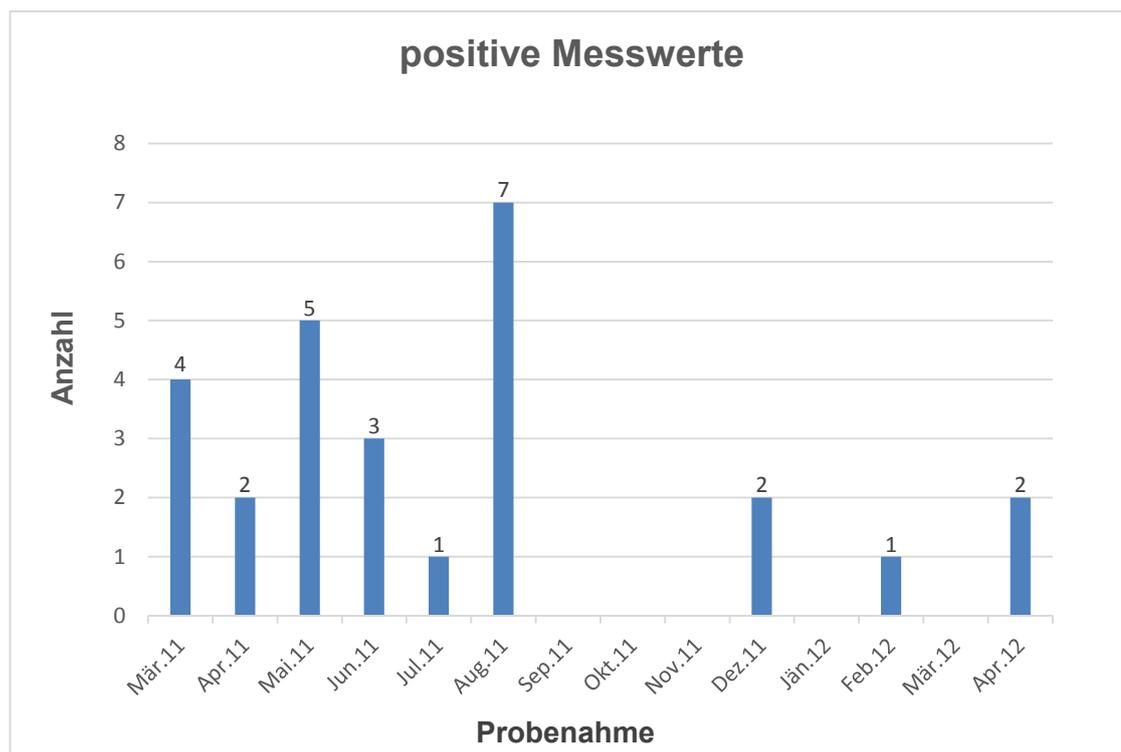
**Abb. 91: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle VBG - III vor Einleitung in die Kläranlage ARA Ludesch im Jahresverlauf**



**Abb. 92: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle VBG - III nach Einleitung in die Kläranlage ARA Ludesch im Jahresverlauf**

Bei den LC-MS/MS-Ergebnissen der sechs ausgewählten Saponine über einen Zeitraum von einem Jahr (März 2011 bis April 2012) konnten bei den Oberflächengewässern inkl. der beiden Hintergrundmessstellen nur vereinzelt positive Konzentrationen nachgewiesen werden. Die meisten Ergebnisse waren nicht nachweisbar oder lagen unter der Bestimmungsgrenze. Abbildung 93 zeigt die Anzahl aller positiven Messwerte der sechs mittels LC-MS/MS gemessenen Saponine im Jahresverlauf der Probenahme von insgesamt 31 Messstellen (2 Hintergrundmessstellen OÖ und W, 13 OÖ, 10 STMK, 4 NÖ und 2 VBG).

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION



**Abb. 93: Die Anzahl der positiven Messwerte aller Hintergrund- und Oberflächengewässermessstellen der 6 untersuchten Saponine im Jahresverlauf**

Es ist ersichtlich, dass zu Beginn der Probenahme zwischen März und August 2011 die meisten positiven Konzentrationen gemessen wurden, die nächsten drei Monate wurden dann nur mehr Werte  $<$  BG oder als nicht nachweisbar erfasst. Erst Ende des Jahres und zu Beginn des Jahres 2012 konnten wieder vereinzelt positive Ergebnisse detektiert werden. Im Großen und Ganzen wurden jedoch in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu WEGNER, 2001 der seine Dissertation über „*Ranunculus fluitans* Lamk. und Rheinflallschaum – Zusammenhänge, Analytik und ökotoxikologische Bedeutung“ verfasste weit geringere Konzentrationen gemessen. WEGNER, 2001 untersuchte die Saponine Hederagenin und Oleanolsäure mittels LC-MS/MS in den Jahren 1998 und 2000 im Rheinwasser und detektierte 1998 Höchstkonzentrationen von 1600 ng/L und im Jahr 2000 geringere Werte bis zu 500 ng/L, was darauf zurückzuführen war, dass es zu Verdünnungseffekten kam, da die Wasserführung des Rheins im Jahr 2000 deutlich höher war als 1998. Der *Ranunculus fluitans* (Flutende Wasserhahnenfuß) ist eine saponinhaltige Wasserpflanze, welche in schnell strömenden Flüssen und Bächen wächst und

speziell zur Blütezeit oder durch Schäden an der Pflanze diese Inhaltsstoffe ins Wasser abgeben und dadurch große Schaummassen in den Gewässern hervorrufen können (Abb. 94).



**Abb. 94: *Ranunculus fluitans* als Wasserpflanze im Rhein und der dadurch verursachte Schaum am Rheinflall bei Schaffhausen in der Schweiz  
(Quelle: [www.schmitzens-botanikseite.de](http://www.schmitzens-botanikseite.de) & [www.ibm.v.com](http://www.ibm.v.com))**

Es konnte 1998 herausgefunden werden, dass die gemessene maximale Saponinkonzentration im Rheinwasser mit der zeitlichen Entwicklung der Biomasse (max. 100 Tonnen) des Flutenden Hahnenfußes im Fluss korreliert. Bei der Biomasse handelt es sich um das „Geschwemmsel“, welches sich an den Kraftwerksrechen sammelte. Auch die Abflussraten waren über das ganze Jahr relativ konstant zwischen 200 und 400 m<sup>3</sup>/s und es kam zu keinen Spitzen über 650 m<sup>3</sup>/s, die sich negativ auf die Entwicklung der Pflanzen auswirken. Nach dem Hochwasserjahr 1999 wurde im Jahr 2000 dann generell weniger Schaumbildung beobachtet, es gab dadurch aber auch deutlich weniger Biomasse (max. 30 Tonnen) und es kam nur zu einem geringen Anstieg der Saponinkonzentrationen während der Sommermonate. Die Abflussmengen erreichten Spitzen über 650 m<sup>3</sup>/s und waren deutlich höher als 2 Jahre zuvor, dies verursachte ein geringeres Pflanzenwachstum und eine Verdünnung der Saponine im Flusswasser. WEGNER, 2001 konnte bei seiner Studie auch im Grundwasser der Pumpwerke Schaffhausen und Neuhausen Saponine in Konzentrationen um 70 bzw. 30 ng/L nachweisen.

Fakt ist, dass saponinhaltige Pflanzen einen Einfluss auf die Schaumbildung auf Oberflächengewässern haben können, jedoch nicht der alleinige Verursacher

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

---

sind. Bis dato gab es keine entsprechenden Messstellen in Österreich, wo in den beprobten Flüssen vergleichbare Wasserpflanzen wachsen. Welchen Einfluss die Fauna an den Ufern der Gewässer und die damit verbundene Abschwemmung hat, kann nicht genau beurteilt werden. Da Schaumbildungsprozesse sehr komplex sind und neben natürlichen schäumenden Substanzen (Saponine, Tannine,...), Proteine und Huminstoffe, Mikroorganismen, Algen und Phytoplankton auch anthropogen eingetragene synthetische Tenside, Düngemittel aus der Landwirtschaft, Abwasser von Industriebetrieben und kommunalen Kläranlagen einen Einfluss auf diese haben, müssten weitere Untersuchungen getätigt werden, um anthropogene Ursachen auszuschließen. Hierfür könnte man Leitsubstanzen (Arzneimittel und deren Metabolite, Industriechemikalien und Zuckerersatzstoffe) für Abwasserverunreinigung bzw. -beeinflussung durch kommunale Kläranlagen von Grund- und Oberflächengewässer bestimmen. Dazu zählen die Arzneimittel Carbamazepin (Antiepileptikum) und dessen Metabolit CBZ-DiOH, Metoprolol und Sotalol (Betablocker), das Insektizid Omethoat, die als Komplexbildner und Korrosionsschutzmittel verwendeten Benzo- und Tolyltriazole und die Süßstoffe Acesulfam und Sucralose.

Ein weiteres Problem ist die strukturelle Vielfalt der Stoffgruppe Saponine, es gibt allein 100 Pflanzenfamilien welche diese sekundären Pflanzenstoffe enthalten und bei den Steroidsapogeninen ebenfalls 100 verschiedene Strukturen. Es gibt wahrscheinlich über 1000 verschiedene Saponinstrukturen, wobei es unmöglich ist, all diese Saponine in einer analytischen Methode zu erfassen. Daher wurden sechs Saponine aus in Österreich heimischen Pflanzen ausgewählt. Wenn diese also nur in geringen Mengen oder gar nicht nachgewiesen werden können, schließt das nicht aus, dass andere Saponine in den Proben enthalten sind.

#### **4.1.3. Bestimmung von Saponinen in Abwässern von Kläranalgen (Emissionsproben)**

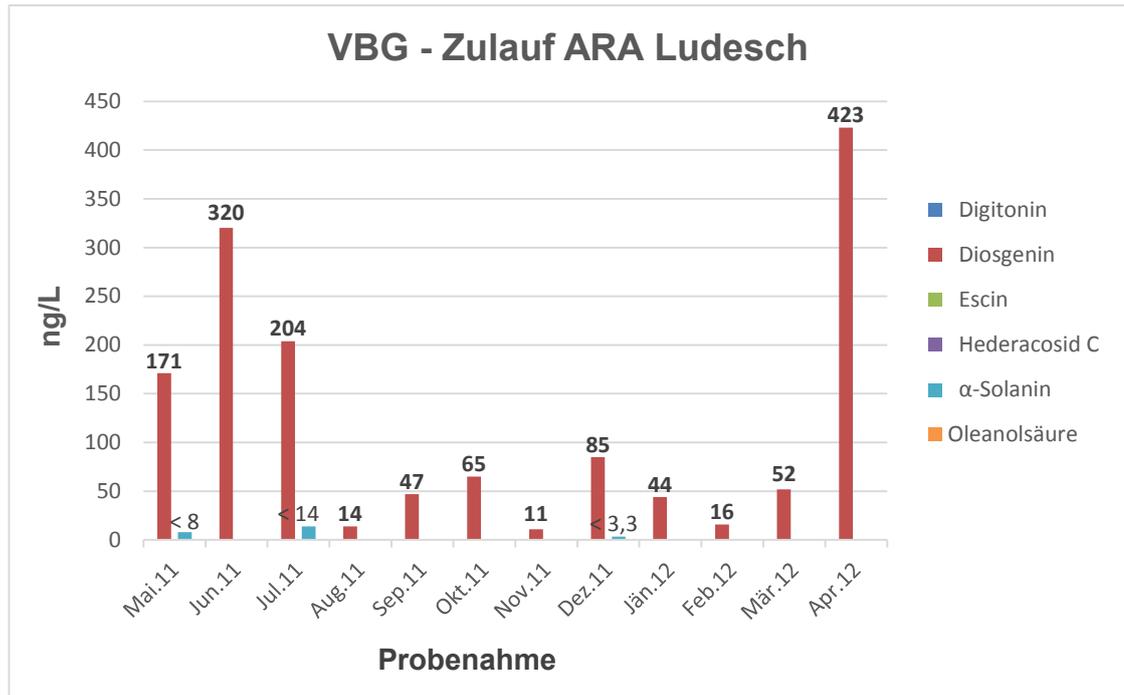
Analog zu den Immissionsproben (Oberflächengewässer) wurden auch 3 Emissionsproben im Jahresverlauf (Mai 2011 bis April 2012) beprobt und untersucht. Dabei wurde bei der Kläranlage ARA Ludesch der Zulauf (Kommunalabwasser inkl. 60 % des Abwasser einer Textilfabrik) und der Ablauf nach biologischer Reinigung des Abwassers ausgewählt, sowie eine Tagesmischprobe des Fabrikabwassers. Die Ergebnisse der LC-MS/MS Messungen sind in den folgenden Grafiken ersichtlich.

Abbildung 95 zeigt den ungeklärten Zulauf zur Abwasserreinigungsanlage Ludesch. Es konnten im Jahresverlauf jeden Monat von Mai 2011 bis April 2012 das Diosgenin in beträchtlichen Konzentrationen nachgewiesen werden (von 11 bis 423 ng/L). Zudem konnte das Saponin  $\alpha$ -Solanin im Mai, Juli und Dezember 2011 mit Werten kleiner der Bestimmungsgrenze detektiert werden. Alle anderen Saponine waren nicht nachweisbar.

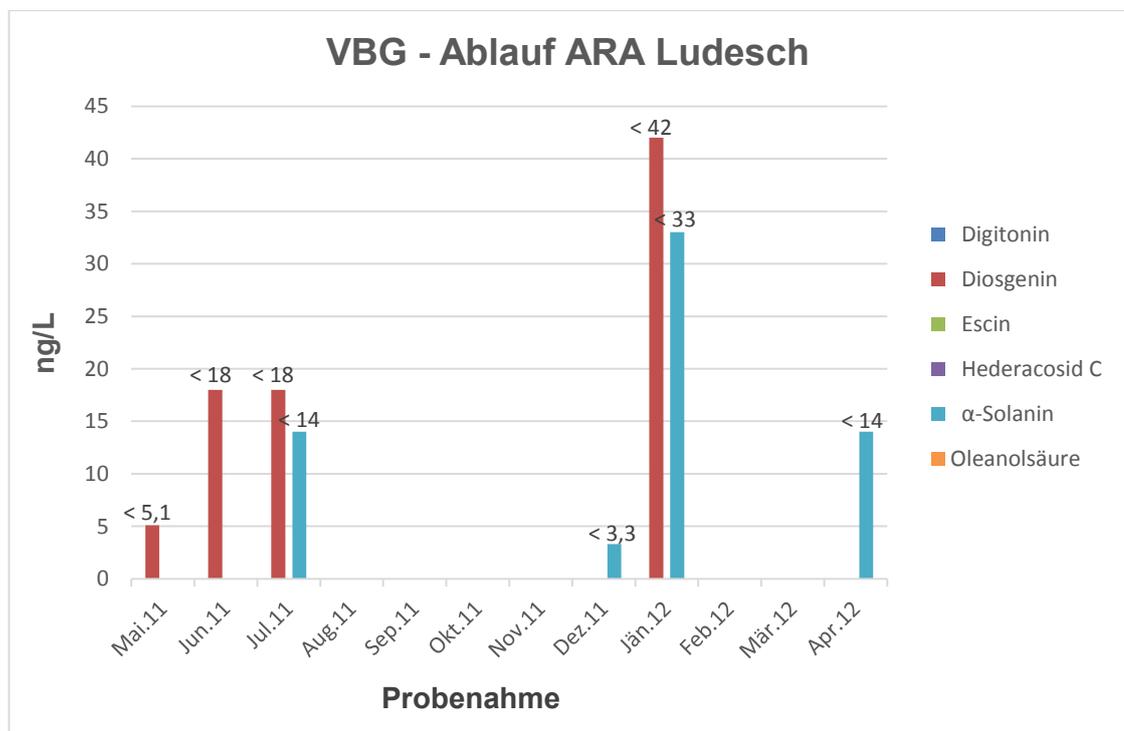
Bei der Messstelle VBG – Ablauf ARA Ludesch (Abb. 96) zeigt sich ein ähnliches Bild. Diosgenin wurde im Zeitraum von Mai bis Juli 2011 und im Jänner 2012 kleiner der Bestimmungsgrenze nachgewiesen, dies deckt sich mit den hohen Ergebnissen des Zulaufes, einzig im April 2012 wo der größte Wert von 423 ng/L im Zulauf gemessen wurde, wurde dieses Saponin im Ablauf nicht mehr nachgewiesen. Auch das andere im Zulauf gemessene Saponin das  $\alpha$ -Solanin wurde im Ablauf gefunden und zwar im Juli und Dezember 2011 und im Jänner und April 2012.

Man kann also daraus schließen, dass das Diosgenin aufgrund seiner Oberflächenaktivität im Klärschlamm verbleibt oder eventuell auch bakteriell abgebaut wird, wogegen das  $\alpha$ -Solanin im Zulauf und im Ablauf < BG nachgewiesen werden kann.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

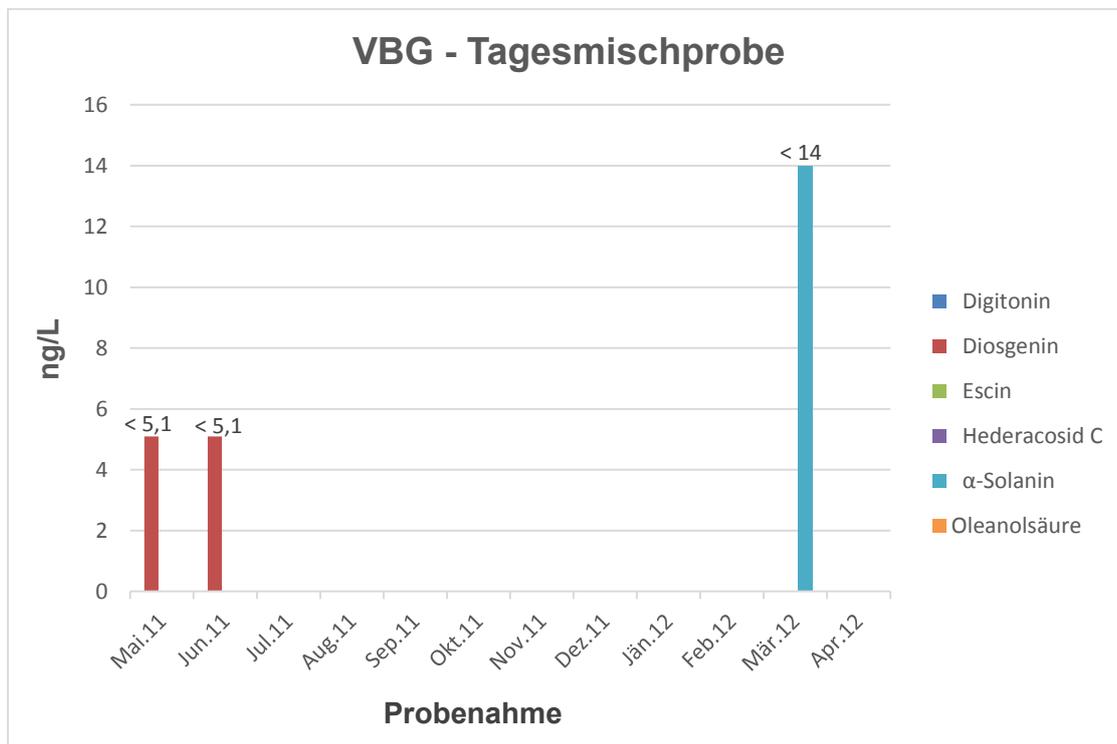


**Abb. 95: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle VBG – Zulauf ARA Ludesch im Jahresverlauf**



**Abb. 96: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle VBG – Ablauf ARA Ludesch im Jahresverlauf**

In der Tagesmischprobe der Textilfabrik (Abb. 97), welche 60 % des Abwassers des Zulaufes zur ARA Ludesch ausmacht, fanden sich die beiden Saponine Diosgenin und  $\alpha$ -Solanin in Konzentrationen kleiner als die Bestimmungsgrenze. Das Diosgenin wurde im Mai und Juni 2011 und das  $\alpha$ -Solanin im März 2012 detektiert. Wie genau diese beiden Saponine in das Abwasser gelangen ist fraglich, da in den Textilbetrieben eigentlich nicht mit diesen Substanzen gearbeitet wird.

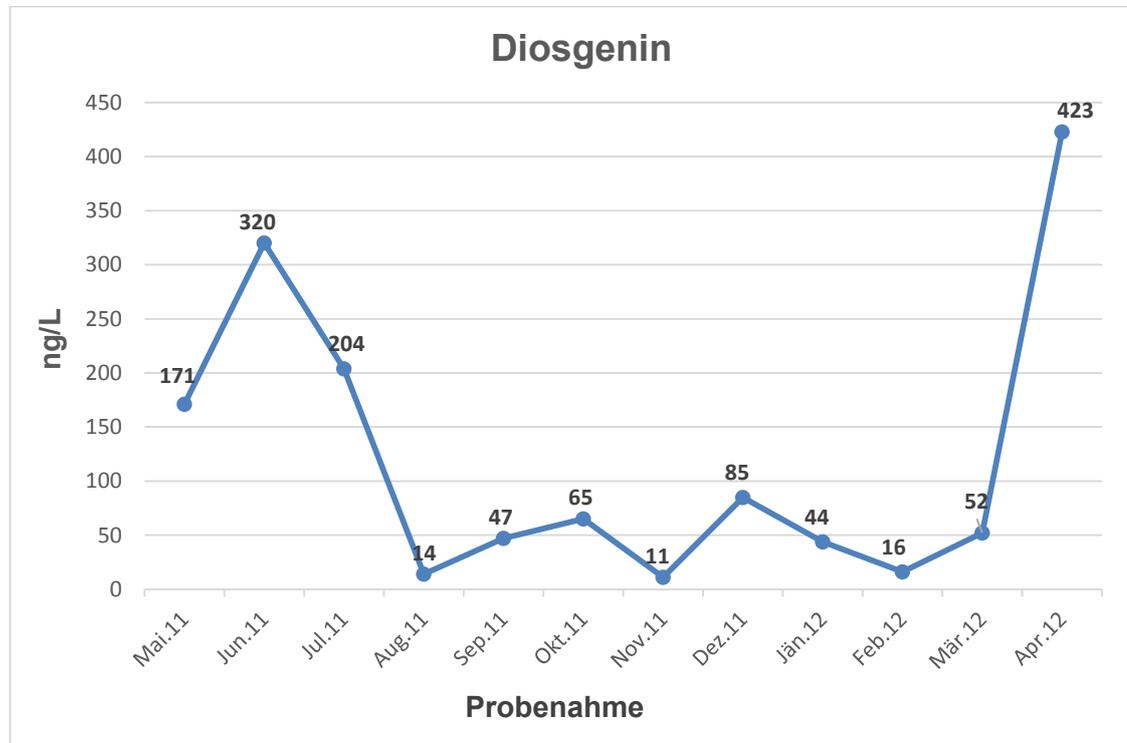


**Abb. 97: Die LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle VBG – Tagesmischprobe im Jahresverlauf**

Unseres Wissens wurden das erste Mal natürliche Tenside in Abwasserproben untersucht und daher gibt es keine Vergleichsdaten. In der Tagesmischprobe der Textilfabrik, die etwa 60 % des Zulaufes der ARA Ludesch ausmacht wurden Saponine nicht oder kleiner der Bestimmungsgrenze nachgewiesen. Beim Zulauf hingegen konnte während der gesamten Probenahme das Diosgenin positiv erfasst werden. Abbildung 98 zeigt nochmals den Verlauf und es ist erkennbar, dass in den Frühjahrsmonaten (Mai, Juni, Juli 2011 und April

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

2012) weitaus höhere Konzentrationen und zwar bis zum 7fachen gemessen wurden als im Spätsommer, Herbst und Winter.

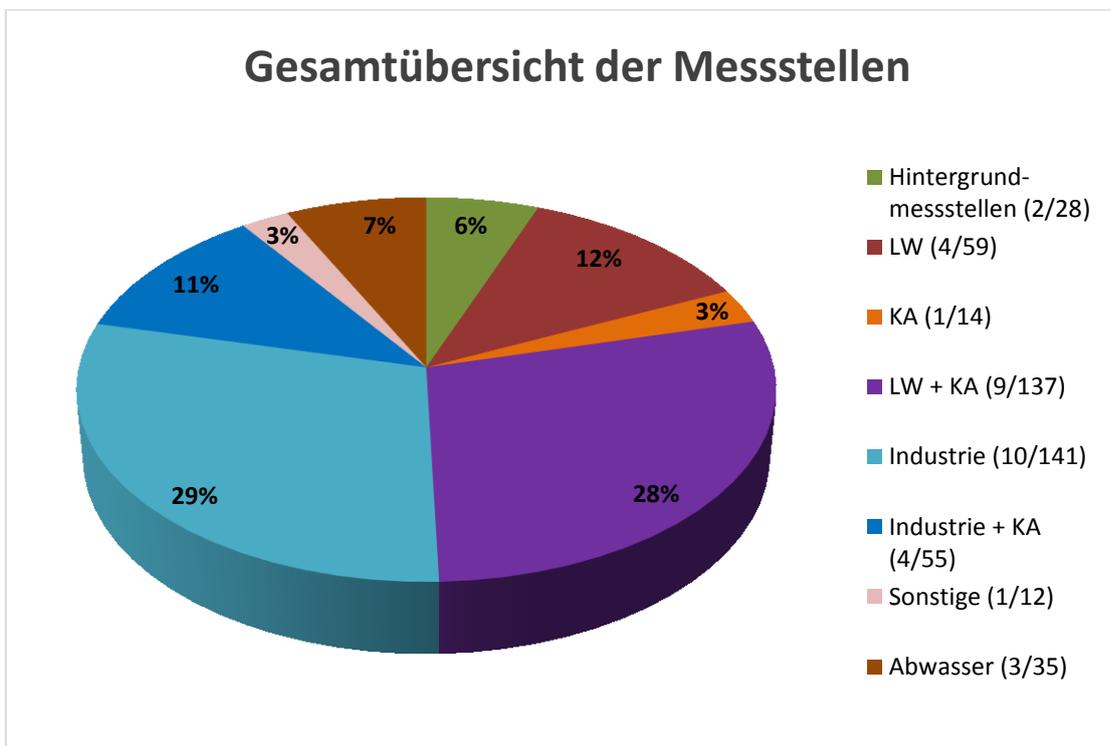


**Abb. 98: Parameter Diosgenin im Verlauf der Jahresreihe der Messstelle VBG – Zulauf ARA Ludesch**

Wie genau das Diosgenin in den Zulauf gelangt ist bisher unbekannt, es ist jedoch anhand der LC-MS/MS-Ergebnisse ersichtlich, dass dieses entweder abgebaut oder über den Klärschlamm entfernt wird, da es im Ablauf nur mehr kleiner der Bestimmungsgrenze oder nicht mehr nachgewiesen werden kann.

## 4.2. Ergebnisse des Schäumungspotentials

Zur Bewertung des Schaumbildungsvermögens der österreichischen Oberflächengewässer wurden insgesamt 31 Immissionsmessstellen und zusätzlich noch 3 Emissionsmessstellen (Abwässer) über ein Jahr lang im Zeitraum von März 2011 bis Mai 2012 beprobt.



**Abb. 99: Anteile der Messstellen je Belastungsklasse**  
 Legende: Anzahl der Messstellen (links) und die Probenanzahl je Belastungsquelle (rechts)

Abbildung 99 zeigt die Einordnung der 481 bereits mittels LC-MS/MS untersuchten Proben, eingeteilt in acht Segmente welche die verschiedenen Belastungseinflüsse auf die einzelnen Messstellen darstellen. Diese enthalten 2 Hintergrundmessstellen, von welchen 28-mal im Jahr Proben gezogen wurden. Diese Proben machen etwa 6 % aller gemessenen Proben aus. Vier Oberflächenwasserproben, die nur von der Landwirtschaft beeinflusst sind (insgesamt 59 Proben), entsprechen etwa 12 % der Gesamtheit. Es gab eine Messstelle die vorwiegend durch eine Kommunale Kläranlage beeinflusst wurde, hier wurden 14 Proben genommen (3 %). Bei neun Messstellen kann

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

---

sowohl von einer Belastung durch die Landwirtschaft als auch von kommunalen Abwässern ausgegangen werden, diese wurden insgesamt 137-mal beprobt und machen etwa 28 % aus. 10 Messstellen lagen im Einzugsgebiet von diversen Industriebetrieben und es wurden hier insgesamt 141 Proben genommen (29 %). Bei 4 weiteren Messstellen kam zur industriellen Beeinflussung noch die Einleitung einer kommunalen Kläranlage dazu, dies entsprach 45 Proben und 11 % der Gesamtheit. Eine Messstelle (12 Proben = 3 %) konnte nicht genau zugeordnet werden und wurde unter Sonstige geführt. Die drei Abwassermessstellen bestehend aus dem Zu- und Ablauf zur ARA Ludesch und der Tagesmischprobe einer Textilfabrik umfassen 35 Proben und machen 7 % aller gemessenen Proben aus. Tabelle 45 zeigt die Zuordnung der Messstellen zu den 7 Kategorien der Belastungsquellen die genauer in Tab. 7 im Kapitel 3.1.1 ersichtlich sind.

**Tab. 45: Zuteilung der 34 Messstellen zu den Belastungsquellen**

<b>Belastungsquelle</b>	<b>Messstellen</b>
Hintergrundmessstellen	Reichramingbach, Halterbach
Landwirtschaft	Ipfbach, Hörschinger Bach, Ranna, Agrana_oh
Kläranlage	Frohnleiten
LW + KA	Antiesen, D. Aschach 2 & 3, Feldaist, Gr. Rodl, Innbach, Krems, Pram, Jung_oh
Industrie	Traun, Agrana_uh, Jung_uh, Kainischtraun, Weinzödlwehr, Ertlermühle, Hohenbrugg, Thörlbach, Vordernbergerbach
Industrie + KA	Ager, III nach Einleitung, Feldbach, Pöls
Sonstige	III vor Einleitung
Abwasser	Ablauf, Zulauf, Tagesmischprobe

Auch in diesem Kapitel wurde zur leichteren Darstellung der Grafiken folgende Abkürzungen verwendet: LW für Landwirtschaft, KA für Kommunale Kläranlagen, LW + KA für Landwirtschaft und kommunale Kläranlage, Industrie für verschiedene industrielle Zweige und Industrie + KA für diverse Industrie und kommunale Kläranlage.

Die Ergebnisse des Schäumungspotentials wurden in Gesamthöhe [mm] dargestellt, welche sich aus der Schaumfront [mm] und der Blasenhöhe [mm]

zusammensetzt. Zur Vereinfachung wurden immer die Jahresmittelwerte angegeben, außer es war wichtig zur Erörterung mancher Ausreißer. Alle Ergebnisse und zusätzliche Abbildungen der einzelnen Messstellen im Jahresverlauf sind in Tabellen und Grafiken in Kapitel 10 (unter dem Punkt 10.2. Ergebnisse des Schäumungspotentials) ersichtlich.

#### 4.2.1. Ergebnisse des Schäumungspotentials der Hintergrundmessstellen

Die zwei Hintergrundmessstellen OÖ – Reichramingbach und W – Halterbach sind in Abbildung 100 dargestellt als Mittelwert der Gesamthöhen [mm] und die Standardabweichungen über die gesamte Probenahmezeit (März 2011 bis Mai 2012). Als Jahresmittel wurden beim Reichramingbach 31,8 mm und beim Halterbach 45,4 mm berechnet, der Unterschied zwischen den beiden war signifikant ( $p < 0,05$ ).

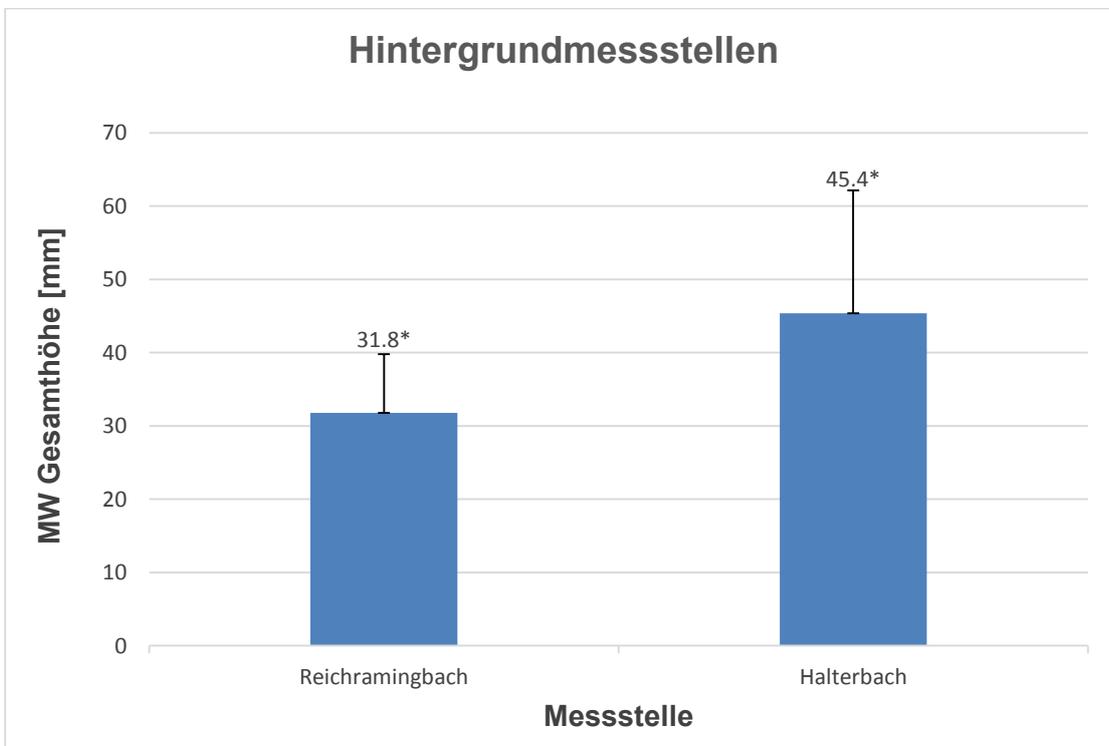
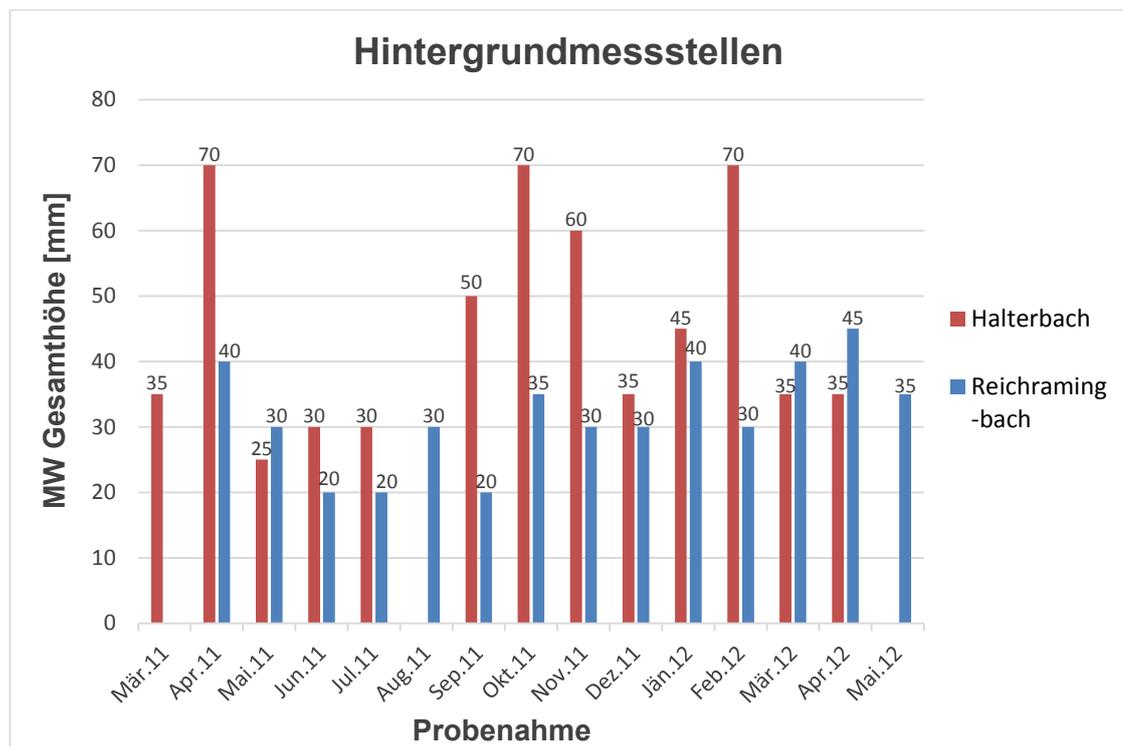


Abb. 100: Das Schäumungsvermögen der Hintergrundmessstellen OÖ – Reichramingbach und W -Halterbach dargestellt als Mittelwert (\*  $p < 0,05$ )

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Abbildung 101 zeigt das Schäumungspotential der beiden Messstellen im Jahresverlauf. Es kann gut erkannt werden, warum es zu einem Unterschied der Mittelwerte kommt. Beim Reichramingbach gibt es fast keine jahreszeitlichen Schwankungen, wogegen beim Halterbach im April und Oktober 2011 und im Februar 2012 Gesamthöhen von 70 mm und im September bzw. November 2011 Werte von 50 bzw. 60 mm gemessen wurden.



**Abb. 101: Das Schäumungsvermögen der beiden Hintergrundmessstellen OÖ – Reichramingbach und W -Halterbach dargestellt im Jahresverlauf**

#### 4.2.2. Ergebnisse des Schäumungspotentials der Oberflächengewässer

Im Gegensatz zu der Hintergrundmessstelle Reichramingbach wurden in den anderen Messstellen in Oberösterreich generell höhere Mittelwerte der Gesamthöhen [mm] bei den Schaumversuchen festgestellt. Abbildung 102 zeigt alle in Oberösterreich gemessenen Messstellen inkl. des Reichramingbaches, deren Standardabweichungen und den signifikanten Unterschied zur Hintergrundmessstelle Reichramingbach, welche anthropogen unbelastet ist.

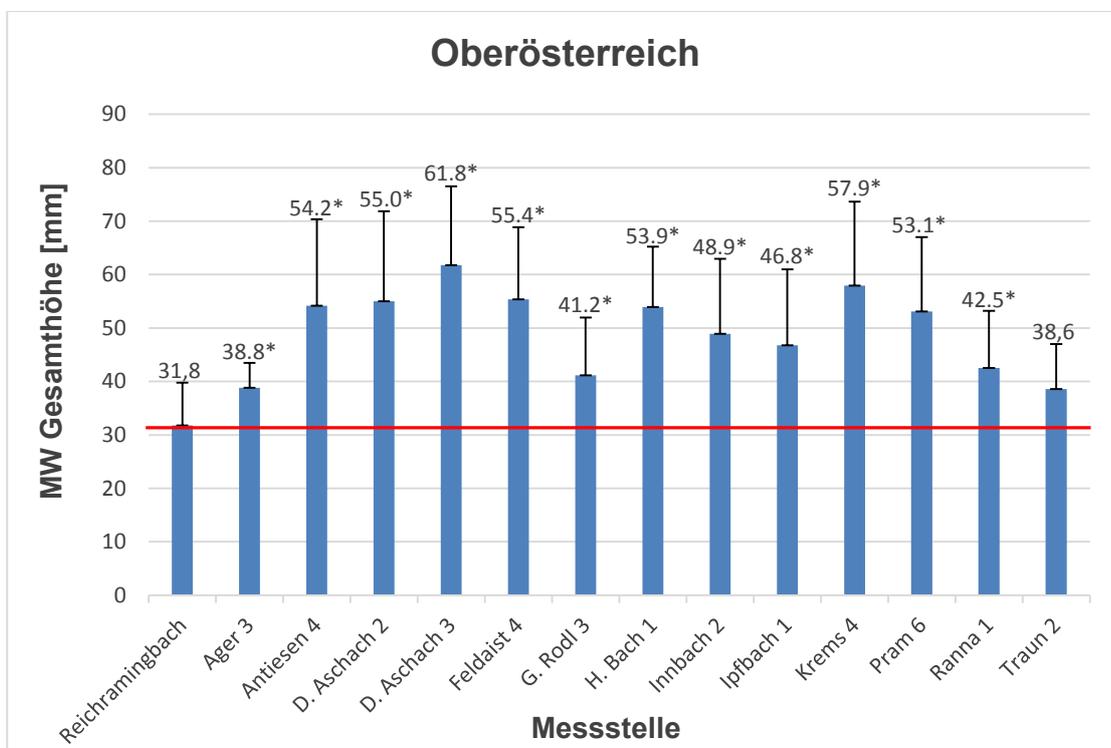


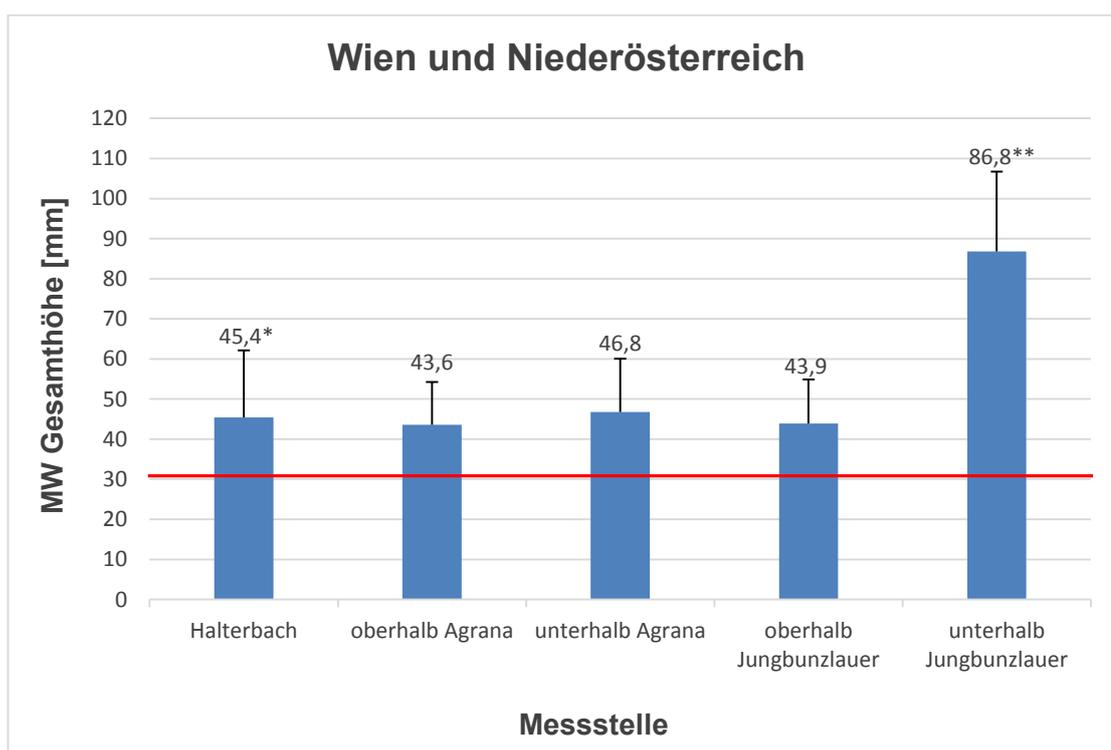
Abb. 102: Das Schäumungsvermögen der 13 Messstellen in Oberösterreich inkl. Reichramingbach dargestellt als Mittelwert (\*  $p < 0,05$ )

Die Ergebnisse aller 13 Immissionsmessstellen liegen deutlich über dem Mittelwert der Hintergrundmessstelle Reichramingbach, welcher in der Grafik durch die rote Linie dargestellt wurde. Die meisten Gewässer sind entweder durch diverse Industriebetriebe, kommunale Kläranlagen, Landwirtschaft oder aus Kombinationen derer beeinflusst (KA + LW bzw. Industrie + KA). Alle oberösterreichischen Messstellen, außer OÖ - Traun 2 unterscheiden sich

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

signifikant ( $p < 0,05$ ) zur oberösterreichischen Hintergrundmessstelle Reichramingbach.

In Abbildung 103 sind die Mittelwerte der 4 Immissionsmessstellen in Niederösterreich inklusive der Hintergrundmessstelle Halterbach im Bundesland Wien (an der Grenze zu NÖ) ersichtlich. Man kann deutlich sehen, dass die Werte der Hintergrundmessstelle Halterbach, sowie der Messstellen oberhalb und unterhalb der Zuckerfabrik und oberhalb des Zitronensäureproduzenten sich nicht signifikant voneinander unterscheiden und jeweils bei etwa 45 mm Gesamthöhe im Mittel liegen. Der einzige signifikante Unterschied ( $p = 0,000$ ) wurde zwischen dem Halterbach und der Messstelle unterhalb Jungbunzlauer erfasst.

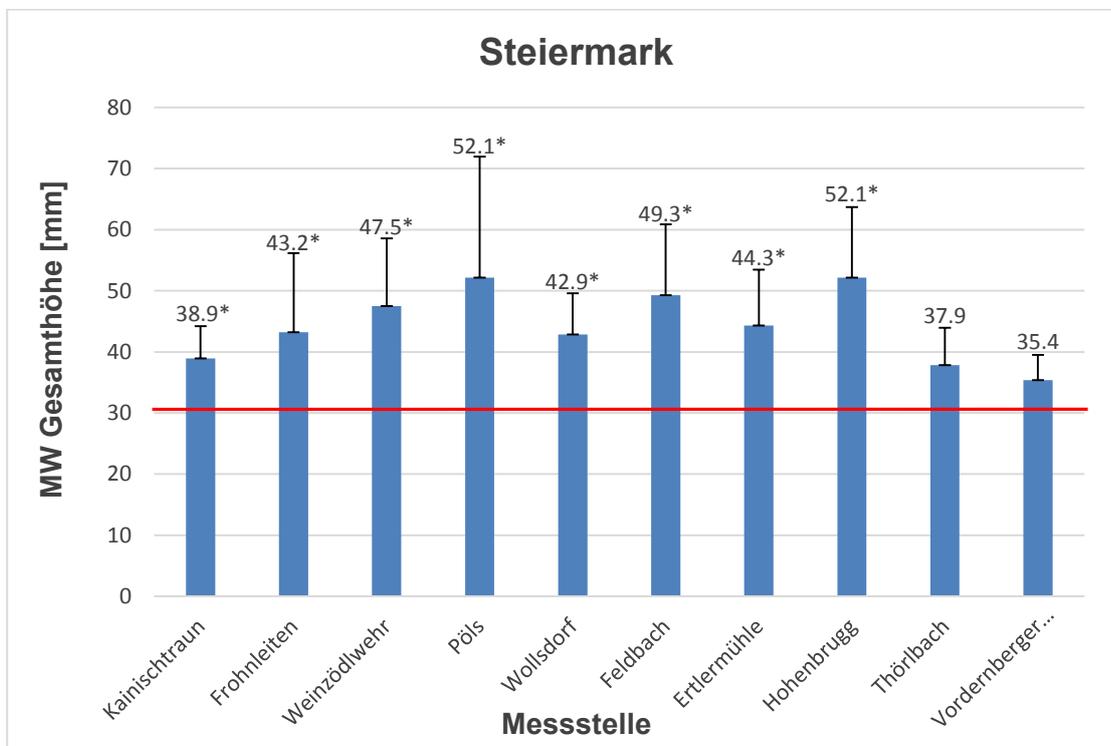


**Abb. 103: Das Schäumungsvermögen der 4 Messstellen in Niederösterreich inkl. Halterbach dargestellt als Mittelwert (\*\*  $p = 0,000$ )**

Die rote Linie in der Grafik zeigt den Mittelwert der Hintergrundmessstelle im Hintergebirge der Region Nationalparks Kalkalpen in Oberösterreich dem Reichramingbach und hier gibt es höchst signifikante Unterschiede ( $p = 0,000$ )

zu allen Messstellen in Wien und Niederösterreich. Weiters kann man einen kleinen jedoch nicht signifikanten Unterschied beim Rußbach (oh und uh Agrana) und einen sehr deutlichen höchst signifikanten ( $p = 0,000$ ) Mittelwert-Unterschied bei der Pulkau ober- und unterhalb der Jungbunzlauer Austria AG erkennen.

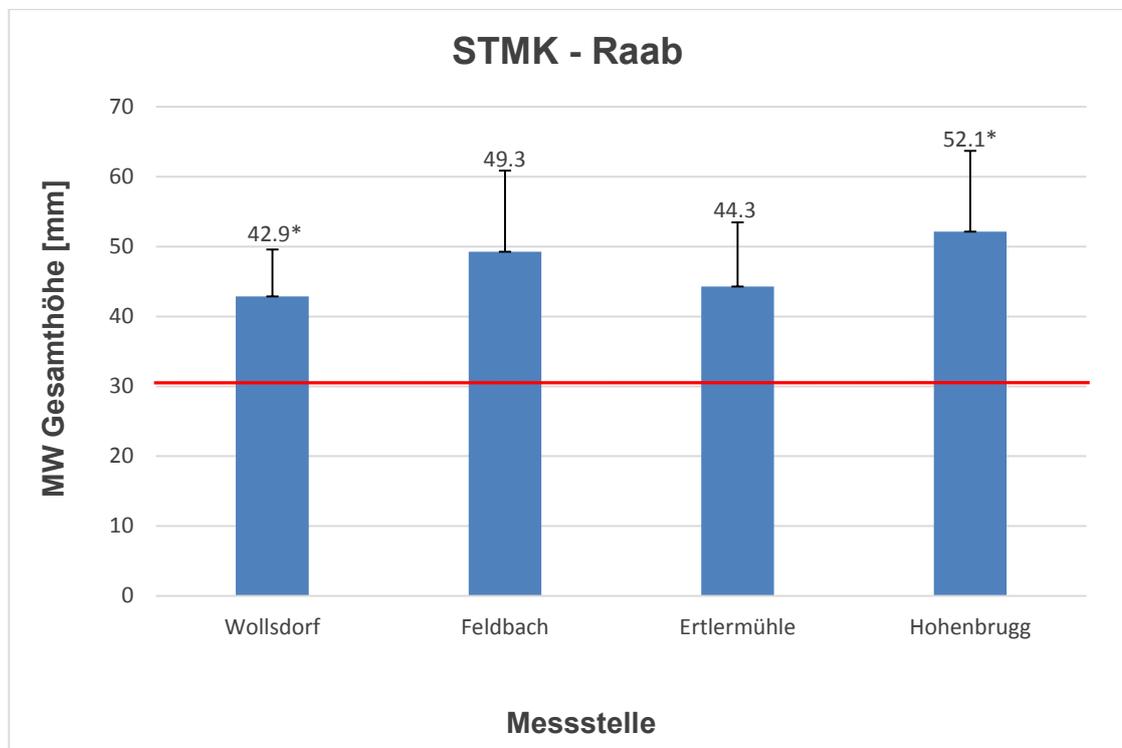
Abbildung 104 zeigt alle Jahresmittelwerte in mm, die Signifikanzen und die Standardabweichung, welche bei den Schaumversuchen für die 10 Messstellen der Steiermark ermittelt wurden. Auch hier wurde wieder der Mittelwert der Hintergrundmessstelle Reichramingbach in Oberösterreich (31,8 mm) als Vergleichswert durch die rote Linie dargestellt. Es konnten ähnlich wie in Oberösterreich hoch signifikante Unterschiede ( $p < 0,01$ ) zu allen Messstellen, mit Ausnahme des Vordernbergerbaches und dem Thörlbach festgestellt werden. Des Weiteren ist ersichtlich, dass bei der Mur (oberhalb Frohnleiten mit 43,21 mm und dem Weinzödlwehr mit 47,50 mm Gesamthöhe) ein Unterschied ersichtlich ist, welcher jedoch nicht signifikant ist.



**Abb. 104: Das Schäumungsvermögen der 10 Messstellen in der Steiermark dargestellt als Mittelwert (\*  $p < 0,01$ )**

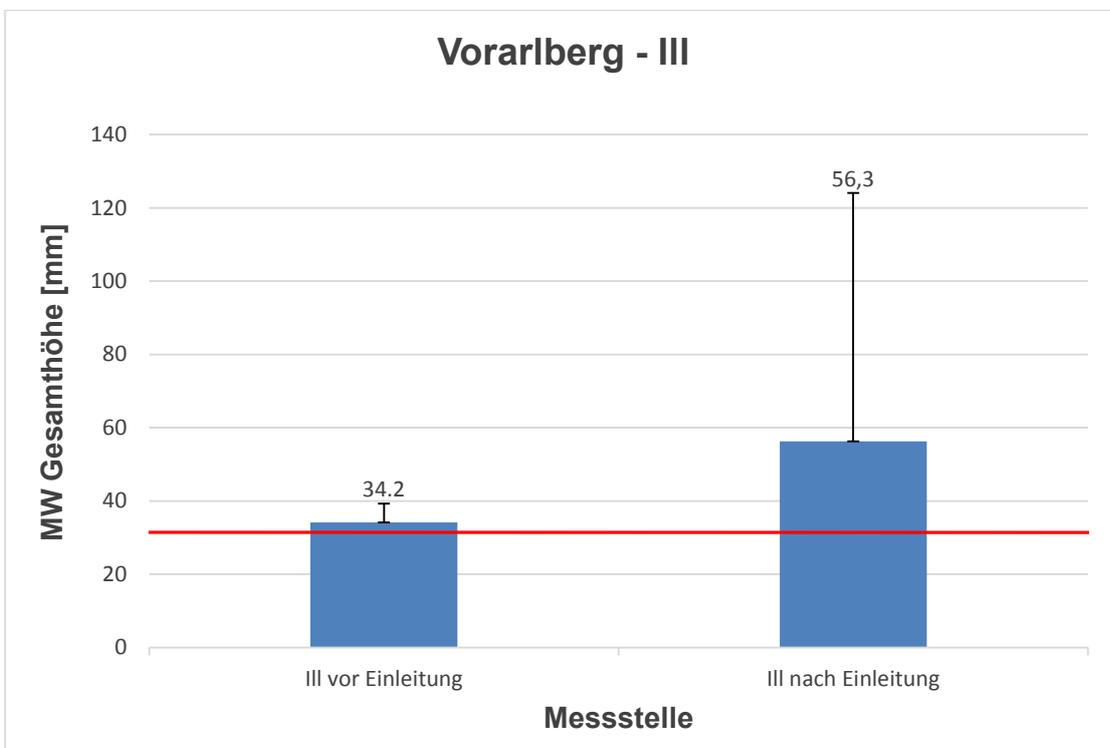
## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Auch bei der Raab (Abb. 105) an der 4 Messstellen flussabwärts beprobt wurden nämlich Wollsdorf, Feldbach, Ertlermühle und Hohenbrugg (beeinflusst durch Lederindustriebetriebe) sind Unterschiede zwischen den mittleren Gesamthöhen zu beobachten. Vergleicht man die Messstellen miteinander konnte jedoch nur zwischen Wollsdorf und Hohenbrugg der letzten Stelle vor dem Burgenland ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) beobachtet werden. Die rote Linie stellt die Hintergrundmessstelle Reichramingbach in Oberösterreich dar und war zu allen Messstellen an der Raab signifikant verschieden ( $p < 0,01$ ).



**Abb. 105: Das Schäumungsvermögen der 4 Messstellen flussabwärts der Raab (STMK) dargestellt als Mittelwert (\*  $p < 0,05$ )**

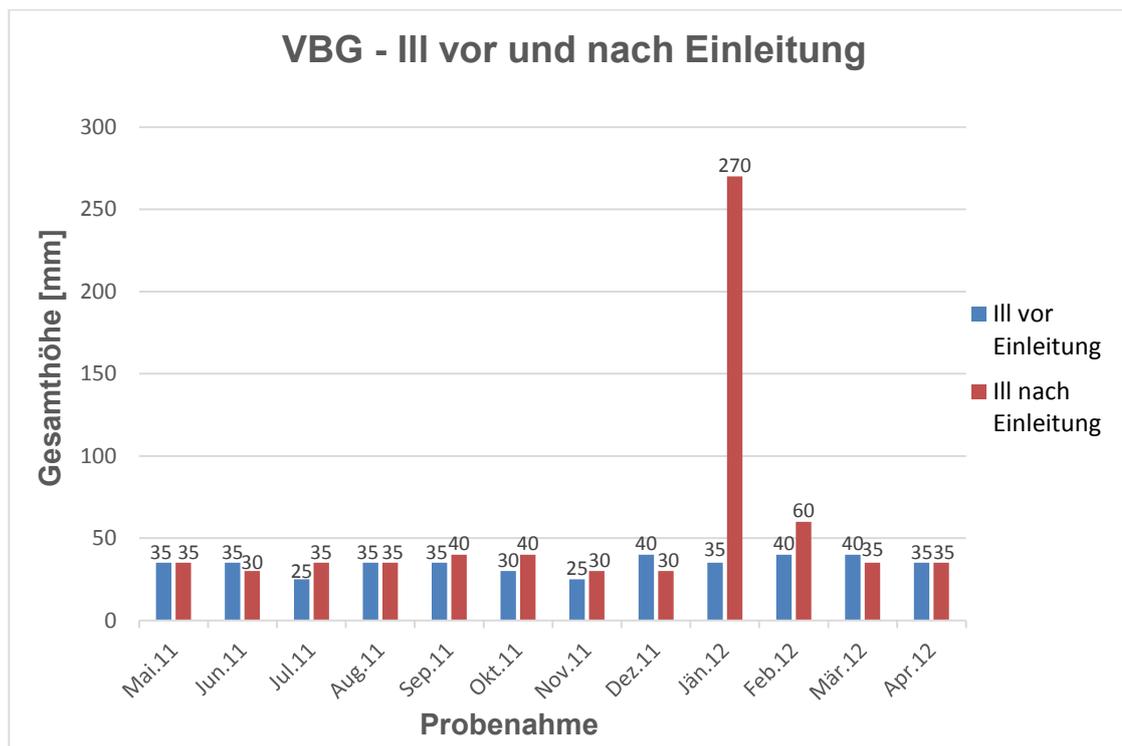
Im letzten Bundesland des Schaummessnetzes Vorarlberg wurde die III (Lutz) vor und nach der ARA Ludesch und einer Textilfabrik beprobt. Abbildung 106 zeigt das Schaumbildungsvermögen vor und nach den Einleitern (Industrie + KA). Wobei der Zulauf der ARA Ludesch etwa 60 % des Abwassers der Textilfabrik enthält und der Ablauf der Kläranlage nach Reinigung des Abwassers wieder in den Fluss geleitet wird. Es ist klar ersichtlich, dass im Mittelwert ein deutlicher, jedoch nicht signifikanter Unterschied zwischen den gesamten Messwerten der beiden Messstellen, besteht. Es konnte auch keine Signifikanz im Vergleich zu den Einzelwerten des Reichramingbaches, dargestellt durch die rote Linie, festgestellt werden.



**Abb. 106:** Das Schäumungsvermögen der Immissionsmessstelle III vor und nach Einleitung der ARA Ludesch und eines Textilbetriebs dargestellt als Mittelwert

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

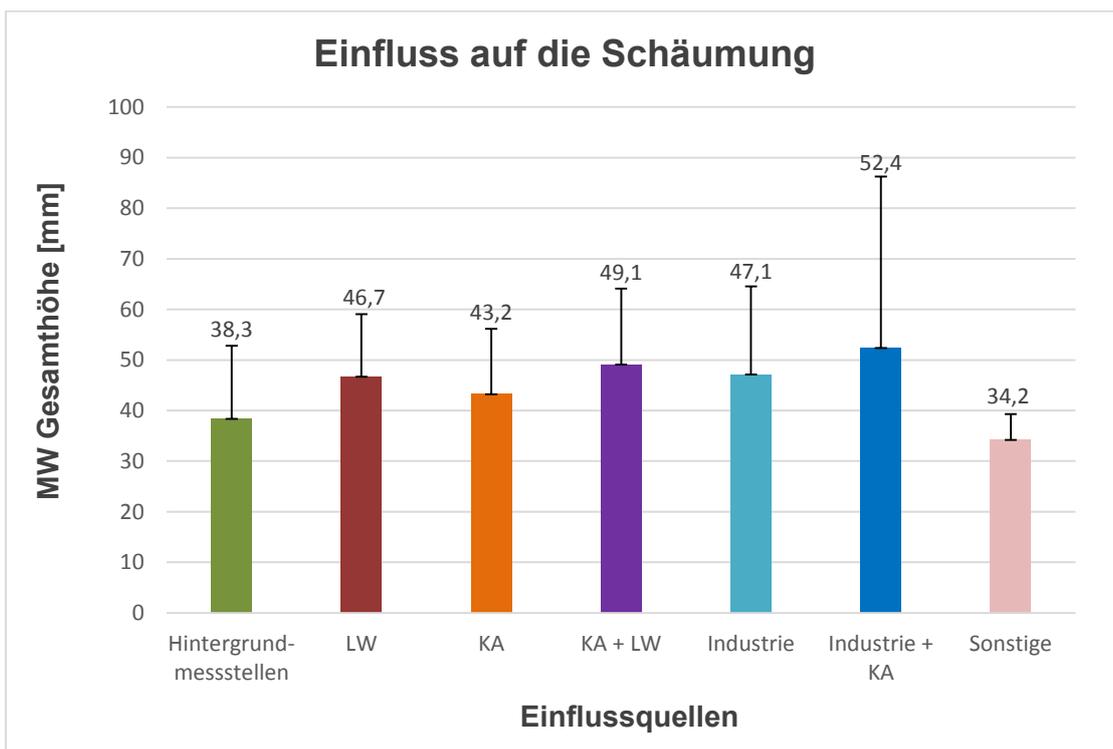
Betrachtet man den Jahresverlauf (Mai 2011 bis April 2012), wird sofort deutlich was diese Abweichung im Mittel zwischen den beiden Messstellen in Vorarlberg verursacht (Abb. 107). Bei der Probe VBG – III nach Einleitung gibt es einen deutlichen Ausreißer im Jänner 2012 mit einer Gesamthöhe von 270 mm und einen moderaten im Februar 2012 mit 60 mm. Ansonsten sind alle Messungen sehr homogen.



**Abb. 107: Das Schäumungsvermögen der beiden Messstellen VBG – III vor Einleitung und VBG – III nach Einleitung dargestellt im Jahresverlauf**

Abbildung 108 zeigt die verschiedenen Messstellen der Oberflächengewässer unterteilt in die diversen Belastungsquellen. Vergleicht man die Hintergrundmessstellen (anthropogen un- bzw. gering belastet) mit den von Kläranlagen beeinflussten Messstellen und der sonstigen Messstelle lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Anders bei den Gruppen LW, KA + LW, Industrie und Industrie + KA hier sind die Unterschiede zu den unbelasteten Gewässern hoch signifikant mit  $p < 0,01$ .

Des Weiteren gab es keine signifikanten Abweichungen zwischen den Gruppen LW vs. KA, LW vs. Industrie, LW vs. Industrie + KA, KA vs. Industrie, KA vs. Industrie + KA und Industrie vs. Industrie + KA. Alle anderen Kombinationen waren signifikant unterschiedlich  $p < 0,05$ .

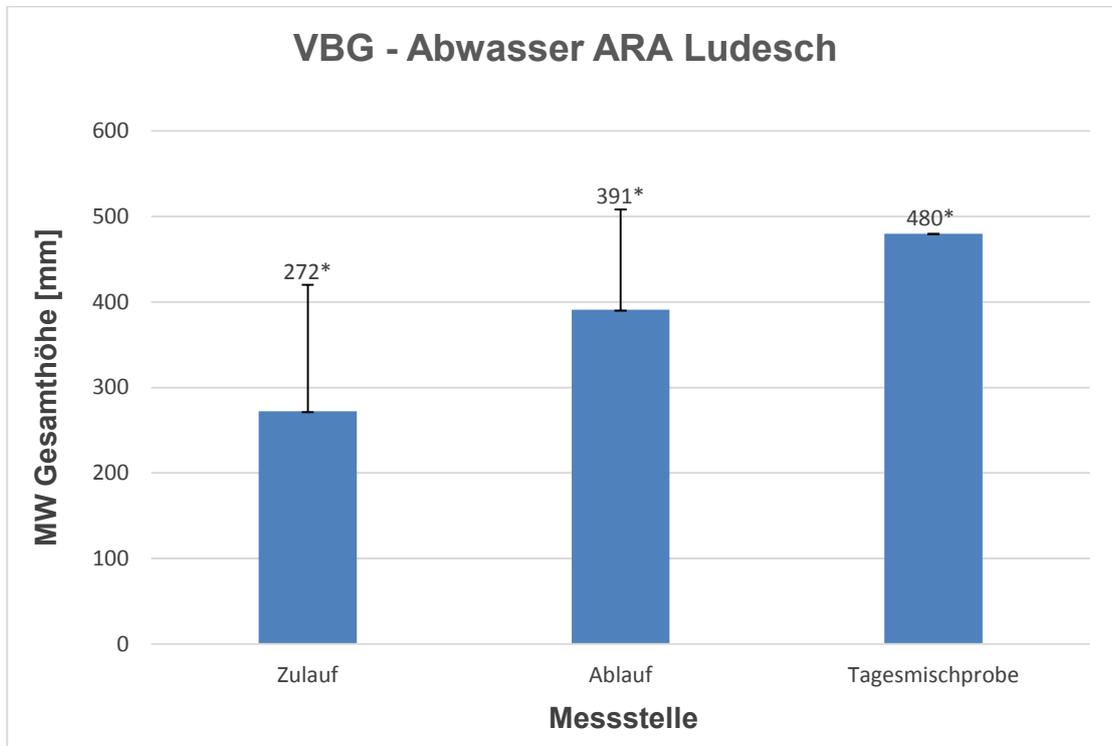


**Abb. 108: Einfluss auf die Schäumung unterteilt in die verschiedenen Einflussquellen**

### 4.2.3. Ergebnisse des Schäumungspotentials der Abwässer

Obwohl das Schäumungspotential eigentlich als Test für Oberflächengewässer und nicht für Abwässer entwickelt wurde, war es jedoch auch sehr interessant ob es bei den Abwässern zu Unterschieden in der Schäumbarkeit kommt. Abbildung 109 zeigt die Mittelwerte des Zu- und Ablaufes der Kläranlage ARA Ludesch und der Tagesmischprobe des Textilbetriebs. Vergleicht man Zu- und Ablauf ist der Unterschied signifikant ( $p < 0,05$ ). Verwunderlich ist jedoch, dass obwohl der Zulauf zur Kläranlage aus fast 60 % des Abwassers der Textilfabrik besteht, im Zulauf der Kläranlage ein deutlich geringeres Schäumungsvermögen beobachtet wurde als in der Tagesmischprobe des Industriebetriebes. Und der Ablauf der Kläranlage ein Schäumungsvermögen zwischen dem Zulauf und dem Abwasser des Textilbetriebs aufwies. Beim Zulauf wurde im Mittel 272 mm und bei der Tagesmischprobe waren es immer  $> 480$  mm. Größer 480 deswegen, da ab diesem Wert die Proben bei der Messung über den Rand der Messsäule ausliefen, die Messung abgebrochen werden musste und die Werte nicht abgelesen werden konnten. Hier wurden immer die Höchstwerte zur Bildung des Mittelwertes herangezogen, aufgrund dessen betrug der Maximalmittelwert 480 mm. Des Weiteren fällt auf, dass der Ablauf (391 mm), welcher eigentlich geklärtes aufgereinigtes Abwasser ist, deutlich mehr Schäumungsvermögen aufweist als der Zulauf. Ein Grund dafür könnte sein, dass häuslich/kommunales Abwasser eventuell als Entschäumer für Industrieabwasser fungiert. Wird nun die Organik des kommunalen Abwassers in der Kläranlage abgebaut, könnte die schäumende Wirkung des industriellen Abwassers wieder zur Geltung kommen, weil diese in geringerer Menge oder nur teilweise abgebaut wurde. Die Proben des Zulaufes waren im Gegensatz zu den Abläufen deutlich verschmutzter und ähnelten farblich den Tagesmischproben der Textilfabrik. Beim Vergleich des Zulaufes mit der Tagesmischprobe wurde ein signifikanter Unterschied, der mit  $p = 0,001$  berechnet wurde, festgestellt und bei der Gegenüberstellung des Ablaufes mit der Tagesmischprobe war dieser nur mehr signifikant ( $p < 0,05$ ). Alle Werte der Abwasserproben (Zu- und Ablauf zur Kläranlage und die Tagesmischprobe der Textilfabrik) waren höchst signifikant unterschiedlich verglichen mit den

Messwerten der Oberflächengewässer- inkl. der Hintergrundmessstellen ( $p = 0,000$ ).



**Abb. 109: Das Schäumungsvermögen der 3 Emissionsmessstellen der ARA Ludesch (Zulauf, Ablauf und Tagesmischprobe des Textilbetriebs) dargestellt als Mittelwert (\*  $p < 0,05$ )**

Abbildung 110 zeigt nochmals den jahreszeitlichen Unterschied zwischen den drei Emissionsmessstellen. Wobei die Tagesmischprobe immer mit  $> 480$  mm gemessen wurde und der Zulauf zur Kläranlage und deren Ablauf variieren. Im Jahresverlauf ist ersichtlich, dass der Ablauf immer ein höheres Schaumbildungsvermögen im Gegensatz zum Zulauf aufweist, außer in den Monaten Juli und August 2011.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

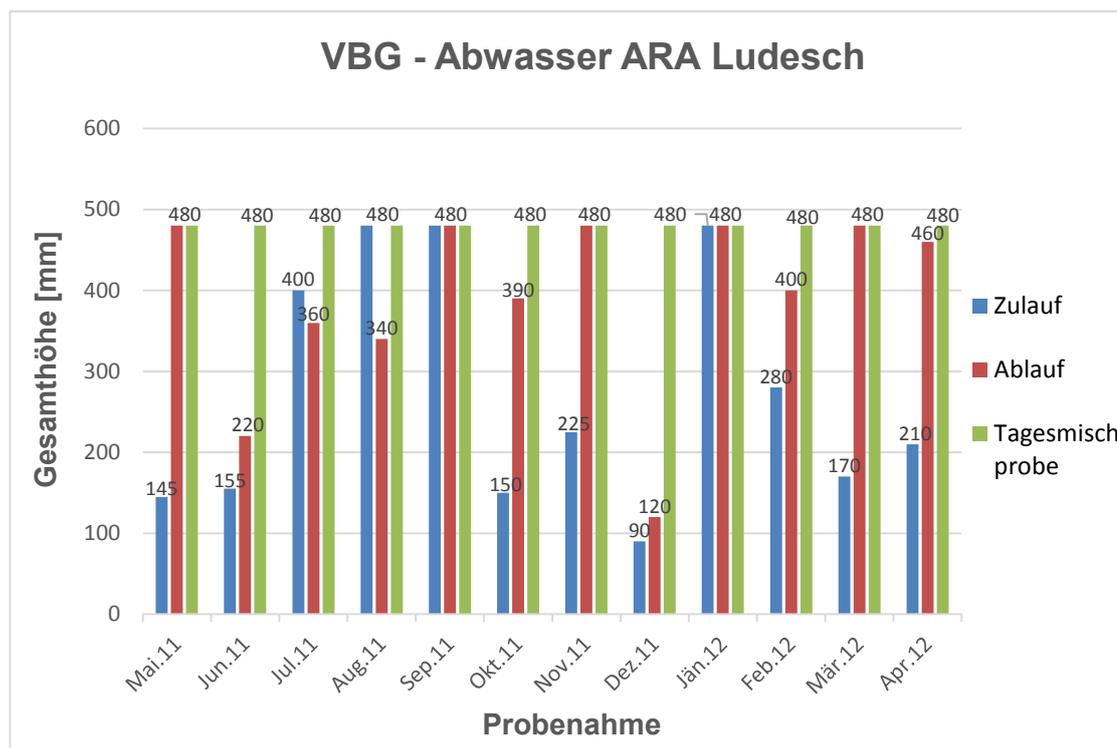


Abb. 110: Das Schäumungsvermögen der 3 Abwassermessstellen dargestellt im Jahresverlauf

### 4.2.4. Ergebnisse des Schäumungspotentials der ausgewählten Standardsubstanzen

Aufgrund der Vergleichbarkeit mit den mittels der entwickelten LC-MS/MS-Analytik gemessenen Saponinkonzentrationen und deren eventuellen Einfluss auf die Schaumbildung, wurden auch die 6 Saponinstandards auf ihre Schäumbarkeit getestet. Es wurden dafür 8 unterschiedliche Konzentrationen im Bereich von 1 bis 500 ng/L (1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ng/L) gelöst in einem Liter MilliQ-Wasser gleichermaßen wie die Oberflächen- und Abwasserproben analysiert. Alle gemessenen Substanzen (Digitonin, Diosgenin, Escin, Hederacosid C,  $\alpha$ -Solanin und die Oleanolsäure) wiesen keine Schäumungsaktivität verglichen zum Leerwert (nur MilliQ-Wasser) auf. Damit konnte bewiesen werden, dass in diesen geringen Konzentrationen kein Einfluss auf die Schaumbildung nachgewiesen werden kann (Tab. 46).

Tab. 46: Schäumungsversuch mit den 6 ausgewählten Standardsubstanzen

Konzentration ng/L	Digi [mm]	Dios [mm]	Escin [mm]	Hed C [mm]	Solanin [mm]	OA [mm]
Leerwert	20	20	20	20	20	20
500 ng/L	20	20	20	20	20	20
250 ng/L	20	20	20	20	20	20
100 ng/L	20	20	20	20	20	20
50 ng/L	20	20	20	20	20	20
25 ng/L	20	20	20	20	20	20
10 ng/L	20	20	20	20	20	20
5 ng/L	20	20	20	20	20	20
1 ng/L	20	20	20	20	20	20

Bei der Standardherstellung konnte jedoch beobachtet werden, dass die ausgewählten Substanzen in höheren Konzentrationen (10 und 100 mg/L) im durchsichtigen Autosampler-Vial nach 1 Minute am Vortex sehr wohl kleine Schaumbläschen am Meniskusrand der Flüssigkeit bildeten.

Es ist also davon auszugehen, dass der Einfluss auf die Schäumbarkeit der ausgewählten Saponine in den in Oberflächen- und Abwasserproben gefundenen Mengen (bis zu 500 ng/L) keinen Einfluss auf die Schäumungsaktivität im Schaumbarkeitsversuch haben und somit kein Zusammenhang festgestellt werden konnte.

### 4.3. Ergebnisse des Ames Test

In der vorliegenden Arbeit wurde das mutagene Potential der ausgewählten Saponine Digitonin, Diosgenin, Escin, Hederacosid C, Oleanolsäure und  $\alpha$ -Solanin mittels Ames Test untersucht. Die verwendeten Proben wurden in sechs unterschiedlichen Konzentrationen (0,0001, 0,002, 0,02, 0,2, 2 und 20 ng/Platte) getestet, wobei die höchste Konzentration 0,5  $\mu$ l MeOH pro Milliliter H<sub>2</sub>O enthält. Der Konzentrationsbereich wurde auf Basis der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten LC-MS/MS Messungen von österreichischen Oberflächengewässern und vereinzelt auch Abwässer festgelegt. Die aus der Saponinanalytik resultierenden Saponingehalte wurden für den Ames Test herangezogen und zur Absicherung noch zwei höhere Konzentrationen um den Faktor 10 bzw. 100 höher (2 und 20 ng/Platte) gewählt, um ein Urteil hinsichtlich der Mutagenität fällen zu können. Damit wurde ein Bereich von fünf log Stufen berücksichtigt. Vor Beginn der Haupttests wurden beide verwendeten Bakterienstämme *Salmonella typhimurium* TA 98 und TA 102 mittels Genetischer Analyse auf ihre Funktionalität geprüft.

#### 4.3.1. Ames Test auf Mutagenität (mutagenic testing)

Der Test auf Mutagenität wurde mit den *Salmonella typhimurium* Stämmen TA 98 und TA 102 mit und ohne metabolischer Aktivierung (S9-Mix) durchgeführt. Die statistische Auswertung der Testergebnisse (Kapitel 10.3. Ergebnisse des Ames Test) zeigt, dass keine der sechs überprüften Saponine mutagenes Potential aufweist. Weder beim *S. typhimurium* Stamm TA 98, welcher Informationen über Frameshift-Mutationen gibt, noch beim Bakterienstamm TA 102, mit dem man oxidative Stressreaktionen nachweisen kann. Auch die Zugabe des Rattenleberhomogenats, um eine Stoffwechselaktivierung zu simulieren hatte keinen Einfluss darauf.

Die Resultate der durchgeführten Tests sind als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (STABW) in Tabelle 47 und den folgenden Abbildungen dargestellt. Die Mittelwerte errechnen sich aus den sechs ermittelten Werten

der jeweils 2 Testansätze mit je 3 Platten pro Substanz und Konzentration, sowie die Mittelwerte der mitgetesteten Positiv- und Negativkontrollen.

Tab. 47: Übersicht der Daten des Tests auf Mutagenität (mutagenic testing). Die his<sup>+</sup> Revertanten wurden gelistet als Mittelwert ± Standardabweichung (\* p < 0,05 zur Negativ Kontrolle)

Substanz	Konz. ng/Platte	TA 98 Revertanten/Platte ohne S9	TA 98 Revertanten/Platte mit S9	TA 102 Revertanten/Platte ohne S9	TA 102 Revertanten/Platte mit S9
Negativ Kontrolle		35,79 ± 8,16	56,42 ± 13,59	676,42 ± 74,28	841,26 ± 47,87
Digitonin	0,0001	31,00 ± 10,53	56,50 ± 5,79	663,33 ± 20,72	858,40 ± 21,08
	0,002	29,17 ± 4,83	47,17 ± 2,93	667,50 ± 16,60	881,67 ± 14,01
	0,02	29,50 ± 6,16	47,33 ± 12,60	639,00 ± 26,97	884,83 ± 14,05
	0,2	28,67 ± 5,20	45,60 ± 10,48	634,00 ± 55,72	872,67 ± 17,26
	2	32,17 ± 8,66	50,17 ± 13,95	670,17 ± 61,40	868,20 ± 9,86
	20	28,67 ± 7,34	46,33 ± 8,02	635,33 ± 70,68	865,00 ± 22,25
Diosgenin	0,0001	42,67 ± 6,44	70,20 ± 13,52	723,50 ± 17,73	859,17 ± 22,40
	0,002	43,33 ± 7,15	64,67 ± 11,08	731,17 ± 13,09	868,83 ± 29,98
	0,02	40,17 ± 5,64	67,20 ± 21,19	765,20 ± 30,38	827,50 ± 8,39
	0,2	41,33 ± 6,89	69,83 ± 18,58	746,17 ± 36,69	839,33 ± 24,41
	2	37,83 ± 12,16	66,33 ± 9,18	648,50 ± 35,48	774,00* ± 42,57
	20	39,83 ± 9,81	64,50 ± 4,51	666,50 ± 16,75	785,83 ± 45,61
Escin	0,0001	36,67 ± 7,12	58,33 ± 13,72	841,83* ± 87,47	774,50 ± 21,70
	0,002	34,17 ± 9,87	60,33 ± 16,01	792,00 ± 82,62	782,50 ± 14,87
	0,02	40,17 ± 5,56	61,50 ± 10,93	847,00* ± 54,05	771,00 ± 57,08
	0,2	35,40 ± 3,21	67,40 ± 7,89	694,00 ± 33,75	786,17 ± 21,35
	2	43,17 ± 8,89	59,17 ± 5,42	777,17 ± 37,83	746,50* ± 18,46
	20	40,33 ± 9,85	54,67 ± 9,24	656,00 ± 75,40	775,00 ± 23,93
Hederacosid C	0,0001	32,83 ± 3,13	43,17 ± 10,91	645,83 ± 20,80	879,83 ± 9,95
	0,002	35,17 ± 10,76	47,83 ± 12,22	656,25 ± 13,35	859,18 ± 22,68
	0,02	33,33 ± 4,18	55,33 ± 10,07	648,00 ± 8,72	857,83 ± 25,54
	0,2	30,67 ± 7,34	52,33 ± 12,96	641,33 ± 15,29	849,00 ± 35,67
	2	35,33 ± 6,83	49,33 ± 6,53	682,67 ± 40,83	887,60 ± 9,99
	20	37,17 ± 6,27	43,17 ± 8,04	689,67 ± 16,12	883,50 ± 9,09

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Substanz	Konz. ng/Platte	TA 98 Revertanten/ Platte ohne S9	TA 98 Revertanten/ Platte mit S9	TA 102 Revertanten/ Platte ohne S9	TA 102 Revertanten/ Platte mit S9
Oleanolsäure	0,0001	27,17 ± 4,75	43,83 ± 3,92	641,83 ± 8,04	890,67 ± 7,12
	0,002	33,80 ± 8,20	44,33 ± 10,75	646,33 ± 13,16	877,80 ± 21,53
	0,02	34,00 ± 7,13	52,00 ± 9,90	653,00 ± 15,75	868,67 ± 21,13
	0,2	29,00 ± 6,78	43,50 ± 10,62	647,00 ± 14,27	881,83 ± 18,97
	2	38,83 ± 5,49	52,17 ± 17,06	590,83 ± 45,95	870,50 ± 12,79
	20	32,67 ± 3,27	47,20 ± 9,15	666,67 ± 25,79	835,17 ± 18,23
α-Solanin	0,0001	39,67 ± 4,37	65,00 ± 12,62	776,17 ± 25,86	801,40 ± 68,72
	0,002	32,83 ± 6,94	55,17 ± 14,05	822,83* ± 65,00	861,67 ± 35,29
	0,02	42,00 ± 3,90	68,00 ± 8,85	782,00 ± 55,77	852,50 ± 41,86
	0,2	41,00 ± 6,57	67,67 ± 13,98	668,00 ± 23,24	814,33 ± 21,01
	2	32,00 ± 8,65	65,00 ± 8,76	792,60* ± 47,61	765,00 ± 44,43
	20	30,17 ± 7,99	65,67 ± 9,42	661,50 ± 30,05	771,33 ± 15,47
Positiv Kontrolle		210,42 ± 35,48	240,50 ± 41,35	1361,33 ± 96,04	1677,83 ± 61,07

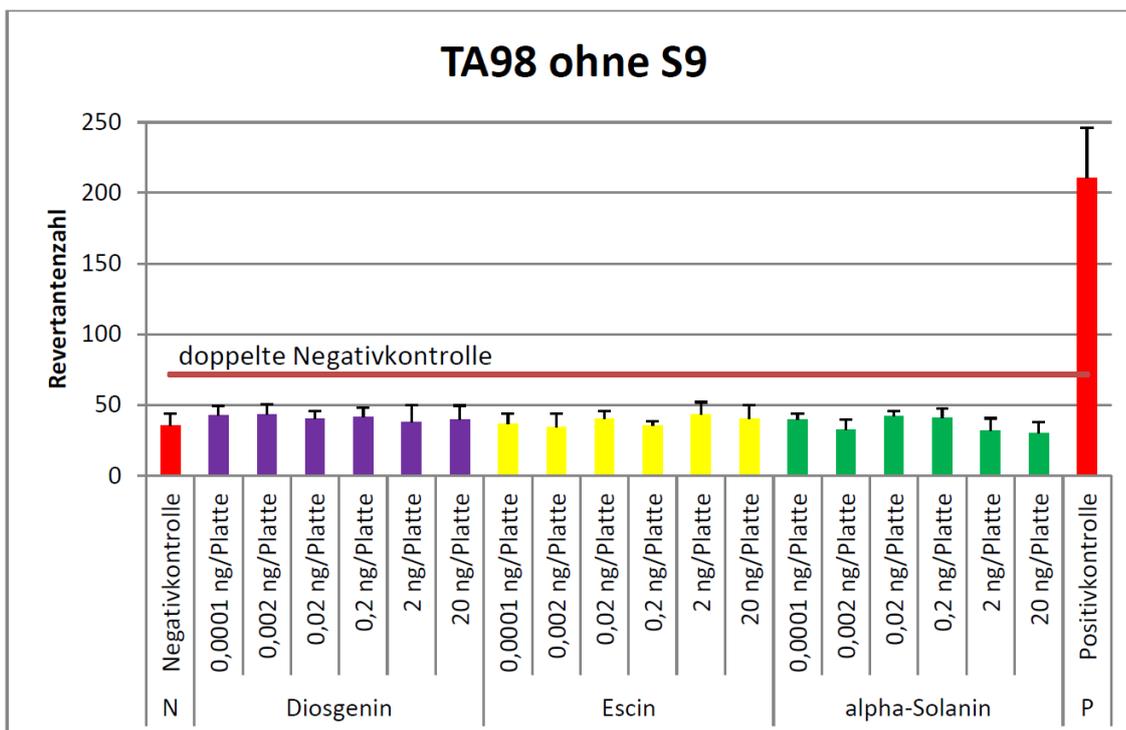
In der Übersicht der Ergebnisse des Ames Tests ist gut ersichtlich, dass es einen Unterschied bei den Revertanzahlen zwischen den beiden Teststämmen TA 98 und TA 102 gibt und auch die metabolische Aktivierung einen Einfluss auf diese hat. Wie in der Literatur beschrieben, liegen die Revertanten beim *Salmonella typhimurium* Stamm TA 98 deutlich unter den des TA 102. Alle Substanzen in allen Konzentrationen und Negativkontrollen unterschieden sich signifikant ( $p < 0,001$ ) von den dazugehörigen Positivkontrollen, wobei diese wie für den Ames Test vorgegeben auf die 3- bis 4-fache Konzentration der Negativkontrolle eingestellt wurden. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde  $p \leq 0,05$  festgesetzt. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurden die Daten graphisch dargestellt.

### 4.3.1.1. Resultate des *Salmonella typhimurium* Stamms TA 98 ohne S9

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse des *S. typhimurium* Stamms TA 98 ohne metabolischer Aktivierung (S9-Mix) dargestellt. Die x-Achse zeigt jeweils 3 Substanzen in den sechs Konzentrationen pro Darstellung sowie die

Negativ- und Positivkontrolle (Mittelwert und Standardabweichung). Auf der y-Achse befinden sich die Anzahl der Revertanten, die durch das Auszählen der inkubierten Minimal-Glucose Agar Platten ermittelt wurden. Um die Interpretation der nichtstatistischen Analyse zu erleichtern wurde auch der Wert der doppelten Negativkontrolle in das Diagramm eingefügt, der beim Überschreiten und gegebener Konzentrationsabhängigkeit einen Hinweis auf mutagenes Potential gibt.

Abbildung 111 zeigt die Resultate der Substanzen Diosgenin, Escin und  $\alpha$ -Solanin und Abbildung 112 Hederacosid C, Digitonin und die Oleanolsäure. Alle ermittelten Revertanzahlen waren bei den getesteten Saponinen signifikant niedriger als die Werte der Positivkontrolle ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 111: Resultate des TA 98\_ohne S9 der Substanzen Diosgenin, Escin und  $\alpha$ -Solanin**

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Beim Ames Test mit dem Bakterienstamm TA 98 ohne S9 lagen die Mittelwerte aller Substanzen in den jeweils sechs Konzentrationen deutlich unter dem doppelten Wert der Negativkontrolle. Zusätzlich konnte bei den eingesetzten Testsaponinen kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Konzentrationen eruiert und dadurch auch keine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden. Infolgedessen sind alle sechs verwendeten Saponine im Ansatz TA 98 ohne metabolischer Aktivierung als nicht mutagen einzustufen.

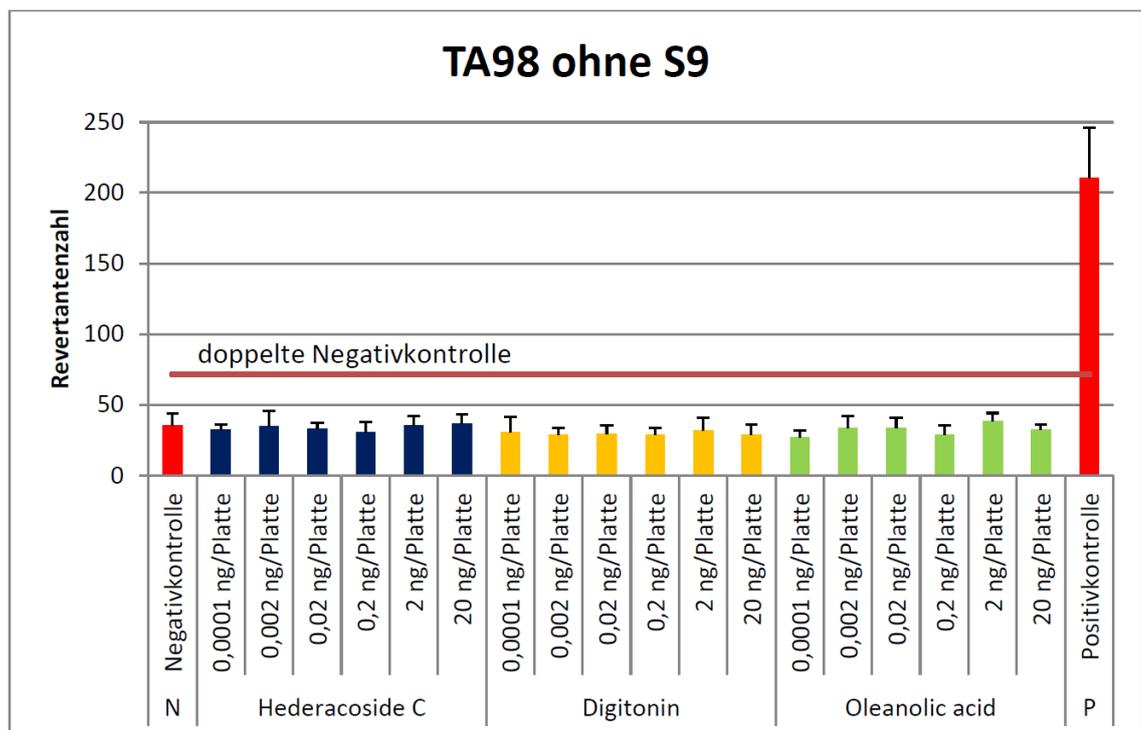


Abb. 112: Resultate des TA 98\_ohne S9 der Substanzen Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure

### 4.3.1.2. Resultate des *Salmonella typhimurium* Stamms TA 98 mit S9

Die folgenden Grafiken (Abb. 113 und 114) stellen die Testergebnisse des *Salmonella typhimurium* Stamms TA 98 mit S9-Zusatz zur metabolischen Aktivierung dar. Auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle und eine Konzentrationsabhängigkeit konnte ebenso nicht beobachtet werden. Im Mittel lagen die Revertanzahlen jedoch etwas höher als im Vergleich zum Testansatz TA 98 ohne metabolische Aktivierung.

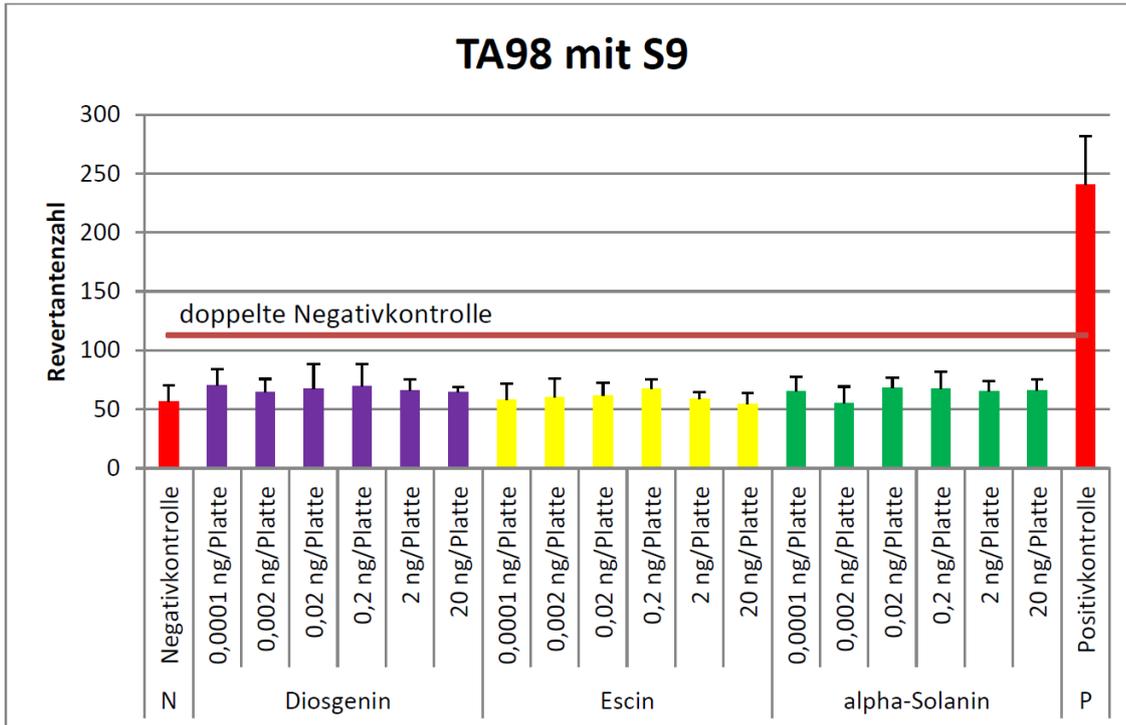


Abb. 113: Resultate des TA 98\_mit S9 der Substanzen Diosgenin, Escin und  $\alpha$ -Solaniin

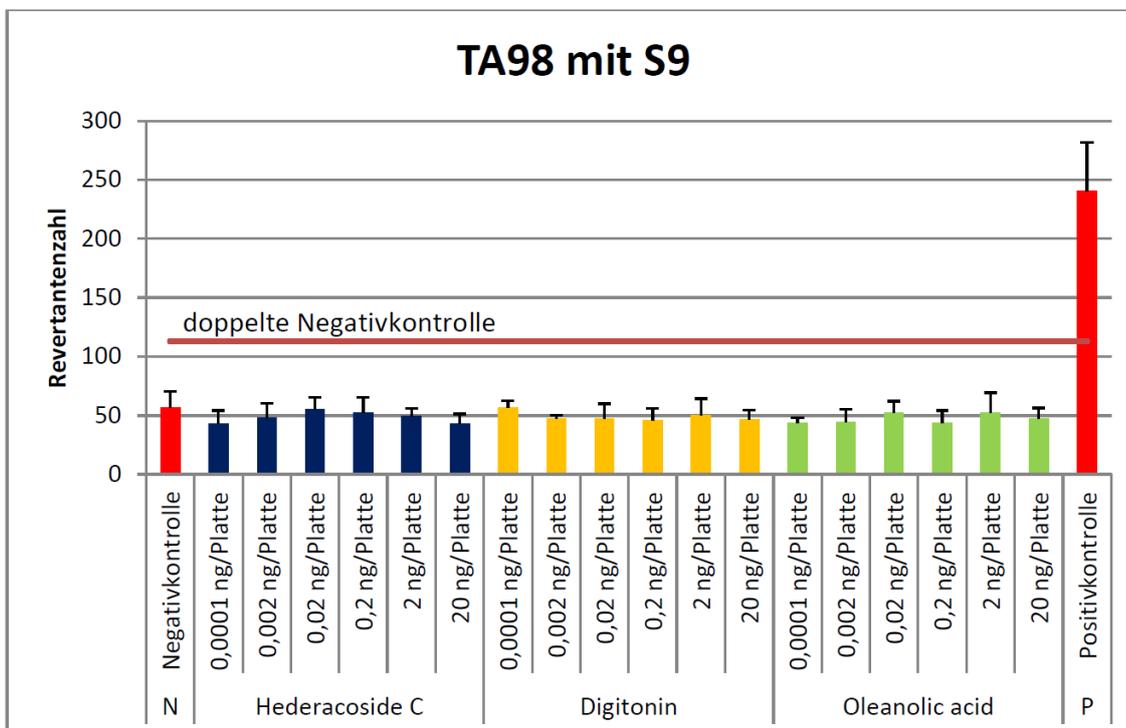


Abb. 114: Resultate des TA 98\_mit S9 der Substanzen Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

---

Alle sechs getesteten Saponine waren signifikant niedriger als die Positivkontrolle ( $p < 0,001$ ) und es gab auch beim Vergleich der Substanzen untereinander keine signifikanten Unterschiede, obwohl die Saponine Diosgenin, Escin und  $\alpha$ -Solanin etwas höhere Werte aufwiesen. Wie auch beim Testansatz ohne metabolischer Aktivierung konnte auch hier keine mutagene Wirkung festgestellt werden.

### **4.3.1.3. Resultate des *Salmonella typhimurium* Stamms TA 102 ohne S9**

Bereits in der Tabelle 45 ist ersichtlich, dass beim Teststamm TA 102 ohne und mit metabolischer Aktivierung bei einigen getesteten Konzentrationen ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Negativkontrolle beobachtet werden konnte. Beim TA 102 ohne S9-Mix ist dies bei je 2 Konzentrationen der Saponine Escin und  $\alpha$ -Solanin der Fall. Die Signifikanzen waren jedoch für die mutagene Bewertung der Substanzen nicht von Belang, da alle Werte signifikant ( $p < 0,001$ ) niedriger waren als die Positivkontrolle und es auch keinen konzentrationsabhängigen Anstieg gab (Abb. 115 und 116). Aufgrund dessen konnte auch beim *Salmonella typhimurium* Stamm TA 102 ohne metabolischer Aktivierung weder mutagenes noch ein oxidatives Potential bei allen untersuchten Saponinen nachgewiesen werden.

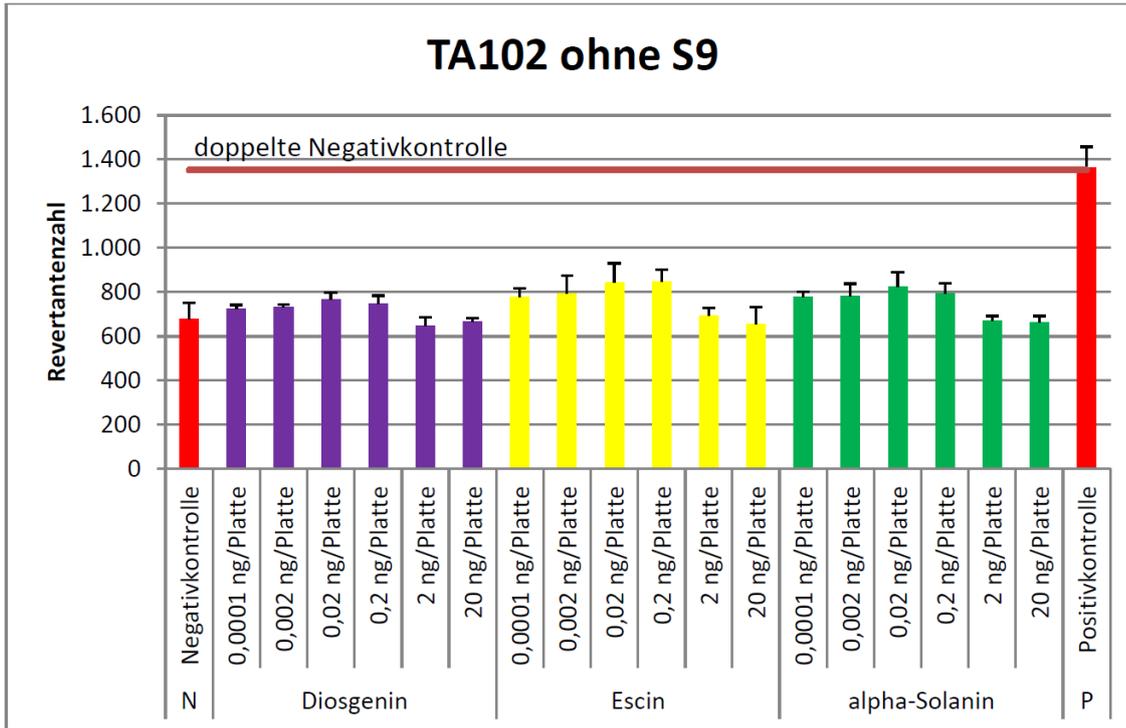


Abb. 115: Resultate des TA 102\_ohne S9 der Substanzen Diosgenin, Escin und  $\alpha$ -Solamin

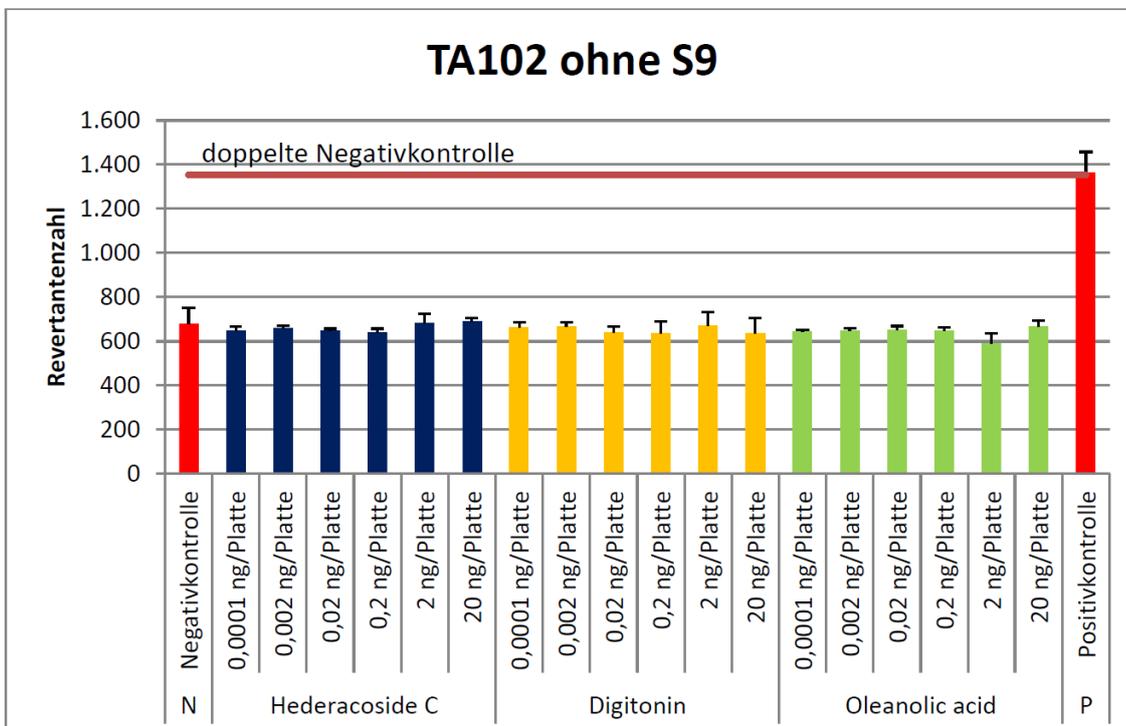


Abb. 116: Resultate des TA 102\_ohne S9 der Substanzen Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.3.1.4. Resultate des *Salmonella typhimurium* Stamms TA 102 mit S9

Beim Bakterienstamm TA 102 mit S9 zur metabolischen Aktivierung zeigte sich ein ähnliches Bild wie beim Testansatz ohne S9-Zugabe. Auch in dieser Testreihe gab es bei zwei getesteten Substanzen (Diosgenin und Escin) statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zur Negativkontrolle, jedoch lagen die Werte beide deutlich unterhalb der Kontrolle. Darum kann geschlossen werden, dass alle Substanzen in den sechs getesteten Konzentrationen keine mutagene oder oxidative Wirkung aufweisen.

Die Abbildungen 117 und 118 zeigen wiederum die Ergebnisse nochmals in graphischer Darstellung und es ist ersichtlich, dass sich alle Werte klar unter denen des doppelten Wertes der Negativ- und der Positivkontrolle befanden. Des Weiteren liegen alle Werte in einem ähnlichen Bereich und es konnte vor allem wieder keine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden. Abschließend betrachtet, weist keine der sechs getesteten Substanzen ein mutagenes beziehungsweise oxidatives Potential auf.

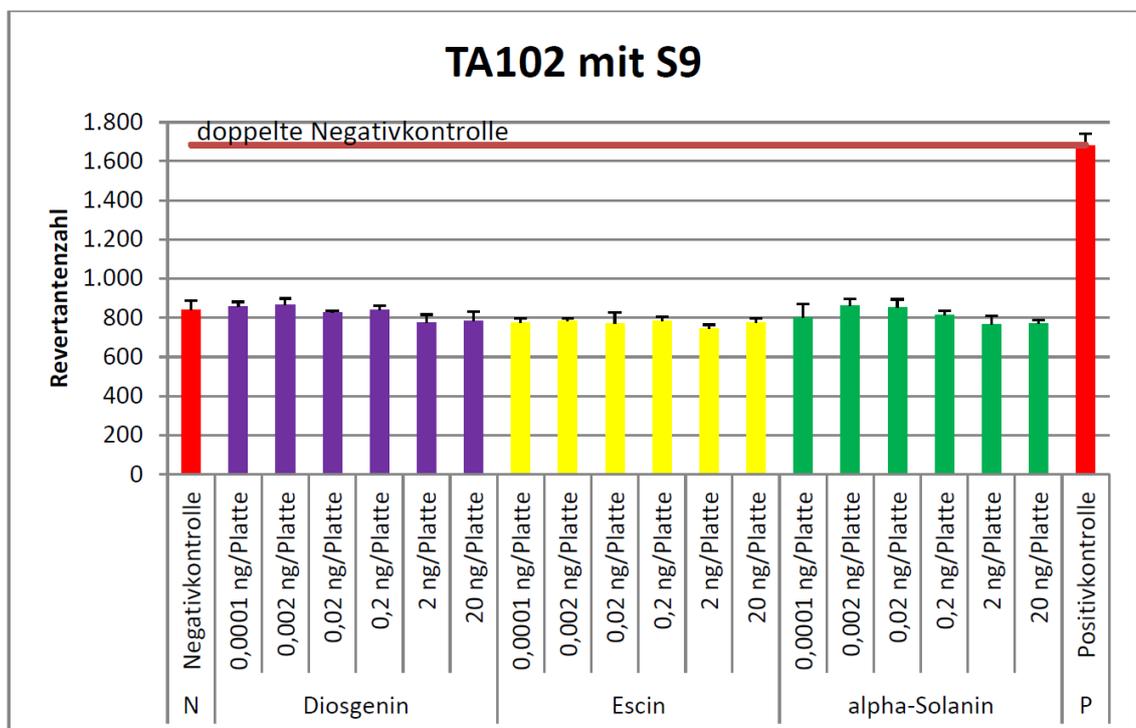


Abb. 117: Resultate des TA 102\_mit S9 der Substanzen Diosgenin, Escin und  $\alpha$ -Solanin

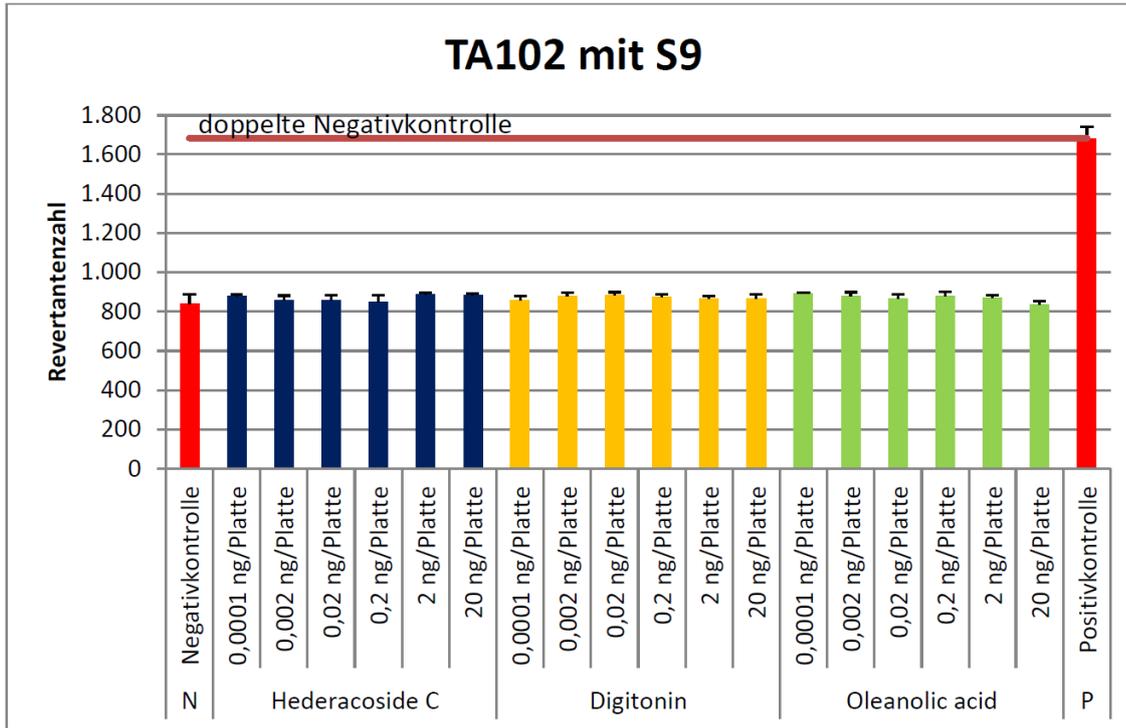


Abb. 118: Resultate des TA 102\_mit S9 der Substanzen Hederacosid C, Digitonin und Oleanolsäure

## 5. Conclusio

Bei Saponinen handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe von hochmolekularen Glykosiden, die aufgrund ihrer physikalisch-chemischen aber auch physiologischen Eigenschaften zu den sekundären Pflanzenstoffen zählen [VINCKEN et al., 2007; WATZL, 2001]. Ihre Verbreitung in der Vegetation ist sehr weitläufig, da sie natürlich in mehr als 100 Pflanzenfamilien und in einigen Meerestieren vorkommen [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995]. Sie wurden aus verschiedenen Pflanzenteilen isoliert und kommen vorwiegend in sehr nährstoffreichem Gewebe vor, weshalb sie in vielen Nahrungsmitteln enthalten sind. Dazu zählen Leguminosen, Alliumarten, Spargel, Spinat, Zuckerrüben, Yam, Hafer und Tee [VINCKEN et al., 2007; GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ und MAZZA, 2007]. Die Bioverfügbarkeit der Saponine ist jedoch sehr gering und liegt bei unter 3 % [PODOLACK et al., 2010; WATZL, 2001].

Ihre strukturelle Komplexität resultiert in einer Reihe physikalischer, chemischer und biologischer Eigenschaften. Saponine sind oberflächenaktive Substanzen, die eine reinigende Wirkung haben und stabile Schäume im wässrigen Medium bilden. Sie wirken hämolytisch, fischtoxisch, molluskizid und sind verantwortlich für die Bitterkeit mancher Lebensmittel. Des Weiteren wirken sie antimikrobiell, fungizid, antiviral, zytotoxisch und antimutagen. Aufgrund ihrer entzündungshemmenden, schleimlösenden, husten- und schmerzstillenden, fiebersenkenden Eigenschaften werden sie oft in Medikamenten verarbeitet [HOSTETTMANN und MARSTON, 1995; SPARG et al., 2004].

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 31 Immissionsmessstellen (Oberflächengewässer) und 3 Emissionsmessstellen (Abwässer) über einen Zeitraum von einem Jahr (März 2011 bis Mai 2012) beprobt. Diese 446 Oberflächenwasser- und 35 Abwasserproben wurden auf sechs ausgewählte Saponine mittels der dafür entwickelten und validierten LC-MS/MS-Analytik untersucht. Aufgrund der zu erwartenden geringen Konzentrationen war eine Probenvorbereitung zur Aufreinigung und

-konzentrierung notwendig. Das Mittel der Wahl waren hierfür die Festphasenextraktion für die Oberflächenwässer und die Flüssig-Flüssig-Extraktion für den Zu- bzw. Ablauf der ARA Ludesch und der Tagesmischprobe des Abwassers einer Textilfabrik. Die extrahierten Proben wurden dann mittels Flüssigkeitschromatographie (LC) aufgetrennt und mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) fragmentiert und detektiert.

Außerdem musste, aufgrund der allgemeinen Schwierigkeiten in der Analytik von Saponinen (geringe strukturelle Unterschiede, amphiphiler Charakter und das hohe Molekulargewicht) und der zu erwartenden niedrigen Saponinkonzentrationen in den Proben, die LC-MS/MS-Methode einen hohen Entwicklungsstand erreichen, um die größtmögliche Empfindlichkeit zu erlangen.

Bei den Messungen der Oberflächengewässer bestätigten sich die Erwartungen bezüglich der Gehalte an Saponinen in den Proben, denn diese waren zum größten Teil nicht nachweisbar (n.n.) oder kleiner als die Bestimmungsgrenze (< BG) des jeweiligen Analyten und somit nicht quantifizierbar. Unter allen 448 Messungen gab es nur 27 positive Messwerte, welche sich im niedrigen ng/L-Bereich befinden. Bei den drei Emissionsmessstellen zeigt sich ein ähnliches Bild, auch hier waren die meisten Saponine nicht nachweisbar oder kleiner der Bestimmungsgrenze. Von 35 Proben waren 12 Werte des Saponins Diosgenin positiv, wobei diese nur bei der Messstelle VBG – Zulauf ARA Ludesch gemessen wurden. Unter diesen Positivbefunden gab es 4 Werte welche im Bereich von 170 bis 425 ng/L lagen. Aufgrund der hohen strukturellen Vielfalt der Substanzgruppe der Saponine kann man obwohl man die ausgewählten Saponine nicht nachgewiesen oder nur in sehr geringen Spuren gemessen hat nicht ausschließen, dass andere Saponine in den Gewässern enthalten sind und zur Schaumbildung auf Oberflächengewässer beitragen.

WEGNER, 2001 untersuchte im Rahmen seiner Dissertation das Phänomen des Rheinfallschaums und die Zusammenhänge des Schaumauftretens mit dem Vorkommen der Wasserpflanze *Ranunculus fluitans* Lamk. (Flutenden Hahnenfuß). Er extrahierte aus der Pflanze die Saponine Hederagenin und die

## CONCLUSIO

---

Oleanolsäure und versuchte diese auch im Rheinwasser mittels LC-MS/MS zu detektieren. Mit Erfolg konnte er im Jahr 1998 Höchstkonzentrationen von bis zu 1600 ng/L und im Jahr 2000 etwas geringere Werte bis 500 ng/L nachweisen. Es war somit möglich einen Zusammenhang zwischen der vorhandenen Biomasse des flutenden Hahnenfußes und den gemessenen Saponinen zu finden und dadurch das hohe Schaumaufreten am Rheinfluss bei Schaffhausen zu erklären.

Um das Schäumungsvermögen der Oberflächengewässer zu klassifizieren wurde ein Schäumbarkeitstest das „Schäumungspotential“ entwickelt und alle auch mittels LC-MS/MS analysierten Proben damit gemessen. Dies geschah mit Hilfe einer Hartplastiksäule, wobei die Probe durch eine Sinterplatte mit einem vorgegebenen Stickstofffluss belüftet und die Gesamthöhe des Schaumes in Millimeter abgelesen wurde.

Insgesamt wurden dieselben 31 Immissionsmessstellen (446 Oberflächenwasserproben), die bereits für die Saponin Analyse verwendet wurden, auf ihr Schäumungsvermögen untersucht. Für die Auswertung und zur besseren Vergleichbarkeit wurden diese in 7 Kategorien aufgrund der verschiedenen Einflussquellen eingeteilt. Es gab zwei Hintergrundmessstellen, welche anthropogen unbeeinflusst und weitgehend naturbelassen waren. Alle weiteren Messstellen wurden entweder durch intensive Landwirtschaft, kommunale Kläranlagen, durch diverse Industriebetriebe oder einer Kombination der unterschiedlichen Einflussfaktoren beeinflusst. Obwohl dieser Schäumungstest für Oberflächengewässer entwickelt wurde, wurden auch die 3 Emissionsmessstellen der ARA Ludesch mit insgesamt 35 Proben auf ihr Schäumungspotential getestet und die Ergebnisse ausgewertet.

Vergleicht man die Werte der beiden Hintergrundmessstellen, welche anthropogen wenig beeinflusst sind, kann man signifikante Unterschiede erkennen. Der Halterbach in Wien schäumt deutlich mehr als der Reichramingbach in Oberösterreich, welcher sich im Hintergebirge befindet. Im Jahresverlauf ist ersichtlich, dass der Halterbach im April 2011 und zwischen den Monaten September 2011 und Februar 2012 das höchste

Schäumungspotential aufweist. Die Ergebnisse der restlichen Oberflächenwasserproben wurden nach Bundesländer sortiert verglichen und zeigten Mittelwerte zwischen 31,8 bis 86,8 mm Gesamthöhe. Anschließend wurden die 31 Immissionsmessstellen in 7 Belastungsquellen (Hintergrundmessstellen, Landwirtschaft, Kläranlage, LW+KA, Industrie, Industrie + KA und Sonstige) unterteilt und gegenübergestellt. Die beiden Hintergrundmessstellen unterschieden sich signifikant von allen Einflussquellen, außer der Gruppe Sonstige. Vergleicht man die Kategorien untereinander, finden sich auch hier signifikante Unterschiede. Ausgenommen zwischen den Gruppen LW vs. KA, LW vs. Industrie, LW vs. Industrie + KA, KA vs. Industrie, KA vs. Industrie + KA und Industrie vs. Industrie + KA. Obwohl das Schäumungspotential eigentlich als Test für Oberflächengewässer entwickelt wurde, konnten auch die Abwasserproben damit untersucht werden. Dazu zählen der Zu- und Ablauf der Kläranlage ARA Ludesch und der Tagesmischprobe des Textilbetriebs, welcher etwa 60 % des Zulaufes der Kläranlage ausmacht. Die erhaltenen Gesamthöhen beim Schäumungsversuch unterschieden sich deutlich von jenen der Oberflächengewässer. Hier wurden im Mittel Werte zwischen 272 und < 480 mm beobachtet und diese waren zu jeder Zeit höchst signifikant unterschiedlich zu allen Hintergrund- und Immissionsmessstellen.

Des Weiteren wurden die 6 ausgewählten Saponinstandardsubstanzen, in den Konzentrationen welche mittels LC-MS/MS in den 481 Realproben gemessen wurden, auch auf ihr Schäumungspotential untersucht. Hierfür wurden die Standardsubstanzen einzeln hinunterverdünnt und anschließend in 8 verschiedenen Konzentrationen (1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 und 500 ng/L) gelöst in MilliQ-Wasser auf ihre Schäumungsaktivität geprüft. Bei diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass es bei allen Substanzen in diesen geringen Mengen keinen Unterschied zum Leerwert gab und somit kein direkter Einfluss auf die Schäumungsaktivität der Proben gegeben war. Mögliche Einflussfaktoren wären andere natürliche und anthropogene oberflächenaktiv wirksame Substanzen, synthetische Tenside, Schwebstoffe, der Salzgehalt, usw.

## CONCLUSIO

---

Saponine können entsprechend Literaturangaben bei Fischen, Weichtieren und Parasiten toxisch wirken. Die Toxizität für Warmblütler ist abhängig von der Konzentration, der Herkunft, Art der Verabreichung und der Zusammensetzung der Saponinmischung [GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ und MAZZA, 2007]. In der vorliegenden Arbeit wurde deren toxikologische Relevanz mit Hilfe eines Bakterienkulturtests bewertet. Die im Ames Test verwendeten Konzentrationen resultieren aus den 446 Oberflächengewässerproben welche mittels LC-MS/MS auf die sechs ausgewählten Saponine (Digitonin, Diosgenin, Escin, Hederacosid C, die Oleanolsäure und das  $\alpha$ -Solanin) untersucht wurden. Um das mutagene beziehungsweise oxidative Potential zu erfassen wurde auf die seit Jahrzehnten bewährte, etablierte und validierte Methodik des Ames Tests zurückgegriffen.

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass das Digitonin in höheren Konzentrationen eine zytotoxische Wirkung aufweist und als Herzglykosid gilt [EID et al., 2012]. Ähnliche Effekte gibt es bei dem im Efeublatt enthaltenen Saponin dem Hederacosid C, wo es bei einer Intoxikation zu klinischen Symptomen kommen kann, da sie auf die glatte Muskulatur wirken [MENDEL et al., 2011; HOSTETTMANN und MARSTON, 1995]. Des Weiteren zählt das von der Kartoffelpflanze natürlich produzierte Glykoalkaloid  $\alpha$ -Solanin zu den toxischen Saponinen. Aufgrund der geringen Datenlage wurden dafür bisher noch keine Grenzwerte (TDI- und NOAEL-Wert) festgelegt [MENSINGA et al., 2005; ZYWICKI et al., 2005].

Alle gefundenen Studien, welche Saponine mittels Ames Test untersuchten, arbeiteten mit saponinhaltigen Pflanzenextrakten die meist als Mischung mehrerer Saponine und keine Reinsubstanzen waren. RAMOS et al., 1998 überprüften in ihrer Arbeit etwa die Extrakte der *Calendula officinalis* L. auf deren Mutagenität/Antimutagenität. Das Steroidsaponin DT-13 wurde von MA et al., 2011 ebenso mit dem Bakterienrückmutationstest getestet.

Es handelt sich hierbei um einen Kurzzeit-Bakterienrückmutationstest, der im Jahre 1964 vom Biochemiker Bruce Ames etabliert wurde. Der große Vorteil dieses in-vitro Tests ist die schnelle und kostengünstige Durchführung. Da einige Substanzen ihre mutagene Wirkung erst durch eine Metabolisierung in

der Leber entfalten können und ein solches exogenes Aktivierungssystem den Bakterienstämmen gänzlich fehlt, geschieht dies durch die Zugabe des Rattenleberhomogenats (S9-MIX) [MORTELMANS und ZEIGER, 2000].

Die sechs ausgewählten Saponine wurden aufgrund ihrer Löslichkeit in Methanol-Wasser Gemischen (0,5 µl/ml MeOH in der höchsten verwendeten Konzentration) gelöst und waren ident mit den Ausgangssubstanzen die in der LC-MS/MS-Analytik für die Standardkalibration verwendet wurden. Die Ergebnisse dieser Messungen, dienten als Grundlage für den im Ames Test verwendeten Konzentrationsbereich (0,00038 bis 100 ng/ml). Alle verwendeten Saponine wurden mit den *Salmonella Typhimurium* Stämmen TA 98 und TA 102 in sechs verschiedenen Konzentrationen (0,0001; 0,002; 0,02; 0,2; 2 und 20 ng/Platte) in Verwendung des Präinkubationstests ohne und mit metabolischer Aktivierung getestet. Vor Beginn dieser Tests wurden die vorhandenen Bakterienstämme mittels genetischer Analyse auf ihre Funktionalität und die Anzahl der Spontanrevertanten überprüft.

Die erhaltenen Daten wurden mit dem nichtparametrischen KOLMOGOROV-SMIRNOV-Test (K-S-Test) auf Normalverteilung geprüft und darauffolgend eine einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Analysis of Variance) als Prüfung auf Unterschiede der Werte durchgeführt. Des Weiteren wurden die Daten aus den Mutagenitätstests mit der nicht-statistischen Beurteilung nach MORTELMANS und ZEIGER, 2000 ausgewertet.

Die Testergebnisse des *S. Typhimurium* Stamms TA 98 ohne metabolischer Aktivierung zeigten, dass es bei allen sechs getesteten Saponinen keinen signifikanten Unterschied zwischen den sechs überprüften Konzentrationen und der Negativkontrolle gab. Alle Mittelwerte der beiden Testansätze und der drei Wiederholungen (Platten) pro Substanz lagen deutlich unter dem doppelten Wert der Negativkontrolle, der zur nicht-statistischen Auswertung errechnet wurde. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei dem TA 98-Testansatz mit S9-Mix-Zugabe zur metabolischen Aktivierung. Es gab wiederum keinen Unterschied zwischen den ermittelten durchschnittlichen Revertanzahlen der sechs Testsubstanzen und der dazugehörigen Negativkontrollen. Es wurde lediglich beobachtet, dass diese Werte im Mittel etwas höher waren im Vergleich zum

## CONCLUSIO

---

Testansatz ohne S9-Mix, was an der Zugabe des Rattenleberhomogenats lag. Da weder im TA 98-Testansatz ohne noch mit metabolischer Aktivierung Unterschiede zur Negativkontrolle zu beobachten waren und infolgedessen auch keine Konzentrationsabhängigkeit gegeben war, sind alle sechs überprüften Saponine in beiden Mutagenitätstests mit dem Bakterienstamm TA 98 als nicht mutagen einzustufen.

Um diese sechs Saponine auch auf ihr oxidatives Potential zu testen wurde ein zweiter Bakterienstamm der *Salmonella Typhimurium* TA 102 verwendet. Auch dieser wurde im Doppelansatz ohne und mit metabolischer Aktivierung durchgeführt. Beim TA 102 ohne S9-Zugabe zeigte sich, dass bei einigen getesteten Konzentrationen ein statistisch signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied bei den Revertanzahlen im Vergleich zu der Negativkontrolle ermittelt werden konnte. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf das Endergebnis der nicht-statistischen Bewertung, da die getesteten Konzentrationen weit unter der errechneten doppelten Negativkontrolle lagen und somit als nicht oxidativ bezeichnet werden können. Wie auch beim TA 98 zeigte der Testansatz mit metabolischer Aktivierung ein ähnliches Bild wie jener ohne S9. Es gab vereinzelt statistisch signifikante ( $p < 0,001$ ) Ergebnisse beim Vergleich der Werte der sechs untersuchten Konzentrationen mit der Negativkontrolle, jedoch keinen zum errechneten doppelten Wert. Generell waren alle Daten sehr homogen und die Revertanzahlen wieder mit S9-Aktivierung höher als ohne. Nach der Methode von MORTELMANS und ZEIGER, 2000 wurden auch hier keine Unterschiede zur den Negativkontrollen und keine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet. Folglich konnten die getesteten Saponine in den verwendeten Konzentrationen als nicht mutagen oder oxidativ wirksam eingestuft werden.

Im Zuge der toxikologischen Beurteilung der ausgewählten Saponine kann zusammengefasst werden, dass keine der sechs überprüften Substanzen in den getesteten Konzentrationen ein mutagenes beziehungsweise oxidatives Potential aufwies. Die in den LC-MS/MS-Messungen ermittelten Werte in den Oberflächengewässern haben somit keine bedenklichen Auswirkungen auf den menschlichen Organismus.

## 6. Zusammenfassung

Saponine sind nichtflüchtige oberflächenaktive Substanzen, welche durch den amphiphilen Charakter des Moleküls für das Seifverhalten bzw. die Schaumbildung in wässrigen Lösungen verantwortlich sind. Als in Pflanzen vorkommende Glykoside zählen sie zu den sekundären Pflanzenstoffen und einige dieser Verbindungen wirken toxisch.

Ziel der vorliegenden Studie war es eine Spurenanalytik zur Analyse von Saponinen in Gewässern zu entwickeln. Hierfür wurden über einen Zeitraum von einem Jahr (März 2011 bis Mai 2012) insgesamt 31 Immissions- und 3 Emissionsmessstellen beprobt. Diese 448 Oberflächenwasser- und 35 Abwasserproben wurden auf sechs ausgewählte Saponine (Diosgenin, Digitonin, Escin, Hederacosid C,  $\alpha$ -Solanin und die Oleanolsäure) mittels Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) untersucht. Aufgrund der zu erwartenden niedrigen Saponinkonzentrationen in den Proben mussten diese vor der Analytik durch eine Probenvorbereitung aufkonzentriert und gereinigt werden. Dies geschah bei den Oberflächenwässern über die Festphasen-Extraktion und bei den weitaus höher belasteten verunreinigten Abwässern war die Flüssig-Flüssig-Extraktion das Mittel der Wahl. Nach einer für diese Aufgabe geeigneten Methodenentwicklung einer Spurenanalytik wurden alle Proben aufgearbeitet und analysiert. Bei den Oberflächengewässern, zu denen auch die beiden Hintergrundmessstellen gehören, waren die meisten Saponine nicht nachweisbar oder kleiner der Bestimmungsgrenze und somit nicht quantifizierbar. Insgesamt konnten nur 27 positive Messwerte bis zu 100 ng/L im Jahresverlauf detektiert werden, wobei diese eher im ersten Drittel der Probenahme lagen (März bis August 2011). Analog zu den Immissionsproben wurden der Zu- und Ablauf einer Kläranlage und die Tagesmischprobe des Abwassers einer Textilfabrik beprobt und nach einer Probenvorbereitung mittels LC-MS/MS gemessen. In allen drei Abwassermessstellen konnten die Saponine

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Diosgenin und  $\alpha$ -Solanin nachgewiesen werden. Wobei beim Zulauf während des gesamten Jahresverlaufs das Diosgenin positiv mit Konzentrationen bis zu 423 ng/L detektiert wurde.

Des Weiteren wurde ein Schäumungstest für Oberflächengewässer gemeinsam mit der TU Wien entwickelt und die Proben der Jahresreihe inkl. den Abwasserproben damit gemessen. Die untersuchten Proben wurden einzeln, aber auch in Gruppen, die sich aufgrund der verschiedenen Belastungsquellen einteilen ließen, ausgewertet. Allgemein gesprochen konnte ein höchst signifikanter Unterschied ( $p = 0,000$ ) zwischen den Immissions- und Emissionsproben festgestellt werden, unabhängig davon welcher Einfluss vorlag. Es wurden bei den meisten Probenahmestellen auch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zu den Hintergrundmessstellen, welche weitgehend unbelastet waren gefunden. Bei Gewässern welche vor und nach einer Einflussquelle beprobt wurden, konnten nach der Einleitung eines Betriebes eine höhere Schäumbarkeit dieser festgestellt werden. Es gibt also eine Vielzahl an natürlichen und anthropogenen Ursachen, welche eine Schaumbildung hervorrufen und es ist meist ein Zusammenspiel von vielen Faktoren welche im Endeffekt für Schäume auf Oberflächengewässer verantwortlich sind. Aus den Schäumbarkeitstests ist jedoch deutlich ersichtlich, dass gerade Abwasser mit hohem organischem Anteil das Schaumverhalten von Fließgewässer deutlich prägen kann.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit das mutagene beziehungsweise oxidative Potential der sechs ausgewählten oben erwähnten Saponine mittels Ames Test experimentell geprüft. Die Standardsubstanzen wurden in einem Methanol-Wassergemisch gelöst und in sechs Konzentrationen (0,0001; 0,002; 0,02; 0,2; 2 und 20 ng/Platte) mit den *Salmonella typhimurium* Stämmen TA 98 und TA 102 sowohl ohne als auch mit metabolischer Aktivierung mittels eines Rattenleberhomogenats (S9-Mix) getestet. Der verwendete Konzentrationsbereich wurde aufgrund der LC-MS/MS Ergebnisse der Oberflächen- und Abwässer der Jahresreihe gewählt. Vor Beginn der

verschiedenen Tests wurden die Bakterienstämme mittels Genetischer Analyse auf ihre Funktionalität geprüft. Die Ergebnisse aller durchgeführten Tests (TA 98 und TA 102 ohne und mit S9-Mix) zeigten, dass alle überprüften Saponine in den unterschiedlichen Konzentrationen sich zwar von den jeweiligen Positivkontrollen ( $p = 0,000$ ) aber nicht von den Negativkontrollen unterschieden. Die Mittelwerte lagen deutlich unter dem doppelten Wert der Negativkontrolle, welcher als Grenze für die nichtstatistische Auswertung des Tests nach MORTELMANS und ZEIGER, 2000 herangezogen wurde. Vergleicht man die Konzentrationen der getesteten Saponine konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied eruiert werden und somit war auch keine Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten. Summa summarum konnte bei keiner der sechs überprüften Substanzen eine Mutagenität beziehungsweise Oxidativität im *in vitro*-Test nachgewiesen werden.

## 7. Summary

Saponins are a structurally diverse class of natural glycosides and widely distributed in the plant kingdom. They are generally known as non-volatile, surface-active compounds and belong to the group of phytochemicals. Saponins consist of non-polar aglycones coupled with one or more monosaccharide moieties (glycone). The combination of these structural elements in their molecules explains their soap-like behaviour in aqueous solutions. Saponins possess a wide range of physicochemical or biological properties including cytotoxic activity.

The aim of the present study was to develop a method to analyse Saponins in water samples. Therefore 31 immission and 3 emission monitoring sites were sampled over a period of one year (March 2011 to Mai 2012). These 448 surface water and 35 wastewater samples were analysed using liquid chromatography coupled with tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS). Six selected Saponins (aescin, digitonin, diosgenin, hederacoside C,  $\alpha$ -solanine and oleanolic acid) were detected and quantified. Due to the very low expected concentrations in these samples, the sample preparation had to accumulate and clean the waters ahead of analysis. For surface waters the solid phase extraction was the method of choice and the higher polluted wastewaters were prepared with liquid-liquid extraction. Previously, method development for an adequate LC-MS/MS analysis with the perfect conditions was initialised before sample preparation and quantitation. Saponins were identified through their corresponding mass-to-charge ratio and were verified by accurate mass, tandem mass and retention times of available associated standard Saponins.

The results of surface water samples and the two biogenic influenced discharge sites showed that most of the six detected Saponins are unverifiable or less than limit of quantitation (LOQ). Overall, only 27 positive measurements up to 100 ng/L could be observed during the course of one year, whereas these values were found in the first third of the sampling (March to August 2011).

Analogous to the immission samples the wastewater (intake and effluent) of a sewage plant and the emissions of a textile factory were sampled and measured after liquid-liquid extraction using LC-MS/MS. In all wastewater samples the Saponin diosgenin and  $\alpha$ -solanine could be verified, whereas in the afflux of the sewage positive values up to 423 ng/L of diosgenin could be detected during the year.

Although we focused on the most important Saponins and we cannot exclude that there are other Saponin structures in the analysed samples, since they represent a structurally diverse compound class.

In addition a test concerning the foaming properties of surface waters was generated in cooperation with the University of Technology Vienna and all water and wastewater samples were analysed with this foam ability test. The test was performed in a plastic column and one litre of a sample was ventilated with nitrogen from below. The height of the whitecap in millimetre was read out and compared by ones and divided into classes concerning the source of impact. Generally, there is a significant difference ( $p = 0.000$ ) between the heights of surface water and wastewater samples. Furthermore there are significant differences ( $p < 0.05$ ) when comparing surface waters and waters which are biogenic influenced like Reichramingbach and Halterbach. Measuring points before and after a source of influence (e.g. tanneries, several types of industry) showed variations of foam ability. This phenomenon indicates anthropogenic influence. There are a variety of natural and anthropogenic reasons which causes foam formation on surface waters and it is usually a strong interaction of them. The foam ability tests showed that especially wastewater can influence the balance of flowing waters negatively.

Additionally the mutagenic and oxidative potential of the six selected Saponins (aescin, digitonin, diosgenin, hederacoside C,  $\alpha$ -solanine and oleanolic acid) were evaluated with the Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. The Ames test is a short-term bacterial reverse mutation assay conceived to detect a wide range of chemical compounds that can produce genetic damage that

## SUMMARY

---

leads to gene mutations. In the present study the *Salmonella* strains TA 98 and TA 102 with and without metabolic activation (rat liver homogenate) was used. The Saponin samples were dissolved in a water-methanol mixture and tested in six concentrations (0.0001; 0.002; 0.02; 0.2; 2 and 20 ng/plate). The used concentration range was adjusted to the LC-MS/MS results of Saponins, which was quantified in the investigated surface waters samples. Previously, the quality of both bacterial strains TA 98 and TA 102 was confirmed by genetic analyses tested for their genetic integrity and spontaneous mutation rate.

The output of all executed tests (TA 98 and TA 102 with and without S9 microsomal fraction) showed that there is a significant difference to the positive but no difference to the negative control among all verified substances and concentrations at all time. In addition the mean values of all tested Saponins and concentrations were far below the doubled negative control value (characteristic spontaneous mutant frequency), which is a criterion in the non-statistical procedure by MORTELMANS and ZEIGER, 2000 to show mutagenicity. Further no significant difference and no dose-related increase in the number of revertant colonies could be observed in any of the substances. In conclusion, none of the analysed six Saponins showed a mutagenic or oxidative potential in the Ames test.

## 8. Literaturverzeichnis

AMES, B. N.; LEE, F. D.; DURSTON, W. E.: An Improved Bacterial Test System for the Detection. *Mutagens and Carcinogens* 1973; 70: 782-786

BALTES, W.; MATISSEK, R.: *Lebensmittelchemie*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2011

BARKER, J.: *Mass Spectrometry*. Second Edition, ACOI (University of Greenwich) & John Wiley & Sons. Chichester 2000: 1-3, 55-57, 74-75, 90-91, 320-323, 331-337

BHATTARAM, V. A.; GRAEFE, U.; KOHLERT, C.; VEIT, M.; DERENDORF, H.: Pharmacokinetics and Bioavailability of Herbal Medicinal Products. *Phytomedicine* 2002; 9: 1-33

BÖTTGER, S.; HOFMANN, K.; MELZIG, M. F.: Saponins can perturb biologic membranes and reduce the surface tension of aqueous solutions: A correlation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2012; 20: 2822-2828

BULMER, A. C.; RIED, K.; COOMBES, J. S.; BLANCHFIELD, J. T.; TOTH, I.; WAGNER, K.-H.: The anti-mutagenic and antioxidant effects of bile pigments in the Ames Salmonella test. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2007; 629: 122-132

CZERCZOT, H.; RAHDEN-STARON, I.; OLESZEK, W.; JURZYSTA, M.: Lack of mutagenic activity of saponins in the Ames test. *Acta Biochimica Polonica* 1993; 40: 74-76

DÖRFLER, H.-D.: *Grenzflächen- und Kolloidchemie*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1994

## LITERATURVERZEICHNIS

---

DRAXLER, A.; HOCHEDLINGER, G.; HUMER, F.; SCHARF, S.: Grundlagen zur Schaumproblematik in Fließgewässern. Umweltbundesamt GmbH, Wien 2009

EID, S. Y.; EL-READI, M. Z.; WINK, M.: Digitonin synergistically enhances the cytotoxicity of plant secondary metabolites in cancer cells. *Phytomedicine* 2012; 19: 1307-1314

FELIPE, M. B. M. C; DE CARVALHO, F. M.; FÉLIX-SILVA, J.; FERNANDES-PEDROSA, M. F., SCORTECCI, K. C.; ANGNEZ-LIMA, L. F.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S. R.: Evaluation of genotoxic and antioxidant activity of *Aesculus hippocastanum* L. (Sapindaceae) phytotherapeutic agent. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 2013; 3 (3): 261-266

GAILLARD, Y.; BLAISE, P.; DARRÉ, A.; BARBIER, T.; PÉPIN, G.: An Unusual Case of Death: Suffocation Caused by leaves of Common Ivy (*Hedera helix*). Detection of Hederacoside C,  $\alpha$ -Hederin and Hederagenin by LC-EI/MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology* 2003; 27 (4): 257-262

GEE, P.; MARON, D. M.; AMES, B. N.: Detection and classification of mutagens: A set of base-specific *Salmonella* tester strains. *Genetics* 1994; 91: 11606-11610

GLÖSL, S.; WAGNER, K.-H.; DRAXLER, A.; KANIAK, M.; LICHTENECKER, S.; SONNLEITNER, A.; SOMOZA, V.; ERBERSDOBLER, H.; ELMADFA, I.: Genotoxicity and mutagenicity of melanoidins isolated from a roasted glucose-glycine model in human lymphocyte cultures, intestinal Caco-2 cells and in the *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA102 applying the AMES test. *Food and Chemical Toxicology* 2004; 42: 1487–1495

GROSS, J. H.: Massenspektrometrie. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2013: 129-130, 447-450, 601-605

GUBANOV, I. A.; LIBIZOV, N. I.; GLADKIKH, A. S.: Search for saponin containing plants among flora of Central Asia and Southern Kazakhstan. Farmatsiya (Moscow) 1970; 19: 23-31

GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ, Ö.; MAZZA, G.: Saponins: Properties, applications and processing. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2007; 47: 231-258

HASSAN, S. M.; HAQ, A. U.; BYRD, J. A.; BERHOW, M. A.; CARTWRIGHT, A. L.; BAILEY, C. A.: Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal. Food Chemistry 2010; 119: 600-605

HEIN, H.; KUNZE, W.: Umweltanalytik mit Spektrometrie und Chromatographie. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1994: 97-102, 324-332

HILLENBRAND, T.; REIHLEN, A.; WEIß, M.: Substitution von PBT(persistent, bioakkumulierbar, toxisch)-Stoffen in Produkten und Prozessen - Leitfaden zur Anwendung umweltverträglicher Stoffe für die Hersteller und gewerblichen Anwender gewässerrelevanter Chemischer Produkte. Umweltbundesamt.de 2003

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A.: Saponins. Cambridge University Press, Cambridge 1995: 18-121, 232-306

HUNG, Y.-H.; HUANG, H.-Y.; CHOU, C.-C.: Mutagenic and antimutagenic effects of methanol extracts of unfermented and fermented black soybeans. Food Microbiology 2007; 118: 62-68

KALSCHEUR, K. N.; PENSKAR, R. R.; DALEY, A. D.; PECHAUER, S. M.; KELLY, J. J.; PETERSON, C. C.; GRAY, K. A.: Effects of anthropogenic inputs on the organic quality of urbanized streams. Water Research 2012; 46: 2515-2524

## LITERATURVERZEICHNIS

---

KREUML, M.; DRAXLER, A.; HOCHEDLINGER, G.; HUMER, F.: Grundlagen zur Schaumproblematik in Fließgewässern (Teil 2) – Tätigkeitsbericht 2011. Umweltbundesamt GmbH, Wien 2011

KREUML, M.; DRAXLER, A.; HOCHEDLINGER, G.; GABRIEL, O.; HUMER, F.: Grundlagen zur Schaumproblematik in Fließgewässern (Teil 2) – Endbericht 2012. Umweltbundesamt GmbH, Wien 2012

LEE, S. T.; STEGELMEIER, B. L.; GARDNER, D. R.: The isolation and identification of steroidal sapogenins in switchgrass. *Journal of Natural Toxins* 2001; 10: 273-281

LI, K.; TANG, Y.; FAWCETT, J. P.; GU, J.; ZHONG, D.: Characterization of the pharmacokinetics of dioscin in rat. *Steroids* 2005; 70: 525-530

LIU, J.: Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology* 1995; 49: 57-68

MA, S.; KOU, J.; YU, B.: Safety evaluation of steroidal saponin DT-13 isolated from the tuber of *Liriope muscari* (Decne.) Baily. *Food and Chemical Toxicology* 2011; 49: 2243-2251

MAN, S.; GAO, W.; ZHANG, Y.; HUANG, L.; LIU, C.: Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia* 2010; 81: 703-714

MARON, D. M.; AMES, B. N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 1983; 113 (3-4): 173-215

MENDEL, M.; CHLOPECKA, M.; DZIEKAN, N.; WIECHETEK, M.: The effect of the whole extract of common ivy (*Hedera Helix*) leaves and selected active substances on the motoric activity of rat isolated stomach strips. *Journal of Ethnopharmacology* 2011; 134: 796-802

MENSINGA, T. T.; SIPS, A. J. A. M.; ROMPELBERG, C. J. M.; VAN TWILLERT, K.; MEULENBELT, J.; VAN DEN TOP, H. J.; VAN EGMOND, H. P.: Potato glycoalkaloids and adverse effects in humans: an ascending dose study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2005; 41: 66-72

MEYER, V.: Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie. 9. Auflage, Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim 2004: 9, 86, 105-106, 255-257, 265-269, 276-279

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E.: The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research* 2000; 455: 29-60

MÖLZER, C.: Anti-/Mutagenic and Anti-/Oxidative potential of heating products based on alanin, dextrin 10, glucose and maltose. Diplomarbeit, Universität Wien, 2007

MU, S.; TIAN, X., RUAN, Y.; LIU, Y.; BIAN, D.; MA, C.; YU, C. FENG, M.; WANG, F.; GAO, L.; ZHAO, J.-J.: Diosgenin induces apoptosis in IGF-1-stimulated human thyrocytes through two caspase-dependent pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012; 418: 347-352

OTTO, M.: Analytische Chemie. 4. Auflage, Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim 2011: 9-13, 18-25, 101, 274-277, 280-284, 291-292, 404-406, 457-459

POLLIER, J.; GOOSSENS, A.: Oleanolic Acid - Molecules of Interest. *Phytochemistry* 2012; 77: 10-15

## LITERATURVERZEICHNIS

---

PODOLAK, I.; GALANTY, A.; SOBOLEWSKA, D.: Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry* 2010; 9: 425-474

POMASSL, A.: Schaumbildung in Gewässern – Ursachen und Schaumpotential pflanzlicher Komponenten. Masterarbeit, Universität für Bodenkultur, Wien, 2012

QUARANTA, M. L.; MENDES, M. D.; MACKAY, A. A.: Similarities in effluent organic matter characteristics from Connecticut wastewater treatment plants. *Water Research* 2012; 46: 284-294

QIN, Y.; WU, X.; HUANG, W.; GONG, G.; LI, D.; HE, Y.; ZHAO, Y.: Acute toxicity and sub-chronic toxicity of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 2009; 126: 543-550

RAMOS, A.; EDREIRA, A.; VIZOSO, A.; BETANCOURT, J.; LÓPEZ, M.; DÉCALO, M.: Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L. *Journal of Ethnopharmacology* 1998; 61: 49-55

RATH, J.: Verhalten von ausgewählten Saponinen im Ames Test. Masterarbeit, Universität Wien, 2013

ROSARIO-ORTIZ, F. L.; SNYDER, S. A.; SUFFET, I. H.: Characterization of dissolved organic matter in drinking water sources impacted by multiple tributaries. *Water Research* 2007; 41: 4115-4128

RUZICKA, K.; GABRIEL, O.; BLETTERIE, U.; WINKLER, S.; ZESSNER, M.: Cause and effect relationship between foam formation and treated wastewater effluents in transboundary river. *Physics and Chemistry of the Earth* 2009; 34: 565-573

SAHIN, G.; VERMA, S. K.; GUREL, E.: Calcium and magnesium elimination enhances accumulation of cardenolides in callus cultures of endemic *Digitalis* species of Turkey. *Plant Physiology and Biochemistry* 2013; Vol. 73: 139-143

SAUVAIRE, Y.; RIBES, G.; BACCOU, J.-C.; LOUBATIERES-MARIANI, M.-M.: Implication of steroid saponins and sapogenins in the hypocholesterolemic effect of fenugreek. *Lipids* 1991; 26, No. 3: 191-197

SCHILLING, K.; BLETTERIE, U.; KROISS, H.; ZESSNER, M.: Adapting the Austrian Edict on wastewater emissions for tanneries as a consequence of foam formation on surface water. *Environmental Science & Policy* 2012; 23: 68-73

SCHILLING, K.; ZESSNER, M.: Foam in the aquatic environment. *Water Research* 2011; 45: 4355-4366

SIRTORI, C. R.: Aescin: Pharmacology, Pharmacokinetics and Therapeutic Profile. *Pharmacological Research* 2001, 44 (3): 183-193

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; Van STADEN, J.: Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 94: 219-243

VINCKEN, J.-P.; HENG, L.; De GROOT, A.; GRUPPEN, H.: Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 2007; 68: 275-297

WATZL, B.: Saponine. Charakteristik, Vorkommen, Aufnahme, Stoffwechsel, Wirkungen. *Ernährungs-Umschau* 48, 2001; 6: 251-253

WEAIRE, D. L.; HUTZLER, S.: *The Physics of Foams*. Oxford University Press. 1999: 6-13

## LITERATURVERZEICHNIS

---

WEGNER, C.: *Ranunculus fluitans* Lamk. und Rheinfallschaum – Zusammenhänge, Analytik und ökotoxikologische Bedeutung. Dissertation, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät der Friedrich-Schiller Universität Jena, 2001

WEGNER, C.; HAMBURGER, M.: Occurrence of Stable Foam in the Upper Rhine River Caused by Plant-Derived Surfactants. *Environmental Science Technology* 2002; 36: 3250-3256

WU, X.; LIU, L.; ZHANG, M.; WU, D.; WANG, Y.; SUN, Y.; FAWCETT, J. P.; GU, J.; ZHANG, J.: Simultaneous analysis of isomers of escin saponins in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to a pharmacokinetic study after oral administration. *Journal of Chromatography B* 2010; 878: 861-867

ZHOU, S., HAMBURGER, M.: Effects of solvent composition on molecular ion responds in electrospray mass spectrometry: Investigation of the ionisation process. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1995; 9: 1516-1521

ZYWICKI, B.; CATCHPOLE, G.; DRAPER, J.; FIEHN, O.: Comparison of rapid liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry methods for determination of glycoalkaloids in transgenic field-grown potatoes. *Analytical Biochemistry* 2005; 336: 178-186

INTERNETQUELLEN FÜR ABBILDUNGEN:

„Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.“

Abb. 17: <http://www.wolfredo.de/worldpress/?p=276> (abgerufen am: 14.07.2011)

Abb. 18: <http://de.wikipedia.org/wiki/Schaum> (abgerufen am: 14.07.2011)

Abb. 20: <http://www.substech.com/dokuwiki/doku.php?id=surfactants> (27.10.2011)

Abb. 21: <http://www.attension.com/applications/measurements/critical-micelle-concentration> (abgerufen am: 21.09.2012)

Tab. 1: <http://de.wikipedia.org/wiki/Tenside> (abgerufen am: 14.07.2011)

Abb. 24: [http://muniche.linde.com/international/web/lg/spg/like35lgspg.nsf/docbyalias/image\\_hplc](http://muniche.linde.com/international/web/lg/spg/like35lgspg.nsf/docbyalias/image_hplc) (abgerufen am: 11.01.2014)

Abb. 27: [http://www.analyticjournal.de/glossar\\_betraege\\_einzeln/massenspektrometrie.html](http://www.analyticjournal.de/glossar_betraege_einzeln/massenspektrometrie.html) (abgerufen am: 11.01.2014)

Abb. 34: [http://de.wikipedia.org/wiki/Nernstsches\\_Verteilungsgesetz](http://de.wikipedia.org/wiki/Nernstsches_Verteilungsgesetz) (abgerufen am: 29.05.2013)

Abb. 35: [http://www.agilent.com/about/newsroom/lasca/imagelibrary/index\\_2003.html](http://www.agilent.com/about/newsroom/lasca/imagelibrary/index_2003.html) & <http://www.krssltd.com/used-refurbished-mass-spectrometer/triple-quad/micromass-quattro-ultima> (abgerufen am: 05.11.2013)

## LITERATURVERZEICHNIS

---

Abb. 36: <http://www.bioon.com.cn/product/list.asp?sortid=37&typeid=707>  
(abgerufen am: 05.11.2013)

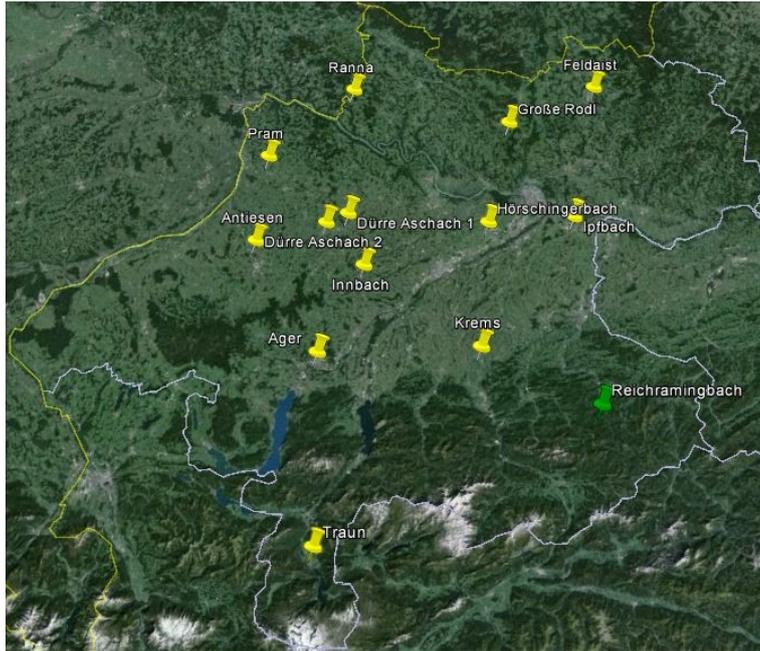
Abb. 93: <http://www.schmitzens-botanikseite.de/ranflu/ranflu2.htm> &  
<http://www.ibm.v.com/inside2002-047.html> (abgerufen am: 09.10.2013)

## 9. Anhang

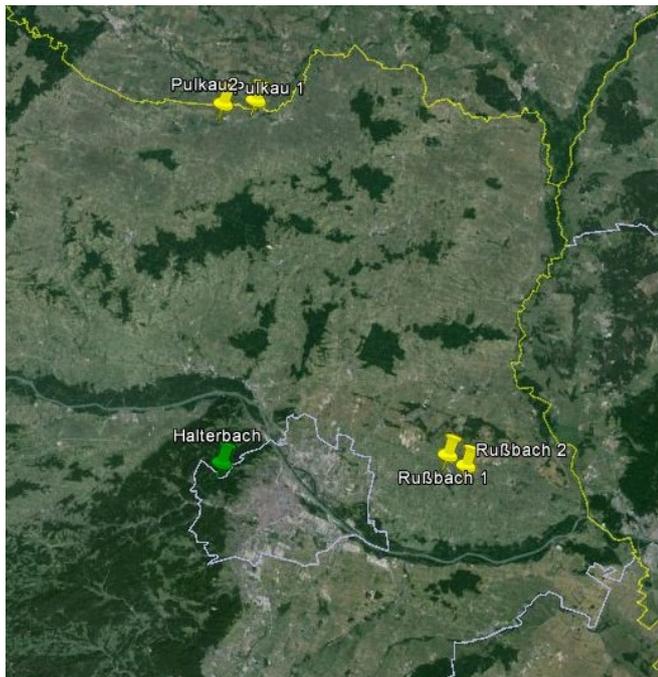
### 9.1. Probenahme-Messstellen



Abb. 119: Übersicht der Messstellen in Westösterreich



**Abb. 120: Übersicht der Messstellen in Oberösterreich**



**Abb. 121: Übersicht der Messstellen in Niederösterreich und Wien**

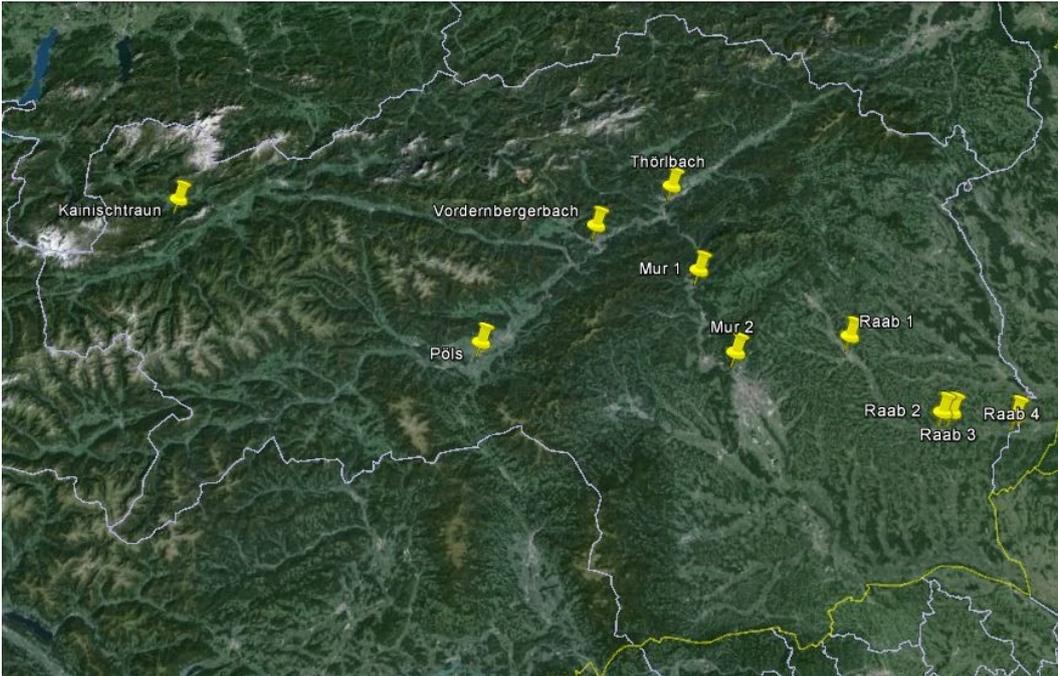


Abb. 122: Übersicht der Messstellen in der Steiermark

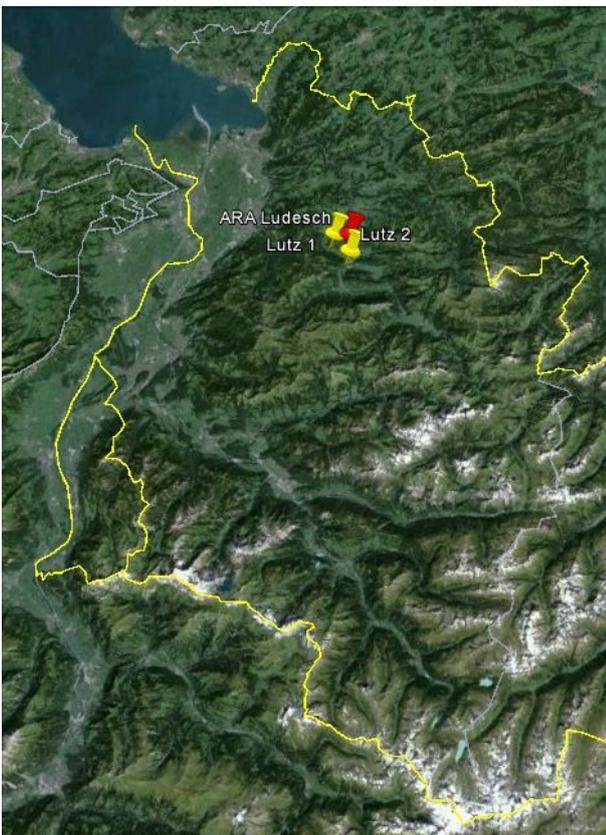


Abb. 123: Übersicht der Messstellen in Vorarlberg

## ANHANG

## 9.2. Pipettierschema zur Herstellung einer Kalibration

Standard-Bezeichnung	AS 1	AS 2	Sap 1	Sap 2	Sap 3	Sap 4	Sap 5	Sap 6	Sap 7	Sap 8	Sap 9	Sap 10	Sap 11	Sap 12	Sap 13	Sap 14
Herstellungsdatum	27.12.2011															
Herstellung Analytiker	Michaela Kreuml															
Endvolumen [ml]	1	3	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
Lösungsmittel	in MeOH															
Endkonzentration [ng/ml]	10000	1000	500	250	100	75	50	25	10	7.5	5	2.5	1	0.5	0.25	0.1
Stammlösungen	Menge	Menge	Menge	Menge	Menge	Menge	Menge	Menge	Menge	Menge	Menge	Menge	Menge	Menge	Menge	Menge
AS 1, 10 µg/ml in MeOH, 27.12.	100*	300														
AS 2, 1 µg/ml in MeOH, 27.12.			1000	250												
Sap 1, 500 ng/ml in MeOH, 27.12.					200	100	100	50	40	15						
Sap 7, 10 ng/ml in MeOH, 27.12.											500	250	100	50	25	10
Lösemittel MeOH	900	2700	1000	750	800	900	900	950	1960	985	500	750	900	950	975	990
Entsorgungsdatum																
Entsorgung Analytiker																

\* MIX-Ausgangsstandard = Digitonin, Diosgenin, Escin, Hederacosid C, Oleanolsäure und Solanin [c = 100 µg/ml]

Abb. 124: Pipettierschema zur Herstellung der Standardkalibration

## 9.3. Regelkarten für Kontrollstandards

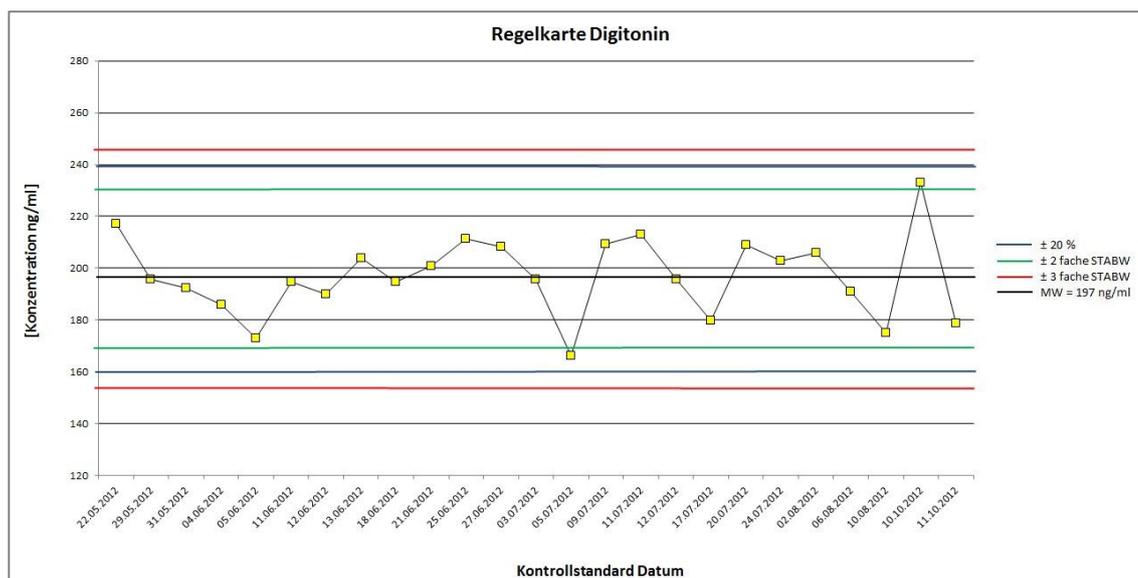


Abb. 125: Regelkarte für den Kontrollstandard Digitonin

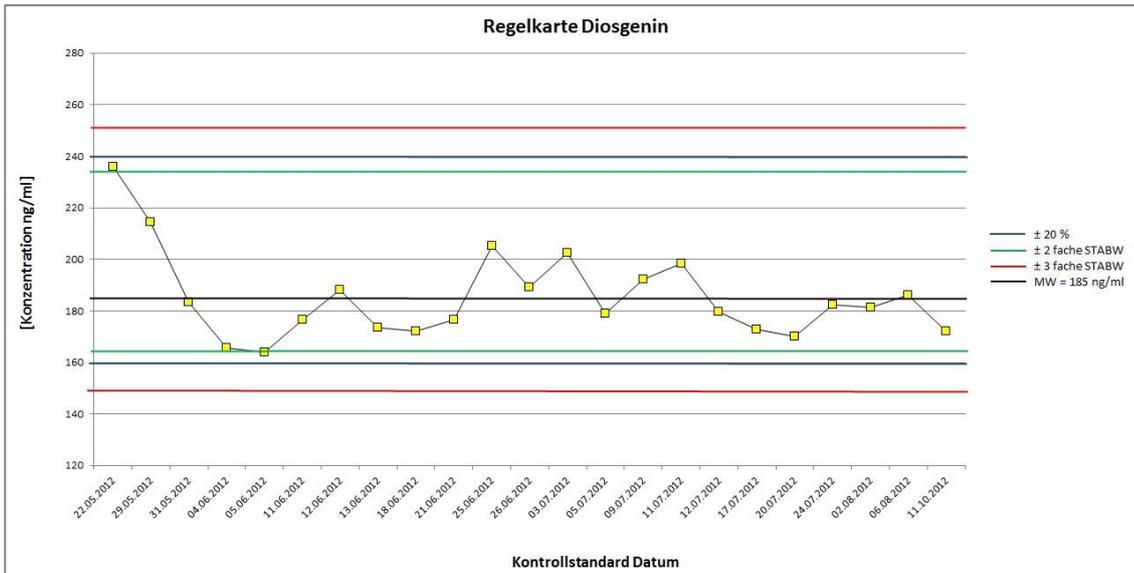


Abb. 126: Regelkarte für den Kontrollstandard Diosgenin

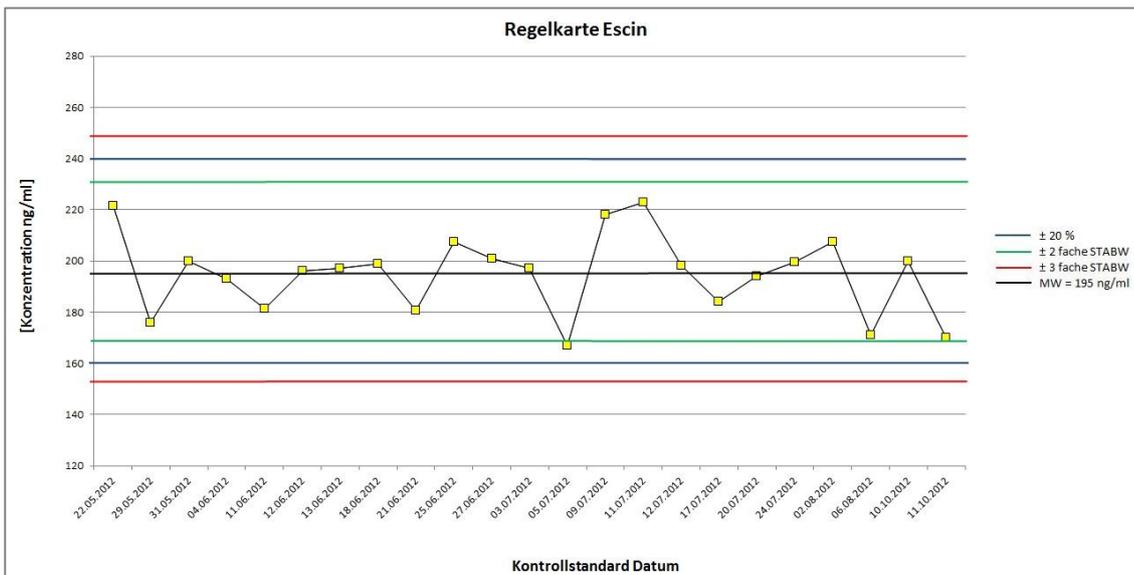


Abb. 127: Regelkarte für den Kontrollstandard Escin

## ANHANG

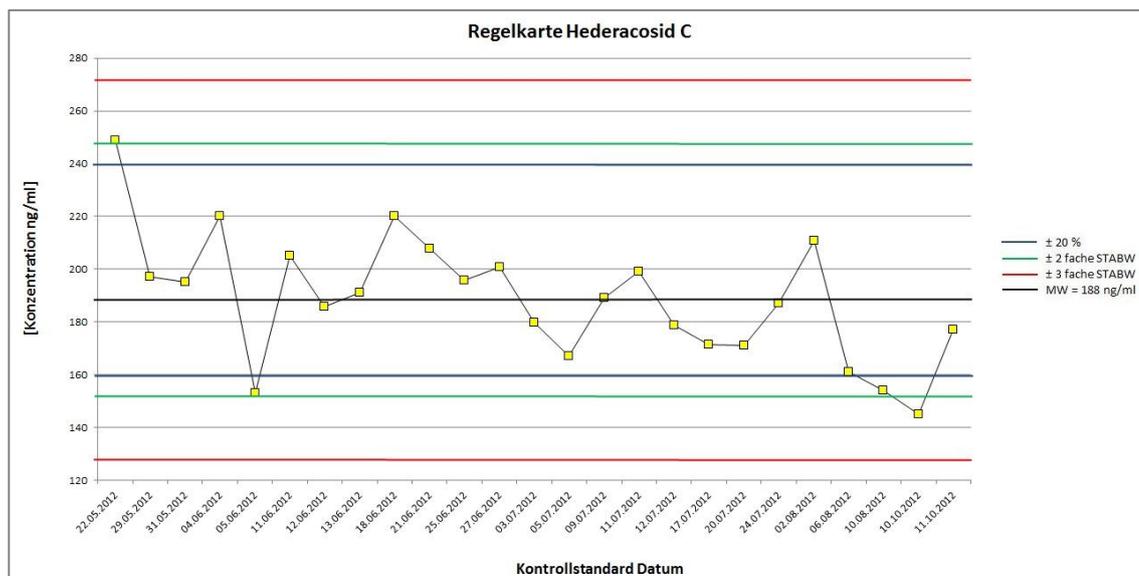


Abb. 128: Regelkarte für den Kontrollstandard Hederacosid C

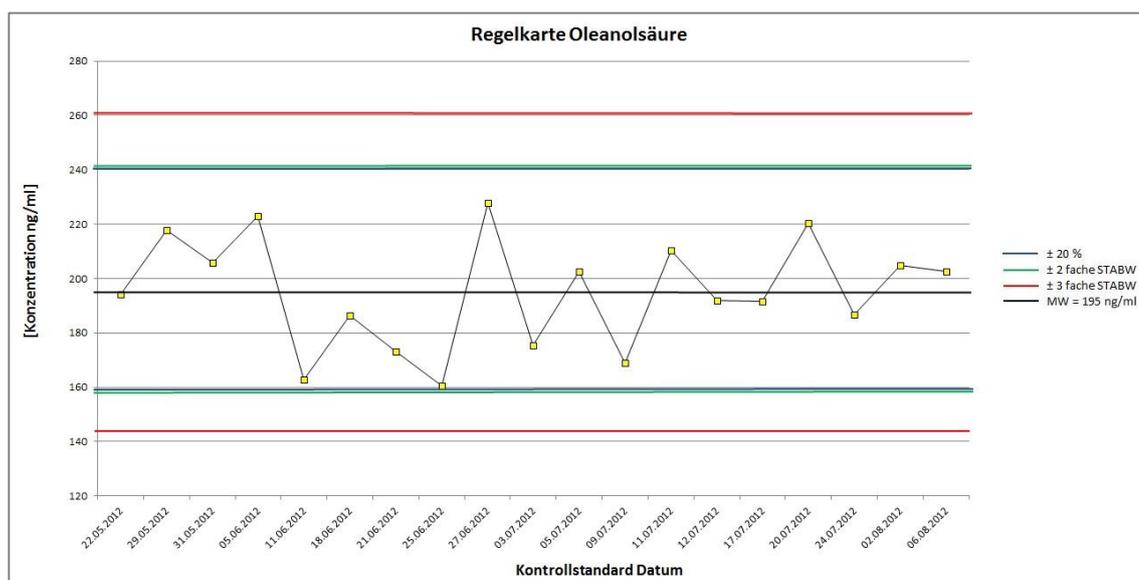
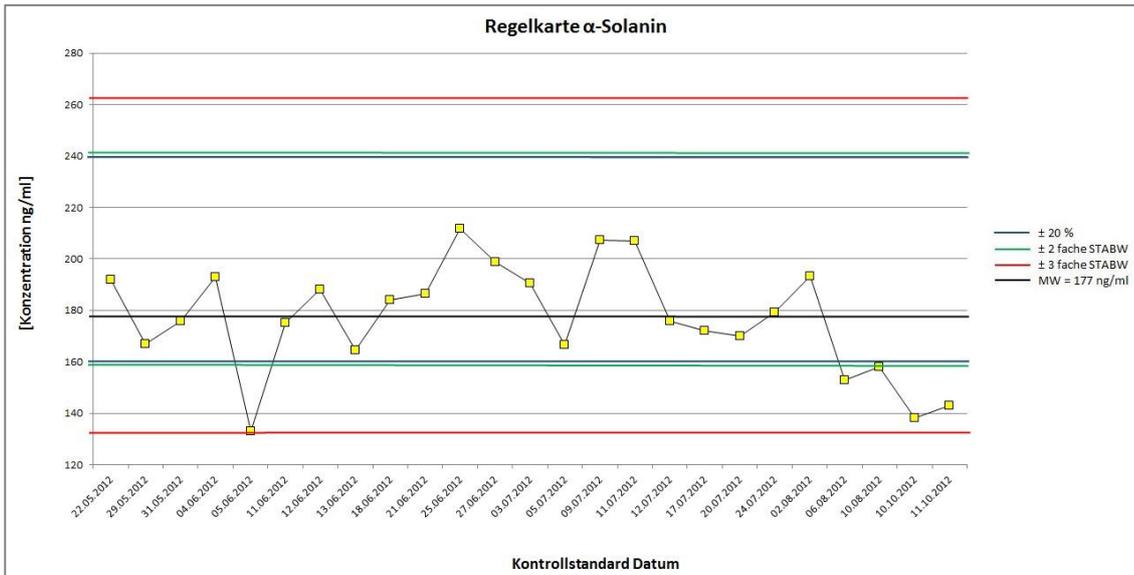


Abb. 129: Regelkarte für den Kontrollstandard Oleanolsäure



**Abb. 130: Regelkarte für den Kontrollstandard  $\alpha$ -Solanin**

## DATEN

## 10. Daten

## 10.1. Ergebnisse der LC-MS/MS Analytik

### 10.1.1. Ergebnisse der LC-MS/MS Messungen der Hintergrundmessstellen Reichramingbach (OÖ) und Halterbach (W)

Tab. 48: LC-MS/MS Ergebnisse der Hintergrundmessstelle Reichramingbach (RR) in OÖ

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
RR 1	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
RR 2	Mai 11	< 6,2	n.n.	n.n.	n.n.	< 6,5	n.n.
RR 3	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
RR 4	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
RR 5	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 4,9	n.n.
RR 6	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
RR 7	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
RR 8	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
RR 9	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
RR 10	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
RR 11	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
RR 12	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
RR 13	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
RR 14	Mai 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; &lt; Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 49: LC-MS/MS Ergebnisse der Hintergrundmessstelle Halterbach (HB) in Wien

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
HB 1	Mrz 11	n.n.	26	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
HB 2	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
HB 3	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 2,5	n.n.
HB 4	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
HB 5	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
HB 6	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
HB 7	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
HB 8	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
HB 9	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
HB 10	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
HB 11	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
HB 12	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 94
HB 13	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
HB 14	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; &lt; Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

### 10.1.2. Ergebnisse der LC-MS/MS Messungen der Oberflächengewässer der 4 Bundesländer (OÖ, NÖ, STMK und VBG)

Tab. 50: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Ager 3 - OÖ

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Ager 3	Apr 11	< 5,0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ager 3	Mai 11	<b>6,0</b>	n.n.	n.n.	< 10	<b>4,1</b>	n.n.
Ager 3	Mai 11	< 6,3	n.n.	n.n.	n.n.	< 3,3	n.n.
Ager 3	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ager 3	Jul 11	< 6,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ager 3	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ager 3	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ager 3	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 20
Ager 3	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ager 3	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ager 3	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	< 9,8	n.n.	n.n.
Ager 3	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ager 3	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	< 3,6	n.n.	n.n.
Ager 3	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ager 3	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; < Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 51: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Antiesen 4 - OÖ

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Antie 4	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 2,8	n.n.
Antie 4	Mai 11	n.n.	< 8,3	n.n.	n.n.	< 3,0	n.n.
Antie 4	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Antie 4	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Antie 4	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Antie 4	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Antie 4	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Antie 4	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Antie 4	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Antie 4	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 2,3	n.n.
Antie 4	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 27
Antie 4	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Antie 4	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Antie 4	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; < Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

## DATEN

Tab. 52: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Dürre Aschach 2 - OÖ

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
D. Asch 2	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 2	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 2	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 26
D. Asch 2	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 2	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 2	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 2	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 4,9	n.n.
D. Asch 2	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 2	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 2	Okt 11	< 6,5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 2	Nov 11	n.n.	< 24	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 2	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 5,6	n.n.
D. Asch 2	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 2	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 2	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 2	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	<b>7,5</b>	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; &lt; Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 53: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Dürre Aschach 3 - OÖ

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
D. Asch 3	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 3	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 4,6	n.n.
D. Asch 3	Apr 11	< 5,4	n.n.	n.n.	< 11	< 7,0	<b>34</b>
D. Asch 3	Mai 11	n.n.	<b>13</b>	n.n.	n.n.	< 4,1	n.n.
D. Asch 3	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 3	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 3	Aug 11	<b>60</b>	<b>68</b>	<b>43</b>	<b>24</b>	<b>7,3</b>	<b>46</b>
D. Asch 3	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 6,7	n.n.
D. Asch 3	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 3	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 3	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 3	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 3	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 3,4	n.n.
D. Asch 3	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D. Asch 3	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 3,4	n.n.
D. Asch 3	Apr 12	< 6,2	< 15	n.n.	n.n.	< 3,8	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; &lt; Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 54: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Feldaist 4 - OÖ

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Feldaist 4	Mrz 11	< 5,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldaist 4	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldaist 4	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	4,1	n.n.
Feldaist 4	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldaist 4	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldaist 4	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldaist 4	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldaist 4	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldaist 4	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	< 9,8	n.n.	n.n.
Feldaist 4	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldaist 4	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldaist 4	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 2,3	n.n.
Feldaist 4	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldaist 4	Mrz 12	n.n.	< 16	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldaist 4	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldaist 4	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; &lt; Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 55: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Große Rodl 3 - OÖ

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
G. Rodl 3	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
G. Rodl 3	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 4,3	n.n.
G. Rodl 3	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
G. Rodl 3	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	7,5	n.n.
G. Rodl 3	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
G. Rodl 3	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 5,6	n.n.
G. Rodl 3	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
G. Rodl 3	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 4,1	n.n.
G. Rodl 3	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
G. Rodl 3	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 4,9	n.n.
G. Rodl 3	Jan 12	n.n.	< 13	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
G. Rodl 3	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
G. Rodl 3	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 5,3	n.n.
G. Rodl 3	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; &lt; Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

## DATEN

Tab. 56: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Hörschingerbach 1 - OÖ

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
H. Bach 1	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 26
H. Bach 1	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
H. Bach 1	Apr 11			keine Probe vorhanden			
H. Bach 1	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 3,0	n.n.
H. Bach 1	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 36
H. Bach 1	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
H. Bach 1	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	<b>49</b>
H. Bach 1	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 57
H. Bach 1	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 20
H. Bach 1	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
H. Bach 1	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
H. Bach 1	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
H. Bach 1	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
H. Bach 1	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
H. Bach 1	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
H. Bach 1	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; &lt; Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 57: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Innbach 2 - OÖ

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Innbach 2	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Innbach 2	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Innbach 2	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 3,0	n.n.
Innbach 2	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Innbach 2	Jun 11	<b>13</b>	n.n.	n.n.	< 7,4	<b>5,0</b>	n.n.
Innbach 2	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Innbach 2	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Innbach 2	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Innbach 2	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Innbach 2	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Innbach 2	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Innbach 2	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Innbach 2	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Innbach 2	Feb 12	< 4,5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Innbach 2	Mrz 12	n.n.	< 16	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Innbach 2	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Innbach 2	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; &lt; Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 58: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Ipfbach 1 - OÖ

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Ipfbach 1	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ipfbach 1	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ipfbach 1	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ipfbach 1	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 26
Ipfbach 1	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ipfbach 1	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ipfbach 1	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ipfbach 1	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ipfbach 1	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ipfbach 1	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ipfbach 1	Jan 12	n.n.	< 13	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ipfbach 1	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ipfbach 1	Mrz 12	n.n.	< 10	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ipfbach 1	Apr 12	n.n.	<b>38</b>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; < Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 59: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Krems 4 - OÖ

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Krems 4	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 2,8	n.n.
Krems 4	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 3,0	n.n.
Krems 4	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Krems 4	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Krems 4	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 37
Krems 4	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Krems 4	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Krems 4	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	< 8,7	n.n.	n.n.
Krems 4	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Krems 4	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Krems 4	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 27
Krems 4	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	< 14	n.n.	n.n.
Krems 4	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Krems 4	Apr 12	< 4,4	< 13	n.n.	n.n.	< 3,0	< 15

n.n. = nicht nachweisbar; < Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

## DATEN

Tab. 60: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Pram 6 - OÖ

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Pram 6	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pram 6	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pram 6	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pram 6	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pram 6	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 29
Pram 6	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pram 6	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 32
Pram 6	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 57
Pram 6	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pram 6	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pram 6	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pram 6	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pram 6	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pram 6	Mrz 12	n.n.	< 16	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pram 6	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pram 6	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; &lt; Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 61: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Ranna 1 - OÖ

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Ranna 1	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	5,4	n.n.
Ranna 1	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ranna 1	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ranna 1	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ranna 1	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ranna 1	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ranna 1	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ranna 1	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ranna 1	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ranna 1	Nov 11	n.n.	< 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ranna 1	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 3,7	n.n.
Ranna 1	Jan 12	< 5,5	n.n.	n.n.	< 11	n.n.	n.n.
Ranna 1	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ranna 1	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ranna 1	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; &lt; Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 62: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Traun 2 - OÖ

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Traun 2	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Traun 2	Apr 11	< 5,0	< 14	n.n.	n.n.	< 2,8	n.n.
Traun 2	Mai 11	< 5,0	< 11	n.n.	n.n.	< 3,2	n.n.
Traun 2	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Traun 2	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Traun 2	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Traun 2	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Traun 2	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	< 9,7	n.n.	n.n.
Traun 2	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Traun 2	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Traun 2	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Traun 2	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Traun 2	Feb 12	n.n.	< 13	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Traun 2	Mrz 12	< 4,9	n.n.	n.n.	n.n.	< 5,3	n.n.
Traun 2	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; < Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 63: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle oberhalb Agrana - NÖ

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Agrana OH	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Agrana OH	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Agrana OH	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 2,5	n.n.
Agrana OH	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Agrana OH	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Agrana OH	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 5,3	n.n.
Agrana OH	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Agrana OH	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Agrana OH	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Agrana OH	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	<b>2,1</b>	n.n.
Agrana OH	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Agrana OH	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	<b>100</b>
Agrana OH	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Agrana OH	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	< 14	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; < Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

## DATEN

Tab. 64: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle unterhalb Agrana - NÖ

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Agrana UH	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 5,4	n.n.
Agrana UH	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Agrana UH	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 2,5	n.n.
Agrana UH	Jun 11	< 4,9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Agrana UH	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Agrana UH	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Agrana UH	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Agrana UH	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Agrana UH	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 17
Agrana UH	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Agrana UH	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Agrana UH	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 94
Agrana UH	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Agrana UH	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; < Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 65: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle oberhalb Jungbunzlauer - NÖ

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Jung OH	Mrz 11	n.n.	n.n.	< 19	n.n.	< 5,8	n.n.
Jung OH	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Jung OH	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 2,5	n.n.
Jung OH	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Jung OH	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Jung OH	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 10
Jung OH	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Jung OH	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Jung OH	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Jung OH	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Jung OH	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Jung OH	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	< 19	n.n.	n.n.
Jung OH	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Jung OH	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; < Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 66: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle unterhalb Jungbunzlauer - NÖ

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Jung UH	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Jung UH	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Jung UH	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 2,5	n.n.
Jung UH	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Jung UH	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Jung UH	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Jung UH	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Jung UH	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 23
Jung UH	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Jung UH	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	<b>14</b>	n.n.
Jung UH	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Jung UH	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Jung UH	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Jung UH	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 3,9	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; &lt; Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 67: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Kainischtraun - STMK

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Kainischtraun	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Kainischtraun	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Kainischtraun	Mai 11	< 6,3	< 14	n.n.	n.n.	<b>3,9</b>	n.n.
Kainischtraun	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 3,5	n.n.
Kainischtraun	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Kainischtraun	Aug 11	n.n.	< 22	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Kainischtraun	Sep 11	n.n.	< 18	n.n.	< 14	< 6,9	n.n.
Kainischtraun	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Kainischtraun	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 2,3	n.n.
Kainischtraun	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Kainischtraun	Jan 12	n.n.	< 19	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Kainischtraun	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Kainischtraun	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Kainischtraun	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	< 8,7	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; &lt; Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

## DATEN

Tab. 68: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Mur oberhalb Frohnleiten - STMK

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Frohnleiten OH	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Frohnleiten OH	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Frohnleiten OH	Mai 11	n.n.	< 14	n.n.	n.n.	<b>3,6</b>	n.n.
Frohnleiten OH	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 11	< 26
Frohnleiten OH	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Frohnleiten OH	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Frohnleiten OH	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Frohnleiten OH	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Frohnleiten OH	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Frohnleiten OH	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Frohnleiten OH	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Frohnleiten OH	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Frohnleiten OH	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Frohnleiten OH	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; < Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 69: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Mur Weinzödlwehr - STMK

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Weinzödlwehr	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Weinzödlwehr	Apr 11	< 3,1	n.n.	n.n.	< 8,2	< 2,0	n.n.
Weinzödlwehr	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Weinzödlwehr	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 6,5	n.n.
Weinzödlwehr	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Weinzödlwehr	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Weinzödlwehr	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Weinzödlwehr	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Weinzödlwehr	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Weinzödlwehr	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Weinzödlwehr	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 44
Weinzödlwehr	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Weinzödlwehr	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Weinzödlwehr	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; < Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

**Tab. 70: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Pöls - STMK**

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Pöls	Mrz 11	n.n.	n.n.	< 19	n.n.	< 5,8	n.n.
Pöls	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pöls	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 2,5	n.n.
Pöls	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pöls	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pöls	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 10
Pöls	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pöls	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pöls	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pöls	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pöls	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pöls	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	< 19	n.n.	n.n.
Pöls	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Pöls	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; &lt; Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

**Tab. 71: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Raab 1 Wollsdorf - STMK**

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Wollsdorf	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Wollsdorf	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Wollsdorf	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 17
Wollsdorf	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Wollsdorf	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Wollsdorf	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Wollsdorf	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Wollsdorf	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Wollsdorf	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Wollsdorf	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Wollsdorf	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Wollsdorf	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Wollsdorf	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Wollsdorf	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 58

n.n. = nicht nachweisbar; &lt; Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

## DATEN

Tab. 72: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Raab 2 Feldbach - STMK

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Feldbach	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	11	n.n.
Feldbach	Apr 11	< 5,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldbach	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldbach	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 29
Feldbach	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldbach	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldbach	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldbach	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldbach	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldbach	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldbach	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldbach	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldbach	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Feldbach	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; < Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 73: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Raab 3 Ertlermühle - STMK

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Ertlermühle	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ertlermühle	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ertlermühle	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ertlermühle	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 4,3	n.n.
Ertlermühle	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ertlermühle	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ertlermühle	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ertlermühle	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ertlermühle	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ertlermühle	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ertlermühle	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ertlermühle	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ertlermühle	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ertlermühle	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; < Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 74: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Raab 4 Hohenbrugg - STMK

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Hohenbrugg	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Hohenbrugg	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Hohenbrugg	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Hohenbrugg	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Hohenbrugg	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Hohenbrugg	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Hohenbrugg	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Hohenbrugg	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Hohenbrugg	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Hohenbrugg	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Hohenbrugg	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Hohenbrugg	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Hohenbrugg	Mrz 12	n.n.	< 19	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Hohenbrugg	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; &lt; Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 75: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Thörlbach - STMK

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Thörlbach	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Thörlbach	Apr 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Thörlbach	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 3,3	n.n.
Thörlbach	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Thörlbach	Jul 11	n.n.	< 13	n.n.	n.n.	n.n.	< 43
Thörlbach	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 4,9	n.n.
Thörlbach	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Thörlbach	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Thörlbach	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Thörlbach	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Thörlbach	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Thörlbach	Feb 12	< 4,9	n.n.	n.n.	< 7,3	< 1,3	< 24
Thörlbach	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Thörlbach	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; &lt; Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

## DATEN

Tab. 76: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle Vordernbergerbach - STMK

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Vordernb.	Mrz 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	<b>27</b>
Vordernb.	Apr 11	< 6,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Vordernb.	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Vordernb.	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Vordernb.	Jul 11	< 4,8	<b>80</b>	n.n.	n.n.	n.n.	< 46
Vordernb.	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Vordernb.	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 42
Vordernb.	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Vordernb.	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Vordernb.	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Vordernb.	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Vordernb.	Feb 12	n.n.	< 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Vordernb.	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Vordernb.	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; < Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 77: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle III vor Einleitung in die Kläranlage ARA Ludesch

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
III vor Einleitung	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
III vor Einleitung	Jun 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
III vor Einleitung	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
III vor Einleitung	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
III vor Einleitung	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
III vor Einleitung	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
III vor Einleitung	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
III vor Einleitung	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	< 8.8	n.n.	n.n.
III vor Einleitung	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
III vor Einleitung	Feb 12	n.n.	< 18	n.n.	< 8.8	n.n.	n.n.
III vor Einleitung	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	< 8.8	n.n.	n.n.
III vor Einleitung	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; < Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

**Tab. 78: LC-MS/MS Ergebnisse der Messstelle III nach Einleitung in die Kläranlage ARA Ludesch**

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	α-Sol [ng/L]	OA [ng/L]
III nach Einleitung	Mai 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
III nach Einleitung	Jun 11	< 4.6	n.n.	n.n.	n.n.	< 4.5	n.n.
III nach Einleitung	Jul 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
III nach Einleitung	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
III nach Einleitung	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
III nach Einleitung	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
III nach Einleitung	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
III nach Einleitung	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
III nach Einleitung	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
III nach Einleitung	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
III nach Einleitung	Mrz 12	n.n.	< 18	< 25	< 8.8	n.n.	n.n.
III nach Einleitung	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; < Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

### 10.1.3. Ergebnisse der LC-MS/MS Messungen der Abwasser- messstellen Vorarlberg (Zulauf und Ablauf der ARA Ludesch und Tagesmischprobe des Abwassers einer Textilfabrik)

**Tab. 79: LC-MS/MS Ergebnisse der Abwassermessstelle Zulauf - ARA Ludesch Vorarlberg**

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	α-Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Zulauf 1	Mai 11	n.n.	<b>171</b>	n.n.	n.n.	< 8,0	n.n.
Zulauf 2	Jun 11	n.n.	<b>320</b>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Zulauf 3	Jul 11	n.n.	<b>204</b>	n.n.	n.n.	< 14	n.n.
Zulauf 4	Aug 11	n.n.	<b>14</b>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Zulauf 5	Sep 11	n.n.	<b>47</b>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Zulauf 6	Okt 11	n.n.	<b>65</b>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Zulauf 7	Nov 11	n.n.	<b>11</b>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Zulauf 8	Dez 11	n.n.	<b>85</b>	n.n.	n.n.	< 3,3	n.n.
Zulauf 9	Jan 12	n.n.	<b>44</b>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Zulauf 10	Feb 12	n.n.	<b>16</b>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Zulauf 11	Mrz 12	n.n.	<b>52</b>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Zulauf 12	Apr 12	n.n.	<b>423</b>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; < Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

## DATEN

Tab. 80: LC-MS/MS Ergebnisse der Abwassermessstelle Ablauf - ARA Ludesch Vorarlberg

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
Ablauf 1	Mai 11	n.n.	< 5,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ablauf 2	Jun 11	n.n.	< 18	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ablauf 3	Jul 11	n.n.	< 18	n.n.	n.n.	< 14	n.n.
Ablauf 4	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ablauf 5	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ablauf 6	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ablauf 7	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ablauf 8	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 3,3	n.n.
Ablauf 9	Jan 12	n.n.	< 42	n.n.	n.n.	< 33	n.n.
Ablauf 10	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ablauf 11	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ablauf 12	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 14	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; < Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

Tab. 81: LC-MS/MS Ergebnisse der Abwassermessstelle Tagesmischprobe (TMP) Vorarlberg

Probe	PN Datum	Digi [ng/L]	Dios [ng/L]	Esc [ng/L]	Hed C [ng/L]	$\alpha$ -Sol [ng/L]	OA [ng/L]
TMP 1	Mai 11	n.n.	< 5,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
TMP 2	Jun 11	n.n.	< 5,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
TMP 3	Jul 11			keine Probe vorhanden			
TMP 4	Aug 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
TMP 5	Sep 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
TMP 6	Okt 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
TMP 7	Nov 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
TMP 8	Dez 11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
TMP 9	Jan 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
TMP 10	Feb 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
TMP 11	Mrz 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 14	n.n.
TMP 12	Apr 12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar; < Wert = kleiner Bestimmungsgrenze

## 10.2. Ergebnisse des Schäumungspotentials

### 10.2.1. Ergebnisse des Schäumungspotentials der Hintergrundmessstellen

Tab. 82: Werte des Schäumungspotentials der Hintergrundmessstellen

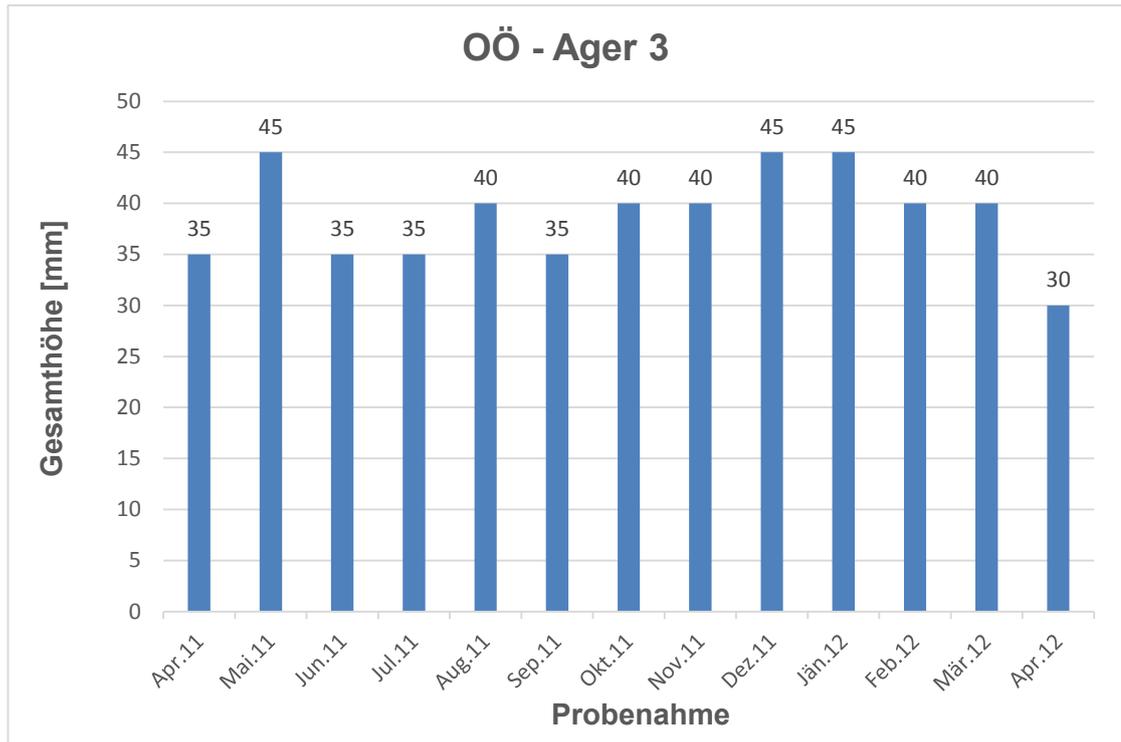
	OÖ - Reichramingbach [mm]	W - Halterbach [mm]
Mär.11	-	35
Apr.11	40	70
Mai.11	30	25
Jun.11	20	30
Jul.11	20	30
Aug.11	30	-
Sep.11	20	50
Okt.11	35	70
Nov.11	30	60
Dez.11	30	35
Jän.12	40	45
Feb.12	30	70
Mär.12	40	35
Apr.12	45	35
Mai.12	35	-

### 10.2.2. Ergebnisse des Schäumungspotentials der Oberflächengewässer

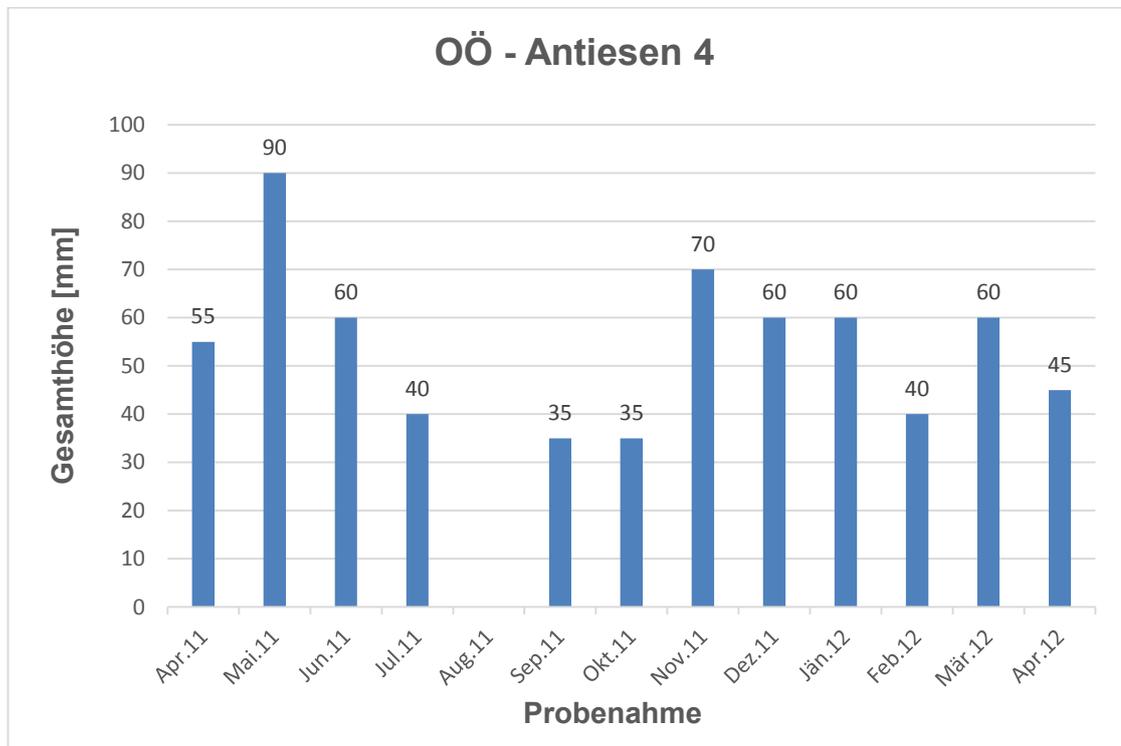
Tab. 83: Werte des Schäumungspotentials der oberösterreichischen Messstellen

	OÖ - Ager 3 [mm]	OÖ - Antiesen 4 [mm]	OÖ - D. Aschach 2 [mm]	OÖ - D. Aschach 3 [mm]	OÖ - Feldaist 4 [mm]	OÖ - G. Rodl 3 [mm]	OÖ - H. Bach 1 [mm]	OÖ - Innbach 2 [mm]	OÖ - Ipfbach 1 [mm]	OÖ - Krems 4 [mm]	OÖ - Pram 6 [mm]	OÖ - Ranna 1 [mm]	OÖ - Traun 2 [mm]
Mär.11	-	-	55	55	45	30	35	30	35	-	30	35	35
Apr.11	35	55	50	40	50	35	55	40	35	50	35	30	35
Mai.11	45	90	50	55	45	35	55	55	25	55	45	35	35
Jun.11	35	60	50	60	60	70	50	45	50	80	55	40	40
Jul.11	35	40	70	70	75	35	65	50	35	60	-	60	30
Aug.11	40	-	65	70	55	30	40	40	35	35	50	40	25
Sep.11	35	35	25	80	90	-	65	35	75	40	55	50	40
Okt.11	40	35	75	55	50	35	50	75	50	80	55	40	40
Nov.11	40	70	55	60	45	50	75	50	60	60	50	40	40
Dez.11	45	60	95	95	-	40	60	40	40	-	70	40	35
Jän.12	45	60	45	45	50	50	40	45	50	50	45	70	50
Feb.12	40	40	45	75	60	45	45	80	70	70	80	40	40
Mär.12	40	60	45	55	45	40	60	45	45	40	70	35	35
Apr.12	30	45	45	50	50	40	60	55	50	75	50	40	60

## DATEN



**Abb. 131: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Ager 3 im Jahresverlauf**



**Abb. 132: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Antiesen 4 im Jahresverlauf**

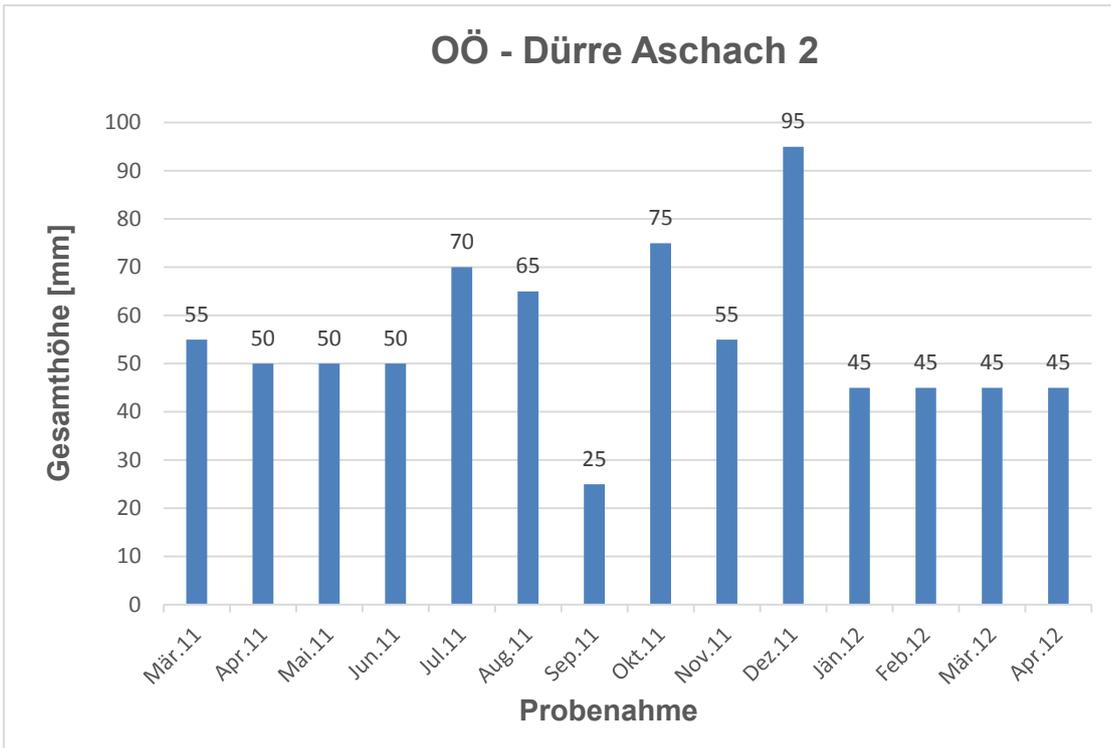


Abb. 133: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Dürre Aschach 2 im Jahresverlauf

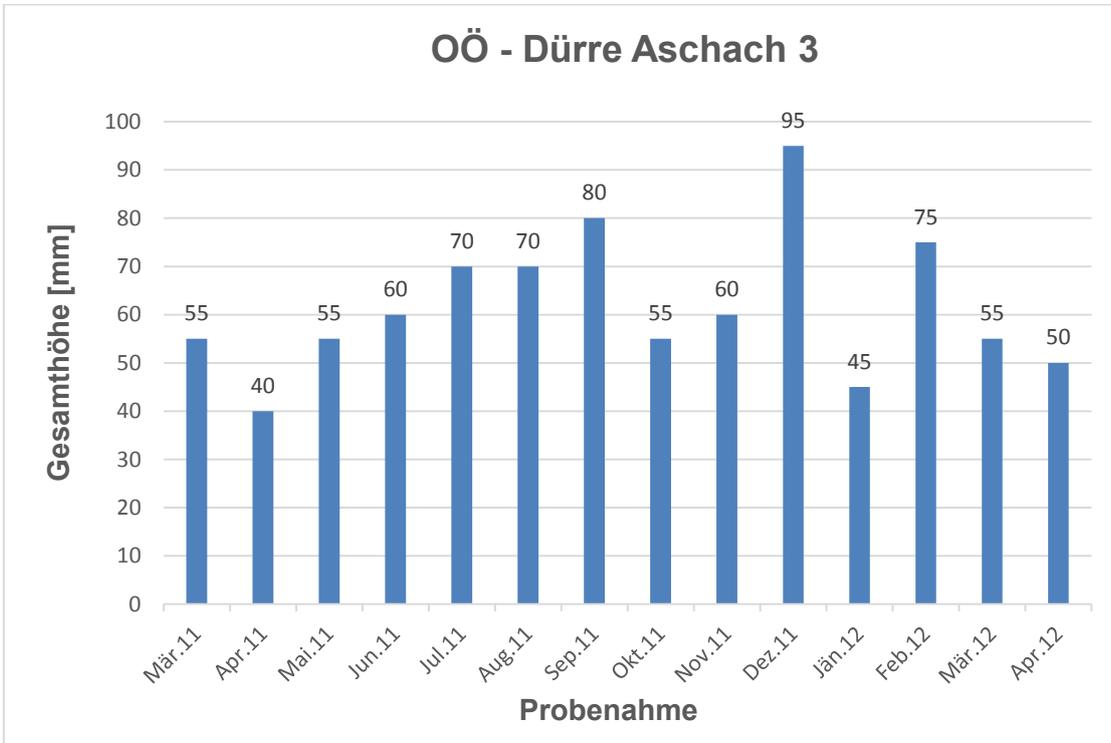


Abb. 134: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Dürre Aschach 3 im Jahresverlauf

## DATEN

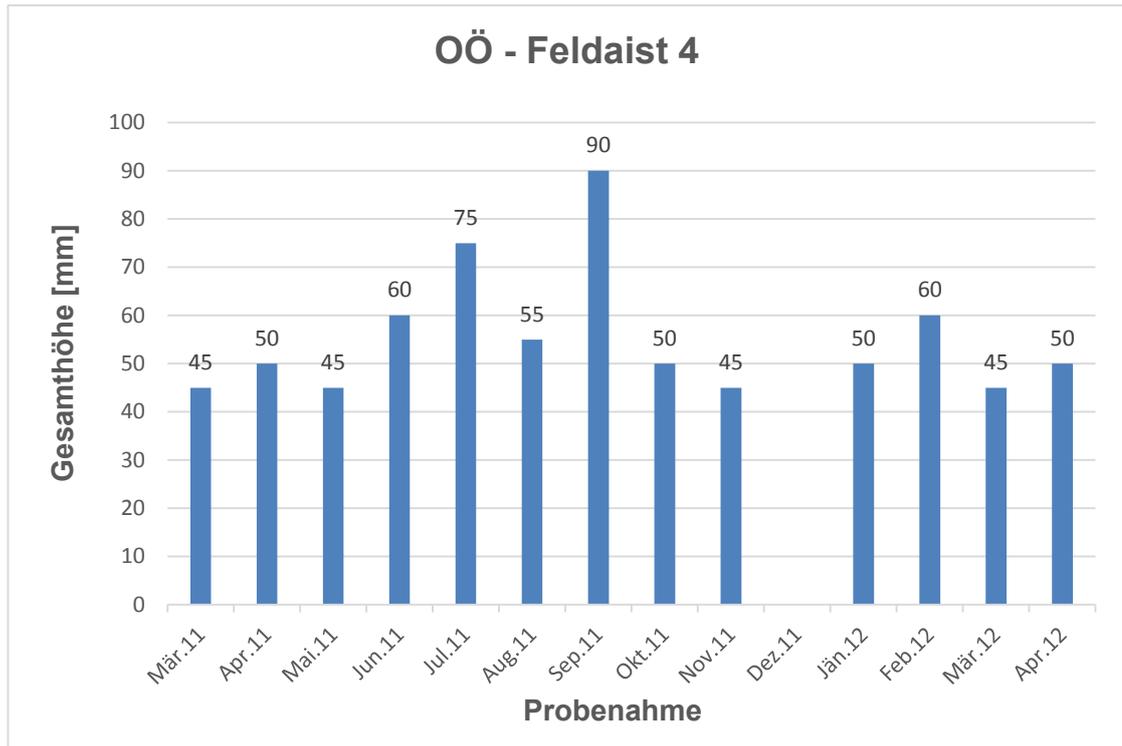


Abb. 135: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Feldaist 4 im Jahresverlauf

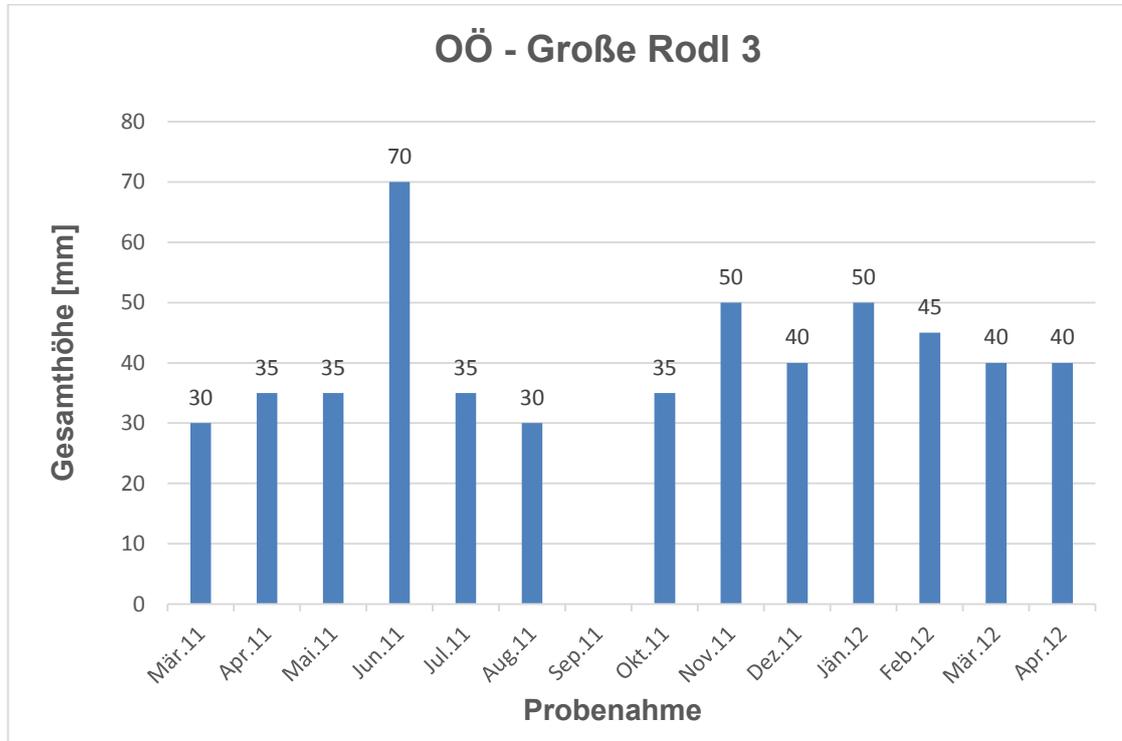


Abb. 136: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Große Rodl 3 im Jahresverlauf

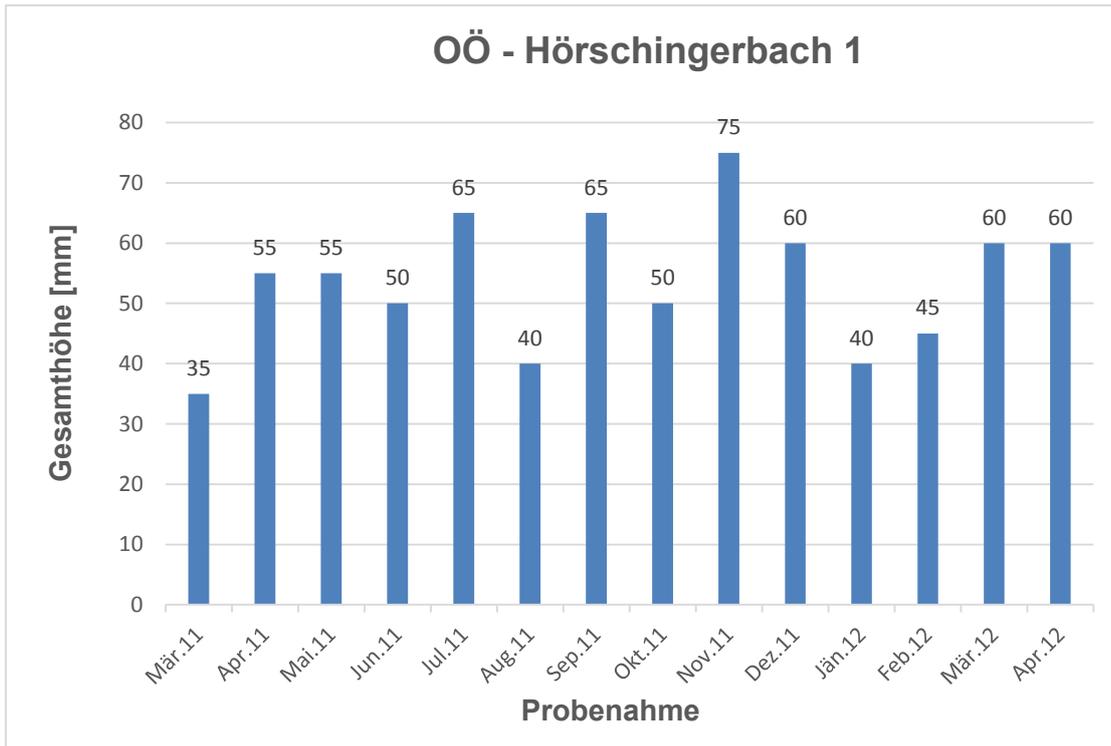


Abb. 137: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Hörschingerbach 1 im Jahresverlauf

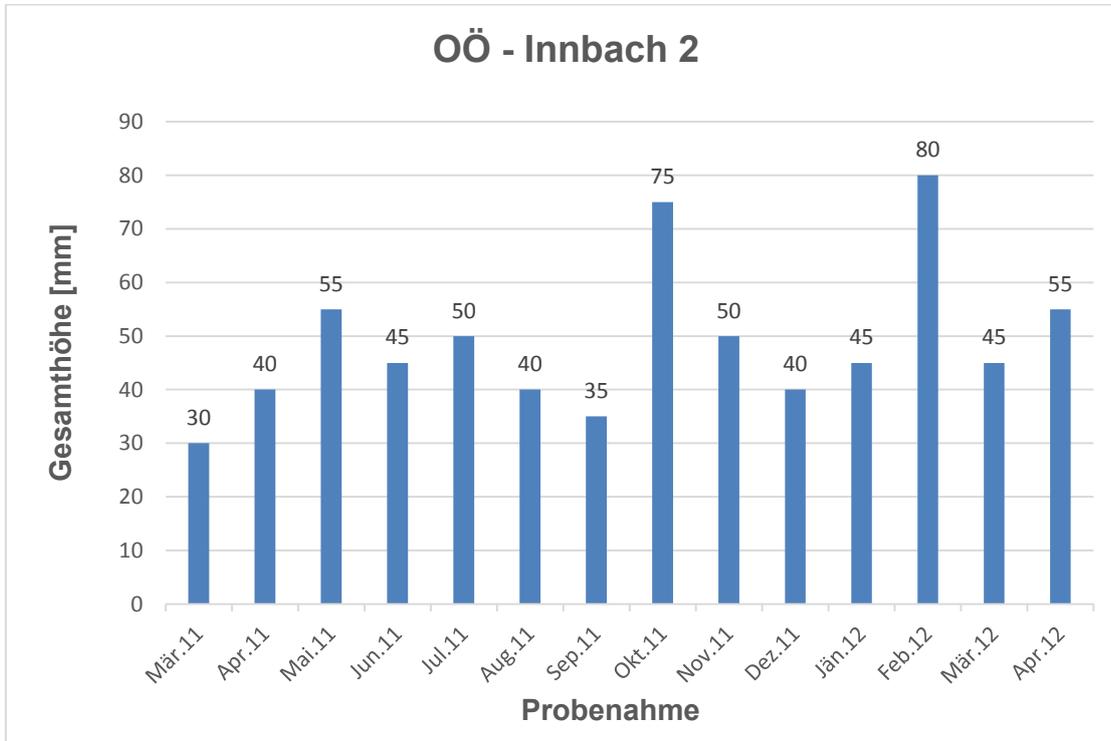
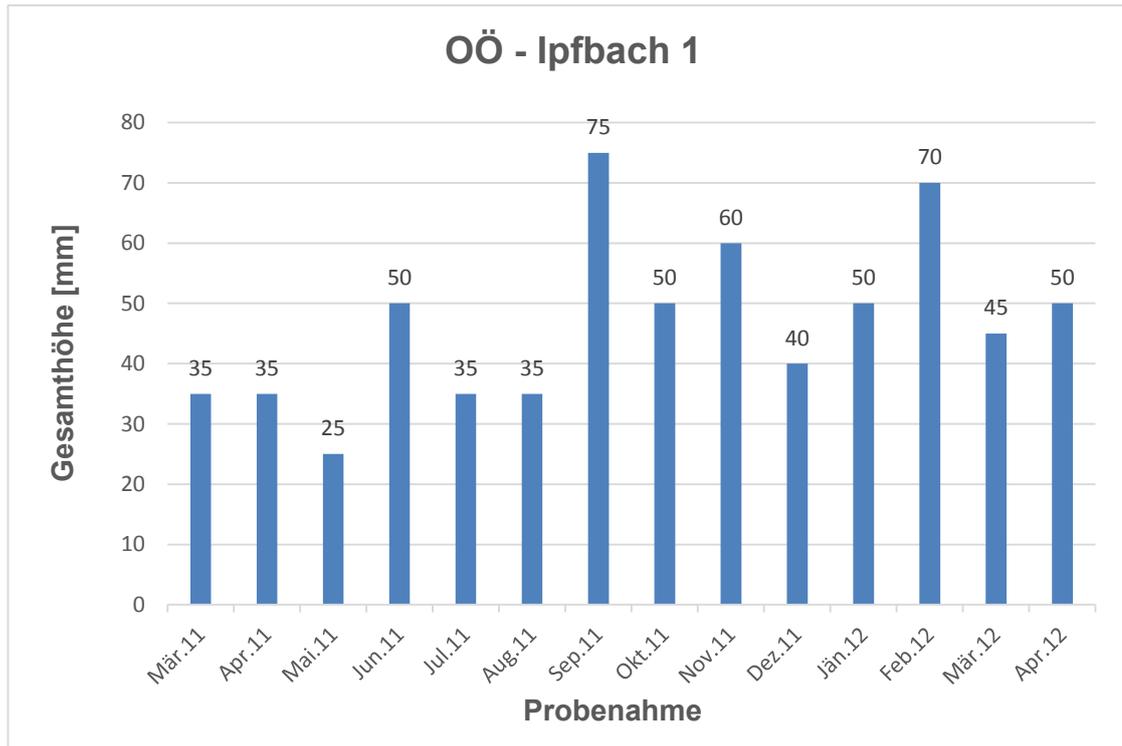
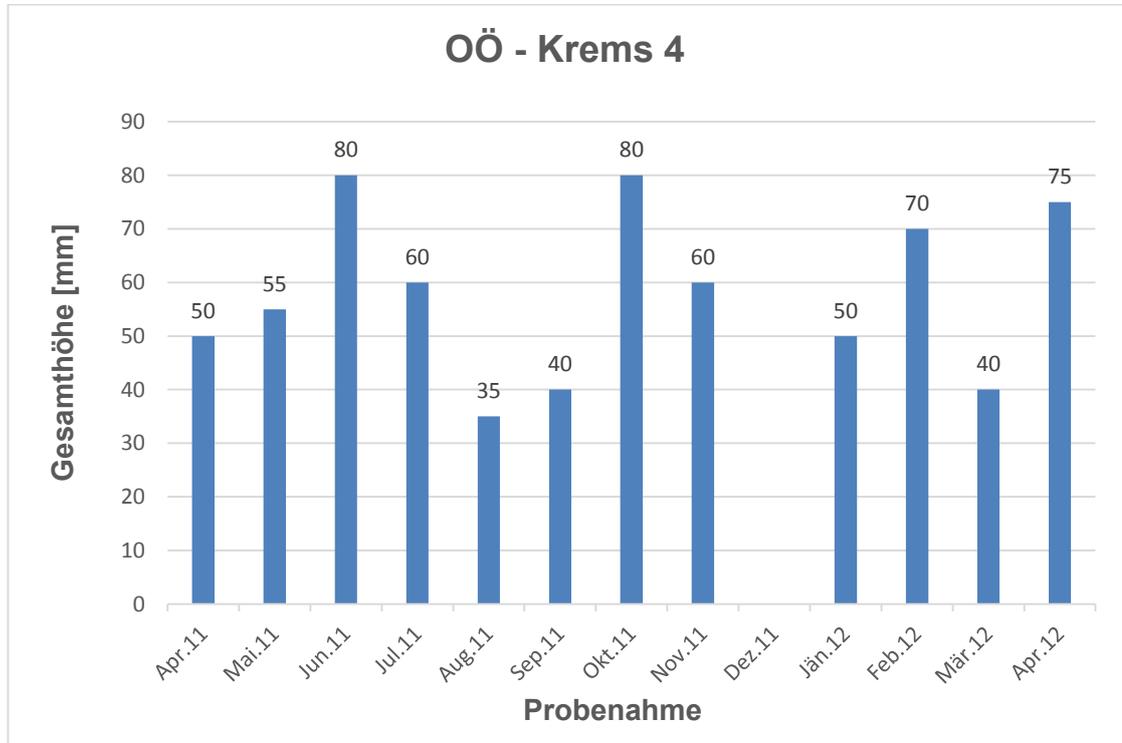


Abb. 138: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Innbach 2 im Jahresverlauf

## DATEN



**Abb. 139: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Ipfbach 1 im Jahresverlauf**



**Abb. 140: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Krems 4 im Jahresverlauf**

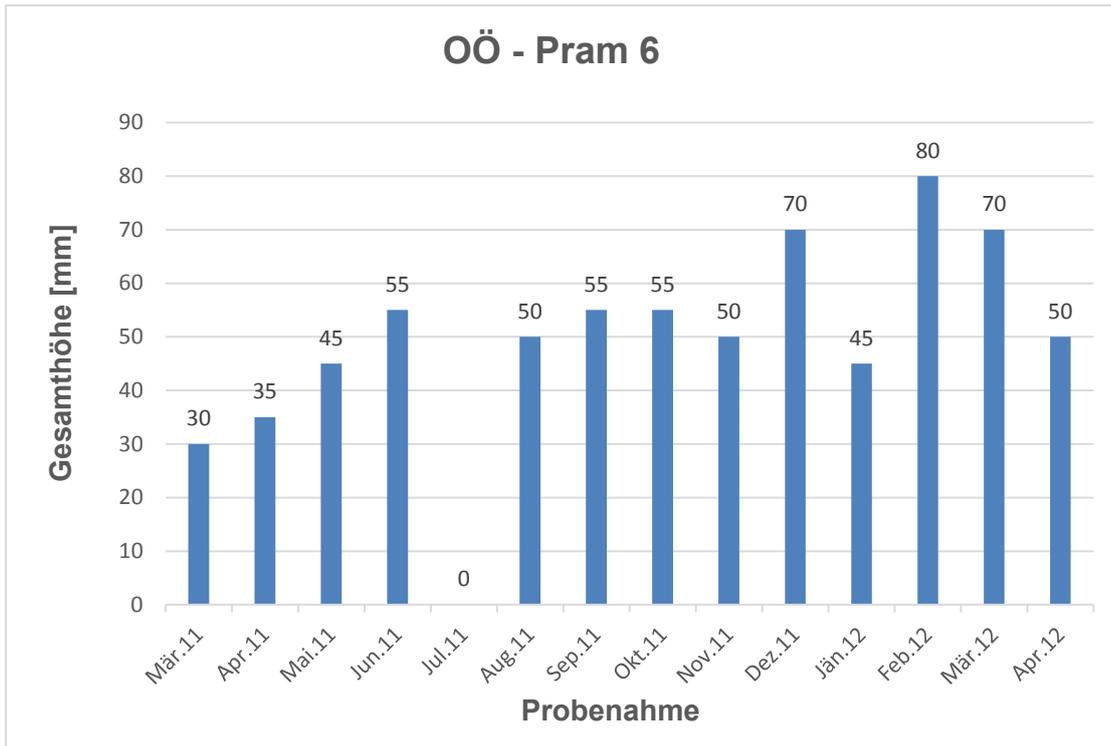


Abb. 141: Das Schäumungspotential der Messstelle OÖ – Pram 6 im Jahresverlauf

Tab. 84: Werte des Schäumungspotentials der niederösterreichischen Messstellen

	NÖ - oberhalb Agrana [mm]	NÖ - unterhalb Agrana [mm]	NÖ - oberhalb Jungbuzlauer [mm]	NÖ - unterhalb Jungbuzlauer [mm]
Mär.11	35	40	45	50
Apr.11	55	40	50	70
Mai.11	40	35	30	115
Jun.11	30	25	45	80
Jul.11	35	55	30	70
Aug.11	40	60	35	90
Sep.11	35	40	65	80
Okt.11	50	50	30	80
Nov.11	35	35	45	70
Dez.11	50	45	40	80
Jän.12	70	70	40	120
Feb.12	50	70	45	110
Mär.12	40	40	60	100
Apr.12	45	50	55	100

## DATEN

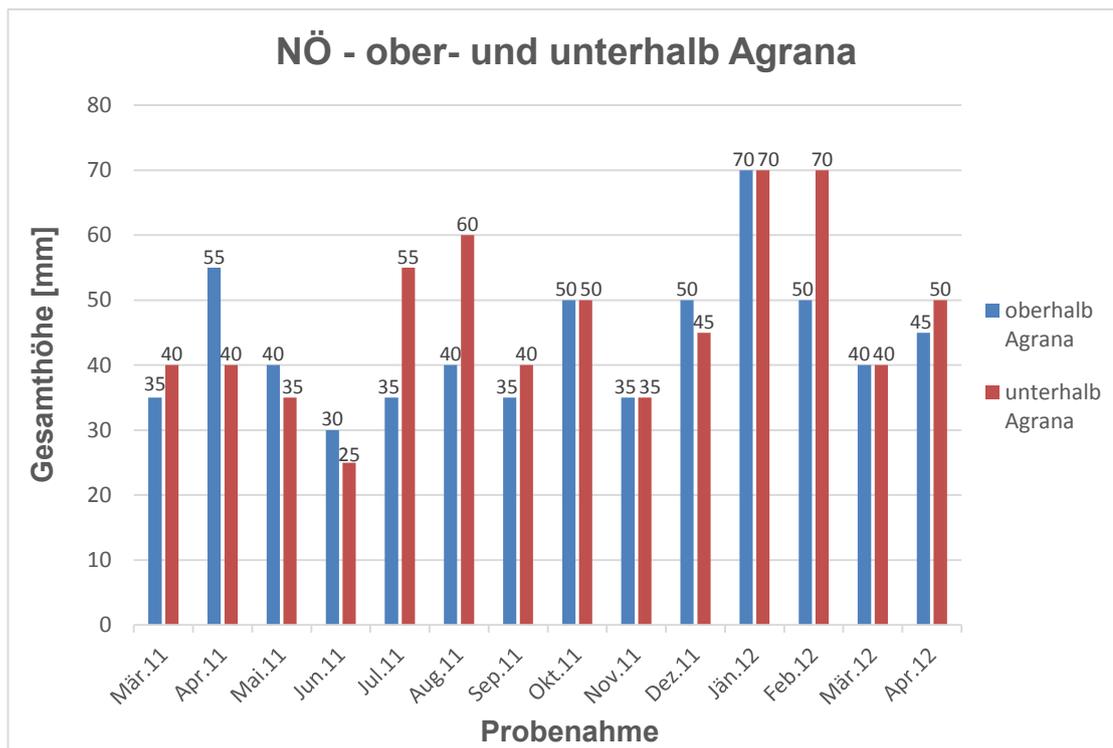


Abb. 142: Das Schäumungspotential der Messstellen NÖ – ober- und unterhalb Agrana im Jahresverlauf

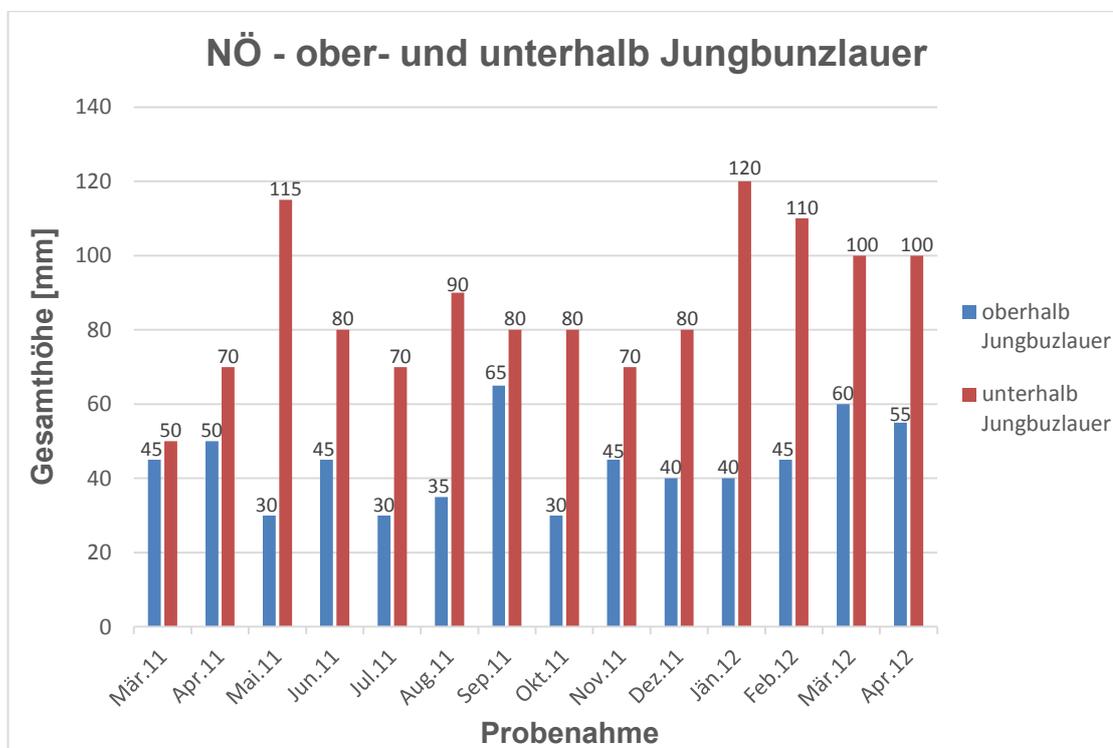


Abb. 143: Das Schäumungspotential der Messstellen NÖ – ober- und unterhalb Jungbunzlauer im Jahresverlauf

Tab. 85: Werte des Schäumungspotentials der Messstellen in der Steiermark

	STMK - Kainischtraun [mm]	STMK - Frohnleiten [mm]	STMK - Weinzödlwehr [mm]	STMK - Pöls [mm]	STMK - Wollsdorf [mm]	STMK - Feldbach [mm]	STMK - Ertlermühle [mm]	STMK - Hohenbrugg [mm]	STMK - Thörlbach [mm]	STMK - Vordemberger bach [mm]
Mär.11	45	35	50	80	30	35	35	35	30	35
Apr.11	35	30	30	35	50	45	40	60	35	30
Mai.11	40	45	65	40	35	40	35	70	35	35
Jun.11	40	40	55	50	40	60	70	50	35	30
Jul.11	30	35	45	35	40	40	40	45	35	35
Aug.11	35	35	35	35	50	40	50	45	35	40
Sep.11	35	40	60	40	40	45	45	45	35	30
Okt.11	50	35	40	50	45	45	40	50	35	40
Nov.11	35	40	45	45	35	50	35	40	45	35
Dez.11	40	50	50	60	45	55	40	45	40	30
Jän.12	40	80	50	100	50	45	50	65	40	40
Feb.12	45	60	65	75	50	50	50	50	55	35
Mär.12	40	40	35	45	40	60	45	55	40	40
Apr.12	35	40	40	40	50	80	45	75	35	40

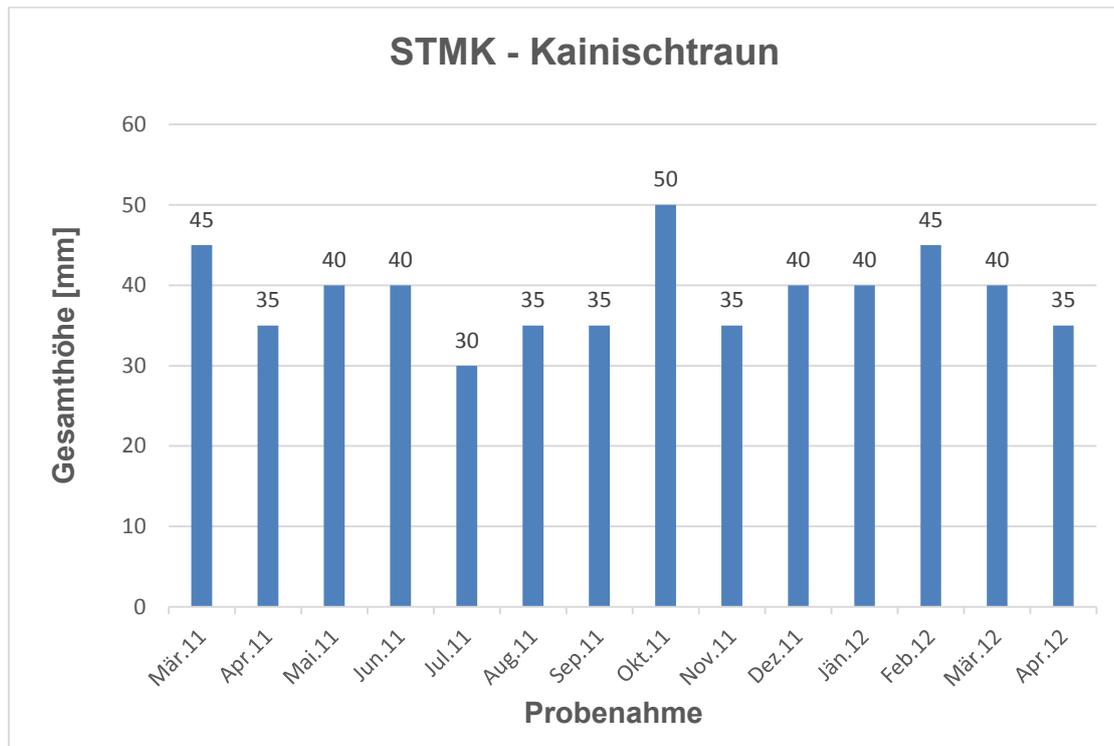
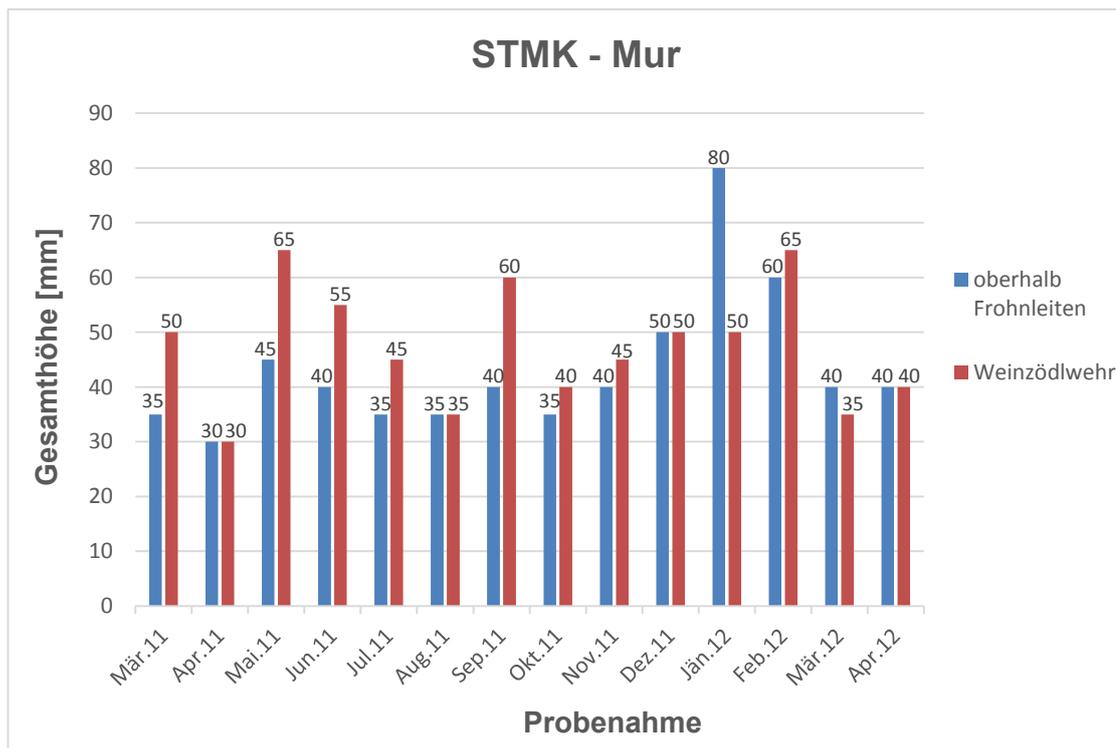
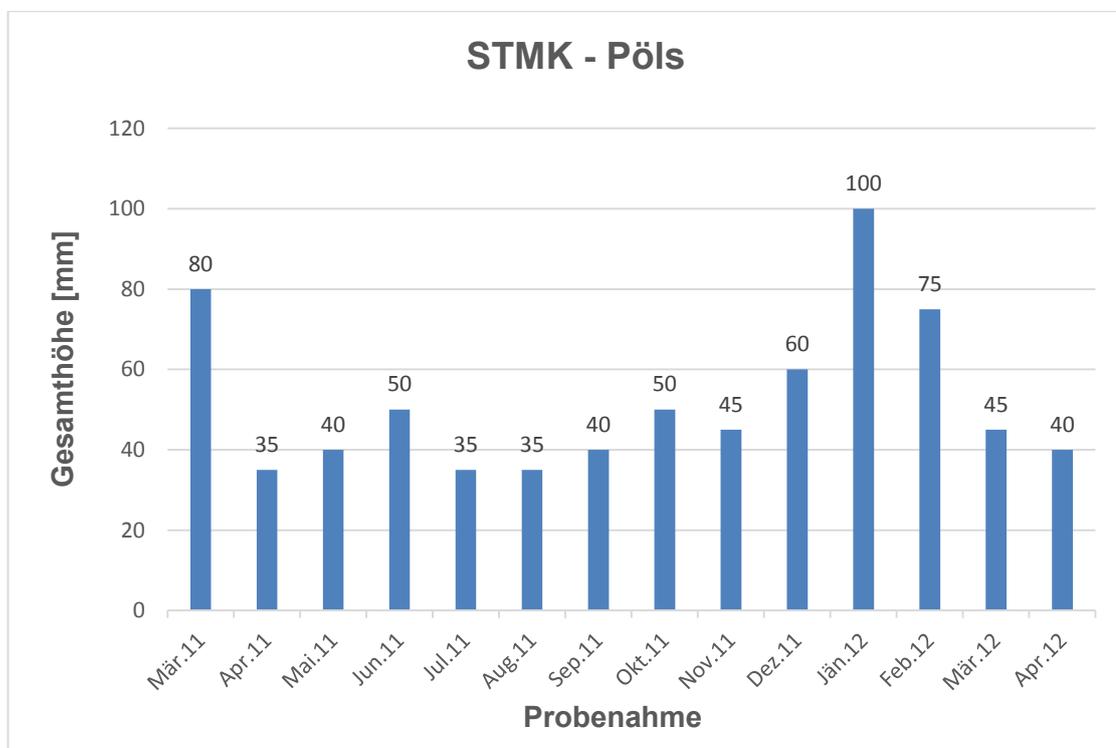


Abb. 144: Das Schäumungspotential der Messstelle STMK – Kainischtraun im Jahresverlauf

## DATEN



**Abb. 145: Das Schäumungspotential der Messstellen STMK – oberhalb Frohnleiten und Weinzödlwehr (Mur) im Jahresverlauf**



**Abb. 146: Das Schäumungspotential der Messstelle STMK – Pöls im Jahresverlauf**

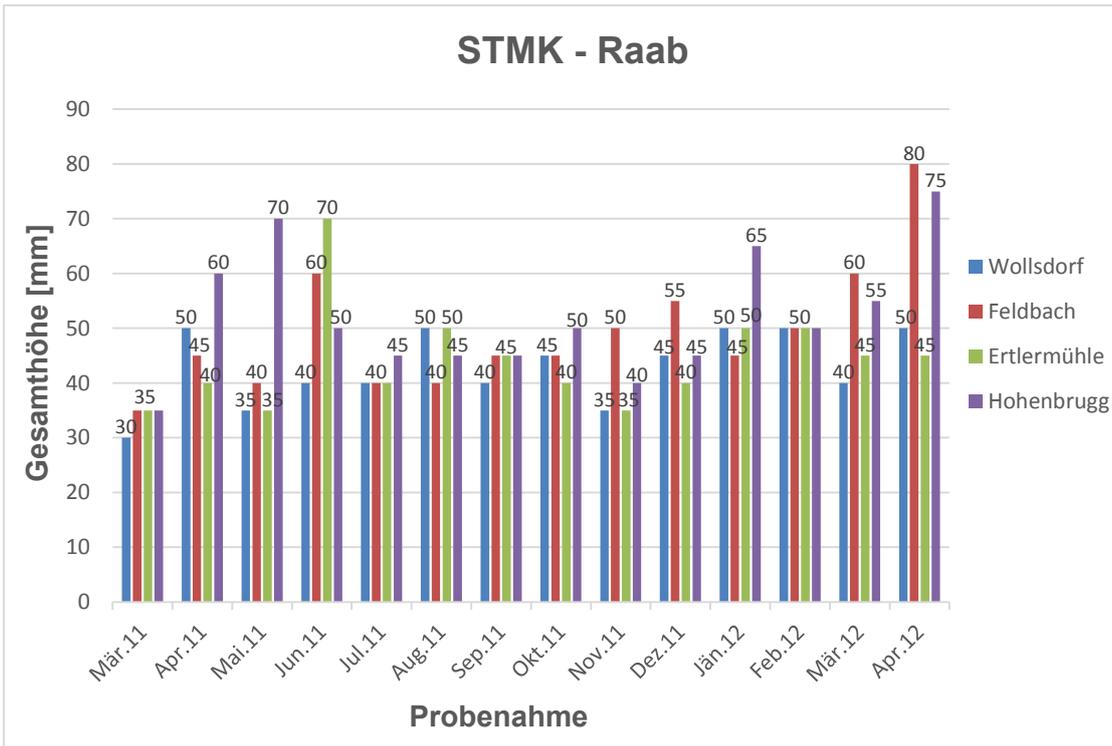


Abb. 147: Das Schäumungspotential der Messstellen STMK – Wollsdorf, Feldbach, Ertlermühle und Hohenbrugg (Raab) im Jahresverlauf

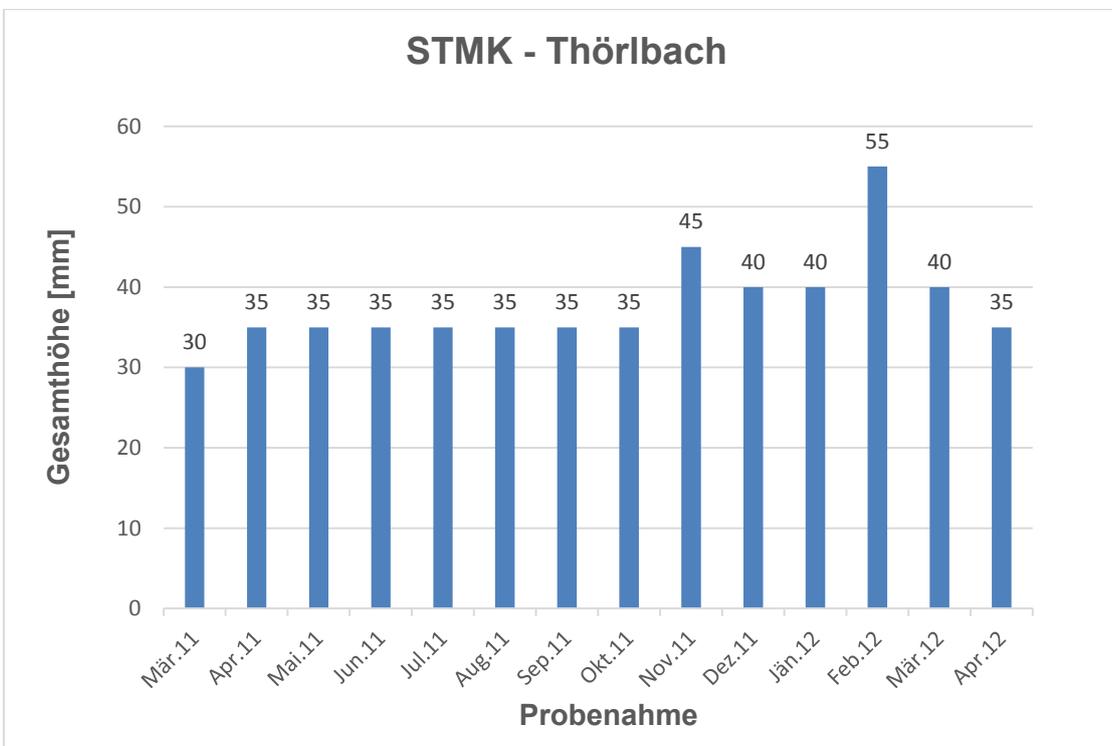


Abb. 148: Das Schäumungspotential der Messstelle STMK – Thörlbach im Jahresverlauf

## DATEN

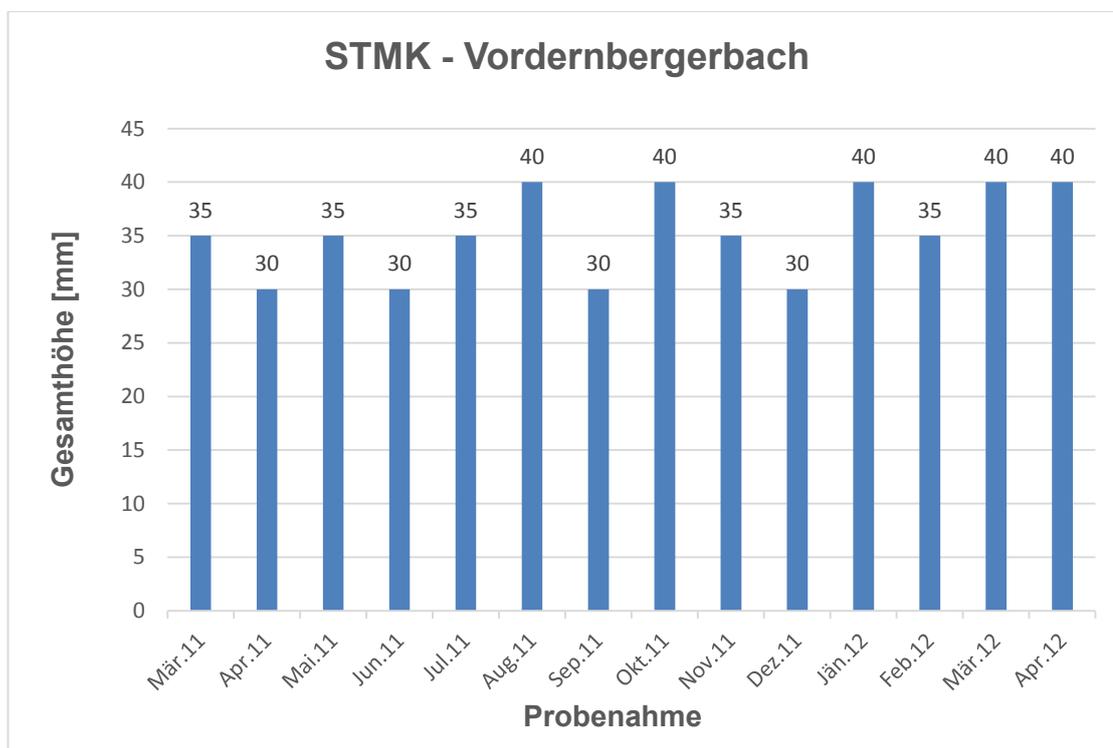


Abb. 149: Das Schäumungspotential der Messstelle STMK – Vordernbergerbach im Jahresverlauf

Tab. 86: Werte des Schäumungspotentials der Messstellen in Vorarlberg

	VBG - III vor Einleitung [mm]	VBG - III nach Einleitung [mm]
Mai.11	35	35
Jun.11	35	30
Jul.11	25	35
Aug.11	35	35
Sep.11	35	40
Okt.11	30	40
Nov.11	25	30
Dez.11	40	30
Jän.12	35	270
Feb.12	40	60
Mär.12	40	35
Apr.12	35	35

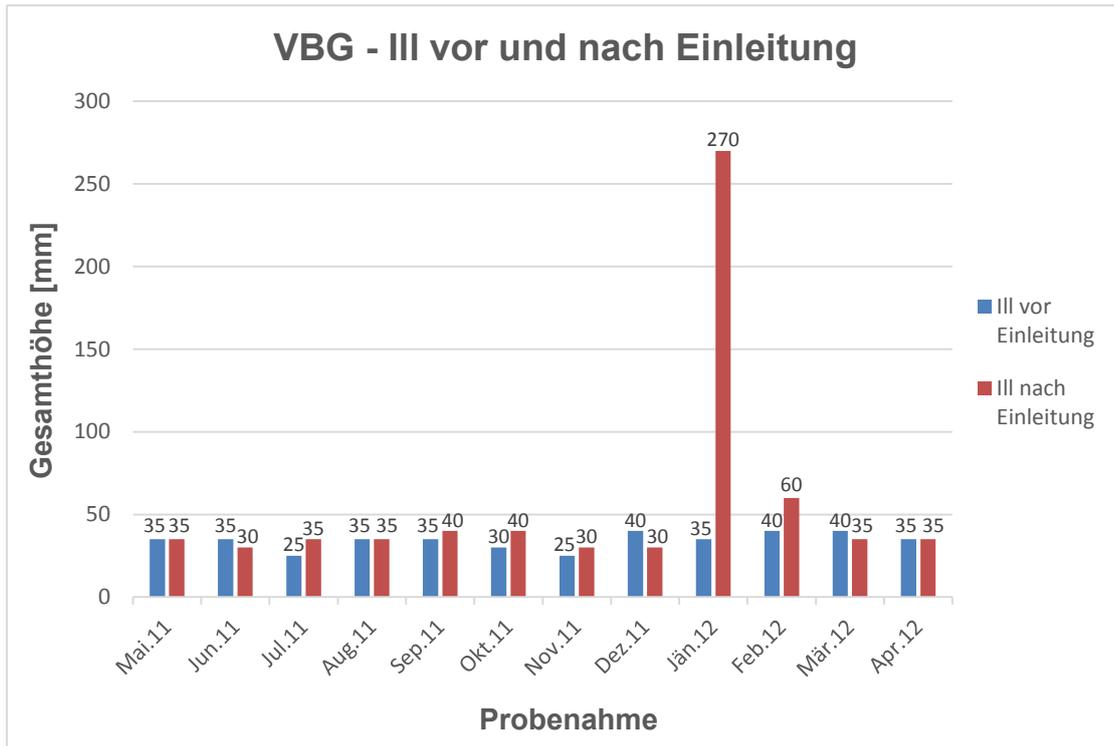


Abb. 150: Das Schäumungspotential der Messstellen VBG – III vor und nach Einleitung im Jahresverlauf

### 10.2.3. Ergebnisse des Schäumungspotentials der Abwässer

Tab. 87: Werte des Schäumungspotentials der Abwassermessstellen in Vorarlberg

	VBG - Zulauf [mm]	VBG - Ablauf [mm]	VBG - Tagesmischprobe [mm]
<b>Mai.11</b>	145	> 480	> 480
<b>Jun.11</b>	155	220	> 480
<b>Jul.11</b>	400	360	> 480
<b>Aug.11</b>	> 480	340	> 480
<b>Sep.11</b>	> 480	> 480	> 480
<b>Okt.11</b>	150	390	> 480
<b>Nov.11</b>	225	> 480	> 480
<b>Dez.11</b>	90	120	> 480
<b>Jän.12</b>	> 480	> 480	> 480
<b>Feb.12</b>	280	400	> 480
<b>Mär.12</b>	170	> 480	> 480
<b>Apr.12</b>	210	460	> 480

## DATEN

## 10.3. Ergebnisse des Ames Test

## 10.3.1. Testergebnisse TA 98\_ohne S9

Auswertung Testergebnisse TA 98\_ohne S9

Negativ	44	32	43	46	Positiv	228	238	175	172
Negativ	45	23	46	25	Positiv	219	267	176	191
Negativ	44	34	51	37	Positiv	220	271	179	189
Negativ	32	29	45	37					
Negativ	33	27	37	37					
Negativ	29	33	25	25					
<b>Negativ Gesamt</b>		<b>MW</b>	<b>35,79</b>		<b>Positiv Gesamt</b>	<b>MW</b>	<b>210,42</b>		
		<b>STABW</b>	<b>8,16</b>			<b>STABW</b>	<b>35,48</b>		

## Substanz 1 → Diosgenin

TEST Nr. 1.1	S1 K1	51	S1 K2	46	S1 K3	38	S1 K4	36	S1 K5	61	S1 K6	41
	S1 K1	49	S1 K2	52	S1 K3	40	S1 K4	32	S1 K5	37	S1 K6	55
	S1 K1	44	S1 K2	38	S1 K3	44	S1 K4	44	S1 K5	38	S1 K6	45
TEST Nr. 1.2	S1 K1	36	S1 K2	47	S1 K3	37	S1 K4	52	S1 K5	26	S1 K6	35
	S1 K1	36	S1 K2	45	S1 K3	49	S1 K4	42	S1 K5	31	S1 K6	37
	S1 K1	40	S1 K2	32	S1 K3	33	S1 K4	42	S1 K5	34	S1 K6	26
TEST 1.1 + 1.2	<b>MW</b>	<b>42,67</b>	<b>MW</b>	<b>43,33</b>	<b>MW</b>	<b>40,17</b>	<b>MW</b>	<b>41,33</b>	<b>MW</b>	<b>37,83</b>	<b>MW</b>	<b>39,83</b>
TEST 3.1 + 3.2	<b>STABW</b>	<b>6,44</b>	<b>STABW</b>	<b>7,15</b>	<b>STABW</b>	<b>5,64</b>	<b>STABW</b>	<b>6,89</b>	<b>STABW</b>	<b>12,16</b>	<b>STABW</b>	<b>9,81</b>

## Substanz 2 → Escin

TEST Nr. 1.1	S2 K1	31	S2 K2	30	S2 K3	50	S2 K4	33	S2 K5	55	S2 K6	48
	S2 K1	33	S2 K2	44	S2 K3	41	S2 K4	37	S2 K5	49	S2 K6	49
	S2 K1	29	S2 K2	37	S2 K3	41	S2 K4	40	S2 K5	49	S2 K6	50
TEST Nr. 1.2	S2 K1	41	S2 K2	46	S2 K3	36	S2 K4	35	S2 K5	36	S2 K6	31
	S2 K1	48	S2 K2	21	S2 K3	34	S2 K4	32	S2 K5	36	S2 K6	36
	S2 K1	38	S2 K2	27	S2 K3	39	S2 K4	49	S2 K5	34	S2 K6	28
TEST 1.1 + 1.2	<b>MW</b>	<b>36,67</b>	<b>MW</b>	<b>34,17</b>	<b>MW</b>	<b>40,17</b>	<b>MW</b>	<b>35,40</b>	<b>MW</b>	<b>43,17</b>	<b>MW</b>	<b>40,33</b>
TEST 3.1 + 3.2	<b>STABW</b>	<b>7,12</b>	<b>STABW</b>	<b>9,87</b>	<b>STABW</b>	<b>5,56</b>	<b>STABW</b>	<b>3,21</b>	<b>STABW</b>	<b>8,89</b>	<b>STABW</b>	<b>9,85</b>

## Substanz 3 → α-Solanin

TEST Nr. 1.1	S3 K1	45	S3 K2	38	S3 K3	48	S3 K4	40	S3 K5	29	S3 K6	27
	S3 K1	43	S3 K2	34	S3 K3	45	S3 K4	52	S3 K5	39	S3 K6	46
	S3 K1	41	S3 K2	22	S3 K3	37	S3 K4	39	S3 K5	45	S3 K6	29
TEST Nr. 1.2	S3 K1	34	S3 K2	36	S3 K3	40	S3 K4	45	S3 K5	27	S3 K6	24
	S3 K1	35	S3 K2	40	S3 K3	41	S3 K4	34	S3 K5	31	S3 K6	26
	S3 K1	40	S3 K2	27	S3 K3	41	S3 K4	36	S3 K5	21	S3 K6	29
TEST 1.1 + 1.2	<b>MW</b>	<b>39,67</b>	<b>MW</b>	<b>32,83</b>	<b>MW</b>	<b>42,00</b>	<b>MW</b>	<b>41,00</b>	<b>MW</b>	<b>32,00</b>	<b>MW</b>	<b>30,17</b>
TEST 3.1 + 3.2	<b>STABW</b>	<b>4,37</b>	<b>STABW</b>	<b>6,94</b>	<b>STABW</b>	<b>3,90</b>	<b>STABW</b>	<b>6,57</b>	<b>STABW</b>	<b>8,65</b>	<b>STABW</b>	<b>7,99</b>

## Substanz 4 → Hederacocside C

TEST Nr. 2.1	S4 K1	31	S4 K2	31	S4 K3	26	S4 K4	24	S4 K5	39	S4 K6	44
	S4 K1	32	S4 K2	22	S4 K3	32	S4 K4	26	S4 K5	46	S4 K6	41
	S4 K1	28	S4 K2	27	S4 K3	33	S4 K4	26	S4 K5	38	S4 K6	41
TEST Nr. 2.2	S4 K1	34	S4 K2	40	S4 K3	38	S4 K4	40	S4 K5	29	S4 K6	37
	S4 K1	36	S4 K2	52	S4 K3	35	S4 K4	40	S4 K5	31	S4 K6	33
	S4 K1	36	S4 K2	39	S4 K3	36	S4 K4	28	S4 K5	29	S4 K6	27
TEST 2.1 + 2.2	<b>MW</b>	<b>32,83</b>	<b>MW</b>	<b>35,17</b>	<b>MW</b>	<b>33,33</b>	<b>MW</b>	<b>30,67</b>	<b>MW</b>	<b>35,33</b>	<b>MW</b>	<b>37,17</b>
TEST 3.1 + 3.2	<b>STABW</b>	<b>3,13</b>	<b>STABW</b>	<b>10,76</b>	<b>STABW</b>	<b>4,18</b>	<b>STABW</b>	<b>7,34</b>	<b>STABW</b>	<b>6,83</b>	<b>STABW</b>	<b>6,27</b>

## Substanz 5 → Digitonin

TEST Nr. 2.1	S5 K1	19	S5 K2	30	S5 K3	22	S5 K4	31	S5 K5	36	S5 K6	43
	S5 K1	30	S5 K2	22	S5 K3	34	S5 K4	22	S5 K5	44	S5 K6	27
	S5 K1	21	S5 K2	28	S5 K3	23	S5 K4	30	S5 K5	34	S5 K6	29
TEST Nr. 2.2	S5 K1	35	S5 K2	37	S5 K3	37	S5 K4	26	S5 K5	23	S5 K6	26
	S5 K1	48	S5 K2	30	S5 K3	33	S5 K4	26	S5 K5	21	S5 K6	24
	S5 K1	33	S5 K2	28	S5 K3	28	S5 K4	37	S5 K5	35	S5 K6	23
TEST 2.1 + 2.2	<b>MW</b>	<b>31,00</b>	<b>MW</b>	<b>29,17</b>	<b>MW</b>	<b>29,50</b>	<b>MW</b>	<b>28,67</b>	<b>MW</b>	<b>32,17</b>	<b>MW</b>	<b>28,67</b>
TEST 3.1 + 3.2	<b>STABW</b>	<b>10,53</b>	<b>STABW</b>	<b>4,83</b>	<b>STABW</b>	<b>6,16</b>	<b>STABW</b>	<b>5,20</b>	<b>STABW</b>	<b>8,66</b>	<b>STABW</b>	<b>7,34</b>

## Substanz 6 → Oleanolic Acid

TEST Nr. 2.1	S6 K1	32	S6 K2	22	S6 K3	23	S6 K4	25	S6 K5	40	S6 K6	33
	S6 K1	24	S6 K2	45	S6 K3	32	S6 K4	37	S6 K5	42	S6 K6	36
	S6 K1	21	S6 K2	31	S6 K3	30	S6 K4	46	S6 K5	47	S6 K6	29
TEST Nr. 2.2	S6 K1	32	S6 K2	44	S6 K3	43	S6 K4	27	S6 K5	37	S6 K6	31
	S6 K1	24	S6 K2	38	S6 K3	38	S6 K4	35	S6 K5	36	S6 K6	37
	S6 K1	30	S6 K2	34	S6 K3	38	S6 K4	21	S6 K5	31	S6 K6	30
TEST 2.1 + 2.2	<b>MW</b>	<b>27,17</b>	<b>MW</b>	<b>33,80</b>	<b>MW</b>	<b>34,00</b>	<b>MW</b>	<b>29,00</b>	<b>MW</b>	<b>38,83</b>	<b>MW</b>	<b>32,67</b>
TEST 3.1 + 3.2	<b>STABW</b>	<b>4,75</b>	<b>STABW</b>	<b>8,20</b>	<b>STABW</b>	<b>7,13</b>	<b>STABW</b>	<b>6,78</b>	<b>STABW</b>	<b>5,49</b>	<b>STABW</b>	<b>3,27</b>

### 10.3.2. Testergebnisse TA 98\_mit S9

Auswertung Testergebnisse TA 98\_mit S9

Negativ	47	79	47	44	Positiv	185	258	283	262
Negativ	65	75	51	43	Positiv	209	230	271	274
Negativ	52	81	39	49	Positiv	153	219	274	268
Negativ	54	79	40	54					
Negativ	55	74	53	40					
Negativ	60	72	44	57					
<b>Negativ Gesamt</b>		<b>MW</b>	<b>56,42</b>		<b>Positiv Gesamt</b>		<b>MW</b>	<b>240,50</b>	
		<b>STABW</b>	<b>13,59</b>				<b>STABW</b>	<b>41,35</b>	

**Substanz 1 → Diosgenin**

TEST Nr. 1.1	S1 K1	59	S1 K2	47	S1 K3	49	S1 K4	51	S1 K5	51	S1 K6	62
	S1 K1	54	S1 K2	55	S1 K3	47	S1 K4	56	S1 K5	62	S1 K6	66
	S1 K1	77	S1 K2	71	S1 K3	61	S1 K4	52	S1 K5	65	S1 K6	61
TEST Nr. 1.2	S1 K1	74	S1 K2	73	S1 K3	93	S1 K4	84	S1 K5	70	S1 K6	59
	S1 K1	87	S1 K2	68	S1 K3	96	S1 K4	87	S1 K5	74	S1 K6	69
	S1 K1	89	S1 K2	74	S1 K3	86	S1 K4	89	S1 K5	76	S1 K6	70
TEST 1.1 + 1.2	<b>MW</b>	<b>73,33</b>	<b>MW</b>	<b>64,67</b>	<b>MW</b>	<b>72,00</b>	<b>MW</b>	<b>69,83</b>	<b>MW</b>	<b>66,33</b>	<b>MW</b>	<b>64,50</b>
	<b>STABW</b>	<b>14,32</b>	<b>STABW</b>	<b>11,08</b>	<b>STABW</b>	<b>22,31</b>	<b>STABW</b>	<b>18,58</b>	<b>STABW</b>	<b>9,18</b>	<b>STABW</b>	<b>4,51</b>

**Substanz 2 → Escin**

TEST Nr. 1.1	S2 K1	54	S2 K2	48	S2 K3	61	S2 K4	55	S2 K5	61	S2 K6	48
	S2 K1	52	S2 K2	50	S2 K3	45	S2 K4	68	S2 K5	49	S2 K6	50
	S2 K1	54	S2 K2	41	S2 K3	56	S2 K4	69	S2 K5	64	S2 K6	73
TEST Nr. 1.2	S2 K1	70	S2 K2	74	S2 K3	78	S2 K4	68	S2 K5	63	S2 K6	54
	S2 K1	79	S2 K2	69	S2 K3	66	S2 K4	40	S2 K5	58	S2 K6	53
	S2 K1	41	S2 K2	80	S2 K3	63	S2 K4	77	S2 K5	60	S2 K6	50
TEST 1.1 + 1.2	<b>MW</b>	<b>58,33</b>	<b>MW</b>	<b>60,33</b>	<b>MW</b>	<b>61,50</b>	<b>MW</b>	<b>67,40</b>	<b>MW</b>	<b>59,17</b>	<b>MW</b>	<b>54,67</b>
	<b>STABW</b>	<b>13,72</b>	<b>STABW</b>	<b>16,01</b>	<b>STABW</b>	<b>10,93</b>	<b>STABW</b>	<b>7,89</b>	<b>STABW</b>	<b>5,42</b>	<b>STABW</b>	<b>9,24</b>

**Substanz 3 → α-Solanin**

TEST Nr. 1.1	S3 K1	61	S3 K2	62	S3 K3	59	S3 K4	63	S3 K5	70	S3 K6	60
	S3 K1	56	S3 K2	55	S3 K3	71	S3 K4	54	S3 K5	53	S3 K6	58
	S3 K1	49	S3 K2	57	S3 K3	65	S3 K4	51	S3 K5	56	S3 K6	66
TEST Nr. 1.2	S3 K1	66	S3 K2	61	S3 K3	80	S3 K4	84	S3 K5	76	S3 K6	78
	S3 K1	84	S3 K2	68	S3 K3	58	S3 K4	72	S3 K5	68	S3 K6	76
	S3 K1	74	S3 K2	28	S3 K3	75	S3 K4	82	S3 K5	67	S3 K6	56
TEST 1.1 + 1.2	<b>MW</b>	<b>65,00</b>	<b>MW</b>	<b>55,17</b>	<b>MW</b>	<b>68,00</b>	<b>MW</b>	<b>67,67</b>	<b>MW</b>	<b>65,00</b>	<b>MW</b>	<b>65,67</b>
	<b>STABW</b>	<b>12,62</b>	<b>STABW</b>	<b>14,05</b>	<b>STABW</b>	<b>8,85</b>	<b>STABW</b>	<b>13,98</b>	<b>STABW</b>	<b>8,76</b>	<b>STABW</b>	<b>9,42</b>

**Substanz 4 → Hederacoside C**

TEST Nr. 2.1	S4 K1	57	S4 K2	52	S4 K3	67	S4 K4	53	S4 K5	49	S4 K6	35
	S4 K1	32	S4 K2	58	S4 K3	59	S4 K4	69	S4 K5	53	S4 K6	51
	S4 K1	40	S4 K2	34	S4 K3	62	S4 K4	64	S4 K5	37	S4 K6	48
TEST Nr. 2.2	S4 K1	54	S4 K2	53	S4 K3	52	S4 K4	33	S4 K5	50	S4 K6	50
	S4 K1	31	S4 K2	31	S4 K3	54	S4 K4	46	S4 K5	51	S4 K6	32
	S4 K1	45	S4 K2	59	S4 K3	38	S4 K4	49	S4 K5	56	S4 K6	43
TEST 2.1 + 2.2	<b>MW</b>	<b>43,17</b>	<b>MW</b>	<b>47,83</b>	<b>MW</b>	<b>55,33</b>	<b>MW</b>	<b>52,33</b>	<b>MW</b>	<b>49,33</b>	<b>MW</b>	<b>43,17</b>
	<b>STABW</b>	<b>10,91</b>	<b>STABW</b>	<b>12,22</b>	<b>STABW</b>	<b>10,07</b>	<b>STABW</b>	<b>12,96</b>	<b>STABW</b>	<b>6,53</b>	<b>STABW</b>	<b>8,04</b>

**Substanz 5 → Digitonin**

TEST Nr. 2.1	S5 K1	61	S5 K2	44	S5 K3	69	S5 K4	59	S5 K5	65	S5 K6	47
	S5 K1	65	S5 K2	43	S5 K3	56	S5 K4	53	S5 K5	54	S5 K6	54
	S5 K1	51	S5 K2	50	S5 K3	43	S5 K4	33	S5 K5	63	S5 K6	52
TEST Nr. 2.2	S5 K1	55	S5 K2	48	S5 K3	39	S5 K4	44	S5 K5	47	S5 K6	50
	S5 K1	57	S5 K2	49	S5 K3	40	S5 K4	39	S5 K5	27	S5 K6	32
	S5 K1	50	S5 K2	49	S5 K3	37	S5 K4	22	S5 K5	45	S5 K6	43
TEST 2.1 + 2.2	<b>MW</b>	<b>56,50</b>	<b>MW</b>	<b>47,17</b>	<b>MW</b>	<b>47,33</b>	<b>MW</b>	<b>45,60</b>	<b>MW</b>	<b>50,17</b>	<b>MW</b>	<b>46,33</b>
	<b>STABW</b>	<b>5,79</b>	<b>STABW</b>	<b>2,93</b>	<b>STABW</b>	<b>12,60</b>	<b>STABW</b>	<b>10,48</b>	<b>STABW</b>	<b>13,95</b>	<b>STABW</b>	<b>8,02</b>

**Substanz 6 → Oleonic Acid**

TEST Nr. 2.1	S6 K1	38	S6 K2	46	S6 K3	69	S6 K4	59	S6 K5	66	S6 K6	62
	S6 K1	45	S6 K2	36	S6 K3	56	S6 K4	53	S6 K5	70	S6 K6	43
	S6 K1	46	S6 K2	59	S6 K3	43	S6 K4	33	S6 K5	67	S6 K6	49
TEST Nr. 2.2	S6 K1	46	S6 K2	55	S6 K3	46	S6 K4	40	S6 K5	37	S6 K6	44
	S6 K1	48	S6 K2	34	S6 K3	44	S6 K4	43	S6 K5	35	S6 K6	28
	S6 K1	40	S6 K2	36	S6 K3	54	S6 K4	33	S6 K5	38	S6 K6	38
TEST 2.1 + 2.2	<b>MW</b>	<b>43,83</b>	<b>MW</b>	<b>44,33</b>	<b>MW</b>	<b>52,00</b>	<b>MW</b>	<b>43,50</b>	<b>MW</b>	<b>52,17</b>	<b>MW</b>	<b>47,20</b>
	<b>STABW</b>	<b>3,92</b>	<b>STABW</b>	<b>10,75</b>	<b>STABW</b>	<b>9,90</b>	<b>STABW</b>	<b>10,62</b>	<b>STABW</b>	<b>17,06</b>	<b>STABW</b>	<b>9,15</b>

## DATEN

## 10.3.3. Testergebnisse TA 102\_ohne S9

## Auswertung Testergebnisse TA 102\_ohne S9

Negativ	704	709	648	659	Positiv	1484	1405	1398	1246
Negativ	751	722	558	646	Positiv	1497	1386	1383	1251
Negativ	824	721	542	662	Positiv	1377	1439	1236	1234
Negativ	807	739	659	649					
Negativ	722	705	564	643					
Negativ	743	667	557	633					
<b>Negativ Gesamt</b>		<b>MW</b>	<b>676,42</b>		<b>Positiv Gesamt</b>		<b>MW</b>	<b>1361,33</b>	
		<b>STABW</b>	<b>74,28</b>				<b>STABW</b>	<b>96,04</b>	

## Substanz 1 → Diosgenin

TEST Nr. 1.1	S1 K1	737	S1 K2	751	S1 K3	814	S1 K4	795	S1 K5	639	S1 K6	647
	S1 K1	747	S1 K2	727	S1 K3	744	S1 K4	694	S1 K5	586	S1 K6	654
	S1 K1	704	S1 K2	733	S1 K3	776	S1 K4	781	S1 K5	641	S1 K6	663
TEST Nr. 1.2	S1 K1	729	S1 K2	739	S1 K3	744	S1 K4	732	S1 K5	668	S1 K6	667
	S1 K1	721	S1 K2	724	S1 K3	748	S1 K4	743	S1 K5	684	S1 K6	673
	S1 K1	703	S1 K2	713	S1 K3	482	S1 K4	732	S1 K5	673	S1 K6	695
TEST 1.1 + 1.2	<b>MW</b>	<b>723,50</b>	<b>MW</b>	<b>731,17</b>	<b>MW</b>	<b>765,20</b>	<b>MW</b>	<b>746,17</b>	<b>MW</b>	<b>648,50</b>	<b>MW</b>	<b>666,50</b>
TEST 3.1 + 3.2	<b>STABW</b>	<b>17,73</b>	<b>STABW</b>	<b>13,09</b>	<b>STABW</b>	<b>30,38</b>	<b>STABW</b>	<b>36,69</b>	<b>STABW</b>	<b>35,48</b>	<b>STABW</b>	<b>16,75</b>

## Substanz 2 → Escin

TEST Nr. 1.1	S2 K1	797	S2 K2	902	S2 K3	841	S2 K4	933	S2 K5	644	S2 K6	721
	S2 K1	791	S2 K2	839	S2 K3	974	S2 K4	891	S2 K5	671	S2 K6	588
	S2 K1	837	S2 K2	842	S2 K3	916	S2 K4	838	S2 K5	689	S2 K6	541
TEST Nr. 1.2	S2 K1	753	S2 K2	744	S2 K3	765	S2 K4	807	S2 K5	721	S2 K6	703
	S2 K1	744	S2 K2	747	S2 K3	801	S2 K4	819	S2 K5	702	S2 K6	720
	S2 K1	741	S2 K2	678	S2 K3	754	S2 K4	794	S2 K5	737	S2 K6	663
TEST 1.1 + 1.2	<b>MW</b>	<b>777,17</b>	<b>MW</b>	<b>792,00</b>	<b>MW</b>	<b>841,83</b>	<b>MW</b>	<b>847,00</b>	<b>MW</b>	<b>694,00</b>	<b>MW</b>	<b>656,00</b>
TEST 3.1 + 3.2	<b>STABW</b>	<b>37,83</b>	<b>STABW</b>	<b>82,62</b>	<b>STABW</b>	<b>87,47</b>	<b>STABW</b>	<b>54,05</b>	<b>STABW</b>	<b>33,75</b>	<b>STABW</b>	<b>75,40</b>

## Substanz 3 → alpha-Solanin

TEST Nr. 1.1	S3 K1	733	S3 K2	812	S3 K3	867	S3 K4	816	S3 K5	647	S3 K6	639
	S3 K1	796	S3 K2	778	S3 K3	862	S3 K4	844	S3 K5	656	S3 K6	646
	S3 K1	775	S3 K2	673	S3 K3	854	S3 K4	805	S3 K5	644	S3 K6	621
TEST Nr. 1.2	S3 K1	806	S3 K2	827	S3 K3	702	S3 K4	778	S3 K5	671	S3 K6	689
	S3 K1	783	S3 K2	799	S3 K3	858	S3 K4	780	S3 K5	689	S3 K6	681
	S3 K1	764	S3 K2	803	S3 K3	794	S3 K4	718	S3 K5	701	S3 K6	693
TEST 1.1 + 1.2	<b>MW</b>	<b>776,17</b>	<b>MW</b>	<b>782,00</b>	<b>MW</b>	<b>822,83</b>	<b>MW</b>	<b>792,60</b>	<b>MW</b>	<b>668,00</b>	<b>MW</b>	<b>661,50</b>
TEST 3.1 + 3.2	<b>STABW</b>	<b>25,86</b>	<b>STABW</b>	<b>55,77</b>	<b>STABW</b>	<b>65,00</b>	<b>STABW</b>	<b>47,61</b>	<b>STABW</b>	<b>23,24</b>	<b>STABW</b>	<b>30,05</b>

## Substanz 4 → Hederacoside C

TEST Nr. 2.1	S4 K1	664	S4 K2	663	S4 K3	653	S4 K4	635	S4 K5	617	S4 K6	682
	S4 K1	605	S4 K2	662	S4 K3	645	S4 K4	626	S4 K5	668	S4 K6	665
	S4 K1	654	S4 K2	667	S4 K3	632	S4 K4	635	S4 K5	665	S4 K6	689
TEST Nr. 2.2	S4 K1	649	S4 K2	637	S4 K3	653	S4 K4	658	S4 K5	711	S4 K6	695
	S4 K1	655	S4 K2	658	S4 K3	649	S4 K4	663	S4 K5	729	S4 K6	714
	S4 K1	648	S4 K2	624	S4 K3	656	S4 K4	631	S4 K5	706	S4 K6	693
TEST 2.1 + 2.2	<b>MW</b>	<b>645,83</b>	<b>MW</b>	<b>656,25</b>	<b>MW</b>	<b>648,00</b>	<b>MW</b>	<b>641,33</b>	<b>MW</b>	<b>682,67</b>	<b>MW</b>	<b>689,67</b>
TEST 3.1 + 3.2	<b>STABW</b>	<b>20,80</b>	<b>STABW</b>	<b>13,35</b>	<b>STABW</b>	<b>8,72</b>	<b>STABW</b>	<b>15,29</b>	<b>STABW</b>	<b>40,82</b>	<b>STABW</b>	<b>16,12</b>

## Substanz 5 → Digitonin

TEST Nr. 2.1	S5 K1	685	S5 K2	672	S5 K3	629	S5 K4	674	S5 K5	669	S5 K6	633
	S5 K1	632	S5 K2	689	S5 K3	630	S5 K4	651	S5 K5	646	S5 K6	646
	S5 K1	658	S5 K2	642	S5 K3	618	S5 K4	536	S5 K5	562	S5 K6	661
TEST Nr. 2.2	S5 K1	661	S5 K2	679	S5 K3	693	S5 K4	648	S5 K5	704	S5 K6	688
	S5 K1	688	S5 K2	666	S5 K3	632	S5 K4	646	S5 K5	735	S5 K6	686
	S5 K1	656	S5 K2	657	S5 K3	632	S5 K4	661	S5 K5	705	S5 K6	498
TEST 2.1 + 2.2	<b>MW</b>	<b>663,33</b>	<b>MW</b>	<b>667,50</b>	<b>MW</b>	<b>639,00</b>	<b>MW</b>	<b>634,00</b>	<b>MW</b>	<b>670,17</b>	<b>MW</b>	<b>635,33</b>
TEST 3.1 + 3.2	<b>STABW</b>	<b>20,72</b>	<b>STABW</b>	<b>16,60</b>	<b>STABW</b>	<b>26,97</b>	<b>STABW</b>	<b>55,72</b>	<b>STABW</b>	<b>61,40</b>	<b>STABW</b>	<b>70,68</b>

## Substanz 6 → Oleanolic Acid

TEST Nr. 2.1	S6 K1	646	S6 K2	658	S6 K3	643	S6 K4	627	S6 K5	613	S6 K6	675
	S6 K1	638	S6 K2	627	S6 K3	636	S6 K4	649	S6 K5	518	S6 K6	677
	S6 K1	639	S6 K2	638	S6 K3	641	S6 K4	654	S6 K5	644	S6 K6	671
TEST Nr. 2.2	S6 K1	650	S6 K2	662	S6 K3	676	S6 K4	659	S6 K5	556	S6 K6	686
	S6 K1	629	S6 K2	651	S6 K3	656	S6 K4	661	S6 K5	597	S6 K6	676
	S6 K1	649	S6 K2	642	S6 K3	666	S6 K4	632	S6 K5	617	S6 K6	615
TEST 2.1 + 2.2	<b>MW</b>	<b>641,83</b>	<b>MW</b>	<b>646,33</b>	<b>MW</b>	<b>653,00</b>	<b>MW</b>	<b>647,00</b>	<b>MW</b>	<b>590,83</b>	<b>MW</b>	<b>666,67</b>
TEST 3.1 + 3.2	<b>STABW</b>	<b>8,04</b>	<b>STABW</b>	<b>13,16</b>	<b>STABW</b>	<b>15,75</b>	<b>STABW</b>	<b>14,27</b>	<b>STABW</b>	<b>45,95</b>	<b>STABW</b>	<b>25,79</b>

### 10.3.4. Testergebnisse TA 102\_mit S9

Auswertung Testergebnisse TA 102\_mit S9

Negativ	772	834	867	898	Positiv	1615	1617	1752	1734			
Negativ	833	841	899	888	Positiv	1742	1657	1679	1620			
Negativ	734	816	897	892	Positiv	1601	1692	1777	1648			
Negativ	794	786	879	847								
Negativ	851	781	874	874								
Negativ	788	n.a.	888	816								
<b>Negativ Gesamt</b>		<b>MW</b>	<b>841,26</b>		<b>Positiv Gesamt</b>		<b>MW</b>	<b>1677,83</b>				
		<b>STABW</b>	<b>47,87</b>				<b>STABW</b>	<b>61,07</b>				
<b>Substanz 1 → Diosgenin</b>												
TEST Nr. 1.1	S1 K1	841	S1 K2	881	S1 K3	829	S1 K4	819	S1 K5	711	S1 K6	747
	S1 K1	878	S1 K2	907	S1 K3	825	S1 K4	835	S1 K5	773	S1 K6	759
	S1 K1	827	S1 K2	886	S1 K3	842	S1 K4	827	S1 K5	756	S1 K6	732
TEST Nr. 1.2	S1 K1	863	S1 K2	825	S1 K3	817	S1 K4	819	S1 K5	828	S1 K6	827
	S1 K1	887	S1 K2	871	S1 K3	823	S1 K4	855	S1 K5	761	S1 K6	809
	S1 K1	859	S1 K2	843	S1 K3	829	S1 K4	881	S1 K5	815	S1 K6	841
TEST 1.1 + 1.2	<b>MW</b>	<b>859,17</b>	<b>MW</b>	<b>868,83</b>	<b>MW</b>	<b>827,50</b>	<b>MW</b>	<b>839,33</b>	<b>MW</b>	<b>774,00</b>	<b>MW</b>	<b>785,83</b>
TEST 3.1 + 3.2	<b>STABW</b>	<b>22,40</b>	<b>STABW</b>	<b>29,98</b>	<b>STABW</b>	<b>8,38</b>	<b>STABW</b>	<b>24,41</b>	<b>STABW</b>	<b>42,57</b>	<b>STABW</b>	<b>45,61</b>
<b>Substanz 2 → Escin</b>												
TEST Nr. 1.1	S2 K1	773	S2 K2	799	S2 K3	733	S2 K4	776	S2 K5	733	S2 K6	798
	S2 K1	747	S2 K2	788	S2 K3	729	S2 K4	771	S2 K5	764	S2 K6	792
	S2 K1	798	S2 K2	767	S2 K3	737	S2 K4	764	S2 K5	775	S2 K6	787
TEST Nr. 1.2	S2 K1	780	S2 K2	782	S2 K3	799	S2 K4	781	S2 K5	741	S2 K6	773
	S2 K1	797	S2 K2	796	S2 K3	875	S2 K4	817	S2 K5	731	S2 K6	732
	S2 K1	752	S2 K2	763	S2 K3	753	S2 K4	808	S2 K5	735	S2 K6	768
TEST 1.1 + 1.2	<b>MW</b>	<b>774,50</b>	<b>MW</b>	<b>782,50</b>	<b>MW</b>	<b>771,00</b>	<b>MW</b>	<b>786,17</b>	<b>MW</b>	<b>746,50</b>	<b>MW</b>	<b>775,00</b>
TEST 3.1 + 3.2	<b>STABW</b>	<b>21,70</b>	<b>STABW</b>	<b>14,87</b>	<b>STABW</b>	<b>57,08</b>	<b>STABW</b>	<b>21,35</b>	<b>STABW</b>	<b>18,46</b>	<b>STABW</b>	<b>23,93</b>
<b>Substanz 3 → alpha-Solanin</b>												
TEST Nr. 1.1	S3 K1	746	S3 K2	856	S3 K3	826	S3 K4	833	S3 K5	807	S3 K6	754
	S3 K1	773	S3 K2	815	S3 K3	818	S3 K4	828	S3 K5	741	S3 K6	769
	S3 K1	738	S3 K2	829	S3 K3	802	S3 K4	814	S3 K5	835	S3 K6	795
TEST Nr. 1.2	S3 K1	884	S3 K2	900	S3 K3	879	S3 K4	811	S3 K5	741	S3 K6	756
	S3 K1	908	S3 K2	899	S3 K3	894	S3 K4	825	S3 K5	731	S3 K6	773
	S3 K1	866	S3 K2	871	S3 K3	896	S3 K4	775	S3 K5	735	S3 K6	781
TEST 1.1 + 1.2	<b>MW</b>	<b>801,40</b>	<b>MW</b>	<b>861,67</b>	<b>MW</b>	<b>852,50</b>	<b>MW</b>	<b>814,33</b>	<b>MW</b>	<b>765,00</b>	<b>MW</b>	<b>771,33</b>
TEST 3.1 + 3.2	<b>STABW</b>	<b>68,72</b>	<b>STABW</b>	<b>35,29</b>	<b>STABW</b>	<b>41,86</b>	<b>STABW</b>	<b>21,01</b>	<b>STABW</b>	<b>44,43</b>	<b>STABW</b>	<b>15,47</b>
<b>Substanz 4 → Hederacoside C</b>												
TEST Nr. 2.1	S4 K1	884	S4 K2	844	S4 K3	865	S4 K4	831	S4 K5	891	S4 K6	882
	S4 K1	882	S4 K2	875	S4 K3	886	S4 K4	869	S4 K5	873	S4 K6	895
	S4 K1	867	S4 K2	890	S4 K3	871	S4 K4	899	S4 K5	n.a.	S4 K6	872
TEST Nr. 2.2	S4 K1	869	S4 K2	832	S4 K3	815	S4 K4	839	S4 K5	882	S4 K6	892
	S4 K1	893	S4 K2	843	S4 K3	841	S4 K4	807	S4 K5	897	S4 K6	885
	S4 K1	884	S4 K2	871	S4 K3	869	S4 K4	n.a.	S4 K5	895	S4 K6	875
TEST 2.1 + 2.2	<b>MW</b>	<b>879,83</b>	<b>MW</b>	<b>859,17</b>	<b>MW</b>	<b>857,83</b>	<b>MW</b>	<b>849,00</b>	<b>MW</b>	<b>887,60</b>	<b>MW</b>	<b>883,50</b>
TEST 3.1 + 3.2	<b>STABW</b>	<b>9,95</b>	<b>STABW</b>	<b>22,68</b>	<b>STABW</b>	<b>25,54</b>	<b>STABW</b>	<b>35,67</b>	<b>STABW</b>	<b>9,99</b>	<b>STABW</b>	<b>9,09</b>
<b>Substanz 5 → Digitonin</b>												
TEST Nr. 2.1	S5 K1	699	S5 K2	894	S5 K3	878	S5 K4	873	S5 K5	866	S5 K6	886
	S5 K1	865	S5 K2	861	S5 K3	883	S5 K4	851	S5 K5	858	S5 K6	860
	S5 K1	876	S5 K2	888	S5 K3	894	S5 K4	887	S5 K5	922	S5 K6	855
TEST Nr. 2.2	S5 K1	877	S5 K2	867	S5 K3	899	S5 K4	897	S5 K5	863	S5 K6	830
	S5 K1	828	S5 K2	888	S5 K3	894	S5 K4	858	S5 K5	870	S5 K6	868
	S5 K1	846	S5 K2	892	S5 K3	861	S5 K4	870	S5 K5	884	S5 K6	891
TEST 2.1 + 2.2	<b>MW</b>	<b>858,40</b>	<b>MW</b>	<b>881,67</b>	<b>MW</b>	<b>884,83</b>	<b>MW</b>	<b>872,67</b>	<b>MW</b>	<b>868,20</b>	<b>MW</b>	<b>865,00</b>
TEST 3.1 + 3.2	<b>STABW</b>	<b>21,08</b>	<b>STABW</b>	<b>14,01</b>	<b>STABW</b>	<b>14,05</b>	<b>STABW</b>	<b>17,26</b>	<b>STABW</b>	<b>9,86</b>	<b>STABW</b>	<b>22,25</b>
<b>Substanz 6 → Oleanolic Acid</b>												
TEST Nr. 2.1	S6 K1	877	S6 K2	895	S6 K3	873	S6 K4	881	S6 K5	883	S6 K6	816
	S6 K1	893	S6 K2	884	S6 K3	896	S6 K4	892	S6 K5	879	S6 K6	836
	S6 K1	896	S6 K2	842	S6 K3	866	S6 K4	902	S6 K5	858	S6 K6	844
TEST Nr. 2.2	S6 K1	894	S6 K2	893	S6 K3	839	S6 K4	890	S6 K5	852	S6 K6	843
	S6 K1	895	S6 K2	875	S6 K3	852	S6 K4	879	S6 K5	871	S6 K6	860
	S6 K1	889	S6 K2	846	S6 K3	886	S6 K4	847	S6 K5	880	S6 K6	812
TEST 2.1 + 2.2	<b>MW</b>	<b>890,67</b>	<b>MW</b>	<b>877,80</b>	<b>MW</b>	<b>868,67</b>	<b>MW</b>	<b>881,83</b>	<b>MW</b>	<b>870,50</b>	<b>MW</b>	<b>835,17</b>
TEST 3.1 + 3.2	<b>STABW</b>	<b>7,12</b>	<b>STABW</b>	<b>21,53</b>	<b>STABW</b>	<b>21,13</b>	<b>STABW</b>	<b>18,97</b>	<b>STABW</b>	<b>12,79</b>	<b>STABW</b>	<b>18,23</b>

n.a. = nicht auszählbar

# CURRICULUM VITAE

---

## PERSÖNLICHE DATEN

Name: Michaela Theresa Lucia Kreuml  
Geburtsdatum: 29. Juni 1982  
Nationalität: Österreich



## AUSBILDUNG

Jun 2003 Matura an der HLW Landwiedstraße, Linz

Okt 2003 - Dez 2010 Diplomstudium Ernährungswissenschaften A474, Studienschwerpunkt: Lebensmitteltechnologie, Universität Wien  
Thema der Diplomarbeit: „*Veränderung ausgewählter Inhaltsstoffe und der sensorischen Eigenschaften von Kaffee während einer Lagerdauer von 9 Monaten*“  
Supervisor: Ao. Univ.-Prof. Dr. Dorota Majchrzak

Jan 2011 Graduiert als Mag. rer.nat.

Seit März 2011 Doktoratsstudium der Naturwissenschaften (Lebenswissenschaften) Dissertationsgebiet: Ernährungswissenschaften A 791 474, Universität Wien  
Thema der Dissertation: „*Quantifizierung von Saponinen in Oberflächen- und Abwasserproben mittels LC-MS/MS - deren Einfluss auf die Schaumbildung und toxikologische Bedeutung*“  
Supervisor: Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner

## BERUFSERFAHRUNG

März 2009 - Dez 2009 Durchführung der sensorischen Analysen für die Firma Nestlé am Institut für Ernährungswissenschaften, Universität Wien

Okt 2009 - März 2011 Tutorin am Department für Ernährungswissenschaften, Universität Wien

Sept 2010 - Dez 2012 Dissertantin und Projektmitarbeiterin am Umweltbundesamt GmbH Wien, Abteilung Organische Analysen, Arbeitsgruppe Emerging Pollutants (LC-MS/MS)

Jan 2013 – Jun 2013 Freie Dienstvertragsnehmerin am Umweltbundesamt GmbH Wien, Abteilung Organische Analysen, Arbeitsgruppe Pestizide und Metabolite (LC-MS/MS)

## CURRICULUM VITAE

---

- Juli 2013 – Aug 2014      Angestellte am Umweltbundesamt GmbH, Abteilung Organische Analysen, Arbeitsgruppe Pestizide und Metabolite (LC-MS/MS)
- Seit Aug 2014              Angestellte am Institut für Hydroanalytik; AGES Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH Linz (LC-MS/MS und LC-HRMS)

### PRAKTIKA

- Juli - Aug 2007              IWA – Institut für Wasseraufbereitung der LinzAg (Trinkwasserlabor)
- Aug - Sept 2007            AGES Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH Linz, Bereich Landwirtschaft (Labor)
- Sept 2008                    IWA – Institut für Wasseraufbereitung der LinzAg (Abwasserlabor)

### WEITERE TÄTIGKEITEN NEBEN DEM STUDIUM

- Seit Mai 2011                Studienrichtungsververtretung des Doktorats NaWi (Naturwissenschaften)

### ZUSÄTZLICHE AUSBILDUNG

- März 2009                    Ausbildung zur Kaffee-Expertin am Österreichischen Kaffeeinstitut der VHS Hietzing, Wien

### WEITERE QUALIFIKATIONEN

Analytik:      LC-MS/MS; LC-HRMS; HPLC-UV; Bakterien Kulturen: Ames *Salmonella*/microsome Mutagenitäts Assay (*Salmonella* Test, Ames Test); Troloxäquivalentstest für oxidative Aktivität (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity Assay = TEAC); Photometrie; Sensorische Analysen

PC:              MS Office (Word, Excel, Power Point, Access), Statistikprogramm (SPSS) und LIMS (Labor-Informations- und Management-System)

Sprachen:      Deutsch, Englisch, Französisch

# CURRICULUM VITAE

---

## SUPERVISION UND MENTORING VON ZWEI MASTERSTUDENTINNEN

### Mitbewertung von zwei Masterarbeiten:

1. SCHAUMBILDUNG IN GEWÄSSERN  
Ursachen und Schaumpotential pflanzlicher Komponenten  
(Anna Pomassl – Universität für Bodenkultur Wien)
2. VERHALTEN VON AUSGEWÄHLTEN SAPONINEN IM AMES TEST  
(Julia Rath – Universität Wien)

## WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEITEN/PUBLIKATIONEN

KREUML, M.; DRAXLER, A.; HOCHEDLINGER, G.; HUMER, F.: Grundlagen zur Schaumproblematik in Fließgewässern (Teil 2) – Tätigkeitsbericht 2011. Umweltbundesamt GmbH 2011

KREUML, M.; DRAXLER, A.; HOCHEDLINGER, G.; GABRIEL, O.; HUMER, F.: Grundlagen zur Schaumproblematik in Fließgewässern (Teil 2) – Endbericht 2012. Umweltbundesamt GmbH 2012

Kongressteilnahme und Posterpräsentation (Changes of sensory quality characteristics of coffee during storage) bei der "5th European Conference on Sensory and Consumer Research" in Bern (Schweiz) am 9. – 12. September 2012

KREUML, M.; PLÖDERL, B.; MAJCHRZAK, D.: Haltbarkeit von Röstkaffee. Wie verändern sich sensorische Qualität und ausgewählte Inhaltsstoffe von Kaffee während der Lagerung? Aroma – Das Röstmagazin, COFFEE BUSINESS Verlagsgesellschaft mbH, Osnabrück 01/2012

KREUML, M.; PLÖDERL, B.; MAJCHRZAK, D.: Veränderungen der sensorischen Eigenschaften und ausgewählter Inhaltsstoffe von Kaffee während der Lagerung – Changes of Sensory Quality Characteristics and selected chemical parameters of Coffee during storage. **ERNÄHRUNG/NUTRITION**, Fachzeitschriftenverlagsges.m.b.H, Wien 10/2012

KREUML, M.T.L.; MAJCHRZAK, D.; PLOEDERL, B.; KOENIG, J.: Changes in sensory quality characteristics of coffee during storage. Food Sciences & Nutrition 2013; 1 (4): 267-272

Wien, am 06.10.2014



Mag. Michaela Kreuml