



forschen.
vernetzen.
anwenden.

Innovationsreport 2025

Industrielle Gemeinschaftsforschung

IGF-Forschungsvorhaben 01IF22369N / 22369 N

Entwicklung eines Verfahrens zur rezeptorspezifischen Anreicherung von Hormonen und endokrinen Disruptoren (RezAH)

Laufzeit:

01.04.2022 – 31.07.2025

Beteiligte Forschungsstelle(n):

Institut für Umwelt & Energie, Technik & Analytik e. V. (IUTA)
Forschungsabteilung Umweltanalytik & Toxikologie

Schlussbericht vom 19.12.2025

zum IGF-Vorhaben 01IF22369 N

Thema

Entwicklung eines sensitiven Verfahrens zur rezeptorspezifischen Anreicherung von Hormonen und endokrinen Disruptoren (RezAH)

Berichtszeitraum

01.04.2022 bis 31.07.2025

Forschungsvereinigung

Institut für Umwelt & Energie, Technik & Analytik e.V. (IUTA)
Bliersheimer Straße 58-60
47239 Duisburg

Forschungseinrichtung(en)

Institut für Umwelt & Energie, Technik & Analytik e.V. (IUTA)
Bliersheimer Straße 58-60
47239 Duisburg



Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung des Projektes	6
1.1. Einleitung.....	6
1.2. Forschungsziel	8
2. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse	9
2.1. Arbeitspaket 1: Bindung des menschlichen Östrogenrezeptors auf einer Oberfläche.....	9
2.1.1. Eingesetzte Vorbehandlungs- und Nachweismethoden	9
2.1.1.1. Methoden der Oberflächenvorbehandlung	9
2.1.1.2. Überprüfung des Beschichtungserfolges bei Metalloberflächen	10
2.1.1.3. Überprüfung des Beschichtungserfolges durch den Einsatz von Phytase.....	10
2.1.1.4. Einsatz der Ligandenbindestelle zur Bindung an eine modifizierte Oberfläche.....	11
2.1.1.5. Überprüfung des Beschichtungserfolges durch Auslagerung in 17 β -Estradiollösung ...	12
2.1.1.6. Nachweis der Hormone	12
2.1.2. Oberflächenmodifizierung metallischer Oberflächen	13
2.1.2.1. Bindung an eine Metalloberfläche über Mercaptopropionsäure (Im et.al.).....	13
2.1.2.2. Bindung an eloxiertes Aluminium oder Titanlegierungen über organische Phosphorsäuregruppen/Phosphonate	20
2.1.3. Bindung an textile Materialien	26
2.1.4. Bindung an Glasmembran und stickstoffmodifiziertes Polymer	28
2.1.5. Diskussion und Fazit zum Arbeitspaket 1	32
2.2. Arbeitspaket 2: Laborversuche zur Anreicherung, Elution und Wiederfindung von Estrogenen.	33
2.3. Arbeitspaket 3: Biofilmuntersuchungen am Passivsampler während der Exposition	34
2.4. Arbeitspaket 4: Kalibrierversuche im Labor für ausgewählte repräsentative Estrogene	35
2.5. Arbeitspaket 5: Passive Probenahmen an zuvor ausgewählten Standorten	37
2.6. Arbeitspaket 6: Vergleich passive und aktive Probenahme (KI)	38
3. Verwendung der Zuwendung.....	40
3.1. Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)	40
3.2. Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans)	40
3.3. Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans)	40
4. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	40
5. Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten	41

6. Wissenstransfer in die Wirtschaft	42
7. Durchgeführte Transfermaßnahmen.....	42
8. Geplante spezifische Transfermaßnahmen nach der Projektlaufzeit	43

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematischer Ablauf der Herstellung eines Immunosensors zur Detektion von Estrogenen nach Im et al.	13
Abbildung 2	Ablaufschema zur Beschichtung der Passivsammler.....	14
Abbildung 3	Metallstücke vor der Beschichtung.	14
Abbildung 4	Beschichtete Plättchen nach den ersten beiden Beschichtungsstufen.....	15
Abbildung 5	Aufnahmen mittels Lichtmikroskop (100 fache Vergrößerung, Hellfeldmodus) der beschichteten Silberplättchen (a Original, b beschichtet).....	15
Abbildung 6	REM-Aufnahmen der beschichteten Silberplättchen	16
Abbildung 7	Eingesetzte Materialien mit Goldoberfläche; a) mir Piranha-Säure gereinigtes rundes Material b) Veränderung der Oberfläche während des Beschichtungsvorgangs c) goldbedampfter Objekträger mit aufgebrachter Lösung der Ligandenbindestelle.	17
Abbildung 8	Erstes Beispiel der REM / EDX Analysen der Goldoberflächen; a) Bild der Oberfläche mit dem analysierten Bereich 2 b) EDX Analyse des gewählten Bereichs 2.	18
Abbildung 9	Zweites Beispiel der REM / EDX Analysen der Goldoberflächen; a) Bild der Oberfläche mit dem analysierten Bereich 1 b) EDX Analyse des gewählten Bereichs 1.	18
Abbildung 10	Reaktionsschema zur Herstellung von einer Phosphonat-Schicht auf einer Oberfläche	20
Abbildung 11	Eingespannte Aluminiumplättchen zur Beschichtung mittels T-BAG-Methode.....	21
Abbildung 12	Maleimid-Addukt Bildung zur Ausbildung eines Succinimidesters.	21
Abbildung 13	EDX-Spektrum des beschichteten Aluminiums	22
Abbildung 14	Reaktionsgleichung zum Nachweis von Phytase und Beispiel für die Gelbfärbung.	23
Abbildung 15	Lösungen nach der Reaktion mit immobilisierter Phytase. 1-Lösemittelblindwert, 2-Gereinigtes Plättchen ohne Phytase, 3-Lösemittelblindwert, 4-Gereinigtes Al-Plättchen mit Phytase, 5-Beschichtung in 2 Schritten mit Phytase, 6-Beschichtung in einem Schritt mit Phytase, 7-Beschichtung in 2 Schritten mit Phytase.	23
Abbildung 16	Titanmaterial a) vor der Reinigung b) nach der Reinigung c) nach Beschichtung mit der Trägerstruktur.....	24
Abbildung 17	Beispiel der REM / EDX Analysen der Titanoberflächen; a) Bild der Oberfläche mit dem analysierten Bereich 1 b) EDX Analyse des gewählten Bereichs 1.	25
Abbildung 18	Eingesetztes Textil; a) geringes Volumen auf der Oberfläche b) benetztes Textil c) komplett in Lösung eingelegt.	27
Abbildung 19	Lewatit VP OC 1065 ohne Vorbehandlung.	28
Abbildung 20	Lewatit VP OC 1065 a) gewaschen und nass; b) getrocknet bei 40°C.	29
Abbildung 21	Getrocknetes und feuchtes bzw. nasses Lewatit in HPLC- Vials und Eppendorf-Caps nach Zugabe von 100 µL Lösung der Ligandenbindestelle.....	29
Abbildung 22	MakroPorP12M5-500 und MakroPorP1.5M1-200 Glasmembrane (10 x 10 mm).	30
Abbildung 23	Glasmembrane in 17 β -Estradiol-Auslagerungslösung.....	31
Abbildung 24	Ablauf des Fouling-Prozesses. A: Polymere Materialien wie Proteine, Polysaccharide und Zellwandbruchstücke adsorbieren in einem sehr schnellen Prozess auf der Oberfläche. B: Die sich ausbildende Oberflächenschicht erleichtert das Anhaften von Mikroorganismen. C: Innerhalb weniger Tage können sich sehr stabile Biofilme bilden.	34

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Eigenschaften der zwei untersuchten makroporöse Siliziummembrane.....	30
Tabelle 2	Vergleich passive und aktive Probenahme.....	38
Tabelle 3	Geplante Transfermaßnahmen (teilweise auch nach Projektende)	42

1. Einleitung und Zielsetzung des Projektes

1.1. Einleitung

Durch die Verwendung einer Vielzahl an Chemikalien und der Einleitung von Abwasser in Oberflächengewässer werden die Ökosystemfunktionen, wie die Selbstreinigungskraft von Gewässern, die dort vorkommenden Organismen bzw. ganze Populationen negativ beeinträchtigt. Ein naturnaher ökologischer und chemischer Zustand, wie in der europäischen Wasserrahmenrichtlinie (WRRL)¹ gefordert, ist oft nicht gegeben. Um den aktuellen Zustand der Gewässer und auch Maßnahmen zur Verbesserung bewerten zu können, sind repräsentative Probenahmen und Analysen notwendig, wobei die Probenahme der entscheidende Faktor mit dem größten Fehlerpotential darstellt².

Der Großteil der Untersuchungen von Gewässern erfolgt aktuell mittels instrumenteller Analytik wie z. B. Gaschromatographie-Triple-Quadrupolmassenspektrometrie (GC-MS/MS) und Flüssigchromatographie-Triple-Quadrupolmassenspektrometrie (LC-MS/MS), wobei spezifisch die Konzentration einzelner bekannter Substanzen bestimmt wird. Diese Verfahren sind von Vorteil, wenn zum Beispiel Einleitungen von genau bekannten Substanzen in Gewässer überwacht werden sollen. Allerdings sind diese Verfahren ungeeignet, um die Gesamtheit einer Probe zu erfassen, da lediglich eine vorher definierte Liste an Substanzen untersucht wird.

Diese Lücke schließt die wirkungsbezogene Analytik. In der wirkungsbezogenen Analytik werden modifizierte Zellsysteme oder Biosensoren genutzt, um biologische (Aus-)Wirkungen und Effekte einer Probe zu beschreiben. Durch natürliche Wirkmechanismen können so alle Komponenten einer Probe erfassen werden, die Einfluss auf diesen Mechanismus nehmen. Somit kann nicht nur eine Aussage über die Gesamtheit der Probe, sondern auch über deren Auswirkungen auf die Umwelt getroffen werden. Bereits etablierte sogenannte Endpunkte sind z. B. Genotoxizität, Neurotoxizität, oder hormonelle Effekte (estrogenen-, androgene-, gestagene-Effekte).

Auch bei der wirkungsbezogenen Analytik ist für viele Proben eine Anreicherung und Aufreinigung notwendig, um geringe Effekte erfassen zu können. Die für die instrumentelle Analytik eingesetzten Verfahren wie die Flüssig-Flüssig-Extraktion oder die Festphasenextraktion sind für eine wirkungsbezogene Analytik jedoch nicht ohne Einschränkungen geeignet. Auch wenn diese Verfahren zurzeit eingesetzt werden, um den notwendigen Konzentrationsbereich zu erreichen, ist es völlig unstrittig, dass durch diese Vorgehensweise potenziell am Effekt beteiligte Komponenten und Substanzen aus der Probe entfernt werden. Diese Diskriminierung kann zu einem gewissen Grad minimiert, aber nicht ausgeschlossen werden.

Um die Vorteile einer wirkungsbezogenen Analytik voll ausschöpfen zu können und die Qualität dieser Analytik wesentlich zu verbessern, muss eine diskriminierungsfreie Anreicherung entwickelt

¹ Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. 2000, Official Journal of the European Union. p. 1-73

² Cammann, K., ed. Instrumentelle analytische Chemie. Verfahren, Anwendungen und Qualitätssicherung. 2001, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg.

werden. Dafür sind möglichst alle Substanzen, die an der Wirkung beteiligt sind, anzureichern und alle Substanzen, die ggf. eine Störung verursachen, abzutrennen. Da die Wirkung sich z. B. im Falle der estrogenen Effekte über die Bindung an den Estrogenrezeptor definiert, kann dieser nicht nur für die Detektion, sondern bereits zur Sammlung und Anreicherung der wirkungsrelevanten Substanzen optimal genutzt werden.

Dem Vorhaben liegt daher die Idee und Hypothese zugrunde, dass durch die Immobilisierung des Rezeptors auf einem Trägermaterial ein wirkungsbezogener Passivsammler hergestellt werden kann, der bereits bei der Probenahme eine selektive Anreicherung der Substanzen im Gewässer erlaubt.

Eine kontinuierliche, repräsentative Probenahme über einen längeren Zeitraum ermöglicht außerdem die Berücksichtigung von Konzentrationsschwankungen oder Belastungsspitzen, welche bei herkömmlich durchgeführten Stichproben nicht erfasst werden³. Eine Entnahme von mehreren Teilproben über einen längeren Zeitraum (z. B. 24 oder 72 h), die anschließend zu einer Mischprobe vereint werden, liefert zwar eine genauere Aussage zu Durchschnittskonzentrationen, ist aber sehr zeit- und damit kostenintensiv. Außerdem ist die Stabilität der Proben während der Probenahme aufgrund der biologischen Aktivität und der eingeschränkten Kühlmöglichkeiten vor Ort nur begrenzt gegeben.

Bei Passivsammlern wirkt eine Trägersubstanz als Absorbens oder Adsorbens, an den die Analyten meist chemisch gebunden werden, wodurch eine Stabilität der Analyten gegeben ist. Passivsammler benötigen keine Energiezufuhr und können somit sehr flexibel auch in schwer zugänglichen Bereichen eingesetzt werden. Des Weiteren können Passivsammler das Äquivalent von mehreren Litern Wasser pro Tag sammeln⁴ und somit zu einer Verbesserung der Empfindlichkeit der Analytik beitragen.

Durch die angestrebte Entwicklung einer diskriminierungsfreien Anreicherung für die wirkungsbezogene Analytik in Form eines Passivsammlers können damit sowohl Kosten für eine aufwändige Probenahme, Stabilisierung und Anreicherung eingespart, als auch die Qualität der Analytik und damit die Bewertung der Gewässer deutlich verbessert werden.

³ Becker, B., Claus, E., Möhlenkamp, C., Bachtin, J., Paschke, A., Schäfer, S., Anwendung von Passivsammlern in Überwachungsprogrammen gemäß WRRL und MSRL - Identifizierung von Kontaminationsschwerpunkten, Referenzstandorten und neuen Schadstoffen (AnPassa). im Auftrag des Umweltbundesamtes, 2020.

⁴ M. Zennegg, E.V., P. Schmid, Messung von PCB und Dioxinen in Fließgewässern. Evaluation der Praxistauglichkeit von Sedimentanalysen und Messungen mittels Passivsammlern in der Wasserphase zur Lokalisierung von Emissionsquellen. Bundesamt für Umwelt. Umwelt-Wissen, 2016. 1639: p. 46.

1.2. Forschungsziel

Der humane Estrogenrezeptor lässt sich auf einer Oberfläche durch chemisch-physikalische Verfahren immobilisieren. Der auf dem Trägermaterial gebundene und weiter aktive Rezeptor kann als Passivsammler verwendet werden. Er ermöglicht eine kontinuierliche, repräsentative Probenahme nur von Substanzen, die am Rezeptor binden und somit relevant für eine hormonelle Wirkung sind. Die immobilisierten Substanzen können mit entsprechenden Extraktionsverfahren im Labor vom Passivsammler gelöst und mit anschließender instrumenteller Analytik bestimmt und deren Wirkung mit wirkungsbezogener Analytik ermittelt werden. Wird die Expositionszeit des entwickelten wirkungsspezifischen Passivsammlers (estogene Wirkung) an den linearen Bereich seiner Aufnahmekurve angepasst, kann eine zeitgemittelte Durchschnittskonzentration für die angereicherten hormonell aktiven Substanzen oder die Gesamtwirkung ermittelt werden.

Auf Materialien, die sich über längere Zeiträume in Gewässern befinden, bildet sich ein Biofilm. Dieser kann in der nachfolgenden Handhabung und Analytik zu Problemen und zu Messergebnissen mit verminderter Qualität führen. Die Biofilmbildung während einer Exposition lässt sich durch eine angepasste Expositionszeit und ein keimreduzierendes Material wie z.B. Silber verringern.

Das IUTA kennt aufgrund seiner Forschungsaktivität ein breites Spektrum an möglichen Probenahmestellen in Oberflächengewässern, die bereits erkundet, beprobt und untersucht wurden. Für dieses Projekt sind vor allem Probenahmestellen interessant, an denen Estrogene und estrogene Aktivitäten nachgewiesen wurden. Dies sind z. B. Stellen im Bereich des Abflusses einer Kläranlage. Der Einsatz des entwickelten Passivsammlers ermöglicht sowohl eine kontinuierliche, repräsentative Probenahme in Gewässern als auch im Vergleich zu einer aktiven Probenahme die Bestimmung von aussagekräftigeren durchschnittlichen Effekt- oder Substanzkonzentrationen eines längeren Zeitraums. Der Einsatz geht zudem mit einem reduzierten Arbeitsaufwand von mehreren Stunden bei der Probenahme und im Labor einher.

Ziel des Forschungsvorhabens war die Entwicklung eines Passivsammlers bis TRL 5-6, der es ermöglicht, in Gewässern estrogen aktive Substanzen anzureichern. Es war vorgesehen, dass die Passivsammler die Grundlage für eine selektive, auf die estrogene Wirkung bezogene, passive Probenahme und Analytik darstellen. Der Erkenntnisgewinn aus diesem Forschungsvorhaben sollte als Grundlage für eine effekt-dirigierte Gesamtanalytik von Gewässerproben und für weitere auf andere Wirkungen angepasste Passivsammler dienen.

2. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

2.1. Arbeitspaket 1: Bindung des menschlichen Östrogenrezeptors auf einer Oberfläche

2.1.1. Eingesetzte Vorbehandlungs- und Nachweismethoden

2.1.1.1. Methoden der Oberflächenvorbehandlung

Oberflächen sind auf eine Beschichtung vorzubereiten, d.h. Verunreinigungen oder Unebenheiten müssen entfernt werden, da sonst Haftfestigkeit und Funktionalität der Beschichtung leiden⁵. Selbst kleine Anhaftungen verhindern, dass die eigentliche Beschichtung optimal auf dem Untergrund haf- tet, weil sie als Trennschicht wirken könnten.

Im IGF-Vorhaben MeXory⁶ wurde für die Funktionalisierung von Glasoberflächen ein Vorbehandlungsprozess durchgeführt, um die Zugänglichkeit zur Glasoberfläche, welche maßgeblich verantwortlich für die Funktionalisierung ist, sicherzustellen. Als bewährte und bekannte Methode wurde die Behandlung der Glasoberflächen mit Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid (Piranhasäure) eingesetzt. Diese Kombination wirkt als starkes Oxidationsmittel, das organische, adsorbierte Reste von der Oberfläche entfernt. Bei der Reaktion wird eine große Menge aktiven Sauerstoffs freigesetzt, der mit organischen Verunreinigungen wie Fetten, Ölen, Proteinen oder Polymerresten reagiert und sie vollständig zu gasförmigen Produkten wie CO₂, Wasser und anderen kleinen Molekülen zersetzt. Im et al.⁷ haben in ihrer Veröffentlichung die Vorbereitung der Oberflächen von Goldelektroden über eine elektrochemische Politur in einem Phosphatpuffer beschrieben. Dies erfolgte durch eine Potenzialabtastung zwischen -0,6 und 1,0 V mit einer Geschwindigkeit von 100 mV/s unter Verwendung eines Potentiostaten. Dabei muss die Reinigung der Oberfläche unmittelbar vor der Beschichtung erfolgen, um mögliche neue Ablagerungen zu vermeiden. Da eine elektrochemische Politur im IUTA technisch nicht möglich und eine erneute Verschmutzung durch einen Transport der Oberflächen wahrscheinlich war, wurde für die Goldoberflächen auf die Reinigung mittels Piranhasäure zurückgegriffen. Die Ergebnisse der Reinigungsprozedur mittels Piranhasäure sind in Kapitel 2.1.2.1 näher erläutert.

Zur Vorbereitung der Titanlegierung beschreiben Silverman et al.⁸ ein Schleifen der Oberfläche mit Siliziumkarbidpapier in den Körnungen 240er und 500er. Anschließend erfolgte ein aufeinanderfolgendes Spülen des Materials im Ultraschallbad mit Methylenchlorid, Methylethylketon und Methanol, sowie eine Trocknung und Lagerung im Ofen bei 200 °C. Erste Tests zum Schleifen des Materials wurden mit dem am IUTA bewährten Al₂O₃ und einem Papiertuch bzw. Wattestäbchen durchgeführt. Bereits bei dieser sehr sanften Methode konnten Beschädigungen an der Oberfläche der Titanlegierung festgestellt werden, so dass auf das Schleifen mit Siliziumkarbidpapier verzichtet wurde. Die Spülsschritte sowie trocknen und lagern bei 200 °C wurden wie von Silverman et al.⁸ beschrieben übernommen.

In Anlehnung an die Vorbereitung der Oberfläche von Silverman et al.⁸ erfolgte auch die Vorbereitung der Aluminiumoberflächen. Allerdings wurde hierbei gänzlich auf das Schleifen verzichtet, um

⁵ <https://www.reinigung.fraunhofer.de/de/kernkompetenzen/oberflaechenbehandlungvorderbeschichtung.html>

⁶ Abschlussbericht zum IGF-Vorhaben 21243 N – 2024, <https://www.iuta.de/igf/igf-forschungsprojekte/aif-nummer/21423/>

⁷ Im, J.-E., et al., *Electrochemical detection of estrogen hormone by immobilized estrogen receptor on Au electrode. Surface and Coatings Technology*, 2010. 205: p. S275-S278.

⁸ Silverman, B. M., et al., *Comparative Properties of Siloxane vs Phosphonate Monolayers on A Key Titanium Alloy*. *Langmuir* 2005, 21, 225-228

die Oxidschicht nicht zu beschädigen. Gespült wurde anschließend mit Dichlormethan, Ethylmethylketon und Methanol.

Das vom Deutschen Textilforschungszentrum Nord-West ÖP GmbH (DTNW, Mitglied im PA) zur Verfügung gestellte Textil basiert auf einem Polyamidgewebe mit 130 Gramm pro Quadratmeter. Es wurde für 24 h mit 0,1 M NaIO₄-Lösung vorfunktionalisiert, um eine Bindung mit einer terminalen Aminogruppe der Ligandenbindestelle über ein Glutardialdehyd zu ermöglichen.

Die im späteren Projektverlauf untersuchten Glasmembrane und das stickstoffmodifizierte Polymer wurden unterschiedlich vorbereitet und getestet. Die Glasmembranen wurden dazu mehrfach mit Reinstwasser gespült und das Material anschließend bei 40 °C getrocknet. Außerdem wurden die Glasmembranen ohne eine Vorbehandlung verwendet. Das stickstoffmodifizierte Polymer wurde vor dem Einsatz entweder bei 40 °C getrocknet, mehrfach mit Reinstwasser gewaschen und bei 40 °C getrocknet, mehrfach mit Reinstwasser gewaschen und nass verwendet, oder unbehandelt verwendet. Details und Ergebnisse werden in Kapitel 2.1.4 dargestellt und diskutiert.

Die in den ersten Versuchen eingesetzten Metalle Silber, Kupfer und Zink wurden nur mit Lösemitteln gespült und dann direkt verwendet.

2.1.1.2. Überprüfung des Beschichtungserfolges bei Metallocberflächen

Zur Überprüfung des Beschichtungserfolgs wurden die entsprechenden Materialien mittels REM/EDX und/oder mittels Lichtmikroskopie (50 bis 100-fache Vergrößerung) untersucht.

Die REM/EDX-Technik ist ein kombiniertes Analyseverfahren, das Rasterelektronenmikroskopie (REM) und energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) verbindet, um Oberflächenstrukturen sichtbar zu machen und parallel die chemische Zusammensetzung der Oberflächenstrukturen zu bestimmen.

Mit dem REM können hochauflösende Bilder mit einer Auflösung bis in den Nanometerbereich erstellt werden, so dass Mikrostrukturen, Risse und Inhomogenitäten direkt an der Probenoberfläche erfasst werden können. Die EDX-Analyse kann als Punktmessung oder Flächenmessung durchgeführt werden und Informationen zur Elementzusammensetzung an diesen Stellen bzw. Bereichen liefern. Das REM/EDX-Verfahren wird verwendet, um optische und chemische Informationen aus dem Mikrobereich einer Probe zu gewinnen. Es ist besonders effektiv bei der Untersuchung von Materialdefekten, Verunreinigungen und der Analyse von Fremdeinschlüssen. Die mit dieser Technik erzielten Ergebnisse zur Bewertung der Oberflächenvorbehandlung und des Beschichtungserfolgs sind in den Kapiteln zur Oberflächenmodifizierung metallischer Oberflächen dargestellt (2.1.2). Da der Einsatz der REM/EDX-Technik nur für metallische Oberflächen möglich ist, war eine Überprüfung des Beschichtungserfolgs für das Textil, die Glasmembran und das stickstoffmodifizierte Polymer nur indirekt über die Abreicherung einer Lösung von 17β-Estradiol möglich (siehe Kapitel 2.1.1.5).

2.1.1.3. Überprüfung des Beschichtungserfolges durch den Einsatz von Phytase

Zur Abreicherung einer Lösung von 17β-Estradiol ist der Einsatz des Hormonrezeptors bzw. der Ligandenbindestelle notwendig. Der Hormonrezeptor war jedoch in der gesamten Projektlaufzeit nicht

kommerziell verfügbar und die Kosten für die Ligandenbindestelle sind nicht unerheblich. Aus diesem Grund wurde ein ähnlich großes Molekül gesucht, dass über eine einfache Reaktion indirekt nachgewiesen werden kann. Damit sollte zunächst untersucht werden, wie es möglich ist, so große Moleküle auf Oberflächen zu platzieren und zu binden.

Das Enzym Phytase hat eine ähnliche Molekülgröße, ist sehr günstig und kann über eine einfache Enzym-Substrat-Reaktion nachgewiesen werden. Der indirekte Nachweis erfolgt dabei durch die Umsetzung (Hydrolyse) von p-Nitrophenylphosphat (pNPP) durch die Phytase in p-Nitrophenylphosphat, welches durch seine gelbe Färbung unter alkalischen Bedingungen photometrische nachgewiesen werden kann. Die Intensität der gelben Färbung wird bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen und erlaubt einen Rückschluss auf die umgesetzte Menge pNPP und damit auch auf die Menge von Phytase. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im Kapitel 2.1.2.2 ausführlich dargestellt und diskutiert.

2.1.1.4. Einsatz der Ligandenbindestelle zur Bindung an eine modifizierte Oberfläche

Im Antrag zu diesem Projekt war die Immobilisierung des Estrogenrezeptors an eine geeignete Oberfläche vorgesehen. Allerdings war der Rezeptor während der gesamten Projektlaufzeit nicht verfügbar, so dass als Alternative nur die Ligandenbindestelle des Estrogenrezeptors genutzt wurde. Der Unterschied zwischen dem Estrogenrezeptor und der Ligandenbindestelle liegt in ihrer Funktion und Struktur⁹. Der Estrogenrezeptor ist ein spezifisches Protein, das auf den passenden Liganden (ein Estrogen) reagiert. Der Rezeptor hat die Aufgabe, nach Ligandenbindung eine biologische Antwort auszulösen, etwa durch Signalkaskaden oder Änderungen der Genexpression¹⁰. Die Ligandenbindestelle ist ein strukturell klar definiertes Areal innerhalb eines Rezeptors, an dem der Ligand (das Estrogen) spezifisch andockt. Es ist ein spezialisiertes Proteinsegment, das über hochspezifische Wechselwirkungen selektiv das passende Hormon erkennt und nach Bindung dessen Wirkung vermittelt¹¹. Die Ligandenbindestelle (LBD) besteht meist aus einer exakt gefalteten Region aus mehreren Alpha-Helices, die ein gemeinsames dreidimensionales Strukturmotiv ausbilden. Somit stellt die Ligandenbindestelle den entscheidenden Teil des Rezeptors dar, der für die Bindung von Estrogenen zuständig und damit notwendig ist.

Von der Ligandenbindestelle standen 25 µL in einer Lösung bestehend aus 50 mM Tris-HCl ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{*HCl}$ /Puffer) (pH-Wert = 8.0), 500 mM KCl, 0,5 mM EDTA (Ethylenediamintetraessigsäure), 0,02 % NP-40 (Nonylphenolethoxylat – nichtionisches Tensid), 5 mM DTT (Dithiothreitol/Clelands Reagenz/Reduktionsmittel in Puffern) und 20 % Glycerol (einfachster dreiwertiger Zuckerkalkohol) zur Verfügung.

⁹ <https://flexikon.doccheck.com/de/Kernrezeptor> und https://media.dav-medien.de/sample/9783804743311_p.pdf?v4

¹⁰ <http://physiologie.cc/II.4.htm> und <https://de.khanacademy.org/science/biology/cell-signaling/mechanisms-of-cell-signaling/a/signal-perception> und <https://flexikon.doccheck.com/de/Kernrezeptor>

¹¹ <https://flexikon.doccheck.com/de/Kernrezeptor> und <https://flexikon.doccheck.com/de/Hormonrezeptor> und <http://physiologie.cc/II.4.htm>

2.1.1.5. Überprüfung des Beschichtungserfolges durch Auslagerung in 17β -Estradiollösung

Der indirekte Nachweis einer Oberflächenmodifikation und damit einer Immobilisierung der Ligandenbindestelle erfolgte über die Abreicherung einer Lösung von 17β -Estradiol. 17β -Estradiol (auch Östradiol, E2) ist das wichtigste natürliche Östrogen des Menschen und das biologisch potenteste der drei Hauptöstrogene (Estradiol, Estron, Estriol). Es ist ein Steroidhormon mit der Summenformel $C_{18}H_{24}O_2$. Es liegt überwiegend als lipophiles Molekül vor, ist schlecht wasserlöslich, aber gut in Fetten und organischen Lösungsmitteln löslich, was die Passage durch Zellmembranen erleichtert¹². Für die Auslagerungsversuche wird der entsprechende Passivsammler, der auf seiner Oberfläche die immobilisierte Ligandenbindestelle enthält, in eine Lösung mit einer bekannten Konzentration des Liganden 17β -Estradiol getaucht und unter unterschiedlichen Bedingungen inkubiert. Während dieser Zeit binden die 17β -Estradiol Moleküle an die Ligandenbindestelle und werden im Anschluss mit der Entnahme des Passivsammlers ebenfalls aus der Lösung entfernt. Entsprechend Tanenbaum et al.¹³ kann ein Mol der Ligandenbindestelle exakt ein Mol 17β -Estradiol binden. Die Konzentration der 17β -Estradiollösung wurde für alle Versuche so berechnet, dass eine Abreicherung der 17β -Estradiollösung um ca. 50% erwartet wurde, welche messtechnisch gut erfassbar ist.

2.1.1.6. Nachweis der Hormone

Der analytische Nachweis der am Passivsammler gebundenen hormonell aktiven Substanzen erfolgte indirekt durch die Analyse der abgereicherten Auslagerungslösung mittels GC-MS/MS bzw. LC-MS/MS in Abhängigkeit der vorliegenden Konzentrationsbereiche.

Für die GC-MS/MS-Methode ist eine Derivatisierung der Hormone mit 99% BSTFA (N,O, (Bis-(trimethylsilyl)-trifluoro-acetamid) + 1 % TMCS (Trimethylchlorsilan) notwendig. 17β -Estradiol besitzt zwei Hydroxylgruppen, die mit BSTFA + 1 % TMCS zu Trimethylsilyl(TMS)-Ethern derivatisiert werden. Die entstehenden Verbindungen sind deutlich flüchtiger und können so sehr sensitiv mittels GC-MS/MS detektiert werden. Zur Verbesserung der Nachweigrenze und zur Reduktion von Matrixeffekten kann eine zusätzliche Aufreinigung und Anreicherung der Probe über eine Festphasenextraktion erfolgen.

Bei einer ausreichend hohen Konzentration von 17β Estradiol kann auf die Anreicherung und Derivatisierung verzichtet werden. Der analytische Nachweis ist direkt aus der wässrigen Lösung mittels LC-MS/MS möglich. Dazu wurde für dieses Vorhaben eine eigene Messmethode entwickelt. Die chromatographische Trennung erfolgte mittels Gradientenelution auf einer Restek Raptor ARC-18 50 * 2,1 mm, 2,7 μ m Trennsäule. Als mobile Phasen wurden Wasser + 0,1% Ameisensäure und Acetonitril + 0,1% Ameisensäure mit einer Flussrate von 500 μ L/min bei einem Injektionsvolumen von 50 μ L verwendet. Die Quantifizierung erfolgte im MRM-Modus (multiple-reaction-monitoring) mit folgenden Massenübergängen für die Quantifizierung und die Verifizierung von 17β Estradiol: 273,1 → 107,2 (m/z) und 273,1 → 135,3 (m/z). Die Bestimmungsgrenze lag bei 1 ng/mL.

¹² Produktinformationen von Sigma Aldrich zu 17β -Estradiol, <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/e8875>

¹³ Tanenbaum, D.M. et al., Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains, PNAS May 26, 1998, 95 (11) 5998-6003, <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.5998>

2.1.2. Oberflächenmodifizierung metallischer Oberflächen

2.1.2.1. Bindung an eine Metallocberfläche über Mercaptopropionsäure (Im et.al.¹⁴)

Als Basis der Oberflächenbeschichtung zum Zeitpunkt der Antragstellung und in ersten Vorversuchen diente das von Im et al.¹⁴ publizierte Vorgehen zur Bindung des Estrogenrezeptors an eine Goldoberfläche. Das in Abbildung 1 dargestellte Schema zur Herstellung eines Immunosensors nutzt dabei Mercaptopropionsäure als Ankersubstanz.

Dazu wurden Goldelektroden direkt im Anschluss an die elektrochemische Reinigung (siehe Kapitel 2.1.1.1) für acht Stunden in einer wässrigen Lösung von Mercaptopropionsäure inkubiert, um eine Carboxylat-terminierte Monoschicht auszubilden. Durch eine Inkubation in einer Mischung aus 3-(3-Dimethylaminopropyl)-1-ethylcarbodiimidhydrochlorid und N-Hydroxysuccinimid wurden die terminalen Carboxylgruppe in aktive Stellen umgewandelt. Im letzten Schritt erfolgte die Aufbringung des Estrogerezeptors für 12 Stunden zur Ausbildung einer kovalenten Bindung.

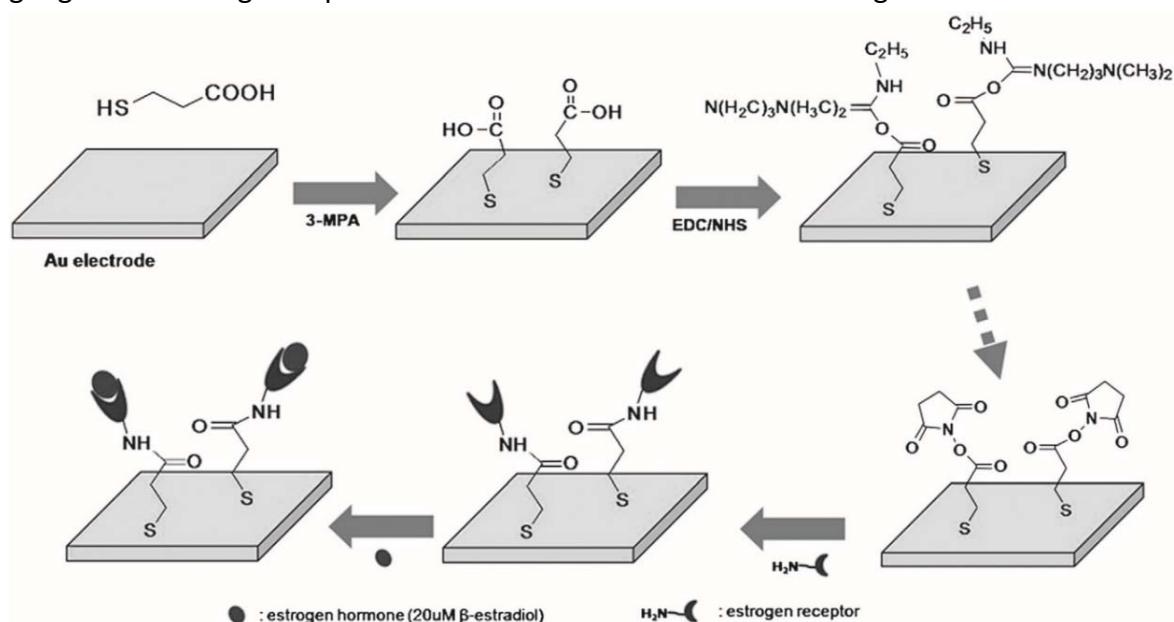


Abbildung 1

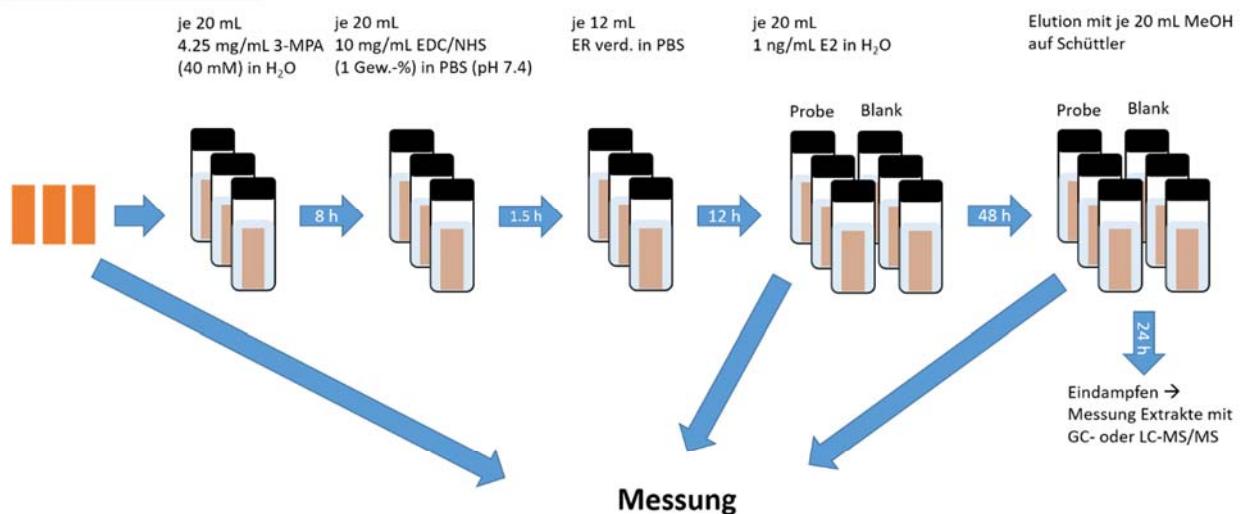
Schematischer Ablauf der Herstellung eines Immunosensors zur Detektion von Estrogenen nach Im et al.

Da aufgrund der Kosten in diesem Projekt bewusst auf die Verwendung von Goldoberflächen verzichtet werden sollte, wurde das Vorgehen für die Materialien Silber, Zink und Kupfer leicht modifiziert und detaillierter ausgearbeitet (Abbildung 2).

Eine Oberflächenvorbehandlung der einzelnen Plättchen erfolgte wie bereits in Kapitel 2.1.1.1 nur durch Spülen mit verschiedenen Lösemitteln.

¹⁴ Im, J.-E., et al., *Electrochemical detection of estrogen hormone by immobilized estrogen receptor on Au electrode. Surface and Coatings Technology*, 2010. **205**: p. S275-S278.

Bindung des ER und Nachweis



3-MPA: 3-Mercaptopropionic acid (106.15 g/mol)
 EDC: 3-(3-dimethylaminopropyl)-1-ethylcarbodiimide hydrochloride
 NHS: N-hydroxysuccinimide
 E2: 17 β -Estradiol

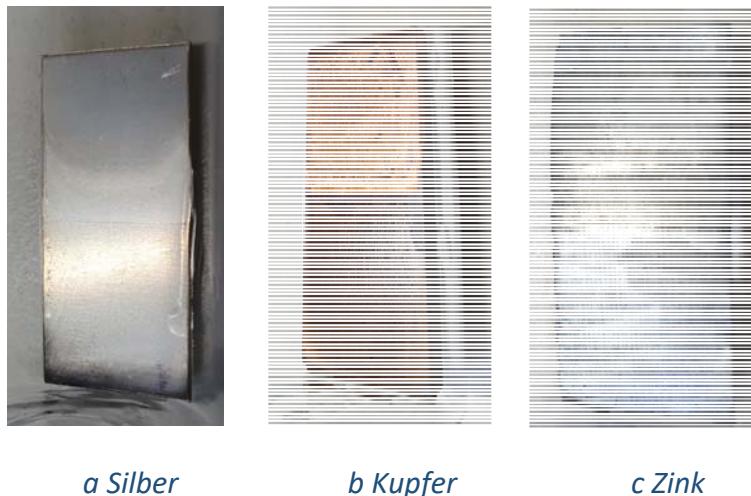
Abbildung 2 Ablaufschema zur Beschichtung der Passivsammler.

Das Vorgehen deckt sich in den ersten Schritten mit dem von Im et al.¹⁴ veröffentlichten Vorgehen, um eine vergleichbare Trägerschicht auf den Silber-, Kupfer- bzw. Zink-Oberflächen auszubilden. Dazu wurden die Metallstücke auf eine passende Größe zurechtgeschnitten und in Glasgefäße zur Beschichtung gegeben (siehe Abbildung 3).



Abbildung 3 Metallstücke vor der Beschichtung.

Nach den ersten zwei Beschichtungsstufen (Reaktion der Plättchen mit 3-Mercaptopropionsäure (3-MPA) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) sowie N-hydroxysuccinimide (NHS)) wurden die hergestellten Plättchen mikroskopisch untersucht. Abbildung 4 zeigt Fotos der Metallstücke nach den ersten beiden Beschichtungsschritten. Besonders bei Zink und Kupfer konnte bereits visuell eine deutlich sichtbare Veränderung der Oberfläche der Plättchen beobachtet werden. Der in die Beschichtungslösungen eingetauchte Teil der Plättchen hatte sich deutlich verändert (vgl. Abbildung 4)



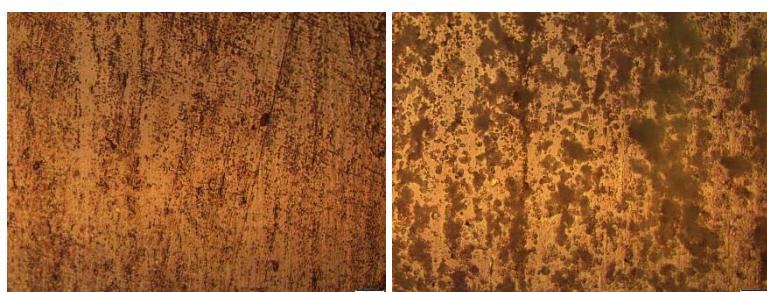
a Silber

b Kupfer

c Zink

Abbildung 4 *Beschichtete Plättchen nach den ersten beiden Beschichtungsstufen.*

Bei Untersuchungen unter dem Lichtmikroskop wurde jedoch sichtbar, dass die Oberflächen der Kupfer- und Zinkplättchen eher korrodiert waren. Eine Beschichtung war nicht erkennbar. Bei der Untersuchung der Silberplättchen zeigte sich unter dem Lichtmikroskop ein Hinweis auf eine erfolgreiche Beschichtung der Oberfläche (siehe Abbildung 5).



a Original

b beschichtet

Abbildung 5 *Aufnahmen mittels Lichtmikroskop (100 fache Vergrößerung, Hellfeldmodus) der beschichteten Silberplättchen (a Original, b beschichtet)*

Nähere Untersuchungen am REM zeigten eine erfolgreiche Aufbringung von Material auf die Silber-Oberfläche (siehe Abbildung 6).

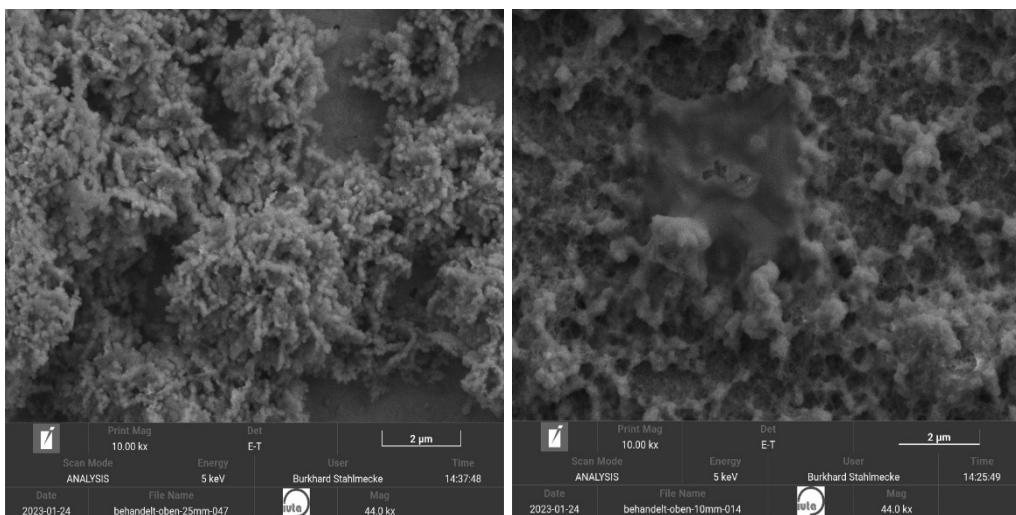


Abbildung 6 REM-Aufnahmen der beschichteten Silberplättchen

Allerdings konnte nicht wie gewünscht, eine homogene Beschichtung, sondern ein eher punktuelles Aufwachsen von verschiedenen Substanzen beobachtet werden. Eine zusätzliche EDX-Analyse zeigte zudem keinerlei Hinweise auf die Anlagerung von organischen Substanzen, die Stickstoff enthalten. Wie in Abbildung 1 dem Reaktionsschema dargestellt, enthalten EDC und NHS mehrere Stickstoffgruppen, die nach einer Bindung an die Oberfläche im EDX sichtbar sein müssten. Neben Silber konnten nur Sauerstoff, Kohlenstoff und Kupfer mittels EDX bestimmt werden.

Weitere Versuche mit diesen Materialien blieben ebenfalls erfolglos. Es bleibt allerdings unklar, aus welchem Grund die Aufbringung einer Trägerschicht wie Im et al.¹⁴ sie beschreibt nicht gelang. Auch wenn Monoschichten mit kurzkettigen Thiolen auf Gold einfacher und stabiler herzustellen sind, können Thiole, wie die hier verwendete 3-Mercaptopropionsäure, auch an Kupfer oder Zink binden, wobei Thiolat-Schichten (Cu-S-R¹⁵ bzw. Zn-S-R) ausgebildet werden. Allerdings zeigte eine detaillierte Literaturrecherche, dass durch die Anfälligkeit zur Oxidation die Qualität und die Stabilität der Thiolat-Schichten oft deutlich schlechter ist als bei Gold.

Gold gilt für die Ausbildung qualitativ hochwertiger, dichter und langlebiger Monoschichten als das beste Basismaterial, da es gut geordnete und stabile Thiolat-Schichten (Au-S-R-Bindungen) ausbildet und wenig Sulfide gebildet werden. Auch wenn Goldoberflächen im Antrag nicht in Erwägung gezogen wurden, erfolgten aufgrund der besseren Ausbildung von Monoschichten mit einer Goldoberfläche Versuche mit Gold bedampften Oberflächen. Diese als "proof of concept" durchgeführten Versuche erfolgten streng nach den Vorgaben der Veröffentlichung von Im et al.¹⁴ (siehe Abbildung 1). Wie bereits in Kapitel 2.1.1.1 beschrieben, erfolgte die Vorbehandlung der Oberfläche mit Piranhasäure, um mögliche Verunreinigungen zu entfernen. Abbildung 7 zeigt Bilder der verwendeten Materialien, sowie die wesentlichen Arbeitsschritte zur Immobilisierung der Ligandenbindestelle.

¹⁵ R = organischer Rest



Abbildung 7 *Eingesetzte Materialien mit Goldoberfläche; a) mir Piranha-Säure gereinigtes rundes Material b) Veränderung der Oberfläche während des Beschichtungsvorgangs c) goldbedampfter Objektträger mit aufgebrachter Lösung der Ligandenbindestelle.*

Bei den runden Plättchen mit einem Durchmesser von 10 mm handelte es sich um magnetische Metallprobenhalterungsscheiben, die im REM eingesetzt werden. Sie bestehen aus magnetischem Edelstahl mit einer Beschichtung von 1 µm aus reinem Gold. Außerdem wurden Objektträger verwendet, die mit Gold in einer Schichtdicke von 50 nm bedampft waren. Das jeweilige Material wurde wie in Abbildung 1 und Abbildung 2 dargestellt in die Beschichtungslösungen eingetaucht, so dass sich eine Monoschicht auf Basis von Au-S-R-Bindungen ausbilden sollte. Dabei bildete sich bei den runden Plättchen während der Inkubation in der Mischung aus 3-(3-Dimethylaminopropyl)-1-ethylcarbodiimidhydrochlorid und N-Hydroxysuccinimid eine bräunliche Verfärbung, die bei den bedampften Objektträgern nicht beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 7b).

Zur Überprüfung des Beschichtungserfolgs wurden die Goldoberflächen sowohl mittels REM/EDX als auch in Auslagerungsversuchen in einer 17β -Estradiollösung untersucht. Die Untersuchungen mittels REM/EDX erfolgten nach der Aufbringung der Trägerschicht. Die Abbildung 8 und die Abbildung 9 zeigen Beispiele der REM/EDX Analysen der Goldoberflächen.

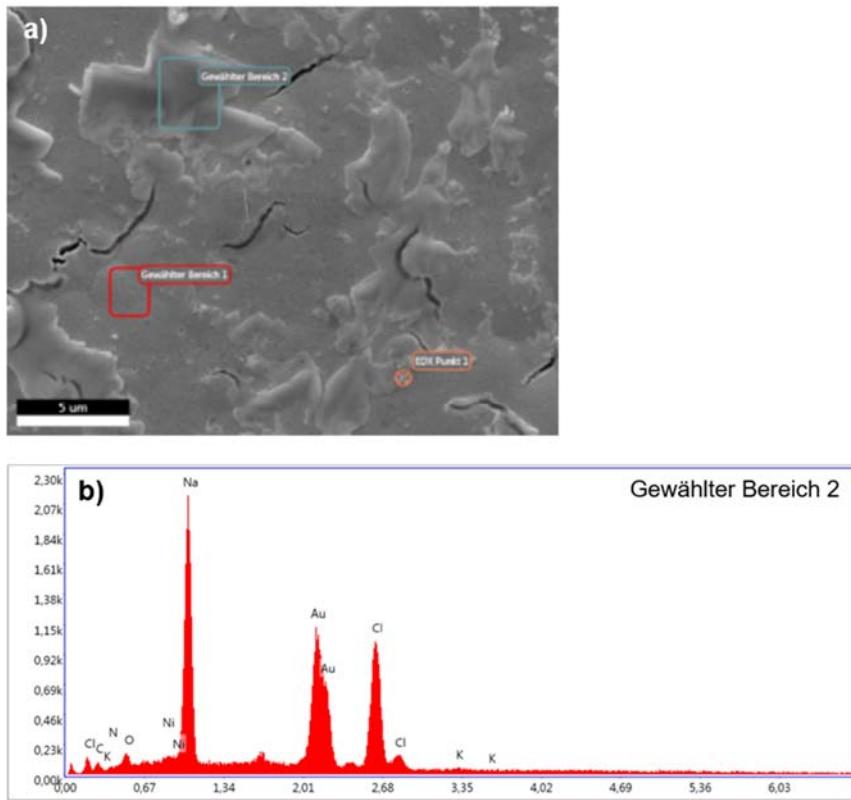


Abbildung 8 Erstes Beispiel der REM / EDX Analysen der Goldoberflächen; a) Bild der Oberfläche mit dem analysierten Bereich 2 b) EDX Analyse des gewählten Bereichs 2.

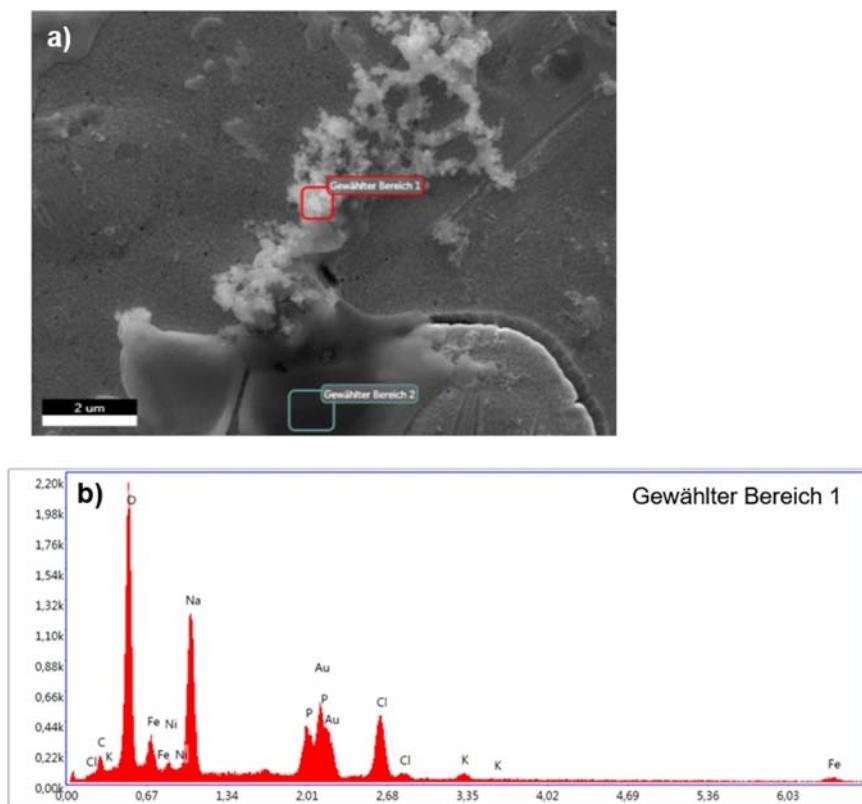


Abbildung 9 Zweites Beispiel der REM / EDX Analysen der Goldoberflächen; a) Bild der Oberfläche mit dem analysierten Bereich 1 b) EDX Analyse des gewählten Bereichs 1.

Die Bilder zeigen heterogene Ablagerungen von unterschiedlicher Morphologie auf den Goldoberflächen. Eine erwartete homogene Monoschicht aus Thiolat-Gruppen ist nicht zu erkennen. Auch wenn in Abbildung 8 größere homogene Bereiche sichtbar sind, sind diese nicht durchgängig und unregelmäßig verteilt. Die EDX Analyse zeigte deutliche Signale für Natrium, Gold und Chlor, aber keine Signale für Schwefel, die bei einer Beschichtung mit Thiolen zur erwarten wären. Des Weiteren wurden kristalline Ablagerungen, wie in Abbildung 9 gezeigt, beobachtet. Auch hier zeigte die EDX Analyse deutliche Signale für Natrium, Gold und Chlor, wobei auch Sauerstoff nachgewiesen wurde. Bei den beobachteten Ablagerungen handelte es sich vermutlich um Salzkristalle aus NaCl, welche als Bestandteile der eingesetzten Chemikalien auf die Oberflächen gelangt sind. Die bräunliche Verfärbung der runden Goldoberflächen wurde vermutlich durch einen Korrosionseffekt des Edelstahlkerns hervorgerufen.

Alle weiteren Versuche zur Herstellung einer homogenen und stabilen Monoschicht auf einer Goldoberfläche zeigten ähnliche Ergebnisse. Unterschiedliche Einwirkzeiten der Chemikalien, Variationen der Temperaturen während der Reaktionen und höhere Konzentrationen der Substanzen führten zu keinen nennenswert anderen Ergebnissen. Eine Monoschicht aus einer stabilen Au–Thiolat-Bindung konnte in keinem der durchgeführten Versuche ausgebildet werden.

Trotz der negativen Ergebnisse aus den REM/EDX Analysen wurde versucht, auch die Ligandenbindestelle an die Goldoberflächen zu immobilisieren. Nach den Reaktionen zur Ausbildung der Trägerschicht wurde wie in Im et al.¹⁴ beschrieben die Ligandenbindestelle auf die Oberfläche gegeben und inkubiert. Zunächst wurden die Angaben in der Veröffentlichung exakt befolgt und anschließend in mehreren Versuchsreihen die folgenden Parameter variiert:

- Einwirkzeiten der Chemikalien,
- Temperaturen bei den Reaktionen,
- Art der Aufgabe (Aufgeben, Einlegen, Eintrocknen),
- Verdünnungen und damit verschiedene Konzentrationen der Ligandenbindestellenlösung sowie die
- Inkubationszeit in der Inkubationslösung.

Die Überprüfung erfolgte über die bereits in Kapitel 2.1.1.5 beschriebenen Auslagerungsversuche in einer 17 β -Estradiollösung. Keiner der durchgeführten Versuche und der untersuchten Variationen zeigte eine Abreicherung der 17 β -Estradiollösung. Die bei jedem Versuch parallel durchgeführten Blindwerte und positiv-Kontrollen zeigten keinerlei Auffälligkeiten oder Abweichungen in den Versuchen. Auch eine Instabilität der Ligandenbindestelle bzw. ein Abwaschen konnte nicht beobachtet werden.

In Kombination mit den Ergebnissen der REM/EDX Analysen musste davon ausgegangen werden, dass bereits die Trägerschicht, an die die Ligandenbindestelle kovalent gebunden werden sollte, nicht hergestellt werden konnte. Somit stand für die Ligandenbindestelle keine Möglichkeit für eine kovalente Bindung zur Verfügung und eine Immobilisierung konnte nicht erfolgen. Auf Basis dieser Untersuchungen wurde der im Antrag vorgesehene Weg zur Beschichtung von Metalloberflächen hinterfragt und durch eine intensive Literaturrecherche weitere Möglichkeiten zur Immobilisierung der Ligandenbindestelle recherchiert.

2.1.2.2. Bindung an eloxiertes Aluminium oder Titanlegierungen über organische Phosphorsäuregruppen/Phosphonate

Silvermann et al.¹⁶ verglichen in ihrer Publikation Monoschichten von Phosphonaten und Siloxanen auf Titanlegierungen als Oberflächenbeschichtungen von medizinischen Geräten. Dabei erweist sich insbesondere der aminosäuremodifizierte Phosphonatfilm als hydrolytisch stabil.

In der Literatur¹⁷ wurden außerdem dünne organische Filme zur Verbesserung der Korrosionsbeständigkeit und der Haftvermittlung zu anderen organischen Beschichtungen auf Aluminium untersucht, wobei insbesondere den Organophosphonaten sehr gute Hafteigenschaften zugeschrieben wurden.

Aus diesem Grund wurde versucht, 11-Hydroxyundecylphosphorsäure durch die sogenannte T-BAG-Methode¹⁸ zunächst auf Aluminiumoberflächen, als sehr preisgünstiges Oberflächensubstrat, aufzubringen, um damit eine Basis für folgende Beschichtungen und Modifizierungen zu schaffen. Die Reaktion ist in Abbildung 10 gezeigt.

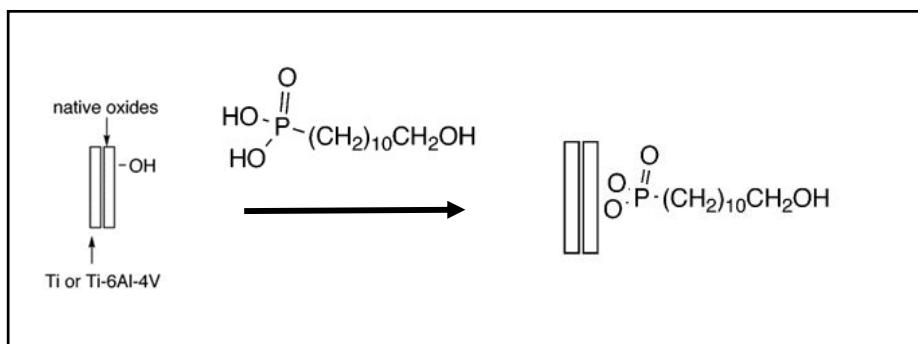


Abbildung 10 Reaktionsschema zur Herstellung einer Phosphonat-Schicht auf einer Oberfläche

Die Plättchen wurden für die T-BAG-Methode mittels Krokodilklemmen senkrecht in 30ml-Vials platziert und in die Beschichtungslösung eingetaucht (siehe Abbildung 11). Anschließend wurde das Lösungsmittel langsam so weit verdampft, dass die Plättchen nicht mehr in die Lösung eintauchten.

¹⁶ Silverman, B.M. et al.; Comparative Properties of Siloxane vs. Phosphonate Monolayers on a key Titanium alloy, *Langmuir* 2005, 21, 225-228

¹⁷ G. Gunasekaran, R. Natarajan, V. S. Muralidharan, N. Palaniswamy, B. V. Appa Rao, Anti-Corrosion Methods and Materials 1997, 44, 248. in Pahnke, J. Modifizierung von Aluminiumoberflächen durch kovalent gebundene Polymermonolagen und -netzwerke, Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2006

¹⁸ Ahoulou, S. et al.; Functionalization and Characterization of Silicon Nanowires for Sensing Applications: A Review; *Nanomaterials* 2021, 11(4) 999; <https://doi.org/10.3390/nano11040999>



Abbildung 11 Eingespannte Aluminiumplättchen zur Beschichtung mittels T-BAG-Methode.

In einem zweiten Schritt erfolgte die Aufbringung eines 3-Maleimidopropionsäure-N-hydroxysuccinimidesters ebenfalls über die T-BAG-Methode (Abbildung 12).

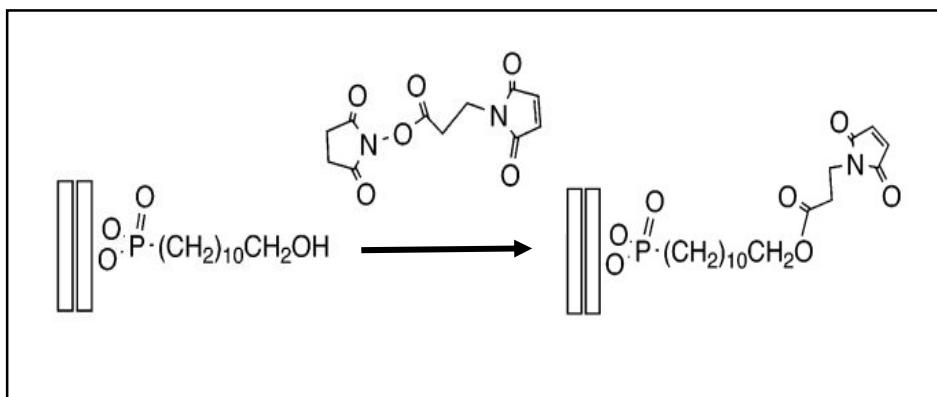


Abbildung 12 Maleimid-Addukt Bildung zur Ausbildung eines Succinimidesters.

Im Rahmen des IGF-Forschungsvorhabens FKZ_21243 N – MeXory¹⁹, dessen Zielstellung die Herstellung von Passivsammeln zur Sammlung metallorganischer Komponenten war, wurden verschiedene Wege der Oberflächenbeschichtung beschritten. In der ersten Variante erfolgte die Modifikation der Oberfläche, wie auch für dieses Projekt beschrieben, über die Aufbringung der Trägerschicht in zwei Schritten, also mittels Layer by Layer-Verfahren²⁰. Dies bedeutet, dass zunächst die Phosphorsäureverbindung und in einem separaten zweiten Schritt das Maleimid-ester aufgebracht wird. Eine Alternative, die sich im Projekt MeXory bewährt hat, ist die vorgezogene separate Herstellung eines

¹⁹ Abschlussbericht zum IGF-Vorhaben 21243N vom 21.03.2024, <https://www.iuta.de/igf/igf-forschungsprojekte/aif-nummer/21423/>

²⁰ Abschlussbericht zum BMBF – Vorhaben 031B0668, NPBioPhos - Erforschung und Erschließung des Bioraffinerie-Nutzungspotentials phosphorhaltiger Biomoleküle für nachhaltige Anwendungen im Sinne einer effizient-ökonomischen Rohstoff-Veredelung, https://www.dtnw.de/wp-content/uploads/2022/06/projekte_abgeschlossene_projekte_NPBioPhos_stekbrief.pdf

sogenannten Aktivesters (Derivates) aus den beiden Ausgangssubstanzen und erst dann eine Aufbringung des Esters in einem Schritt auf die Oberfläche. Das heißt 11-hydroxyundecylphosphorsäure und das Maleimid-ester wurden zunächst unter einem Stickstoffstrom für 24 h zur Reaktion gebracht, wodurch sich ein Derivat bildet, welches anschließend in nur einem Schritt auf das Aluminiumplättchen aufgebracht wurde. Im Vorhaben MeXory führte die Beschichtung mit nur einem Schritt zu homogeneren und reproduzierbareren Schichten auf den Oberflächen. Auch für die Aufbringung in einem Reaktionsschritt wurde die T-BAG-Methode verwendet.

Um nachzuweisen, ob die Phosphorsäureverbindung auf der Oberfläche abgeschieden wurde, erfolgte die Untersuchung visuell und mittels REM/EDX, wobei beschichtete und unbeschichtete Oberflächen miteinander verglichen wurden.

Visuell waren keine Unterschiede zwischen den unbeschichteten und beschichteten Plättchen erkennbar. Auch die REM-Aufnahmen zeigten keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Oberflächenmorphologie zwischen den Plättchen. Die parallel durchgeföhrten EDX-Messungen lieferten einen schwachen Hinweis auf Phosphor auf den beschichteten Aluminium-Plättchen (siehe Abbildung 13).

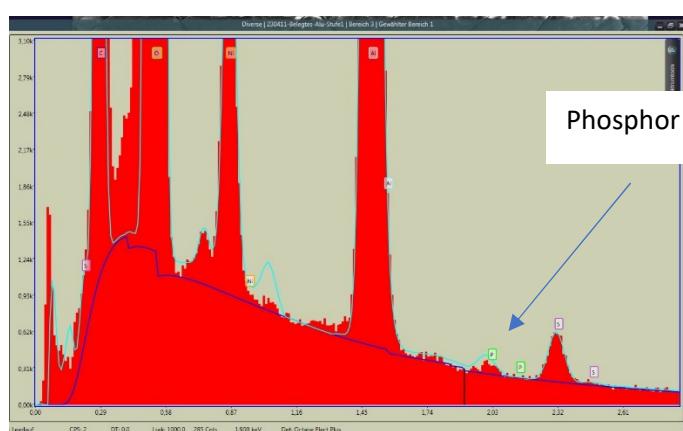


Abbildung 13 EDX-Spektrum des beschichteten Aluminiums

Aufbauend auf den Hinweisen aus der REM/EDX Analyse wurden im Anschluss Versuche zur Bindung eines großen Moleküls an die Trägerstruktur durchgeführt. Aufgrund der Kosten für die Ligandenbindestelle wurden diese Versuche zunächst mit dem Enzym Phytase durchgeführt (siehe Kapitel 2.1.1.3). Dazu wurden die Plättchen über Nacht in eine gesättigte Phytaselösung eingelegt. Anschließend wurden die Plättchen gewaschen, um Reste der Phytaselösung zu entfernen und falsch positive Reaktionen zu vermeiden. Der Nachweis der Phytase erfolgte über die Reaktion von p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenolat, welches im alkalischen Bereich gelb gefärbt ist (siehe Abbildung 14).

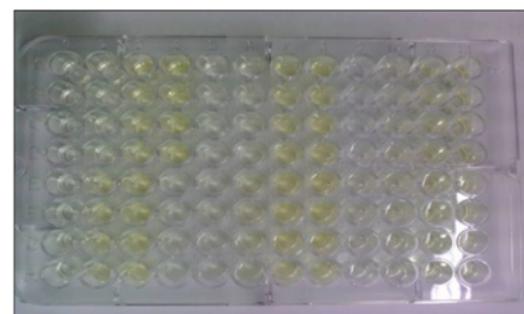
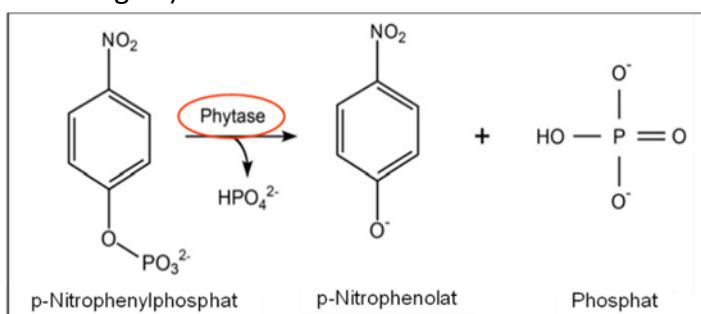


Abbildung 14 Reaktionsgleichung zum Nachweis von Phytase und Beispiel für die Gelbfärbung.

Die aus den Versuchen resultierenden Lösungen sind beispielhaft in Abbildung 15 dargestellt.

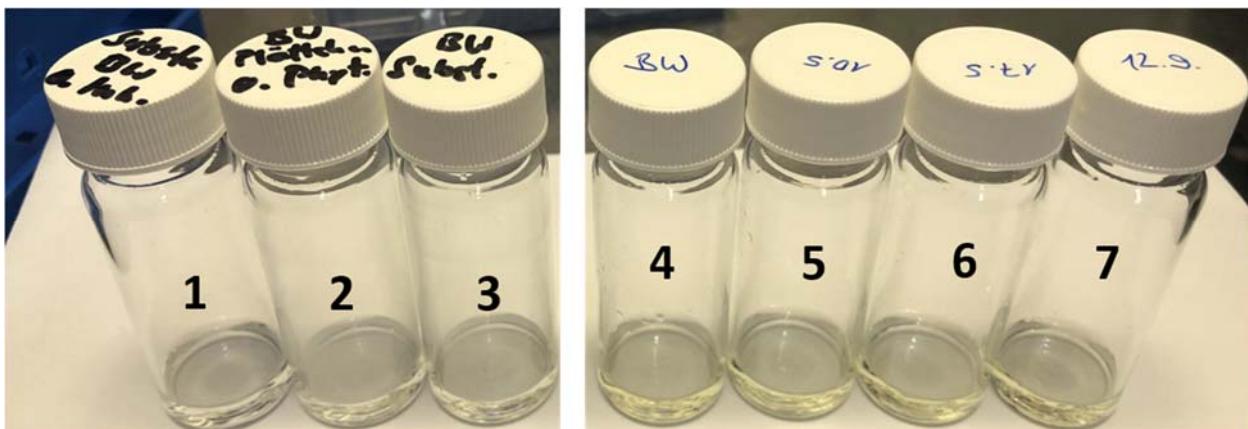


Abbildung 15 Lösungen nach der Reaktion mit immobilisierter Phytase. 1-Lösungsmittelblindwert, 2-Gereinigtes Plättchen ohne Phytase, 3-Lösungsmittelblindwert, 4-Gereinigtes Al-Plättchen mit Phytase, 5-Beschichtung in 2 Schritten mit Phytase, 6-Beschichtung in einem Schritt mit Phytase, 7-Beschichtung in 2 Schritten mit Phytase.

Als Ergebnis zeigte sich eine leichte Gelbfärbung in allen Lösungen, bei denen Phytase eingesetzt wurde. In allen Blindwerten ohne Phytase war keine Gelbfärbung zu beobachten. Allerdings zeigte auch die Probe eine Gelbfärbung in der gleichen Intensität, die ein Aluminiumplättchen ohne eine Oberflächenmodifikation enthielt. Dies deutete auf eine mögliche direkte Bindung der Phytase an die Aluminium-Oberfläche hin. Es gab auch keine Unterschiede in Abhängigkeit des Beschichtungsverfahrens (ein oder zwei Beschichtungsschritte), so dass der beobachtete Effekt in allen Proben auf eine unspezifische Bindung zurückzuführen war. Es konnte nicht beurteilt werden, ob die Trägerschicht nicht adäquat aufgebracht werden konnte, oder ob die Bindung der Phytase an diese Trägerschicht nicht erfolgt ist.

Silverman et al. beschrieben in ihrer Veröffentlichung die erfolgreiche Beschichtung einer Titanlegierung (Ti6Al4V) mit Monoschichten von Phosphaten. Aus diesem Grund wurden zusätzlich Titanlegierungen als Basismaterial für die bereits dargestellte Beschichtungsmethode eingesetzt, wobei exakt der von Silvermann beschriebene Beschichtungsweg in 2 Schritten gewählt wurde. Silvermann beschrieb die Beschichtung allerdings mit einem etwas anderen Maleimidester ((3-Triethoxysilylpropyl)-6-N-maleimidohexanamide), welcher selbst hergestellt wurde. Der im Rahmen des Vorhabens eingesetzte Maleimidester wurde käuflich bei Fisher Scientific²¹ erworben.

Nach einer intensiven Reinigung mit sehr milden Scheuer- und Lösungsmitteln wurden die Plättchen trocken bei 200 °C im Ofen gelagert (siehe Kapitel 2.1.1.1). Anschließend wurde das Trägermaterial mit der T-BAG-Methode mit 11-hydroxyundecylphosphonsäure gelöst in trockenem Tetrahydrofuran (0,1 mmol) behandelt. Dabei wurde das Lösungsmittel verdampft, bis das Level der Lösung unterhalb des Trägermaterials gefallen war. Anschließend wurde das Material für 48 h bei 120 °C im Ofen inkubiert und danach im Ultraschallbad mit Methanol gespült. Zur Aufbringung der zweiten Schicht

²¹ 3-Maleimidopropionsäure-N-hydroxysuccinimidester, 99% ig, Artikel-Nummer 15497675; CAS: 55750-62-4

wurde das Trägermaterial für 24 h bei Raumtemperatur in eine Lösung von 3-Maleimidopropionsäure-N-hydroxysuccinimidester in Acetonitril (5 mM) eingelegt. Hier zeigte sich bereits eine optische Veränderung der Oberfläche (siehe Abbildung 16 c). Die überschüssigen Chemikalien wurden mit Acetonitril abgespült und das Titanplättchen getrocknet. Da die Reaktion mit Phytase bei den Aluminiumplättchen nicht spezifisch war, wurde bei dem Titanmaterial wie bei den Goldplättchen eine Aufbringung der Ligandenbindestelle direkt im Anschluss durchgeführt.

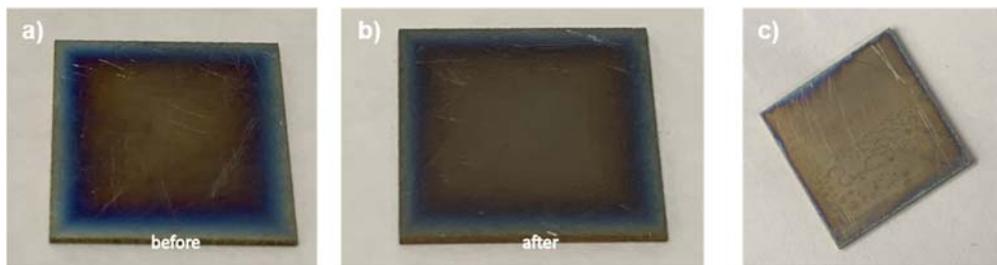


Abbildung 16 Titanmaterial a) vor der Reinigung b) nach der Reinigung c) nach Beschichtung mit der Trägerstruktur.

Die anschließenden Untersuchungen mittels REM und EDX zeigten auch hier eine heterogene Ablagerung von Kristallen und Partikeln aber keine homogene Beschichtung. Neben Titan und Spuren von Aluminium konnte bei diesen Plättchen Stickstoff detektiert werden (siehe Abbildung 17), d.h. eine Bindung der Ligandenbindestelle an die Oberfläche könnte punktuell erfolgt sein.

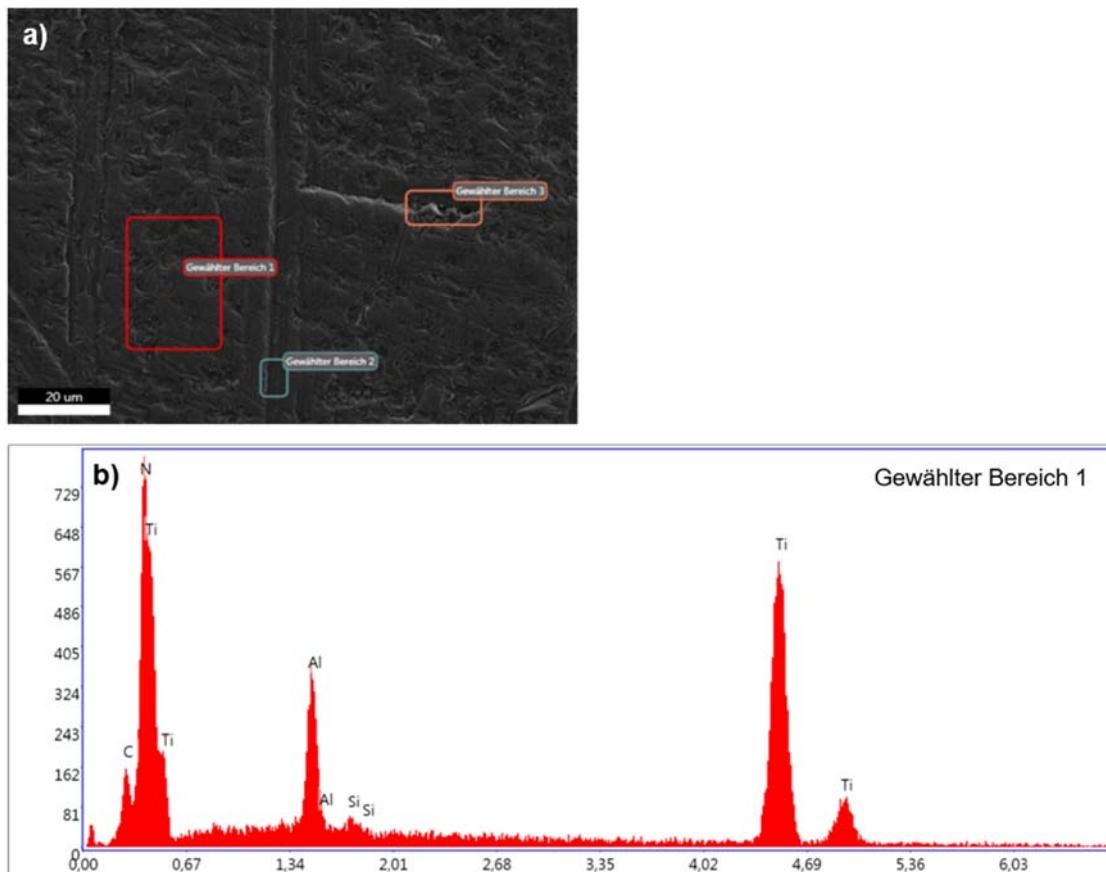


Abbildung 17 Beispiel der REM / EDX Analysen der Titanoberflächen; a) Bild der Oberfläche mit dem analysierten Bereich 1 b) EDX Analyse des gewählten Bereichs 1.

Aus diesem Grund wurden das Trägermaterial in Lösungen des Hormons 17 β -Estradiol (E2) ausgelegt. Eine Abreicherung der Lösung, wie sie stöchiometrisch möglich gewesen wäre, wurde nicht beobachtet. Somit liegt der Schluss nahe, dass die Ligandenbindestelle nicht kovalent an die Titanlegierung gebunden bzw. sich bei den Waschschriften bzw. der Inkubation wieder gelöst hat. Somit konnte E2 nicht durch den Einsatz der hergestellten Passivsammler aus der Lösung entfernt und somit auch nicht abgereichert werden.

Leider stand kein analytisches Verfahren zur Verfügung, um den Verbleib der Ligandenbindestelle in der Waschlösung oder in der Inkubationslösung zu detektieren. Grundsätzlich ist es möglich, große Moleküle wie Rezeptoren oder Proteine mittels Infrarotspektroskopie oder Ramanspektroskopie zu analysieren. Durch Konformitätsänderungen ist es sogar möglich festzustellen, ob ein Ligand gebunden ist oder nicht. Allerdings waren die zur Verfügung stehenden Konzentrationen zu gering. Eine Analyse im unverdünnten Zustand war aufgrund massiver Störungen durch das Lösemittel Glycerol nicht möglich.

2.1.3. Bindung an textile Materialien

Eine Alternative zu einer Immobilisierung der Ligandenbindestelle auf Metalloberflächen stellt der Einsatz von textilen Materialien als Basis für einen Passivsammler dar. Textile Fasern können vielfältig modifiziert werden und sind für viele unterschiedliche Anwendungen z. B. im Bereich der Umwelttechnologie und Katalyse bereits im Einsatz.

Die Vorteile von Textilien sind

- neben der kostengünstigen Herstellung,
- einer hohen chemischen Beständigkeit,
- ein guter Durchfluss bei der Auslage im Gewässer als Passivsammler,
- eine flexible Konstruktion und
- eine einfache Anpassbarkeit der aktiven Oberfläche sowie
- die Möglichkeit der rückstandslosen Entfernung aus einem Gewässer.

Dies macht sie auch für den Einsatz als Passivsammler sehr geeignet.

Das Deutsche Textilforschungszentrum Nord-West (DTNW) forscht an innovativen Technologien zu Funktionalisierung textiler Materialien. Insbesondere die Forschungsgruppen Umwelttechnologie & Katalyse und Green Chemistry & Nanotechnologie haben die Untersuchungen im Forschungsvorhaben intensiv unterstützt. Beide Arbeitsgruppen beschäftigen sich unter anderem mit der Herstellung von katalytisch wirksamen Textilien, in denen bereits Enzyme und Organokatalysatoren für verbesserte Synthesen und Verfahren im Bereich Feinchemie, Pharma, Lebensmittel- und Textiltechnik erfolgreich immobilisiert und eingesetzt wurden. Beispielhaft wurden Peptidasen auf einen Wollfilz über einen Glutardialdehyd-Anker immobilisiert, mit deren Hilfe anschließend sehr einfach Eiweißtrübungen in Weinen ohne einen weiteren Chemikalieneinsatz beseitigt werden konnten.^{22,23}

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Forschungsvorhabens wurde ein Polyamidgewebe mit einem Flächengewicht von 130 Gramm pro Quadratmeter als geeignetes Trägermaterial identifiziert und für 24 h mit 0,1 M NaIO4-Lösung vorfunktionalisiert. Für die Bindung der Ligandenbindestelle stand eine terminale Aminogruppe zur Verfügung, die somit für eine kovalente Bindung sorgt.

Durch die Vorfunktionalisierung des Textils konnte die Ligandenbindestelle direkt und ohne weitere Arbeitsschritte mit dem Textil in Kontakt gebracht und die kovalente Bindung ausgebildet werden. Aufgrund der geringen Menge und der Viskosität der Lösung (siehe Kapitel 2.1.1.4) wurden zunächst Möglichkeiten der Aufbringung und Versuche zur Benutzbarkeit des Textils durchgeführt. Dazu wurde eine Versuchslösung bestehend aus 20% Glycerol und Reinstwasser angesetzt, um die Lösung der Ligandenbindestelle nachzubilden. Dabei zeigte sich, dass das zur Verfügung stehende Volumen von 25 µL kaum ausreicht, um eine relevante Fläche des Textils zu beaufschlagen (siehe Abbildung 18 a). Durch Verdünnungen mit Reinstwasser bzw. PBS-Puffer konnte die Lösung jedoch gut auf dem Textil verteilt und eine vollständige Benetzung des Textils erreicht werden (siehe Abbildung 18 b).

²² Abschlussbericht zum IGF-Vorhaben FKZ_22880BG, Faserfixierte Peptidasen für die Vermeidung von Eiweißtrübungen in Weinen, 2025

²³ Opwis, Klaus (DTNW), Textilien mit katalytischen Eigenschaften, Vortrag IFATCC Augsburg, 10/2023

Zur Immobilisierung der Ligandenbindestelle erfolgte die Aufbringung auf drei unterschiedlichen Wegen:

- tropfenweise Aufgabe mit einer Pipette auf einer Seite der Textilprobe.
- vollständiges Tränken der Textilprobe und Abtrocknung bei Raumtemperatur.
- komplettes Eintauchen der Textilprobe in die verdünnte Lösung der Ligandenbindestelle (siehe Abbildung 18 c) und feucht halten bis zum Ende der Inkubation.



Abbildung 18 Eingesetztes Textil; a) geringes Volumen auf der Oberfläche b) benetztes Textil c) komplett in Lösung eingelegt.

Unmittelbar nach der Inkubation zur Immobilisierung der Ligandenbindestelle an das Textil wurden die einzelnen Textilstücke mit Reinstwasser oder PBS-Puffer gespült, um Reste ungebundener Moleküle der Ligandenbindestelle zu entfernen. Zum Nachweis der Immobilisierung der Ligandenbindestelle auf den Textilproben wurde diese wieder in Lösungen von 17 β -Estradiol ausgelegt, wobei die Versuchsbedingungen angepasst wurden. So wurde die Lösung der bekannten Konzentration von 17 β -Estradiol sowohl in Reinstwasser als auch im PBS-Puffer angesetzt, um die Konformität der Ligandenbindestelle aufrecht zu erhalten und einen Funktionsverlust zu vermeiden. Außerdem erfolgten die Versuche zur Auslagerung bei Raumtemperatur, bei 30 °C und bei 37°C, um den optimalen Arbeitsbereich für die Bindung von 17 β -Estradiol an die Ligandenbindestelle zu ermitteln. Des Weiteren wurde die Auslagerungszeit zwischen einer und 24 Stunden variiert. Es wurde erwartet, dass nach der anschließenden Entfernung der Textilprobens aus den E2-Lösungen, E2 entfernt und die Lösung somit abgereichert wurde. Die Konzentrationen sind jeweils so gewählt worden, dass mindestens eine Abreicherung von 50% erreicht werden sollte. Zur Ermittlung der Abreicherung von E2 aus den wässrigen und gepufferten Lösungen erfolgte eine Messung mittels sensibler LC-MS/MS.

Keine der untersuchten Lösungen aus den unterschiedlichen Versuchsbedingungen zeigte eine Abreicherung der E2 Konzentration nach Entfernung des Textils. Somit konnte keine Bindung des 17 β -Estradiol an die immobilisierte Ligandenbindestelle nachgewiesen werden. Auch die zusätzlich untersuchten Waschlösungen, Positiv- und Negativ-Kontrollen gaben keine Hinweise auf mögliche Ursachen oder Probleme bei der Versuchsdurchführung.

2.1.4. Bindung an Glasmembran und stickstoffmodifiziertes Polymer

Da sowohl eine Immobilisierung der Ligandenbindestelle an Metalloberflächen als auch an ein textiles Material nicht erfolgreich waren, wurden weitere Möglichkeiten recherchiert. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass bereits die Aufbringung der Trägerschicht auf die Metalloberflächen nicht gelang, wurden Materialien gewählt, die bereits eine Trägerschicht ähnliche Funktionalisierung aufwiesen (stickstoffmodifiziertes Polymer) oder aufgrund ihrer Struktur (Glasmembran) eine direkte Bindung des Rezeptors erlauben sollten.

Als stickstoffmodifiziertes Polymer wurde Lewatit VP OC 1065 von der Firma Merck bezogen und für diverse Versuchsreihen eingesetzt. Bei dem Material handelte es sich um ein schwach basisches, anionisches Austauscherharz. Das Material lag als sphärische Partikel mit einem Durchmesser von ca. 0,5 mm vor. Die Matrix besteht aus Styrol-Divinylbenzol mit Trimethylamin als aktiver Matrixgruppe. Das Material ist leicht klumpend und ist im Original-Gebinde leicht feucht verpackt (ca. 50% Trocknungsverlust, Abbildung 19).



Abbildung 19 *Lewatit VP OC 1065 ohne Vorbehandlung.*

Vor der Inkubation mit der Ligandenbindestelle wurde das Material unterschiedlich vorbereitet:

- Das Material wurde drei Mal mit Reinstwasser gewaschen und nass eingesetzt (Abbildung 20 a).
- Das Material wurde drei Mal mit Reinstwasser gewaschen und anschließend bei 40°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (Abbildung 20 b).
- Das Material wurde bei 40°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (Abbildung 20 b).
- Das Material wurde ohne weitere Vorbehandlung verwendet (Abbildung 19).

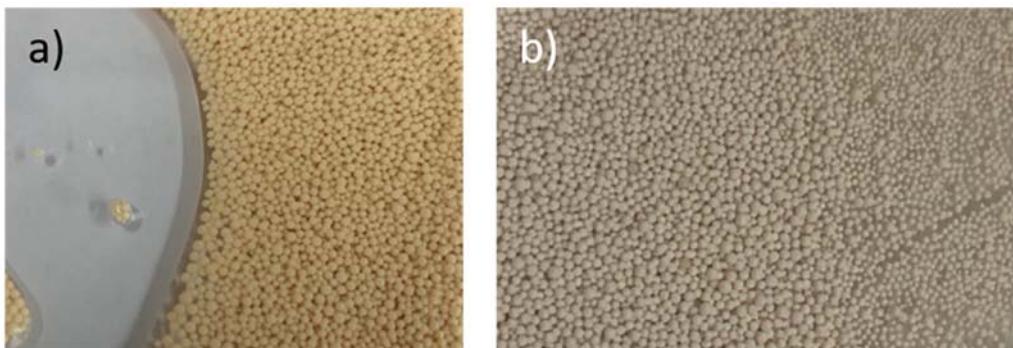


Abbildung 20 Lewatit VP OC 1065 a) gewaschen und nass; b) getrocknet bei 40°C.

Das getrocknete Material wurde deutlich heller und lud sich stark elektrostatisch auf. Es ist davon auszugehen, dass durch den Prozess der Trocknung die aktive Matrixgruppe beschädigt wurde. Dennoch wurde auch das getrocknete Material zur Immobilisierung der Ligandenbindestelle getestet. Dazu wurde das unterschiedlich vorbehandelte Material in HPLC-Vials bzw. Eppendorf-Caps einge- wogen und 100 µL einer verdünnten Lösung der Ligandenbindestelle hinzugegeben. Das bereits feuchte bzw. nasse Lewatit wurde durch diese Zugabe überschichtet, während das getrocknete Ma- terial lediglich benetzt wurde (siehe Abbildung 21).

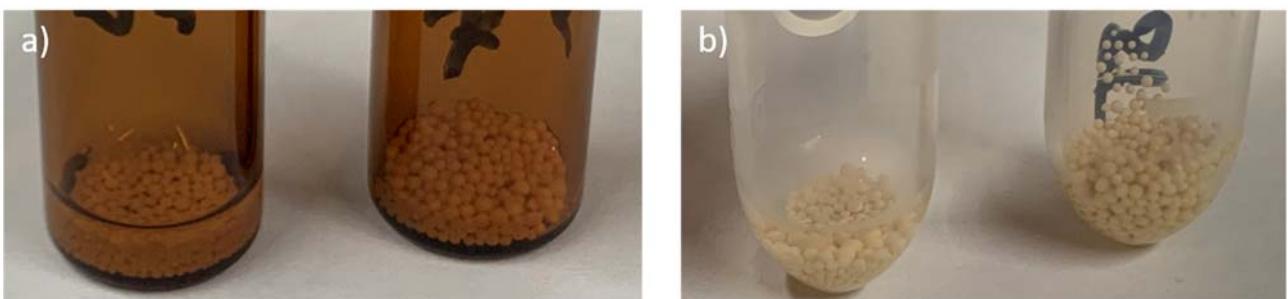


Abbildung 21 Getrocknetes und feuchtes bzw. nasses Lewatit in HPLC- Vials und Eppendorf-Caps nach Zugabe von 100 µL Lösung der Ligandenbindestelle.

Jede vorbereitete Variation des Lewatit Materials wurde anschließend sowohl für 24 h als auch für drei Tage mit der Ligandenbindestelle bei 37°C inkubiert, um eine Immobilisierung an das Material zu erreichen. Zusätzlich wurden von allen Variationen Blindwerte und Positiv-Kontrollen angesetzt.

Im Anschluss an die Inkubation zur Immobilisierung der Ligandenbindestelle erfolgte die Auslage- rung in 17β-Estradiol-Lösung. Dazu wurde eine Lösung von 800 ng/mL 17β-Estradiol in PBS-Puffer angesetzt und jeweils 1 mL in die Gefäße hinzugegeben. Es erfolgte eine weitere Inkubation bei 37°C für mindestens 16 Stunden und die Messung des Überstandes mittels LC-MS/MS.

Die Ergebnisse zeigen eine Wiederfindung zwischen 14 und 35 % der dotierten Konzentration an 17β-Estradiol nach einer Immobilisierung der Ligandenbindestelle für 24 h. Unterschiede zwischen den untersuchten Variationen des Lewatit Materials konnten nicht beobachtet werden, allerdings lag die Wiederfindung in den Eppendorf-Caps niedriger als in den HPLC-Vials aus Glas. Dies bedeu- tet, dass 17β-Estradiol aus der Lösung abgereichert wurde, was auf eine erfolgreiche Bindung an

den Rezeptor und somit auf eine erfolgreiche Immobilisierung hindeuten könnte. Durch die Betrachtung der zusätzlich mitgeführten Blindwerte wird jedoch deutlich, dass es sich bei dieser Abreicherung um eine unspezifische Bindung an das Material handelt. Die Blindwerte wurden identisch zu den Proben angesetzt, ohne jedoch die Ligandenbindestelle hinzuzugeben. Auch hier ist eine niedrige Wiederfindung und damit eine Abreicherung von 17β -Estradiol aus der Lösung zu beobachten. Daher kann die Abreicherung nicht mit einer Immobilisierung und einer Bindung an die Ligandenbindestelle in Zusammenhang gebracht werden.

Als Glasmembran wurden zwei unterschiedliche makroporöse Siliziummembranen von der Firma Smart Membranes untersucht. Die relevanten Eigenschaften der beiden Membranen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 *Eigenschaften der zwei untersuchten makroporöse Siliziummembrane.*

Membran	MakroPorP12M5-500	MakroPorP1.5M1-200
Pitch	$\approx 12 \mu\text{m}$ square	$\approx 1,5 \mu\text{m}$ square
Porenlänge	$\approx 481 \mu\text{m}$	$\approx 209 \mu\text{m}$
Porendurchmesser	$\approx 5 \mu\text{m}$	$\approx 1 \mu\text{m}$
Größe	10 x 10 mm	10 x 10 mm

Für eine Immobilisierung ist hierbei der Porendurchmesser entscheidend. Die Ligandenbindestelle soll in die Poren eindringen und durch van der Waals-Wechselwirkungen mit dem umgebenden Material immobilisiert werden. Die Membranen wurden als 10 x 10 mm große Plättchen zur Verfügung gestellt (siehe Abbildung 24), die sowohl unbehandelt als auch nach einer Reinigung mit Reinstwasser und einer Trocknung bei 40°C eingesetzt wurden.

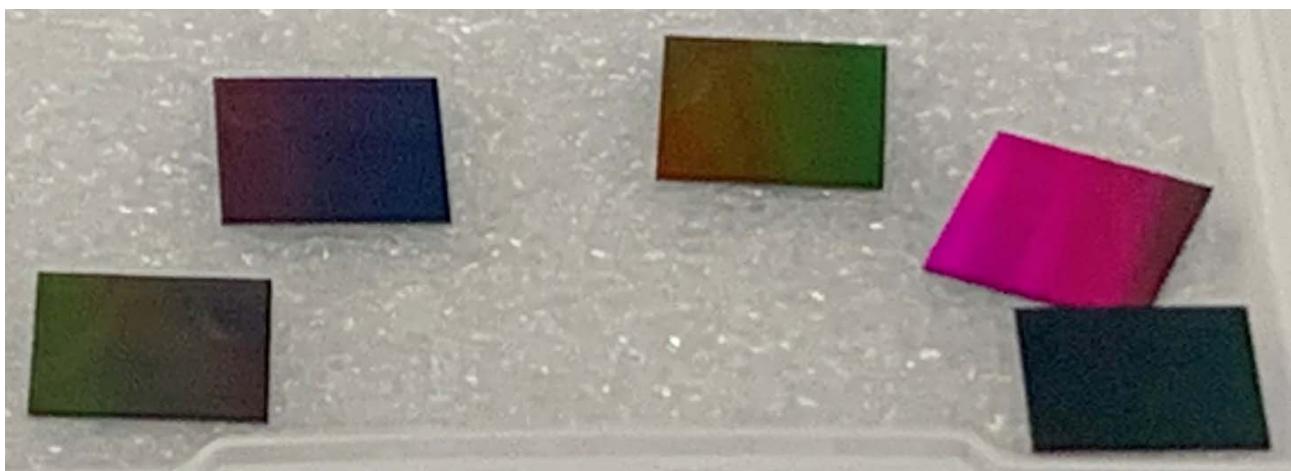


Abbildung 22 *MakroPorP12M5-500 und MakroPorP1.5M1-200 Glasmembrane (10 x 10 mm).*

Die gelöste Ligandenbindestelle ($100 \mu\text{L}$) wurde auf die Oberfläche der Membranen aufgebracht und anschließend für 24 h bzw. 3 Tage bei 37°C inkubiert, um eine Immobilisierung zu erreichen. Zusätzlich wurden von beiden Membranen und beiden Variationen der Vorbehandlung Blindwerte und Positiv-Kontrollen angesetzt.

Im Anschluss an die Inkubation zur Immobilisierung der Ligandenbindestelle erfolgte die Auslagerung in 17β -Estradiol-Lösung. Dazu wurde eine Lösung von 800 ng/mL 17β -Estradiol in PBS-Puffer angesetzt und die Plättchen jeweils überschichtet (Abbildung 23).



Abbildung 23 Glasmembrane in 17β -Estradiol-Auslagerungslösung.

Die Auslagerung erfolgte für mindestens 16 h bei 37°C . Der Überstand wurde abgenommen und mittels LC-MS/MS analysiert.

Die Ergebnisse zeigten in keinem der durchgeföhrten Versuche eine Abreicherung der Auslagerungslösung. Die Positiv-Kontrollen zeigten eine Stabilität von 17β -Estradiol während der gesamten Versuchsdauer und unter allen Bedingungen, so dass die Stabilität des E2 gegeben ist. Eine Abreicherung und damit eine Immobilisierung der Ligandenbindestelle an die Glasmembrane konnte nicht erreicht werden.

2.1.5. Diskussion und Fazit zum Arbeitspaket 1

Im Arbeitspaket 1 dieses Forschungsvorhabens sollte der menschliche Estrogenrezeptor auf einer Oberfläche gebunden und immobilisiert werden.

Als Trägermaterial sollten dazu Metalle getestet werden, da Metalle sehr robust gegenüber Umwelteinflüssen sind. Hierbei sollte der Fokus auf Silber liegen, da zusätzlich hemmende Eigenschaften bei der Biofilmbildung zu vermuten waren. Außerdem sollten in diesem Arbeitspaket weitere aussichtsreiche Materialien wie z. B. Glas/Silikat getestet werden. Dabei waren ein möglichst hohes Anreicherungsvermögen (hohe Konzentration an gebundenem Rezeptor), eine möglichst stabile Bindung des Rezeptors (Rezeptoren werden während der Exposition nicht abgewaschen) und möglichst geringe Kosten des Materials anzustrebende Eigenschaften. Da die Versuche zur Immobilisierung auf die im Projektantrag vorgesehenen Materialien nicht erfolgreich waren, wurde auf verschiedene andere Materialien zurückgegriffen. Allerdings zeigte sich trotz intensiver Bemühungen in keinem der vielzähligen Versuche eine erfolgreiche Immobilisierung auf einer Oberfläche. Auch die mit einem Erfolg in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Immobilisierung des Estrogenrezeptors auf einer Gold- bzw. Titan-Oberfläche konnten nicht reproduziert werden. Dabei war ein wesentlicher Unterschied, dass in diesen Veröffentlichungen der Erstrogenrezeptor und nicht wie in diesem Vorhaben die Ligandenbindestelle verwendet wurde. Bemühungen zur Beschaffung des Estrogenrezeptors blieben über die gesamte Projektlaufzeit erfolglos („nicht lieferbar“), so dass keine Versuche mit dem Estrogenrezeptor durchgeführt werden konnten.

Ein weiterer Einflussfaktor könnte in der Funktionsfähigkeit der Ligandenbindestelle liegen. Durch eine falsche Lagerung, eine geringe Stabilität, oder nicht geeignete Inkubationsbedingungen könnte es zu Konformitätsveränderungen kommen, die eine Bindung an eine Oberfläche oder die anschließende Bindung des Liganden verhindern. Die Ligandenbindestelle wurde wie bereits beschrieben (Kapitel 2.1.1.4) in einem Puffer gelöst und auf Trockeneis vom Hersteller übergeben, wobei eine Lagerung bei -80 °C empfohlen wurde. Da eine Lagerung bei -80 °C im IUTA nicht möglich war, wurde die Ligandenbindestelle möglichst direkt nach der Lieferung verwendet. Ein Vergleich zwischen einer frischen Ligandenbindestelle (Untersuchung am Tag der Lieferung) und eines bei < -18 °C über eine längere Zeit gelagerten Aliquots zeigte jedoch keine Unterschiede. Auch Variationen der Inkubationsbedingungen hinsichtlich der Temperaturen und Pufferlösungen zeigte keine Unterschiede und keinen Erfolg für die Immobilisierung.

Neben den für die Metalloberflächen durchgeführten Untersuchungen mittels REM/EDX, bestand keine Möglichkeit die Bindung der Ligandenbindestelle auf nichtmetallische Oberflächen zu untersuchen. Grundsätzlich ist es zwar möglich mittels Raman-Analysen große Moleküle wie Enzyme oder Rezeptoren zu analysieren und auch Unterschiede in deren Konformität festzustellen. Allerdings lag die Ligandenbindestelle in Glycerol vor, was bei dieser Art von Untersuchungen zu erheblichen Störungen geführt hätte. Eine Verdünnung der Lösung führt zu solch niedrigen Konzentrationen der Ligandenbindestelle, dass sie nicht mehr detektiert werden kann. Die Hinweise aus den REM/EDX

Analysen der Metallocberflächen lassen jedoch darauf schließen, dass auch bei den alternativ untersuchten Materialien keine Immobilisierung der Ligandenbindestelle erreicht werden konnte.

Es kann somit nicht abschließen erklärt werden, warum die Immobilisierung der Ligandenbindestelle weder auf Metallocberflächen noch auf Textilen, Glasmembranen oder modifizierte Polymeren gelungen ist. Auch die Verfahren aus peer-reviewed Veröffentlichungen konnten nicht erfolgreich reproduziert werden. Die Bearbeitung der auf diesen Arbeiten aufbauenden und folgenden Arbeitspakete war somit erheblich eingeschränkt und konnte nur theoretisch durchgeführt werden.

2.2. Arbeitspaket 2: Laborversuche zur Anreicherung, Elution und Wiederfindung von Estrogenen

In diesem Arbeitspaket sollten die Eigenschaften der entwickelten Passivsammler im Labor untersucht werden. Für jede im Antrag genannte Referenzsubstanz sollte die Beladungskapazität ermittelt und diese miteinander verglichen werden. Anschließend sollten geeignete Lösemittel zur Elution der Referenzsubstanzen von den Passivsammlern getestet werden. Aufgrund der Schwierigkeiten in Arbeitspaket 1 konnten diese Untersuchungen nur theoretisch bzw. anhand der verfügbaren Literatur bearbeitet werden.

An die Ligandenbindestelle gebundene Substanzen lassen sich nur dann lösen, wenn ihre intermolekularen Wechselwirkungen geschwächt werden. Östrogene wie 17 β -Estradiol binden an die Ligandenbindungsdomäne des entsprechenden Hormonrezeptors durch eine hydrophobe Tasche mit ergänzenden Wasserstoffbrücken- und Van-der-Waals-Bindungen. Die Lösung des 17 β -Estradiols sollte so erfolgen, dass die Ligandenbindestelle nicht zerstört wird und möglichst auf dem Passivsammler gebunden bleibt. Daher sind äußerst milde Bedingungen notwendig. Besonders geeignet sind milde Puffer- und /oder Salzlösungen. Bei Versuchen von Harris/Lim et al.²⁴ konnte besonders Chlorid gut in die Grenzfläche des Liganden eindringen und damit die vorliegende Bindung beeinflussen. Des Weiteren wäre ein leichter Anstieg des pH-Wertes eine Möglichkeit, die Freisetzung von 17 β -Estradiol zu unterstützen.

Außerdem könnte die Löslichkeit des 17 β -Estradiols durch Zusatz von Lösungsmitteln wie z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Ethanol erhöht werden. Im Rahmen des IGF-Vorhaben Nr. 01IF21954N (DA-EDA) wurden Lösungsmittel wie DMSO und Alkohole (Methanol) zur Konditionierung oder Elution von SPE-Kartuschen bzw. als sogenannte Keeper getestet, wobei neben der eigentlichen Anreicherung organischer Komponenten die Verträglichkeit von Organismen eines Biostests im Vordergrund standen. DMSO ist im Konzentrationsbereich von 5 bis 20% in einer Pufferlösung dafür bekannt, die Löslichkeit des Hormons im Puffer zu erhöhen, ohne die Ligandenbindestelle anzugreifen.

²⁴ Harris, B.Z., Lim, W.A. et al., Role of Electrostatic Interactions in PDZ Domain Ligand Recognition, Biochemistry 2003, 42, 2797-2805

2.3. Arbeitspaket 3: Biofilmuntersuchungen am Passivsammler während der Exposition

Biofouling bezeichnet die biologische Besiedelung technischer oder natürlicher Oberflächen durch Mikroorganismen, Algen, Pilze und höhere Organismen und führt zu einer funktionellen Veränderung der Grenzfläche. Ein Biofilm auf einem Passivsammler beeinflusst damit die Stabilität und Funktionalität der Beschichtungen. Die Geschwindigkeit und die Morphologie des Foulings sind abhängig von der Oberflächenbeschichtung und von der Art der Mikroorganismen.²⁵

Im Textilbereich konnte gezeigt werden, dass eine Oberflächenschicht aus Proteinen, Polysacchariden und anderen Zellabfällen das Anhaften von Mikroorganismen unter Ausbildung von Biofilmen unterstützt (Abbildung 24)²⁶. Organische Polymere (Proteine, Polysaccharide etc.), die u.a. auch durch abgetötete Zellen freigesetzt werden, bilden auf Oberflächen innerhalb kürzester Zeit eine Konditionierungsschicht (**A**), die eine Adsorption von Mikroorganismen vereinfacht (**B**). Es kann sich so ein Biofilm ausbilden (**C**), der einen komplexen, durch eine Polymermatrix stabilisierten Zellverbund darstellt und oftmals nur schwer zu entfernen ist. Diese Biofilme bilden die Grundlage für die Adhäsion höherer Organismen (Algen, Muscheln, etc.), z.B. auf Schiffshüllen, Fischereinetzen und textilen Abdeckungen.

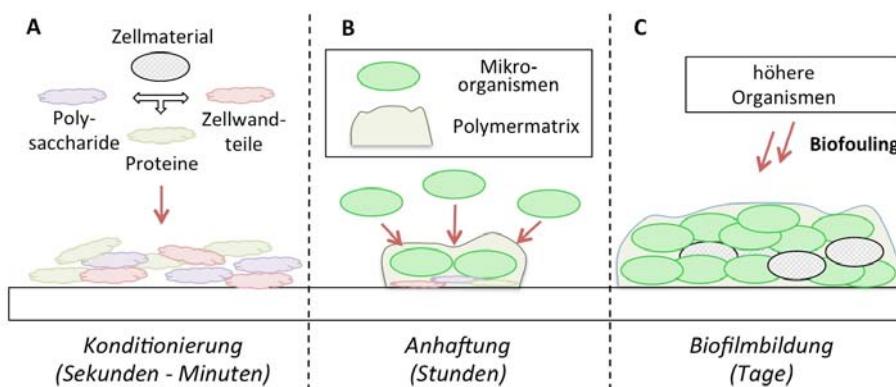


Abbildung 24 Ablauf des Fouling-Prozesses. A: Polymere Materialien wie Proteine, Polysaccharide und Zellwandbruchstücke adsorbieren in einem sehr schnellen Prozess auf der Oberfläche. B: Die sich ausbildende Oberflächenschicht erleichtert das Anhaften von Mikroorganismen. C: Innerhalb weniger Tage können sich sehr stabile Biofilme bilden.

Oberflächen mit Ligandenbindestellen dienen als Biosensoren für Zelladhäsion und -steuerung. Durch unspezifische Adsorption konkurrieren fouling-aktive Biomoleküle mit dem Ziel-Liganden und können somit die Selektivität sowie Sensitivität des Systems stark verringern.²⁷ Da es im Vorhaben bis zum Schluss nicht gelungen ist, eine stabile Bindung der Ligandenbindestelle auf einem Trägermaterial zu realisieren, sind die Versuche zum Biofouling nicht durchgeführt worden. Eine korrekte Aussage zur Stabilität der Passivsammler ist damit nicht möglich.

²⁵Madzgalla, M. Masterarbeit 2015, https://kola.opus.hbz-nrw.de/files/939/Masterarbeit_MMadzgalla.pdf

²⁶Abschlussbericht IGF-Vorhaben MeXory Nr. 21423N, 2024

²⁷Jacobi, F., Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen an biomimetischen Grenzflächen: Untersuchung von Multivalenzefekten mit polymeren Sonden, Dissertation Heinrich Heine Universität Düsseldorf 2022

2.4. Arbeitspaket 4: Kalibrierversuche im Labor für ausgewählte repräsentative Estrogene

Zur Bestimmung der Sammelrate des Passivsammlers sollte dieser bei verschiedenen Gewässerparametern wie z. B. Fließgeschwindigkeit, Temperatur, pH-Wert und Leitfähigkeit, im Labor exponiert werden. Die Sammelraten sollten für verschiedene ausgewählte Referenzsubstanzen sowohl in Reinstwasser als auch in Oberflächenwasser bestimmt werden. Aufgrund der Schwierigkeiten in Arbeitspaket 1 konnten diese Untersuchungen nur theoretisch bzw. anhand der verfügbaren Literatur bearbeitet werden.

Die theoretischen Grundlagen von Passivsammlern wurden vom Umweltbundesamt²⁸ und in der DIN EN ISO 5667-23:2011 beschrieben. Die Referenzsubstanzen diffundieren aufgrund eines Konzentrationsgradienten vom beprobten Medium (Reinst- oder Oberflächenwasser) in die Sammelphase (zur Ligandenbindestelle des Passivsammlers) bis ein Gleichgewicht erreicht ist. Wird der Passivsampler erst mit Erreichen des Gleichgewichts aus dem zu beprobenden Medium genommen, wird er als Gleichgewichtssammler bezeichnet. Die Konzentration einzelnen Analyten (z.B. die Referenzsubstanzen) im Wasser (c_w) zum Zeitpunkt der Entnahme des Passivsammlers kann mit der folgenden Gleichung 1 berechnet werden:

$$\frac{m_s}{V_s} = c_w K_{SW} \quad (1)$$

Wird der Passivsampler vor der Halbwertzeit der gesamten Expositionszeit (t) entnommen, handelt es sich um einen integrativen oder kinetischen Passivsampler. Die Aufnahme von Substanzen befindet sich näherungsweise im linearen Bereich und eine zeitgemittelte Durchschnittskonzentration (c_{TWA}) im Wasser kann mittels Gleichung 2 ermittelt werden:

$$m_s(t) = c_w(TWA) R_s t \quad (2)$$

m_s	Masse des Analyten in der Sammelphase nach der Expositionszeit t
V_s	Volumen der Sammelphase
c_w	Analytkonzentration in der Wasserphase
K_{SW}	Sammler-Wasser-Verteilungskoeffizient
t	Expositionszeit des Passivsammlers in der Wasserphase
$c_w(TWA)$	zeitgemittelte Durchschnittskonzentration (Time-Weighted Average Concentration)
R_s	Sammelrate des Passivsammlers

²⁸ Becker, B., Claus, E., Möhlenkamp, C., Bachtin, J., Paschke, A., Schäfer, S., Anwendung von Passivsammlern in Überwachungsprogrammen gemäß WRRL und MSRL - Identifizierung von Kontaminationsschwerpunkten, Referenzstandorten und neuen Schadstoffen (AnPassa). im Auftrag des Umweltbundesamtes, 2020

Kraus, U.R., et al., Prüfung und Validierung der Einsatzmöglichkeiten neuartiger Passivsammler für die Überwachung prioritärer Schadstoffe unter der WRRL, der MSRL und im Rahmen von HELCOM und OSPAR im Zeitraum 01.01.2010 – 30.10.2012, in Texte 25/2015. 2015, Umweltbundesamt.

Die Sammelrate (R_S) gibt das Volumen an, das vom Passivsammler in einer bestimmten Zeit extrahiert wurde (L/d) und kann mit folgender Formel bestimmt werden:

$$R_S = \frac{m_S}{c_W \times t} \quad (3)$$

Die Sammelrate wird dabei von den Umweltfaktoren an der Probenahmestelle (Temperatur, Fließgeschwindigkeit, Aufwuchs, Salzgehalt, partikulärer und gelöster organischer Kohlenstoff (POC und DOC) usw.) beeinflusst und ist spezifisch für die Sammelphase und die jeweilige Substanz. Zur Kalibrierung eines Passivsammlers sind deshalb für jede Einzelsubstanz Laborversuche notwendig, die aufgrund der fehlenden Passivsammler nicht durchgeführt werden konnten.

2.5. Arbeitspaket 5: Passive Probenahmen an zuvor ausgewählten Standorten

Im Arbeitspaket sollten die entwickelten Passivsammler an zuvor ausgewählten Standorten direkt im Gewässer getestet werden. Dazu sollte eine geeignete Befestigung gefunden werden, mit der sowohl mehrere Passivsammler eingebracht werden können und sie außerdem so fest verankert werden können, dass ein Davontreiben und ein Diebstahl ausgeschlossen werden können. Da die Immobilisierung der Ligandenbindestelle auf ein Trägermaterial in AP 1 nicht erfolgreich war und somit auch kein Passivsampler zur Verfügung stand, konnten diese Untersuchungen nicht durchgeführt werden. Ungeachtet dessen wurden erste Standorte für einen möglichen Einsatz im Gewässer identifiziert.

In anderen Forschungsvorhaben wurden bereits einige Proben von einem kleinen Gewässer vom Niederrhein der Niers entnommen. Somit lagen bereits einige Daten zur estrogenen Wirkung und zu weiteren Gewässerparametern vor. Die Niers ist ein östlicher Zufluss der Maas und umfasst ein Einzugsgebiet von ca. 1.400 Quadratkilometern, das von 735.000 Menschen bewohnt wird. Das Quellgebiet der Niers liegt in der Jülicher Börde und ist heute durch den Braunkohle-Tagebau Garzweiler versiegt. Die Niers wird daher am Oberlauf mit Sümpfungswasser aus dem Tagebau gespeist. Zusätzlich leiten einige Klärwerke insbesondere im Mittellauf bis zu 83 Millionen Kubikmeter Abwasser pro Jahr in die Niers ein. In niederschlagsarmen Zeiten besteht somit der Großteil der Wassermenge aus gereinigtem Abwasser. Des Weiteren verfügt die Niers über diverse operative und Überblicksmessstellen, für die bereits diverse chemische und biologische Messdaten vorliegen (EL-WAS web – Wasserdaten NRW).

Des Weiteren bot die Linksniederrheinische Entwässerungs-Genossenschaft (LINEG) Zugang zu dem von ihnen verwalteten Wassersystem an. Aufgrund der Schwierigkeiten im Arbeitspaket 1 wurden hier jedoch noch keine Standorte konkreter ausgewählt.

2.6. Arbeitspaket 6: Vergleich passive und aktive Probenahme (KI)

Im abschließenden Arbeitspaket 6 sollten eine passive Probenahme mit dem entwickelten Passivsammler durchgeführt und mit einer parallel durchgeführten aktiven Probenahme verglichen werden. Vor- und Nachteile beider Probenahmetechniken sollten dabei bzgl. Aufwand, Zeit, Kosten, Praktikabilität, Handhabung und Plausibilität der Ergebnisse beleuchtet werden. Aufgrund der Schwierigkeiten in Arbeitspaket 1 erfolgte die Bearbeitung dieses Arbeitspakets ebenfalls nur theoretisch bzw. anhand der verfügbaren Literatur.

Für die Analyse von Estrogenen in Wasserproben werden eine Reihe spezifischer Probenahmeverfahren und -bedingungen beschrieben, um zuverlässige und repräsentative Ergebnisse zu erhalten. Dazu gehört die direkte Probenahme, bei der die Entnahme in einem sterilen Glas- oder Kunststoffbehälter erfolgt. Wichtig ist dabei die konsequente Vermeidung von Kreuzkontamination und die sofortige Lagerung bei niedrigen Temperaturen (idealerweise 4 °C), um einen Abbau der Estrogene zu verhindern. Bei der indirekten Probenahme mittels Passivsammler, wie in diesem Vorhaben vorgesehen, werden die Passivsammler für eine kontinuierliche Probenahme über ein definiertes Zeitfenster in ein Gewässer eingesetzt. Sie bieten den Vorteil einer integrativen Messung und sind besonders bei schwankenden Konzentrationen geeignet. Die passive und aktive Probenahme unterscheiden sich grundlegend in ihrer Herangehensweise, dem Zeitbezug und dem erzielten Probenergebnis.

Ein Vergleich ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2 *Vergleich passive und aktive Probenahme.*

Kriterium	Passive Probenahme	Aktive Probenahme
Probenahmeprinzip	Sammler verbleibt über längeren Zeitraum im Wasser und sammelt Analyte zeitintegriert.	Direktes Entnehmen einer Momentanprobe mithilfe von Pumpen, Schöpfgefäß o. Ä..
Analysenaussage	Durchschnittliche Konzentration über die Sammelzeit; einzelne Ereignisse können erfasst werden .	Konzentration zum Probenahmezeitpunkt; kurzzeitige Ereignisse können verpasst werden.
Fehlerquellen	Kann durch geringe Strömung oder biologische Aktivität beeinflusst werden; Kalibrierung nötig.	Repräsentativität ist abhängig von Ort und Zeitpunkt; Gefahr sporadischer Einträge wird geringer erfasst.
Technik und Aufwand	Einfache Handhabung vor Ort, kein Strombedarf; Rückholung und Extraktion notwendig.	Benötigt meist Technik (Pumpe, Gefäße); direkte Analyse oder Weiterverarbeitung erforderlich ¹ .

Die passive Probenahme ist ideal für die zeitliche Integrierung und die Erfassung niedriger Konzentrationen, sowie für ein Langzeitmonitoring. Die aktive Probenahme eignet sich, wenn punktuelle Belastung oder hohe räumliche/zeitliche Auflösung gefordert ist und Strömungsverhältnisse unklar sind. Praktisch empfiehlt sich je nach Fragestellung und zu erwartendem Konzentrationsverlauf oft eine Kombination beider Methoden.

3. Verwendung der Zuwendung

3.1. Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)

Es wurde wissenschaftlich-technisches Personal insgesamt über 20,98 Personenmonate eingesetzt.

3.2. Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans)

Die ursprünglich beantragten Geräte wurden nicht benötigt, die dafür eingeplanten Mittel in Personalmittel umgewidmet.

3.3. Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans)

Nicht beantragt

4. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die geleistete Arbeit entspricht nur teilweise dem begutachteten und bewilligten Arbeitsplan aus dem Antrag.

Aufgrund der oben beschriebenen Schwierigkeiten im Arbeitspaket 1 wurde dort ein deutlich höherer (Personal-)Aufwand betrieben und als angemessen, sinnvoll und notwendig erachtet. Das Projekt wurde 2x ausgabenneutral um insgesamt 16 Monate verlängert.

Letztlich konnten die auf AP1 aufbauenden, nachfolgenden Arbeitspakete lediglich theoretisch bzw. anhand verfügbarer Literatur bearbeitet werden.

5. Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten

Ein wirkungsspezifischer Passivsammler für die direkte Anreicherung von Estrogenen im Gewässer sollte von interessierten Unternehmen nach erfolgreichem Projektabschluss übernommen und eingesetzt werden. Die Erfolgsaussichten waren aufgrund einer momentan am Markt nicht vorhandenen vergleichbaren Probenahme und der damit verbundenen wesentlich spezifischeren Charakterisierung von Umweltproben als sehr gut einzustufen. Ein Probenahmeverfahren mit Passivsammlern hätten das Potential ein neues analytisches Gesamtkonzept zu etablieren, dass sich mit der repräsentativen passiven Probenahme von Anfang an auf eine spezifische Wirkung konzentriert und mit folgender biologischer und instrumenteller Analytik besser in der Lage ist sowohl die Wirkung näher zu charakterisieren als auch verursachende Einzelsubstanzen zu identifizieren. Bei gelungener Herstellung von Passivsammlern würden die Forschungsergebnisse einen wesentlichen Beitrag zur Umstellung der Umweltanalytik weg von einer Bestimmung und Überwachung von einzelnen bekannten Substanzen hin zur wirkungsbezogenen Analytik und der Identifizierung von bekannten und auch unbekannten Verursachern solcher Effekte in der aquatischen Umwelt liefern.

IUTA hat in der gesamten Projektlaufzeit im DIN Arbeitskreis NA 119-09-05-09 AK Hormonelle Wirkungen (Xenohormone) mitgearbeitet, der sich mit der wirkungsbezogenen Analytik beschäftigt. Die Forschungsergebnisse hätten hier direkt in die Normung einfließen und das entwickelte Verfahren in eine weitere Normung und Standardisierung überführt werden können.

Da es im Vorhaben bis zum Schluss nicht gelungen ist, eine stabile Bindung der Ligandenbindestelle auf einem Trägermaterial zu realisieren und damit einen Passivsammler und letztendlich ein neues Probenahmeverfahren zu entwickeln, sind die Anwendungsmöglichkeiten, die im Antrag formuliert wurden, nicht eingetreten.

6. Wissenstransfer in die Wirtschaft

Aufgrund der Tatsache, dass Arbeitspaket 1 nicht erfolgreich abgeschlossen werden wurde, konnte kein wirkungsspezifischer Passivsammler entwickelt werden. Ein Wissenstransfer in die Wirtschaft erfolgte daher lediglich in dem Maße, dass der Sachverhalt mit Experten aus der Wirtschaft mehrfach intensiv diskutiert wurde. Dabei wurden die Schwierigkeiten ausführlich dargestellt und mögliche Fehlerquellen und Alternativen diskutiert. Konkrete Ergebnisse konnten nicht präsentiert werden.

7. Durchgeführte Transfermaßnahmen

Aufgrund der fehlenden Ergebnisse durch die Schwierigkeiten im Arbeitspaket 1 konnten nur bedingt Transfermaßnahmen durchgeführt werden. Tabelle 3 zeigt die geplanten Transfermaßnahmen, wie sie im Antrag vorgesehen waren.

Tabelle 3 Geplante Transfermaßnahmen (teilweise auch nach Projektende)

Maßnahme	Ziel	Ort/Rahmen	Datum/ Zeitraum
Erster Projekt-begl. Ausschuss	Es erfolgt eine Vorstellung des Projektes	IUTA und online	Mai 2023
Information Fach- publikum	Information eines breiten Fachpublikums über das Projekt	Artikel im IUTA Tätigkeits-bericht 2024	2024
Zweiter Projekt- begl. Ausschuss	Innerhalb des zweiten projektbegleitenden Aus- schusses erfolgt die Vorstellung der bislang erziel- ten Projektergebnisse.	IUTA und online	Juni 2025
Vorträge	z.B. Essener Tagung für Wasserwirtschaft	2025/2026	nach Projektende
Beratung von KMU	Information von Unternehmen auch außerhalb des PA. Diese Maßnahme wird fortlaufend über die ge- samte Projektlaufzeit durchgeführt.	IUTA	Kontinuierlich
Veröffentlichung in Fachzeitschriften	GIT, LABO, LABO-Anwenderforum (z.B. als Vortrag)	Duisburg	Kontinuierlich und nach Projekt- ende
Information von Verbänden	Know-How-Transfer an interessierte Firmen durch Verbände; Gezieltes Informieren der Verbände zu den Arbeiten; Übersenden des Abschlussberichtes	Duisburg	fortlaufend
Akademische Aus- bildung	Wissensvermittlung und Einbeziehung der For- schungsergebnisse in die Lehrveranstaltungen Ana- lytische Chemie	Duisburg	Nach Projektende

Insbesondere Transfermaßnahmen durch Vorträge auf Tagungen oder Veröffentlichungen in Fachzeitschriften, sowie eine Einbeziehung der erzielten Ergebnisse in die akademische Ausbildung waren ohne Projektergebnisse nicht möglich. Ungeachtet dessen wurde der Projektstatus, die aufgetretenen Schwierigkeiten und die alternativen Möglichkeiten kontinuierlich mit dem projektbegleitenden Ausschuss, interessierten Firmen und Verbänden sowie weiteren Experten präsentiert und diskutiert.

8. Geplante spezifische Transfermaßnahmen nach der Projektlaufzeit

Aufgrund der fehlenden Ergebnisse sind spezifische Transfermaßnahmen nach der Projektlaufzeit nicht geplant.