



Non-Target-Analytik in der Ökologie

T.L.H. Pham^{1*} (lamhuong.pham@tu-berlin.de), in Kooperation mit H. Weisshoff², C. Mügge², E. Krause³, W. Rotard⁴, A. Preiss⁵ und I. Zaspel⁶

Abstract

Die vorliegende Arbeit gibt einen Überblick über Methoden und Techniken der *Non-Target*-Analytik bei der Identifizierung von Abbauprodukten anthropogener organischer Verbindungen und von Schadstoffen natürlicher Herkunft. An ausgewählten Beispielen wird die Leistungsfähigkeit moderner Analysemethoden bei der Identifizierung unbekannter Verbindungen gezeigt. Etwa 30% der dadurch identifizierten Verbindungen erweisen sich als bis dahin unbekannt. Der kombinierte Einsatz chromatographischer und spektroskopischer bzw. spektrometrischer *off-line* und *on-line* Methoden, insbesondere der *on-line* Kopplungen LC-PDA-ESI-Q-TOF-MS-MS/MS und LC-UV-NMR zur Rapididentifizierung organischer Verbindungen im Gemisch, hat sich als sehr vorteilhaft herausgestellt. Darüber hinaus sind die sich gegenseitig ergänzenden Strukturaussagen der UV/Vis-, MS- und NMR-Methoden von besonderer Bedeutung.

Einleitung

In der Analytik, insbesondere Umweltanalytik, die sich u. a. mit der Identifizierung und Quantifizierung von ökotoxischen Substanzen beschäftigt, wird ein rasanter Anstieg der Analyten registriert. Dank modernster Techniken können in der *Target*-Analytik bekannte Schadstoffe bis zum Konzentrationsbereich von pg/ml erfasst und in der *Non-Target*-Analytik bisher unbekannte Verbindungen schneller identifiziert werden.

Im Hinblick auf die *Non-Target*-Analytik in der Ökologie und unter Berücksichtigung anthropogener Einflüsse können Substanzen mit toxischem und ökotoxischem Potenzial, welche Ökosysteme nachhaltig belasten und aufgrund ihrer hohen Vielfalt und geringen Konzentration noch nicht ausreichend untersucht werden, je nach Ursprung in zwei Gruppen geteilt werden. Zur ersten Gruppe gehören anthropogene Schadstoffe, wie Rückstände und Abbauprodukte von Arzneimitteln, Pestiziden, Textilfarbstoffen etc. Zur zweiten Gruppe gehören Schadstoffe natürlicher Herkunft. Langfristige anthropogene Veränderungen von Ökosystemen, z.B. Klimaveränderung, führen zum explosiven Wachstum von pathogenen Mikroorganismen und damit zu neuen Schadstoffen natürlicher Herkunft, z.B. Mykotoxine aus Schimmelpilzen oder Cyanotoxine aus Blaualgen.

Die *Non-Target*-Analytik hat zum Ziel durch Kombination unterschiedlicher Analysetechniken Probeninhaltsstoffe, u. a.

Substanzen mit toxischem und ökotoxischem Potenzial, zu erkennen und zu identifizieren. Sie leistet damit einen wichtigen Beitrag zur Bewertung von Gefahrenlagen und zu neuen Gesetzgebungen für den Umweltschutz.

Die vorliegende Arbeit gibt einen Überblick über Methoden und Techniken der *Non-Target*-Analytik im Zusammenhang mit der Identifizierung von unbekanntem Abbauprodukten anthropogener organischer Verbindungen und von Schadstoffen natürlicher Herkunft. Dabei konzentrieren wir uns auf die Untersuchung von Sekundärmetaboliten aus Bodenmikroorganismen, welche als Pathogenitätsfaktoren wirken und in sehr unterschiedlicher Weise bei Forstpflanzen Krankheits-symptome auslösen oder das Pflanzenwachstum fördern bzw. schädliche Wirkungen von Pathogenen auf Pflanzen verhindern.

In der *Non-Target*-Analytik hat sich der kombinierte Einsatz chromatographischer und spektroskopischer bzw. spektrometrischer *off-line* und *on-line* Methoden, insbesondere der *on-line* Kopplungen LC-PDA-ESI-Q-TOF-MS, -MS/MS und LC-UV-NMR zur Rapididentifizierung unbekannter organischer Verbindungen im Gemisch als sehr vorteilhaft herausgestellt. UV/Vis-Spektren ermöglichen die Detektion von delokalisierten π -Elektronen-Systemen und dadurch die Zuordnung zu bestimmten Substanzklassen. Der direkte Vergleich mit Referenzspektren aus UV/Vis-Datenbanken in computerautomatisierten HPLC-Systemen erlaubt eine hocheffektive Identifizierung bereits bekannter Metaboliten. LC-MS-MS-MS-Kopplungen, wie LC-ESI-MS/MS, LC-ESI-Q-TOF-MS/MS, LC-IonTrap-MSⁿ, und H/D-Austausch-MS-MS/MS-Experimente sind hochleistungsfähige Techniken für die Untersuchung komplexer Gemische, da sie notwendige Informationen über Molekülmassen und über die Anwesenheit bestimmter funktionaler Gruppen der Analyten liefern.

Obwohl der kombinierte Einsatz der HPLC-NMR-MS für die Identifizierung organischer Verbindungen im Gemisch sehr leistungsfähig ist /Godejohann et al., Preiss et al., Sandvoß et al./, kommt diese Technik aufgrund des hohen Preises in den meisten Analytiklabors nicht zur Anwendung. Die Kooperation verschiedener Labore, die über die Standardtechniken MALDI-TOF-TOF-MS, LC-PDA, LC-MS-MS/MS, LC-UV-NMR verfügen, ist eine sinnvolle Alternative, um umfangreiche Untersuchungsaufgaben auf effektive Art zu lösen /Pham et al. 2005/.

Ergebnisse und Diskussion

Das angewendete Workflow-Schema der vorliegenden Arbeit ist in **Abb. 1** dargestellt. Die Proben (flüssig oder fest) werden meist zuerst mittels MALDI-MS untersucht. Auf dem *on-line* Weg werden flüssige Proben zuerst mittels SPE behandelt. Die Identifizierung bzw. Strukturaufklärung der Substanzen erfolgt durch Auswertung spektroskopischer bzw. spektrometrischer Daten aus *on-line* LC-PDA-, LC-MS-MS/MS- und LC-NMR-Messungen sowie durch den Vergleich mit Datenbanken. Etwa 30% der dadurch identifizierten Verbindungen erweisen sich als bis dahin unbekannt. Der zweite Weg, die *off-line* Variante, beinhaltet die Isolierung der Substanzen durch eine Kombination chromatographischer Verfahren. Zur Strukturaufklärung der rein isolierten Substanzen werden MS- und NMR-Techniken eingesetzt.

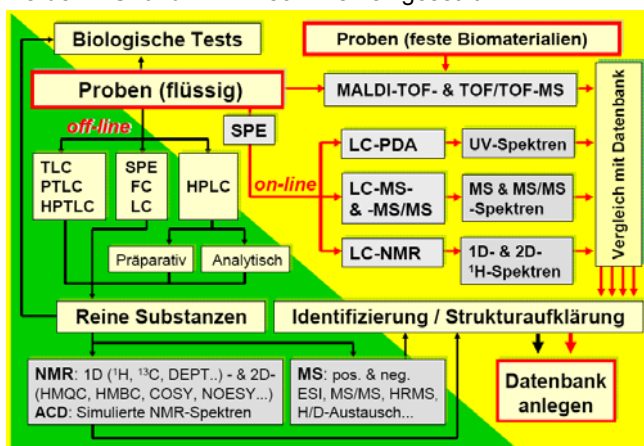


Abb1: Workflow-Schema

Als Beispiele für die *Non-Target*-Analytik in der Ökologie werden hier die Rapididentifizierung von Abbauprodukten des Textilfarbstoffes Reaktiv Black 5, die Identifizierung von Mykotoxinen der Hyphomycetengattung *Fusarium* /Pham *et al.*, Zaspel *et al.*/ sowie die Rapiddetektion des Pflanzenpathogens *Chalara fraxinea* /Zaspel & Pham, Pham *et al.*/ dargestellt.

1. Identifizierung der Abbauprodukte des Handelsfarbstoffs Reactive Black 5

Derzeit werden rund 3000 Substanzen als Textilfarbstoffe verwendet, etwa 27% davon (ca. 50.000 Jahrestonnen) sind Reaktivfarbstoffe /BAG 2009/, die an Baumwolle kovalent gebunden werden und dadurch sehr gut auf der Textiloberfläche haften. Diese Farbstoffe besitzen eine hohe Lichtechtheit und Alterungsbeständigkeit, sind aber biologisch und chemisch schlecht abbaubar und können, wie im Fall der Benzidinfarbstoffe, ein hohes öko- und humantoxisches Potenzial aufweisen.

Für eine effektive Behandlung der Textilabwässer wurde der Abbauprozess des wichtigen Handelsfarbstoffs Remazol Black 5 (RB5) in Modelabwässern untersucht. RB5 wurde zunächst hydrolysiert und anschließend biologisch mit Weißfäulepilzen behandelt. Alternativ erfolgte ein chemischer Abbau durch Ozonolyse. Für die Analytik wurden die Kopplungstechniken LC-PDA-MS und -MS/MS, LC-ESI-

IonTrap-MSⁿ in Kombination mit *on-flow* und *stopped-flow* LC-UV-NMR eingesetzt.

Für RB5 wird gemäß Herstellerangabe die Struktur I angenommen, die keine Ketogruppe enthält. Dagegen zeigt das ¹³C-NMR Spektrum ein Kohlenstoffsignal bei δ 180,47 ppm, welches auf eine tautomere Form II von RB5 mit einer Ketogruppe im Chinonring hindeutet (Abb. 2). Die Anwesenheit der Wasserstoffbrücke wird durch ein starkes Signal bei δ 15,4 ppm im ¹H-Spektrum bestätigt. Weitere NMR-Experimente bestätigen das Vorliegen eines Naphthochinondiazid-Derivates II. Darüber hinaus konnten mittels NMR im Handelsfarbstoff RB5 mindestens 7 weitere Farbstoffe mit einem Anteil von 20% nachgewiesen werden. Anhand der ¹H-Methylen-Signalintegrale -SO₂-CH₂-CH₂- (3,0 bis 4,4 ppm) konnte die Anwesenheit von mindestens fünf Verbindungen nachgewiesen werden, die eine Ethylsulfongruppe enthalten. Ebenso wurde ein Vertreter mit einer Vinylsulfongruppe -SO₂-CH=CH₂ durch das Triplet des CH-Protons der Vinylsulfongruppe bei δ 6,05 ppm nachgewiesen. Weitere Triplets von Ethylsulfongruppen bei δ 3,95 und 3,7 ppm konnten Hydrolyseprodukten von RB5 zugeordnet werden, die eine Hydroxyethylsulfongruppe -SO₂-CH₂-CH₂-OH enthalten. Anhand des Verhältnisses von Vinyl- und Hydroxyethyl-Sulfongruppen konnte auch gezeigt werden, dass RB5 bei Raumtemperatur in Wasser nur geringfügig hydrolysiert.

Das 3D-HPLC-PDA-Chromatogramm des Handelsfarbstoffs RB5 zeigt verschiedene UV/Vis-Absorptionsspektren (190 - 800 nm) mit den typischen Banden der roten und blauen Naphthalin-Sulfon-Diazofarbstoffe (**Abb. 3**).

Anders als in bisherigen Arbeiten wurden hier statt Tributylamin Ammoniumhydrogencarbonat- bzw. Ammoniumformiat-Lösungen (20 mM in H₂O/CH₃CN) verwendet, wodurch der Trenneffekt und die Ionisierung deutlich verbessert werden konnten und LC-NMR-Untersuchungen möglich wurden.

Mittels LC-DAD-MS-MS/MS sowie LC-IonTrap-MSⁿ und LC-UV-NMR konnten die Verbindungen II bis VI (**Abb. 2**) des Handelsfarbstoffs RB5 identifiziert werden. Die aus LC-DAD-MS-MS/MS resultierenden Strukturvorschläge für chemische und biologische Abbauprodukte von RB5 VII bis XVI (**Abb. 2**) konnten mittels NMR und LC-UV-NMR bestätigt werden. Zur Bestätigung der Strukturvorschläge für die Verbindungen, z.B. XIII (Hauptabbauprodukt aus der Behandlung mit Weißfäulepilzen) und XV (Hauptabbauprodukt aus der Hydrolyse), wurden LC-MS/MS sowie -MSⁿ und H/D-Austauschexperimente durchgeführt. Jedes Fragment konnte in der H- und der D-Form detailliert untersucht werden (**Abb. 4**). Verbindung XIII konnte mittels LC-NMR als eine bisher unbekannte Verbindung aus der Strukturgruppe 2H-naphtho[1,8-*cd*]-isoxazole identifiziert werden, welche auf dem Syntheseweg nicht zu gewinnen ist.

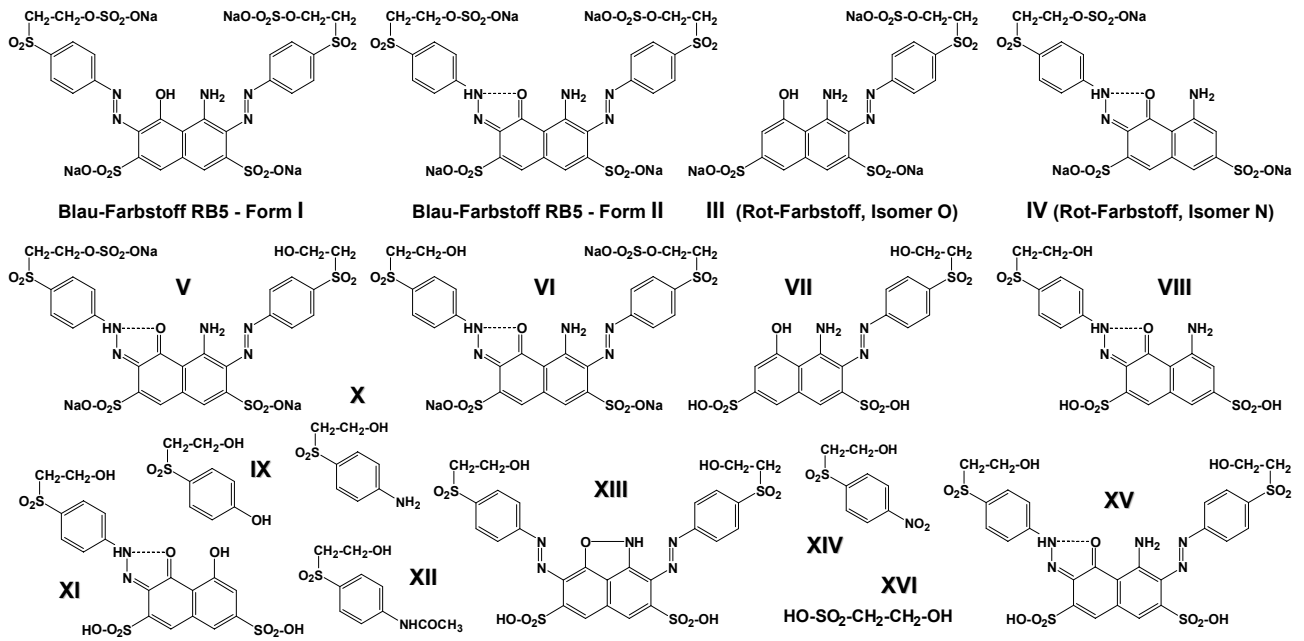


Abb. 2: Bisher angenommene Struktur des Blau-Farbstoff RB5 (I), neu identifizierte Tautomer-Form des RB5 (II), identifizierte Inhaltsstoffe (III - VI) des Handelsfarbstoffs RB5 und seine Abbauprodukte (VI - XVI)

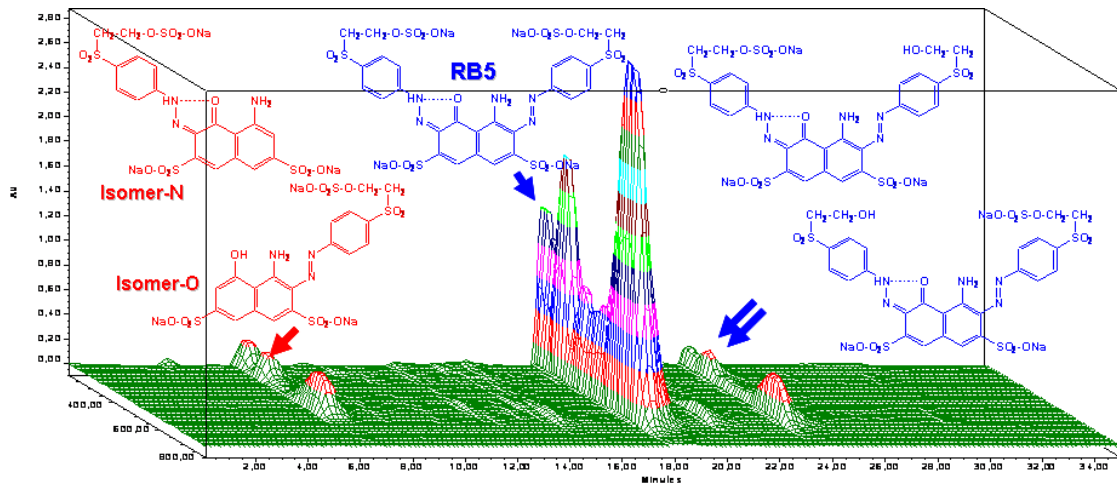


Abb. 3: 3D-PDA-HPLC-Chromatogramm des Handelsfarbstoffs RB5

XIII	H-Form (Molmasse m/z 741)		H_{acid}		D-Form (Molmasse m/z 746)	
	Fragmentierungsweg (ESI) [M-H] ⁻ m/z 740		4		Fragmentierungsweg (ESI) [M-D] ⁻ m/z 744	
	1	2	1	2	1	2
740	740	4	4	744	744	
↓ - 64 (SO ₂)	↓ - 213	4	3	↓ - 64 (SO ₂)	↓ - 214	
676	527	3	3	680	530	
↓ - 213	↓ - 64 (SO ₂)	3	3	↓ - 214	↓ - 64 (SO ₂)	
463	463	2	3	466	466	
↓ - 109	↓ - 64 (SO ₂)	2	3	↓ - 64 (SO ₂)	↓ - 64 (SO ₂)	
354	399 → ⁻²¹³ 186	2	3	356 → ⁻¹⁸⁸ 168	402	
↓ - 64 (SO ₂)	↓ - 109	2		↓ - 64 (SO ₂)		
290	290	2		292		

XV	H-Form (Molmasse m/z 743)		H_{acid}		D-Form (Molmasse m/z 750)	
	Fragmentierungsweg (ESI) [M-H] ⁻ m/z 742		4		Fragmentierungsweg (ESI) [M-D] ⁻ m/z 748	
	1	2	1	2	1	2
742	742	6		748		
↓ - 64 (SO ₂)	↓ - 64 (SO ₂)	6		↓ - 64 (SO ₂)		
678	678 465	5		684		
↓ - 213	↓ - 108	5		↓ - 214		
465	570	4		470		
↓ - 28 ↓ - 56	↓ - 30 ↓ - 109	4		↓ - 29 ↓ - 57		
437 → ⁻²⁸ 409	540 461			441 413		
↓ - 110 ↓ - 110	↓ - 109					
327	299					
↓ - 64	431					
235						

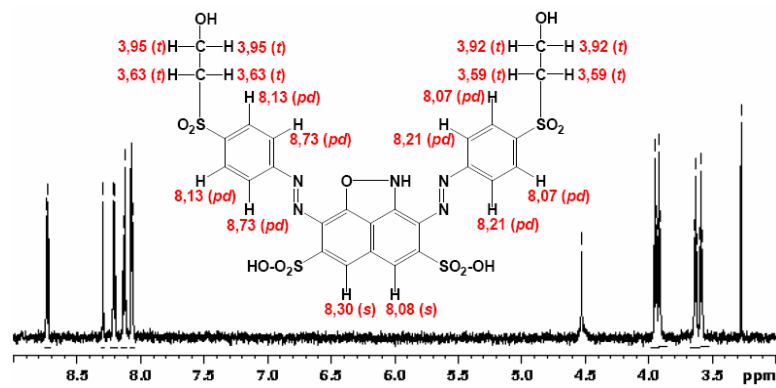


Abb. 4: Vergleich der Fragmentierungsmuster aus H/D-Austauschexperimenten von Verbindungen XIII und XV sowie ¹H-Spektrum (stopped-flow LC-NMR) und Zuordnung der ¹H-Signale der Verbindung XIII

Die Ozonolyse von RB5 führt, wie LC-MS- und NMR-Untersuchungen ergaben, zu einem vollständigen Abbau der aromatischen Ringe und zur Entstehung der Verbindung HO-SO₂-CH₂-CH₂-OH.

Dieses Beispiel zeigt, dass ohne eine gründliche Untersuchung des Ausgangsmaterials falsche Rückschlüsse über die Entstehung von Abbauprodukten gezogen werden können.

2. Untersuchung an pflanzenpathogenen *Fusarium*-Arten

Fusarien bilden eine sehr umfangreiche Pilzgattung, deren Verbreitung u. a. durch extensiven Weizen- und Maisanbau, aber auch durch Klimaveränderungen gefördert wird. Sie können sehr lange in Böden überdauern. Durch *Fusarien* gebildete Mykotoxine gelangen über kontaminierte Nahrungsmittel in die Lebensmittelkette und wurden u. a. schon in Eiern nachgewiesen. Verschiedene Arten sind bekannte Schaderreger bei Forstbaumarten. Insbesondere bei der Anzucht von Jungpflanzen von Laubbäumen in Baumschulen können sie zu Schäden, von Gewebenekrose bis zu Totalausfällen,

führen. Häufig nachgewiesene Vertreter sind *Fusarium avenaceum*, *F. sporotrichioides*, *F. lateritium*, *F. sambucinum* und *F. tricinctum*.

Für die folgenden Untersuchungen wurden 14 isolierte *Fusarium*-Stämme auf Agar-Medien angezchtet und die Zell-extrakte mittels LC-ESI-TOF-MS-MS/MS untersucht. Mit den gleichen Stämmen wurden Pflanzen von 5 Laubbäumen beimpft.

Zwei Monate nach der Beimpfung wurde die Bildung von Stammnekrosen an den Pflanzen beobachtet. Die Anfälligkeit der verschiedenen Baumarten gegenüber den *Fusarium*-Isolaten wurde in drei Gruppen (keine, leichte bzw. schwere Schäden) eingeteilt (Tab. 1).

Stämme Species	<i>Fusarium avenaceum</i>										<i>Fus. tricin-</i> <i>trinc-</i> <i>tum</i>	<i>Fus. sporo-</i> <i>trichioides</i>	<i>Fus. sam-</i> <i>bucinum</i>	
	Ha3	1	2	5	7	9	10	742	44	Ha4	Ha6	He2	13	14
<i>Acer</i>	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden
<i>Prunus</i>	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden
<i>Sorbus</i>	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden
<i>Fraxinus</i>	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden
<i>Tilia</i>	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden	keine Schäden

■ keine Schäden, Abwehrreaktion Inhaltsstoffe: hauptsächlich bekannte & neue Cyclodepsipeptide	■ leichte Schäden (begrenzte kleine Rindennekrosen) Inhaltsstoffe: bekannte & neue Mycotoxine und Cyclodepsipeptide	■ schwere Schäden (Rindennekrosen, Weiksymptome) Inhaltsstoffe: hauptsächlich bekannte & neue Mycotoxine
--	--	--

Tab.1: Anfälligkeit von Laubbaumarten gegenüber *Fusarium*-Befall

Bei der Auswertung der Ergebnisse der LC-MS-Untersuchungen an *Fusarium*-Zellextrakten dieser drei Gruppen wurde ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den gebildeten Sekundärmetaboliten und dem durch die *Fusarien* verursachten Schäden an den Pflanzen festgestellt (**Abb. 5**). Bei den *Fusarien*, die keine Schäden an den Pflanzen verursacht haben, werden hauptsächlich Cyclodepsipeptide der Enniatin-Gruppe gefunden. Bei den *Fusarien*, die schwere Schäden verursachen, werden sowohl viele bekannte Mykotoxine der Trichothecen-Gruppe, z.B. T2-Toxin, Neosolaniol..., als auch bisher unbekannte Trichothecene, z.B. FZP-1 und -2, in hoher Konzentration und die Cyclodepsipeptide *Accuminatum* und *Beauvericin* (in geringer Konzentration) gefunden. Bei den *Fusarien*, die leichtere Schäden verursachen, wurden sowohl Cyclodepsipeptide als auch Mykotoxine der Trichothecen-Gruppe, aber in geringer Konzentration gefunden.

In **Tab. 2** sind alle gefundenen Verbindungen der 14 getesteten *Fusarien* zusammengestellt, von denen mehr als 30% bisher unbekannt waren.

Hauptsekundärmetaboliten aus 14 <i>Fusarium</i> -Isolaten				
bekannt			bisher unbekannt	
<i>Accuminatum</i> A	Enniatin B	Illicicolin F	FZP-T1	FZP-P6
<i>Accuminatum</i> B	Enniatin B1	Neosolaniol	FZP-T2	FZP-P7
<i>Accuminatum</i> C	Enniatin B; N,N'-Didemethyl	Neosolaniol; 8-Acetyl	FZP-P1	FZP-P8
Apicidin; 8'-deoxo, 9'-hydroxy	Enniatin B; N-Demethyl	Neosolaniol; 8-Isobutanoyl	FZP-P2	FZP-P9
Apicidin; 8'S-alcohol	Enniatin D	Neosolaniol; 8-Pentanoyl	FZP-P3	FZP-P10
Beauvericin A	Enniatin E	Neosolaniol; 8-Propanoyl	FZP-P4	FZP-P11
Beauvericin B	Fusaproliferin	NT2-Toxin	FZP-P5	FZP-P12
Enniatin A	Fusarinine A	T2-Toxin		
Enniatin A1	HT2-Toxin	T2-Toxin; 3'-Hydroxy		

Tab.2: Liste der Hauptsekundärmetaboliten aus 14 *Fusarium*-Isolaten

3. Eschentriebsterben, verursacht durch *Chalara fraxinea*
Seit einigen Jahren werden in Europa verstärkt Schäden an Eschen festgestellt. Befallene Eschen weisen eine schütterte Belaubung, trockene Blätter und Zweige auf. Die Krankheit hat sich mittlerweile zu einem ökologischen Problem ausgeweitet, da alle Altersklassen, sowohl in natürlichen Beständen als auch in Baumschulen, betroffen sind. Der Erreger des Eschensterbens - der Ascomycet *Hymenoscyphus albidus* bzw. seine Nebenfruchtform *Chalara fraxinea* - wurde aus befallenen Gewebe isoliert und *in-vitro* kultiviert. Mittels MALDI-MS und LC-PDA-ESI-TOF-MS sowie -MS/MS wurde eine Reihe von bisher unbekanntem Sekundärmetaboliten mit Molekülmassen von 900 bis 1500 Da sowohl in Zellextrakten von auf Agar-Medium kultivierten *C. fraxinea* als auch in Extrakten abgestorbenen Pflanzengewebes detektiert.

C. fraxinea konnte auch anhand seiner o. e. bisher unbekanntem Sekundärmetaboliten in künstlich infizierten Eschen nachgewiesen werden, wobei die Verteilung in der Pflanze unterschiedlich war. In den oberen Teilen der Pflanzen, die zuerst abgestorben waren, konnten die o. e. Sekundärmetaboliten nicht gefunden werden, wohingegen sie unterhalb der Impfstelle bis in den Wurzelbereich in hohen Konzentrationen nachgewiesen wurden.

Zum ersten Mal konnte das Pathogen *C. fraxinea* mittels MALDI- und LC-ESI-MS *in-vitro* indirekt durch Sekundärmetaboliten rasch detektiert werden. Gleichzeitig wurde nachgewiesen, dass der Pilz bzw. die durch ihn gebildeten Metabolite wurzelwärts transportiert werden.

MS-high-throughput-fingerprinting kann je nach Anforderungen die teuren bzw. zeitaufwendigen mikrobiologischen / molekulargenetischen Nachweise des Pathogens sehr selektiv und effektiv ergänzen oder vollkommen ersetzen und im Rahmen von Resistenzprüfungen von Nachkommenschaften eingesetzt werden (da eine MALDI-MS- Untersuchung nur etwa 5 Minuten benötigt).

Zusammenfassung

Die dargestellten Beispiele belegen die Leistungsfähigkeit der *Non-Target*-Analytik, die sich durch eine sinnvolle Kombination sich ergänzender Analysetechniken erzielen lässt. Dabei kann die Kooperation verschiedener Laboratorien helfen, analytische Kompetenzen zu bündeln und instrumentelle Engpässe zu überwinden.

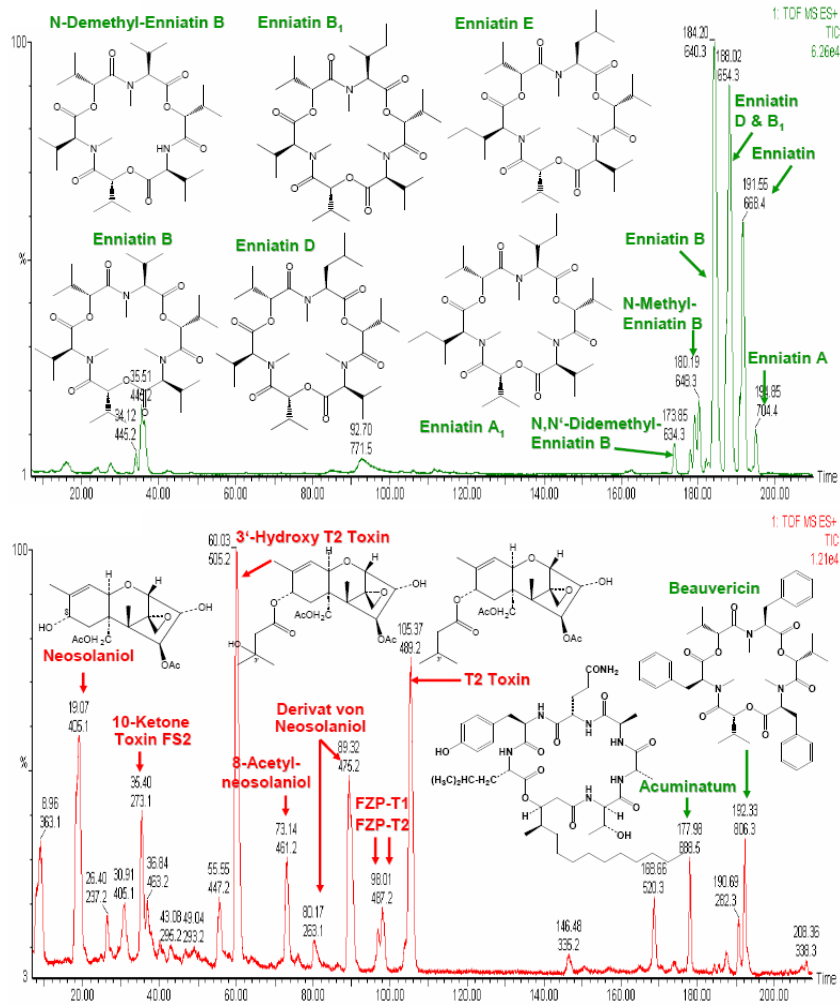


Abb. 5: Beispiel über Ergebnisse der LC-MS-Untersuchungen an *Fusarium*-Zellextrakten

Literatur

Friedlipartner AG, im Auftrag des Bundesamts für Gesundheit (BAG): Textilfarbstoffe: Inventar, Stoffdaten und Priorisierung verwendeter Substanzen, Zürich, 2009, www.friedlipartner.ch

Godejohann, M.; Tseng, L. H.; Braumann, U.; Fuchser, J.; Spraul, M.: Characterization of a paracetamol metabolite using on-line LC-SPE-NMR-MS and a cryogenic NMR probe. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1058 (1-2), 191-196.

Godejohann, M.; Heintz, L.; Daolio, C.; Berset, J.-D.; Muff, D.: Comprehensive non-targeted analysis of contaminated groundwater of a former ammunition destruction site using 1H-NMR and HPLC-SPE-NMR/TOF-MS. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, 43, 7055-7061.

Pham, L.H.; Vater, J.; Rotard, W.; Mügge, C.: Identification of secondary metabolites from *Streptomyces violaceoruber* TÜ22 by means of on-flow LC-NMR and LC-DAD-MS. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, 43 (9), 710-723.

Pham, L.H.; Weißhoff, H.; Zaspel, I.; Mügge, C.: Rapid identification of secondary metabolites from *Fusarium Sambucinum* by means of LC-PDA-Q-TOF-MS/MS and LC-UV-NMR (in preparation)

Pham, L.H.; Weisshoff, H.; Zaspel, I.; Muegge, C.: Identification of secondary metabolites from *Chalara fraxinea* - a new hyphomycete pathogen of ash decline in Europe (in preparation)

Preiss, A.; Elend, M.; Gerling, S.; Berger-Preiss, E.; Steinbach, K.: Identification of highly polar nitroaromatic compounds in leachate and ground water samples from a TNT-contaminated waste site by LC-MS, LC-NMR and off-line NMR and MS investigations. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 389 (6), 1979-1988.

Sandvoss, M.; Pham, L.H.; Levsen, K.; Preiss, A.; Muegge, C.; Wuensch, G.: Isolation and structural elucidation of steroid oligoglycosides from the starfish *Asterias rubens* by means of direct online LC-NMR-MS hyphenation and one- and two-dimensional NMR investigations. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**; 1253-1262.

Originalbeiträge

Zaspel, I.; Pham, L.H.; Krause, E.: Mycotoxin producing *Fusarium* species - the cause of primary stem canker of deciduous forest plants. *Acta Silv. Lign. Hung. Spec. Ed.*, **2007**, pp 253-256.

Korrespondenzadresse:

1/* Dr. T.L.H. Pham
Chemisches Zentrallabor des Instituts für Ökologie,
Technische Universität Berlin
Salzufer 12, D-10587 Berlin
Tel./Fax: 0049 30 31473532
E-Mail: lamhuong.pham@tu-berlin.de

Coautoren:

2/ H. Weisshoff , C. Mügge
AG NMR, Institut für Chemie,
Humboldt-Universität zu Berlin
Brook-Taylor-Str. 2, D-12489 Berlin
E-Mail: hardy.weisshoff@chemie.hu-berlin.de
E-Mail: muegge@chemie.hu-berlin.de

3/ E. Krause
Leibnitz-Institut für Molekulare Pharmakologie
Robert-Rössle-Str. 10, D-13125 Berlin-Buch
E-Mail: ekrause@fmp-berlin.de

4/ W. Rotard
FG Umweltchemie, Institut für Technischen
Umweltschutz, Technische Universität Berlin
Fasanenstrasse 1a, D-10623 Berlin
E-Mail: wolfgang.rotard@tu-berlin.de

5/ A. Preiss
Fraunhofer-Institut für Toxikologie und
Experimentelle Medizin
Nikolai-Fuchs-Str. 1, D-30625 Hannover
E-Mail: alfred.preiss@item.fraunhofer.de

6/ I. Zaspel
Institut für Forstgenetik (vTI),
Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald
und Fischerei
Eberswalder Chausee 3A, D-15377 Waldsiedersdorf
E-Mail: irmtraut.zaspel@vti.bund.de