



Effektorientierte Schadstoffdetektion in marinen Proben

vorgelegt von
Diplom-Ingenieurin
Natascha Michel

an der Fakultät III - Prozesswissenschaften -
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ferdi Hellweger

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Rotard

Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Hühnerfuss

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 9.12.21

Berlin 2022

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	1
Kurzfassung	3
Abstract	5
Symbolverzeichnis	7
Abkürzungen	9
1 Einleitung	11
1.1 Motivation	11
1.2 Zielsetzung	12
2 Grundlagen und Stand des Wissens	15
2.1 Festphasenextraktion	16
2.2 Chromatographie	17
2.2.1 Allgemeine Grundlagen	18
2.2.2 Hochleistungsdünnschichtchromatographie-HPTLC	20
2.2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-HPLC	24
2.3 Effektorientiertes Schadstoffscreening	26
2.3.1 Allgemeine Grundlagen	26
2.3.2 HPTLC und <i>A. fischeri</i>	27
2.3.3 Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen	28
2.4 Schadstoffscreening mittels Massenspektrometrie	30
2.4.1 Elektrospray-Ionisation	30
2.4.2 Quadrupol-Massenspektrometer	31
2.4.3 Massenauflösung und Massengenauigkeit	33
2.4.4 Messmodi und Screening-Strategien	35

3	Material und Methoden	39
3.1	Projekt I: Effektorientiertes Schadstoffscreening	39
3.1.1	Anzucht der <i>A. fischeri</i> -Bakterien	39
3.1.2	Vorreinigung der HPTLC-Platten	41
3.1.3	Probenapplikation	41
3.1.4	Gradientenentwicklung	41
3.1.4.1	Vorhandenes Verfahren	42
3.1.4.2	Optimiertes Verfahren	43
3.1.5	Beschichtung der HPTLC-Platten mit <i>A. fischeri</i>	45
3.1.5.1	Vorhandene Verfahren	45
3.1.5.2	Optimiertes Verfahren	45
3.1.6	Quantifizierung der Biolumineszenzhemmung	46
3.1.7	Kontrollstandard	47
3.1.7.1	Vorhandenes Verfahren	47
3.1.7.2	Optimiertes Verfahren	50
3.1.8	Probenanreicherung und Blindwerte	51
3.1.8.1	Vorhandenes Verfahren	51
3.1.8.2	Optimiertes Verfahren	53
3.1.8.3	Probenahme und Extraktion von Elbewasserproben . . .	53
3.1.8.4	Probenahme und Extraktion von Meerwasserproben . . .	54
3.1.9	Non-Target Screening HPLC-MS/MS	55
3.1.10	HPTLC-Platten Elution	56
3.1.10.1	Vorhandenes Verfahren	56
3.1.10.2	Optimiertes Verfahren	57
3.1.11	Eluentenauswahl für die RP-HPLC-MS	58
3.1.11.1	Vorhandenes Verfahren	58
3.1.11.2	Optimiertes Verfahren	58
3.1.12	MS-Scanmodus und Scanbereich	61
3.1.12.1	Scanmodus	61
3.1.12.2	Scanbereich	61
3.1.13	Peakdetektion	62
3.1.13.1	MZmine	62
3.1.13.2	Peak View 1.2	63
3.1.14	Plausibilitätsprüfung-Peakauswahl	63
3.2	Projekt II: Chemisch-analytisches Schadstoffscreening	66
3.2.1	Schadstoffidentifizierung	66

3.2.2	Fipronil und Transformationsprodukte	67
3.2.2.1	Elbewasser-Probenahme und -aufarbeitung	67
3.2.2.2	Nordseewasser-Probenahme und -aufarbeitung	68
3.2.2.3	Aale-Probenahme und -aufarbeitung	69
3.2.2.4	Quantifizierung und Qualitätssicherung	70
3.3	Projekt III: Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen	71
4	Ergebnisse und Diskussion	73
4.1	Projekt I: Effektorientiertes Schadstoffscreening	73
4.1.1	Reproduzierbarkeit	73
4.1.1.1	Eine <i>A. fischeri</i> -Kultur	73
4.1.1.2	Mehrere <i>A. fischeri</i> -Kulturen	79
4.1.1.3	Beurteilung der Reproduzierbarkeit	81
4.1.2	Konzentrations-Arbeitsbereich	82
4.1.2.1	HPTLC	82
4.1.2.2	<i>A. fischeri</i> -Detektion	87
4.1.2.3	Non-Target Screening	93
4.1.3	Zwischenfazit	95
4.1.4	Identifizierung toxischer Substanzen	96
4.1.4.1	Meerwasserproben	96
4.1.4.2	Elbe-Hochwasserproben	99
4.1.4.3	Elbewasserproben	103
4.1.5	Verfahrensbeurteilung	111
4.2	Projekt II: Chemisch-analytisches Schadstoffscreening	112
4.2.1	Identifizierte Schadstoffe	112
4.2.2	Fipronil und Fipronil-Transformationsprodukte	117
4.2.2.1	Elbewasser	119
4.2.2.2	Nordseewasser	122
4.2.2.3	Aalproben	123
4.2.2.4	Toxizitätsbewertung	125
4.3	Projekt III: Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen	126
4.3.1	Blindwertproblematik	127
4.3.2	Verfahrensbeurteilung	131
5	Fazit und Ausblick	133
	Literaturverzeichnis	139

Abbildungsverzeichnis	153
Tabellenverzeichnis	159
Anhang	163
1 Projekt I	163
1.1 Reproduzierbarkeit <i>A. fischeri</i> -Detektion	163
1.2 Konzentrations-Arbeitsbereich	166
1.2.1 <i>A. fischeri</i> -Detektion	166
1.2.2 Non-Target Screening	169
2 Projekt II Chemisch-analytisches Schadstoffscreening	172
2.1 Identifizierte Schadstoffe	172
2.2 Elbewasser	175
2.3 Fipronil und Fipronil-Transformationsprodukte	176
2.4 Aalproben	178
2.5 Toxizitätsbewertung	180

Danksagung

Vielen Menschen ist es zu verdanken, dass ich die Promotion vollenden konnte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Rotard, meinem Doktorvater, für die Betreuung der Doktorarbeit, die konstruktiven fachlichen Gespräche und die unendliche Geduld, welche mir während der Promotionszeit entgegen gebracht wurde. Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dr. Hellweger für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und bei Prof. Dr. Heinrich Hühnerfuss für die Übernahme der Zweitkorrektur bedanken.

Dr. Ulrike Kammann sei für die Leitung des Projektes *MERIT-MSRL* gedankt, in dessen Rahmen die Promotion überhaupt erst geschrieben werden konnte. Den Mitgliedern des Thünen-Instituts danke ich für die kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Besonders bedanken möchte ich mich bei allen Angestellten des Labors des Bundesamtes für Seefahrt und Hydrographie für die schöne und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre. Ein besonderer Dank gilt hierbei Wolfgang Gerwinski für die wertvolle Unterstützung und die Möglichkeit mich jederzeit mit Fragen an ihn wenden zu können. Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Dr. Norbert Theobald für das Einbringen seines sachkundigen Wissens besonders in den Erstentwurf der Doktorarbeit.

Meiner Familie kann ich für ihre Unterstützung und Ermutigung in dieser langen Zeit gar nicht genug danken! Vom ganzen Herzen danke ich meinem Partner Janusz, der mich von Anfang bis Ende, über Berge und durch Täler begleitet, ermutigt und unterstützt hat! Unserem Sohn Jan danke ich ebenfalls vom ganzen Herzen, dass er mich in dieser komplexen Welt die wirklich wichtigen Dinge im Leben erkennen lässt! Wie schön, dass es euch gibt!

Kurzfassung

Mit dem Inkrafttreten der Europäischen Meeresstrategie-Rahmenrichtlinie im Juli 2008 und der darin zum Thema Schadstoffe enthaltenden Forderung des Deskriptors 8, dass sich aus den Konzentrationen an Schadstoffen keine Verschmutzungswirkung ergeben darf, wird sowohl eine umfassende Bestandsaufnahme der in der Meeresumwelt vorzufindenden Schadstoffe als auch eine fundierte Bewertung von deren Wirkung auf Meeresorganismen notwendig.

Das Hauptanliegen dieser Arbeit war es, für die Meeresumwelt relevante organische Schadstoffe zu ermitteln, welche noch nicht im Rahmen eines regelmäßigen Monitoring-Programms überwacht werden. Die Detektion toxisch wirkender Substanzen erfolgte hierbei effektorientiert, mittels einer Kombination aus Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC)-Probenauftrennung und anschließender *A. fischeri*-Detektion. Die HPTLC-Methode wurde hierfür bezüglich Probenaufgabe und -entwicklung optimiert. Die als toxisch detektierten Substanzen wurden anschließend im Rahmen eines Non-Target Screenings mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Massenspektrometrie (MS) Analytik analysiert, um diese nach Möglichkeit zu identifizieren. Die identifizierten Schadstoffe sollten daraufhin eine erste Toxizitätsbewertung, basierend auf zu ermittelnden Dosis-Wirkungs-Beziehungen, durchlaufen, wofür ebenfalls die Kombination aus HPTLC und *A. fischeri*-Detektion eingesetzt werden sollte.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass, trotz der sehr guten Reproduzierbarkeit des Testsystems, ein Effektorientiertes Schadstoffscreening mittels der Kombination aus HPTLC und *A. fischeri*-Detektion für komplexe Umweltproben nur bedingt geeignet ist und das Testsystem besser für ein Monitoring in Form von Probenvergleichen über einen bestimmten Zeitraum hinweg eingesetzt werden sollte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein chemisch-analytisches Non-Target Screening zur Identifizierung von Schadstoffen mittels der Kombination HPTLC-HPLC-MS/MS effizienter gegenüber einem reinen HPLC-MS/MS Non-Target Screening ist, da Matrixeffekte reduziert und weiterhin zusätzliche Stoffinformationen erhalten werden. Entsprechend kann eine effektivere Eingrenzung an Substanzen erfolgen, welche für weiterführende Identifizierungsversuche herangezogen werden sollen. Hierdurch konnten neun für die aquatische Umwelt relevante organische Schadstoffe identifiziert werden. In diesem Zusammenhang wurden erstmalig das Insektizid Fipronil und zwei seiner Transformationsprodukte in Elbe- und Nordseewasser sowie in aus der Elbe entnommenen Aalen nachgewiesen und quantitativ erfasst. Bezüglich der Bewertung von Schadstoffen mit Hilfe des Testsystems wird dessen Potential in der Bestimmung relativer Toxizitäten gesehen.

Unter der Voraussetzung zukünftiger Optimierungsarbeiten, stellt das hier verwendete Testsystem eine sinnvolle Ergänzung zum allgemeinen Schadstoffmonitoring dar, um Schadstoffe in der Umwelt zu erfassen und einer ersten Bewertung zu unterziehen.

Abstract

The Marine Strategy Framework Directive which came into force in July 2008 requires in its descriptor 8 regarding the pollution of marine waters by chemical contaminants that contaminants have to be “at a level not giving rise to pollution effects“. Respectively, a substantial survey of contaminants occurring in the marine environment as well as assessing their impacts on marine organisms is necessary.

The initial main objective of this study was to identify organic contaminants relevant for the marine environment which are not yet included into regular monitoring programs. Therefore, the detection of toxic substances was supposed to be realized with an effect-directed test system using a combination of High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) separation of samples and *A. fischeri*-detection of toxic substances. The HPTLC-method was optimized regarding sample application and sample development. Identification of toxic substances was done by Non-Target Screening using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Mass spectrometry (MS) analysis. Afterwards, the identified substances were supposed to undergo an initial toxicity assessment in terms of dose-response-relationships by using the same test system.

Based on the experiments that were conducted in this study it could be concluded that an effect-directed screening for organic contaminants with the combination of HPTLC and *A. fischeri*-detection is not suited for complex environmental samples, even if the reproducibility of the test system was found to be very good. The application of the test system for a monitoring concept in form of sample comparison over a certain period of time seems, therefore, to be more promising. Furthermore, it could be shown that a Non-target chemical analysis by HPTLC-HPLC-MS/MS is more efficient than a Non-Target Screening by HPLC-MS/MS only, as matrix effects are reduced and additional substance data are gained. As a result the selection of substances for further identification experiments becomes more efficient. Thus, nine organic contaminants relevant for the aquatic environment could be identified. In this context for the first time the insecticide Fipronil and two of its transformation products were detected and quantitatively determined in water samples of the North Sea and the river Elbe as well as in eels collected from the river Elbe. Regarding the toxicity assessment of contaminants with the effect-directed test system its potential is seen in determining relative toxicities.

Further optimizing developments provided, the test system would usefully complement the regular monitoring programs in detecting and initially assessing environmental contaminants.

Symbolverzeichnis

H	Biolumineszenzhemmung	[%]
\bar{H}	Mittelwert der Biolumineszenzhemmungen	[%]
m	Masse	[Da]
R	Massenauflösung	[-]
R _f	Retentionsfaktor	[-]
t _R	Retentionszeit	[min]
z	Betrag der Ladungszahl	[-]

Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
A. fisheri	Aliivibrio fisheri
ACN	Acetonitril
AMD	Automated Multiple Development
BHT	Butylhydroxytoluol
BSH	Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie
BW	Blindwert
CE	Kollisions Energie
DCM	Dichlormethan
DMG	Dimethylgelb
EC	Effekt-Konzentration
EMS	Enhanced Mass Spectra
EPI	Enhanced Product Ion
ESI	Elektrospray-Ionisation
EU-MSRL	Europäische-Meeresstrategie-Rahmenrichtlinie
EU-WRRL	Europäische Wasserrahmenrichtlinie
FG	Fettgewicht
GC	Gaschromatographie
HELCOM	Helsinki-Kommission
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
KOW	n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
LOD	Nachweisgrenze
LOQ	Bestimmungsgrenze
m/z	Masse-zu-Ladungs Verhältnis
MCPA	2-Methyl-4-chlorphenoxyessigsäure
MeOH	Methanol
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert

Abkürzungen

NaOH	Natriumhydroxid
NG	Nassgewicht
NP	Normalphase
OSPAR	Oslo-Paris-Abkommen
PFBA	Perfluorbutansäure
PFBS	Perfluorbutansulfonsäure
PFDA	Perfluordecansäure
PFDoA	Perfluordodecansäure
PFHpA	Perfluorheptansäure
PFHpS	Perfluorheptansulfonsäure
PFHxA	Perfluorhexansäure
PFHxS	Perfluorhexansulfonsäure
PFNA	Perfluornonansäure
PFOA	Perfluoroctansäure
PFOS	Perfluoroctansulfonsäure
PFPA	Pentafluorpropionsäure
PFTeDA	Perfluortetradecansäure
PFTTrDA	Perfluortridecansäure
PFUdA	Perfluorundecansäure
Qtrap	Ionenfalle
RP	Umkehrphase
S/N	Signal-Rausch Verhältnis
SPE	Festphasenextraktion
STAW	Standardabweichung
TIC	Total Ion Chromatogram
VK	Variationskoeffizient
WDF	Wiederfindung
XIC	Extracted Ion Chromatogram

1 Einleitung

1.1 Motivation

In die Meeresumwelt der Nord- und Ostsee werden organische Schadstoffe über Flüsse, atmosphärische Deposition, den allgemeinen Schiffsverkehr oder die kommerzielle Nutzung der Meere wie bspw. durch Errichtung und Betrieb von Öl- und Gasförderplattformen als auch Windkraftanlagen eingetragen. Zur Zeit werden etwa 100 dieser organischen Schadstoffe aufgrund gesetzlicher Vorgaben wie denen des Oslo-Paris-Abkommens (OSPAR), der Helsinki-Kommission (HELCOM) und der Europäischen Wasserrahmenrichtlinie (EU-WRRL) in Form eines regelmäßigen Monitorings überwacht [26] [52]. Bei der großen Anzahl an Substanzen, die gegenwärtig in die Umwelt gelangen [111], ist es jedoch offensichtlich, dass hierdurch nur ein kleiner Anteil an Schadstoffen Beachtung findet und mit zugehörigen Grenzwerten versehen ist. Entsprechend zeigen die vergangenen Jahre, dass eine Vielzahl von umweltrelevanten, organischen Schadstoffen in der marinen Umwelt anzutreffen ist, deren Konzentrationen jedoch für die Meeresumwelt keine gesetzlichen Regelungen aufweisen [9, 11, 38, 86, 87]. Mit dem Inkrafttreten der Europäischen Meeresstrategie-Rahmenrichtlinie (EU-MSRL) im Juli 2008 und der darin zum Thema Schadstoffe enthaltenden Forderung des Deskriptors 8, dass sich aus den Konzentrationen an Schadstoffen keine Verschmutzungswirkung ergeben darf [27], resultieren die grundsätzlichen Fragestellungen:

1. Welche Schadstoffe liegen in welchen Konzentrationen in der marinen Umwelt vor?
2. Welche Grenzwerte müssen für die entsprechenden Schadstoffe gelten, damit eine Verschmutzungswirkung ausbleibt?

Die Beantwortung der Fragen fordert sowohl eine umfassende Bestandsaufnahme der in der Meeresumwelt vorzufindenden Schadstoffe als auch eine fundierte Bewertung von deren Wirkung auf Meeresorganismen. Hierfür können verschiedene Verfahren eingesetzt werden. Neben einem chemisch-analytischen Schadstoffscreening mit anschließender Toxizitätsbewertung können ebenfalls Effektorientierte Testsysteme zum Einsatz kommen, mit denen Schadstoffe in den zu untersuchenden Proben (Wasser-, Sediment- und Biota-proben) detektiert werden können, die den zu untersuchenden Effekt wie bspw. generelle

Toxizität oder östrogene Wirkung hervorrufen.

1.2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, für die marine Umwelt relevante Schadstoffe, welche noch nicht im Rahmen eines regelmäßigen Monitorings überwacht werden, ausfindig zu machen. Für die Detektion toxischer Substanzen kam hierfür ein Effektorientiertes Testsystems bestehend aus einer Kombination aus Hochleistungsdünnschichtchromatographie HPTLC und Leuchtbakterien (*Aliivibrio fischeri*)-Detektion zum Einsatz. Die Identifizierung der toxisch wirkenden Substanzen erfolgte im Anschluss mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Massenspektrometrie (MS) Analytik. Die Anwendung des Testsystems wurde hierbei so gestaltet werden, dass es ergänzend in das bereits vorhandene Monitoring-Programm des Bundesamtes für Seeschifffahrt und Hydrographie (BSH) ¹ zur Überwachung von Schadstoffen integriert werden kann. Entsprechend galt es, eine geeignete Methode zu entwickeln, zu prüfen und diese für Proben, welche im Rahmen des BSH-Monitorings genommen wurden, anzuwenden. Weiterhin sollten mit diesem Testsystem Dosis-Wirkungs-Beziehungen von ausgewählten Schadstoffen abgeleitet werden, um eine erste Grundlage für die Bewertung von Schadstoffen zu schaffen. Der Schwerpunkt der Schadstoffdetektion lag auf der Untersuchung von Meerwasserproben aus der Nordsee (Deutsche Bucht). Basierend auf den hieraus gewonnenen Ergebnissen sowie aufgrund des Elbe-Hochwasserereignisses im Juni 2013 wurden die Untersuchungen von Elbewasserproben mit in die Arbeit aufgenommen. Aus den hierfür durchgeführten Versuchen ergaben sich insgesamt drei große Themenkomplexe:

Projekt I: Effektorientiertes Schadstoffscreening

Die Detektion toxischer Substanzen erfolgte nach der dünnschichtchromatischen Auftrennung der zu untersuchenden Probenextrakte mit Hilfe von Leuchtbakterien (*Aliivibrio fischeri*) auf Dünnschichtchromatographieplatten [36]. Neben der eigentlichen Anwendung auf Umweltproben war es zuvor das Ziel, die Reproduzierbarkeit sowie den Konzentrations-Arbeitsbereich des Testsystems zu bestimmen sowie Standards zur Überprüfung der Ergebnisqualität einzuführen. Hierfür waren eine vorausgehende Methodenentwicklung und -optimierung, welche zum Teil auf den methodischen Vorgaben des Betriebs- und Forschungslabors der Landeswasserversorgung Wasserwerk Langenau (siehe Kapitel 3 Material und Methoden) basierten, erforderlich. Eine Entwicklung und

¹Die Routineüberwachung von ca. 100 organischen Substanzen in der Deutschen Bucht erfolgt bis zu viermal im Jahr.

Optimierung erfolgte für die Verfahrensschritte:

- (1) Probenanreicherung
- (2) HPTLC-Probenentwicklung
- (3) HPTLC-Plattenbeschichtung mit *A. fischeri*
- (4) Qualitätskontrolle
- (5) Extraktion toxischer Substanzen für die anschließende Identifizierung.

Im Anschluss an die Detektion toxischer Substanzen in einer Probe sollten diese identifiziert werden. Der Schwerpunkt lag hierbei auf der HPLC-MS/MS Analytik in Form eines Non-Target Screenings. Das Ziel war es, die Messbedingungen so zu wählen, dass möglichst alle potentiellen Substanzen erfasst werden und dass für die nachfolgende Auswertung ein möglichst hohes Signal-Rausch-Verhältnis der Analyten erzielt wird. Entsprechend wurde der Einfluss des Eluenten sowie der verschiedener Scanmodi und Scanbereiche auf die Signalqualität untersucht. Die Auswertung der Scandaten erfordert sowohl eine fehlerfreie Peakdetektion als auch die Möglichkeit einen „Blindwertabzug“ durchzuführen. Hierfür wurde die Qualität der Peakdetektion zweier Softwareprogramme miteinander verglichen. Die Peakdetektion im Rahmen eines Non-Target Screenings hat ein hohes Datenaufkommen in Form einer hohen Anzahl an detektierten Substanzen (Peakliste) zur Folge. Für weiterführende Untersuchungen der detektierten Substanzen war es demnach nötig, das Datenaufkommen sinnvoll einzugrenzen. Hierfür sollte eine entsprechende Methode gefunden werden, welche es ermöglicht, die Anzahl der detektierten Substanzen für weiterführende Identifizierungsversuche zu reduzieren.

Projekt II: Chemisch-analytisches Schadstoffscreening

Basierend auf den aus dem Projekt I gewonnenen Ergebnissen wurde entschieden, das Non-Target Schadstoffscreening mittels der Kombination aus HPTLC-HPLC-MS/MS durchzuführen. Hierfür wurde die im Projekt I entwickelte Methode im Wesentlichen beibehalten, die Detektion der Toxizität der zu untersuchenden Proben mit Hilfe von Leuchtbakterien wurde jedoch nicht mehr vorgenommen. Das Ziel im Rahmen des Projektes II bestand darin, die eingesetzte Methode weiter zu optimieren und für die aquatische Umwelt relevante Schadstoffe, welche noch nicht regelmäßig durch das BSH-Monitoring-Programm überwacht werden, auffindig zu machen und diese in Nordsee- und Elbewasser- als auch in Biotaprobe quantitatativ zu erfassen. Abschließend sollte

die Effizienz des eingesetzten Testsystems für die Identifizierung von Schadstoffen bewertet und mit der Effizienz eines chemisch-analytischen Schadstoffscreenings verglichen werden.

Projekt III: Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Neben einer Identifizierung von Schadstoffen sollte die Kombination aus HPTLC und *A. fischri*-Detektion ebenfalls für eine erste Bewertung von Schadstoffen, in Form einer Bestimmung von EC-Werten (Effekt-Konzentrationen) eingesetzt werden. Hierbei werden nach Schulz et al. [101] definierte Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz in Form von Flächen auf die HPTLC-Platte aufgetragen. Nach der anschließenden Detektion der Biolumineszenzhemmung können analog zum klassischen Leuchtbakterien-Küvettest [32] Dosis-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden. Das Ziel lag hierbei in der Optimierung des Testdesigns und des Testverfahrens, der Einführung von Qualitätskontrollen sowie der Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen der aus den Projekten I und II ermittelten Schadstoffe.

2 Grundlagen und Stand des Wissens

Das Schadstoffscreening bildet die Grundlage, um Schadstoffe gezielt zu überwachen, deren Verhalten in der Umwelt zu untersuchen sowie für die Umwelt relevante Schadstoffe ausfindig zu machen. Hierfür kommen eine Vielzahl an chemisch-analytischen Verfahren zum Einsatz. Für die genannten Anwendungsgebiete stellt die mit chromatographischen Trennverfahren, wie der Hochleistungsflüssigkeits- und Gaschromatographie (GC), gekoppelte Massenspektrometrie (MS) die beste Möglichkeit dar, Schadstoffe qualitativ und quantitativ nachzuweisen sowie deren chemische Struktur aufzuklären [73]. Aussagen über die Auswirkungen von Schadstoffen auf die betroffenen Umweltkompartimente können mit dieser rein chemisch-analytischen Methode allerdings nicht getroffen werden. An diesem Punkt setzt das sogenannte Effektorientierte Schadstoffscreening an. Bei diesem Verfahren wird davon ausgegangen, dass nicht alle Substanzen in einer Umweltprobe einen toxischen Effekt besitzen, sondern nur bestimmte Fraktionen für toxische Effekte verantwortlich sind. Je nach zu beantwortender Fragestellung werden der eigentlichen Schadstoffidentifizierung Toxizitätstests vorangestellt, um gezielt die toxisch wirkenden Fraktionen ausfindig zu machen und damit die Identifizierung von Schadstoffen auf ein Wesentliches zu beschränken. Der zum Einsatz gekommene Toxizitätstest kann anschließend mit Hilfe von Standardsubstanzen verwendet werden, um gezielt Dosis-Wirkungs-Beziehungen eines Schadstoffes abzuleiten.

Im folgenden Kapitel 2.1 werden die Grundlagen und der Stand der Technik für die in dieser Arbeit eingesetzte Probenaufarbeitung mittels Festphasenextraktion und die eingesetzten Verfahren zur chromatographischen Probenaufreinigung mittels Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) beschrieben und erläutert. Weiterhin werden die Grundlagen bezüglich der Schadstoffbewertung anhand von Dosis-Wirkungs-Beziehungen beschrieben.

Im darauffolgenden Kapitel 2.3 werden die Grundlagen und der Stand der Forschung für das Effektorientierte-Schadstoffscreening und dem im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Testsystem bestehend aus der Probenfraktionierung mittels HPTLC und anschließender Detektion von toxisch wirkenden Substanzen mit Hilfe von Leuchtbakterien (*Aliivibrio fischeri*) beschrieben und erläutert.

Das sich anschließende Kapitel 2.4 beschreibt die Grundlagen und den Stand der Technik

der Massenspektrometrie sowie deren Anwendung für unterschiedliche Schadstoffscreening-Strategien.

2.1 Festphasenextraktion

Die meisten Umweltproben können nicht direkt auf ihren Schadstoffgehalt hin untersucht werden, da deren Schadstoffkonzentrationen zu gering sind und/oder die Probenmatrix für das verwendete Messverfahren ungeeignet ist. Entsprechend bedarf es vor der eigentlichen Schadstoffanalyse einer Probenaufarbeitung, um die zu messenden Schadstoffe von der Probenmatrix zu trennen und anzureichern. Bei einer Festphasenextraktion (SPE) wird eine Flüssigkeit durch ein meist pulverförmiges Sorbensmaterial geleitet. Substanzen, welche in der Flüssigkeit gelöst vorliegen, treten hierdurch in Wechselwirkung mit dem Sorbensmaterial und können somit von dem Sorbens zurückgehalten und aus der Flüssigkeit entfernt werden. Je nach verwendetem SPE-Material werden unterschiedliche Arten von Wechselwirkungen für die Extraktion von Substanzen genutzt. Eines der gängigsten SPE-Materialien ist das Silicagel, welches durch seine an der Oberfläche befindlichen Silanol (-Si-OH) - oder Silandiol (-Si(OH)₂)-Gruppen polare Analyten durch Wasserstoffbrücken-Bindungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen aus dem flüssigen Medium entfernen und damit anreichern kann [92]. Die SPE mit Silicagel wird als Normalphasen (NP-Normal Phase)-Extraktion bezeichnet. Erfolgt eine Modifizierung des Silicagels dahingehend, dass die Silanolgruppen durch langkettige Alkylreste, meistens C8 oder C18 Ketten, ersetzt werden, so wird diese Art des Silicagels als Umkehrphase (RP-Reversed Phase) bezeichnet. Aufgrund der hierdurch entstandenen unpolaren Oberfläche des Silicagels adsorbieren im Vergleich zu dem Normalphasen-Silicagel überwiegend unpolare Substanzen. Die Adsorption der Analyten an das RP-Silicagel basiert hierbei auf den Van-der-Waals-Kräften [1]. Die Extraktion von Analyten über einen weiteren Polaritätsbereich lässt sich mit SPE-Materialien erzielen, welche eine Mischung aus sowohl unpolaren als auch polaren funktionellen Gruppen aufweisen. Eine sehr gute Extraktionsleistung über einen weiten Polaritätsbereich wird durch die hierfür häufig verwendeten Polymermaterialien wie bspw. dem Styrendivinylbenzol-Copolymer erzielt. Solche organischen SPE-Materialien weisen eine große Oberfläche (meist > 700 m²/g) auf, wodurch die Extraktionsleistung stark erhöht wird. Zusätzlich können polarere Analyten durch die aromatischen Verbindungen des Polymers aufgrund von π - π -Wechselwirkungen verstärkt an dem SPE-Material adsorbiert werden [54, 2]. Abbildung 2.1 zeigt den Ablauf einer SPE, welcher sich in dem meisten Fällen aus vier Arbeitsschritten zusammensetzt: Zu Anfang wird das SPE-Material mit einem ge-

eigneten Lösemittel gespült, um prozessbedingte Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wird das SPE-Material konditioniert, um eine vollständige Benetzung des SPE-Materials mit der zu extrahierenden Probe sicherstellen zu können (1). Im zweiten Schritt (2) erfolgt die Probenaufgabe. Analyten, welche eine hohe Affinität gegenüber dem SPE-Material aufweisen, adsorbieren an dessen Oberfläche und werden aus dem flüssigen Medium extrahiert. Da es sich hierbei nicht um eine analytspezifische Adsorption handelt, werden ebenfalls potentielle Störsubstanzen (Matrix), welche sich in der Probe befinden können, mit extrahiert. Im folgenden Arbeitsschritt (3) wird das SPE-Material mit einem Lösemittel gespült, um einen möglichst großen Teil der mit angereicherten Matrix zu entfernen. Vor der Elution des Analyte (4) von der Festphase wird das SPE-Material mit Hilfe eines Luft- oder Stickstoffstroms getrocknet. Die Elution erfolgt mit einem geeigneten Lösemittel und beträgt analytabhängig etwa das Vier- bis Achtfache des Volumens des verwendeten SPE-Materials [84]. Der somit gewonnene Extrakt kann im Anschluss optional eingengt werden, um die Konzentration des Analyten im Extrakt für die eigentliche Analyse weiter zu erhöhen.

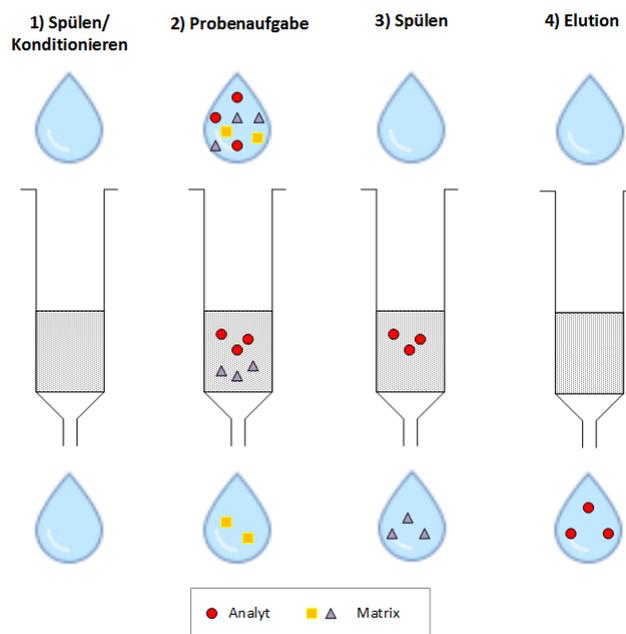


Abbildung 2.1 Arbeitsschritte einer SPE (verändert nach [2]).

2.2 Chromatographie

Der Begriff der Chromatographie geht auf die Versuche des Botanikers Michail Semjonowitsch Tswett (1872–1919) zurück, welcher einen Chlorophyllextrakt durch eine mit

Inulin gefüllte Glassäule leitete und damit eine Trennung der Extraktbestandteile erzielte. Entsprechend werden unter dem Begriff Chromatographie Verfahren zusammengefasst, mit denen Substanzen eines Gemisches voneinander getrennt werden können. Seit den Anfängen der Chromatographie hat sich eine Vielzahl an Verfahren entwickelt, von denen die

- Dünnschichtchromatographie,
- Flüssigkeitschromatographie,
- Gaschromatographie,
- Gel-Permeations-Chromatographie

zu den gängigsten Chromatographieverfahren zählen [58, 74]. Im Folgenden werden die allgemeinen Grundlagen chromatographischer Verfahren beschrieben sowie die für diese Arbeit relevanten Verfahren der Dünnschicht- und Flüssigkeitschromatographie genauer erläutert.

2.2.1 Allgemeine Grundlagen

Allen chromatographischen Trennverfahren gemein ist, dass sich die zu trennenden Substanzen in einer mobilen Phase befinden, welche über oder durch eine stationäre Phase geleitet wird. Die mobile Phase kann flüssig oder gasförmig sein, die stationäre Phase fest oder flüssig. Die Substanzen der mobilen Phase treten hierbei in Wechselwirkung mit der stationären Phase und werden daraufhin entlang der Auftrennstrecke unterschiedlich stark retardiert, wodurch die erwünschte Substanztrennung erzielt werden kann. Die Trennleistung des Chromatographieverfahrens kann über die Anzahl der theoretischen Böden N ausgedrückt werden. Als ein theoretischer Boden wird hierbei die Einstellung eines Gleichgewichtes einer Substanz zwischen der mobilen und der stationären Phase bezeichnet. N ist demnach definiert als der Quotient der Trennstreckenlänge L und der Höhe H der theoretischen Böden (siehe Gleichung 2.1) [58].

$$N = \frac{L}{H} \quad (2.1)$$

Die Bodenhöhe H beeinflussenden Faktoren werden durch die van-Deemter-Gleichung beschrieben (siehe Gleichung 2.2).

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_m + C_s) \cdot u \quad (2.2)$$

wobei

$$A = 2 \cdot \lambda \cdot d_p \quad (2.3)$$

$$B = 2 \cdot \gamma \cdot D_m \quad (2.4)$$

$$C_m = \frac{d_p^2 \cdot \omega}{D_m} \quad (2.5)$$

$$C_s = \frac{d_p^2 \cdot q \cdot k}{D_s \cdot (k + 1)} \quad (2.6)$$

mit

d_p = Partikeldurchmesser

λ = statistische Unregelmäßigkeit der Packung

γ = Labyrinthfaktor der Porenkanäle

D_m = Diffusionskoeffizient in der mobilen Phase

ω = Partikelpackungsfaktor

q = Konfigurationsfaktor

D_s = Diffusionskoeffizient in der stationären Phase

k = Retentionsfaktor

Der A-Term der Gleichung 2.2 wird als Eddy- bzw. Streudiffusionsterm bezeichnet. Er beschreibt den Einfluss auf die Bodenhöhe H aufgrund von unterschiedlich langen Wegen, welche Analyten durch eine gepackte stationäre Phase zurücklegen müssen sowie deren verzögerter Massentransfer aufgrund unterschiedlicher linearer Strömungsverhältnisse zwischen den Partikeln der stationären Phase. Die Größe des A-Terms ist unabhängig von der linearen Strömungsgeschwindigkeit u der mobilen Phase und ist abhängig von der Packungsdichte der stationären Phase, der Partikelgröße und der Partikelgrößenverteilung [79, 74, 51].

Der B-Term beschreibt die molekulare Longitudinal-Diffusion der Analyten, d.h. deren Diffusion in der mobilen Phase entlang und gegen die Strömungsrichtung. Entsprechend hängt der B-Term vom Diffusionskoeffizienten des Analyten für die mobile Phase ab. Der Einfluss des B-Terms nimmt mit steigender Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase ab [102, 51].

Die zufällige radiale Diffusion der Analyten in der mobilen Phase sowie deren Diffusion in die stationäre Phase wird jeweils durch die Terme C_m und C_s beschrieben. In

beiden Fällen wird hierdurch der Weitertransport der Analyten mit der mobilen Phase verzögert, was zu einer Vergrößerung der Bodenhöhe führt. Dieser Effekt nimmt mit steigender Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase zu. Die Terme C_m und C_s sind umgekehrt proportional des jeweiligen Diffusionskoeffizienten des Analyten sowie proportional des Partikeldurchmessers zum Quadrat der stationären Phase. [79]. Hierbei ist der Einfluss des C_s -Terms größer als C_m , da $D_s \ll D_m$ ist. Abbildung 2.2 zeigt die grafische Darstellung der Van-Deemter-Gleichung sowie die Einflüsse der einzelnen Terme. Aus Abbildung 2.2 wird ersichtlich, dass die geringste Trennstufenhöhe durch den Tiefpunkt der Kurve, welche sich durch die Aufsummierung der einzelnen Terme ergibt, repräsentiert wird. Hieraus ergibt sich entsprechend die optimale Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase [79, 74, 51].

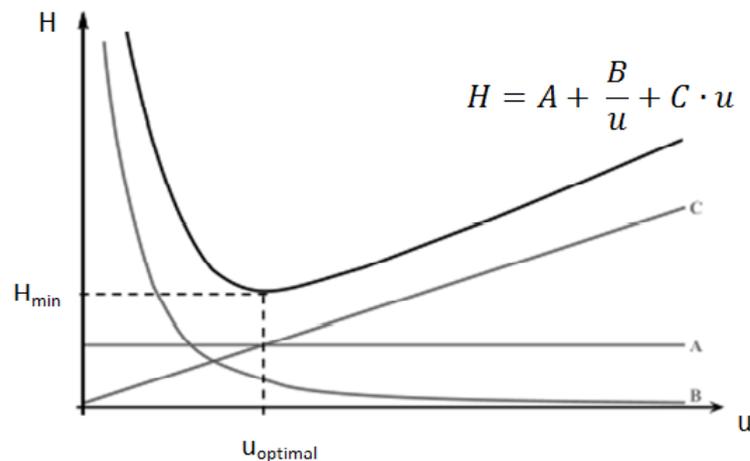


Abbildung 2.2 Grafische Darstellung der Van-Deemter-Gleichung

2.2.2 Hochleistungsdünnschichtchromatographie-HPTLC

Die Dünnschichtchromatographie (TLC-Thin Layer Chromatography) ist ein altes und etabliertes Verfahren zum Abtrennen von Stoffen aus Stoffgemischen. Hierbei wird die Probe auf eine stationäre Phase, welche auf einer Glasplatte, Aluminium- oder Kunststoffolie fixiert ist, aufgetragen und mit Hilfe einer mobilen Phase, welche aufgrund von Kapillarkräften die stationäre Phase durchläuft, getrennt. Als stationäre Phase wird in der Dünnschichtchromatographie meist ein NP-Silicagel verwendet. Modifizierte Silicagel-Formen wie bspw. das RP-Silicagel sind ebenfalls erhältlich. Basierend auf der Polarität der zu trennenden Stoffe wird die mobile Phase gewählt [105, 91]. Die Van-Deemter-Gleichung (Gleichung 2.2) geht von einer konstanten Fließgeschwindigkeit

der mobilen Phase aus. Da bei der Dünnschichtchromatographie die Fließgeschwindigkeit von den Kapillarkräften abhängt, nimmt diese mit steigender Entwicklungshöhe ab. Dieses kann mit Hilfe des DC-Fließgesetzes beschrieben werden [47, 102]:

$$z_F = \sqrt{(\kappa \cdot t)} \quad (2.7)$$

mit

$$\kappa = 2 \cdot k_0 \cdot d_p \cdot \frac{\sigma}{\eta} \cdot \cos \theta \quad (2.8)$$

und

z_F = Entfernung der Fließmittelfront vom Eintauchpegel [cm]

κ = Fließkonstante [cm^2/s]

t = Laufzeit für die Strecke z_F [s].

k_0 = Permeabilitätskonstante

d_p = Partikeldurchmesser [cm]

σ = Oberflächenspannung des Laufmittels [N/m]

η = dynamische Viskosität des Laufmittels [$\text{Pa} \cdot \text{s}$]

θ = Kontaktwinkel

Hieraus ist ersichtlich, dass mit zunehmender Strecke der Laufmittelfront die dafür benötigte Zeit stark zunimmt. Die auf die Geschwindigkeit der Lösemittelfront Einfluss nehmenden Parameter sind der Partikeldurchmesser der stationären Phase sowie die physikalischen Eigenschaften des Laufmittels. Die Bodenhöhe bestimmenden Parameter können durch für an die Dünnschichtchromatographie angepasste Van-Deemter-Gleichung beschrieben werden [98]:

$$H = 2 \cdot \lambda \cdot d_p + 2 \cdot \gamma \cdot D_m \cdot \frac{z_F}{\kappa} + \frac{\omega \cdot d_p \cdot \kappa}{D_s \cdot 2 \cdot z_F} \cdot \ln \frac{z_F}{z_0} \quad (2.9)$$

mit

H = theoretische Bodenhöhe [cm]

λ = Homogenität der Packung

d_p = Partikeldurchmesser [cm]

γ = Labyrinthfaktor

D_m = Diffusionskoeffizient des Analyten in der mobilen Phase [cm^2/s]

z_F = Entfernung der Fließmittelfront vom Eintauchpegel [cm]

κ = Fließkonstante [cm^2/s]

ω = Partikelpackungsfaktor radiale Diffusion [1/cm]

D_s = Diffusionskoeffizient des Analyten in der stationären Phase [cm²/s]

z_0 = Strecke zwischen Eintauchpegel und Startlinie [cm]

Durch verbesserte Herstellungsverfahren der Dünnschichtchromatographieplatten konnten die die theoretische Bodenhöhe bestimmenden Parameter optimiert werden. Hierzu zählen vor allem kleinere Partikeldurchmesser, schmalere Korngrößenverteilung und reduzierte Schichtdicken, welche zu einer Verkleinerung der Terme A, B und C der Van-Deemter-Gleichung führen. Entsprechend wird hierbei von der Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC-High Performance Thin Layer Chromatography) gesprochen [98]. Eine automatisierte Probenauftragung sowie eine automatisierte Gradientenentwicklung (Automated Multiple Development-AMD) führen zusätzlich zu einer stark verbesserten Auftrennqualität: durch das automatisierte Probenauftragen liegen die aufzutrennenden Substanzen im Vergleich zu einer manuellen Probenauftragung bereits fokussierter vor, wodurch eine höhere Trennschärfe erzielt wird. Das automatisierte Gradientenentwicklungsprogramm basiert auf dem Prinzip, dass die Probenauftrennung schrittweise mit einem von polar nach unpolar verlaufenden Gradienten erfolgt. Hierbei nimmt die Entwicklungsstrecke mit jedem Entwicklungsschritt zu, während die Polarität des Eluenten abnimmt. Zwischen den einzelnen Entwicklungsschritten wird der Eluent aus der Kammer abgezogen und die HPTLC-Platte wird unter Vakuum getrocknet. Anschließend wird die Entwicklungskammer mit Stickstoff geflutet und die Kammer mit dem nachfolgendem Eluenten konditioniert. Diese Entwicklungstechnik ermöglicht eine starke Fokussierung der Substanzflecken, wodurch eine hohe Trennzahl (Anzahl auftrennbarer Substanzen) erzielt werden kann [14, 15, 104]. Abbildung 2.3 zeigt beispielhaft den Gradientenverlauf eines neunstufigen Entwicklungsprogrammes.

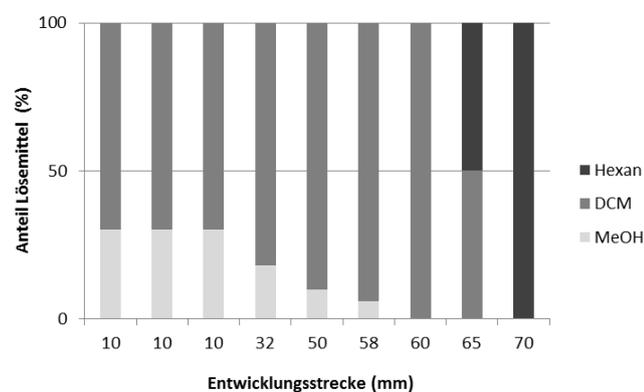


Abbildung 2.3 Neunstufiges HPTLC-Entwicklungsprogramm

Bei einer hierdurch erzielten Bandenbreite von typischerweise 1 mm–2 mm und einer vollständigen Bandentrennung mit einer Auflösung $R > 1,3$ nach:

$$R = \frac{\Delta z}{\bar{b}} \quad (2.10)$$

mit

R = Auflösung

Δz = Abstand der Bandenschwerpunkte [cm]

\bar{b} = arithmetisches Mittel beider Basisbreiten [cm]

ergibt sich bei einer Lösemittelstrecke von 70 mm und einem Probeauftragungspunkt bei 8 mm eine theoretisch mögliche Trennzahl zwischen ca. 23–46. Im Vergleich zu der Flüssig- oder Gaschromatographie verbleiben die aufgetrennten Substanzen bei der HPTLC auf der stationären Phase. Die jeweiligen stoffspezifischen Eigenschaften einer Substanz bestimmen ihre Position auf der HPTLC-Platte, welche durch den Retentionsfaktor (R_f) beschrieben wird [104, 98] (siehe Abbildung 2.4 und Gleichung 2.11).

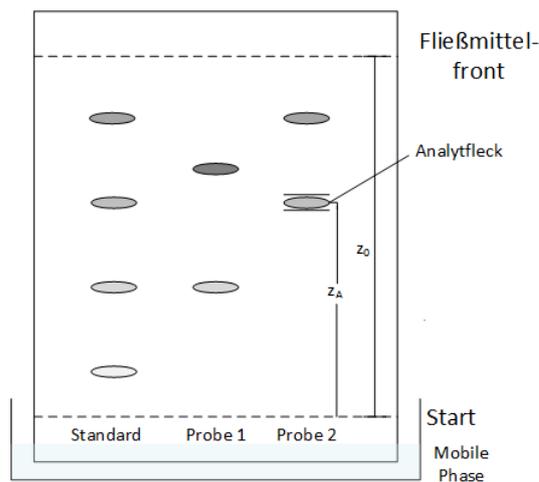


Abbildung 2.4 Darstellung einer entwickelten HPTLC-Platte.

$$R_f = \frac{z_A}{z_F - z_0} \quad (2.11)$$

mit

R_f = Retentionsfaktor

z_A = Strecke zwischen Start und Bandenmittelpunkt [cm]

z_0 = Strecke zwischen Start und Lösemittelfront [cm]

Wird der R_f -Wert einer Substanz auf den einer Standardsubstanz bezogen, erhält man den relativen R_f -Wert:

$$R_{f,rel} = \frac{R_{f,Analyt}}{R_{f,Standard}} \quad (2.12)$$

Für die Bestimmung des R_f -Wertes müssen die Substanzen nach dem Entwicklungsschritt detektiert werden. Da dieses in vielen Fällen unter sichtbarem Licht aufgrund der fehlenden Eigenfärbung nicht möglich ist, können Substanzen mit Hilfe von UV-Strahlung sichtbar gemacht werden. Hierfür wird der stationären Phase ein Fluoreszenzindikator beigesetzt, dessen Fluoreszenzstrahlung unter UV-Licht (meist bei 254 nm) angeregt wird. Substanzen auf der HPTLC-Platte, welche diese Fluoreszenzstrahlung absorbieren, werden somit als dunkle Bereiche auf der HPTLC-Platte sichtbar. Substanzen, welche eine Eigenfluoreszenz besitzen, können durch Anregung der Fluoreszenz mit Hilfe von UV-Licht bei 366 nm kenntlich gemacht werden [94, 107].

2.2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-HPLC

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC-High Performance Liquid Chromatography) beruht prinzipiell auf denselben Trennungsmechanismen wie die zuvor beschriebene HPTLC. Im Unterschied zur HPTLC befindet sich die stationäre Phase bei der HPLC innerhalb einer Edelstahlkapillare, durch welche die mobile Phase mit Hilfe von Pumpen bei Fließgeschwindigkeiten von bis zu ~10 mL/min und Drücken von bis zu ~400 bar durch die stationäre Phase befördert wird. Die Fließgeschwindigkeit wird hierbei konstant gehalten und es gilt entsprechend die Van-Deemter-Gleichung nach Gleichung 2.2 [83]. Für die stationäre Phase werden ebenfalls wie bei der HPTLC häufig Silicagel basierte Materialien verwendet. In vielen Fällen wird die HPLC als Ergänzung zur Gaschromatographie (GC) verwendet, um polarere, schwer flüchtige bzw. thermolabile Analyten zu messen. Entsprechend gehört die Verwendung eines RP-Silicagels als stationäre Phase mit zu den gängigsten HPLC-Anwendungen [106]. In der Abbildung 2.5 ist der Aufbau einer HPLC-Anlage dargestellt.

Die bei der RP-HPLC häufig zum Einsatz kommenden Eluenten sind Wasser zusammen mit Methanol oder Acetonitril. Den Eluenten können optional Puffersubstanzen zugesetzt werden. Hierdurch werden pH-Wert-Schwankungen während der Chromatographie verhindert und somit die Retentionszeiten (t_R) der Analyten konstant gehalten. Für eine Detektion der Analyten müssen diese von der HPLC-Trennsäule eluiert werden. Dies kann entweder isokratisch oder mit Hilfe eines Gradienten erzielt werden. Bei

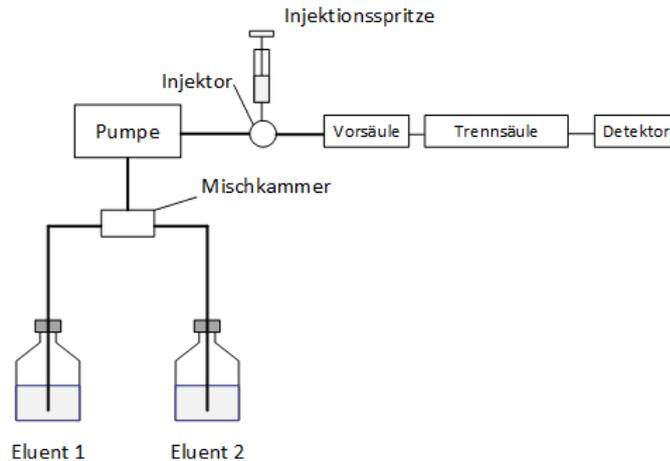


Abbildung 2.5 Aufbau eines HPLC-Anlage (nach [89]).

der isokratischen Trennung bleibt die Zusammensetzung des Eluenten über die gesamte Chromatographiezeit konstant. Bei der Gradiententrennung wird die Eluentenzusammensetzung im Laufe des Chromatographieprozesses geändert. Hierdurch wird die Elutionskraft auf Substanzen mit hohen Retentionszeiten verstärkt und die Chromatographiedauer damit reduziert [79]. Nachdem die Analyten die Trennsäule verlassen haben, erzeugen sie im Detektor (z. B. UV-Detektor oder Massenspektrometer) stoffmengenproportionale Signale. Die graphische Darstellung der detektierten Signalintensitäten I über die Zeit t wird als (äußeres) Chromatogramm bezeichnet. Äquivalent zu den R_f -Werten bei der HPTLC beschreibt die Retentionszeit t_R die Dauer des Aufenthaltes eines Analyten in der Trennsäule. Diese berechnet sich als Summe aus der Durchflusszeit t_0 , welche von einer nicht retardierenden Substanz benötigt wird und der Verweilzeit t_s (Nettoretentionszeit) an der stationären Phase (siehe Gleichung 2.13)[71].

$$t_R = t_0 + t_s \quad (2.13)$$

Die Qualität der Signal-(Peak-) Trennung zweier Substanzen wird über die Auflösung R beschrieben. R ist definiert als der Quotient aus dem Abstand der beiden Peakmaxima (Differenz der Retentionszeiten t_R) und dem arithmetischen Mittelwert der Peakbreiten (w) [79]:

$$R = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} = 1,18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{1/2_1} + w_{1/2_2}} \quad (2.14)$$

Für die Quantifizierung einer Substanz wird üblicherweise der Flächeninhalt des Analytenpeaks verwendet. Hierfür ist eine entsprechende Auflösung erforderlich. Zwei gleich-

große Peaks gelten demnach bei einer Auflösung von $R \geq 1,3$ als ausreichend getrennt. Weiterhin muss sich das Messsignal eines Analyten genügend stark vom allgemeinen Hintergrundrauschen abheben. Als Rauschen wird hierbei der Bereich zwischen dem höchsten und dem niedrigsten Wert der Basislinienschwankung in der Nähe des Analytenpeaks bezeichnet, welcher dividiert durch zwei, als das sogenannte Noise (N) definiert ist, von dessen unterstem Punkt die Messung für die Höhe h_A des Analytensignals vorgenommen wird.[83] Abbildung 2.6 zeigt eine schematische Darstellung eines Chromatogramms, sowie die zugehörigen zuvor beschriebenen Kenngrößen.

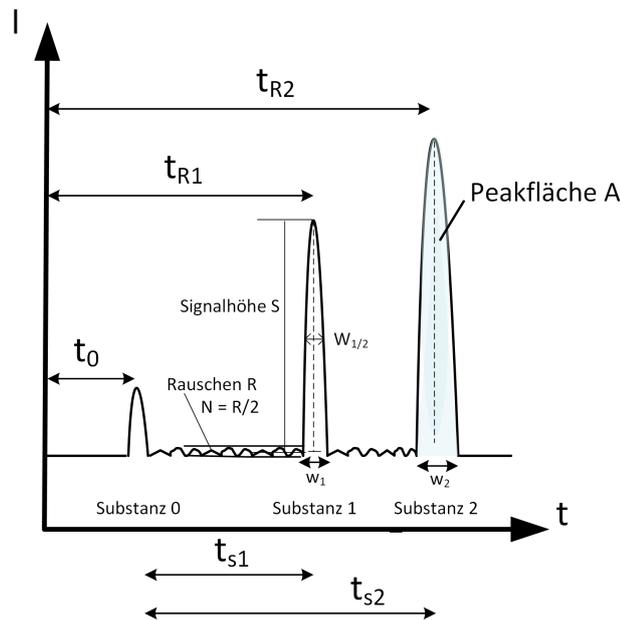


Abbildung 2.6 Darstellung eines HPLC-Chromatogramms mit zugehörigen Kenngrößen.

Für den qualitativen Nachweis einer Substanz ist definitionsgemäß ein Verhältnis von $S/N \geq 3$ (Nachweisgrenze) erforderlich. Hingegen wird für eine quantitative Bestimmung ein S/N -Verhältnis ≥ 10 (Bestimmungsgrenze) benötigt [79].

2.3 Effektorientiertes Schadstoffscreening

2.3.1 Allgemeine Grundlagen

Das Effektorientierte Schadstoffscreening verfolgt das Ziel, Schadstoffe mit toxischen Effekten in einer Probe ausfindig zu machen. Im Allgemeinen werden hierfür die Proben fraktioniert und die einzelnen Fraktionen werden auf ihre Toxizität hin untersucht. Je nach der zu untersuchenden Toxizitätswirkung (z.B. hormonaktive Substanzen), wer-

den die Fraktionen einer Probe einem geeigneten Toxizitätstest unterzogen. Weist eine Probenfraktion die untersuchte Toxizitätswirkung auf, kann diese ggf. weiter fraktioniert und die gebildeten Fraktionen erneut auf ihre Toxizität hin untersucht werden. Am Ende der Untersuchungen steht die Identifizierung der toxischen Substanzen. Hierfür werden in den meisten Fällen Massenspektrometer mit vorgeschalteten GC- oder HPLC-Systemen verwendet [10, 68]. Abbildung 2.7 zeigt den prinzipiellen Ablauf eines Effektorientierten Schadstoffscreenings.

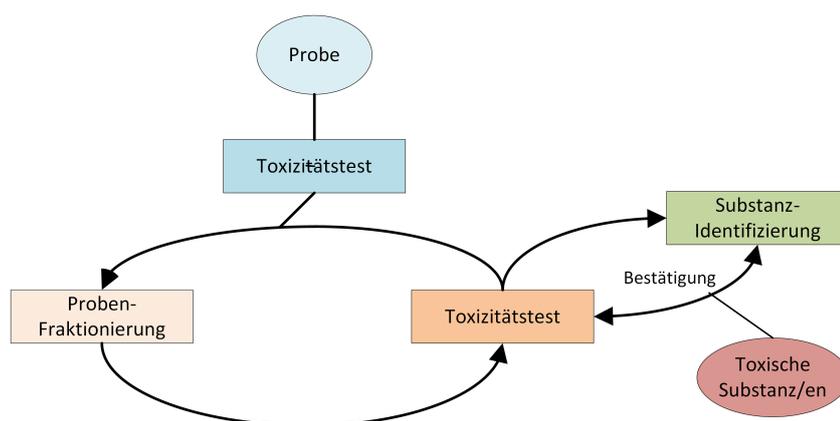


Abbildung 2.7 Prinzipieller Ablauf eines Effektorientierten Schadstoffscreenings (verändert nach [10]).

2.3.2 HPTLC und *A. fischeri*

Der Begriff Bioautographie bezeichnet eine mikrobiologische Detektionsmethode, welche auf einer Dünnschichtchromatographie-Platte erfolgt [21]. Die Kombination aus HPTLC und *Aliivibrio fischeri* (*A. fischeri*)-Bakterien stellt eine Möglichkeit für ein Bioautographie-Verfahren dar, um ein Effektorientiertes Schadstoffscreening durchzuführen. Hierbei wird die zu untersuchende Probe mittels HPTLC aufgetrennt und anschließend wird die HPTLC-Platte mit Leuchtbakterien der Spezies *A. fischeri* (ehemals *Vibrio fischeri*) [112] benetzt [21]. Die Toxizitätsbestimmung erfolgt durch die Messung der bei dem Bakterium *A. fischeri* natürlich vorkommenden Biolumineszenz, welche unter aeroben Bedingungen durch eine enzymatische (Luciferase-) Oxidation eines langkettigen Aldehyds (RCOH) sowie eines in der reduzierten Form vorliegenden Flavinmononukleotids (FMNH₂) entsteht. Die anschließende Reduzierung beider oxidierten Spezies erfordert Energie, welche über Adenosinriphosphat (ATP), Nicotinamidadeninukleotidphosphat (NADPH) und Nicotinamidadeninukleotid (NADH) zur Verfügung gestellt wird [82, 119]. Die Biolumineszenz ist hierdurch direkt an den Energiestoffwechsel der *A. fischeri*-Bakterien gekoppelt (siehe Abbildung 2.8). Entsprechend eignet sich der Leuchtbakterientest für die Toxizitätsbestimmung eines breiten Spektrums an auf den

Stoffwechsel unterschiedlich toxisch wirkenden Substanzen [12].

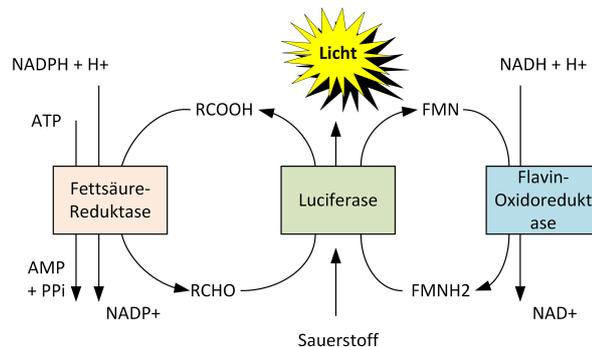


Abbildung 2.8 Entstehung der Biolumineszenz in *A. fischeri* (verändert nach [82]).

Für die Detektion anthropogener Schadstoffe wurde die Kombination aus HPTLC und *A. fischeri*-Detektion u. a. von Schulz et al. (2008) [100] zum Überwachen von Depoiesickerwasser und zur Bestimmung von Oxidationsnebenprodukten nach der UV-Behandlung von Röntgenkontrastmittel-haltigen Abwässern verwendet. Weiterhin konnte das Testsystem zur Detektion antibakterieller Substanzen in Mundwässern [7] und zur Überprüfung der Stabilität von Sonnenschutzmitteln gegenüber photooxidativen Prozessen [5] angewendet werden. Ebenfalls zeigten Chen und Schwack (2014) [19], dass es möglich ist mit dem Testsystem in Lebensmittel zugesetzte Antibiotika zu detektieren.

2.3.3 Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Die Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen stellt einen entscheidenden Schritt für die Beurteilung von Schadstoffen dar, da hierdurch der Zusammenhang zwischen der Konzentration eines Schadstoffes und dem zu untersuchenden Effekt auf einen Testorganismus dargestellt wird. Entsprechend werden Dosis-Wirkungs-Beziehungen oftmals als Grundlage für die Festlegung von Grenzwerten herangezogen [43].

Der für ein Effektorientiertes Schadstoffscreening eingesetzte Toxizitätstest kann nach der Identifizierung einer oder mehrerer toxischen Substanz/en ebenfalls für die Ableitung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen genutzt werden, um eine erste Einschätzung über den Toxizitätsgrad der zu testenden Substanz/en zu erhalten. Hierbei werden definierte Schadstoffkonzentrationen mit dem entsprechenden Toxizitätstest getestet und der detektierte toxische Effekt in Form einer Dosis-Wirkungs-Kurve dargestellt (siehe Abbildung 2.9).

Die Ableitung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen mit Hilfe der Kombination aus HPTLC und *A. fischeri*-Detektion kann entsprechend nach folgendem Schema durchgeführt wer-

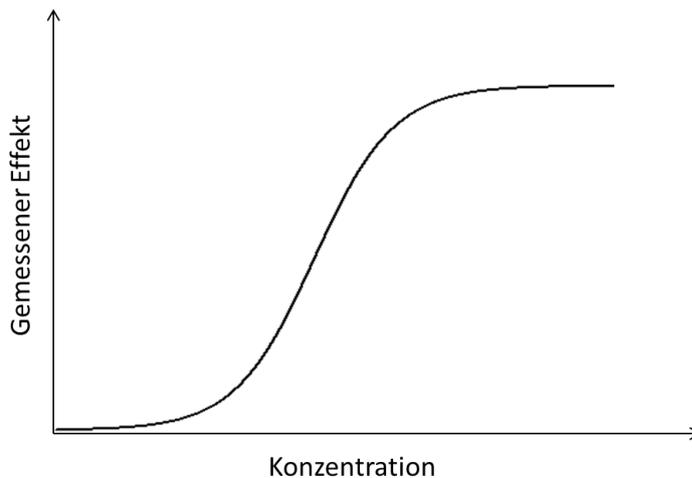


Abbildung 2.9 Darstellung einer idealisierten Dosis-Wirkungs-Kurve.

den: Die zu prüfenden Substanzen werden in definierten Konzentrationen in Form definierter Flächen auf die HPTLC-Platte aufgetragen. Im Anschluss wird die HPTLC-Platte in eine *A. fischeri*-Suspension getaucht und die Biolumineszenzhemmung detektiert, um daraus Dosis-Wirkungs-Beziehungen abzuleiten [101]. Diese Methode besitzt gegenüber Toxizitätstests, in denen die zu untersuchenden Schadstoffkonzentrationen in flüssigen Medien getestet werden (z. B. dem Leuchtbakterien-Küvettentest [32]), theoretisch folgende Vorteile:

- (1) Das Ansetzen unterschiedlicher Verdünnungsstufen kann reduziert werden, da bspw. eine Verdoppelung der Konzentration mit einem doppelten Auftragevolumen erfolgen kann.
- (2) Es können auch unpolare Substanzen getestet werden, da die Löslichkeit einer Substanz in wässrigen Medien für diesen Test unbedeutend ist.
- (3) Die zu testende Substanz kann in diversen Lösemitteln gelöst vorliegen, da sich diese während der Auftragung verflüchtigen.
- (4) Die Detektion der Biolumineszenzhemmungen im Vergleich zur Referenz erfolgt zeitgleich.

Bezüglich der Bewertung von Schadstoffen kam die Kombination aus HPTLC und *A. fischeri*-Detektion nur selten zum Einsatz. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung konnte von Schulz et al. (2017) [101] für die Substanz Bromoxynil mit Hilfe des Testsystems dargestellt werden. Weiterhin wurde das Testsystem in zwei Studien zum Vergleich der Toxizitäten von Schadstoffen und deren Transformationsprodukte eingesetzt [93, 75].

2.4 Schadstoffscreening mittels Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein Detektionsverfahren, welches Substanzen nach deren Ionisierung basierend auf ihrem Masse-zu-Ladungs Verhältnis (m/z) voneinander trennen kann. Die Massenspektrometrie ist somit ein sehr selektives Verfahren für die Detektion verschiedenster organischer Schadstoffe. In Kombination mit vorgeschalteten chromatographischen Trennverfahren wie der GC oder HPLC stellen diese Kopplungssysteme bezüglich der organischen Schadstoffanalytik in vielen Bereichen den Stand der Technik dar [73]. Der prinzipielle Aufbau eines Massenspektrometers umfasst die Bestandteile eines Einlasssystems, einer Ionisierungseinheit, einem Massenanalysator sowie einem nachfolgenden Detektor. Basierend auf der zu untersuchenden Fragestellung können verschiedene Arten der genannten Bauteile zum Einsatz kommen (siehe Abbildung 2.10). Im Folgenden werden die für die vorliegende Arbeit relevanten Funktionsweisen und Begrifflichkeiten der Massenspektrometrie genauer erläutert.

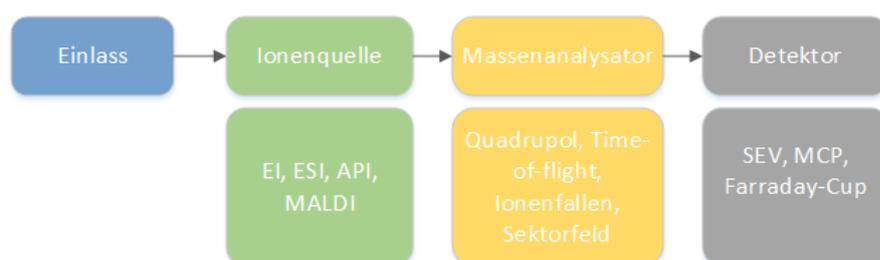


Abbildung 2.10 Aufbau eines Massenspektrometers mit Beispielen von gängigen Baukomponenten. (EI, Elektronenstoßionisation; ESI, Elektrospray-Ionisation; API, Atmosphärendruck-Ionisation; MALDI, Matrix-unterstützte Laser-Ionisation; SEV, Sekundärelektronenvervielfacher; MCP, Mikrokanalplatte)

2.4.1 Elektrospray-Ionisation

Bevor Substanzen mit Hilfe des Massenspektrometers analysiert werden können, müssen diese zuvor ionisiert werden. Die Elektrospray-Ionisation (ESI) ermöglicht es, gelöste Analyten zu ionisieren und sie in die Gasphase zu überführen. Durch dieses Ionisierungsprinzip war es erstmals möglich, die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit der Massenspektrometrie zu koppeln [37]. Das Prinzip der Ionisierung beruht hierbei auf der Zerstäubung der Flüssigkeit unter Atmosphärendruck mit Hilfe einer feinen Kapillare, an welche eine positive oder negative Spannung (ca. 3–6 kV) angelegt wird (siehe Abbildung 2.11).

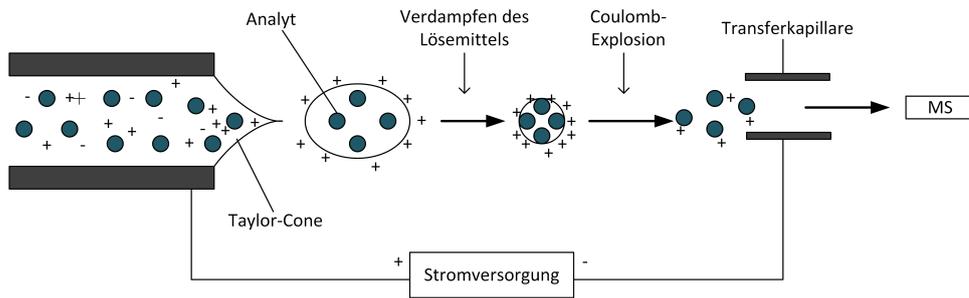


Abbildung 2.11 Aufbau und Funktion der ESI-Quelle (verändert nach [17])

Hierdurch werden je nach angelegter Spannung an der Oberfläche positiv oder negativ geladene Tropfen erzeugt. Durch das Verdunsten des in dem Tropfen enthaltenen Lösemittels kommt es zu einer Erhöhung der Ladungsdichte. Wird hierbei das Rayleigh-Limit, d. h. das Gleichgewicht zwischen der Coulomb-Abstoßung und der Oberflächenflächenspannung des Tropfens (siehe Gleichung 2.15) [96] überschritten, kommt es zu einer Coulomb-Explosion, bei der der Tropfen in viele kleine Tröpfchen zerfällt. Dieser Prozess setzt sich so lange kaskadenförmig fort, bis es zu einer Freisetzung des geladenen Analyten in die Gasphase kommt [29].

$$q = 8 \cdot \pi \sqrt{\varepsilon_0 \cdot \gamma \cdot R^3} \quad (2.15)$$

q = Ladung des Tropfens [C]

ε_0 = Permittivität des Vakuums [C²/N·m²]

γ = Oberflächenspannung der Tropfenflüssigkeit [N/m]

R = Radius des Tropfens [m]

Durch die entgegengesetzt geladene Transferkapillare werden die Analyten in das Massenspektrometer befördert.

2.4.2 Quadrupol-Massenspektrometer

Die Auftrennung von Ionen nach ihrem m/z -Verhältnis kann nach verschiedenen Prinzipien erfolgen. Bei einem Quadrupol-Massenspektrometer wird die Auftrennung durch vier parallel liegende Stabelektroden erzielt, bei denen die jeweils gegenüber liegenden Stäbe das gleiche Potential aufweisen, welches sich aus Wechsel- und Gleichstrom zusammensetzt [44]. Hierdurch werden die Ionen auf oszillierenden Bahnen zum Detektor geleitet. Entsprechend des angelegten elektrischen Feldes gelangen nur Ionen mit einem

bestimmten m/z -Verhältnis zum Detektor, während es bei allen anderen Ionen aufgrund zu starker Ablenkungen zu einer Entladung an den Stabelektroden kommt [39]. In Abbildung 2.12 ist der Aufbau eines Quadrupols dargestellt.

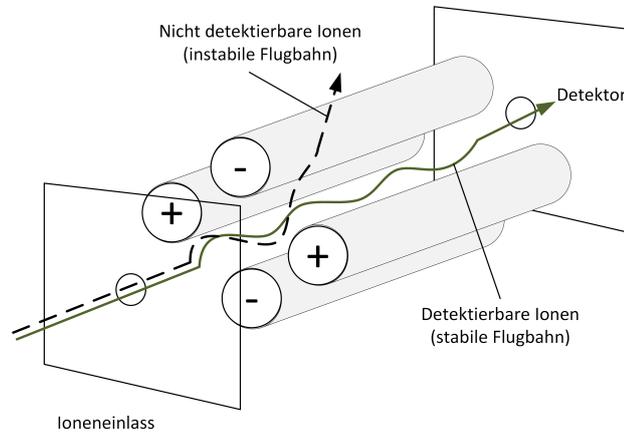


Abbildung 2.12 Aufbau eines Quadrupol- Massenspektrometers (verändert nach[39]).

Durch das Anlegen eines Hochvakuums im Massenspektrometer wird verhindert, dass die gebildeten Molekülionen durch das Zusammenstoßen mit Luftmolekülen unkontrolliert fragmentieren. Die Bewegung der Ionen im elektromagnetischen Quadrupolfeld lässt sich basierend auf den Mathieu-Gleichungen vereinfacht durch Gleichung 2.16 beschreiben [89].

$$\frac{m}{z} = \frac{5,7V}{\omega^2 r^2} \quad (2.16)$$

mit

m = Ionenmasse [Da]

r = Quadrupolradius [m]

V = Wechselspannung [V]

ω = Kreisfrequenz [1/s]

z = Ladungszahl

Für ein gegebenes Quadrupol-Massenspektrometer sind die Parameter r und ω konstant. Die Variation der Wechselspannung V bestimmt demnach das m/z -Verhältnis, welches Ionen besitzen müssen, um das Quadrupolfeld ungehindert zum Detektor zu passieren. Quadrupol-Massenspektrometer können Molekülionen bis zu einem m/z -Verhältnis von ~ 2000 messen [53].

2.4.3 Massenauflösung und Massengenauigkeit

Die Massenauflösung (R) eines Massenspektrometers bestimmt, inwieweit sich zwei Molekülmassen voneinander unterscheiden lassen. Die Massenauflösung ist definiert als:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (2.17)$$

mit

m = Masse eines Moleküls [Da]

Δm = Die kleinste Massendifferenz mit der die Signale zweier Molekülmassen als getrennt betrachtet werden können [Da].

Allgemein gelten hierbei zwei Massensignale gleicher Intensität als getrennt, wenn das die beiden Signale trennende Peaktal 10% der jeweiligen Peakintensität beträgt (siehe Abbildung 2.13) [44].

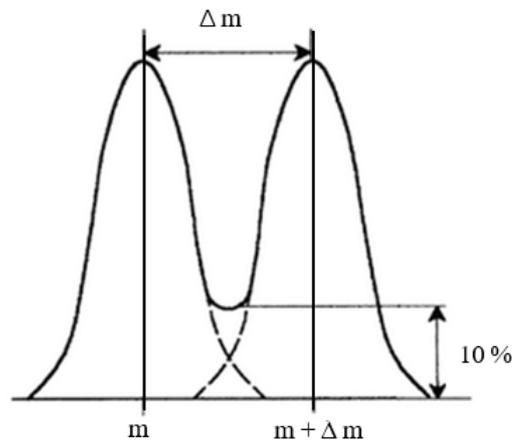


Abbildung 2.13 Schema zur Definition der Trennung zweier Signalpeaks (nach [72]).

Entsprechend ihres Auflösungsvermögens ($R <$ oder > 5000) werden die unterschiedlichen Arten von Massenspektrometern nach oben genannter Definition in niedrig- oder hochauflösende Gerätetypen unterteilt. Quadrupolgeräte werden demnach als niedrigauflösende Massenspektrometer klassifiziert [29].

Die Massengenauigkeit eines Massenspektrometers ist definiert als die Differenz aus der theoretisch berechneten exakten Masse (m_{exakt}) eines Moleküls und der vom Massenspektrometer gemessenen Molekülmassen (m_{gemessen}):

$$\Delta m = m_{\text{exakt}} - m_{\text{gemessen}} \quad (2.18)$$

Sie ist neben Parametern wie u. a. der gewählten Messmethode oder auftretenden Peaküberlappungen auch von dem Auflösungsvermögen des Massenspektrometers abhängig [55], so dass in den meisten Fällen ein höheres Auflösungsvermögen ebenfalls eine höhere Massengenauigkeit zur Konsequenz hat (siehe Abbildung 2.14). Bei Quadrupol-Massenfiltern werden Auflösungsvermögen von etwa $\pm 0,1$ Da erreicht [29].

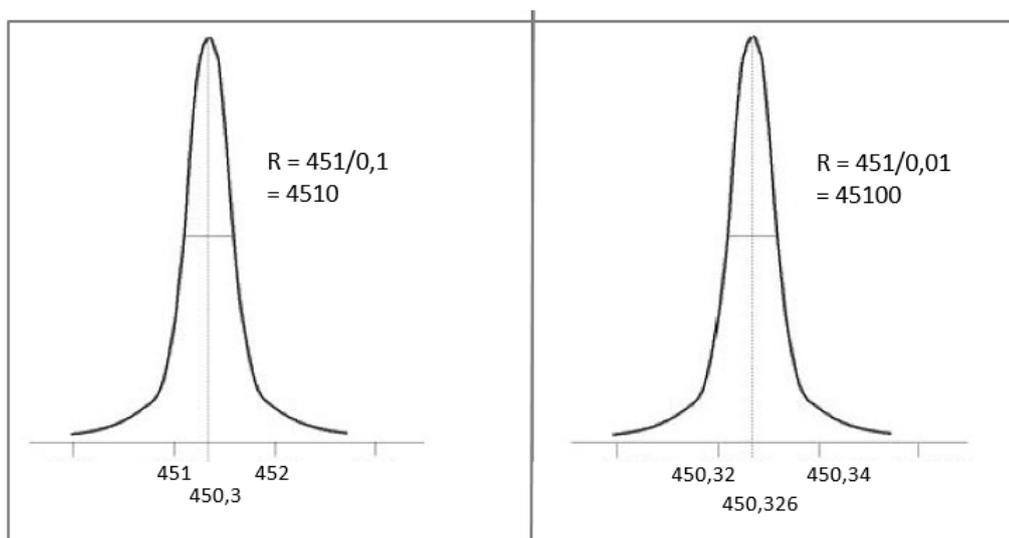


Abbildung 2.14 Zusammenhang zwischen dem Auflösungsvermögen und der Massengenauigkeit in der Massenspektrometrie; links: Peak niedrigaufgelöst, rechts: Peak hochaufgelöst (nach [29]).

Die Kopplung mehrerer Massenspektrometer wird als Tandem-Massenspektrometrie bezeichnet. Aus einer Kopplung dreier Quadrupolmassenfilter (Triple-Quadrupol/QqQ-MS) resultieren verschiedene Möglichkeiten, wie die Quadrupolmassenfilter betrieben und miteinander kombiniert werden können. Üblicherweise ist dabei der mittlere Quadrupol durch eine Gaseinspeisung als Kollisionzelle ausgelegt und der erste und der dritte Quadrupol wirken als Massenfilter [44]. Sind am dritten Quadrupol noch zusätzliche Elektroden installiert, so kann dieses Teil auch wie eine lineare Ionenfalle (QTrap) betrieben werden, welche die geladenen Moleküle anreichern kann. In der Ionenfalle werden Molekülionen in axialer Richtung für bis zu 500 ms gesammelt, bevor sie zum Detektor geleitet werden. Hierdurch können niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für Analyten erzielt werden. Die entsprechend benötigte längere Verweildauer der zu detektierenden Molekülionen kann sich allerdings für instabile Ionen, aufgrund eines vorzeitigen Zerfalls, negativ auf die Sensitivität der Messung auswirken. Ebenfalls kann

die Empfindlichkeit durch eine Überfüllung der Ionenfalle und den damit vorzeitigem Zerfall der zu detektierenden Molekülonen aufgrund von Kollisionen mit anderen Molekülonen negativ beeinträchtigt werden [56, 46].

Im Folgenden werden die gängigen Messmodi eines Triple-Quadrupol-Systems und deren Anwendungen für unterschiedliche Schadstoffscreening-Strategien vorgestellt.

2.4.4 Messmodi und Screening-Strategien

Je nachdem, ob gezielt bestimmte Schadstoffe gemessen werden sollen, oder ob es das Ziel ist, einen möglichst vollständigen Überblick über die Schadstoffbelastung in den zu untersuchenden Umweltkompartimenten zu erhalten, kommen verschiedene Screening-Strategien und Messmodi eines Triple-Quadrupol-Systems zum Einsatz:

Das **Target Screening** beschreibt die zielgerichtete Schadstoffanalytik und findet besonders in Routineüberwachungen Anwendung. Hier sind die zu bestimmenden Schadstoffe bekannt, so dass sowohl Probenaufarbeitung als auch Messmethoden optimal aufeinander abgestimmt werden und somit auch sehr geringe Schadstoffkonzentrationen erfasst werden können. Die Quantifizierung der Zielanalyten steht bei dem Target-Screenings im Vordergrund. Hierfür kann der **MRM (Multiple Reaction Monitoring)** Messmodus verwendet werden. Bei dem MRM wird ein substanzspezifisches Molekülion (Precursor) heraus selektiert, welches im Anschluss im zweiten Quadrupol (q_2) mit Hilfe eines Kollisionsgases (z. B. Stickstoff) fragmentiert wird. Ein oder mehrere molekulspezifische Fragmente können anschließend im Q_3 für die Detektion herausgefiltert werden. Hierbei wird ein Fragment (Quantifier) für die Quantifizierung herangezogen. Zusätzlich werden ein oder mehrere gebildete Fragmente (Qualifier) sowie die substanzspezifische chromatographische Retentionszeit für die eindeutige Identifizierung der zu quantifizierenden Substanz verwendet. Das Verhältnisse von Quantifier zu Qualifier dient zusätzlich der Ergebnisabsicherung sowie der Überprüfung auf evtl. vorliegende Matrixeffekte. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe eines Referenzstandards sowie eines Internen Standards (bspw. Isotopenstandard) [29, 125].

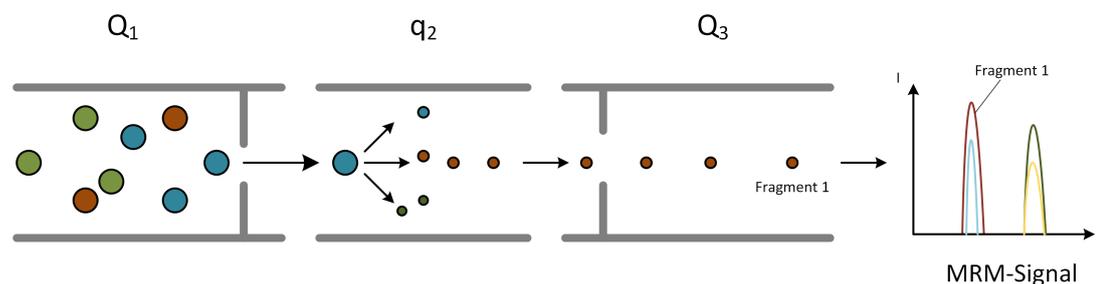


Abbildung 2.15 Darstellung des MRM Messmodus (verändert nach [33]).

Das **Suspect Screening** beschreibt eine „auf Verdacht“ basierende Schadstoffanalytik, welche aufgrund einer zuvor vorhandenen Information durchgeführt wird. Hierzu zählt beispielsweise die Information über die Verwendung eines bestimmten Pestizides im Untersuchungsgebiet aufgrund derer die Proben gezielt auf die entsprechende Substanz hin analysiert werden. Basierend auf den Informationen zur Molekülmasse und potentiellen Fragmenten einer Substanz (bspw. aus Datenbanken) kann ebenfalls der MRM Messmodus nach dem Prinzip des Target Screenings verwendet werden. Aufgrund der Tatsache, dass die Probenaufarbeitung und die Messbedingungen im Vergleich zum Target Screening nicht optimal an den Analyten angepasst sind, resultiert dies in einer geringeren Nachweisempfindlichkeit. Bei einem positiven Messergebnis muss die endgültige Verifizierung über die Messung eines Referenzstandards abgesichert werden [69, 103]. Das sogenannte **Non-Target Screening** verfolgt das Ziel, so viele Informationen wie möglich über die in einer Probe enthaltenen Substanzen zu erhalten. Demnach erfolgt im Vergleich zum Target- oder Suspect Screening die Detektion der Analyten nicht massenselektiv sondern über einen möglichst weiten Massenbereich. Der **Full Scan Modus** bietet die Möglichkeit, einen breiten m/z -Verhältnis-Bereich und damit viele in einer Probe befindliche Substanzen zu erfassen. Im Full Scan Modus wird das Quadrupol-Massenspektrometer letztendlich wie ein einzelnes Massenspektrometer betrieben. Optional werden hier Q_1 oder Q_3 für die Selektion des zu scannenden Massenbereiches ausgewählt, während sich die anderen beiden Massenfilter im sogenannten „RF-only“ Betrieb befinden und somit die Molekülionen diese Massenfilter ungehindert zum Detektor passieren können [44].

Wird das Massenspektrometer mit einem chromatischen Trennverfahren wie der GC oder der HPLC gekoppelt, so wird das TIC (Total Ion Chromatogram) erhalten. Das TIC stellt die aufsummierten Signal-Intensitäten der pro Zeiteinheit gemessenen Massenspektren dar. Aus einem TIC lassen sich gezielt definierte m/z -Verhältnisse extrahieren. Man erhält somit das XIC (Extracted Ion Chromatogram). Abbildung 2.16 zeigt den

Zusammenhang zwischen dem TIC und dem XIC. Nachteilig bei dieser Screening Methode erweist sich die geringere Sensitivität aufgrund der pro Masseneinheit reduzierten Messzeit sowie dem stärkeren Einfluss von Matrix-Effekten auf die Signalqualität [44].

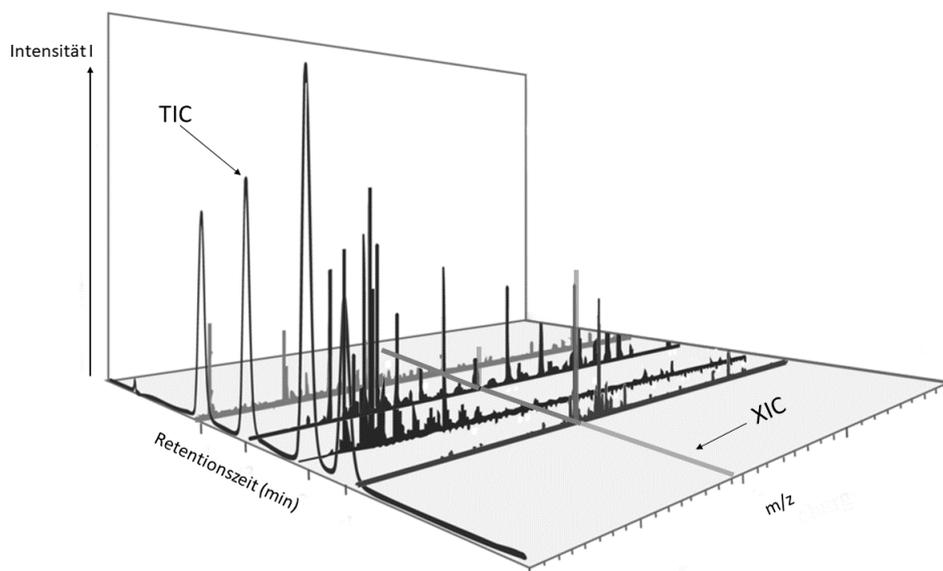


Abbildung 2.16 Zusammenhang zwischen dem TIC und dem XIC.

Nach einem Full Scan können in einem zweiten Messlauf die Moleküle von Interesse gezielt im q_2 fragmentiert werden, um sämtliche gebildeten Fragmente (Product Ions) durch einen Q_3 -Scan zu erfassen (siehe Abbildung 2.17). Dieser Scanmodus wird als Product Ion Scan bezeichnet und ist besonders für die Identifizierung von unbekannt Substanzen nützlich, da der Product Ion Scan zur Strukturaufklärung als auch das substanzspezifische Fragmentmuster für einen Abgleich mit Datenbankeinträgen verwendet werden kann [44, 69].

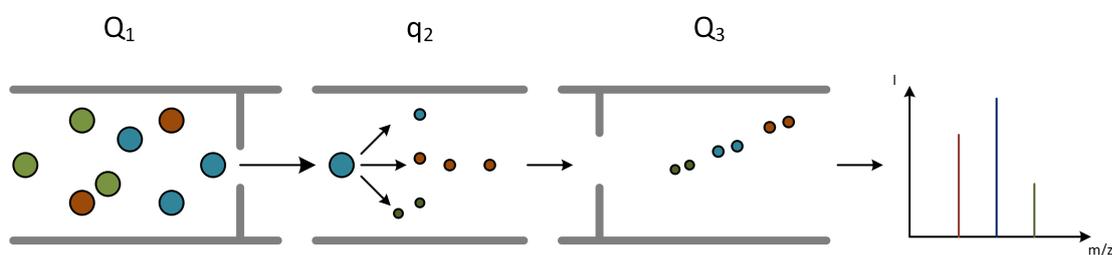


Abbildung 2.17 Darstellung des Product Ion Scans (verändert nach [33]).

Die hier beschriebenen Screening-Strategien und Messmodi besitzen jeweils ihre Vor- und Nachteile. Entsprechend kann mit deren gezielter Kombination ein umfassenderes

Bild über die Schadstoffbelastung eines Untersuchungsgebietes erhalten werden als mit einer Screening-Strategie allein.

3 Material und Methoden

3.1 Projekt I: Effektorientiertes Schadstoffscreening

Der prinzipielle methodische Ablauf für die Detektion toxischer Substanzen mittels HPTLC und *A. fischeri*-Detektion ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die Methodenentwicklung und -optimierung basierte auf den Empfehlungen, welche vom Betriebs- und Forschungslabor der Landeswasserversorgung Wasserk Langenau zur Verfügung gestellt wurden. Hierzu zählte:

- (1) die HPTLC-Plattenvorreinigung,
- (2) die Anzucht der *A. fischeri*-Bakterien [100],
- (3) das Beschichten der HPTLC-Platte mit der *A. fischeri*-Suspension [100],
- (3) das Gradientenprogramm für die Entwicklung der HPTLC-Platte [101],
- (4) der Standard für die Kontrolle der HPTLC-Entwicklung,
- (5) die Auftragung definierter Standards als Flächenkonzentrationen für Dosis-Wirkungs-Beziehungen[101].

Bis auf die HPTLC-Plattenvorreinigung und die Anzucht der *A. fischeri*-Bakterien wurden die übrigen Anwendungspunkte für die entsprechenden Anforderungen weiterentwickelt und optimiert.

3.1.1 Anzucht der *A. fischeri*-Bakterien

Die Anzucht der *A. fischeri*-Bakterien erfolgte mit gefriergetrockneten Bakterien (LUMISmini LCK484; HACH). Die Reaktivierung der *A. fischeri*-Bakterien wurde mit Hilfe der Zugabe von 5 mL Reaktivierungslösung (HACH) und anschließender 15 minütiger Ruhezeit erzielt. Darauf folgend wurden die *A. fischeri*-Bakterien in ein zuvor für 20 min und bei 121 °C autoklaviertes Nährmedium gegeben. Die einzelnen Komponenten des Nährmediums wurden in Reinstwasser (Milli-Q™, MERCK) gelöst und mit NaOH

3 Material und Methoden

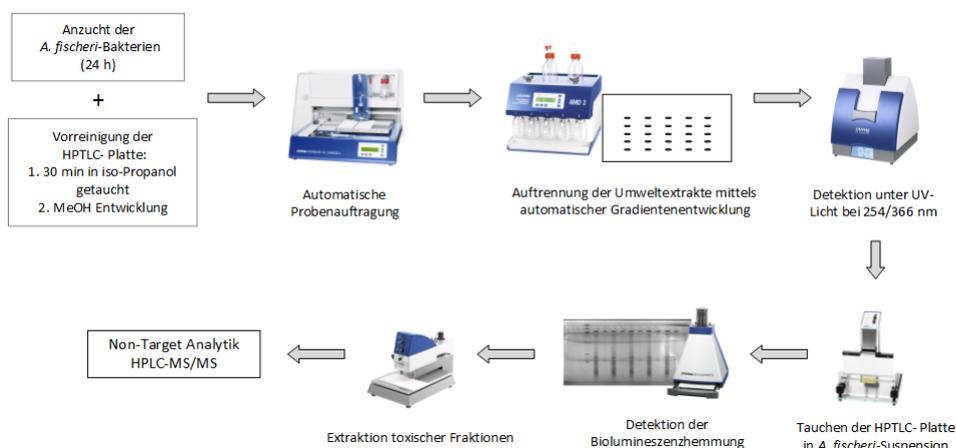


Abbildung 3.1 Methodischer Ablauf der Detektion toxischer Fraktionen mittels HPTLC und *A. fischeri*

wurde ein pH-Wert von 7 eingestellt. Pro Ansatz wurden 220 mL des Nährmediums in Erlenmeyerkolben verwendet. Die *A. fischeri*-Bakterien wurden für 24 h unter konstantem Rühren auf einem Magnetrührer angezchtet. Die Zusammensetzung des Nährmediums pro Liter ist in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1 Zusammensetzung des Nährmediums für die Anzucht der *A. fischeri*-Bakterien

Substanz	Konzentration (g/L)	Hersteller
NaCl	30	EMSURE®ACS, Reag. Ph Eur MERCK MILLIPORE
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	6,1	EMSURE®ACS, Reag. Ph Eur. MERCK MILLIPORE
K ₂ HPO ₄	2,1	EMSURE®ACS, Reag. Ph Eur. MERCK MILLIPORE
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2	EMSURE®ACS, Reag. Ph Eur. MERCK MILLIPORE
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5	EMSURE®ACS, Reag. Ph Eur. MERCK MILLIPORE
Pepton aus Casein	5	SIGMA-ALDRICH
Hefeextrakt	0,5	SIGMA-ALDRICH
Glycerin 85%	1,8 mL*	EMSURE®exp Ph Eur, BP MERCK MILLIPORE
NaOH (pH-Wert Einstellung)	3-4 Plättchen	EMSURE®ISO MERCK MILLIPORE

3.1.2 Vorreinigung der HPTLC-Platten

Vor der Verwendung einer HPTLC-Platte (LiChrospher®HPTLC Silica gel 60 F254s, MERCK) wurde diese für mind. 30 min in eine mit Isopropanol (2-Propanol, BAKER ANALYZED®A.C.S. Reagent ;J.T.Baker®) gefüllte Doppeltröglkammer getaucht. Die mit Isopropanol getränkte HPTLC-Platte wurde im Anschluss auf einer Heizplatte bei ca. 70 °C unter einem Laborabzug getrocknet und danach vollständig mit MeOH (Methanol AMD CHROMASOLV®; SIGMA-ALDRICH) entwickelt. War eine Lagerung einer gereinigten HPTLC-Platte notwendig, so wurde die Silicagelschicht mit einer Glasplatte abgedeckt, mit Aluminiumfolien ummantelt und in einer abgedeckten Glaskammer bis zur Verwendung gelagert.

3.1.3 Probenapplikation

Die Applikation der Proben auf die HPTLC-Platte erfolgte automatisch mit Hilfe des Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4, CAMAG). Die Probenextrakte wurden in Form von Banden mit jeweils 6 mm Länge aufgetragen. Die Applikationsgeschwindigkeit wurde basierend auf dem verwendeten Lösemittel des Probenextraktes gewählt und lag damit für die untersuchten Elbe- und Meerwasserextrakte bei 150 nl/s. Nach jeder Probenapplikation wurde die Applikationsspritze automatisch dreimal mit Aceton gespült sowie die Spritzenadel mit der ATS 4 Funktion „Flush nozzle“ gereinigt, um evtl. Querkontaminationen zu vermeiden. Das Applikationsvolumen war abhängig von den zu untersuchenden Probenextrakten und betrug im Allgemeinen 5 µL für Elbewasserextrakte sowie 10 µL für Meerwasserextrakte. Maximal wurden 12 Probenextrakte appliziert. Die Vollständigkeit der Probenapplikation wurde im Anschluss mit Hilfe des TLC Visualizer (CAMAG) unter UV-Licht bei 254 nm und bei 366 nm kontrolliert.

3.1.4 Gradientenentwicklung

Die vertikale Entwicklung der HPTLC-Platten erfolgte automatisch mit Hilfe des AMD 2 (Automated Multiple Development) von CAMAG. Für die Auftrennung der Probenextrakte wurde stets ein Gradientenprogramm verwendet. Die hierfür verwendeten Lösemittel waren Methanol (MeOH AMD CHROMASOLV®; SIGMA-ALDRICH), Dichlormethan (DCM HPLC Grade; J.T.Baker®) und Hexan (Hexan HPLC Grade; J.T.Baker®). Die Entwicklungsqualität wurde anschließend erneut mit dem TLC Visualizer unter UV-Licht bei 254 nm und 366 nm kontrolliert.

3.1.4.1 Vorhandenes Verfahren

Zu Anfang wurden die HPTLC-Platten mit einem Entwicklungsprogramm bestehend aus 19 Entwicklungsschritten (nach [101]) und einem Lösemittelgradienten von Methanol/Dichlormethan über Dichlormethan bis Hexan (siehe Tabelle 3.2) entwickelt .

Tabelle 3.2 Lösemittelzusammensetzung, Entwicklungshöhe und Trocknungszeiten des 19-stufigen Gradientenprogramms.

Schritt	Methanol (+0.05% AS) [Vol %]	Dichlormethan [Vol %]	Hexan [Vol %]	Entwicklung [mm]	Trockenzeit [min]
1	30,0	70,0	0,0	10,0	4,0
2	30,0	70,0	0,0	10,0	4,0
3	30,0	70,0	0,0	10,0	4,0
4	27,9	72,1	0,0	14,7	4,0
5	25,7	74,3	0,0	19,4	4,0
6	23,6	76,4	0,0	24,1	4,0
7	21,4	78,6	0,0	28,8	4,0
8	19,3	80,7	0,0	33,4	4,0
9	17,1	82,9	0,0	38,1	4,0
10	15,0	85,0	0,0	42,8	4,0
11	12,9	87,1	0,0	47,5	4,0
12	10,7	89,3	0,0	52,2	4,0
13	8,6	91,4	0,0	56,9	3,0
14	6,4	93,6	0,0	61,6	3,0
15	4,3	95,7	0,0	66,3	3,0
16	2,1	97,9	0,0	70,9	3,0
17	0,0	100,0	0,0	75,6	3,0
18	0,0	50,0	50,0	80,3	3,0
19	0,0	0,0	100,0	85,0	3,0

Dem Methanol wurde zusätzlich Methansäure (Ameisensäure ACS reagent; Sigma-Aldrich) im Verhältnis 100:0,05 (v/v) zugesetzt. Insgesamt benötigte dieses Entwicklungsprogramm etwa 3 h 30 min. Die HPTLC-Platten mussten nach der Entwicklung für einige Sekunden in eine mit Ammonium gesättigte Kammer gestellt werden, um die auf der Platte verbliebene Methansäure zu neutralisieren, da diese einen hemmenden Effekt auf die *A. fischeri*-Bakterien besitzt. Die Entwicklung mit der zugesetzten Methansäure stellte einen kritischen Punkt für die anschließende Benetzung mit *A. fischeri*-Bakterien dar, da der Punkt der Neutralisation nicht gemessen werden konnte und sich bei einigen HPTLC-Platten großflächige Hemmungen der Biolumineszenz ergaben. Als nachteilig erwies sich ebenfalls die lange Entwicklungszeit der HPTLC-Platten. Die Möglichkeit einer schnellen Versuchswiederholung im Falle auftretender Fehler war nicht gegeben.

Weiterhin sollten Versuche zur Reproduzierbarkeit (siehe Kapitel 4.1.1.1) der Biolumineszenzhemmung durchgeführt werden, bei denen drei Platten an einem Tag entwickelt und getaucht werden sollten. Hierfür nahm das 19-stufige Entwicklungsprogramm zu viel Zeit in Anspruch. Eine Lagerung der entwickelten HPTLC-Platten über Nacht kam nicht in Frage, da hierdurch deutliche Diffusionseffekte von Substanzen beobachtet werden konnten, wodurch ein Vergleich der Platten untereinander nicht mehr möglich war.

3.1.4.2 Optimiertes Verfahren

Um den Einfluss der Methansäure zu minimieren, wurde in den folgenden Versuchen die Methansäure nur in den ersten drei Entwicklungsschritten zugesetzt. Trotz einer Reduzierung der Methansäure wurden regelmäßig flächendeckende Hemmungen der Biolumineszenz auf der HPTLC-Platte detektiert. Es wurde daraufhin die Qualität der Substanztrennung ohne den Zusatz von Methansäure getestet. Hierfür wurde der im Kapitel 3.1.7 beschriebene Kontrollstandard mit und ohne Zusatz von Methansäure entwickelt. Wie Abbildung 3.2 zeigt, geht die Entwicklung ohne den Zusatz von Methansäure mit einer R_f -Verschiebung für die einzelnen Substanzen einher, jedoch bei gleichbleibender Trennungsqualität. Für die Entwicklung eines schnelleren HPTLC-Entwicklungsprogrammes wurde ebenfalls der Kontrollstandard verwendet. Wie unter Kapitel 2.2.2 beschrieben, besitzen die stationäre Phase und die gewählten Laufmittel Einfluss auf die HPTLC-Entwicklungsdauer. Aufgrund der effizienten Trennleistung sollten die zu Anfang verwendete Art der eingesetzten HPTLC-Platten sowie der prinzipielle Gradientenverlauf von MeOH/DCM über DCM hin zu Hexan beibehalten werden. Eine Reduzierung der HPTLC-Entwicklungszeit wurde daher mit einer Reduzierung der Entwicklungsstrecke erreicht. Das „Schnellentwicklungsprogramm“ erzielte für den Kontrollstandard die gleiche Auftrennungsqualität wie das 19-stufige Entwicklungsprogramm. Das „Schnellentwicklungsprogramm“ umfasst neun Entwicklungsschritte und benötigt 1 h 30 min (siehe Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3 Lösemittelzusammensetzung, Entwicklungshöhe und Trocknungszeiten des 9-stufigen Gradientenprogrammes.

Schritt	Methanol [Vol %]	Dichlormethan [Vol %]	Hexan [Vol %]	Entwicklung [mm]	Trockenzeit [min]
1	30	70	0	10	4
2	30	70	0	10	4
3	30	70	0	10	4
4	18	82	0	32	4
5	10	90	0	50	4
6	6	94	0	58	4
7	0	100	0	60	4
8	0	50	50	65	4
9	0	0	100	70	4

Sowohl die Entwicklungszeit als auch der Verbrauch von Lösemitteln konnten somit um über die Hälfte reduziert werden. Zwar geht eine Reduzierung der Entwicklungstrecke ebenfalls mit einer Reduzierung der theoretisch maximalen Anzahl an zu trennenden Substanzen einher, jedoch überwiegen die Vorteile, welche durch die verkürzte Entwicklungszeit gewonnen wurden. Abbildung 3.2 zeigt die Auftrennung des Kontrollstandards mit dem 9-stufigen im Vergleich zu dem 19-stufigen Gradientenprogramm.

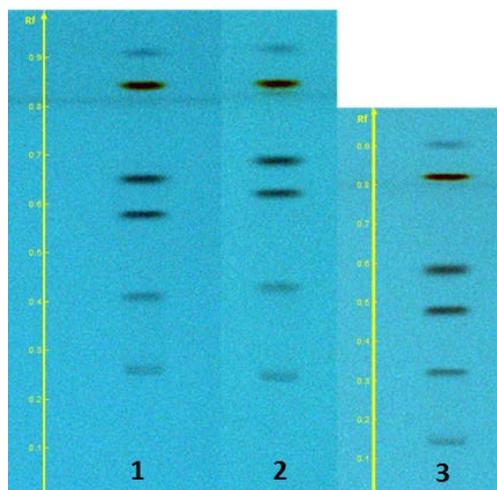


Abbildung 3.2 HPTLC-aufgetrennter Kontrollstandard mit 19-stufigem Gradientenprogramm: 1) mit Zusatz von Methansäure, 2) ohne Zusatz von Methansäure, 3) 9-stufiges Gradientenprogramm. Detektion unter UV-Licht bei 254 nm.

3.1.5 Beschichtung der HPTLC-Platten mit *A. fischeri*

3.1.5.1 Vorhandene Verfahren

Um die HPTLC-Platten mit *A. fischeri* zu benetzen, wurden die HPTLC-Platten mit einer speziellen Tauchvorrichtung (Chromatogram Immersion Device; CAMAG) unter definierter Geschwindigkeit und Verweildauer in die Bakteriensuspension getaucht. Nach dem Tauchen der HPTLC-Platten musste der überschüssige Flüssigkeitsfilm auf den Platten entfernt werden, um eine störungsfreie Detektion der Biolumineszenz zu gewährleisten. Zu Anfang geschah dies mit einem handelsüblichen Fensterwischer. Dieses Verfahren zeichnete sich durch folgende Nachteile aus:

- (1) Beim Tauchvorgang können vor allem polare Substanzen von der HPTLC-Platte in Lösung gehen, wodurch Ergebnisse verfälscht werden können.
- (2) Weiterhin können die in Lösung gegangenen Substanzen toxisch auf die Leucht-bakterien wirken und die Ergebnisse nachfolgender zu tauchender HPTLC-Platten beeinflussen.
- (3) Beim Entfernen des Flüssigkeitsüberschusses von der HPTLC-Platte mit einem Fensterwischer bestand die Gefahr, durch das Eigengewicht des Wischers die Silicagelschicht zu beschädigen bzw. ganz zu zerstören.

Eine Alternative zum Tauchen der HPTLC-Platte wird von V. Baumgatner vorgestellt [6]. Hier wird ein handelsübliches Fensterwischtuch (Polyamid) mit einer *A. fischeri*-Suspension durchtränkt und anschließend unter Druck mit Hilfe einer handelsüblichen Teigrolle auf die HPTLC-Platte aufgebracht. Die Verwendung eines Fensterwischtuches zur Aufbringungen der Bakteriensuspension wurde aufgrund möglicher Verunreinigungen eines solchen Produktes nicht in Betracht gezogen. Anstelle dessen wurde ein hochreiner Glasfaserfilter (GF/F; Whatmann) verwendet. Hierbei zeigte sich, dass die erforderliche Flüssigkeitsmenge für eine vollständige Beschichtung der HPTLC-Platte vom Glasfaserfilter nicht aufgenommen werden konnte.

3.1.5.2 Optimiertes Verfahren

Die Verwendung des Glasfaserfilters (Whatman Grade GF/F Glasfaserfilter, \varnothing 257 mm; GE Healthcare Life Sciences) erbrachte hingegen sehr gute Ergebnisse für die Beseitigung der überschüssigen *A. fischeri*-Suspension nach dem Tauchen der HPTLC-Platte. Mit dieser Methode konnte eine Beschichtung der HPTLC-Platte mit *A. fischeri* ohne Gefahr einer Schädigung der Silicagelschicht erzielt werden. Hierfür wird ein Glasfaserfilter halbiert und die Längsseite mit der Bakteriensuspension befeuchtet. Hierdurch wird

eine gute Anhaftung des Filters an die HPTLC-Platte erzielt. Nachdem Tauchen der HPTLC-Platte wird diese glasseitig auf ein Papiertuch gelegt. Die mit der Suspension befeuchtete Kante des GF-Filters wird nun am oberen Tauchrand der HPTLC-Platte angesetzt und zur Unterkante der HPTLC-Platte gezogen, um die überschüssige Bakteriensuspension auf der Silicagelschicht zu entfernen. Anschließend muss die Rückseite der HPTLC-Platte von der Flüssigkeit mit einem Papiertuch entfernt werden, um eine störungsfreie Detektion der Biolumineszenz zu gewährleisten. Die Versuche zur Reproduzierbarkeit (siehe Kapitel 4.1.1.1) zeigten vergleichbare Ergebnisse, d. h. eine Beeinträchtigung der Bakterien in ihrer Biolumineszenz konnte trotz des Tauchens mehrerer HPTLC-Platten nicht festgestellt werden. Um jedoch das Herauslösen vor allem polarer Substanzen zu reduzieren, wurde die maximale Tauchgeschwindigkeits- (5 mm/s) und die minimalste Verweilzeiteinstellung von 1 s gewählt.

3.1.6 Quantifizierung der Biolumineszenzhemmung

Nach dem Beschichten einer HPTLC-Platte mit der Bakteriensuspension wurde die Biolumineszenz in einer Dunkelkammer mit Hilfe einer CCD-Kamera (Bioluminizer®; CAMAG) über ein bestimmtes Zeitintervall detektiert. Auf den resultierenden Graustufenbildern waren die toxisch wirkenden Substanzen aufgrund ihrer biolumineszenzhemmenden Wirkung als dunkel erscheinende Bereiche sichtbar. Die quantitative Erfassung der Biolumineszenzhemmung erfolgte vergleichbar zu dem klassischen Leuchtbakterien-Küvettentest [32] durch den Bezug der detektierten Biolumineszenzhemmung auf einen nicht toxisch wirkenden Referenzbereich durch die Verwendung der Pixelgrauwerte nach Schulz et al. (2008) [100]. Die Auslesung der Pixelgrauwerte der Bilder erfolgte basierend auf der nach Baumgartner et al. (2010) [8] beschriebenen Methode: Die zu quantifizierenden Bildbereiche wurden mit Hilfe der Open Source Software GIMP (GNU Image Manipulation Program) ausgeschnitten, um überflüssige Pixel des Bildes zu eliminieren. Die Auslesung der Pixelgrauwerte des Bildausschnitts, welche für die Berechnung der Biolumineszenzhemmung verwendet wurden, erfolgte mit Hilfe der Open Source Software ImageMagick®. Die eigentliche Berechnung der Biolumineszenzhemmung erfolgte mit Microsoft Excel durch das Auslesen der von der Software ImageMagick® erzeugten Textdatei. Hierfür wurde der Durchschnittswert der Pixelgrauwerte eines Hemmbereiches gebildet und in Relation zu den durchschnittlichen Pixelgrauwerten des Referenzbereiches (rechts und links des Hemmbereichs) gesetzt:

$$H = \frac{I_{Ref} - I_P}{I_0} \cdot 100\% \quad (3.1)$$

mit

H = Biolumineszenzhemmung (%)

I_{Ref} = Leuchtintensität des Referenzbereiches

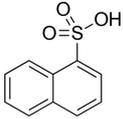
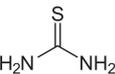
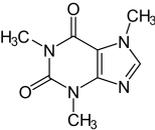
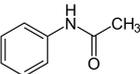
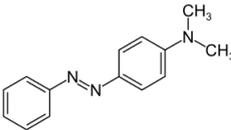
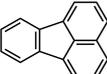
I_{P} = Leuchtintensität des Pobenbereiches

3.1.7 Kontrollstandard

3.1.7.1 Vorhandenes Verfahren

Die Kontrolle eines HPTLC-Laufes erfolgte mit Hilfe eines Kontrollstandards, welcher zu jeder Entwicklung mit auf die HPTLC-Platte aufgetragen wurde. Der Kontrollstandard enthielt insgesamt sechs Substanzen mit log KOW (n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient)-Werten zwischen 1,5–5,0 (Quelle Chemspider Datenbank [18]), um ein möglichst breites Spektrum der aufzutrennenden Substanzen abzudecken. Die Zusammensetzung des Kontrollstandards (siehe Tabelle 3.4) basierte auf den Empfehlungen des Betriebs- und Forschungslabors des Zweckverbandes Landeswasserversorgung Langenau. Für eine Kontrolle der Detektion unter UV-Licht bei 366 nm (Detektion der Eigenfluoreszenz) wurde dem Kontrollstandard zusätzlich Fluoranthren beigefügt. Aufgrund der sehr geringen Polarität des Fluoranthrens wurde Aceton als Lösemittel verwendet. Die pro HPTLC-Entwicklung aufgetragene Menge des Kontrollstandards betrug 30 μL .

Tabelle 3.4 Zusammensetzung des anfänglich verwendeten Kontrollstandards.

Nr.	Substanz	Konzentration (mg/L)	Strukturformel
1	1-Naphtalinsulfonsäure	10	
2	Thioharnstoff	10	
3	Koffein	10	
4	Acetanilid	10	
5	Dimethylgelb	5	
6	Fluoranthren	1,6	

Neben der Kontrolle der Auftrennqualität wurde zusätzlich eine Kontrolle für die Qualität der verwendeten *A. fischeri*-Kultur benötigt, welche ebenfalls über den verwendeten Kontrollstandard abgedeckt werden sollte. Insgesamt sollte der Kontrollstandard demnach folgende Eigenschaften besitzen:

- (1) alle Substanzen sollten unter UV-Licht bei 254 nm und/oder UV-Licht bei 366 nm zu detektieren sein,
- (2) es sollte kein „Ausbluten“ der Substanzflecken durch das Benetzen mit den *A. fischeri*-Bakterien verursacht werden,
- (3) mindestens eine Substanz sollte als Positivkontrolle für die verwendeten *A. fischeri*-Bakterien dienen,
- (4) eine Substanz sollte als Negativkontrolle enthalten sein.

Prinzipiell wurden die oben erwähnten Anforderungen von dem zu Anfang verwendeten Kontrollstandard erfüllt. Die Substanzen Fluoranthren und Dimethylgelb hätten theoretisch als Positivkontrolle für die *A. fischeri*-Detektion dienen können. Allerdings

konnte bei der Substanz Dimethylgelb nach dem Tauchen der HPTLC-Platte ein leichtes „Ausbluten“ beobachtet werden. Zusätzlich waren die R_f -Werte von Dimethylgelb und einer der horizontal verlaufenden „Schmutzbanden“ identisch (siehe Abbildung 3.3). Hierdurch konnte eine reproduzierbare Biolumineszenzhemmung und damit eine Kontrolle der *A. fischeri*-Qualität nicht garantiert werden (vgl. Kapitel 4.1.1.1). Fluoranthen erzielte ebenfalls eine ausreichende Biolumineszenzhemmung und hätte als Positivkontrolle dienen können. Damit Fluoranthen jedoch zusammen mit den anderen Substanzen in einem Gemisch als Kontrollstandard vorliegen konnte wurde als Lösemittel Aceton gewählt. Es zeigte sich, dass es nach einiger Zeit durch Aceton zu einer chemischen Reaktion mit einzelnen Komponenten kam, und die Haltbarkeit des Kontrollstandards dadurch verkürzt wurde. Zudem zeigte sich unter UV-Licht bei 366 nm ein leichter Überladungseffekt von Fluoranthen auf der HPTLC-Platte (siehe Abbildung 3.3). Die restlichen Substanzen erzielten bei der eingesetzten Konzentration keine bis sehr schwache Hemmung und konnten aus diesem Grunde für eine Positivkontrolle nicht in Frage kommen. Weiterhin zeigte sich, dass die Biolumineszenzhemmung der Substanz Thioharnstoff zeitabhängig war (siehe Kapitel 4.1.1.1). Demnach konnte Thioharnstoff nur als Kontrolle für die chromatographische Auftrennung eingesetzt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte der zukünftige Kontrollstandard in Methanol gelöst vorliegen und Fluoranthen optional mit Hilfe der „Overspotting“-Funktion der automatisierten Probenauftragung in den Kontrollmix integriert werden. Als Positiv- und Negativkontrolle kamen die Substanzen Acetanilid, Koffein und 1-Naphtalinsulfonsäure in Frage.

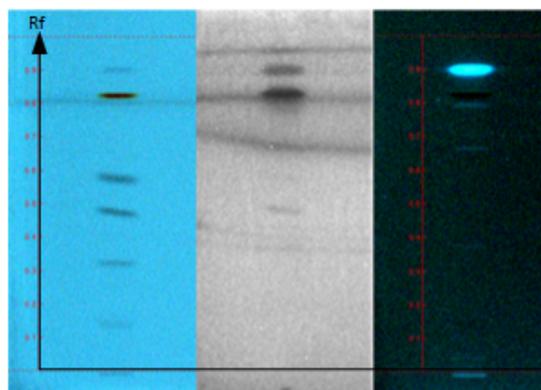


Abbildung 3.3 Aufgetrennter Kontrollstandard; links: Detektion unter UV-Licht (254 nm), mittig: *A. fischeri*-Detektion, rechts: unter UV-Licht (366 nm).

3.1.7.2 Optimiertes Verfahren

Um die Zusammensetzung des „neuen“ Kontrollstandards bestimmen zu können, wurden die Biolumineszenzhemmungen bei acht unterschiedlichen Konzentrationen (1-Naphtalinsulfonsäure, Thioharnstoff, Koffein und Acetanilid: 1000 ng/Bande bis 0,5 ng/Bande; Dimethylgelb: 500 ng/Bande bis 0,25 ng/Bande; Fluoranthen: 155,5 ng/Bande bis 0,08 ng/Bande) des im vorigen Kapitel beschriebenen Kontrollstandards gemessen (siehe Abbildung 3.4).

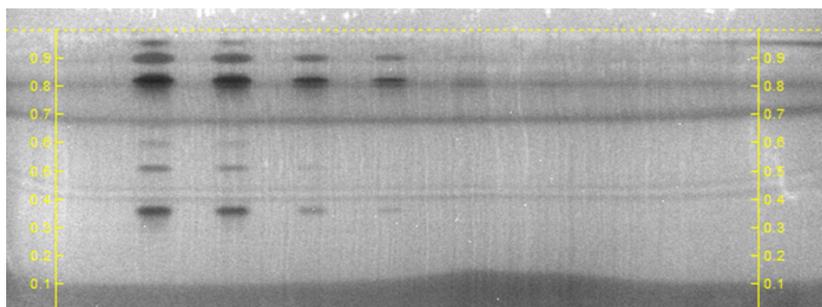


Abbildung 3.4 Detektion der Biolumineszenzhemmung des in unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragenen und aufgetrennten Kontrollstandards.

Auf Basis dieses Ergebnisses wurde ein neuer Kontrollstandard mit MeOH als Lösemittel angesetzt, in dem die Konzentrationen der einzelnen Substanzen so gewählt wurden, dass Koffein als Positiv- (siehe auch Kapitel 4.1.1.1) und Acetanilid als Negativkontrolle für die Überprüfung der *A. fischeri*-Qualität dienen. Fluoranthen lag als Einzellösung in Hexan vor und konnte optional mit Hilfe der „Overspotting“-Funktion des ATS4-Gerätes mit aufgebracht werden. Abbildung 3.5 zeigt die Detektion des aufgetrennten optimierten Kontrollstandards unter UV-Licht bei 254 nm und bei 366 nm als auch die entsprechende Biolumineszenzdetektion. Unter UV-Licht bei 254 nm sind deutlich alle Substanzen bis auf Fluoranthen zu erkennen. Fluoranthen ist unter UV-Licht bei 366 nm deutlich sichtbar. Acetanilid verursacht bei einer Menge von 80,4 ng/Bande keine Biolumineszenzhemmung und konnte demnach als Negativkontrolle verwendet werden. 1-Naphtalinsulfonsäure erzeugt erst bei sehr hohen Auftragemengen eine Biolumineszenzhemmung und wurde mit der maximalen Konzentration angesetzt unter der eine gute Chromatographie ohne Überladung der HPTLC-Platte noch möglich war.

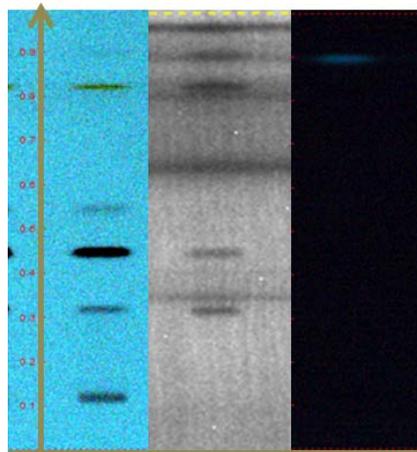


Abbildung 3.5 Detektion des neuen Kontrollstandards, links: UV-Licht bei 254 nm; mittig: *A. fischeri*-Detektion; rechts: UV-Licht bei 366 nm.

In Tabelle 3.5 ist die Zusammensetzung des optimierten Kontrollstandards dargestellt. Das optimale und für weiterführende Versuche verwendete Auftragevolumen betrug 35 μL , Fluoranthen wurde mit Hilfe der „Overspottin“-Funktion zu 15 μL aufgetragen.

Tabelle 3.5 Zusammensetzung des optimierten Kontrollstandards

Nr.	Substanz	Konzentration (mg/L)
1	1-Naphtalinsulfonsäure	25
2	Thioharnstoff	5
3	Koffein	25
4	Acetanilid	2
5	Dimethylgelb	0,7
6	Fluoranthen*	0,6

3.1.8 Probenanreicherung und Blindwerte

3.1.8.1 Vorhandenes Verfahren

Die Anreicherung von Schadstoffen aus Wasserproben erfolgte zu Anfang mit einer vom BSH eingesetzten Methode zur Überwachung von Schadstoffen in Nordsee-, Ostsee- und

Elbewasser. Hierbei werden die Schadstoffe mittels Festphasenextraktion (SPE) angereichert. Zuvor wird den Wasserproben ein Mehrkomponenten Interner Standard zugesetzt. Die Elution von der SPE-Säule erfolgt im Anschluss mit einem gepufferten Gemisch aus MeOH und Acetonitril. Es zeigte sich, dass die mit der beschriebenen Methode hergestellten Extrakte ungeeignet für eine Identifizierung von Schadstoffen mittels HPTLC und *A. fischeri*-Detektion waren. Dies lag zum einen an dem verwendeten Pufferzusatz des Elutionsmittels, welches sich störend auf die HPTLC-Auftrennung auswirkte. Weiterhin zeigte sich, dass während der Elution Verunreinigungen des verwendeten SPE-Materials (Strata-X[®]; Phenomenex) mit herausgelöst wurden, welche eine starke biolumineszenz-hemmende Wirkung besaßen. Diese Blindwerte waren nach der HPTLC-Auftrennung im mittleren R_f-Bereich deutlich sichtbar, weshalb in diesem Bereich eine Detektion toxischer Substanzen nicht mehr möglich war (siehe Abbildung 3.7). Ebenfalls ist die Zugabe eines Internen Standards für eine Effektorientierte Untersuchung als kritisch zu betrachten, da hierdurch falsch-positive Befunde hervorgerufen werden können, wie der Vergleich zweier Elbewasser-Extrakte mit und ohne zugesetztem Internem Standard (27 Komponenten) in Abbildung 3.6 zeigt. Der Extrakt mit zugesetztem Internem Standard zeigt deutlich eine zusätzliche Hemmbande im R_f-Bereich 0,75. Nach der Extraktion des entsprechenden R_f-Bereiches und anschließender HPLC-MS/MS-Detektion wurde die Komponente Metolachlor-D6 als einzige Substanz des zugesetzten Internen Standards im Extrakt nachgewiesen. Zusätzlich wurde ein Non-Target Screening durchgeführt, wobei der R_f-Bereich 0,75 des Extraktes ohne zugesetzten Internen Standard als Vergleichsprobe herangezogen wurde. Hierbei wurden 14 Massen detektiert, welche größtenteils sehr ähnliche Elutionsprofile zeigten und welche in der Vergleichsprobe nicht detektiert wurden bzw. eine wesentlich geringeren Signalintensität aufwiesen.



Abbildung 3.6 Vergleich zweier Elbewasser-Extrakte: links: ohne Internen Standard; rechts: mit Internem Standard

3.1.8.2 Optimiertes Verfahren

Aufgrund der oben beschriebenen Problematiken wurde bei der Extrakterstellung für die Detektion toxischer Substanzen in Wasserproben auf die Zugabe von Internen Standards sowie der Zugabe von Puffern zum Elutionsmittel verzichtet. Weiterhin wurde nach für die *A. fischeri*-Detektion geeigneteren SPE-Materialien gesucht. Folgende SPE-Materialien, mit ähnlichen Adsorptionseigenschaften wie das Strata-X[®] SPE-Material, wurden auf Blindwerteigenschaften hin untersucht:

- (1) Oasis HLB (Waters),
- (2) HR-X (85 μm , CHROMABOND[®]),
- (3) HR-X (45 μm , CHROMABOND[®]),
- (4) ISOLUTE[®] C 18 (Biotage).

Die Bestimmung der Blindwerte (Doppelbestimmung) erfolgte mit Reinstwasser (Milli-Q[™], MERCK) entsprechend den Extraktionsschritten für die Anreicherung von Schadstoffen aus realen Probewässern (siehe Kapitel 3.1.8.3). Die Abbildung 3.7 zeigt die Blindwertextrakte der unterschiedlichen SPE-Materialien im Vergleich zum Strata-X Material nach deren HPTLC-Auftrennung nach der *A. fischeri*-Detektion. Die Ergebnisse zeigen, dass alle SPE-Materialien einen einheitlichen Blindwert im R_f -Bereich 0,8 aufweisen. Hingegen ist das SPE-Material Strata-X (Bande 10 und 12) das einzige SPE-Material, welches zusätzlich eine starke Biolumineszenzhemmung im R_f -Bereich 0,3 sowie eine schwache Biolumineszenzhemmung im R_f -Bereich 0,7 aufweist. Während beim einheitlichen Blindwert eine prozessbedingte Verunreinigung nicht ausgeschlossen werden kann, weisen die zusätzlichen Blindwerte des Strata-X-[®] Materials auf Verunreinigungen des SPE-Materials hin. Die SPE-Materialien OASIS HLB, HR-X und ISOLUTE C18 sind bezüglich der Blindwerte für die *A. fischeri*-Detektion als gleichwertig zu beurteilen. Der Extrakt des SPE-Material ISOLUTE C18 zeigte jedoch nach der Aufkonzentrierung eine stark haftende Filmbildung an den Wandungen der BÜCHI-Gläser, welche sich weder durch Einweichen in einem Mucosal[®]-Bad noch durch Säure- oder Basenbehandlung entfernen ließ. Aufgrund der Eigenschaft des SPE-Materials OASIS HLB auch polare Substanzen anreichern zu können wurde entschieden, das Strata-X-Material durch OASIS HLB zu ersetzen.

3.1.8.3 Probenahme und Extraktion von Elbewasserproben

Die Probenahme der Elbewasserproben erfolgte in Wittenbergen (Hamburg) von einem Steg aus. Die Probenahmetiefe betrug 1m. Es wurden jeweils zwei unabhängige Elbe-

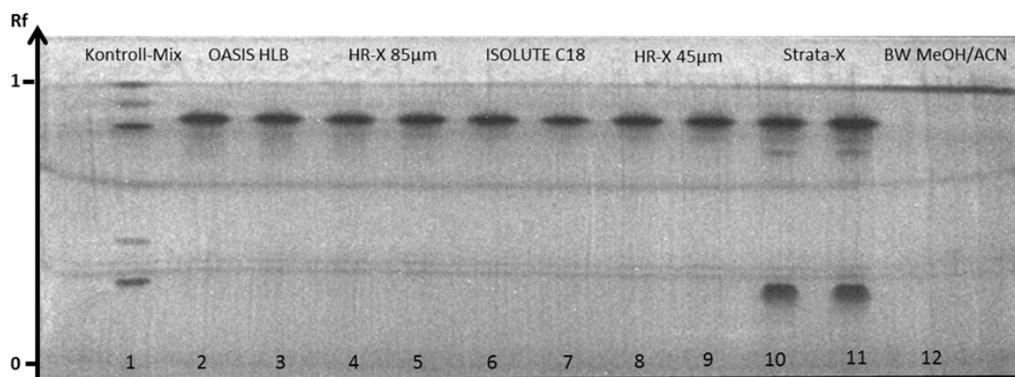


Abbildung 3.7 Blindwerte der getesteten SPE-Materialien.

wasserproben (2 L) gewonnen.

Die Extraktion der Elbehochwasserproben erfolgte zu Anfang mittels Festphasenextraktion mit dem polymerbasierten Umkehrphasensorbens Strata-X[®] (Phenomenex). Aufgrund des auftretenden Blindwertes bei der *A. fischeri*-Detektion wurde für die Extraktion weiterer Elbewasserproben das copolymerere Festphasenmaterial OASIS[®] HLB (Waters) verwendet (siehe 3.1.8). In beiden Fällen erfolgte die Extrakterstellung automatisch mit Hilfe einer BSH-internen Extraktionsapparatur. Hierbei wurden 2 L Elbewasserprobe durch mit 1,5 g des jeweiligen Festphasenmaterials gefüllte 12 mL Polypropylen Kartuschen (Phenomenex) gepumpt. Das Festphasenmaterial wurde zuvor mit 200 mL Methanol HPLC Grade (J.T.Baker[®]) und 40 mL Reinstwasser (Milli-Q[™], MERCK) konditioniert. Die Partikelabtrennung erfolgte über ein vorgeschaltete, mit 1,7 g Glaswolle gefüllte 12 mL Polypropylen Kartusche (Phenomenex). Im Anschluss an die Probenextraktion erfolgte ein Spüldurchgang der Festphasenkartusche mit 100 mL Reinstwasser (Milli-Q[™], MERCK). Nach dem Trocknen des Festphasenmaterials mit Stickstoff wurde die Festphase mit 9 mL eines Methanol/ Acetonitril (70/30; v/v) Gemisches eluiert. Das Eluat wurde anschließend mit einem Parallelverdampfer (Syncore[®] Analyst, Büchi) auf ca. 0,3 mL eingengt. Nachdem der Extrakt in ein 1,5 mL Vial überführt wurde, erfolgte eine Spülung des Parallelverdampfer-Glases mit Methanol/ Acetonitril (70/30; v/v). Die Spüllösung wurde ebenfalls in das Vial mit dem Extrakt überführt und der Extrakt wurde darauffolgend durch Stickstoff-Abblasung auf 0,8 mL eingengt.

3.1.8.4 Probenahme und Extraktion von Meerwasserproben

Die an jeder Messstation gewonnen Meerwasserproben wurden jeweils doppelt beprobt. Zusätzlich wurde parallel für eine evtl. Quantifizierung von Schadstoffen eine Meerwasserprobe mit zugesetztem Internen Standard extrahiert. Die Extraktion der gewonnenen

Meereswasserproben wurde identisch zu den Elbewasserproben durchgeführt. Das Extraktionsvolumen der Meerwasserproben, welche an den Probenahmestationen NSB3 und DTEND (siehe Abbildung 4.5) genommen wurden, lag aufgrund geringer Schadstoffkonzentration bei 5 L.

3.1.9 Non-Target Screening HPLC-MS/MS

Für das Non-Target Screening war es notwendig, die Messbedingungen so zu wählen, dass eine ausreichend hohe Signalintensität der in den zu untersuchenden Proben enthaltenden Substanzen für die anschließende Peakdetektion erzielt werden konnte. Deren Identifizierung erfolgte anschließend durch gezielte Fragmentierungsexperimente und den Abgleich der gewonnenen Daten mit Datenbanken. Das Non-Target Screening von Schadstoffen erfolgte mit einer HPTLC (Dionex Ultimate 3000)-MS/MS (QTrap 5500; AB Sciex) Kopplung. Für die chromatographische Trennung wurde eine RP-Trennsäule (Kinetex C18; Phenomenex) mit einer Länge von 100 mm, einem Durchmesser von 2 mm und einer Partikelgröße von 2,6 μm verwendet. Der Trennsäule wurde zum Schutz vor Verunreinigungen eine Vorsäule (SecurityGuard Cartridge Aqua C18; Phenomenex) vorgeschaltet. Die chromatographische Trennung erfolgte mit Hilfe eines Gradientenprogrammes. Die Chromatographiezeit betrug 35 min bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,17 mL/min. Die verwendeten Eluenten waren Wasser (Milli-QTM, MERCK) und Methanol (MeOH HPLC Grade; J.T.Baker®). Der Einfluss verschiedener Eluentenzusätze auf die Signalintensitäten von Substanzen wird im folgenden Kapitel 3.1.11 beschrieben. Das verwendete Gradientenprogramm ist in Tabelle 3.6 dargestellt. Die Temperatur während eines HPLC-Laufes wurde mit Hilfe eines Säulenofens konstant auf 28 °C gehalten.

Tabelle 3.6 HPLC-Gradientenprogramm für das Non-Target Screening. Äquil. = Äquilibration

	Äquil.		Analyse		
Zeit (min)	5,5	0,3	5	29	35
MeOH (%)	10	10	30	95	95
Flow (mL/min)	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17

Als Ionisierungsquelle wurde eine Elektrosprayionisation (ESI) verwendet, deren Spannungspolarität innerhalb eines Messlaufes auf positiv (+ 5500 V) oder negativ (− 4500 V) gestellt wurde. Die Temperatur der ESI-Quelle lag bei 400 °C. Für das Non-Target Screening wurde eine Scanrate von 10000 Da/s sowie die Berechnung der Signalintensitäten durch die Aufsummierung von jeweils drei Scans gewählt. Die Messung der m/z-

Verhältnisse erfolgte mit der Ionenfallen-Funktion des verwendeten MS-Gerätes (Enhanced MS-EMS Scan). Die gezielte Fragmentierung bestimmter Substanzen nach der Auswertung der EMS Scan-Läufe (siehe Kapitel 3.1.13) erfolgte in einem erneuten Scan-Lauf im EMS-EPI (Enhanced Product Ion Scan) Modus. Die Substanzen wurden hierbei mit drei diskreten Kollisionsenergien (CE) von 20 eV, 35 eV und 50 eV fragmentiert und die gebildeten Produktionen wurden im Anschluss durch einen Scan-Lauf erfasst. Die notwendigen Messeinstellungen wurden über die Software Analyst 1.5.1 vorgenommen.

3.1.10 HPTLC-Platten Elution

3.1.10.1 Vorhandenes Verfahren

Für die Identifizierung der als toxisch detektierten Substanzen war deren Elution von der HPTLC-Platte für das anschließende Non-Target Screening erforderlich. Aufgrund der in einer Umweltprobe unbekanntem Schadstoffkonzentrationen wurde eine möglichst vollständige Elution der Substanzen angestrebt, um die Wahrscheinlichkeit für ausreichend hohe Analytsignale bei der HPLC-MS/MS Analytik zu erhöhen und somit eine entsprechende Peakdetektion zu ermöglichen. Hierfür stand ein TLC-MS Interface (CAMAG) zur Verfügung, welches mit Hilfe eines absenkbaren Elutionskopfes eine Elution des entsprechenden HPTLC-Plattenbereiches ermöglichte (siehe Abbildung 3.8). Die Elution erfolgte zu Anfang manuell mit einer Mikroliterspritze (Hamilton), wobei das Eluat in einem Vial aufgefangen wurde. Die Extraktionseffizienz wurde mit Hilfe eines Schadstoffgemisches, bestehend aus 52 Substanzen, getestet. Das Schadstoffgemisch wurde in einer definierten Konzentration auf die HPTLC-Platte aufgetragen und die Extraktionseffizienz wurde mit 250 μL sowie 500 μL des Extraktionsmittels (MeOH/ACN; 70/30; v/v) als jeweilige Dreifachbestimmung ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass eine Erhöhung des Extraktionsvolumens keine Erhöhung der Wiederfindung zur Folge hatte. Während die durchschnittliche relative (auf den Internen Standard bezogene) Wiederfindung bei einem Extraktionsvolumen von 250 μL bei $71,8\% \pm 9,9\%$ lag, so wurde bei einem Extraktionsvolumen von 500 μL eine durchschnittliche relative Wiederfindung von $68,9\% \pm 11,5\%$ erzielt (siehe Tabelle 3.7).

Nachteilig an diesem Verfahren erwies sich der hohe Zeitaufwand. Neben der Tatsache, dass nach jedem Extraktionsschritt die Ausgangsleitung gespült werden musste, um eventuelle Kontaminationen für die nachfolgenden Extraktionen zu vermeiden, so kam es sehr häufig aufgrund von Kieselgelpartikeln zu einem Verstopfen des Elutionsausganges. Eine solche Verstopfung konnte nur kurzfristig mit der dafür vorgesehenen Druckluftspülung beseitigt werden, in den meisten Fällen war der Ausbau des Elutionskopfes und

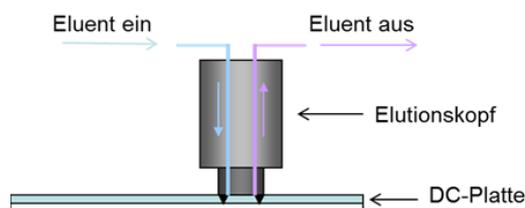


Abbildung 3.8 Schematische Abbildung des für die HPTLC Elution verwendeten Elutionskopfes (verändert nach [76].)

dessen Reinigung im Ultraschallbad erforderlich.

3.1.10.2 Optimiertes Verfahren

Um den benötigten Zeitaufwand des oben beschriebenen Verfahrens zu reduzieren, wurde nach Alternativen für die Extraktion von Substanzen von der HPTLC-Platte gesucht. Durch ein kurzzeitiges Absenken des Elutionskopfes war es möglich, den entsprechenden Bereich auf der HPTLC-Platte auszustanzen. Das so entstandene Kieselgelplättchen konnte nun in ein Spitzvial überführt und durch Zugabe des Extraktionsmittels (250 μL MeOH/ACN; 70/30; v/v) als „Batch“ extrahiert werden. Die Extraktionszeit betrug 30 min. Die Extraktionseffizienz wurde ebenfalls mit dem zuvor beschriebenen Schadstoffmix als Dreifachbestimmung ermittelt. Hierbei zeigte sich eine um etwa 12 % verminderte durchschnittliche relative Wiederfindungsrate der Analyten (58 % \pm 8,4 %). Tabelle 3.7 zeigt die durchschnittlichen Wiederfindungsraten mit den zugehörigen Standardabweichungen der getesteten Analyten für die drei Extraktionsverfahren.

Tabelle 3.7 Vergleich der durchschnittlichen relativen Wiederfindungen (WDF) und Standardabweichungen (STAW) der verwendeten Analyten für die drei getesteten Extraktionsverfahren.

Extraktion	Flow (250 μL)	Flow (500 μL)	Batch
WDF (%)	71,8	68,9	58,0
STAW	9,9	11,5	8,4

Trotz der schlechteren Wiederfindungsrate wurde das Batch-Verfahren aufgrund der einfacheren Handhabung und der daraus resultierenden Zeitersparnis gewählt. Für das Non-Target Screening wurde die hieraus folgende Konzentrationsminderung der Proben-substanzen im zu untersuchenden Extrakt durch eine entsprechende Aufkonzentrierung kompensiert. Probenextrakte wurden jeweils als Dreifachbestimmung auf die HPTLC-Platte aufgetragen und anschließend entwickelt. Der zu untersuchende R_f -Bereich wurde bei allen drei Proben ausgestanzt und die so erhaltenen drei Kieselgelplättchen wur-

den mit 300 μL für 30 min extrahiert und im Anschluss auf 50 μL durch Stickstoff-Abblasung eingengt. Vor dem Aufkonzentrierungsschritt wurden die Proben mit einem Drei-Komponenten-Injektionsstandard versetzt, um die Qualität einer Messung beurteilen zu können.

3.1.11 Eluentenauswahl für die RP-HPLC-MS

Die Auswahl des HPLC-Eluenten besitzt neben der chromatographischen Auftrennungsleistung ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die vom Massenspektrometer detektierten Signalintensitäten einzelner Substanzen. Zum einen tragen die den Eluenten zugesetzten Puffer zur Ionisierung der zu detektierenden Substanzen bei, zum anderen können die Eluenten Verunreinigungen enthalten, welche somit kontinuierlich in das MS gelangen und dort die Ionisierung der Analyten und/oder deren Signal/Rausch-Verhältnis verschlechtern, so dass eine Peakdetektion erschwert wird.

3.1.11.1 Vorhandenes Verfahren

Zu Anfang wurde für das Non-Target Screening der HPLC-Eluent verwendet, welcher für die Monitoring-Messungen des BSH von organischen Spurenstoffen, wie bspw. Pestizide und Pharmazeutika, in Meerwasserproben eingesetzt wurde. Der Eluent bestand aus Reinstwasser (Milli-QTM, MERCK) und Methanol HPLC Grade (J.T.Baker®) mit jeweiligen Zusätzen an 64 mM Essigsäure und 50 mM Ammoniumacetat. Die ersten Full-Scan Versuche (100 Da–1000 Da) mit definierten Standards zeigten jedoch stark veräuschte Massenspuren mit entsprechend schlechten Signal/Rausch-Verhältnissen sowie neben dem Analyten-Signal-Peak zusätzliche, durch Verunreinigungen hervorgerufene „Blindwert-Peaks“. Abbildung 3.9 zeigt beispielhaft die Massenspur eines Internen Standards Atrazin-D5 ($t_{\text{R}} = 17,36$ min). Atrazin-D5 lag bei diesem Versuch in einer Konzentration von 4 ng/L vor. Das S/N-Verhältnis wurde mit dem S/N-Skript der Auswertesoftware Analyst 1.5.1 ermittelt und lag für Atrazin-D5 bei einem Wert von drei ($S/N = 3$).

3.1.11.2 Optimiertes Verfahren

Aufgrund der schlechten S/N-Verhältnisse der getesteten Analyten und den beim Full-Scan detektierten Verunreinigungen wurden zusätzlich zwei Zusätze zu den Eluenten Wasser und Methanol getestet:

1. Methansäure

Basierend auf der Veröffentlichung von Hug et al. [57] wurde 0,1 % Methansäure (CHOOH)

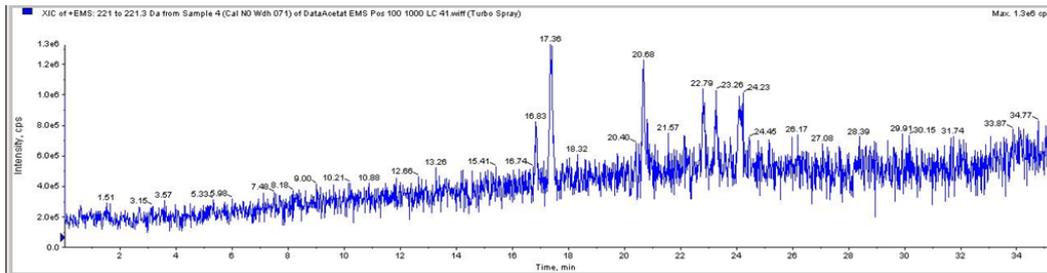


Abbildung 3.9 Extrahierte Massenspur des Analyten Atrazin-D5 ($t_R = 17,36$ min).

als einziger Zusatz zu den Eluenten gewählt. Hierbei zeigte sich eine deutliche Verbesserung des S/N-Verhältnisses der getesteten Analyten-Signale sowie eine deutliche Reduzierung von detektierten Verunreinigungen. Am Beispiel von Atrazin-D5 konnte durch den alleinigen Zusatz von Methansäure eine Erhöhung des S/N-Verhältnisses um den Faktor ~ 3 erzielt werden. Abbildung 3.10 zeigt die Massenspur des Analyten Atrazin-D5 (vgl. Abbildung 3.9) sowie die Massenspur des im negativen Ionenmodus gemessenen Internen Standards PFOA- $^{13}\text{C}_4$ ($t_R = 23,3$ min; S/N = 12,3).

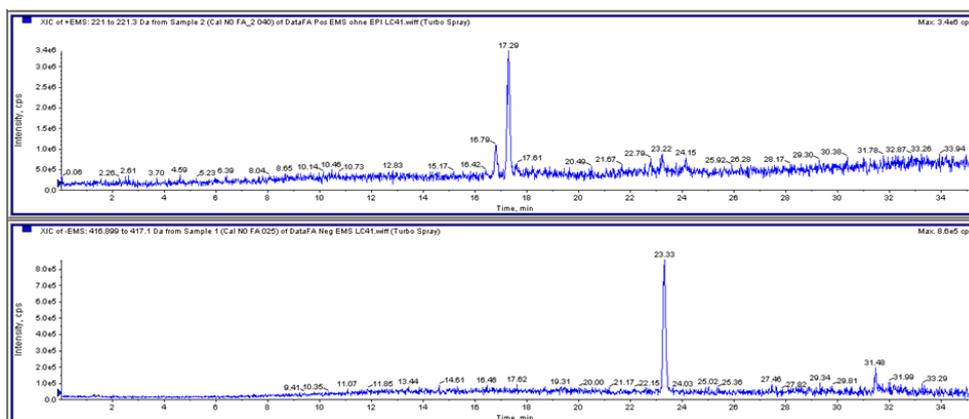


Abbildung 3.10 Extrahierte Massenspektren der Internen Standards Atrazin-D5 (oben) und PFOA- $^{13}\text{C}_4$ (unten) bei einem Eluentenzusatz von 0,1 % Methansäure.

2. Methansäure und Ammoniumhydroxid

Zusätzlich zu dem nur mit Methansäure versetzten Eluenten wurde weiterhin der Zusatz von 0,05 % Methansäure und 0,025 % Ammoniumhydroxid (NH_4OH) zu den Eluenten Wasser und Methanol untersucht. Hierdurch konnte im Vergleich zu dem Zusatz von 0,1 % Methansäure für die meisten Analyten eine weitere Erhöhung des S/N-Verhältnisses erzielt werden. Am Beispiel von Atrazin-D5 erhöhte sich das S/N-Verhältnis von neun (ausschließlich Methansäure) auf einen Wert von 17 (Zusatz von Methansäure + Ammoniumhydroxid). Das S/N-Verhältnis des im negativen Ionenmodus gemessenen Analyten PFOA- $^{13}\text{C}_4$ erhöhte sich von 12 auf einen Wert von 39.

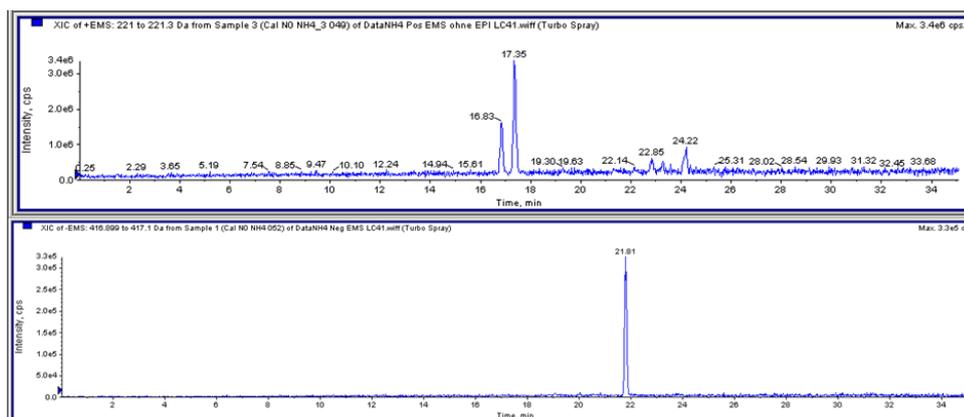


Abbildung 3.11 Extrahierte Massenspektren der Internen Standards Atrazin-D5 (oben) und PFOA- $^{13}\text{C}_4$ (unten) bei einem Eluentenzusatz von Methansäure und Ammoniumhydroxid.

Tabelle 3.8 stellt zusammenfassend die gemessenen Intensitäten sowie die S/N-Werte von jeweils drei im positiven und negativen Ionenmodus gemessenen Analyten dar.

Tabelle 3.8 Signalintensitäten (Peakhöhe H) und S/N-Verhältnisse von sechs Analyten bei unterschiedlichen Eluentenzusätzen; n.g. = nicht gemessen.

Analyt	Acetat-Puffer		CHOOH		CHOOH + NH_4OH	
	Peak (H)	S/N	Peak (H)	S/N	Peak (H)	S/N
Metolachlor-D6	1,0 E6	8,6	1,5 E6	8,3	3,4 E6	22,0
Terbutylazin-D5	1,2 E6	3,0	3,8 E6	14,8	4,4 E6	14,2
Atrazin-D5	8,6 E5	3,1	3,0 E6	9,1	3,1 E6	16,8
PFOS- $^{13}\text{C}_4$	n.g.		3,9 E6	34,9	8,8 E5	92,8
PFOA- $^{13}\text{C}_4$	n.g.		7,9 E5	12,3	3,3 E5	39,2
Bentazon-D6	n.g.		4,2 E6	76,5	6,9 E5	153,3

Basierend auf den Ergebnissen konnten mit dem Zusatz von 0,05 % Methansäure und 0,025 % Ammoniumhydroxid zu den Eluenten die besten S/N-Verhältnisse für die getesteten Analyten erzielt werden, weshalb dieser Eluent für die Non-Target-Analytik gewählt wurde.

3.1.12 MS-Scanmodus und Scanbereich

3.1.12.1 Scanmodus

Für das Non-Target Screening wurde zu Anfang der Enhanced Mass Spectra (EMS)-Scan mit integriertem Enhanced Product Ion (EPI)-Scan gewählt. Dieser Scan-Modus besitzt den Vorteil, dass innerhalb eines Full-Scanlaufes zusätzlich Informationen über die Struktur einer detektierten Substanz durch deren gezielte Fragmentierung gesammelt werden kann. Basierend auf einem ausgewählten Schwellenwert werden eine gewählte Anzahl an Substanzen mit den höchsten Signalintensitäten eines Scanzykles zusätzlich fragmentiert und deren Produktionen gescannt. Zu Anfang wurde die Anzahl der zu fragmentierenden Substanzen pro Scanzzyklus auf drei begrenzt, da mit zunehmender Anzahl an Fragmentierungen eine Verkürzung des EMS-Scanzykles mit entsprechenden Verringerungen der S/N-Verhältnisse der einzelnen Substanzen einherging. Hierbei zeigte sich jedoch, dass hauptsächlich Substanzen der untersuchten Proben fragmentiert wurden, welche ebenfalls in den zugehörigen Blindwerten vorhanden waren. Demzufolge wurde auf die Integrierung des EPI-Scans verzichtet und das Non-Target Screening nach folgenden Schritten durchgeführt:

1. EMS-Full Scan (100 Da–1000 Da),
2. Peakdetektion und Peakeleminierung (Blindwert) mit PeakView 1.2 (siehe Kapitel 3.1.13),
3. Gezielte Fragmentierung der rausgefilterten Peaks nach der Plausibilitätsprüfung,
4. Abgleich der Fragmentierungsmuster mit Datenbanken (DAIOS, MassBank).

3.1.12.2 Scanbereich

Innerhalb eines Non-Target Scanlaufes sollen so viele Substanzen wie möglich erfasst werden. Prinzipiell gilt hierbei, dass mit zunehmenden Massenscanbereich die Scanzeit pro Massenbereich verkürzt wird. Da sich solch eine verkürzte Scanzeit negativ auf die Signalintensitäten der zu detektierenden Analyten auswirken und damit eine Peakauswertung erschwert werden kann, wurde der in Kapitel 3.1.11 verwendete Standard unter Verwendung des optimierten Eluent bei einer Halbierung des Massen-Scanbereiches (100 Da–500 Da) erneut im EMS-Scanmodus vermessen. Hierbei zeigte sich keine Verbesserung der Qualität der Analytensignale im Vergleich zu der Vermessung des Standards innerhalb des Massenbereiches von 100 Da–1000 Da. Abbildung 3.12 zeigt die Massenspur des Analyten Atrazin-D5 eines Scanlaufes über einen Massenbereich von 100 Da–500 Da. Sowohl Signalintensität als auch das S/N-Verhältnis waren identisch mit den

Messungen eines Scanlaufes von 100 Da–1000 Da (vgl. Abbildung 3.11). Entsprechend wurde entschieden für das Non-Target Screening die erforderlichen Scanläufe über einen Massenbereich von 100 Da–1000 Da durchzuführen.

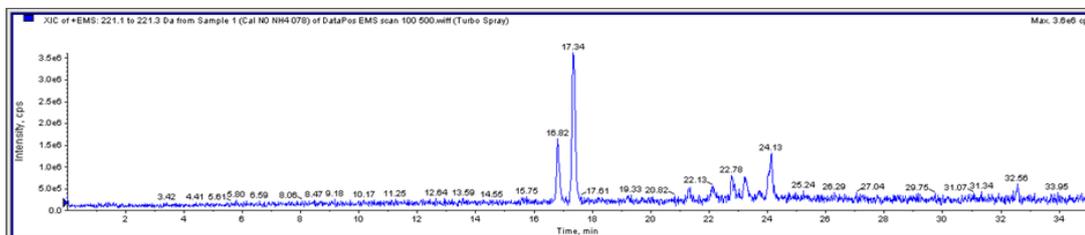


Abbildung 3.12 Extrahierte Massenspur des Analyten Atrazin-D5 ($t_R = 17,34$ min) eines Scanlaufes über den Massenbereich 100 Da–500 Da.

Für das Non-Target Screening wurde daher der Scan-Massenbereich von 100 Da–1000 Da beibehalten.

3.1.13 Peakdetektion

Nach den durchgeführten Scanläufen war es erforderlich, die detektierten Substanzen in Form einer Peakliste (gemessene Masse und zugehörige Retentionszeit) gegen die Messung eines zugehörigen Blindwertes abgleichen zu können, um für die nachfolgende gezielte Fragmentierung Verunreinigungen nicht mit einzubeziehen. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Auswertesoftware Programme getestet. Die Ergebnisse werden nachfolgend beschrieben.

3.1.13.1 MZmine

Zu Anfang wurde die Open Source Software MZmine 2 [90] für die Peakdetektion herangezogen. Die Effizienz der Peakdetektion wurde mit einem Standard bestehend aus 41 Substanzen (39 Analyten und zwei deuterierte Injektionsstandards) getestet. Nach einem Abgleich der generierten Peakliste des Standardmixes mit der des zugehörigen Blindwertes sollten demnach im Idealfall 39 Peaks detektiert werden. Das Ergebnis zeigte jedoch insgesamt 900 detektierte Peaks. Diese hohe Anzahl lässt sich durch die Auslegung der Software für hochauflösende anstelle von (wie in diesem Falle vorliegenden) niedrig auflösenden MS-Daten erklären. Eine entsprechende Fehlinterpretation der Daten mit vielen falsch-positiven Ergebnissen ist die Folge. Der 41-Komponentenstandard wurde im Rahmen einer einmaligen Versuchsreihe am UFZ Leipzig, Fachgebiet für Wirkungsorientierte Analytik, ebenfalls mit einem hochauflösendem MS (XL Orbitrap, Thermo Fisher) vermessen. Die Auswertung der Daten mit MZmine ergab nach einem Blindwert-

abgleich eine stark reduzierte Anzahl detektierter Peaks von 136, welches ein wesentlich realistischeres Ergebnis darstellt. Der Vergleich beider Versuche zeigte, dass MZmine 2 für die Auswertung der Scanläufe der für das Non-Target Screening verwendeten QTrap nicht geeignet zu sein schien, weshalb nach Alternativen für die Auswertung der Scan-Daten gesucht werden musste.

3.1.13.2 Peak View 1.2

Als Alternative zur Software MZmine 2 wurde die Software Peak View 1.2 getestet, welche als Demo-Version von AB Sciex zur Verfügung gestellt wurde. Die Auswertung der Scandaten des oben erwähnten Standardmixes und der Abgleich mit dem zugehörigen Blindwert erbrachte mit der Software Peak View 1.2 eine detektierte Peakanzahl von 52. Dieses Ergebnis lässt sich darauf zurückführen, dass die Software Peakview 1.2 besser auf die Daten der QTrap angepasst ist und damit weniger falsch-positive Ergebnisse erzeugt werden. Im Vergleich zu dem Datensatz des hochauflösenden Massenspektrometers kann eine Reduzierung der Peakanzahl ebenfalls durch die niedrige Auflösung (zwei Substanzen werden bei ähnlicher Retentionszeit und ähnlicher Masse zusammengefasst) als auch durch ein schlechteres S/N Verhältnis (Peak ist für die Software nicht erkennbar) zustande kommen. Unter den 52 detektierten Peaks konnten 29 Peaks den im Standard verwendeten Analyten zugeordnet werden. Bei den restlichen 10 Analyten waren die Messsignale nicht vorhanden oder zu gestört, um von der Software herausgefiltert werden zu können. Aufgrund dieses sehr guten Ergebnisses wurde Peak View 1.2 als Auswertesoftware für das Non-Target Screening gewählt. Folgende Einstellungen wurden für die Peakdetektion verwendet: ungefähre Peakweite von 12 s, Mindestintensität 30 counts, Vervielfacher Chemisches Rauschen 1,5. Ein Substanz kam für ein Fragmentierungsexperiment in Frage, wenn deren Signalintensität mindestens um den Faktor drei höher lag als die des zugehörigen Blindwertes.

3.1.14 Plausibilitätsprüfung-Peakauswahl

Nachdem ein HPTLC-Probenextrakt und der zugehörige Blindwert im EMS-Full Scan gemessen und anschließend ein Abgleich der beiden Peaklisten durchgeführt wurde, sollten daraufhin in einem zweiten Scanlauf gezielt Substanzen fragmentiert werden. Für den hierfür eingesetzten EMS-EPI-Scan Modus gab es die Möglichkeit, mit Hilfe einer „Inclusion-Liste“ insgesamt sieben zu fragmentierende Substanzen festzulegen. Zusätzlich wurden pro Scanperiode die zwei Substanzen mit den höchsten gemessenen Intensitäten fragmentiert. Da in den meisten Fällen die Anzahl der für eine Fragmentierung in Frage kommenden Substanzen die Anzahl der möglichen Einträge in die „Inclusion-Liste“

überstieg, wurden entsprechende Auswahlkriterien benötigt. Es wurde daher überprüft, ob ein möglicher Zusammenhang zwischen der HPLC-Retentionszeit einer detektierten Substanz und deren R_f -Wert besteht, so dass nur Substanzen für eine Fragmentierung in Betracht gezogen werden sollten, welche einem bestimmten Retentionszeitfenster zugeordnet werden konnten. Hierfür wurden die R_f -Werte und die Retentionszeiten von insgesamt 41 Analyten miteinander korreliert. Hierbei zeigte sich, dass für 24 Analyten (siehe Anhang Tabelle 6) für bestimmte Retentionszeitfenster ein Zusammenhang zum zugehörigen R_f -Wert besteht. Die R_f -Werte wurden hierfür in zwei Klassen unterteilt (Klasse 1: R_f -Wert $< 0,6$, Klasse 2: R_f -Wert $> 0,6$). Abbildung 3.13 zeigt den Zusammenhang zwischen den in zwei Klassen eingeteilten R_f -Werten und den zugehörigen Retentionszeiten.

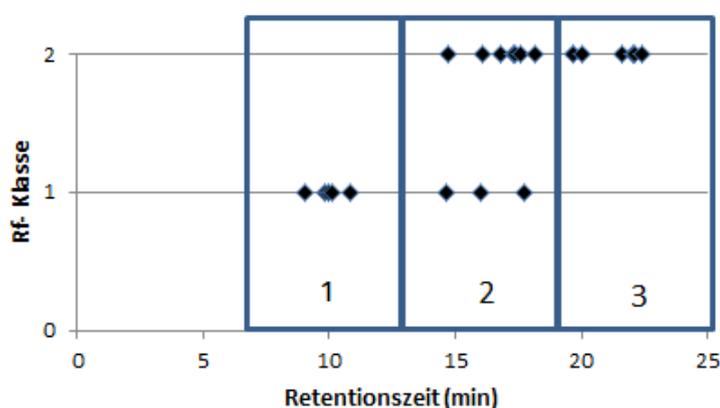


Abbildung 3.13 Zusammenhang zwischen den in zwei Klassen eingeteilten R_f -Werten (Klasse 1: R_f -Wert $< 0,6$, Klasse 2: R_f -Wert $> 0,6$) und den zugehörigen HPLC-Retentionszeiten

Aus Abbildung 3.13 ist ersichtlich, dass es für einige Substanzen ein Zusammenhang zwischen den HPTLC- R_f -Werten und den HPLC-Retentionszeiten zu geben scheint: Substanzen, welche eine niedrige Retentionszeit (Bereich 1 der Abbildung 3.13) aufweisen, lassen sich ausschließlich der Klasse 1 zuordnen. Substanzen, welche mittlere Retentionszeiten (Bereich 2) aufweisen, konnten hingegen nicht eindeutig einer R_f -Klasse zugewiesen werden. Die Substanzen, welche eine hohe Retentionszeit (Bereich 3) besitzen, konnten ausschließlich der R_f -Klasse 2 zugeordnet werden. Hierdurch konnte ein grobes Auswahlkriterium für die zu fragmentierenden Substanzen angewendet werden. Wurde bspw. ein HPTLC-Extrakt der R_f -Klasse 2 analysiert, so wurden in der Folgeanalyse vorzugsweise nur Substanzen fragmentiert, welche höhere Retentionszeiten aufwiesen. Hierbei ist zu betonen, dass dies eine Auswahlmethode unter vielen ist und hierdurch der Fokus auf Substanzen gelegt wird, welche sich „konservativ“ verhalten (polar = niedriger

R_f -Wert und niedrige t_R ; unpolar = hoher R_f -Wert und hohe t_R). Dies wird durch die restlichen 17 in die Untersuchung mit einbezogenen Analyten deutlich. Hierbei handelte es sich um Analyten aus der Klasse der Perfluorierten Substanzen (PFCs), welche hohe n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten aufweisen ($\log KOW$ 3– $\log KOW$ 13 [18]). Die Untersuchungen ergaben, dass alle 17 PFCs trotz hoher $\log KOW$ -Werte im unteren R_f -Bereich (R_f 0– R_f 0,3) der HPTLC-Platte zu finden waren, was sich mit den stark oberflächenaktiven Eigenschaften dieser Schadstoffgruppe begründen lässt [20].

Nach der Fragmentierung der ausgewählten Substanzen wurden die somit erhaltenen Fragmentmuster mit Datenbankeinträgen verglichen. Vor dem Hintergrund, dass eine eindeutige Identifizierung von Substanzen nur durch den Abgleich mit einer unter identischen Messbedingungen analysierten Referenzsubstanz möglich ist, sollte aufgrund der damit verbundenen hohen Kosten, bei einer Datenbankübereinstimmung, eine erste Plausibilitätsprüfung durchgeführt werden, welche sich bei der Identifizierung von unbekanntem Substanzen bewährt hat [61, 69]. Hierfür wurde das Vorhandensein eines charakteristischen Isotopenpeaks kontrolliert und es erfolgte eine Retentionszeitabschätzung anhand des $\log KOW$ -Wertes der in der Datenbank hinterlegten Substanz. Für viele Substanzen, welche sich nicht stark basisch oder stark sauer verhalten und einen $\log KOW$ -Wert zwischen 0–6 aufweisen, ist es möglich, den $\log KOW$ -Wert anhand der Retentionszeit einer HPLC-Messung unter der Verwendung eines RP-Materials als stationäre Phase zu bestimmen [50, 88]. Entsprechend ist es im Umkehrschluss möglich die Retentionszeit einer Substanz basierend auf deren Stoffeigenschaften für eine RP-HPLC-Messung abzuschätzen. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendete RP-HPLC Methode konnte eine deutliche Korrelation zwischen den $\log KOW$ -Werten der im zuvor beschriebenen Versuch verwendeten 24 Substanzen (siehe Anhang Tabelle 6) und deren Retentionszeiten festgestellt werden (siehe Abbildung 3.14).

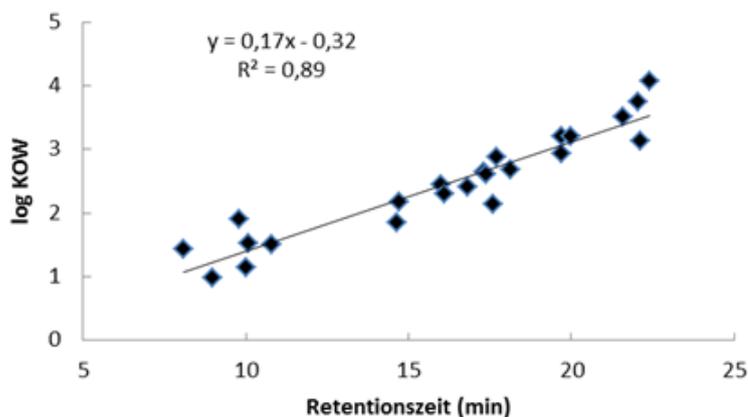


Abbildung 3.14 Korrelation zwischen den log KOW-Werten von 24 Substanzen und deren zugehörige Retentionszeiten (min) für die verwendete RP-HPLC Messung.

Nachdem die charakteristischen Fragmentmuster der fragmentierten Substanzen mit Datenbankeinträgen verglichen wurden, konnte bei einer Fragmentmusterübereinstimmung der log KOW-Wert genutzt werden, um basierend auf der Korrelation in Abbildung 3.14 die zugehörige Retentionszeit zu berechnen. Lag die berechnete Retentionszeit innerhalb des nach der im Anhang aufgeführten Formel 1 berechneten 95 %- tigen Prognoseintervalls, wurde die Datenbankübereinstimmung wie in [61] beschrieben, als plausibel gewertet. Wurde mindestens eines der beiden Plausibilitätskriterien (Isotopenpeak und/oder Retentionszeit) erfüllt, wurde ein entsprechender Referenzstandard bestellt, um eine eindeutige Identifizierung zu ermöglichen.

3.2 Projekt II: Chemisch-analytisches Schadstoffscreening

3.2.1 Schadstoffidentifizierung

Für die eindeutige Identifizierung von Schadstoffen mit Hilfe eines Referenzstandards wurden die Messbedingungen im Vergleich zum Non-Target Screening angepasst. Während der HPLC-Säulentyp beibehalten wurde, wurde den verwendeten Eluenten Wasser und Methanol jeweils 64 mM Essigsäure und 50 mM Ammoniumacetat hinzugesetzt. Hierdurch wurde eine höhere Retentionszeitstabilität der zu analysierenden Substanzen erreicht. Die optimalen MS-Messbedingungen der untersuchten Schadstoffe wurden mit Hilfe zugehöriger Referenzstandards ermittelt (siehe Anhang Tabelle 8). Referenzstandards für die Substanzen Irbesartan, IRB-446, Olmesartan, Phenazon, Tebutam, Tramadol und Valsartan Säure wurden von dem Forschungslabor der Landeswasserversorgung Langenau zur Verfügung gestellt. Die Referenzstandards für die Substanzen Indol-3-

carboxaldehyd, Sulpirid und Torasemid wurden von Dr. Ehrenstorfer (LGC, Augsburg) bezogen. Tabelle 3.9 zeigt das HPLC-Gradientenprogramm, welches für die Identifizierung von Analyten verwendet wurde.

Tabelle 3.9 HPLC-Gradientenprogramm für die Identifizierung von Schadstoffen. Äquil. = Äquilibrierung

	Äquil.		Analyse		
Zeit (min)	5,5	0,3	4	22	26
MeOH (%)	10	10	30	95	95
Flow (mL/min)	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22

3.2.2 Fipronil und Transformationsprodukte

3.2.2.1 Elbewasser-Probenahme und -aufarbeitung

Die Probenahme der Elbewasserproben erfolgte von einem Steg in Wittenbergen (Hamburg) aus. Die Proben wurden 1m unterhalb der Wasseroberfläche genommen. Es wurde jeweils eine unabhängige Doppelbeprobung durchgeführt. Da die Elbe im Abschnitt des Probenahmeortes von den Gezeiten beeinflusst wird, wurden die Proben zu Zeiten des Elbe-Hochwasserstandes gewonnen, um eine mögliche Verdünnung mit Nordseewasser zu vermeiden. Die Proben wurden direkt nach der Probenahme aufgearbeitet. Die Probenahmezeitpunkte waren April 2014, Mai 2014, Dezember 2014 und Januar 2015. Zusätzlich wurden Rückstellproben des BSH aus den Monaten Juni 2013, Juli 2013, Oktober 2013 und Dezember 2013 analysiert, welche nach dem gleichen Probenahmeprinzip gewonnen wurden wie die Proben aus den Jahren 2014 und 2015. Die Elbewasserproben wurden vor deren Extraktion mit Hilfe eines Glasfaserfilters (GF/F, Porengröße 0,7 µg, Whatmann®) gefiltert. Im Anschluss wurden in 500 mL des Filtrates 1 mL eines Mehrkomponenten-Internen Standards (4 ng/mL) pipettiert (siehe auch Kapitel 3.2.2.4). Die Extraktion der Proben erfolgte mit Hilfe einer automatisierten SPE-Apparatur (Quicksampler Q-3000Aqua, Biontis). Es wurden pro Probe 200 mL des Elbewassers durch mit 200 mg Strata-X gefüllten 3 mL Polypropylen Kartuschen (Phenomenex) gepumpt. Zuvor wurde das SPE-Material mit dem Eluenten (Methanol/Acetonitril; 70/30; v/v) vorgespült und anschließend in einem weiteren Spülschritt mit Methanol (LC-MS Chromasolv®, Sigma-Aldrich) gefolgt von Reinstwasser (LC-MS Chromasolv®) konditioniert. Die Elution erfolgte mit 6 mL eines Gemischs aus Methanol (LC-MS Chromasolv®, Sigma-Aldrich) und Acetonitril (HPLC grade, J.T. Baker®) (v/v; 70/30) und einem Pufferzusatz (1,25 mM Essigsäure und 2,5 mM Ammoniumacetat). Anschließend

wurden 1,5 mL des Eluats entnommen und unter Stickstoffabbläsung auf 0,5 mL eingengt. Für die Blindwertermittlung wurde Reinstwasser (Milli-QTM, MERCK) verwendet, welches äquivalent zur Probe aufgearbeitet wurde. Die somit gewonnenen Endextrakt wurden mittels HPLC-MS/MS analysiert.

3.2.2.2 Nordseewasser-Probenahme und -aufarbeitung

Die Probenahme der Nordseewasser-Proben erfolgte an insgesamt fünf küstennahen und küstenfernen Probenahmestandpunkten der Nordsee (Deutsche Bucht), welche in Abbildung 3.15 dargestellt sind. Das Probenvolumen lag bei 10 L, welches 5 m unterhalb der Wasseroberfläche genommen wurde. Die Proben wurden direkt im Anschluss extrahiert.

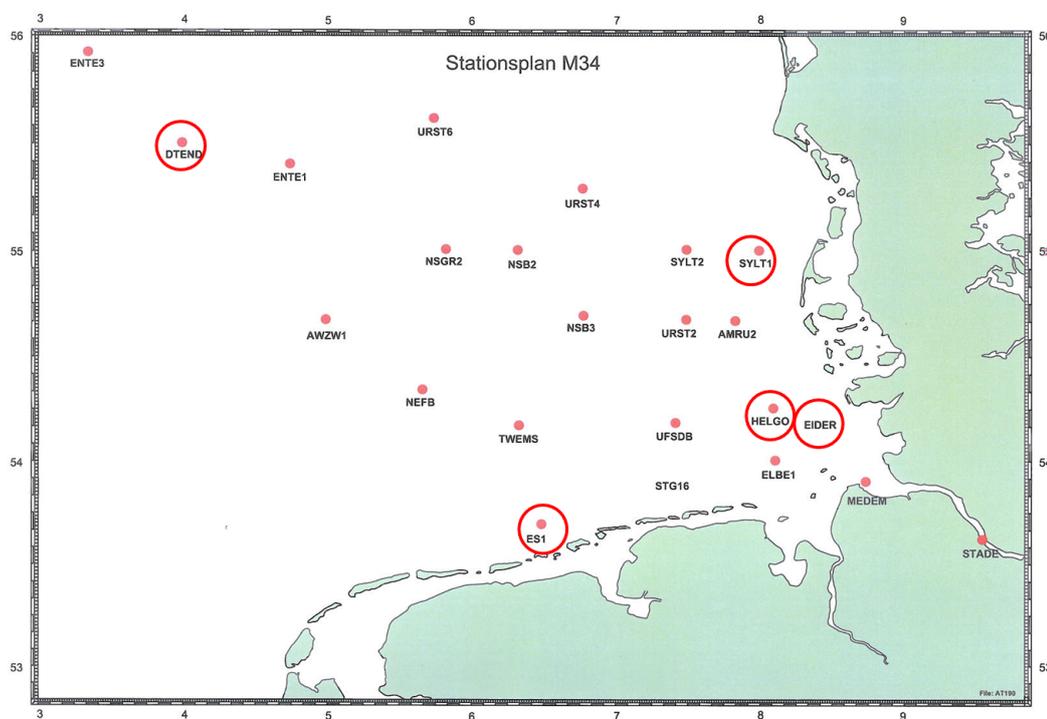


Abbildung 3.15 Messstationen (rot umrandet) der Nordseewasserproben, welche auf Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon hin untersucht wurden.

Vor der Extraktion wurden der Wasserprobe 2 mL eines Mehrkomponentenstandards (4 ng/mL), welcher im Rahmen des BSH-Monitorings verwendet wird, zugesetzt (siehe auch Kapitel 3.2.2.4). Die Extraktion der Nordseewasserproben erfolgte mit Hilfe einer BSH-internen Extraktionsapparatur. Hierbei wurden 2 L der Nordseewasserprobe (5 L für die an der Station DTEND gewonnene Probe) durch mit 1,5 g Strata-X gefüllte 12 mL Polypropylen Kartuschen (Phenomenex) gepumpt. Das Festphasenmaterial wurde zuvor

mit 200 mL Methanol HPLC Grade (J.T.Baker®) und 40 mL Reinstwasser (Milli-Q™, MERCK) konditioniert. Die Partikelabtrennung erfolgte über eine vorgeschaltete, mit 1,7 g Glaswolle gefüllte 12 mL Polypropylen Kartusche (Phenomenex). Im Anschluss an die Probenextraktion erfolgte ein Spüldurchgang der Festphasenkartusche mit 100 mL Reinstwasser (Milli-Q™, MERCK). Nach dem Trocknen des Festphasenmaterials mit Stickstoff bis zur Gewichtskonstanz wurden die Festphasenkartuschen in Aluminiumfolie gewickelt und bis zur weiteren Aufarbeitung kühl gelagert.

Die Elution der Festphasen erfolgte mit 60 mL eines Methanol/Acetonitril (70/30; v/v) Gemisches mit Pufferzusatz (1,25 mM Essigsäure und 2,5 mM Ammoniumacetat). Das Eluat wurde anschließend mit einem Parallelverdampfer (Syncore®Analyst, Büchi) auf ca. 0,3 mL eingengt. Nachdem der Extrakt in ein 1,5 mL Vial überführt wurde, erfolgte eine Spülung des Parallelverdampfer-Glases mit Methanol/Acetonitril (70/30; v/v). Die Spüllösung wurde ebenfalls in das Vial mit dem Extrakt überführt und der Extrakt wurde darauffolgend durch Stickstoff-Abblasung auf 1,0 mL eingengt. Der Extrakt wurde anschließend mittels HPLC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 3.2.2.4). Für die Bestimmung der Blindwerte wurde Reinstwasser (Milli-Q™, MERCK) verwendet, welches äquivalent zur Probenaufarbeitung behandelt wurde.

3.2.2.3 Aale-Probenahme und -aufarbeitung

Bei den untersuchten Aalproben handelte es sich um Rückstellproben des Thünen-Instituts, Institut für Fischereiökologie. Die 13 Aale wurden im November 2013 und 2014 aus der Elbe in der Nähe von Hamburg (Hoopte und Winsen) im Einklang mit der EU-Datenerhebung für Fischerei entnommen [30, 31]. Die Bestimmung des Silberaal-Status wurde basierend auf Durif et al. 2005 [35] durchgeführt.

Die 13 Leberproben sowie zusätzliche sechs Muskelproben wurden gefriergetrocknet und homogenisiert vom Thünen Institut, Institut für Fischereiökologie erhalten. Die Schadstoffextraktion erfolgte basierend auf der nach Theobald et al. 2011 [109] beschriebenen Methode: 2 g Muskelprobe oder 1 g Leberprobe wurden jeweils dreimal mit 9 mL Acetonitril (HPLC Ultra Gradient Grade, J.T. Baker®) in einem 35 mL Zentrifugenröhrchen auf einem Überkopfschüttler für 30 min extrahiert. Zuvor wurde der jeweiligen Probe 1 mL eines Internen Standards (siehe auch Kapitel 3.2.2.4) hinzugefügt. Nach jedem Extrationsschritt wurde die Probe für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand in einem Spitzkolben gesammelt. Anschließend wurde die Probe auf zwei 15 mL Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und bei -18 °C über Nacht aufbewahrt. Darauffolgend wurden die Proben erneut zentrifugiert (3000 rpm, 1 min), um die Fettmatrix abzutrennen. Die so gewonnenen Extrakte wurden vereint und in einem Parallelverdampfer

(Syncore®Analyst, Büchi) auf 3 mL eingeengt, gefolgt von einem erneuten Ausfrierungs- und Abzentrifugierungsschritts. Vom Endextrakt wurde 1 mL in ein Vial für die HPLC-MS/MS Analyse überführt. Einige Messungen ergaben, dass die Signalqualität der Analyten als auch die Wiederfindung (siehe Kapitel 3.2.2.4) aufgrund starker Matrixeffekte gestört waren, weshalb einiger der Endextrakte mit Acetonitril 1:10 verdünnt wurden. Hierdurch konnte die Analysequalität wesentlich gesteigert werden. Der Blindwert wurde mit dem für die Extraktion verwendeten Acetonitril hergestellt, welches äquivalent zur Probe behandelt wurde.

3.2.2.4 Quantifizierung und Qualitätssicherung

Die Quantifizierung von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon erfolgte mittels HPLC-MS/MS Analyse (siehe Kapitel 3.1.9). Für die chromatographische Auftrennung der Wasser- und Aal-Probenextrakte wurde eine C-18 HPLC-Säule (Kinetex 100 mm x 2,1 mm, Partikelgröße 2,6 µg, Phenomenex) mit einer vorgeschalteten AQ C18-Schutzsäule (4 mm x 2,1 mm, Phenomenex) verwendet. Die Chromatographie wurde bei einer Flußrate von 0,220 mL/min bei einer konstanten Säulentemperatur von 28 °C durchgeführt. Für den Eluenten A wurde ultrareines Wasser (LC-MS Chromasolv®, Sigma-Aldrich) verwendet. Eluent B war Methanol (LC-MS Chromasolv®, Sigma-Aldrich). Beiden HPLC-Eluenten wurde ein Essigsäure-(5,6 mM) Ammoniumacetat (5 mM)-Puffer zugesetzt. Das verwendete HPLC-Gradientenprogramm ist in Tabelle 3.6 dargestellt. Die Methode zur Quantifizierung von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon wurde basierend auf dem vom BSH eingesetzten Internen Standard erstellt, welcher für die Quantifizierung von Schadstoffen in Wasserproben verwendet wird. Hierdurch wurde es möglich retrospektive Proben, welche im Rahmen des BSH-Monitorings gewonnen wurden zu untersuchen. Der Interne Standard wurde nach den Kriterien ähnlicher HPLC-Retentionszeiten sowie adäquater Wiederfindungsraten ausgewählt. Entsprechend wurde für die Quantifizierung von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in den Elbe- und Nordseewasserproben ¹³C-markierte Perfluorooctansäure (PFOA) sowie ¹³C-markierte Perfluorooctansulfonsäure (PFOS) für die Quantifizierung in Aalproben eingesetzt. Die Detektion der Analyten erfolgte im scheduled Multiple Reaction Monitoring (sMRM) Modus mit negativer ESI-Quelle.

Die für die Quantifizierung verwendeten Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon-Standards wurden von Dr. Ehrenstorfer (LGC, Augsburg) erworben. Die ¹³C-markierten Standards stammten von Wellington Laboratories Inc. (ON, Canada).

Für die Bestimmungsgrenze wurde eine S/N-Verhältnis von 10 für das Quantifier-Ion und einem Minimum S/N-Verhältnis von 3 für das Qualifier-Ion angesetzt. Zusätzlich wurde

das Verhältnis der Peakflächen ($A_{\text{Quantifier}}/A_{\text{Qualifier}}$) für die Auswertung mit herangezogen, dessen Abweichung vom Mittelwert der Peakflächenverhältnisse der für die Quantifizierung verwendeten Kalibriergeraden maximal 15 % betragen durften. Für die Nachweisgrenze wurde eine S/N-Verhältnis von mindestens 3 für das Quantifier-Ion als auch für das Qualifier-Ion angesetzt. Die sich daraus berechneten Bestimmungs- und Nachweisgrenzen für Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon der untersuchten Elbewasserproben sind im Anhang in Tabelle 9 und für die untersuchten Nordseewasserproben in Tabelle 12 dargestellt.

Die Wiederfindung wurde durch Dotierung bekannter Analytkonzentrationen zu den Wasserproben bzw. Aalproben bestimmt und berechnet sich aus der Differenz der gemessenen Analytkonzentrationen der dotierten Probe und der gemessenen Analytkonzentrationen der undotierten Probe. Der Zusatz von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon für die Bestimmung von deren Wiederfindung in Elbewasser-Proben betrug 1 ng/L, der in den Nordseewasserproben betrug 0,1 ng/L. Hieraus ergab sich für die Elbewasserproben eine Wiederfindung ($n = 7$) von Fipronil von $97,8\% \pm 2,4\%$ sowie $89,3\% \pm 2,2\%$ für Fipronil-desulfinyl und $85,5\% \pm 5,1\%$ für Fipronil-sulfon (siehe Anhang Tabelle 10). Die Wiederfindung von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in den Nordseewasserproben ($n = 6$) betrug $100,9\% \pm 3,2\%$ für Fipronil sowie $97,1\% \pm 3,0\%$ für Fipronil-desulfinyl und $93,1\% \pm 3,9\%$ für Fipronil-sulfon (siehe Anhang Tabelle 13).

Der Zusatz von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon für die Bestimmung von deren Wiederfindung in den Muskel- und Leberproben betrug 5 ng für Fipronil und Fipronil-desulfinyl sowie 10 ng für Fipronil-sulfon. Hierdurch konnte eine Wiederfindung ($n = 9$) von Fipronil von $103,3\% \pm 6,1\%$ sowie von Fipronil-sulfon von $99,9\% \pm 5,0\%$ ermittelt werden. Die Wiederfindung ($n = 3$) von Fipronil-desulfinyl in den Aal-Muskelproben lag bei $103,7\% \pm 0,6\%$.

3.3 Projekt III: Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Eine erste Bewertung der identifizierten Schadstoffe sollte in Anlehnung an die von Schulz et al. [101] beschriebene Methode erfolgen. Hierfür wurden definierte Schadstoffkonzentrationen als auch ein zugehöriger Blindwert mit Hilfe des ATS4-Samplers (CAMAG) in Form von Flächen (6 mm x 6 mm) auf die zuvor gereinigte (siehe Kapitel 3.1.2) HPTLC-Platte aufgetragen. Die Beschichtung der HPTLC-Platte erfolgte wie in Kapitel 3.1.5 beschrieben. Die Detektion der Biolumineszenzhemmung erfolgte mit dem Biolumini-

zer® (CAMAG). Die Detektionsdauer lag bei 15 min mit einer Detektionsfrequenz von einem Bild pro Minute. Die Quantifizierung der Biolumineszenzhemmung erfolgte wie in Kapitel 3.1.6 beschrieben.

Zu Anfang war es das Ziel, Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Substanz Perfluorooctansäure (PFOS) zu ermitteln. Der hierfür verwendete PFOS-Standard wurde von Dr. Ehrenstorfer (LGC, Augsburg) bezogen. Für die Ermittlung der Blindwerte wurden die Lösemittel MeOH (J.T. Baker®), MeOH (AMD, Fluka) und Aceton (J.T. Baker®) verwendet.

Die Extraktion des Kieselgelplättchens zur Ermittlung der für den Blindwert verantwortlichen Substanz wurde mit 200 µL Hexan (J.T. Baker®) durchgeführt. Die Extraktionszeit betrug 0,5 h. Für die Spülung der Bauteile des ATS4-Samplers wurde ebenfalls Hexan (J.T. Baker®) verwendet. Die Extrakte wurden mittels GC-MS (Variaian 1200, Säulentyp Bruker BR-5ms, 30 m x 0,25 mm) analysiert.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Projekt I: Effektorientiertes Schadstoffscreening

Das Ziel des Projektes I war es, die Detektion toxischer Fraktionen von Umweltproben nach deren dünn-schichtchromatischen Auftrennung, mit Hilfe von *A. fischeri* zu ermöglichen. Im Fokus stand hierbei die Untersuchung von Meer- und Elbewasserproben, welche vornehmlich im Rahmen des BSH-Monitoringprogrammes genommen wurden. Im Folgenden werden die Möglichkeiten und Grenzen des Testsystems basierend auf den Ergebnissen der Untersuchungen zur Qualitätssicherung sowie von Meer- und Elbewasserprobenextrakten erläutert und diskutiert.

4.1.1 Reproduzierbarkeit

4.1.1.1 Eine *A. fischeri*-Kultur

Für eine eindeutige Bewertung einer Fraktion als toxisch oder nicht toxisch ist eine Reproduzierbarkeit der Testergebnisse unabdingbar. Die Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmung wurde mit Hilfe des Kontrollstandards (siehe Kapitel 3.1.7) getestet, da dieser neben der Überprüfung der chromatographischen Auftrennung ebenfalls als Kontrolle für die Qualität der *A. fischeri*-Detektion verwendet werden sollte. In einem ersten Versuch wurde der Kontrollstandard zu vier unterschiedlichen Volumina (Konzentrationsstufen) auf eine HPTLC-Platte als Dreifachbestimmung pro Konzentrationsstufe aufgetragen und aufgetrennt. Im Anschluss wurde die hervorgerufene Biolumineszenzhemmung der einzelnen Substanzen und Konzentrationen bestimmt. Der Versuch wurde insgesamt als Dreifachbestimmung (drei HPTLC-Platten) und mit einer *A. fischeri*-Kultur durchgeführt, so dass pro Substanz und Konzentrationsstufe insgesamt neun Biolumineszenzhemmwerte vorlagen (siehe Anhang Tabelle 1). Von den insgesamt sechs im Kontrollstandard enthaltenden Substanzen (Fluoranthen, Dimethylgelb, Acetanilid, Koffein, Thioharnstoff und 1-Naphtalinsulfonsäure) konnten Acetanilid und 1-Naphtalinsulfonsäure nicht in die Auswertung mit einbezogen werden, da für diese Substanzen eine Biolumineszenzhemmung erst über der noch chromatographierbaren Auftragemenge verzeichnet werden konnte.

Zu Anfang wurde überprüft, ob die detektierten Biolumineszenzhemmungen eindeutig den getesteten Konzentrationen zugewiesen werden konnten. Die Zuordnung wurde hierbei als eindeutig angenommen, wenn es zu keiner Überlappung der Standardabweichungen zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen kam. Bezogen auf die Auswertung der HPTLC-Einzelplatten ($n = 3$ pro Konzentrationsstufe und HPTLC-Platte) wurde dieses Kriterium ausnahmslos erfüllt. Die Standardabweichungen lagen hier zwischen 0,2% Hemmung bis 5,3% Hemmung. Bezogen auf den Mittelwert aller detektierten Hemmwerte pro Konzentrationsstufe (drei HPTLC-Platten, $n = 9$) wurden im Vergleich zur HPTLC-Einzelplattenauswertung ähnlich geringe und sich nicht überlappende Standardabweichungen für die Substanzen Fluoranthen, Dimethylgelb und Koffein registriert. Die Standardabweichungen lagen für diese drei Substanzen zwischen 1,6% Hemmung bis 3,5% Hemmung. Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse für die Substanz Thioharnstoff. Eine eindeutige Zuordnung der Biolumineszenzhemmungen zu den entsprechenden Konzentrationsstufen war aufgrund der hohen und sich überlappenden Standardabweichungen nicht mehr möglich. Abbildung 4.1 zeigt die Mittelwerte ($n = 9$) der detektierten Biolumineszenzhemmungen für die jeweils vier getesteten Konzentrationsstufen der Substanzen Fluoranthen, Dimethylgelb, Koffein und Thioharnstoff sowie die zugehörigen Standardabweichungen.

Der Grund für die hohen Standardabweichungen der Substanz Thioharnstoff lag in den detektierten Hemmwerten der HPTLC-Platte 3, welche deutlich geringer ausfielen als die der anderen beiden HPTLC-Platten. Die schlechte Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmung für Thioharnstoff konnte in einem Folgeversuch auf die Lagerungsdauer der HPTLC-Platten zurückgeführt werden: Prinzipiell wurden bei Versuchen, in denen es erforderlich war, mehrere HPTLC-Platten zu tauchen, zuerst die HPTLC-Platten entwickelt und im Anschluss zeitnah in die *A. fischeri*-Suspension getaucht, um eine möglichst gleichbleibende Qualität der Bakterien zu garantieren und damit vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Bei drei zu testenden HPTLC-Platten mit einer jeweiligen Entwicklungszeit von ca. 1 h und 30 min setzte dies eine Lagerung der zuerst entwickelten HPTLC-Platten von mindestens 1,5 h bis 3 h voraus. Die HPTLC-Platten wurden zur Lagerung mit einer Glasplatte abgedeckt, um diese vor Verunreinigungen aus der Umgebungsluft zu schützen, als auch den Kontakt mit Sauerstoff zu minimieren. Im Folgeversuch wurde erneut die Biolumineszenzhemmung des Kontrollstandards auf drei HPTLC-Platten als Fünffachbestimmung pro HPTLC-Platte ermittelt. Dieses Mal wurde zusätzlich die Lagerungszeit der einzelnen HPTLC-Platten so minimal wie möglich gehalten. Abbildung 4.2 zeigt jeweils einen Ausschnitt der detektierten Biolumineszenzhemmung der drei

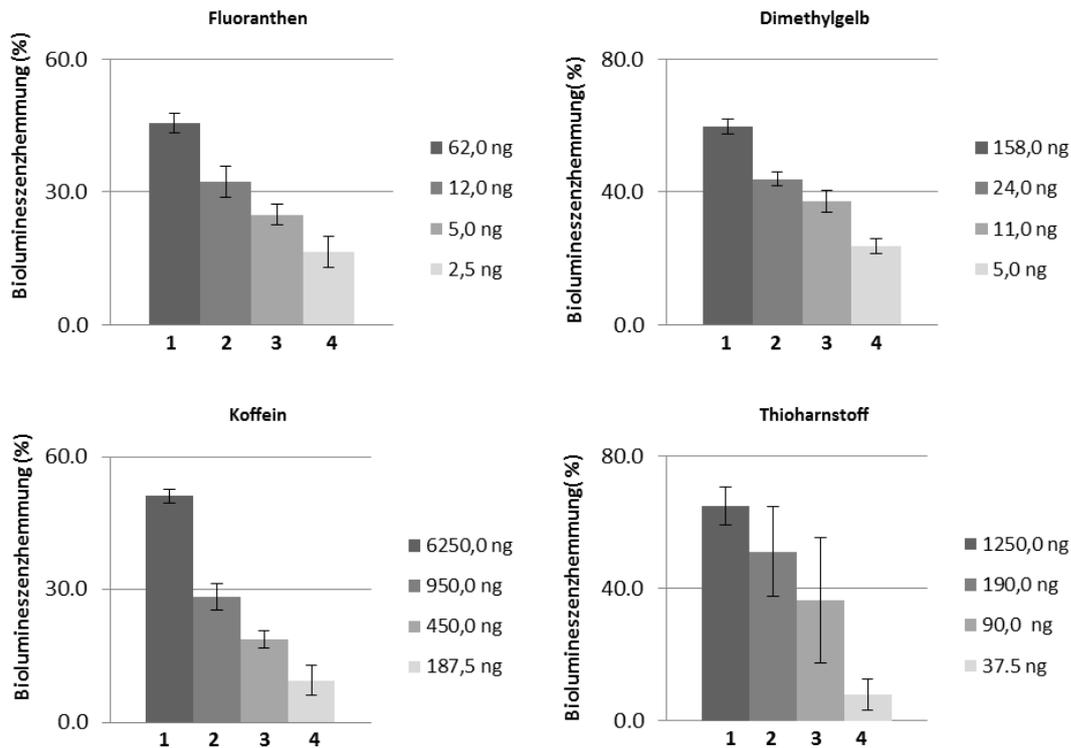


Abbildung 4.1 Mittelwerte ($n = 9$) und Standardabweichungen der Biolumineszenzhemmung (%) der vier getesteten Konzentrationsstufen (1–4) für die Substanzen Fluoranthen, Dimethylgelb, Koffein und Thioharnstoff.

HPTLC-Platten. Auf der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass die Biolumineszenzhemmung von Thioharnstoff (roter Kasten) mit sinkender HPTLC-Plattenlagerungszeit t ($t_1 > t_2 > t_3$) abnimmt. Auf der HPTLC-Platte 3 mit der entsprechend kürzesten Lagerungszeit konnte keine Hemmung für Thioharnstoff mehr festgestellt werden. Die schlechte Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmung für die Substanz Thioharnstoff ist demnach nicht auf die Methode der *A. fischeri*-Detektion zurückzuführen. Ein Faktor, welcher für die schlechte Reproduzierbarkeit des Thioharnstoffs verantwortlich sein könnte ist, dass Thioharnstoff mit Komponenten der *A. fischeri*-Kultur chemisch reagiert und das somit entstandene Produkt eine erhöhte Toxizität aufweist.

Für die Bewertung der Ergebnisse wurde das Gültigkeitskriterium für die Ansätze zur Bestimmung der charakteristischen EC_{20}/EC_{50} des klassischen Leuchtbakterien-Tests laut DIN EN ISO 11348-3: 2009-05 [32] herangezogen. Demnach dürfen die Hemmwerte (%) der Parallelbestimmungen nicht mehr als 3%-Punkte als Differenz von ihrem Mittelwert abweichen (siehe Gleichung 4.1).

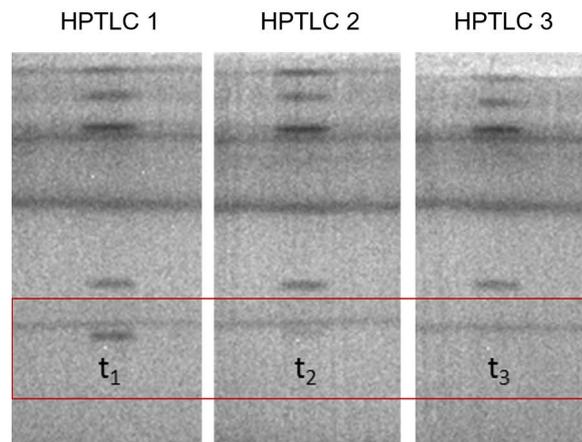


Abbildung 4.2 Ausschnitt der detektierten Biolumineszenzhemmung dreier nach der Entwicklung unterschiedlich lang (Zeit t , mit $t_1 > t_2 > t_3$) gelagerten HPTLC-Platten. Der rote Kasten zeigt den R_f -Bereich von Thioharnstoff.

$$\left| \bar{H} - H_i \right| \leq 3,0\% \quad (4.1)$$

mit

\bar{H} = Mittelwert der H_i -Werte (%)

H_i = Biolumineszenzhemmung (%)

Zu Anfang wurde die Einhaltung des Gültigkeitskriteriums für die jeweiligen Einzelplatten überprüft, indem die arithmetische Differenz der einzelnen Hemmwerte ($n = 3$) zu ihrem Mittelwert gebildet wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 4.1 Arithmetische Differenzen (%-Punkte) der einzelnen Hemmwerte ($n = 3$ pro HPTLC-Platte) zu ihrem Mittelwert für die Substanzen Fluoranthren, Dimethylgelb und Koffein. Überschreitungen des 3 %-Punkte Gültigkeitskriteriums sind rot markiert.

		Differenz zur Mittelwerthemmung (%-Punkte) der Testsubstanz Fluoranthren								
		HPTLC-Platte 1			HPTLC-Platte 2			HPTLC-Platte 3		
Messung		1	2	3	1	2	3	1	2	3
Konz. Stufe										
1		1,2	1,9	0,8	2,0	1,2	0,9	0,0	1,0	1,0
2		2,0	1,9	0,1	3,8	0,9	4,8	4,4	0,0	4,3
3		1,9	1,9	3,9	1,7	1,8	0,0	1,4	2,0	0,6
4		0,6	1,8	1,3	5,8	4,7	1,2	1,3	2,6	1,4

		Differenz zur Mittelwerthemmung (%-Punkte) der Testsubstanz Dimethylgelb								
		HPTLC-Platte 1			HPTLC-Platte 2			HPTLC-Platte 3		
Messung		1	2	3	1	2	3	1	2	3
Konz. Stufe										
1		1,4	0,1	1,5	1,9	1,8	3,6	0,8	1,0	1,8
2		1,0	1,0	0,0	3,6	2,4	1,1	0,3	1,6	1,8
3		1,5	0,9	0,7	4,8	3,0	1,7	0,8	2,6	3,5
4		0,1	1,0	1,1	0,1	0,6	0,6	1,7	0,4	1,2

		Differenz zur Mittelwerthemmung (%-Punkte) der Testsubstanz Koffein								
		HPTLC-Platte 1			HPTLC-Platte 2			HPTLC-Platte 3		
Messung		1	2	3	1	2	3	1	2	3
Konz. Stufe										
1		0,4	1,1	0,6	2,4	1,3	1,2	1,0	0,4	1,3
2		0,2	0,3	0,0	4,2	0,7	5,0	0,9	2,3	1,3
3		1,1	1,9	3,0	1,8	0,8	1,0	1,6	0,8	2,5
4		1,4	4,5	3,2	0,7	2,8	3,6	4,2	2,6	1,7

Die Überprüfung der Einhaltung des Gültigkeitskriteriums für die Einzelplatten zeigte, dass es bei 17 von den insgesamt 108 Differenzwerten (15,7%) zu einer Überschreitung der geforderten maximalen 3 %-Punkte-Abweichung vom Mittelwert kam. Die Überschreitungen lagen hierbei zwischen 3,2 %- Punkten und 5,8 %- Punkten. Aus der Tabelle 4.1 wird weiterhin ersichtlich, dass 10 der 17 Überschreitungen (58,8%) der HPTLC-Platte 2 zugeordnet werden konnten. Der Grund könnte hierfür in der *A. fischeri*-Beschichtung der HPTLC-Platte gelegen haben, welche gut ersichtlich auf der HPTLC-Platte 2 am unregelmäßigsten ausfiel (vgl. Anhang Abbildungen 1–3). Eine homogene *A. fischeri*-Beschichtung ist für die Auswertung der HPTLC-Platten sehr wichtig, da die Biolumineszenzhemmung einer zu testenden Substanz in Relation zu einem Referenzbereich rechts und links von der Substanz bestimmt wird. Entsprechend kann eine unregelmäßige *A. fischeri*-Beschichtung eine höhere Varianz von Biolumineszenzhemmwerten bei Mehrfachbestimmungen zur Folge haben. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse der HPTLC-Platte 2 in der folgenden Zusammenfassung der Einzelplattenergebnisse nicht mit berücksichtigt.

Die Überprüfung der Einhaltung des Gültigkeitskriteriums bezogen auf den Mittelwert

der Einzelhemmwerte (%) der HPTLC-Platten 1 und 2 ($n = 6$) ergab, dass von den insgesamt 72 Differenzwerten zehn Werte (13,9%) über der geforderten maximalen Abweichung von 3 %-Punkten lagen. Die Überschreitungen bewegten sich hierbei in einem Bereich von 3,1 %-Punkten bis 5 %-Punkten (siehe Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2 Arithmetische Differenzen (%-Punkte) der einzelnen Hemmwerte der HPTLC-Platten 1 und 3 ($n = 6$) zu ihrem Mittelwert für die Substanzen Fluoranthren, Dimethylgelb und Koffein. Überschreitungen des 3 %-Punkte Gültigkeitskriteriums sind rot markiert.

Fluoranthren						
Differenz zum Mittelwert (%- Punkte)						
Konz. Stufe	1	2	3	4	5	6
1	2,3	0,8	1,9	1,2	0,2	2,2
2	2,7	1,2	0,6	3,7	0,7	5,0
3	0,8	0,8	5,0	0,3	3,1	0,5
4	1,1	1,3	1,8	0,8	3,1	0,9

Dimethylgelb						
Differenz zum Mittelwert (%- Punkte)						
Konz. Stufe	1	2	3	4	5	6
1	0,3	0,9	2,5	0,3	0,1	2,9
2	0,2	2,2	1,2	1,4	2,7	0,7
3	0,8	1,6	1,4	1,5	3,3	2,8
4	0,2	1,1	1,0	1,8	0,3	1,1

Koffein						
Differenz zum Mittelwert (%- Punkte)						
Konz. Stufe	1	2	3	4	5	6
1	1,2	0,3	1,4	1,8	1,2	0,5
2	1,1	0,6	0,9	0,1	3,1	0,5
3	1,1	1,9	3,0	1,6	0,8	2,5
4	2,8	3,1	4,6	5,6	1,2	0,3

Aus Tabelle 4.2 wird ersichtlich, dass fünf der zehn 3 %-Punkte Überschreitungen bei der Substanz Fluoranthren detektiert wurden, wobei drei Werte (3,1 %-Punkte bis 3,7 %-Punkte) als geringfügige Überschreitung gewertet werden können. Weitere vier Überschreitungen wurden bei der Substanz Koffein registriert, von denen drei der vierten Konzentrationsstufe zugeschrieben werden konnten. Die vierte Konzentrationsstufe und damit die geringste Auftragemenge von Koffein bewirkte nur noch eine sehr geringe Biolumineszenzhemmung (Mittelwert = 9,3%) und liegt damit an der untersten noch detektierbaren Konzentration, was die etwas höhere Schwankungsbreite der Hemmwerte in diesem Bereich erklären könnte. Eine geringfügige Überschreitung konnte zudem bei Koffein (3,1 %-Punkte) in der Konzentrationsstufe 2, sowie bei Dimethylgelb (3,3 %-Punkte) in der Konzentrationsstufe 3 festgestellt werden. Abschließend ist festzuhalten, dass von den hier betrachteten 72 Differenzwerten in 86,1% der Fälle das Gültigkeitskriterium eingehalten wurde und von den zehn registrierten Überschreitungen sechs Werte

lediglich zwischen 3,1 %-Punkten und 3,7 %-Punkten lagen. Die Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmung für verschiedene HPTLC-Platten ist demnach wie bei der Auswertung der einzelnen HPTLC-Platten als sehr gut zu bewerten. Die die Reproduzierbarkeit negativ beeinflussenden Faktoren scheinen für diesen Versuch eine ungleichmäßige Beschichtung der HPTLC-Platten mit *A. fischeri*, eine für den Versuch zu gering gewählte Konzentrationsstufe (Koffein, Konzentrationsstufe 4) sowie chemische Veränderungen der Testsubstanz Thioharnstoff zu sein.

4.1.1.2 Mehrere *A. fischeri*-Kulturen

Für die Bewertung der Toxizität von Meer- und Elbewasserproben sowie für die Verwendung des Kontrollstandards als Qualitätskontrolle für die *A. fischeri*-Bakterien war es weiterhin notwendig, die Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmung für unterschiedliche *A. fischeri*-Kulturen zu untersuchen. Hierfür wurde ebenfalls der Kontrollstandard in der für Versuche als Qualitätskontrolle eingesetzten Konzentration (vgl. Kapitel 3.1.7) verwendet, welche vergleichbar mit der Konzentrationsstufe 2 des zuvor beschriebenen Versuches zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit einer *A. fischeri*-Kultur war. Insgesamt wurden die Biolumineszenzhemmwerte von 11 *A. fischeri*-Kulturen, d.h. 11 Hemmwerten pro Substanz (Fluoranthen, Dimethylgelb und Koffein), bestimmt. Abbildung 4.3 zeigt die Mittelwerte der Biolumineszenzhemmungen und die zugehörigen Standardabweichungen für die Substanzen Fluoranthen, Dimethylgelb und Koffein. Demnach erzielte die aufgetragene Menge von 9 ng/Bande Fluoranthen eine Hemmung von $35\% \pm 5,1\%$ Hemmung, 24,5 ng/Bande Dimethylgelb eine Hemmung von $51\% \pm 6\%$ Hemmung und 875 ng/Bande Koffein eine Hemmung von $31\% \pm 3,3\%$ Hemmung.

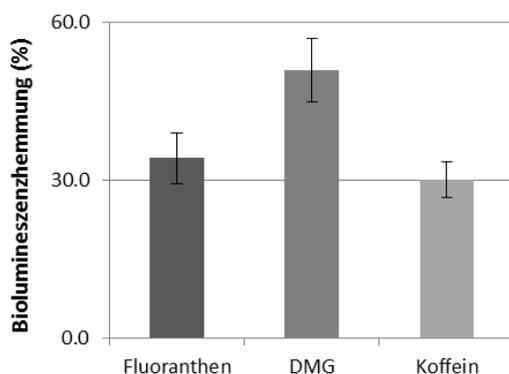


Abbildung 4.3 Mittelwerte der Biolumineszenzhemmungen sowie zugehörige Standardabweichungen von 11 *A. fischeri*-Kulturen für die Substanzen Fluoranthen, Dimethylgelb (DMG) und Koffein.

Ein Gültigkeitskriterium für die Reproduzierbarkeit von Messergebnissen verschiedener *A. fischeri*-Kulturen ist in der DIN EN ISO 11348-3: 2009-05 nicht vorgeschrieben. Es wird lediglich das vorhergehende Testen der verwendeten Bakteriencharge mit drei Kontrollsubstanzen vorgeschrieben, welche in vorgegebenen Konzentrationen eine Hemmung zwischen 20 % und 80 % erzielen müssen. Für die Bewertung der Ergebnisse wurden von daher die Verfahrenskenndaten eines für den klassischen Leuchtbakterientest durchgeführten Ringversuches verwendet (Anhang C der DIN EN ISO 11348-3: 2009-05). Im Ringversuch wurden die EC₂₀- sowie EC₅₀- Werte dreier Substanzen ermittelt. Die Anzahl der herangezogenen Messergebnisse betrug für die einzelnen EC₂₀ und EC₅₀-Werte zwischen 13 und 15, die ermittelten Vergleichsvariationskoeffizienten lagen zwischen 9,6 % und 52,4 %. Im Vergleich betrug die Variationskoeffizienten der getesteten Substanzen im Reproduzierbarkeitsversuch mit 11 *A. fischeri*-Kulturen 14,6 % für Fluoranthren, 11,8 % für Dimethylgelb und 10,7 % für Koffein. Die Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmung mehrerer *A. fischeri*-Kulturen ist demnach ebenfalls als sehr gut zu bewerten. Ergänzend wurden wie im zuvor beschriebenen Versuch zur Reproduzierbarkeit der Messergebnisse mit einer *A. fischeri*-Kultur die arithmetischen Differenzen der einzelnen Hemmwerte zur ihrem Mittelwert bestimmt. Tabelle 4.3 zeigt zusammenfassend die Biolumineszenzhemmwerte der 11 *A. fischeri*-Kulturen für die Substanzen Fluoranthren, Dimethylgelb und Koffein, sowie die arithmetischen Differenzen zu ihrem Mittelwert.

Tabelle 4.3 Biolumineszenzhemmungen von 11 *A. fischeri*-Kulturen für die Substanzen Fluoranthren, Dimethylgelb und Koffein. Überschreitungen des 3%-Punkte Gültigkeitskriteriums sind rot markiert. MW = Mittelwert; STAW = Standardabweichung; VK = Variationskoeffizient

	Hemmung (%)			Differenz zum MW (%- Punkten)		
	Fluoranthren	Dimethylgelb	Koffein	Fluoranthren	Dimethylgelb	Koffein
<i>A. fischeri</i> - Kultur	(9 ng/Bande)	(24,5 ng/Bande)	(875 ng/Bande)	(9 ng/Bande)	(24,5 ng/Bande)	(875 ng/Bande)
1	28,2	49,4	30,2	6,8	1,6	0,9
2	35,5	55,1	36,5	0,5	4,2	5,4
3	34,9	57,5	30,1	0,1	6,6	1,0
4	34,3	58,4	32,8	0,7	7,4	1,7
5	38,4	55,7	31,0	3,4	4,7	0,1
6	40,7	52,0	30,5	5,7	1,0	0,6
7	39,2	44,8	30,9	4,2	6,1	0,2
8	35,5	52,6	31,9	0,5	1,6	0,8
9	31,2	41,5	27,8	3,8	9,5	3,3
10	25,4	41,6	24,6	9,6	9,4	6,5
11	41,8	52,1	35,8	6,8	1,1	4,7
MW	35,0	51,0	31,1			
STAW	5,1	6,0	3,3			
VK (%)	14,6	11,8	10,7			

Aus Tabelle 4.3 wird ersichtlich, dass das Gültigkeitskriterium einer maximalen 3%-Punkte-Abweichung vom Mittelwert, welches für die Bewertung der Ergebnisse einer *A. fischeri*-Kultur herangezogen wurde, für die Substanzen Fluoranthren und Dimethylgelb in über 50 % der Fälle nicht eingehalten werden konnte. Die Überschreitungen lagen für beide Substanzen zwischen 3,4 %-Punkten und 9,6 %-Punkten. Im Gegensatz dazu wurde bei der Substanz Koffein das Gültigkeitskriterium lediglich bei vier der insgesamt 11 Hemmwerten überschritten, wobei eine Überschreitung (3,3 %-Punkte) als marginal bewertet werden kann. Obwohl das Gültigkeitskriterium für die Substanzen Fluoranthren und Dimethylgelb bei den meisten Hemmwerten nicht eingehalten wurde, so ist eine maximale Überschreitung von 9,6 %-Punkten über 11 *A. fischeri*-Kulturen immer noch als gut zu bewerten. Die im Vergleich besser ausfallende Reproduzierbarkeit der Hemmwerte für die Substanz Koffein mag darin begründet liegen, dass sich der R_f -Wert von Koffein in einem Bereich auf der HPTLC-Platte befindet, welcher im Vergleich zu den R_f -Werten der anderen beiden Substanzen keinerlei Störungen in Form der quer über die Platte verlaufenden „Schmutzbanden“ aufweist und somit geringer schwankende Hemmwerte detektiert werden können (siehe Anhang Abbildung 1). Aus diesem Grund wurde die Substanz Koffein als Qualitätskontrolle für die verwendeten *A. fischeri*-Kulturen in den weiterführenden Versuchen verwendet.

4.1.1.3 Beurteilung der Reproduzierbarkeit

Die Versuche zur Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmungen mit dem Effektorientierten Testsystem bestehend aus HPTLC-Auftrennung und *A. fischeri*-Detektion haben gezeigt, dass die Reproduzierbarkeit der detektierten Biolumineszenzhemmungen auch über mehrere Bakterien-Kulturen hinweg insgesamt als sehr gut zu bewerten ist. Stärker streuende und damit die Reproduzierbarkeit negativ beeinflussenden Hemmwerte waren vermutlich nicht auf die eigentliche *A. fischeri*-Detektion zurückzuführen, sondern auf methodische Faktoren wie

- eine ungleichmäßige Beschichtung der HPTLC-Platten mit *A. fischeri*,
- Verschmutzungen auf den HPTLC-Platten,
- zu niedrig gewählten Testkonzentrationen,
- chemische Veränderungen der Testsubstanz Thioharnstoff.

Weiterhin zeigte sich, dass von den vier für die Auswertung einbezogenen Testsubstanzen, Koffein in der im Kontrollstandard eingesetzten Konzentration die beste Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmwerte aufwies, weshalb Koffein in weiterführenden

Versuchen als Kontrollsubstanz für die Beurteilung der *A. fischeri*-Kulturenqualität eingesetzt wurde.

4.1.2 Konzentrations-Arbeitsbereich

Die Detektion toxischer Fraktionen umfasst im vorliegenden Testsystem die beiden Teilarbeitsschritte der HPTLC-Probenauftrennung sowie der *A. fischeri*-Detektion. Sowohl für die HPTLC als auch für die *A. fischeri*-Detektion stellen die Konzentrationen der einzelnen Substanzen in den zu untersuchenden Proben die für die Anwendung limitierenden Faktoren dar. Im Fokus der Untersuchungen standen Probenextrakte von Meer- und Elbewasserproben, welche vornehmlich im Rahmen des BSH-Monitoringprogrammes genommen wurden. Die Anreicherung erfolgte wie in den Kapiteln 3.1.8.3 und 3.1.8.4 beschrieben mit einer polymerbasierten, funktionalisierten Umkehrphase (OASIS® HLB), welche aufgrund ihrer funktionellen Gruppen in der Lage ist, ein breites Spektrum an Substanzen (polar bis unpolar) zurückzuhalten. Diese unspezifische Anreicherung besitzt den Vorteil, eine Vielzahl an anthropogenen und damit potentiell toxischen Substanzen erfassen zu können, gleichzeitig werden jedoch ebenfalls Substanzen angereichert, welche für die vorliegende Fragestellung irrelevant sind und sich störend auf die chromatographische Auftrennung als auch die *A. fischeri*-Detektion auswirken können. Solche Stoffe werden im allgemeinen als Matrix bezeichnet und umfassen im vorliegenden Fall alle natürlich in Meer- und Elbewasser vorkommenden Stoffe wie bspw. Huminsäuren. Die Probenextrakte enthalten folglich eine größtenteils in unbekanntem Konzentrationen vorliegende, unbekannt Anzahl an natürlichen und anthropogenen Stoffen. Während bei der Dünnschichtchromatographie eine maximale Probenauftragmenge für eine störungsfreie Auftrennung nicht überschritten werden darf, so wird bei der *A. fischeri*-Detektion eine substanzabhängige Mindestkonzentration benötigt, um eine *A. fischeri*-Biolumineszenzhemmung zu erzeugen. Dementsprechend kann das Ziel einer ausreichenden chromatographischen Auftrennung dem der Detektion toxischer Fraktionen entgegenstehen. Diese Problematik und der daraus resultierende Konzentrations-Arbeitsbereich wird im Folgenden erläutert und diskutiert.

4.1.2.1 HPTLC

Aufgrund der sehr komplexen Zusammensetzung der zu untersuchenden Probenextrakte war eine Einzelsubstanzauftrennung, wie bspw. bei dem bei jedem Versuch mitlaufenden Kontrollstandard, nicht zu erwarten. Vielmehr kommt es bei solch hochkomplexen Proben zu Substanzüberlappungseffekten. Das für die Dünnschichtchromatographie maximal applizierbare Probenvolumen für die zu untersuchenden Elbe- und Meerwasserextrak-

te wurde experimentell, basierend auf der Auftrennqualität der Substanzen (Auswertung unter UV-Licht bei 254 nm und 360 nm) als auch auf der detektierten Biolumineszenzhemmung, bestimmt. Abbildung 4.4 zeigt mehrere HPTLC-aufgetrennte Meerwasserextrakte verschiedener Probenahmestationen aus der Deutschen Bucht unter UV-Licht bei 254 nm und 366 nm sowie die Detektion der *A. fischeri*-Biolumineszenz. Eine Übersicht über die Lage der einzelnen Probenahmestationen innerhalb der Deutschen Bucht gibt Abbildung 4.5. Die Applikationsmenge der einzelnen Probenextrakte betrug 10 μL . Aufgrund der geringen Schadstoffkonzentrationen an den Probenahmestationen NSB3 und DETEND wurden hier 5 L Meerwasser anstelle der üblichen 2 L Meerwasser für die Anreicherung verwendet. Der entsprechend höhere Anreicherungsfaktor kann äquivalent zu einer Applikationsmenge von 25 μL betrachtet werden.

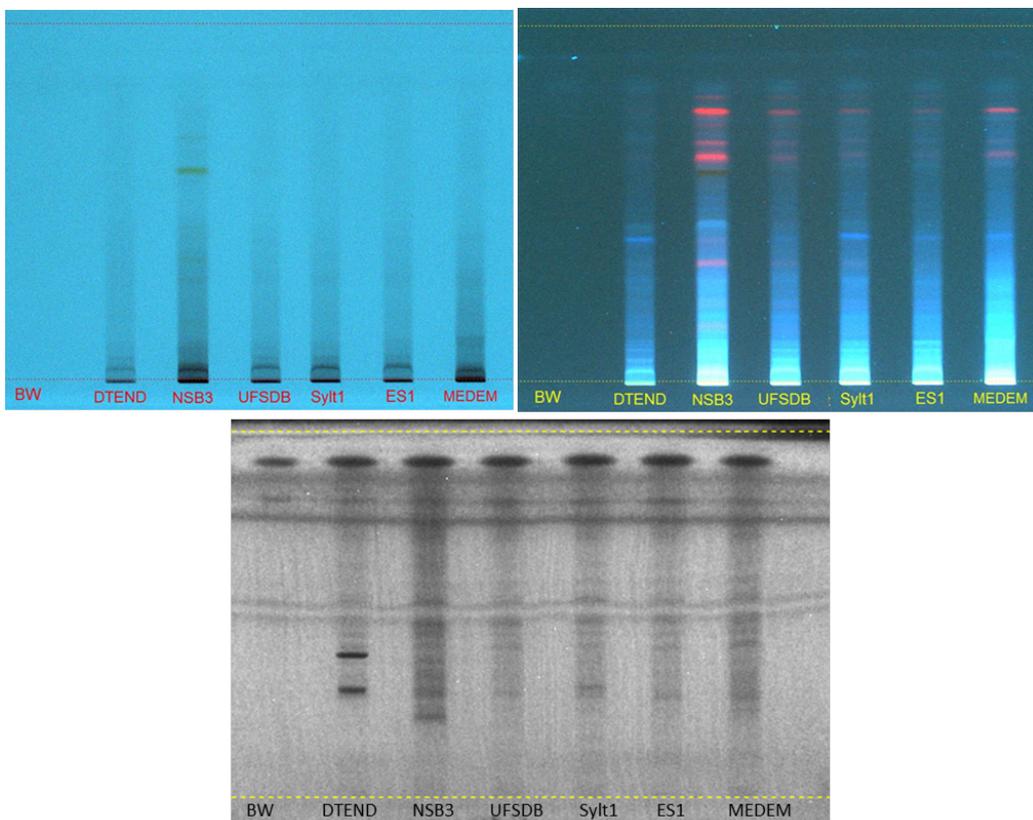


Abbildung 4.4 Aufgetrennte Meerwasserextrakte (Applikationsvolumen 10 μL) verschiedener Probenahmestationen der Deutschen Bucht unter UV-Licht bei 254 nm (oben links) und UV-Licht bei 366 nm (oben rechts) sowie die Detektion der *A. fischeri*-Biolumineszenz (unten).

In Abbildung 4.4 ist ersichtlich, dass die unter UV-Licht bei 254 nm detektierbare Strahlungsabsorption der Proben sehr gering ausfiel und deshalb für eine Beurteilung der Probenauftrennqualität ungeeignet war. Hingegen zeigt die Detektion der Eigenfluor-

reszenz unter UV-Licht bei 366 nm ein wesentlich differenzierteres Bild. Unter UV-Licht bei 366 nm weisen die Probenextrakte eine über den fast vollständigen R_f -Bereich durchgängig verlaufende bläuliche Hintergrundfluoreszenz auf, welche im unteren R_f -Bereich stärker ausfällt als im oberen R_f -Bereich. Die Hintergrundfluoreszenz wird stellenweise durch klar abgrenzbare Substanzbanden überlagert, wobei dies hauptsächlich auf den oberen R_f -Bereich zutrifft. Im unteren R_f -Bereich überwiegt die durchgängig verlaufende Hintergrundfluoreszenz (besonders deutlich zu sehen bei den Probenextrakten der Stationen NSB3 und MEDEM), so dass eine differenzierte Betrachtung für diesen Bereich nicht möglich ist. Diese Tatsache weist darauf hin, dass es scheinbar für einige Substanzen bereits zu einer Überladung der stationären Phase kam und ein geringeres Applikationsvolumen der Probenextrakte für eine optimale Auftrennqualität hätte gewählt werden müssen. Bezogen auf die Detektion der zugehörigen Biolumineszenzhemmung zeichnet sich ein ähnliches Bild ab. Eine Biolumineszenzhemmung ist ebenfalls bei allen Probenextrakten fast über den gesamten R_f -Bereich zu beobachten. Im Gegensatz zu der detektierten durchgehenden Hintergrundfluoreszenz ist die Biolumineszenzhemmung der einzelnen Probenextrakte im unteren R_f -Bereich nur sehr schwach ausgeprägt und nimmt mit steigendem R_f -Wert zu. Ebenfalls kommt es hierbei zu einer partiellen Überlagerung der durchgehenden Biolumineszenzhemmung durch klar abgrenzbare Hemmbanden. Die fast über den ganzen R_f -Bereich verlaufende Biolumineszenzhemmung der jeweiligen Proben kann ebenfalls auf eine Überladung der stationären Phase hindeuten. In diesem Falle werden toxisch wirkende Substanzen aufgrund fehlender Adsorptionsplätze über einen weiteren R_f -Bereich verteilt. Dieser Effekt nimmt bei Probenextrakten stärker belasteter Probenahmestation (MEDEM) sowie größeren Applikationsmengen (NSB3) zu. Die den Untersuchungen zu Grunde liegende Frage nach einzelnen toxischen Fraktionen in den Meerwasserextrakten lässt sich demnach nur unzureichend beantworten, da faktisch der gesamte Extrakt als toxisch gewertet werden muss und nur zwischen verschiedenen Toxizitätsstufen unterschieden werden kann.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sowohl für die Auftrennqualität der Proben als auch für die nachfolgende Detektion der Toxizität mit *A. fischeri* das optimale Applikationsvolumen abhängig von der jeweiligen Belastungssituation des Probenahmestandortes zu wählen ist und eine Menge von 10 μL für die hier betrachtete Anreicherungsmethode nicht überschritten werden sollte.

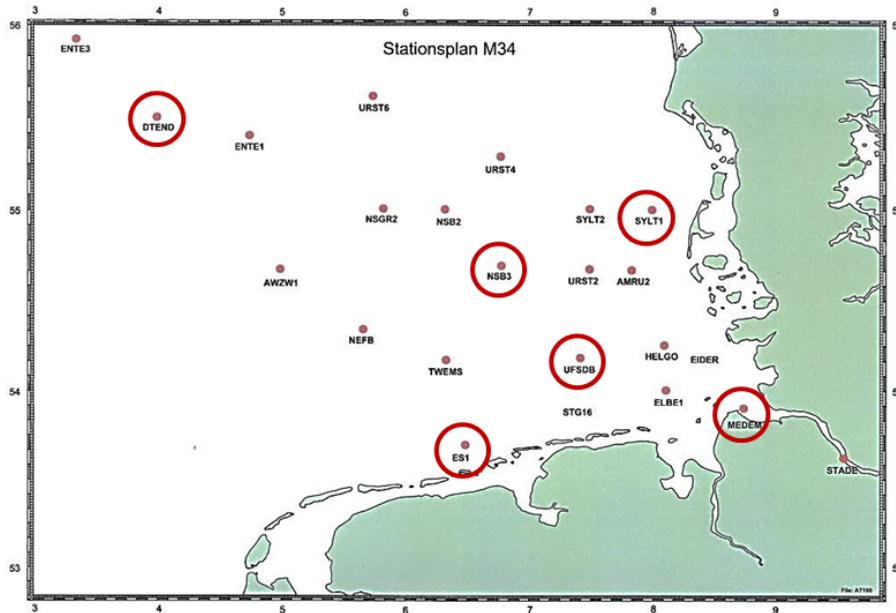


Abbildung 4.5 Probenahme-Stationsnetz des BSH. Rot markiert: Probenahmestandorte der für die Untersuchung des Konzentrations-Arbeitsbereiches verwendeten Meerwasserproben.

Nach gleichem Vorgehen wie bei den zu untersuchenden Meerwasserextrakten wurde das optimale Applikationsvolumen für Elbewasserextrakte ermittelt. Ausgehend von den Ergebnissen der zuvor getesteten Meerwasserextrakte und der höheren zu erwartenden Belastungssituation des Elbewassers wurden die HPTLC-Auftrennqualität und die Detektion der Biolumineszenzhemmung für die Applikationsvolumen von 5 μL und 10 μL miteinander verglichen (siehe Abbildungen 4.6 und 4.7).

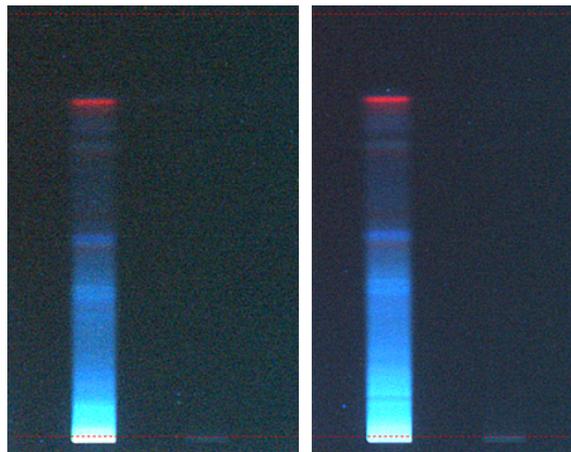


Abbildung 4.6 Aufgetrennter Elbewasserextrakt mit zugehörigem Blindwert unter UV-Licht bei 366 nm. Links: Applikationsvolumen 5 μL , rechts: Applikationsvolumen 10 μL .

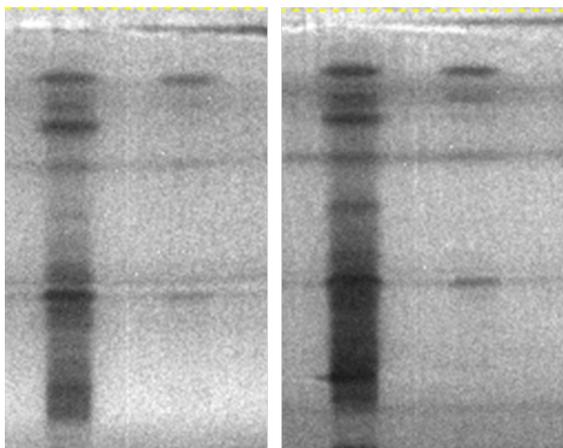


Abbildung 4.7 Detektion der Biolumineszenzhemmung des aufgetrennten Elbewasserextraktes mit zugehörigen Blindwert. Links: Applikationsvolumen 5 μL , rechts: Applikationsvolumen 10 μL .

Bezüglich des optimalen Applikationsvolumens für Elbewasserextrakte zeichnet sich ein ähnliches Bild wie bei den untersuchten Meerwasserextrakten ab. Die Ergebnisse der UV-Detektion bei 366 nm zeigen für beide Applikationsvolumina des Elbeextraktes wie bei den aufgetrennten Meerwasserextrakten eine bläuliche über den ganzen R_f -Bereich verlaufende Fluoreszenz, welche graduell zu höheren R_f -Werten abnimmt. Ebenfalls wird hier die bläuliche Hintergrundfluoreszenz von abgrenzbaren Substanzbanden unterbrochen. Eine Intensivierung der detektierten Fluoreszenz ist bei einem Applikationsvolumen von 10 μL im Vergleich zu 5 μL nur marginal zu verzeichnen. Im Gegensatz hierzu steht die Detektion der Biolumineszenzhemmung. Der Vergleich der beiden Applikationsvolumina zeigt eine eindeutige Intensivierung der Biolumineszenzhemmung bei einem Applikationsvolumen von 10 μL im Vergleich zu 5 μL . Wie bei den Meerwasserextrakten ist hier ebenfalls eine durchgängige Biolumineszenzhemmung zu verzeichnen, welche im unteren R_f -Bereich stärker ausfällt als im oberen R_f -Bereich. Diese Hintergrundbiolumineszenzhemmung wird vereinzelt durch definierte Hemmbanden unterbrochen, von denen jedoch drei Hemmbanden dem Blindwert zuzurechnen sind. Ebenfalls scheinen die zu verzeichnende durchgängig verlaufende Hintergrundfluoreszenz und -biolumineszenzhemmung auf Überladungseffekte der stationären Phase hinzuweisen. Aufgrund der sehr stark ausfallenden Hintergrundbiolumineszenzhemmung bei einem Applikationsvolumen des Elbeextraktes von 10 μL wurde das optimale Applikationsvolumen auf maximal 5 μL abgeschätzt.

Zwischenfazit Prinzipiell lag den hier diskutierten Versuchen die Annahme zugrunde, dass höhere Schadstoffkonzentrationen auf der HPTLC-Platte einer Detektion mit $A.$

fischeri zuträglicher sind als niedrige Schadstoffkonzentration, was ein möglichst großes Applikationsvolumen der zu untersuchenden Proben auf die HPTLC-Platte voraussetzt. Die hier getesteten Applikationsvolumina von 10 μL und 25 μL für Meewasserextrakte sowie 5 μL und 10 μL für Elbewasserextrakte zeigten bei der UV-Detektion bereits Anzeichen von Überladungseffekten auf der HPTLC-Platte. Weiterhin zeigte sich, dass für die Detektion von Schadstoffen mit *A. fischeri* das maximale Probenapplikationsvolumen mit 10 μL für Meerwasserextrakte bzw. 5 μL für Elbewasserextrakte bereits erreicht wurde, da bei diesen Applikationsvolumina eine fast durchgängige, über den gesamten R_f -Bereich verlaufende Biolumineszenzhemmung detektiert wurde. Das Ziel, mit der hier beschriebenen Methode toxische Fraktionen der Probenextrakte von nicht toxischen Fraktionen zu trennen und sie mit *A. fischeri* zu detektieren, konnte demnach nicht vollständig umgesetzt werden, da bei den untersuchten Probenextrakten letztendlich nur zwischen größtenteils undefinierten Bereichen höherer und niedrigerer Toxizität unterschieden werden konnte. Für die geplante sich anschließende Identifizierung der als toxisch detektierten Fraktionen wäre bei den untersuchten Probenextrakten konsequenter Weise ein Non-Target Screening für den gesamten R_f -Bereich nötig. Ein Non-Target Screening für den gesamten R_f -Bereich ist zeitaufwendig und steht dem ursprünglichen Gedanken entgegen, das Non-Target Screening gezielt und damit in reduzierter Form einsetzen zu müssen. Eine allgemeine Reduzierung des Applikationsvolumens der Meeres- und Elbewasserextrakte, um den detektierten Überladungseffekten auf der HPTLC-Platte entgegen zu wirken, wurde aufgrund der im folgenden Kapitel 4.1.2.2 diskutierten Versuchsergebnisse als nicht zielführend bewertet.

4.1.2.2 *A. fischeri*-Detektion

Für eine erste Abschätzung, ab welcher Konzentration Schadstoffe auf der HPTLC-Platte vorliegen müssen, um eine Hemmung der Biolumineszenz zu erzeugen und damit detektiert werden zu können, wurden zu Anfang die visuellen Nachweisgrenzen (ng/Bande) von insgesamt 12 verschiedenen Schadstoffen bestimmt. Zum einen wurden hierfür die Substanzen des Kontrollstandards verwendet, zum anderen wurde zusätzlich ein Schadstoffgemisch mit sechs Substanzen bestehend aus PFOS (Perfluoroctansulfonsäure), PFOA (Perfluoroctansäure), Carbamazepin, Diuron, Primidon und Alachlor mit stark variierenden R_f -Werten (eine Mischungstoxizität konnte somit ausgeschlossen werden) für die Bestimmung der visuellen Nachweisgrenze von Einzelsubstanzen verwendet (siehe Anhang Abbildung 4). Die ermittelten Mindestkonzentrationen der Einzelsubstanzen, bei denen eine Biolumineszenzhemmung noch zu beobachten war, lagen zwischen 3,5 ng/Bande und 12500 ng/Bande. Aus den ermittelten visuellen Nachweisgrenzen kann

abgeleitet werden, dass in den zu untersuchenden Meerwasserproben, welche nach der in Kapitel 3.1.8.4 beschriebenen Methode extrahiert und mit einem Applikationsvolumen von 10 μL auf die HPTLC-Platte aufgetragen werden, die entsprechenden Schadstoffe in einer Konzentration zwischen 140 ng/L und 500.000 ng/L vorliegen müssen, um mit *A. fischeri* detektiert werden zu können (siehe Tabelle 4.4). Die Einschätzung des zu erwartenden Konzentrationsbereiches von Schadstoffen in den zu untersuchenden Meerwasserproben erfolgte basierend auf den Monitoringdaten des BSH für organische Schadstoffe in der Nordsee (Deutsche Bucht). Hierfür wurden die gemessenen Konzentrationen von 55 organischen Schadstoffen an sechs unterschiedlichen Messstationen (küstennah: MEDEM, Sylt1, ES1 und UFSDB; küstenfern: NSB3 und DTEND) der Deutschen Bucht herangezogen. Abbildung 4.5 zeigt die Lage der Messstationen in der Deutschen Bucht. In Tabelle 2 (Anhang) sind die gemessenen Schadstoffkonzentrationen der sechs Messstationen zusammengefasst dargestellt. Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, dass die höchsten Schadstoffkonzentrationen fast ausschließlich an der küstennah gelegenen Station MEDEM gemessen wurden. Hier lagen in 94 % der Fälle die Schadstoffkonzentrationen unterhalb von 10 ng/L oder konnten nicht nachgewiesen werden. Die drei höchsten Konzentrationen wurden an dieser Messstation für Benzotriazol (110 ng/L), Primidon (33,7 ng/L) und Carbamazepin (19 ng/L) gemessen. Für die zur Bestimmung der visuellen Nachweisgrenze verwendeten Schadstoffe Fluoranthen, PFOS, PFOA, Carbamazepin, Primidon und Diuron lagen die gemessenen Schadstoffkonzentrationen im Wasser an der Station MEDEM zwischen 1,4 ng/L und 33,7 ng/L. Tabelle 4.4 zeigt zusammenfassend die visuellen Nachweisgrenzen der 12 getesteten Schadstoffe für eine *A. fischeri*-Detektion und deren daraus resultierenden für die hier diskutierte Methode benötigten Mindestkonzentrationen im Vergleich zu deren gemessenen Konzentrationen im Wasser der Nordsee. Aus Tabelle 4.4 geht hervor, dass Primidon mit > 100 ng/Bande für eine *A. fischeri*-Detektion auf die HPTLC-Platte aufgetragen werden müsste, was einer Konzentration im Meerwasser von > 4000 ng/L entsprechen würde. Ähnlich verhält es sich mit dem Pharmazeutikum Carbamazepin, für welches eine visuelle Nachweisgrenze von 100 ng/Bande bestimmt wurde. Entsprechend müsste Carbamazepin mit einer Konzentration von 4000 ng/L in den Meerwasserproben vorhanden sein, um mit *A. fischeri* detektiert werden zu können. Hingegen wurde Carbamazepin mit einer maximalen Konzentration von 19 ng/L an der Messstation MEDEM gemessen. Die gemessene Carbamazepin-Konzentration wurde somit um ca. Faktor 211 von der theoretisch für die *A. fischeri*-Detektion benötigten Konzentration unterschritten. Eine Detektion dieser Schadstoffe mit *A. fischeri* hätte mit der hier verwendeten Methode aufgrund der allgemein zu geringen Konzentrationen im Wasser nicht erfolgen können. Ähnliche Kon-

zentrationenbereiche wiesen auch die von Brumovský et al. (2016) [11] im Wasser der Nordsee gemessenen Schadstoffe auf. In der Studie wurden 28 organische Schadstoffe, wie bspw. die Süßstoffe Acesulfam und Saccharin als auch Pharmazeutika wie Ketoprofen und Koffein im Wasser der Nordsee detektiert. Die Konzentrationen dieser organischen Schadstoffe bewegten sich größtenteils im unteren ng/L -Bereich, wobei Saccharin mit 32 ng/L in der höchsten Konzentration von allen untersuchten Substanzen vorlag. Die Substanz Koffein wurde in der Studie mit einer maximalen Konzentration von 4 ng/L gemessen und unterschreitet damit die für die *A. fischeri* benötigte Konzentration im Wasser um den Faktor 2500.

Prinzipiell konnte davon ausgegangen werden, dass Schadstoffe, aufgrund geringerer Verdünnungseffekte, im Elbewasser in höheren Konzentrationen vorliegen als in den untersuchten Meerwasserproben und damit Elbewasserextrakte für eine Schadstoffdetektion mit *A. fischeri* besser geeignet sind als Meerwasserextrakte. Für eine erste Abschätzung, in welchen Konzentrationen Schadstoffe im Elbewasser vorliegen und in welchen Konzentrationen bei einem Applikationsvolumen von maximal 5 µL des Elbewasserextraktes die Schadstoffe damit auf der HPTLC-Platte vorliegen, wurden ebenfalls BSH-Monitoringdaten einer Elbewasserprobe herangezogen. Wie bei den zuvor beschriebenen Meerwasserproben, lagen die Messdaten derselben 55 organischen Schadstoffe für die Elbewasserprobe vor (siehe Anhang Tabelle 2). Die vier höchsten Schadstoffkonzentrationen der Elbewasserprobe wurden für die Schadstoffe Benzotrizol (377 ng/L), PFBA (94 ng/L), Carbamazepin (93 ng/L) und Primidon (61 ng/L) gemessen. Die vier Schadstoffe lagen damit um einen Faktor von etwa 2 bis 11 in höheren Konzentrationen im Elbewasser im Vergleich zum Meerwasser vor. Trotz allgemein höherer Schadstoffbelastung des Elbewassers waren die Konzentrationen der hier untersuchten Substanzen im Elbewasser ebenfalls zu niedrig, um diese mit Hilfe von *A. fischeri* detektieren zu können (siehe Tabelle 4.4). Unter anderem lagen die gemessenen Schadstoffkonzentrationen von Carbamazepin und Koffein [120] um den jeweiligen Faktor von 86 und 1250 unterhalb der für die *A. fischeri*-Detektion benötigten Konzentration im Elbewasser vor.

4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.4 Visuelle Nachweisgrenzen (ng/Bande) und daraus resultierende benötigte Meerwassermindestkonzentration (ng/L) von 12 Substanzen für die *A. fischeri*-Detektion im Vergleich zu den gemessenen max. Wasserkonzentrationen (ng/L) der Schadstoffe in der Nordsee und der Elbe; k.A. = keine Angabe.

Substanz	Nachweisgrenze (ng/Bande)	Benötigte Mindestkonz. Meerwasser (ng/L)	Gemessene max. Konz. (ng/L)	Benötigte Mindestkonz. Elbewasser (ng/L)	Gemessene max. Konz. (ng/L)
Fluoranthen	6	240	5,2	480	
Dimethylgelb	3,5	140	k.A.	280	k.A.
Acetanilid	500	20.000	k.A.	1000	k.A.
Koffein	250	10.000	4 (Brumovský et al. 2016)	20.000	16 [120]
Thioharnstoff	100	4000	k.A.	8000	k.A.
1- NS	12500	500.000	k.A.	1.000.000	k.A.
PFOS	> 100	> 4000	1,4	> 8000	2,6
PFOA	> 100	> 4000	1,6	> 8000	3,5
Carbamazepin	100	4000	19	8000	93
Primidon	> 100	> 4000	33,7	> 8000	61
Diuron	> 100	> 4000	4,3	> 8000	9
Alachlor	100	4000	k.A.	8000	k.A.

Basierend auf diesen Ergebnissen konnte davon ausgegangen werden, dass sehr viele Schadstoffe im Wasser der Elbe und der Nordsee in zu geringen Konzentrationen vorliegen, um mit *A. fischeri* als Einzelsubstanz auf der HPTLC-Platte detektiert werden zu können. Abbildung 4.8 zeigt den Konzentrationsbereich der hier betrachteten und vom BSH regelmäßig überwachten 55 organischen Schadstoffen im Meer- und Elbewasser und den, nach entsprechender Anreicherung und Applikation der Probenextrakte, daraus folgenden Konzentrationen der Schadstoffe auf der HPTLC-Platte sowie den für eine *A. fischeri*-Detektion der Schadstoffe benötigten Konzentrationsbereich.

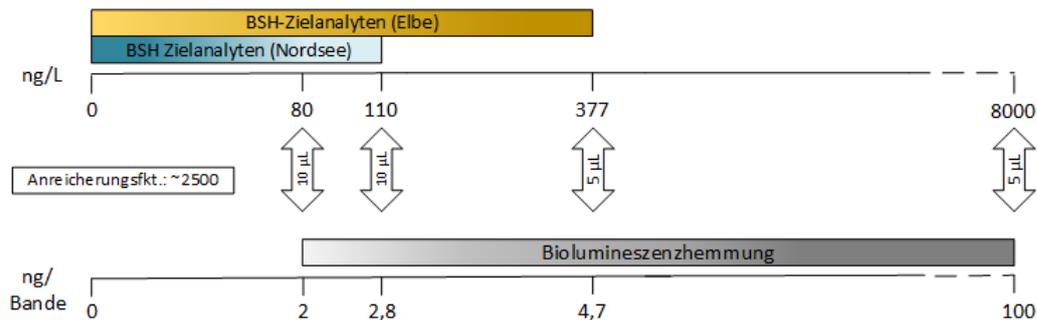


Abbildung 4.8 Schematische Darstellung der Konzentrationsbereiche der hier betrachteten 55 organischen Schadstoffe in Meer- und Elbewasser und der daraus resultierenden Konzentration auf der HPTLC-Platte (bei einem Applikationsvolumen von 10 μL für Meerwasserextrakte und 5 μL für Elbewasserextrakte) sowie den für eine *A. fischeri*-Detektion abgeschätzten benötigten Konzentrationsbereich.

Aufgrund der hohen Komplexität der zu untersuchenden Meerwasser- und Elbewasserextrakte war eine HPTLC-Auftrennung bis hin zu Einzelsubstanzen allerdings nicht zu erwarten, weshalb in einem Folgeversuch die benötigten Mindestschadstoffkonzentrationen für die *A. fischeri*-Detektion in Form von Mischungstoxizitäten näher untersucht werden sollten. Hierfür wurde ein Schadstoffgemisch bestehend aus 60 Substanzen in sieben unterschiedlichen Konzentrationen (1200 ng/Bande bis 12 ng/Bande, entspricht 20 ng/Bande und Substanz bis 0,2 ng/Bande und Substanz) auf eine HPTLC-Platte aufgetragen, aufgetrennt und anschließend wurden die Biolumineszenzhemmungen detektiert (Liste der Schadstoffe siehe Anhang Kapitel 1.2.1). Abbildung 4.9 zeigt die detektierten Biolumineszenzhemmungen des verwendeten Schadstoffgemisches. Die Auswahl der Schadstoffe erfolgte auf Basis der vom BSH regelmäßig überwachten Schadstoffe in Nord- und Ostsee. Ein ähnliches Gemisch an Schadstoffen war demnach ebenfalls in den zu untersuchenden Elbe- und Meerwasserextrakten zu erwarten, mit dem Unterschied, dass in dem definierten Schadstoffgemisch die Substanzen innerhalb einer Verdünnungsstufe alle in gleichen Konzentrationen vorlagen. In realen Wasserprobenextrakten hingegen variieren die Konzentrationen der einzelnen Schadstoffe stark. Trotz allem ist hierdurch eine Einschätzung der Größenordnung für den benötigten Anreicherungsfaktor von Schadstoffen, um diese mit Hilfe von *A. fischeri* detektieren zu können, möglich.

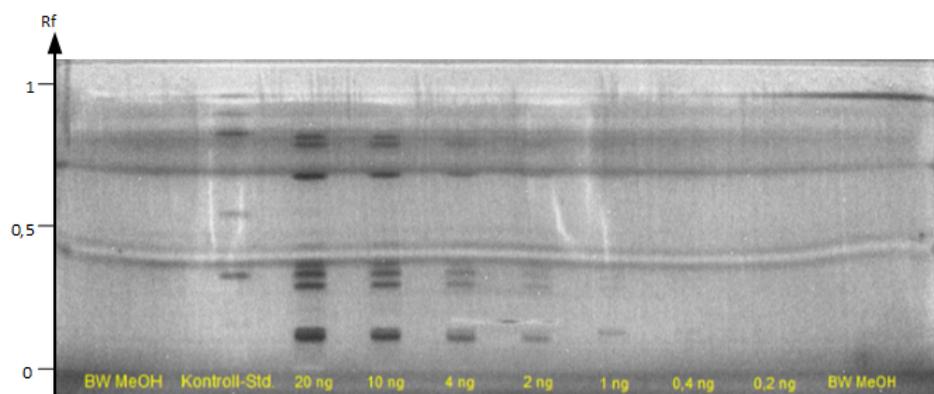


Abbildung 4.9 Detektierte Biolumineszenzhemmungen des zu sieben unterschiedlichen Konzentrationen (1200 ng/Bande bis 12 ng/Bande; entspricht entspricht 20 ng/Bande und Substanz bis 0,2 ng/Bande und Substanz) applizierten Schadstoffgemisches.

Aus Abbildung 4.9 geht hervor, dass bei einer Applikationsmenge von 20 ng/Substanz sieben deutlich sichtbare Hemmbanden detektiert wurden. Die visuelle Nachweisgrenze lag für diese Hemmbanden bei einer Applikationsmenge von 4 ng/Substanz bis 2 ng/Substanz. Für die Abschätzung der für eine detektierbare Biolumineszenzhemmung benötigten Schadstoffkonzentration war es im Folgenden notwendig, die Anzahl der die Biolumineszenzhemmungen verursachenden Schadstoffe zu ermitteln. Hierfür wurden die entsprechenden Hemmbanden nach der in Kapitel 3.1.10.2 beschriebenen Methode ausgestanzt und extrahiert. Die gewonnenen Extrakte wurden im Anschluss gezielt auf die verwendeten Schadstoffe mittels HPLC-MS/MS hin untersucht. Aufgrund der stellenweise sehr eng aneinanderliegenden Hemmbanden war eine exakte Extraktion der entsprechenden Bereiche nicht immer möglich, so dass für die Abschätzung der erforderlichen Schadstoffmindestkonzentration die Ergebnisse der Analyse für die gut zu extrahierenden, einzeln liegenden Hemmbanden im R_f -Bereich 0,1 und 0,7 herangezogen wurden. Die Hemmbande im R_f -Bereich 0,1 war bis zu einer Applikationsmenge von 2 ng/Substanz detektierbar, hingegen konnte die Hemmbande im R_f -Bereich 0,7 bis zu einer Applikationsmenge von 4 ng/Substanz detektiert werden. Unter der Hemmbande im R_f -Bereich 0,1 konnten insgesamt 16 Substanzen identifiziert werden, unter der Hemmbande im R_f -Bereich 0,7 waren es 19 Substanzen (siehe Anhang Kapitel 1.2.1). Für die Abschätzung der benötigten minimalen Schadstoffkonzentrationen, um eine Biolumineszenzhemmung hervorzurufen, wurden die folgenden zwei Grenzfälle betrachtet:

1. Nur eine der unter einer Hemmbande befindlichen Substanzen besitzt eine toxische Wirkung.
2. Alle der unter einer Hemmbande befindlichen Substanzen sind ähnlich toxisch und

die toxischen Effekte verhalten sich additiv.

Aus diesen Annahmen und unter der Einbeziehung der Ergebnisse aus den Analysen der beiden Hemmbanden ergibt sich eine theoretische Mindestmenge von 2 ng/Bande bis 32 ng/Bande bezogen auf den R_f -Bereich 0,1 und 4 ng/Bande bis 76 ng/Bande bezogen auf den R_f -Bereich 0,7 für Einzelsubstanzen bzw. für die Gesamtmenge an Schadstoffen, welche auf der HPTLC-Platte vorhanden sein muss, um eine Biolumineszenzhemmung hervorzurufen. Ausgehend von einer für die *A. fischeri*-Detektion benötigten Schadstoffmindestkonzentration von 2 ng/Bande, welche zumindest für einige Schadstoffe als realistisch angenommen werden kann (siehe Nachweisgrenze von Dimethylgelb), ergibt sich hieraus die Annahme, dass Schadstoffe mit einer Konzentration von mindestens 80 ng/L in den Meerwasserproben bzw. 160 ng/L in den Elbewasserproben vorliegen müssen, um überhaupt mit *A. fischeri* bei der hier verwendeten Methode auf der HPTLC-Platte detektierbar zu sein. Bezogen auf den betrachteten Grenzfall der additiven Mischungstoxizität, lagen die BSH-Monitoringdaten für die Konzentrationen der 16 Schadstoffe in Elbe- und Nordseewasser, welche unter der Hemmbande im R_f -Bereich 0,1 detektiert wurden, vollständig vor (vgl. Anhang Tabelle 2). Unter der Annahme, dass diese 16 Schadstoffe in den aufgetrennten Elbe- und Meerwasserextrakten ebenfalls einen R_f -Wert von 0,1 aufweisen, hätten diese im aufgetrennten Meerwasserextrakt der Station MEDEM mit einer Gesamtkonzentration (Summe der Einzelkonzentrationen) von 0,6 ng/Bande und im aufgetrennten Elbewasserextrakt mit einer Gesamtkonzentration von 1,6 ng/Bande auf der HPTLC-Platte vorgelegen. Die hier für eine *A. fischeri*-Detektion ermittelte benötigte Mindestgesamtkonzentration der 16 Schadstoffe von 32 ng/Bande wäre damit um den Faktor 53 für den Meerwasserextrakt der Station MEDEM und den Faktor 20 für den Elbewasserextrakt unterschritten.

4.1.2.3 Non-Target Screening

Ziel des Non-Target Screenings war es, die in einer Probe vorhandenen Substanzen möglichst vollständig zu erfassen. Im Anschluss sollten die Substanzen durch gezielte Fragmentierung und den daraus resultierenden substanzspezifischen Fragmentmustern mit Hilfe von Datenbanken identifiziert werden. Hierfür war es notwendig, den für eine Substanzdetektion benötigten Konzentrationsbereich zu ermitteln.

Für eine Abschätzung, in welcher Konzentration Schadstoffe im Extrakt vorliegen müssen, um im Rahmen des Non-Target Screenings während eines Full-Scan-Laufes detektiert werden zu können, wurde ein Standardgemisch bestehend aus 65 Schadstoffen (Liste der Schadstoffe siehe Anhang Kapitel 1.2.2) in sechs unterschiedlichen Verdünnungsstufen im Full-Scan Modus (100 Da bis 1000 Da) vermessen. Die getesteten Konzentrationen

der einzelnen Substanzen lagen hierbei zwischen 0,01 ng/mL und 10 ng/mL. Die Auswahl der Schadstoffe basierte auf den vom BSH regelmäßig in Meer- und Elbewasser gemessenen Schadstoffen. Die Peakdetektion erfolgte mit der in Kapitel 3.1.13.2 beschriebenen Methode in Relation zu einer Referenzprobe (Blindwertprobe) mit der Auswertesoftware PeakView®1.2. Von den insgesamt 65 getesteten Schadstoffen konnten 46 (70,8 %) Substanzen bei der höchsten getesteten Konzentration von 10 ng/mL detektiert werden. Bei der niedrigsten getesteten Konzentration von 0,01 ng/mL war keine Peakdetektion mehr möglich. Die Substanz PFOS war die einzige Komponente des Schadstoffgemisches, welche bis zu einer Konzentration von 0,1 ng/mL noch detektierbar war. Tabelle 4.5 zeigt zusammenfassend die absolute und relative Anzahl der detektierten Substanzen für die jeweiligen getesteten Konzentrationsstufen.

Tabelle 4.5 Absolute und relative Anzahl (%) der im Full-Scan (100 Da bis 1000 Da) detektierten Substanzen eines Standardgemisches mit 65 Substanzen in unterschiedlichen Verdünnungsstufen.

Konzentration (ng/mL)	Anzahl detektierter Substanzen	Anteil (%)
10	46	70,8
5	38	58,5
2	17	26,2
0,8	11	16,9
0,1	1	1,5
0,01	0	0

Die Ergebnisse zeigen ein stark substanzabhängiges Detektionslimit. Im Konzentrationsbereich von 0,1 ng/mL und 0,8 ng/mL waren ausschließlich Substanzen aus der Gruppe der perfluorierten Verbindungen noch detektierbar. Aus der Gruppe der getesteten Pestizide konnten sechs Substanzen bis zu einer Konzentration von 2 ng/mL bestimmt werden. Hingegen waren für 29 der 46 detektierbaren Substanzen Konzentrationen von 5 ng/mL bis 10 ng/mL erforderlich, um erfasst werden zu können. Die Ergebnisse beziehen sich auf definierte Standards mit geringen Matrixeinflüssen. Hierdurch waren die einzelnen auszuwertenden Massenspuren weitestgehend ungestört. Weiterhin konnten durch den Abgleich mit der Referenzprobe (Blindwert) Signale, welche durch Verunreinigungen hervorgerufen wurden, herausgefiltert werden. Hingegen ist in Umweltprobenextrakten mit einer Verschlechterung der Messsignale aufgrund der in der Probe enthaltenen Matrix zu rechnen. Der Abgleich mit einer Blindwertprobe kann zudem nur Messsignale der von der Messmethode herrührenden Verunreinigungen herausfiltern, entsprechende

Peaks, welche durch Matrixbestandteile der Probe detektiert werden, werden hierdurch nicht eliminiert. Entsprechend der Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass für viele Schadstoffe Konzentrationen von 5 ng/mL bis 10 ng/mL und mehr für eine Detektion im Scan-Lauf benötigt werden. Eine Probenextraktkonzentration von 5 ng/mL wird basierend auf der Extraktionsmethode von Meer- und Elbewasserproben (siehe Kapitel 3.1.8.3) und der darauf folgenden in Kapitel 3.1.10.2 beschriebenen HPTLC-Plattenelution bei einer Wasserschadstoffkonzentration von etwa 10 ng/L erreicht.

4.1.3 Zwischenfazit

Trotz der sehr guten Reproduzierbarkeit von Ergebnissen, welche mit dem hier besprochenen Testsystem erzielt werden konnte, weisen die Ergebnisse der Versuche zur Bestimmung der für eine *A. fischeri*-Detektion benötigten Schadstoffkonzentrationen auf der HPTLC-Platte einheitlich darauf hin, dass viele Schadstoffe in zu geringen Konzentrationen im Meer- und Elbewasser vorliegen, um diese mit der hier beschriebenen Methode mit *A. fischeri* detektieren zu können. Aus diesem Grund konnte davon ausgegangen werden, dass die zu beobachtende Biolumineszenzhemmung der HPTLC-aufgetrennten Meer- und Elbewasserextrakte (siehe Abbildungen 4.4 und 4.7) vermutlich durch in den Gewässern natürlich vorkommenden Substanzen wie bspw. Huminsäuren, welche sich durch die zuvor durchgeführte Festphasenanreicherung in hohen Konzentrationen in den Probenextrakten befinden, verursacht wurde. Vor dem Hintergrund der zu Anfang erwähnten großen Anzahl an Schadstoffen, welche in die Umwelt gelangen [111], konnte allerdings davon ausgegangen werden, dass durchaus Schadstoffe im Meer- und Elbewasser vorhanden sind, welche in höheren Konzentrationen vorliegen, als die hier betrachteten 55 organischen Schadstoffe. Ein Indiz hierfür bietet die Substanz Benzotriazol, welche im Vergleich zu den anderen regelmäßig überwachten Schadstoffen in hohen und für eine Detektion mit *A. fischeri* relevanten Konzentrationen in Meer- (110 ng/L) und Elbewasser (377 ng/L) gemessen wurde (siehe Anhang Tabelle 2). Für die Substanz Benzotriazol konnte allerdings aufgrund fehlender Wiederfindungen kein R_f -Wert ermittelt und somit keine Toxizitätswirkung zugewiesen werden. Die Wahrscheinlichkeit, Schadstoffe in den für eine *A. fischeri*-Detektion benötigten Konzentrationen anzureichern, wurde allgemein für Elbewasserproben im Vergleich zu Meerwasserproben als höher erachtet, weshalb für die angestrebte Effektorientierte Schadstoffdetektion der Fokus nachfolgender Untersuchungen auf Elbewasserproben gelegt wurde. Wie in Kapitel 4.1.2.1 kritisch diskutiert, konnte aufgrund der bei den HPTLC-aufgetrennten Elbewasserextrakten fast über den gesamten R_f -Bereich auftretenden Biolumineszenzhemmung nicht wie ursprünglich vorgesehen, davon ausgegangen werden, deutlich zwischen toxisch

und nicht toxischen Fraktionen unterscheiden zu können. Trotz allem war es wie in Abbildung 4.7 ersichtlich, möglich, deutlich abgrenzbare Biolumineszenzhemmgebiete zu detektieren. Am Beispiel einer vom 6.5.2014 genommenen Elbewasserprobe wird die Detektion toxischer Substanzen mit *A. fischeri* und deren anschließende Identifizierung im Kapitel 4.1.4.3 ausführlich erläutert und diskutiert.

4.1.4 Identifizierung toxischer Substanzen

4.1.4.1 Meerwasserproben

Die in Kapitel 4.1.2 diskutierten Ergebnisse weisen einheitlich darauf hin, dass die im Meerwasser vorhandenen Schadstoffe überwiegend in zu geringen Konzentrationen vorliegen, um diese mit der in dieser Arbeit beschriebenen Kombination aus HPTLC-Probenauftrennung und der anschließenden Schadstoffdetektion mit *A. fischeri* detektieren zu können. Der Fokus der Schadstoffdetektion wurde aus diesem Grunde auf die in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen Untersuchung von Elbewasserproben gelegt. Das Ziel der Untersuchung von Meerwasserextrakten aus der Deutschen Bucht war neben der Detektion toxischer Substanzen auch eine Überprüfung auf stationsspezifische Detektionsmuster („Fingerprints“), sowohl für die UV- als auch die *A. fischeri*-Detektion. Die Ergebnisse zu den Untersuchungen werden im Folgenden anhand von Meerwasserproben sechs verschiedener Probenahmestationen aus der Deutschen Bucht beschrieben und diskutiert. Die Probennahme erfolgte sowohl an küstennahen (entlang der deutschen Nordseeküste an den Stationen: ES1, UFSDB, MEDEM, Sylt1) als auch küstenfernen Stationen (Stationen: NSB3, DTEND), um einen möglichst weiten Bereich der Deutschen Bucht untersuchen zu können. Die Lage der Probenahmestationen ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Bei den applizierten Proben UFSDB-2 und UFSDB-St handelte es sich jeweils um Doppelbestimmungen der an der Station UFSDB genommenen Wasserproben. Der Extrakt UFSDB-St enthielt im Gegensatz zu allen anderen Extrakten zusätzlich ein Gemisch aus Internen Standards, welches der Wasserprobe vor der Extraktion zugesetzt wurde, um deren potentiellen Einfluss auf die UV- und Biolumineszenzdetektion zu testen.

Nach Auftrennung der Meerwasserextrakte mittels HPTLC wurde die HPTLC-Platte unter UV-Licht bei 254 nm sowie 366 nm ausgewertet (siehe Abbildung 4.10). Das Bild der Aufnahme unter UV-Licht bei 254 nm zeigt, dass sich die Meerwasserextrakte nur sehr geringfügig bis gar nicht voneinander unterscheiden. Die Probenextrakte der Stationen DTEND, UFSDB, Sylt1 und ES1 weisen identische Muster auf. Die Extrakte der Stationen NSB3 und MEDEM weisen eine erhöhte UV-Absorption auf. Weiterhin ist

eine gelblich aussehende Bande im R_f -Bereich 0,6 des NSB3 Probenextraktes deutlich sichtbar. Bis auf den Probenextrakt der Station DETEND ist diese Bande ebenfalls bei den anderen Probenextrakten schwach mit entsprechender Bildkontrastansicht sichtbar (siehe Abbildung 4.11).

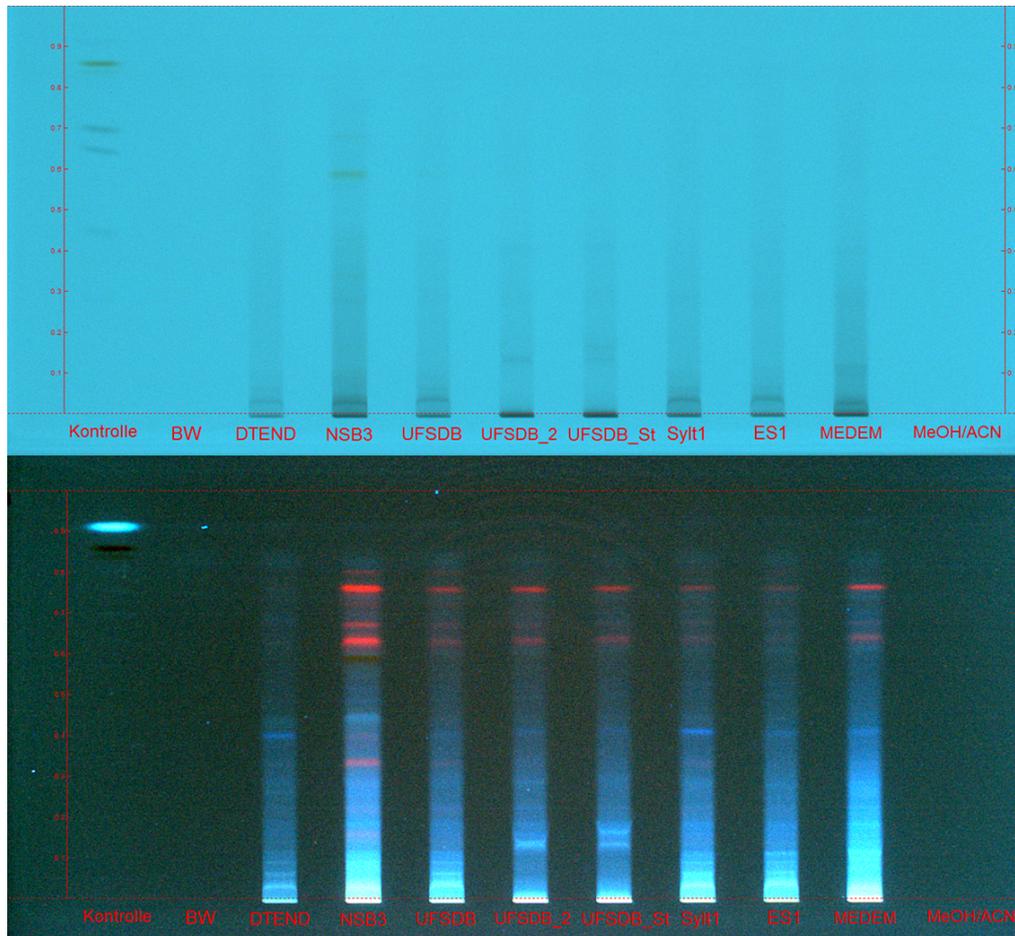


Abbildung 4.10 HPTLC-aufgetrennte Probenextrakte verschiedener Probenahmestationen aus der Deutschen Bucht unter UV-Licht bei 254 nm (oben) und 366 nm (unten).

Dieses lässt sich darauf zurückführen, dass die Extrakte der Stationen NSB3 und MEDEM insgesamt höher konzentriert vorlagen. Die Station MEDEM liegt nahe der Elbemündung, weshalb eine Verdünnung der angereicherten Substanzen mit Meerwasser in Vergleich zu den anderen Stationen geringer ausfiel und aus diesem Grund ein höherer Anreicherungsfaktor entsprechender Substanzen vorlag. Hingegen wurden an der Station NSB3 aufgrund ihrer küstenerferne Lage im Vergleich zu den küstennahe liegenden Stationen 5 L Meerwasser anstelle 2 L angereichert, wodurch ein entsprechend höher konzentrierter Extrakt vorlag. Beide Probenextrakte weisen im Vergleich zu den anderen

Extrakten ein Fehlen der Bande im R_f -Bereich 0,03 sowie ein zusätzliches Auftreten einer Bande im R_f -Bereich 0,13 auf. Es ist zu vermuten, dass dies auf einen zeitlichen Aspekt zurückzuführen ist, da es sich bei beiden Proben um eine Zweitprobenahme handelt, welche in einem Abstand von etwa 1 bis 1,5 Stunden nach der ersten Probenahme aus den jeweiligen 10 L gewonnenen Meerwasserproben erfolgte. Mögliche Abbau- oder Reaktionsprozesse während dieser Zeit könnten hier zu einem Verschieben des R_f -Bereiches geführt haben. Der Probenextrakt UFSDB-St weist im Gegensatz zu den restlichen Extrakten eine zusätzliche Bande im R_f -Bereich 0,15 auf, welche auf die Zugabe des Internen Standard Mixes zurückzuführen ist.

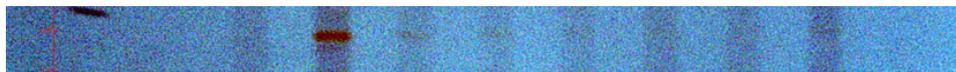


Abbildung 4.11 Kontrastansicht des R_f -Bereiches 0,6 unter UV-Licht bei 254 nm.

Die UV-Detektion bei 366 nm zeigt ein sehr ähnliches Ergebnis zu der Detektion unter UV-Licht bei 254 nm. Stationsspezifische Muster konnten auch hier nicht festgestellt werden. Eine Ausnahme stellt der Probenextrakt der Station DTEND dar, bei welchem die charakteristischen rot fluoreszierenden Banden im Vergleich zu den restlichen Probenextrakten nicht sichtbar sind, was vermutlich auf einen Verdünnungseffekt zurückzuführen ist, da sich die Messstation DTEND am weitesten von der Küste entfernt befand.

Wie auch bei der UV-Detektion konnten bei der Biolumineszenzdetektion der aufgetrennten Meerwasserextrakte keine stationsspezifischen Biolumineszenzhemmungen festgestellt werden (siehe Abbildung 4.12). Neben der unspezifischen und fast über den gesamten R_f -Bereich auftretenden Biolumineszenzhemmung der einzelnen Extrakte, waren die klar definierten Hemmbanden bei allen Probenextrakten mit unterschiedlich starker Ausprägung sichtbar. Lediglich im R_f -Bereich 0,4 des Probenextraktes der Station DTEND ist eine klar definierte Hemmbande zu erkennen, welche bei den restlichen Probenextrakten nicht vorhanden zu sein scheint. Da es sich bei der Probenahmestation DTEND um die küstenfernste der hier beprobten Stationen handelt, konnte davon ausgegangen werden, dass die für die Biolumineszenzhemmung verantwortlichen Substanzen eines natürlichen und nicht eines anthropologischen Ursprungs sind.

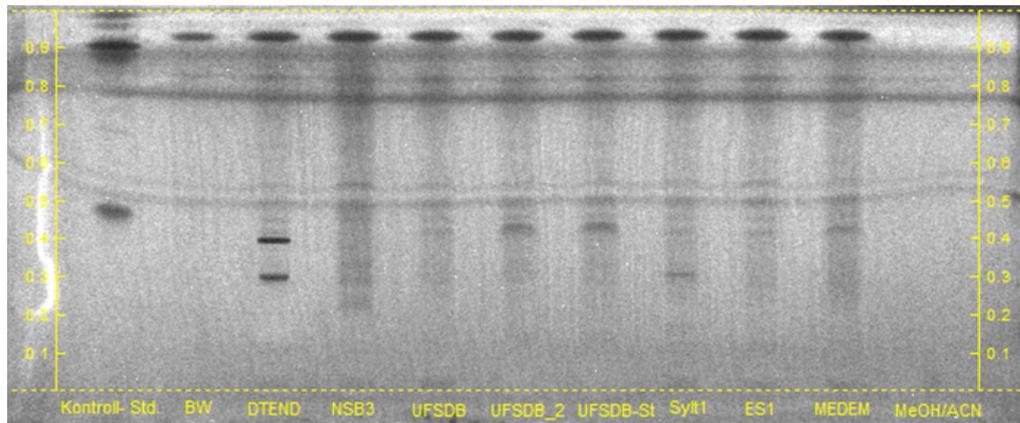


Abbildung 4.12 Detektion der Biolumineszenzhemmung verschiedener HPTLC-aufgetrennter Meerwasserprobenextrakte (Deutsche Bucht).

4.1.4.2 Elbe-Hochwasserproben

Aufgrund der starken Regenfälle in dem Zeitraum vom 30.05.2013 bis 03.06.2013 kam es zu mehreren Hochwasserereignissen in Deutschland, u. a. auch im Elbeeinzugsgebiet. Entsprechend wurden an der Elbemesstelle in Neu Darchau (ca. 80 km von Hamburg entfernt) Spitzendurchflüsse von $4000 \text{ m}^3/\text{s}$ in der Zeit vom 11.06.2013 bis 13.06.2013 gemessen (siehe Abbildung 4.13).

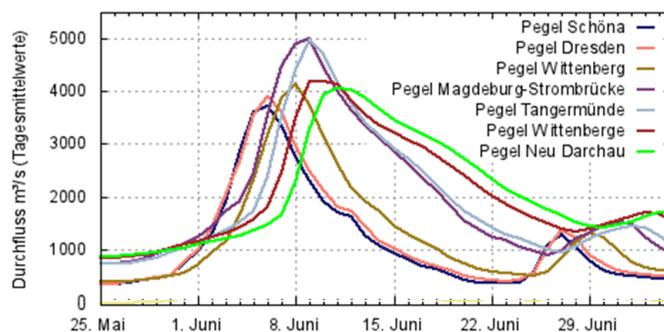


Abbildung 4.13 Durchflüsse (Tagesmittelwerte: 25.5.-5.7.2013) an verschiedenen Pegeln der Elbe [110].

Kurz vor dem Erreichen des Hochwasserscheitelpunktes in Hamburg bis zu einem deutlichen Nachlass des erhöhten Elbewasserdurchflusses wurden in der Zeit vom 10.6.2013 bis 24.6.2013 sieben Elbewasserproben am Probenahmepunkt Wittenbergen in Hamburg genommen (siehe Abbildung 4.14) und nach der in Kapitel 3.1.8.3 beschriebenen Methode extrahiert. Die sieben Probenextrakte wurden zu jeweils $5 \mu\text{L}$ auf eine HPTLC-Platte aufgetragen und entwickelt.

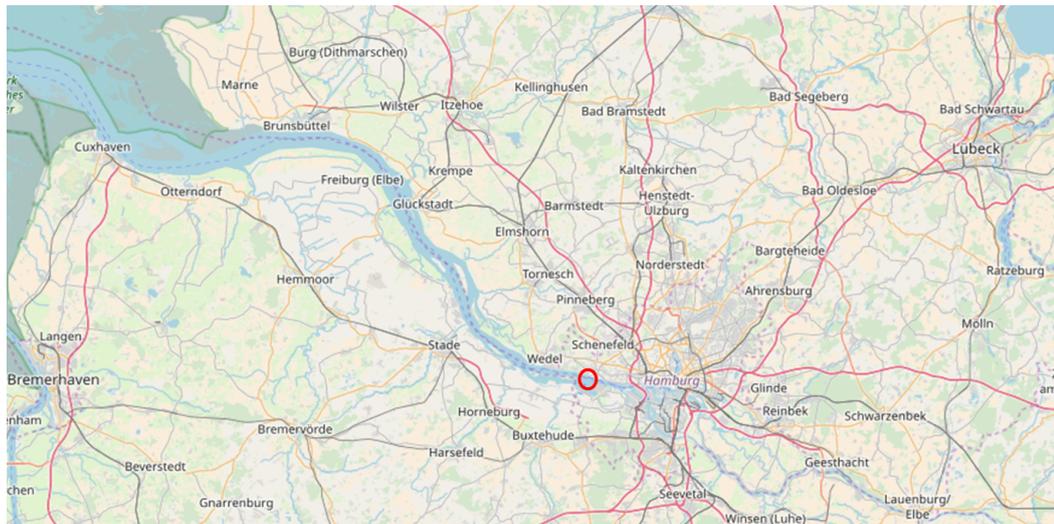


Abbildung 4.14 Probenahmestelle Wittenbergen in Hamburg für Elbewasserproben (rot umrandet).
©OpenStreetMap-Mitwirkende, openstreetmap.org

Die darauf folgende Detektion der Biolumineszenzhemmung zeigte insgesamt lediglich fünf klar definierbare Hemmbanden, von denen zwei dem aus dem verwendeten Festphasenmaterial stammenden Blindwert (BW) zugerechnet werden konnten. Hingegen zeigten die restlichen drei Hemmbanden einen deutlich zeitlichen Verlauf der Intensitäten der detektierten Biolumineszenzhemmungen (siehe Abbildung 4.15). In den R_f -Bereichen 0,75 und 0,4 ist eine Intensivierung der Biolumineszenzhemmung der dort detektierten Hemmbande mit einem Maximum am 20.6.13 zu verzeichnen. Beide Banden sind in der Probe vom 24.6.13 fast nicht mehr vorzufinden. Umgekehrt verhält es sich mit der im R_f -Bereich 0,4 detektierten Hemmbande. Hier ist eine Intensivierung der Hemmung über den gesamten Zeitverlauf zu verzeichnen, mit einem Intensitätsmaximum am 24.6.13. Für die Probe vom 24.6.13 wurde eine unabhängige Doppelbestimmung durchgeführt.

In Abbildung 4.16 ist der zeitliche Verlauf der nach Kapitel 3.1.6 berechneten Biolumineszenzhemmungen (%) der zuvor beschriebenen detektierten Hemmbanden in den R_f -Bereichen 0,15; 0,4 und 0,75 dargestellt. Die Entscheidung, ob sich zwei Biolumineszenzhemmwerte im zeitlichen Verlauf signifikant voneinander unterscheiden, wurde basierend auf den Ergebnissen der Probendoppelbestimmung getroffen. Hierfür wurden die Differenzen der Biolumineszenzhemmwerte (%) der drei Hemmbanden berechnet und die maximale Differenz wurde für die Fehlereinschätzung herangezogen. Diese besaß für die Hemmbande im R_f -Bereich 0,15 einen Wert von 2,6 %-Punkte und ist in Abbildung 4.16 als Fehlerbalken dargestellt. Hierdurch wird sichtbar, dass eine signifikante Erhöhung der detektierten Biolumineszenzhemmungen vom Beginn der Messreihe am 10.6.13 bis zum 24.6.13 sowie deren nachfolgende signifikante Reduzierung am 24.6.13

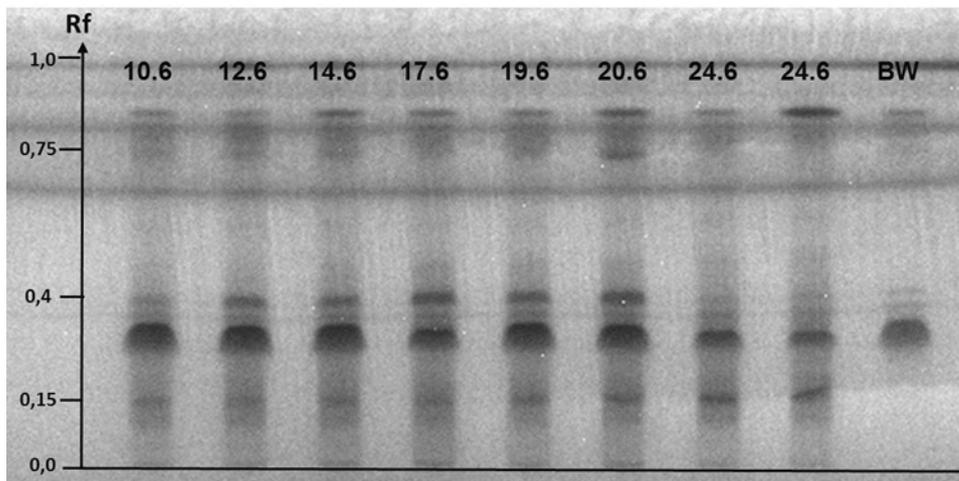


Abbildung 4.15 Detektion der Biolumineszenzhemmung verschiedener HPTLC-aufgetrennter Elbehochwasserextrakte.

für die R_f -Bereiche 0,75 und 0,4 stattgefunden hat. Hingegen müssen die zwischen diesem Zeitintervall liegenden Biolumineszenzhemmungen aufgrund überlappender Fehlerbalken als gleichwertig angesehen werden. Ähnliches ist bei der Hemmbande im R_f -Bereich 0,15 zu beobachten. Hier lässt sich ein signifikanter Anstieg der Biolumineszenzhemmung der Proben vom 10.6.13 im Vergleich zum 20.6.13 bzw. 24.6.13 verzeichnen. Innerhalb dieser Zeitintervalle ist ebenfalls keine Differenzierung der Biolumineszenzhemmung möglich, da auch hier die Fehlerbalken überlappen.

Der beobachtete zeitliche Zusammenhang der Biolumineszenzhemmung lässt vermuten, dass es während des Elbehochwassers, sowohl zu einer durch Ausschwemmung erhöhten Konzentration an toxisch wirkenden Substanzen kam als auch zu einer durch Verdünnungseffekte bedingten Konzentrationserniedrigung. Beide Effekte konnten bei den Zielanalyten des BSH-Monitorings verzeichnet werden. Hier kam es bei einigen Analyten wie bspw. Terbutylazin und Metolachlor zu starken Konzentrationserhöhungen in den Elbewasserproben während des Hochwassers (siehe Abbildung 4.17).

4 Ergebnisse und Diskussion

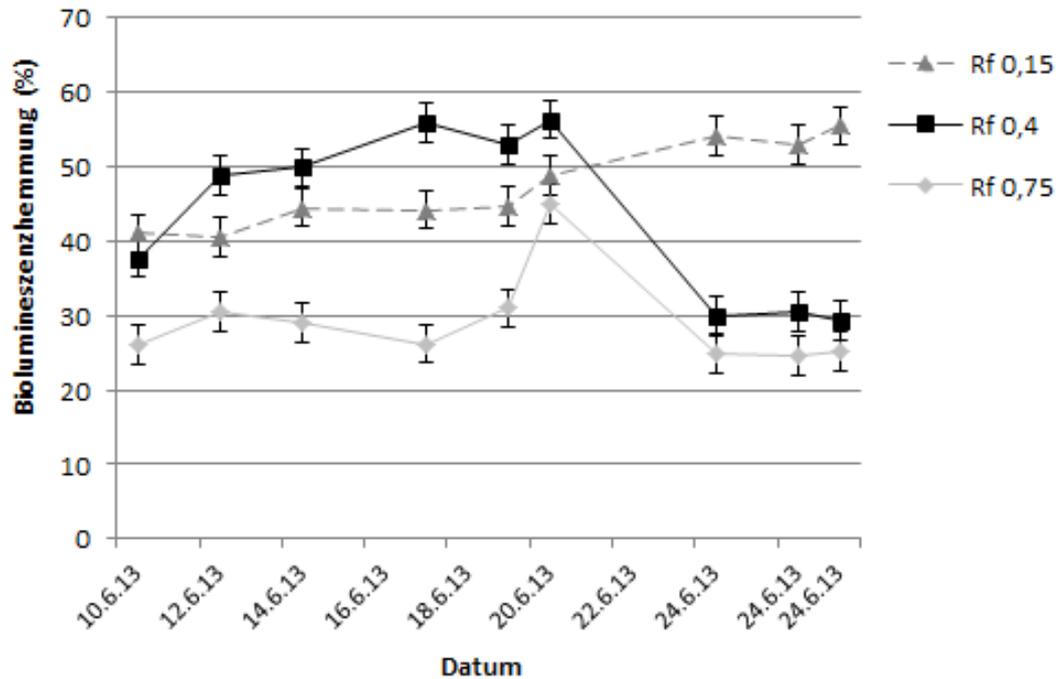


Abbildung 4.16 Zeitlicher Verlauf der berechneten Biolumineszenzhemmungen (%) der Hemmbanden in den R_f -Bereichen 0,15; 0,4 und 0,75.

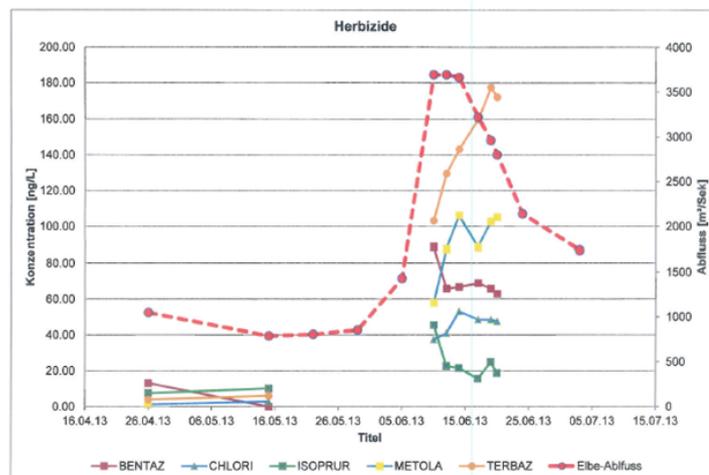


Abbildung 4.17 Zeitlicher Konzentrationsverlauf verschiedener Pestizide während des Elbehochwassers [13].

Ebenfalls konnten abnehmende Analytkonzentrationen durch den verstärkten Elbewasserabfluss während des Hochwassers beobachtet werden. Dieser Effekt trat bspw. bei einigen Pharmazeutika auf. (siehe Abbildung 4.18).

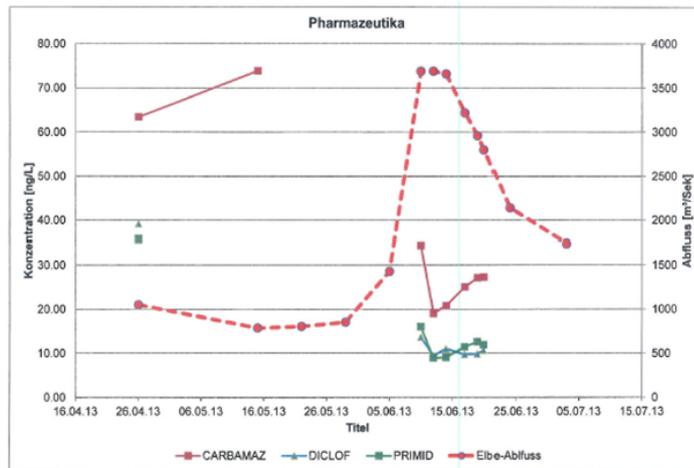


Abbildung 4.18 Zeitlicher Konzentrationsverlauf verschiedener Pharmazeutika während des Elbehochwassers. [13]

Die Ergebnisse der Untersuchung der Elbehochwasserextrakte deuten darauf hin, dass es mit der Kombination aus HPTLC-Probenauftrennung und der Detektion toxisch wirkender Substanzen mittels *A. fischeri* prinzipiell möglich ist, Veränderungen in einem zu untersuchenden System zu erkennen. Im vorliegenden Fall konnte ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der Zu- und Abnahme der detektierten Biolumineszenzhemmungen dreier Hemmbanden und dem Verlauf des Elbehochwassers festgestellt werden. Die Tatsache, dass bei der zu erwartenden hohen Anzahl an organischen Substanzen in den Elbehochwasserextrakten lediglich drei klar definierte Hemmbanden zu detektieren waren, deutete weiterhin darauf hin, dass das verwendete Testsystem eher für ein überwachendes Monitoringkonzept in Form von Probenvergleichen anstelle der gezielten Suche nach toxischen Substanzen in einer komplexen Probe geeignet ist. Dies wird im folgenden Kapitel basierend auf den Ergebnissen einer nach dem Hochwasser gewonnenen Elbewasserprobe ausführlich erläutert und diskutiert.

4.1.4.3 Elbewasserproben

Die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen deuteten darauf hin, dass die für eine *A. fischeri*-Detektion benötigten Schadstoffkonzentrationen bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode aufgrund geringerer Verdünnungseffekte mit höherer Wahrscheinlichkeit in Elbewasser- als in Meerwasserproben vorzufinden sind (siehe Kapitel 4.1.2.2). Aus diesem Grunde wurde der Fokus bei der Detektion von toxischen Substanzen auf die Untersuchung von Elbewasserextrakten gelegt. Weiterhin zeigte sich bei der Untersuchung von Elbewasserextrakten bei der *A. fischeri*-Detektion, dass das ursprüngliche Ziel, toxische Fraktionen von nicht toxischen Fraktionen zu trennen und diese mit *A.*

fischeri zu detektieren, nicht vollständig umgesetzt werden konnte: Während bei der Untersuchung der Elbehochwasserextrakte im Vergleich zu der hohen Anzahl an organischen Verbindungen im Elbewasser lediglich drei definierte Biolumineszenzhemmbanden detektiert werden konnten, so zeigte die Untersuchung eines Elbewasserextraktes einer bei Normalpegel genommenen Wasserprobe eine fast über den gesamten R_f -Bereich verlaufende Biolumineszenzhemmung, so dass in diesem Fall fast der gesamte Extrakt als toxisch bewertet werden musste. Beide Fälle habe gezeigt, dass die Frage nach toxischen Substanzen mit der hier verwendeten Methode für solch komplexe Umweltproben nur stark eingeschränkt beantwortet werden kann. Trotz allem konnten bei den vorangegangenen Untersuchungen abgegrenzte Bereiche stärkerer Toxizitätswirkungen auf der HPTLC-Platte detektiert werden. Aufgrund dieser Tatsache und der Möglichkeit, das vorliegende Testsystem wie in Kapitel 4.1.4.2 als ein vergleichendes (d. h. im Mittelpunkt stehen zeitlich auftretende Veränderungen) Monitoring-Testsystem zu nutzen, wird im Folgenden das prinzipielle Vorgehen für die Identifizierung der für die Toxizität verantwortlichen Substanz(en) anhand eines Elbewasserextraktes einer am 28.4.14 gewonnenen Elbewasserprobe erläutert und die sich daraus ergebenden Vor- und Nachteile werden diskutiert. Abbildung 4.19 zeigt den mit HPTLC-aufgetrennten Elbewasserextrakt einer Elbewasserprobe vom 28.4.14 mit dem zugehörigen Blindwert unter UV-Licht bei 254 nm und 366 nm sowie die nach dem Tauchen der HPTLC-Platte in *A. fischeri*-Suspension detektierte Biolumineszenz(-hemmung).

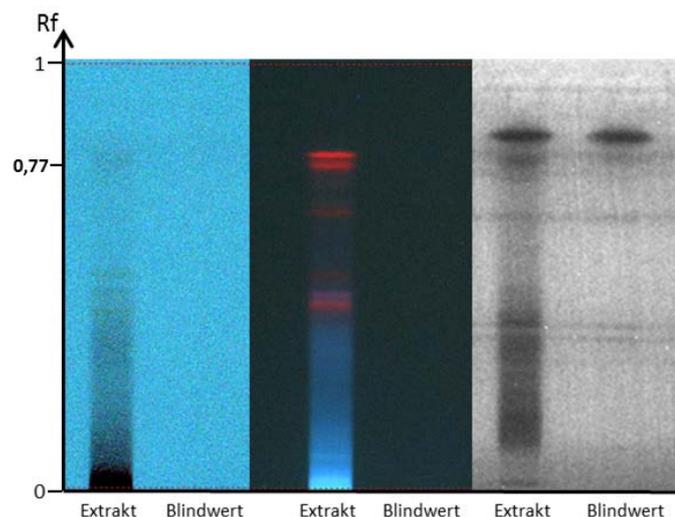


Abbildung 4.19 HPTLC-aufgetrennter Elbewasserextrakt einer Elbewasserprobe vom 28.4.14 mit dem zugehörigen Blindwert unter UV-Licht bei 254 nm (links) und 366 nm (mitte) sowie die zugehörige *A. fischeri*-Detektion (rechts).

In Abbildung 4.19 ist deutlich zu erkennen, dass bis zu einem R_f -Wert von etwa 0,85 eine durchgängige Biolumineszenzhemmung zu detektieren ist, welche im unteren R_f -Bereich zwischen 0,1 und 0,4 größtenteils Biolumineszenzhemmwerte von $> 50\%$ aufweist und ab einem R_f -Wert von etwa 0,5 überwiegend unterhalb von 30% liegt (siehe auch Abbildung 4.20). Wie zuvor beschrieben, wird hierdurch deutlich, dass der gesamte Extrakt als toxisch angesehen werden muss und in diesem Fall nur eine Differenzierung zwischen toxisch und stärker toxisch möglich ist. Beide Bereiche zeigen zudem jeweils eine fast einheitliche Biolumineszenzhemmung. Eine Ausnahme bildet die detektierte Hemmbande im R_f -Bereich 0,77, welche sich klar definiert vom Hintergrund absetzt und eine Biolumineszenzhemmung von 36% erreicht (siehe Abbildung 4.20). In diesem Bereich sind ebenfalls unter UV-Licht bei 366 nm zwei stark rot fluoreszierende Banden zu erkennen. Aufgrund der klar abgegrenzten Hemmung und der zusätzlichen für die Identifizierung der toxisch wirkenden Substanz(en) evtl. wichtigen Information einer charakteristischen roten Fluoreszenz, wurde zu Anfang dieser Bereich für das Non-Target Screening ausgewählt.

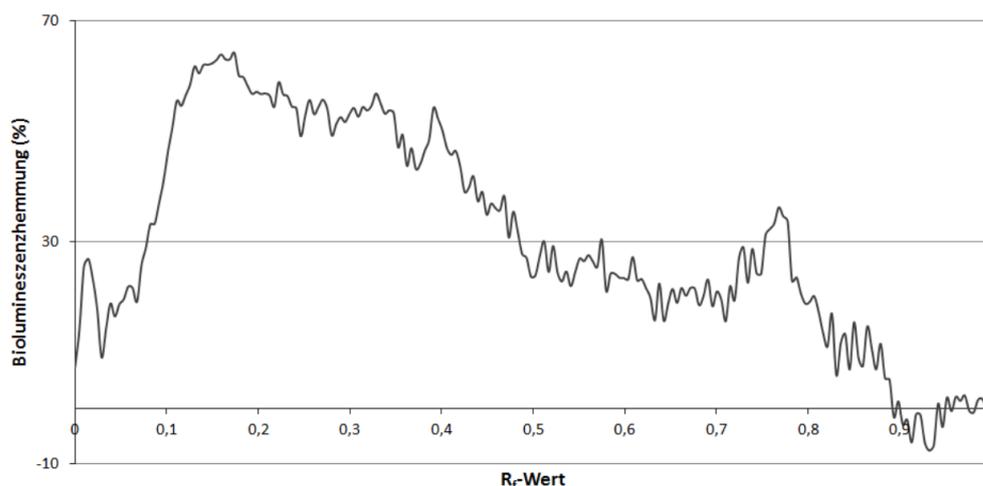


Abbildung 4.20 Biolumineszenzhemmung des untersuchten Elbewasserextraktes.

Die Hemmbande im R_f -Bereich 0,77 wurde inklusive des zugehörigen Blindwertes nach 3.1.10.2 extrahiert und beide Extrakte wurden im positiven und negativen Full-Scanmodus gemessen. Nach der Peakdetektion und dem Entfernen der Blindwertpeaks wurden für den positiven Messmodus 6 Substanzmassen detektiert, für den negativen Messmodus waren es 19 detektierte Substanzmassen. Nach der ersten Plausibilitätsprüfung (siehe Kapitel 3.1.14) der generierten Peakliste wurden 7 der detektierten Massen gezielt fragmentiert und die somit erhaltenen charakteristischen Fragmentmuster wurden im Anschluss mit denen der in den Datenbanken DAIOS [25] und MassBank [77] hinterlegten

Fragmentmuster verglichen. Zusätzlich wurde der Extrakt im Rahmen eines Target-Screenings auf die Zielanalyten des BSH-Monitoring-Programmes hin untersucht. Im Rahmen des Target-Screenings konnten unter der analysierten Hemmbande zehn Analyten (siehe Anhang Tabelle 7) identifiziert werden. Bei dem durchgeführten Non-Target Screening konnte von den 7 Fragmentmustern kein Fragmentmuster den beim Target-Screening detektierten Analyten zugeordnet werden. In einem Fall wurde eine Übereinstimmung mit den in der Datenbank DAIOS dokumentierten Fragmenten für die Substanz Fipronil, einem Insektizid aus der Gruppe der Phenylpyrazole [23] gefunden.

Eine erste Plausibilitätsprüfung erfolgte anhand der chemischen Struktur und des (log KOW) der Substanz Fipronil (siehe Tabelle 4.9). Bezogen auf die Substanz Fipronil, welche einen log KOW- Wert von 4,01 [118] besitzt, würde sich demnach eine theoretische Retentionszeit von 21,5 min ergeben. Die Substanz, deren Fragmentmuster mit dem der Substanz Fipronil eine Übereinstimmung brachte, wurde bei einer Retentionszeit von 22,92 min detektiert. Entsprechend konnte die gute Übereinstimmung der theoretisch berechneten und der gemessenen Retentionszeit als ein weiteres Indiz dafür gewertet werden, dass es sich bei der vorliegenden Substanz um Fipronil handelte. Weiterhin wird aus der Summen- und Strukturformel von Fipronil ersichtlich, dass Fipronil zwei Chloratome besitzt (siehe Tabelle 4.9). Da die natürlich vorkommenden Chlorisotope ^{35}Cl und ^{37}Cl in einem Verhältnis von etwa 3:1 zueinander stehen, war entsprechend zu erwarten, dass die theoretisch berechnete Peakintensität von ^{37}Cl - Fipronil etwa 70 % der Intensität des Fipronil-Monoisotopenpeaks beträgt und demnach ein ausreichend hohes Signal liefert, um von dem niedrig auflösenden MS detektiert werden zu können. Abbildung 4.21 zeigt die aus dem Full-Scan extrahierten Massensbereiche 434.7 Da bis 435.1 Da (Bereich der Monoisotopenmasse) und 436.7 Da bis 437.1 Da (Bereich der ^{37}Cl -Isotopenmasse).

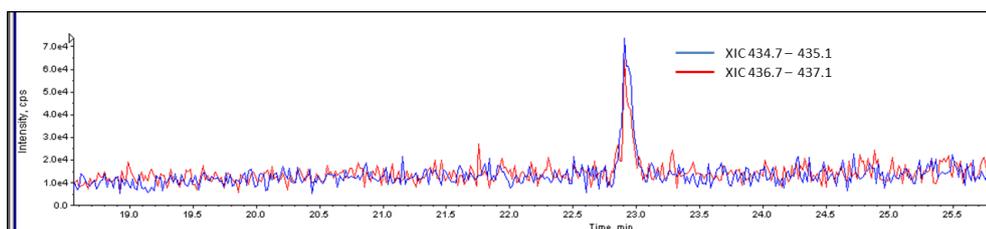


Abbildung 4.21 Aus dem Full- Scan extrahierte Massenspuren im Bereich der Fipronil Monoisotopenmasse (434.7 Da bis 435.1 Da) und dem Bereich der ^{37}Cl -Isotopenmasse (436.7 Da bis 437.1 Da).

Der ^{37}Cl -Isotopenpeak ist in Abbildung 4.21 deutlich erkennbar, weshalb die Datenbankübereinstimmung mit der Substanz Fipronil als plausibel angenommen werden

konnte. Eine abschließende Verifizierung der Substanz Fipronil wurde mit Hilfe eines Referenzstandards vorgenommen. Basierend auf der EG-Richtlinie 2002/657/EG [64] gilt eine Substanz unter der Verwendung eines Massenspektrometers als identifiziert, sobald mindestens drei Identifizierungspunkte erreicht werden, welche für die Messung des Vorläuferions und der Produktionen vergeben werden (siehe Tabelle 4.6). Bei der Verwendung eines niedrigauflösenden MS ist demnach für eine Substanzidentifizierung die Messung zweier Massenübergänge erforderlich. Zusätzlich müssen die Retentionszeit sowie die Verhältnisse der gemessenen Massenübergänge zueinander mit denen der Referenzsubstanz abgeglichen werden.

Tabelle 4.6 Erreichbare Identifizierungspunkte in Abhängigkeit vom gewählten massenspektrometrischen Verfahren nach EU Kommissions-Richtlinie 2002/657/EG.

MS-Verfahren	Erzielte Identifizierungspunkte pro Ion
Niedrig auflösende Massenspektrometrie (LR-MS)	1,0
LR-MS n Vorläufer-Ion	1,0
LR-MS n Übergangsprodukte	1,5
HRMS	2,0
HR- MS ⁿ Vorläufer-Ion	2,0
HR-MS ⁿ Übergangsprodukte	2,5
LR: Low Resolution (Niedrig-Auflösung)	
HR: High Resolution (Hoch-Auflösung)	

Abbildung 4.22 zeigt die extrahierte Massenspur sowie das zugehörige Fragmentmuster der Substanz Fipronil im untersuchten Probenextrakt als auch im Referenzstandard.

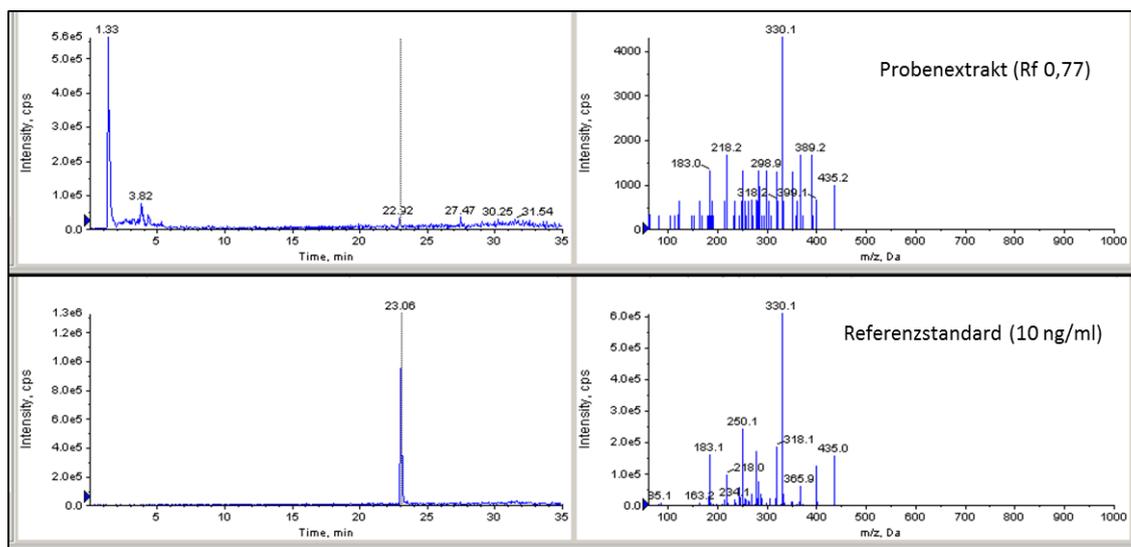


Abbildung 4.22 Extrahierte Massenspur und Massenspektrum des Product Ion Scans von Fipronil im untersuchten Probenextrakt (oben) und Referenzstandard (unten).

Sowohl die Retentionszeit von Fipronil, das charakteristische Fragmentmuster als auch die relativen Intensitätsverhältnisse (%) des Precursors und zweier Massenübergänge stimmen mit denen des Referenzstandards überein (siehe Tabelle 4.7). Die Substanz Fipronil konnte damit eindeutig identifiziert werden.

Tabelle 4.7 Vergleich der Retentionszeiten (t_R) sowie der relativen Intensitäten I (%) des Precursors und zweier Fragmente der Substanz Fipronil im Referenzstandard und in der Probe.

	t_R (min)	$I_{435,2}$	$I_{330,1}$	$I_{250,08}$
Fipronil-Standard	23,06	25,6 %	100 %	39,7 %
Fipronil-Probe	22,92	23,1 %	100 %	30,8 %

Die Ergebnisse zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, Schadstoffe, welche sich unterhalb einer detektierten Biolumineszenzhemmbande befinden, mit Hilfe des Non-Target Screenings zu identifizieren. Gleichzeitig werden hierbei Problematiken deutlich, welche bei dieser Methode der Schadstoffdetektion mit einhergehen: Eine detektierte Biolumineszenzhemmung, wie sie hier am Beispiel der Hemmbande im R_f -Bereich 0,77 beobachtet wurde, ist das Ergebnis einer toxischen Wirkung auf die *A. fischeri*-Bakterien von Substanzen einer unbekanntem Anzahl n . Unter der Voraussetzung einer vollständigen Extraktion dieser Substanzen von der HPTLC-Platte für deren anschließende Identifizierung, können bspw. zu geringe Konzentrationen im Extrakt oder zu starke Matrixeffekte dazu führen, dass die für die erfasste Toxizität relevanten Substanzen nicht detektiert und damit nicht identifiziert werden können. Des Weiteren müssen Substanzen, welche

detektierbar sind, im Anschluss identifiziert werden. Besonders bei der Verwendung eines niedrig auflösenden Massenspektrometers setzt dies in aller Regel das Vorhandensein des entsprechenden Substanz-Fragmentmusters in einer Datenbank voraus. Als Konsequenz bleiben viele noch nicht in Datenbanken erfasste Schadstoffe und Abbauprodukte und ein Großteil an nicht anthropogenen Substanzen, welche ebenfalls mit angereichert werden und durch deren starke Aufkonzentrierung ein toxischer Effekt induziert werden kann, nicht identifizierbar. Nach einer Schadstoffidentifizierung muss nachgewiesen werden, dass die zuvor detektierte Biolumineszenzhemmung durch diesen Schadstoff induziert wurde. Dies setzt eine Quantifizierung des Schadstoffes im untersuchten Probenextrakt mit anschließender Toxizitätstestung unter gleichen Versuchsbedingungen voraus. Während dies für einen identifizierten Schadstoff noch durchführbar ist, so ergibt sich bei mehreren identifizierten Schadstoffen neben der zeit- und kostenaufwändigen Entwicklung von Quantifizierungsmethoden die Problematik, dass sowohl die identifizierten Einzelsubstanzen sowie deren potentielle Mischungstoxizitäten getestet werden müssen, um die detektierte Toxizität einer oder mehrerer Schadstoffe zuordnen zu können. Für eine Anzahl n an Schadstoffen ergeben sich hieraus nach Gleichung 4.2

$$\sum_{k=0}^n \binom{n}{k} = 2^n \quad (4.2)$$

Möglichkeiten an Schadstoffkombinationen, welche für die Toxizitätsbestimmung getestet werden müssten (siehe Abbildung 4.23). Im vorliegenden Fall wurden unter der untersuchten Hemmbande im R_f -Bereich 0,77 im Rahmen des Target Screenings 10 Schadstoffe sowie Fipronil im Rahmen des Non-Target Screenings detektiert. Hieraus ergeben sich nach Gleichung 4.2 insgesamt 2048 Möglichkeiten an Schadstoffkombinationen, welche für die detektierte Toxizität in Frage kommen und welche in entsprechenden Versuchen auf ihrer Toxizität hin untersucht werden müssten. Diese hohe Anzahl an in Betracht zu ziehenden Substanzkombinationen wird zusätzlich durch die zuvor erwähnten Substanzen, welche mit der eingesetzten Analysemethode nicht detektierbar bzw. nicht identifizierbar sind um ein unbekanntes Vielfaches erhöht.

Eine Toxizitätsbestimmung der 2048 Schadstoffkombinationen ist aufgrund des hohen zeitlichen und finanziellen Aufwands kaum möglich. Trotz allem wurde für eine Toxizitätsabschätzung der insgesamt 11 detektierten Schadstoffe eine Quantifizierung im verwendeten Elbewasserextrakt vorgenommen. Die Ergebnisse der Schadstoffquantifizierung (siehe Anhang Tabelle 7) ergaben, dass die Konzentrationen der 11 Schadstoffe im Elbewasserextrakt zwischen 0,1 ng/ml und 20 ng/mL lagen, wobei Fipronil mit einer Konzentration von 2 ng/mL im Probenextrakt bestimmt wurde. Bei einem Applikati-

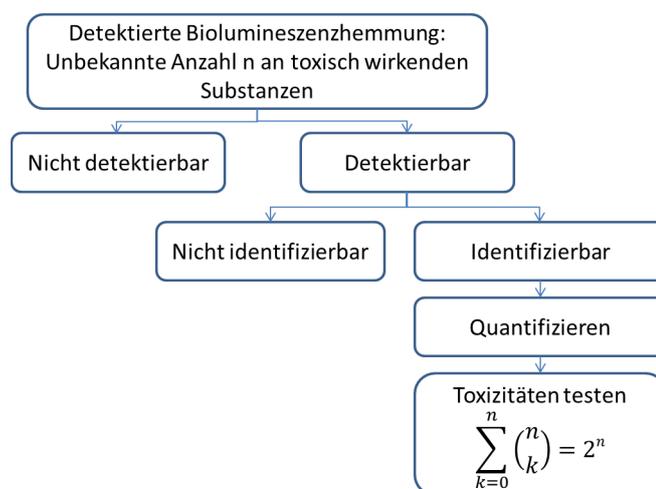


Abbildung 4.23 Unterteilung der unter einer Biolumineszenzhemmbande befindlichen Substanzen.

onsvolumen des Extraktes von 5 μL konnte demnach von einer Absolutmenge der 11 Schadstoffe von ca. 0,32 ng unter der detektierten Biolumineszenzhemmbande ausgegangen werden. Bei einer solch geringen Schadstoffkonzentration konnte basierend auf den Ergebnissen des Kapitels 4.1.2.2 rückgeschlossen werden, dass die 11 Schadstoffe alleine mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht für die detektierte Biolumineszenzhemmung verantwortlich waren.

In einem abschließenden Versuch wurde die Toxizität von Fipronil in der hier berechneten Konzentration von 0,01 ng/Bande auf *A. fischeri* sowie die potentielle Mischungstoxizität aus Fipronil und den beiden Schadstoffen Terbutylazin und Metolachlor, welche von den 11 Schadstoffen in den höchsten Konzentrationen im Probenextrakt vorlagen (vgl. Anhang Tabelle 7), getestet. Die Toxizitätstests ergaben, dass weder Fipronil noch die Kombination aus Fipronil, Terbutylazin und Metolachlor in den im untersuchten Probenextrakt vorliegenden Konzentrationen eine Biolumineszenzhemmung induzieren konnten.

Trotz allem wurde durch den Versuch deutlich, dass die durchgeführte HPTLC-Auftrennung des Elbewasserextraktes mit anschließender Extraktion für ein Non-Target Screening besser geeignet zu sein scheint, als die Verwendung des unaufgetrennten Elbewassergesamtextraktes. Dies lässt sich darauf zurück führen, dass die HPTLC-Auftrennung als ein Aufreinigungsschritt angesehen werden kann, wodurch die für das Non-Target Screening störenden Matrixeffekte abgeschwächt werden. Abbildung 4.24 zeigt hierzu beispielhaft die extrahierte Massenspur (XIC) von Fipronil des im Full-Scan gemessenen Elbewassergesamtextrakts im Vergleich zum Extrakt des von der HPTLC-Platte ausgestanzten R_f -Bereiches 0,77.

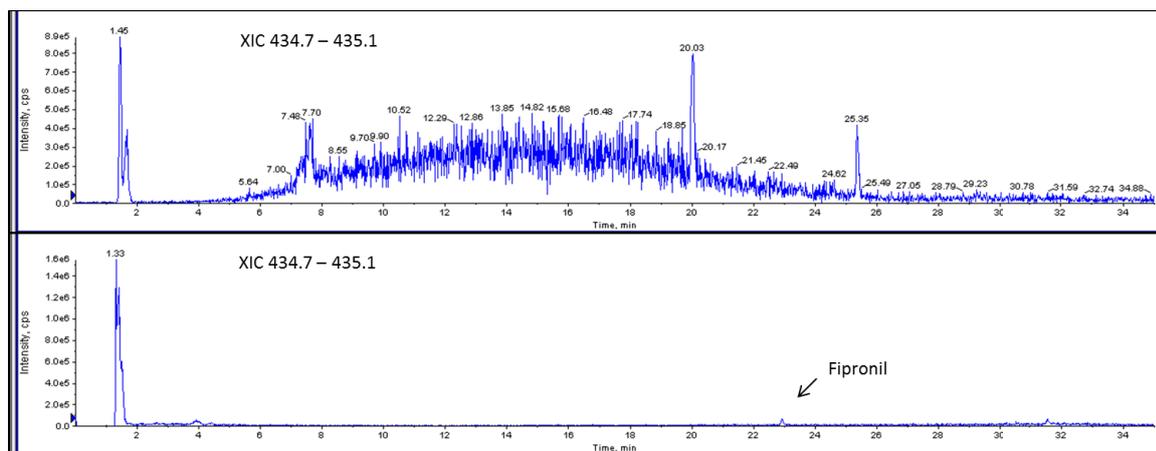


Abbildung 4.24 Aus dem Full-Scan extrahierte Massenspur (Fipronil: XIC 434.7 Da bis 435.1 Da) des gemessenen Elbewassergesamtextraktes (oben) und des Extraktes des von der HPTLC-Platte ausgestanzten R_f -Bereiches 0,77 (unten).

In Abbildung 4.24 ist deutlich zu erkennen, dass das XIC von Fipronil im gemessenen Elbewassergesamtextrakt fast über den gesamten Chromatographielauf stark verrauscht ist, so dass das Analyt-Signal von Fipronil nicht detektiert werden kann. Im Gegensatz hierzu ist der Analyt-Peak von Fipronil im HPTLC-aufgetrennten Extrakt trotz geringer Signalintensität noch erkennbar und konnte dementsprechend von der Auswertesoftware detektiert werden.

4.1.5 Verfahrensbeurteilung

Die hier ausführlich beschriebenen Ergebnisse der Untersuchung eines Elbewasserextraktes mittels HPTLC-Auftrennung und Toxizitätsdetektion mit *A. fischeri* zeigen deutlich die Limitierungen des Testsystems für die Untersuchung komplexer Proben: Je komplexer die Zusammensetzung einer Probe ausfällt, desto höher liegt die Wahrscheinlichkeit, dass eine detektierte Biolumineszenzhemmung von Substanzen induziert wurde, welche sich in der anschließenden Analytik nicht detektieren und/oder nicht identifizieren lassen. Entsprechend wird mit steigender Probenkomplexität der zu erbringende Nachweis, dass die Substanzen, welche identifiziert werden konnten, zumindest für einen Teil der beobachteten Biolumineszenzhemmung verantwortlich sind, erschwert. Im Falle der identifizierten Substanz Fipronil konnte nicht nachgewiesen werden, dass Fipronil in der ermittelten und untersuchten Konzentration eine toxische Wirkung auf *A. fischeri* besitzt. Entsprechend muss davon ausgegangen werden, dass Fipronil nicht aufgrund des hier verwendeten Effektorientierten Testsystems identifiziert werden konnte, sondern aufgrund des durchgeführten chemisch-analytischen Non-Target Screenings. Hierbei zeigte

sich, dass die HPTLC-Auftrennung des Elbewassergesamtextraktes zu einer Verbesserung des S/N-Verhältnisses in der anschließenden MS-Full-Scan Messung beitragen und somit die Detektion von Analyten-Peaks erleichtern bzw. erst ermöglichen kann. Aus diesem Grunde wurde entschieden, den Fokus für die Detektion relevanter Schadstoffe in der aquatischen Umwelt auf das Non-Target Screening mittels der Kombination aus HPTLC und HPLC-MS/MS zu legen. Um zu überprüfen, ob die hier genannten Vorteile, welche sich aus der HPTLC-HPLC-MS/MS Kombination ergeben, sich nicht nur auf die Extraktion des untersuchten R_f -Bereiches beziehen, wurde in einem folgenden Versuch die Extraktion eines Elbewasserextraktes über verschiedene R_f -Bereich durchgeführt und die so gewonnenen Extrakte wurden anschließend einem Non-Target Screening unterzogen. Die hieraus gewonnenen Ergebnisse werden im nachfolgenden Kapitel erläutert und diskutiert.

4.2 Projekt II: Chemisch-analytisches Schadstoffscreening

4.2.1 Identifizierte Schadstoffe

Basierend auf den im vorangegangenen Kapitel erläuterten Ergebnissen wurde der Fokus für die Identifizierung von für die aquatische Umwelt relevanten Schadstoffen auf das Non-Target Screening mittels der Kombination aus HPTLC-Probenauftrennung und anschließendem Schadstoff-Screening mittels HPLC-MS/MS gelegt. Der Vorteil liegt hierbei vor allem in der Reduzierung von Matrixeinflüssen, welche eine Detektion von relevanten Schadstoffen verhindern können. Dies konnte, wie zuvor in Kapitel 4.1.4.3 beschrieben, durch die Extraktion eines ausgewählten R_f -Bereiches eines HPTLC-aufgetrennten Elbewasserextraktes und der daraus folgenden Identifizierung des Schadstoffes Fipronil nachgewiesen werden. In einem folgenden Versuch sollte überprüft werden, ob die Extraktion über den gesamten R_f -Bereich vergleichbar gute Ergebnisse liefert. Hierfür wurde erneut ein Elbewasserextrakt mittels HPTLC aufgetrennt und es wurden die R_f -Bereiche 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 0,9 nach der in Kapitel 3.1.10.2 beschriebenen Methode extrahiert und im Anschluss, wie im vorangegangenen Kapitel erläutert, mittels HPLC-MS/MS analysiert. Für den R_f -Bereich 0,9 wurde zusätzlich eine GC-MS Analyse durchgeführt. Die Analyse der insgesamt sechs Extrakte und die anschließende Datenauswertung erbrachte in 13 Fällen eine Übereinstimmung mit den in Datenbanken hinterlegten charakteristischen MS-Substanz-Fragmentmustern.

Für den Extrakt des R_f -Bereiches 0 konnten mit dem Antihypertensiva Olmesartan, dem Neuroleptika Sulpirid und dem Transformationsprodukt des Antihypertensivas Valsartan, der Valsartan Säure, vergleichbare Fragmentmuster gefunden werden. Die Analyse

des Extraktes des R_f -Bereiches 0,2 erbrachte für sechs Substanzen eine Übereinstimmung mit den Fragmentmustern des Antihypertensiva Irbesartan sowie zwei von dessen Transformationsprodukten IRB-442 und IRB-446, dem Diuretika Torasemid, dem Opioid Tramadol und dem Transformationsprodukt Metolachlor Ethansulfonsäure (ESA) des Herbizides Metolachlor. Weiterhin zeigte eine im Extrakt des R_f -Bereiches 0,4 enthaltene Substanz ein vergleichbares Fragmentmuster mit dem Schmerzmittel Phenazon. Zwei übereinstimmende Fragmentmuster konnten im Extrakt des R_f -Bereiches 0,6 für das Herbizid Tebutam und die Substanz Indol-3-carboxaldehyd nachgewiesen werden. Im Extrakt des R_f -Bereiches 0,8 konnte erneut das Insektizid Fipronil identifiziert werden (vgl. Kapitel 4.1.4.3). Die Analyse des Extraktes des R_f Bereiches 0,9 ergab keinerlei Übereinstimmungen mit den Datensätzen der verwendeten Datenbanken. Für eine erste Plausibilitätseinschätzung der Ergebnisse wurde das Vorhandensein des zu der jeweiligen Substanz zugehörigen Isotopenpeaks überprüft. Bei neun der insgesamt 12 potentiellen Schadstoffe (Fipronil wurde wie in Kapitel 4.1.4.3 beschrieben bereits identifiziert) konnte der zugehörige Isotopenpeak detektiert werden. Zusätzlich wurde basierend auf der für diese Messmethode bestimmten Korrelation zwischen dem log KOW-Wert einer Substanz und deren Retentionszeit (siehe Abbildung 3.14) die gemessene Retentionszeit mit der berechneten, theoretischen Retentionszeit und dem zugehörigen 95 %-Prognoseintervall nach [61] verglichen (siehe Tabelle 4.8). Da für alle Substanzen mindestens ein Plausibilitätskriterium erfüllt wurde, wurden die für eine eindeutige Identifizierung notwendigen Referenzstandards erworben (siehe Kapitel 3.2.1). Für die Substanzen IRB-442 und Metolachlor ESA konnten keine Referenzstandards erworben werden. Die als erstes zur Verfügung stehenden Referenzstandards für die Substanzen Valsartan Säure, Olmesartan, Tramadol, Torasemid, IRB-446, Irbesartan, Phenazon und Tebutam wurden mit der gleichen Messmethode wie die Probenextrakte analysiert und im Anschluss wurden die Fragmentmuster und Retentionszeiten der Referenzstandards mit den entsprechenden Probensubstanzen verglichen (siehe Anhang Abbildung 5). Hierbei zeigte sich, dass die Fragmentmuster und Retentionszeiten der Referenzstandards Irbesartan, IRB-446, Torasemid und Tramadol vergleichbar mit den entsprechenden detektierten Substanzen der Probenextrakte waren. Die Retentionszeitendifferenz von allen vier Referenzstandards zu den Probensubstanzen lag bei $\Delta t_R = 0,2$ min. Ebenfalls lagen sehr gute Fragmentmusterübereinstimmungen der Probensubstanzen zu denen der Referenzstandards Olmesartan, Phenazon und Valsartan Säure vor. Allerdings lagen die Retentionszeitendifferenzen der drei Referenzsubstanzen zu den in der Probe detektierten Substanzen zwischen 0,6 min und 2 min. Diese größere Retentionszeitabweichung kann darauf zurückgeführt werden, dass zwischen den einzelnen Messungen ein größerer zeitlicher Abstand lag, wodurch

diese Substanzen von einer Retentionszeitverschiebung betroffen waren. Retentionszeitverschiebungen sind ein gängiges Phänomen in der HPLC-Anwendung und wirken sich nicht immer konstant auf alle Analyten aus. Für die Referenzsubstanz Tebutam wiesen die charakteristischen Fragmente unterschiedliche Intensitätsverhältnisse im Vergleich zu denen der entsprechenden Probensubstanz auf. Ebenfalls konnte hier eine hohe Retentionszeitdifferenz von 5,1 min festgestellt werden.

Obwohl bis auf Tebutam für alle Fragmentmuster der Referenzsubstanzen eine sehr gute Übereinstimmung mit denen der in dem Elbewasserextrakt detektierten Substanzen vorlag, konnte aufgrund der, wenn auch teilweise nur geringfügigen, Retentionszeitdifferenz nicht von einer eindeutigen Identifizierung der Substanzen ausgegangen werden. Aus diesem Grunde wurde für die einzelnen Substanzen eine MRM-Methode entwickelt. Hierdurch wurde eine höhere Empfindlichkeit der zu messenden Massenübergänge als auch eine erhöhte Stabilität der Retentionszeiten erreicht (siehe Kapitel 3.2.1). Für die Substanzen Indol-3-carboxaldehyd und Sulpirid, deren Referenzstandards erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung standen, wurde basierend auf den zuvor gewonnenen Ergebnissen, kein Fragmentierungsexperiment durchgeführt. Stattdessen erfolgte die Identifizierung direkt über die entwickelte MRM-Methode. Die gemessenen Massenübergänge der jeweiligen Substanzen, die zugehörigen Kollisionsenergien sowie die Retentionszeiten sind im Anhang in Tabelle 2.15 zusammengefasst dargestellt. Von den insgesamt 13 detektierten Schadstoffen konnten somit 10 Schadstoffe mit Hilfe eines Referenzstandards eindeutig identifiziert werden (siehe Tabelle 4.8).

Tabelle 4.8 Auflistung der analysierten Extrakte sowie die in den Datenbanken dokumentierten Substanzen, die im Vergleich zu den jeweiligen Analysedaten übereinstimmende Fragmentmuster aufwiesen, deren log KOW-Wert, sowie basierend darauf, die resultierende berechnete t_R (min) \pm 95 %-Prognoseintervall im Vergleich zur gemessenen t_R (min). Das Vorhandensein des zu einer Substanz zugehörigen Isotopenpeaks sowie des für die Identifizierung notwendigen Referenzstandards wurde mit x = vorhanden bzw. o = nicht vorhanden markiert. Identifizierte Substanzen sind mit x gekennzeichnet, nicht identifizierte mit o.

R _r -Wert	Substanz	Isotop	log KOW	t _R gemessen (min)	t _R berechnet (min)	Ref.-Std.	Ident.	Anwendung
0,8	Fipronil	x	4,01	25,2	25,5 ± 9,1	x	x	Insektizid
0,6	Indol-3-carboxaldehyd	x	1,7	13,8	11,9 ± 8,8	x	x	Metabolit
	Tebutam	o	3,5	17	22,5 ± 8,9	x	o	Herbizid
0,4	Phenazon	x	0,6	10,7	5,4 ± 9,4	x	x	Analgetikum
0,2	Irbesartan	x	4,1	20,6	26 ± 9,2	x	x	Antihypertensiva
	IRB_442	x	k.A.	18	k.A.	o	o	TP von Irbesartan
	IRB_446	x	k.A.	18,5	k.A.	x	x	TP von Irbesartan
	Metolachlor ESA	o	1,7	15,7	11,9 ± 8,8	o	o	TP von Metolachlor (Herbizid)
	Torasemid	x	2,0	14,4	13,6 ± 8,7	x	x	Diuretika
	Tramadol	o	2,6	9,7	17,2 ± 8,7	x	x	Opioid
0,0	Olmesartan	x	3,2	14,3	20,5 ± 8,8	x	x	Antihypertensiva
	Sulpirid	o	0,7	8,5	6 ± 9,3	x	x	Neuroleptika
	Valsartan Säure	x	k.A.	13,2	k.A.	x	x	TP von Valsartansäure

t_R- Retentionszeit; Ref.-Std.- Referenzstandard; Ident.- Identifiziert; TP- Transformationsprodukt

Basierend auf dem eindeutigen Nachweis der zehn Schadstoffe im Elbewasser sollte im Folgenden untersucht werden, ob sich diese Schadstoffe ebenfalls in Meerwasserproben aus der Deutschen Bucht nachweisen lassen. Hierfür wurden die im Rahmen des BSH-Monitorings gewonnenen Festphasenextrakte der Meerwasserproben, welche an den Stationen ES1, EIDER, HELGO, Sylt1, NSB3 und DTEND genommen wurden, inklusive der Blindwerte, sowie die zugehörigen Rückstellproben auf die zehn Schadstoffe hin analysiert. Die Lage der Messstationen ist in Abbildung 4.25 dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass alle Schadstoffe in den Meerwasserproben der Messstationen ES1, EIDER, HELGO, Sylt1 und NSB3 qualitativ nachzuweisen waren. Eine Ausnahme bildete der Schadstoff Valsartan Säure. Valsartan Säure konnte in der Meerwasserprobe der Messstation Sylt1 nicht nachgewiesen werden. Bis auf Indol-3-carboxaldehyd konnte keiner der Schadstoffe in der Meerwasserprobe der küstenfernsten Station DTEND nachgewiesen werden. Keiner der Schadstoffe, bis auf Indol-3-carboxaldehyd, konnte in den zugehörigen Blindwerten nachgewiesen werden. Die hier beschriebenen Ergebnisse sind in Abbildung 4.25 zusammengefasst dargestellt.

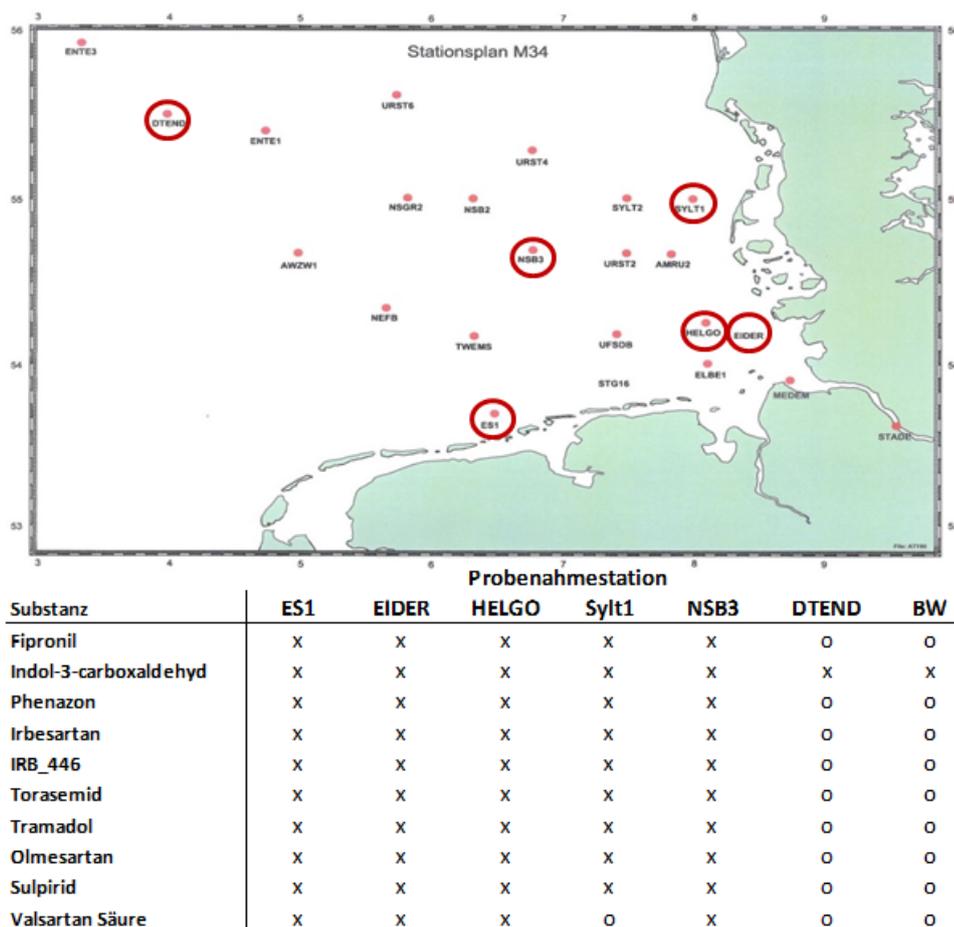


Abbildung 4.25 Probenahmestationen der untersuchten Wasserproben. x = Schadstoff konnte qualitativ nachgewiesen werden; o = Schadstoff konnte qualitativ nicht nachgewiesen werden; BW = Blindwert

Obwohl die Substanz Indol-3-carboxaldehyd nicht im Blindwert der Elbewasseruntersuchung nachzuweisen war, wurde sie in den Blindwerten der Meerwasseruntersuchungen in ähnlich hohen Intensitäten wie in den Proben detektiert. Auffällig war ebenfalls, dass keine Intensitätsabnahme des Messsignales von den küsten nahen Messstationen zu der küstenfernen Messstation DTEND feststellbar war. Entsprechend musste davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Substanz Indol-3-carboxaldehyd um eine Verunreinigung handelte.

Im Folgenden wurde überprüft, ob die identifizierten Schadstoffe auch unabhängig von der chromatischen HPTLC-Auftrennung, d.h. durch einen Full-Scan des Elbewassergesamtextraktes hätten identifiziert werden können. Hierbei zeigte sich, dass wie beispielhaft in Abbildung 4.24 dargestellt, die Massenspuren der zehn identifizierten Substanzen im Gesamtextrakt zu verrauscht gewesen wären, um diese mit Hilfe der Software

PeakView herauszufiltern. Bezüglich des Vorkommens der identifizierten Schadstoffe im Elbewasser, konnten bis über die Schadstoffe Phenazon [122] und Tramadol [41], keine weiteren Veröffentlichungen ausfindig gemacht werden. Allerdings lagen zu allen Schadstoffen Veröffentlichungen vor, welche das Vorhandensein der Schadstoffe in diversen Oberflächengewässern, dokumentieren. Beispielsweise wurden die Schadstoffe Irbesartan, Torasemid und Valsartan (Ausgangsprodukt der Valsartan Säure) im Fluss- und Küstengewässern in Spanien nachgewiesen [115, 85]. Weiterhin wurde das Transformationsprodukt Valsartan Säure im Fluss Erpe, einem Nebenfluss der Spree, detektiert [60]. Die Schadstoffe Sulpirid und Olmesartan konnten in Flussgewässern von Japan und China nachgewiesen werden [3, 78]. Details zum Vorkommen von Fipronil in Gewässern sind im Kapitel 4.2.2 erläutert.

Folgend sollte eine Quantifizierung der identifizierten Schadstoffe für Elbe- und Nordseewasser erfolgen. Aus zeitlichen Gründen musste sich hierbei auf eine Substanz beschränkt werden. Da Fipronil von allen Substanzen den höchsten log KOW-Wert und damit ein hohes Potential für Bioakkumulierbarkeit aufweist, wurde entschieden, die Substanz Fipronil für die Quantifizierung heranzuziehen. Die Ergebnisse sind im folgenden Kapitel ausführlich erläutert.

4.2.2 Fipronil und Fipronil-Transformationsprodukte

Fipronil ist ein Insektizid aus der Gruppe der Phenylpyrazole, dessen Wirkungsprinzip auf der Blockierung des Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA)-Chlorid-Ionenkanals beruht. Hierdurch wird eine tödliche Überreizung des Nervensystems von Insekten herbeigeführt [24]. Ähnliche Wirkmechanismen sind von Insektiziden der älteren Generation, wie bspw. Lindan, Dieldrin und Endosulfan bekannt [116, 24, 49]. Im Vergleich weist Fipronil jedoch eine spezifischere Bindungsaffinität gegenüber den GABA-Rezeptoren von Insekten auf, weshalb Fipronil ein geringeres Schädigungspotential gegenüber den sogenannten Non-Target Organismen zugeordnet wird.

In Deutschland ist der Einsatz von Fipronil als Pflanzenschutzmittel verboten. Basierend auf dem Artikel 53 der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 [28] kann in Notfallsituationen das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit jedoch die Anwendung bestimmter Pflanzenschutzmittel für einen begrenzten Zeitraum genehmigen. In den Jahren 2009 bis 2015 wurde Fipronil als Notfallmittel gegen Schnellkäfer (Drahtwurm) im Kartoffelanbau zugelassen. Ab dem Jahr 2016 wurde hierfür keine Genehmigung mehr erteilt. Weiterhin ist Fipronil als Biozid gegen Ungeziefer wie bspw. Zecken, Motten oder Ameisen zugelassen [63].

Fipronil ist in der Umwelt nicht stabil, wobei es leicht zu der Bildung von Transformati-

onsprodukten kommt. Die drei am häufigsten dokumentierten Transformationsprodukte sind Fipronil-desulfinyl, Fipronil-sulfon und Fipronil-sulfid [113, 45]. Aufgrund dieser Tatsache wurde zusätzlich ein Suspect-Target Screening für diese Substanzen durchgeführt. Die XIC der negativen Full-Scan Messung des Hemmbandenextraktes (R_f 0,77) als auch die des unaufgetrennten Gesamtextraktes konnten das Vorhandensein der drei Abbauprodukte nicht bestätigen. Basierend auf den in der Datenbak DAIOS hinterlegten Fragmenten wurde daraufhin eine MRM-Messung des Gesamtextraktes durchgeführt, da hierdurch im Vergleich zu den Full-Scan Messungen eine höhere Sensitivität erreicht werden kann. Die Ergebnisse der Messung zeigten, dass die Transformationsprodukte Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon im Gesamtextrakt qualitativ nachzuweisen waren (siehe Abbildung 4.26). Aus diesem Grund wurde für die beiden Transformationsprodukte ebenfalls eine Quantifizierungsmethode entwickelt. Fipronil-sulfid konnte in der untersuchten Probe nicht detektiert werden.

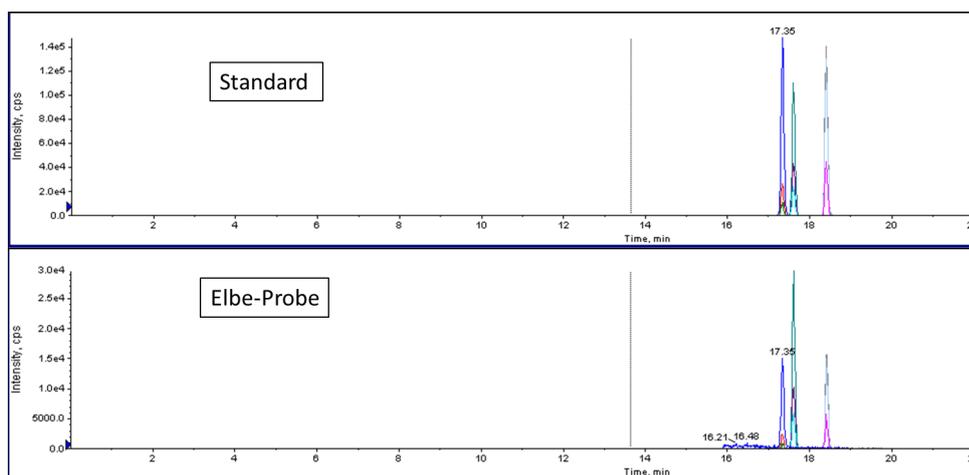
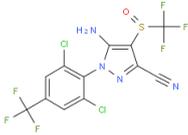
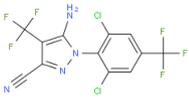
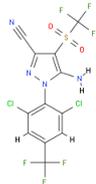


Abbildung 4.26 Vergleich der MRM-Messung eines Standards und der untersuchten Elbewasser-Probe für Fipronil (Peak mittig), Fipronil-desulfinyl (Peak links) und Fipronil-sulfon (Peak rechts).

In Tabelle 4.9 sind die Struktur- und Summenformeln, die Monoisotopenmassen und die log KOW-Werte von Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon im Vergleich zu Fipronil zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 4.9 Stoffeigenschaften des Insektizids Fipronil und zwei seiner Transformationsprodukte Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon

	Fipronil	Fipronil-desulfinyl	Fipronil-sulfon
Strukturformel			
Summenformel	$C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$	$C_{12}H_4Cl_2F_6N_4$	$C_{12}H_4Cl_2F_6N_4O_2S$
Monoisotopenmasse (Da)	435.938690	387.971710	451.933624
logKOW	4,01 [118]	4,63 [118]	3,68 [118]

Während die Bildung von Fipronil-desulfinyl ausschließlich aufgrund von Photooxidation zu erfolgen scheint, konnte die Bildung von Fipronil-sulfon aufgrund biotischer Transformationsprozesse durch Vertebraten, Invertebraten und Pflanzen, durch mikrobiologische Abbauprozesse sowie durch Photooxidation nachgewiesen werden [16, 34, 48, 95].

4.2.2.1 Elbewasser

Nachdem die Substanz Fipronil sowohl in Wasserproben der Elbe und der Nordsee qualitativ nachgewiesen wurde und zwei seiner Transformationsprodukte ebenfalls in einer Elbewasserprobe zu detektieren waren, sollten die drei Substanzen quantitativ erfasst werden. Um Aussagen über das Vorkommen und die Konzentration von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon über einen länger betrachteten Zeitraum treffen zu können, wurde teilweise auf Rückstellproben des BSH zurückgegriffen. Genommene Elbewasserproben wurden entsprechend mit der damals verwendeten Methode aufgearbeitet, um vergleichbare Messergebnisse zu erhalten (siehe Kapitel 3.2.2). Insgesamt wurden hierfür neun Elbewasserproben aus einem Zeitraum von Juni 2013 bis Januar 2015 sowie Meerwasserproben von Mai 2014 analysiert. Die gemessenen Konzentrationen von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in den Elbewasserproben sind in Abbildung 4.27 [80] dargestellt.

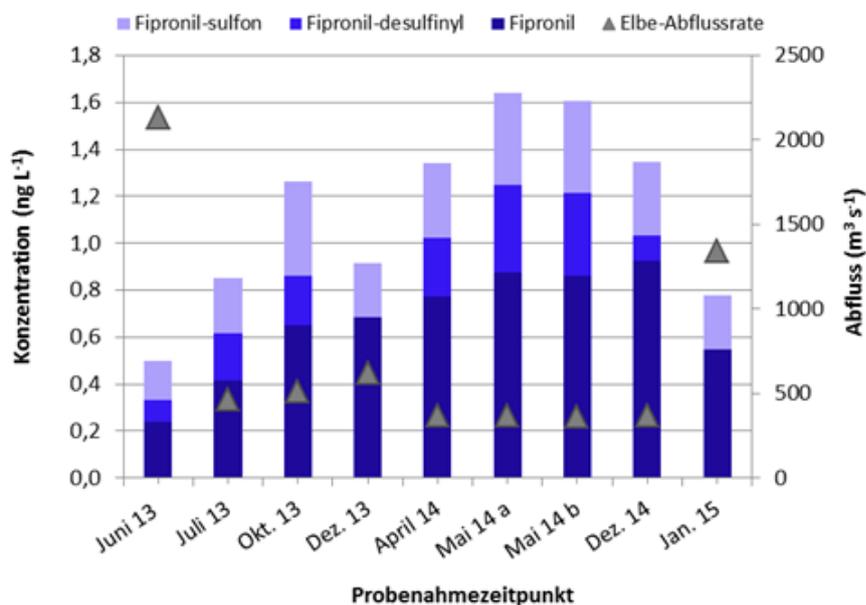


Abbildung 4.27 Gemessene Konzentrationen (ng/L) von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in den untersuchten Elbewasserproben, sowie die zugehörige Abflussrate der Elbe (m^3/s) zur jeweiligen Probenahmezeit.

Aus Abbildung 4.27 wird ersichtlich, dass die Summenkonzentrationen von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon für die analysierten Proben zwischen 0,5 ng/L und 1,6 ng/L lagen. Es konnte eine negative Spearman-Korrelation ($r_s = -0,87$; $p < 0,005$) zwischen der Abflussrate der Elbe und den Summenkonzentrationen festgestellt werden. Entsprechend wurden die höchsten Summenkonzentrationen in den Proben (April 14, Mai 14a und Mai 14b) gemessen, bei denen zum Zeitpunkt der Probenahme die Abflussrate der Elbe am niedrigsten war. Im Gegensatz dazu wurden die niedrigsten Summenkonzentrationen in den Proben gemessen, bei denen die Elbe-Abflussrate zum Probenahmezeitpunkt (Juni 2013 und Januar 2015) am höchsten war (vgl. 11). Die im Vergleich zu den restlichen Proben zwei- bis dreifach niedrigere Summenkonzentration der Probe vom Juni 2013 kann auf das zu diesem Zeitpunkt vorherrschende Hochwasserereignis zurückgeführt werden, welches zu einer stärkeren Verdünnung der Fipronil- und Fipronil-Transformationsprodukte führte.

In allen untersuchten Proben war Fipronil mit der höchsten Konzentration (0,24 ng/L bis 0,92 ng/L) vertreten, gefolgt von Fipronil-sulfon (0,16 ng/L bis 0,39 ng/L) und Fipronil-desulfinyl (<LOQ bis 0,37 ng/L). Ein saisonaler Zusammenhang konnte für die Konzentrationen von Fipronil und Fipronil-desulfinyl festgestellt werden. Während der prozentuale Anteil der Fipronilkonzentration in den Wasserproben, welche in den Wintermo-

naten (Dez. 2013, 2014 und Jan. 2015) genommen wurden, bei durchschnittlich 71,3 % lag, konnte eine Reduzierung des Anteils der Fipronilkonzentration auf durchschnittlich 52,2 % in den Wasserproben festgestellt werden, welche während der Frühlings- und Sommersaison (Juni, Juli 2013 und April, Mai 2014) gewonnen wurden. Gleichzeitig konnte eine Erhöhung der Fipronil-desulfinyl Konzentration um etwa denselben Anteil (18,6 %) festgestellt werden. Dieser saisonale Zusammenhang kann als plausibel bewertet werden, da Fipronil-desulfinyl ausschließlich aufgrund von Photooxidation gebildet wird [16, 48]. Für das Transformationsprodukt Fipronil-sulfon konnte kein saisonaler Trend festgestellt werden. Der Anteil der Fipronil-sulfon Konzentration in den Proben kann als konstant angesehen werden ($26,6 \% \pm 3,3 \%$). Um eine bessere Vergleichbarkeit der zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen Schadstoffkonzentrationen zu erhalten, wurden die Fipronil- und Fipronil-sulfon Konzentrationen auf den Elbepegelstand [110] bezogen, welcher zu dem jeweiligen Probenahmezeitpunkt vorherrschte. Hierbei zeigten sich sowohl für Fipronil als auch für Fipronil-sulfon fast einheitliche Quotienten ($0,18 \text{ ng}/(\text{L} \cdot \text{m}) \pm 0,04 \text{ ng}/(\text{L} \cdot \text{m})$ für Fipronil und $0,08 \text{ ng}/(\text{L} \cdot \text{m}) \pm 0,02 \text{ ng}/(\text{L} \cdot \text{m})$ für Fipronil-sulfon), welche darauf hindeuten, dass der Eintrag an Fipronil über die Monate hin relativ konstant war. Angesichts der Tatsache, dass der Einsatz Fipronil-haltiger Produkte hauptsächlich in den Frühlings- und Sommermonaten erfolgt, wären stark rückgängige Fipronilkonzentrationen bzw. -einträge während der Herbst- und Wintermonate zu erwarten gewesen. Dies konnte anhand der Messwerte jedoch nicht betätigt werden. Ein möglicher Grund könnten Auswaschprozesse aufgrund von Regenfällen gewesen sein, welche das verwendete Fipronil aus den Frühlings- und Sommermonaten in die Elbe eingetragen haben. In diesem Fall wären jedoch ein steigender Anteil der Fipronil-sulfon-Konzentration aufgrund voranschreitender Transformationsprozesse, in den Proben der Herbst- und Wintermonate zu erwarten gewesen. Ein solcher Anstieg konnte bspw. in Proben aus städtischen Regenwasserabflüssen in Kalifornien beobachtet werden. Hier stieg der Fipronil-sulfon Anteil in Proben aus den Frühlings- und Sommermonaten von $\sim 20 \%$ auf $\sim 40 \%$ in Proben, welche im Oktober genommen wurden [42].

Ein direkter Vergleich der hier gemessenen Schadstoffkonzentrationen mit denen aus Studien anderer Länder ist schwierig, da die Konzentrationen von Fipronil in Gewässern stark von den regionalen Gegebenheiten, wie beispielsweise klimatischen Bedingungen oder gesetzlichen Regulierungen, abhängen. Ungeachtet dessen weisen weiträumige Gewässeruntersuchungen innerhalb der USA, im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit, weitaus höhere Konzentrationen von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon (μg -Bereich) auf [45, 121, 124]. Obwohl die hier präsentierten Messdaten kein lückenloses Konzentrationsprofil für den betrachteten Zeitraum aufweisen, so ist basierend auf

der Datenlage trotz allem zu vermuten, dass eine permanente Kontamination des Elbewassers mit Fipronil und dessen Transformationsprodukten vorlag.

4.2.2.2 Nordseewasser

Aufgrund der Tatsache, dass die Elbe in die Nordsee mündet, war zu erwarten, dass Fipronil und dessen Transformationsprodukte ebenfalls im Wasser der Nordsee vorzufinden sind. Entsprechend wurden Nordseewasserproben küstennaher und küstenferner Messstationen (siehe Abbildung 3.15) auf Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon hin untersucht. In allen Proben konnten Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon nachgewiesen werden. Die Summenkonzentration von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon lag hierbei zwischen 96 pg/L und 164 pg/L. In den Wasserproben der küstenfernen Messstation DTEND (siehe Abbildung 3.15) lagen die gemessenen Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze. Hier waren Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon nur qualitativ nachweisbar. Im Vergleich zu den Elbewasserproben war in den Meerwasserproben Fipronil-desulfinyl anteilig am höchsten vertreten, gefolgt von Fipronil-sulfon und Fipronil, welches anteilig am geringsten vorlag. Die Konzentrationsverhältnisse waren für die Wasserproben der Probenahmestationen EIDER, Sylt1 und ES1 praktisch konstant. Hier war Fipronil-desulfinyl anteilig an der Gesamtkonzentration mit $54,7\% \pm 1,7\%$ vertreten. Die Fipronil-sulfon Konzentration machte hingegen $39,4\% \pm 1,0\%$ der Gesamtkonzentration aus. Hingegen war Fipronil mit lediglich $5,9\% \pm 1,2\%$ in den betrachteten Proben anteilig vorhanden. Eine Ausnahme bildete die Probe der Messstation HELGO. Hier lag der Fipronil-Anteil bei $14,1\%$ und damit mehr als doppelt so hoch im Vergleich zu den anderen Proben (siehe auch Anhang Tabelle 12). Abbildung 4.28 zeigt die gemessenen Konzentrationen von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in den Nordseewasserproben der vier Messstationen im Vergleich zu einer dem gleichen Zeitraum zugehörigen Elbewasserprobe.

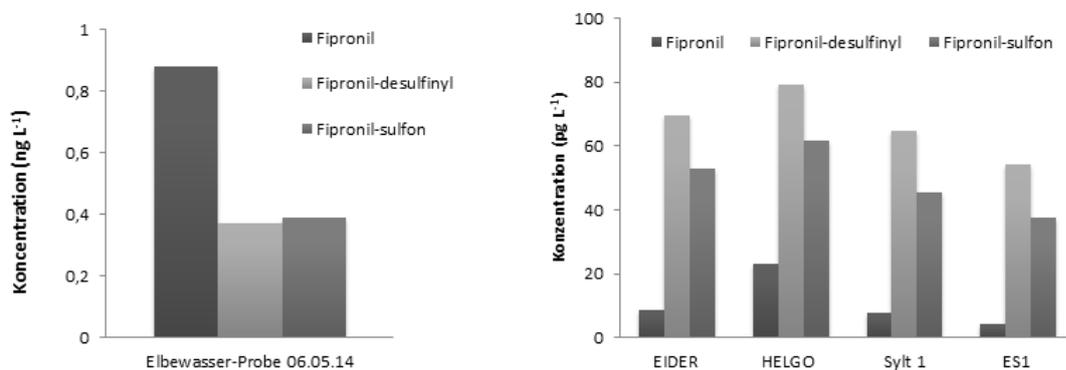


Abbildung 4.28 Gemessene Konzentrationen von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon (pg/L) in den Nordseewasserproben der Messstationen EIDER, HELGO, Sylt1 und ES1 (Abbildung rechts) im Vergleich zu den Konzentrationen der drei Substanzen (ng/L) in einer Elbewasserprobe (Abbildung links).

Wie zu erwarten war, lagen die gemessenen Konzentrationen von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in den Nordseewasserproben, aufgrund des Verdünnungseffektes, um etwa den Faktor 100 niedriger als im Vergleich zu den gemessenen Konzentrationen in den Elbewasserproben. Auffällig war hingegen der stark gesunkene prozentuale Anteil der Fipronil-Konzentration. Ein möglicher Grund hierfür könnte die längere Verweildauer des in die Elbe eingetragenen Fipronils in der Umwelt gewesen sein, wodurch dessen Transformation in die beiden Produkte Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon begünstigt wurde. Ein weiterer Faktor, der sich begünstigend auf die Umwandlung von Fipronil in seine Transformationsprodukte ausgewirkt haben könnte, ist der Salzgehalt der Nordsee. Walse et al. (2004) [117] beobachtete eine um 20 % erhöhte Photodegradations-Kinetik von Fipronil in einer wässrigen Lösung unter der Zugabe von NaCl (3 %) im Vergleich zu einer wässrigen Lösung ohne NaCl-Zusatz.

Die hier untersuchten Proben repräsentieren nur ein sehr kleines Zeitfenster (Mai 2014). Basierend auf den Messergebnissen der Elbewasserproben kann jedoch davon ausgegangen werden, dass eine kontinuierliche Kontamination der Nordsee mit Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon durch den Zufluss der Elbe vorlag.

4.2.2.3 Aalproben

Aufgrund der relativ hohen log KOW-Werte von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon (siehe Tabelle 4.9), sowie der vorliegenden Studienlage, welche aufzeigt, dass Fipronil das Potenzial besitzt, in Fischen zu akkumulieren [66, 81, 97, 99, 113], wurde untersucht, ob sich Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in Fischen, welche der Elbe entnommen wurden, nachweisen lassen. Der Europäische Aal (*Anguilla an-*

guilla) wurde hierfür als besonders geeignet angesehen, da er aufgrund seines hohen Körperfettanteils und seiner hohen Lebenserwartung (bis zu 50 Jahren) prädestiniert dafür ist, Schadstoffe aus der Umwelt zu bioakkumulieren [40, 114]. Insgesamt wurden 13 Blankaale für die Untersuchung herangezogen, welche im November 2013 und 2014 in der Nähe der Entnahmestelle für Elbewasser-Beprobung gefangen wurden (siehe Kapitel 3.2.2). Untersucht wurden hierbei jeweils 13 Leberproben sowie zusätzliche sechs Muskelproben der 13 Blankaale. Die Bezeichnung Blankaal bezieht sich auf einen Teil des Aal-Lebenszyklus. In diesem Zeitraum steht der Aal kurz vor der Abwanderung zum Laichen in die Sargassosee und stellt hierfür die Nahrungsaufnahme ein. Vor dem Hintergrund, dass Kornwick et al. (2006) [66] in einer Studie nachwies, dass bioakkumuliertes Fipronil in Fischen schnell eliminiert wird (Halbwertszeiten für Fipronil von 0,6 Tagen, hauptsächlich aufgrund von Biotransformationsprozessen und zwei Tage für Fipronil-sulfon), wurde davon ausgegangen, dass eine evtl. Bioakkumulation von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in den Aalproben hauptsächlich über die Wasserphase erfolgt sein muss.

Die Messungen ergaben, dass Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in allen der sechs Muskelproben nachzuweisen waren. Hierbei lagen die Konzentrationen für Fipronil bezogen auf das Nassgewicht (NG) zwischen 0,04 ng/g NG und 0,32 ng/g NG, für Fipronil-desulfinyl zwischen 0,02 ng/g NG und 0,13 ng/g NG und für Fipronil-sulfon zwischen 0,52 ng/g NG und 11,24 ng/g NG. Im Gegensatz zu den Muskelproben, konnte in den Leberproben kein Fipronil-desulfinyl nachgewiesen werden. In den Leberproben konnten Fipronil-Konzentrationen zwischen 0,09 ng/g NG und 1,96 ng/g NG sowie Fipronil-sulfon-Konzentrationen zwischen 6,83 ng/g NG und 44,29 ng/g NG nachgewiesen werden. Innerhalb einer Probe war Fipronil-sulfon jeweils mit der höchsten Konzentration vertreten. Innerhalb der sechs zusammengehörigen Muskel-Leber Paare konnte ein Verhältnis der durchschnittlichen Konzentrationen ($c_{\text{Leber}}/c_{\text{Muskel}}$) von 4.6 für Fipronil sowie Fipronil-sulfon festgestellt werden, was darauf hinweist, dass in der Leber verstärkt Fipronil und Fipronil-sulfon bioakkumuliert werden. In Tabelle 4.10 sind die durchschnittlichen Konzentrationen für Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in den Muskel- und Leberproben bezogen auf das NG als auch das Fettgewicht (FG) aufgelistet. Obwohl der Fettanteil innerhalb eines Organismus einen entscheidenden Einfluss auf die Bioakkumulation von Schadstoffen besitzt, konnte in dieser Studie kein Zusammenhang zwischen der Konzentration von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon und dem Fettgehalt von Muskel- und Leberproben (siehe Anhang Tabelle 15) festgestellt werden. Dieses Ergebnis steht in Kontrast zu den Ergebnissen der Studie von Miranda et al. (2008) [81], in der eine positive Korrelation zwischen dem

Fettgehalt und der Konzentration von Fipronil in der Leber von Traíra-Fischen (*Hoplias malabaricus*) gefunden wurde. In einer Studie von Ribeiro et al. (2008) [97] konnte ebenfalls Fipronil in Muskel- und Leberproben von Aalen nachgewiesen werden, welche aus dem Natur Reservoir Camargue in Frankreich entnommen wurden. Die hier gemessenen Fipronil-Konzentrationen (es wurden nur Konzentrationen bezogen auf das Trockengewicht angegeben) lagen im Vergleich zur vorliegenden Studie um ein Vielfaches höher (243- bis 335-fach für Muskelproben und 23- bis 67-fach für Leberproben). Das Verhältnis der durchschnittlichen Fipronil-Konzentrationen von zusammengehörigen Muskel- und Leberproben ($c_{\text{Leber}} / c_{\text{Muskel}}$) lag im Vergleich zur vorliegenden Studie um etwa den Faktor sieben niedriger (bezogen auf das Trockengewicht).

Tabelle 4.10 Durchschnittliche Konzentrationen (ng/g) sowie die zugehörigen Standardabweichungen von Fipronil, Fipronil-desufinyl und Fipronil-sulfon in den untersuchten Muskel- und Leberproben von Aalen bezogen auf das Nassgewicht (NG) und Fettgewicht (FG).

	Konzentration	Leber n=13	Muskel n=6
Fipronil	(ng g ⁻¹ NG)	0.76 ± 0.54	0.13 ± 0.1
Fipronil	(ng g ⁻¹ FG)	9.41 ± 9.15	0.49 ± 0.38
Fipronil-desufinyl	(ng g ⁻¹ NG)	n.d.	0.07 ± 0.04
Fipronil-desufinyl	(ng g ⁻¹ FG)	n.d.	0.25 ± 0.14
Fipronil-sulfon	(ng g ⁻¹ NG)	19.91 ± 9.96	4.05 ± 3.73
Fipronil-sulfon	(ng g ⁻¹ FG)	238.66 ± 137.73	14.17 ± 11.83

In der EU gibt es keine Regelung bezüglich der einzuhaltenden Grenzwerte von Fipronil, Fipronil-desufinyl und Fipronil-sulfon für Speisefische. Allerdings werden von der Europäischen Kommission Höchstgehalte an Rückständen für die Summenkonzentration von Fipronil und Fipronil-sulfon für mehr als 300 Lebensmittel festgelegt. Für tierische Produkte werden Höchstgehalte von 0,005 mg/kg bis 0,09 mg/kg angegeben [65]. In der vorliegenden Arbeit lagen die Summenkonzentrationen von Fipronil und Fipronil-sulfon in den für den Verzehr geeigneten Muskelproben zwischen 0,001 mg/kg und 0,01 mg/kg und damit in einem für Lebensmittel kritischem Bereich.

4.2.2.4 Toxizitätsbewertung

Eine Beurteilung der in dieser Arbeit gemessenen Fipronil, Fipronil-desufinyl und Fipronil-sulfon-Konzentrationen in Elbewasser- und Nordseewasser- sowie Aalproben erfolgte anhand diverser Toxizitätsstudien [113, 62, 67, 108, 59, 22, 4, 121, 123]. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Fipronil, Fipronil-desufinyl und Fipronil-sulfon-

Konzentrationen in Elbewasser- und Nordseewasser in keinem Fall die in den Toxizitätsstudien dokumentierten Effekt- (EC) und Letalkonzentrationen (LC) überschritten (siehe Anhang Tabelle 17). Allerdings beziehen sich die in den Studien ermittelten EC- und LC-Konzentrationen hauptsächlich auf eine kurze Expositionszeit des getesteten Organismus gegenüber Fipronil, Fipronil-desufinyl und Fipronil-sulfon, so dass hier nur die akute Toxizität bestimmt wurde. Eine längerfristige Schadstoff-Exposition, so wie für das Beprobungsgebiet angenommen, kann in niedrigere EC- und LC-Konzentrationen resultieren. Dies konnte in einer Studie von Baird et al. (2013) [4] nachgewiesen werden, in der die bestimmte Fipronil-LC₅₀ für Süßwasserfische der Gattung *Pimephales*, aufgrund verlängerter Expositionszeit, um etwa die Hälfte abnahm (siehe Anhang Tabelle 17). Ebenfalls konnte unter Feldbedingungen, in denen Karpfen für 90 Tage abnehmenden Fipronil-Konzentrationen (0,65 µg bis < LOD innerhalb von von 60 Tagen) ausgesetzt waren, im Lebergewebe eine signifikant erhöhte Enzymaktivität nachgewiesen werden, welche mit oxidativem Stress in Zusammenhang steht. Weiterhin wurden in Gehirn-, Muskel- und Leberproben eine erhöhte Degradation von Lipiden festgestellt [22]. Da die in dieser Arbeit gewonnenen Messdaten darauf hindeuten, dass Fipronil, Fipronil-desufinyl und Fipronil-sulfon über einen längeren Zeitraum im Elbewasser vorhanden waren, liegt die Vermutung nahe, dass ähnliche Effekte ebenfalls in den untersuchten Aalen aufgetreten sind. Dies hätte einen erhöhten Energiebedarf aufgrund von Detoxifizierungsprozessen zur Folge, was besonders für Aale als problematisch anzusehen wäre, da diese auf ihrer 5000 km bis 7000 km langen Wanderung zu Laichgründen die Nahrungsaufnahme einstellen und somit vollständig auf die Fettreserven als Energiequelle angewiesen sind [114].

4.3 Projekt III: Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Neben der Detektion toxischer Fraktionen in Wasserextrakten mit Hilfe der HPTLC und *A. fischeri*-Bakterien sollte mit diesem Testsystem ebenfalls eine erste Toxizitätsbewertung auf der Basis von Dosis-Wirkungs-Beziehungen vorgenommen werden. Hierfür werden die zu untersuchenden Substanzen in unterschiedlichen Flächenkonzentrationen auf die HPTLC-Platte aufgetragen (siehe Kapitel 3.3) und im Anschluss die konzentrationsabhängige Biolumineszenzhemmung detektiert.

4.3.1 Blindwertproblematik

Die Bestimmung von Blindwerten ist wie in der analytischen Chemie ebenfalls bei toxikologischen Untersuchungen erforderlich, um falsch positive Befunde zu vermeiden. Prinzipiell ist das Auftreten von Blindwerten in toxikologischen Untersuchungen als kritisch zu bewerten, da eine beobachtete Toxizität nicht mehr eindeutig der zu testenden Substanz zugeordnet werden kann.

In einem anfänglichen Versuch war das Ziel, Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Substanz Perfluorooctansäure (PFOS) zu ermitteln. Hierzu wurde in einem ersten Testversuch eine PFOS-Standard-Lösung (1 µg/mL gelöst in Methanol) mit Auftragevolumina von 10 µL bis 60 µL auf 6 x 6 mm Flächen auf eine zuvor gereinigte HPTLC-Platte appliziert. Die Blindwertbestimmung erfolgte durch das Auftragen der äquivalenten Mengen des verwendeten Lösungsmittels MeOH (J.T. Baker®) (siehe Abbildung 4.29).

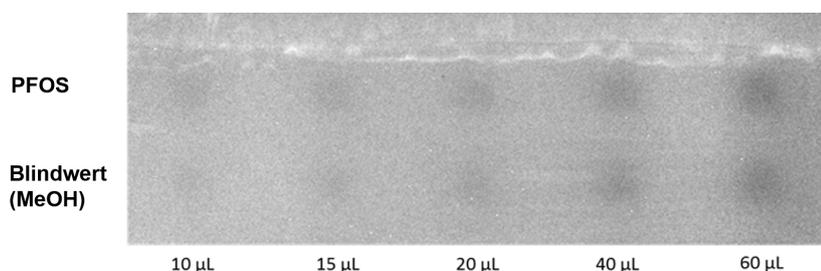


Abbildung 4.29 Detektierte Biolumineszenzhemmung nach Auftragung unterschiedlicher PFOS-Konzentrationen und zugehörige Blindwerte.

Das Ergebnis dieses Versuches zeigte, dass die detektierten Biolumineszenzhemmungen für die unterschiedlichen PFOS-Konzentrationen fast identisch mit denen der zugehörigen Blindwerte (MeOH J.T.Baker®) waren. Die Biolumineszenzhemmungen wurden nach der in Kapitel 3.1.6 beschriebenen Methode ermittelt und sind in der Tabelle 4.11 dargestellt. Da das Proben-Lösemittel bereits bei der Probenauftragung verdampft, konnte dieses nicht für die Blindwerte verantwortlich sein. Entsprechend konnte angenommen werden, dass bei der Probenauftragung toxisch wirkende Kontaminationen auf die HPTLC-Platte gelangen. Eine eindeutige Zuordnung einer Schadstoffkonzentration zu einer detektierten Biolumineszenzhemmung ist durch das Vorhandensein von Blindwerten nicht mehr möglich, da durch sie nur noch eine Mischungstoxizität anstelle der Toxizität einer Einzelsubstanz detektiert werden kann. Da Mischungstoxizitäten sowohl auf additiven, synergistischen als auch antagonistischen Effekten beruhen können und Blindwerte von Blindwertproben unter Umständen stark variieren, ist die Subtraktion der Biolumineszenzhemmung des Blindwertes von der des Probenwertes nicht zulässig.

Aus diesem Grunde wurde versucht, die Quelle der Kontamination/en ausfindig zu machen. Folgende Kontaminationsquellen kamen hierbei Frage:

1. Rückstände aus dem Lösungsmittel,
2. Verunreinigungen aus dem für die Probenauftragung verwendeten Stickstoffs,
3. Verunreinigungen aus den ATS4-Geräteteilen, welche vom Stickstoff bei der Probenauftragung durchlaufen werden.

Tabelle 4.11 Detektierte Biolumineszenzhemmung (%) der Substanz PFOS und des zugehörigen Blindwertes (MeOH) für unterschiedliche Auftragevolumina

Auftragevolumen (μL)	10	15	20	40	60
PFOS	5,1 %	7,0 %	8,8 %	14,7 %	17,4 %
MeOH J.T.Baker®	5,0 %	6,6 %	8,0 %	13,2 %	16,8 %
MeOH AMD Fluka	6.2 %	7.6 %	8.3 %	11.0 %	21.5 %
Aceton	4,3 %	7,1 %	8,0 %	9,0 %	18,3 %
Leeres Vial (410 nl/s)	0,8 %	3,8 %	3,1 %	5,6 %	7,9 %
Leeres Vial (100 nl/s)	n.a.	9,2 %	9,0 %	13,2 %	17,2 %

In folgenden Versuchen wurde zuerst geprüft, ob Rückstände aus dem verwendeten Lösungsmittel für die Blindwerte verantwortlich waren. Hierfür wurden verschiedene Lösungsmittel wie MeOH eines anderen Herstellers (Fluka) und Aceton äquivalent zum oben beschriebenen Versuch getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass in beiden Fällen mit dem ersten Versuch vergleichbare Biolumineszenzhemmungen auftraten. Die Wahrscheinlichkeit, dass die unterschiedlichen Lösemittel gleiche Rückstände auf der HPTLC-Platte hinterlassen hatten, wurde als unwahrscheinlich erachtet, weshalb als mögliche Quellen noch die unter den Punkten 2. und 3. genannten Möglichkeiten in Frage kamen. Der Einfluss des für die Probenauftragung verwendeten Stickstoffs auf die Blindwerte wurde durch die Probenauftragung aus einem leeren Vial untersucht. Anstelle des Lösemittels wurde hierdurch „Luft“ auf die HPTLC-Platte aufgetragen. Für die Auftragung wurden zwei unterschiedliche Auftragesgeschwindigkeiten der „Luft“ (100 nL/s und 410 nL/s) gewählt, d.h. bei einer Reduzierung der Auftragesgeschwindigkeit strömt aufgrund der längeren Probenauftragezeit mehr Stickstoff auf die HPTLC-Platte.

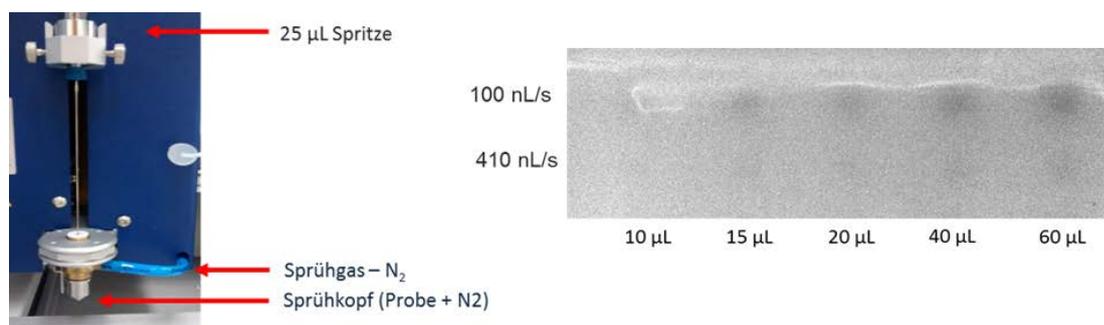


Abbildung 4.30 Applikationseinheit des ATS4-Probensamplers für die Probenauftragung (links) und detektierte Biolumineszenzhemmung zweier mit unterschiedlichen Auftragesgeschwindigkeiten (100 nL/s und 410 nL/s) applizierten „Luft“-Probe (rechts)

Die Ergebnisse dieses Versuches (siehe Abbildung 4.30) zeigten deutlich den Einfluss des zur Probenauftragung verwendeten Stickstoffes auf die *A. fischeri*-Bakterien. Mit langsamer Probenauftragung und damit steigendem Stickstoffauftrag, erhöhte sich die detektierte Biolumineszenzhemmung. Hieraus ließ sich schließen, dass Verunreinigungen im Stickstoff entweder prozessbedingt vorhanden waren oder innerhalb der Stickstoffleitungen von Labor und/oder des Probensamplers aufgenommen wurden. Durch das Einsetzen eines Aktivkohlefilters zwischen der Laborstickstoffleitung und dem ATS4-Probensamplers, was bezüglich der Biolumineszenzhemmung keine Verbesserung ergab, konnten prozessbedingte Verunreinigungen des Stickstoffes als auch die Stickstofflaborleitungen als mögliche Aufnahmequelle von Verunreinigungen ausgeschlossen werden. Demnach musste sich die Quelle innerhalb des Autosamplers befinden. Um Art und Quelle der Verunreinigung weiter einschränken zu können, wurde in einem folgenden Versuch erneut „Luft“ auf die HPTLC-Platte aufgetragen und der entsprechende Bereich mit Hilfe des TLC-MS Interfaces (CAMAG) ausgestanzt und das so erhaltende Kieselgelplättchen in ein Vial überführt und für ca. 0,5 Std. mit 200 µL Hexan extrahiert. Der Extrakt wurde im Anschluss mittels GC-MS im Full-Scan-Modus (100 Da bis 500 Da) vermessen. Als Blindwertreferenz wurde ein Bereich der HPTLC-Platte ausgestanzt und extrahiert, auf dem keine Probenauftragung vorgenommen wurde. Beiden Extrakten wurde ein interner Standard (deuteriertes Fluoranthren) für die Injektionskontrolle zugesetzt.

Der Vergleich beider Scanläufe zeigt im Scanlauf der Probe einen eindeutigen Substanzpeak bei $t_R = 23$ min, welcher im Scanlauf der Blindwertreferenz nicht vorhanden ist. Ein Abgleich des entsprechenden Substanzmassenspektrums mit der Datenbank NIST erzielte eine hohe Übereinstimmung mit dem Massenspektrum der Substanz Butylhydroxytoluol (BHT). Dieses Ergebnis wurde als plausibel gewertet, da BHT als Antioxidant

4 Ergebnisse und Diskussion

tionsmittel u.a. in dem Bereich der Kunststoff- und Gummiproduktion eingesetzt wird [126]. Entsprechend deutete das Ergebnis darauf hin, dass Gerätebauteile des ATS4-Probensamplers, wie bspw. Schläuche, welche vom Stickstoff durchlaufen werden, für die Kontamination verantwortlich waren. Eine Identifizierung der Substanz BHT mittels eines Referenzstandards erfolgte nicht, da die Identifizierung der Kontaminationsquelle und nicht der Substanz als solche im Vordergrund der Untersuchung stand. Im Folgenden wird die detektierte Substanz der Einfachheit halber als „BHT“ bezeichnet. Abbildung 4.31 zeigt das Ergebnis beider Scanläufe sowie die zugehörigen Massenspektren.

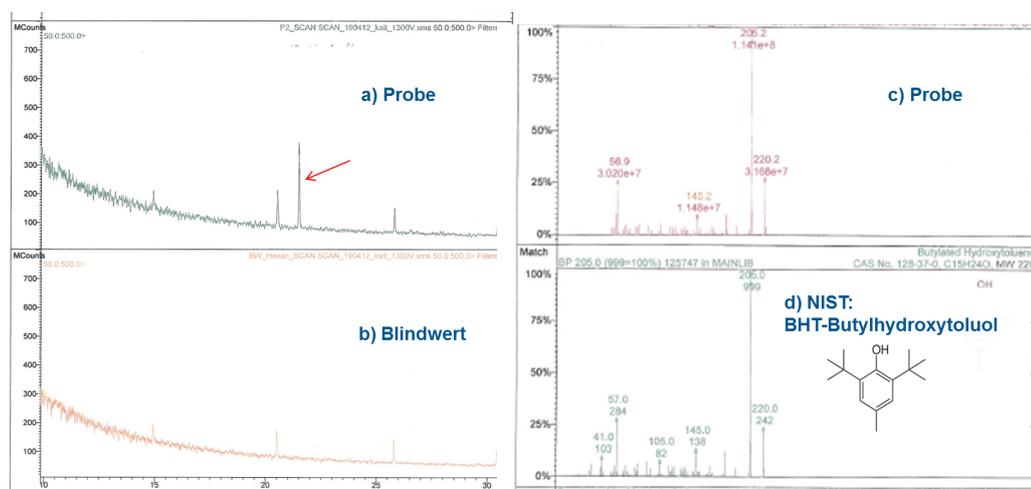


Abbildung 4.31 Ergebnisse des GC-MS-Scanlaufs des Blindwertextraktes (a) sowie der zugehörigen Blindwertreferenz (b) sowie die Massenspektren des Substanzpeaks bei $t_R = 23$ min (c) und der Substanz BHT (d).

Basierend auf den Ergebnissen wurden die für die Kontamination in Frage kommenden Bauteile des ATS4-Probensamplers untersucht. Hierzu gehörten: das verwendete Schlauchmaterial, ein Magnetventil sowie ein Druckreduzierventil. Alle Bauteile wurden mit Hexan gespült und das Spüleluat wurde wie zuvor beschrieben im GC-MS-Full-Scan vermessen. Hierbei konnte der „BHT“-Substanzpeak im Spüleluat des Druckreduzierventils nachgewiesen werden. Nach einer weiteren Elution der aus Kunststoff (Abdeckung) oder Gummi (Membran) bestehenden Bestandteile des Druckreduzierventils konnte als „BHT“-Kontaminationsquelle eindeutig die im Reduzierventil verwendete Gummimembran identifiziert werden. Hier wurde im entsprechenden Spüleluat der „BHT“-Substanzpeak eindeutig nachgewiesen (siehe Abbildung 4.32).

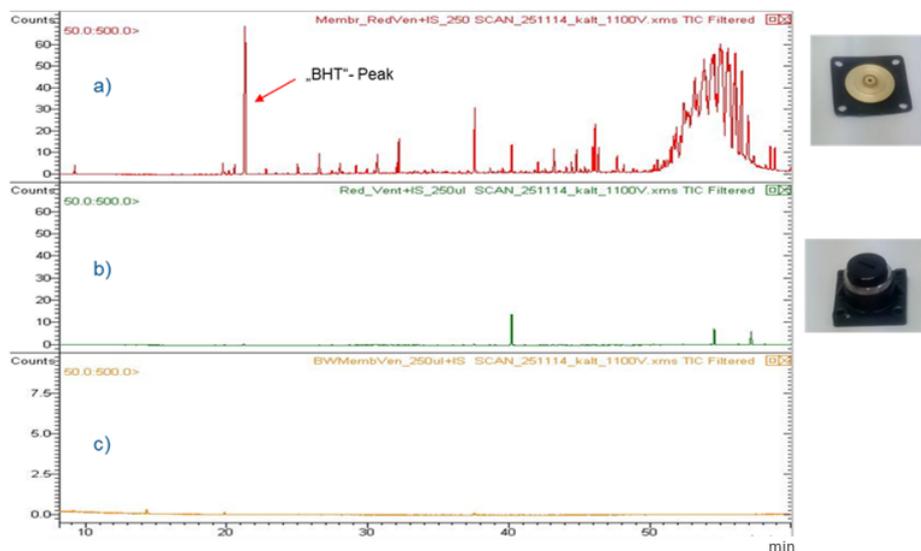


Abbildung 4.32 Ergebnisse der im GC-MS-Full-Scan analysierten Spüleluate der Druckreduzierventil-Gummimembran (a) und -Kunststoffabdeckung (b) sowie der zugehörige Blindwert (c).

Wie in Abbildung 4.32 ersichtlich ist, wurden neben dem „BHT“-Substanzpeak ebenfalls diverse andere Substanzen detektiert. Dies kann mit dem verwendeten Extraktionsmittels Hexan erklärt werden, welches eine wesentlich stärkere Extraktionskraft besitzt als der während der Probenauftragung verwendete Stickstoff. Entsprechend musste eine Identifizierung dieser Substanzen nicht erfolgen. Insgesamt durchläuft der für die Probenauftragung verwendete Stickstoff drei Druckreduzierventile, so dass insgesamt von drei Kontaminationsquellen ausgegangen werden kann, welche für die beobachteten Blindwerte bei der *A. fischeri*-Detektion verantwortlich gemacht werden können. Weiterführende Versuche, um eine Beseitigung des Blindwertes zu erzielen, konnten aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

4.3.2 Verfahrensbeurteilung

Die anfänglichen Versuche zur Beurteilung der Toxizität von Schadstoffen mittels der Kombination aus HPTLC und Leuchtbakteriendetektion haben gezeigt, dass es prinzipiell möglich ist, mit diesem System Dosis-Wirkungs-Beziehungen von Schadstoffen abzuleiten. Problematisch sind hierbei die auftretenden Blindwerte bei der Leuchtbakteriendetektion, welche durch die Technik der Auftragung der Schadstoffe auf die HPTLC-Platte erzeugt werden. Entsprechend können detektierte Biolumineszenzhemmungen nicht eindeutig einem Schadstoff zugewiesen werden, da anstelle der Toxizität einer Einzelsubstanz eine Mischungstoxizität (Blindwert und zu testender Schadstoff) detektiert wird.

Da Mischungstoxizitäten sowohl auf additiven, synergistischen als auch antagonistischen Effekten beruhen können, ist die Subtraktion der Biolumineszenzhemmung des Blindwertes von der des Probenwertes nicht zulässig. Unter der Voraussetzung, dass durch die Schadstoffauftragung auf die HPTLC-Platte kein Blindwert induziert werden würde, hätte dieses Testsystem gegenüber dem klassischen Leuchtbakterien-Küvettentest [32] theoretisch den entscheidenden Vorteil, dass die zu testenden Schadstoffe in diversen Lösungsmitteln vorliegen können, da diese während der Auftragung verflüchtigen. Weiterhin könnten hierdurch theoretisch auch unpolarere Schadstoffe auf ihre Toxizität hin untersucht werden, da die Löslichkeit einer Substanz im wässrigen Medium für diesen Test unbedeutend ist. Allerdings müsste hierfür überprüft werden, ob die Polarität einer Substanz evtl. Auswirkung auf die Benetzbarkeit der Applikationsfläche mit den Leuchtbakterien besitzt, so dass eine detektierte Abnahme der Biolumineszenz nicht auf die Substanztoxizität zurück zu führen ist, sondern auf die verminderte Anzahl von *A. fischeri*-Bakterien im Vergleich zum Referenzbereich.

Weiterhin ist zu beachten, dass die mit diesem Testsystem ermittelten Effekt-Konzentrationen die Einheit einer Flächenkonzentration besitzen, welche sich nicht einfach auf eine Volumenkonzentration zurückführen lässt. Hierdurch wird eine Bewertung der Schadstoffwirkung auf die aquatische Umwelt nur bedingt möglich. Aufgrund der Tatsache, dass das Testsystem leicht und zeitsparend anzuwenden ist (das Ansetzen unterschiedlicher Verdünnungsstufen ist reduziert und die Detektion der Biolumineszenzhemmungen im Vergleich zur Referenz erfolgt zeitgleich), wäre es bei Eliminierung des Blindwertes sehr gut geeignet, die Toxizität einer Substanz relativ zu der Toxizität einer anderen Substanz zu bestimmen. Hierdurch wäre eine erste, schnelle Bewertung eines Schadstoffes in der Form von bspw. „Schadstoff X weist bei gleicher Konzentration eine doppelt so hohe Toxizitätswirkung im Vergleich zu Schadstoff Y auf“ möglich.

5 Fazit und Ausblick

Das Hauptanliegen dieser Arbeit war es, für die Meeresumwelt relevante Schadstoffe zu ermitteln, welche noch nicht im Rahmen regelmäßiger Monitoring-Programme überwacht werden. Die Detektion toxisch wirkender Substanzen erfolgte hierbei effektorientiert mittels einer Kombination aus HPTLC-Probenauftrennung und anschließender *A. fischeri*-Detektion. Im Anschluss daran wurden die toxisch wirkenden Substanzen im Rahmen eines Non-Target Screenings mittels HPLC-MS/MS Analytik analysiert, um diese nach Möglichkeit zu identifizieren. Die identifizierten Schadstoffe sollten daraufhin eine erste Toxizitätsbewertung, basierend auf zu ermittelnden Dosis-Wirkungs-Beziehungen durchlaufen, wofür ebenfalls die Kombination aus HPTLC und *A. fischeri*-Detektion eingesetzt werden sollte. Neben methodischen Optimierungen wie bspw. dem Benetzen der HPTLC-Platte mit den *A. fischeri*-Bakterien, lag das Hauptaugenmerk der anfänglichen Versuche des **Projekts I** für das **Effektorientierte Schadstoffscreening** auf der Überprüfung der Ergebnisqualität sowie der Einführung von Qualitätskontrollen. Folgende Erkenntnisse konnten aus den Ergebnissen der durchgeführten Versuche gewonnen werden:

- Die Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmungs-Detektion ist, auch über mehrere *A. fischeri*-Kulturen hin betrachtet, insgesamt als sehr gut zu bewerten und entspricht weitestgehend den in der DIN-Norm des klassischen Leuchtbakterien-Küvettentests [32] festgelegten Reproduzierbarkeits-Qualitätskriterien.
- Faktoren, welche sich negativ auf die Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmungs-Detektion auswirken können, sind eine ungleichmäßige Beschichtung der HPTLC-Platten mit den *A. fischeri*-Bakterien und Verschmutzungen auf den HPTLC-Platten, welche durch die Probenapplikation und die für die Probenauftrennung verwendeten Lösemittel auf die HPTLC-Platte gelangen. Weitere Faktoren sind chemische Veränderungen von Substanzen auf der HPTLC-Platte, sowie Substanzkonzentrationen nahe des Detektionslimits.
- Die im HPTLC-Kontrollstand enthaltenden Substanzen Koffein und Acetanilid waren sehr gut geeignet, um als, wie auch in der DIN-Norm des klassischen Leucht-

bakterien-Küvettentests [32] gefordert, Negativ- und Positivkontrolle der Biolumineszenz-Detektion eingesetzt werden zu können.

Aus der Bestimmung des Konzentrations-Arbeits-Bereiches des hier betrachteten Testsystems sowie dessen Anwendung auf Nordsee- und Elbewasserextrakte konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden:

- Aufgrund des für eine ungestörte Probenentwicklung begrenzten Applikationsvolumens der zu untersuchenden Probenextrakte auf die HPTLC-Platte konnte davon ausgegangen werden, dass viele Schadstoffe in zu geringer Konzentration vorliegen, als dass sie mit Hilfe der *A. fischeri*-Bakterien detektiert werden können. Dieses gilt, aufgrund des starken Verdünnungseffektes von Schadstoffkonzentrationen in der Nordsee, besonders für die Nordseewasserextrakte.
- Viele in der Umwelt natürlich vorkommenden Substanzen werden durch das in dieser Arbeit durchgeführte SPE-Verfahren ebenfalls mit angereichert und wirken sich, mit sehr großer Wahrscheinlichkeit, aufgrund ihres hohen Konzentrationsvorkommens sowohl negativ auf die HPTLC-Auftrennqualität als auch negativ auf die *A. fischeri*-Detektion (falsch positive Befunde) aus.
- Da bei komplexen Umweltproben eine HPTLC-Auftrennung bis zu Einzelsubstanzen nicht erfolgen kann, ist für die detektierte Toxizität einer Fraktion eine unbekannte Anzahl an Substanzen in unbekannter Konzentration verantwortlich. Eine vollständige Identifizierung und Quantifizierung dieser Substanzen wäre hierbei erforderlich. Bei den hier untersuchten Elbe- und Nordseewasserextrakten ist dies aufgrund deren Komplexität in den meisten Fällen, selbst mit hohem technischen Aufwand, nicht möglich. Weiterhin müsste die Toxizität der identifizierten Substanzen sowohl für die Einzelsubstanzen sowie deren potentielle Mischungstoxizitäten getestet werden, um die detektierte Toxizität einer oder mehrerer Schadstoffe zuordnen zu können. Für eine Anzahl n an Schadstoffen ergeben sich hieraus

$$\sum_{k=0}^n \binom{n}{k} = 2^n \quad (5.1)$$

Möglichkeiten an Schadstoffkombinationen, welche für die Toxizitätsbestimmung getestet werden müssten.

- Die Ergebnisse der Untersuchung von Proben, welche während des Elbe-Hochwasserereignisses genommen wurden, konnten zeigen, dass es prinzipiell möglich

ist, Veränderungen in einem zu untersuchenden System zu erkennen. Zusammen mit den zuvor erwähnten Erkenntnissen, kann daraus geschlossen werden, dass das verwendete Testsystem eher für ein überwachendes Monitoringkonzept in Form von Probenvergleichen anstelle der gezielten Suche nach toxischen Substanzen im Spurenbereich in einer komplexen Probe geeignet ist.

- Eine zuvor durchgeführte HPTLC-Auftrennung von Probenextrakten ist für ein Non-Target Screening besser geeignet als die Verwendung eines unaufgetrennten Gesamtextraktes. Dies lässt sich darauf zurück führen, dass die HPTLC-Auftrennung als ein Aufreinigungsschritt angesehen werden kann, wodurch die für das Non-Target Screening störenden Matrixeffekte abgeschwächt werden. Zusätzlich kann die Information des R_f -Wertes für viele Substanzen ein Rückschluss auf die zu erwartenden HPLC-Retentionszeit liefern, wodurch eine effektivere Eingrenzung an Substanzen erfolgen kann, welche für weiterführende Identifizierungsversuche herangezogen werden sollen.

Abschließend ist basierend auf den zuvor beschriebenen Erkenntnissen festzuhalten, dass die Eignung des in dieser Arbeit betrachteten Effektorientierten-Testsystems für die Identifizierung von toxischen Substanzen, mit steigender Probenkomplexität abnimmt. Aus diesem Grunde wurde entschieden, in einem **Projekt II** ein rein **chemisch-analytisches Schadstoffscreenings** mittels der Kombination aus HPTLC-HPLC-MS/MS durchzuführen. Folgende Erkenntnisse konnten hierbei gewonnen werden:

- Insgesamt konnten neun Schadstoffe eindeutig identifiziert und sowohl in Elbewasser als auch Nordseewasserproben nachgewiesen werden. In Anbetracht der Tatsache, dass alleine ca. 100 Schadstoffe regelmäßig überwacht und größtenteils im Elbe- und Nordseewasser auch nachgewiesen werden können, ist die Anzahl der identifizierten Schadstoffe als gering zu bewerten und lässt darauf schließen, dass es trotz der genannten Vorteile noch Optimierungsbedarf für das Schadstoffscreening mittels der Kombination aus HPTLC-HPLC-MS/MS gibt. Hierzu zählen Möglichkeiten der stärkeren Extraktkonzentrierung als auch die Verwendung eines hochauflösenden Massenspektrometers, wodurch die Messeffizienz deutlich erhöht werden könnte. Ebenfalls würde der Abgleich der Messdaten mit denen in den vorhandenen Datenbanken erleichtert werden, da diese hauptsächlich Daten hochauflösender Massenspektrometer enthalten.
- Von den insgesamt neun eindeutig identifizierten Schadstoffen, gehören acht zu der Gruppe der Pharmazeutika. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass Pharma-

zeutika einen Beitrag zur Verschmutzung der aquatischen Umwelt leisten. Entsprechend sollte überprüft werden, ob die in dieser Arbeit identifizierten Substanzen sowie weitere potentiell in Frage kommende Pharmazeutika in das Überwachungsprogramm mit aufgenommen werden sollten.

- Im Falle des identifizierten Insektizids Fipronil wurde deutlich, dass die Kombination aus Non-Target-, Suspect- und Target Screening die meisten Informationen über einen Schadstoff liefern kann. Die beiden Fipronil-Transformationsprodukte Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon konnten aufgrund eines durchgeführten Suspect Screenings in den untersuchten Elbewasserproben sowie neben Fipronil auch in Aalproben nachgewiesen werden. Die Quantifizierung im Rahmen des Target Screenings machte deutlich, dass Schadstoffkonzentrationen selbst im unteren ng-Bereich besonders aufgrund von Bioakkumulationseffekten eine Gefährdung für die Umwelt darstellen.

Sinnvolle, auf den zuvor genannten Erkenntnissen aufbauende Arbeiten wären die Durchführung eines Non-Target Screenings mittels der Kombination HPTLC-HPLC und hochauflösender Massenspektrometrie sowie die quantitative Erfassung der in dieser Arbeit identifizierten Pharmazeutika. Bezüglich des Insektizids Fipronil wäre es sinnvoll zu überprüfen, ob Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in Biotapproben aus der Nordsee nachweisbar sind. Weiterhin sollte überprüft werden, ob das Transformationsprodukt Fipronil-sulfid, welches hauptsächlich unter anaeroben Bedingungen gebildet wird, in Sedimentproben der Elbe und der Nordsee nachweisbar ist.

Bezüglich der im **Projekt III** zur toxischen **Bewertung von Schadstoffen** mit Hilfe des hier verwendeten Testsystems erzielten Ergebnisse ist festzuhalten, dass:

- Aufgrund der sehr guten Reproduzierbarkeit der Leuchtbakterien-Detektion, der leichten Handhabung sowie im Vergleich zum klassischen Leuchtbakterien-Küvetten-test der zeitgleichen Detektion der Toxizität von Probe und Referenz, ist das Testsystem prinzipiell geeignet, eine erste toxikologische Bewertung für Schadstoffe durchzuführen.
- Der durch die Probenauftragung hervorgerufene Blindwert konnte auf eine Substanz zurückgeführt werden, welche sich in der Membran dreier Druckreduzierventile befindet und mit dem für die Probenauftragung verwendeten Stickstoff auf die HPTLC-Platte gelangt. Entsprechend wird anstelle der Toxizität einer Einzelsubstanz eine Mischungstoxizität (Blindwert und zu testender Schadstoff) detektiert, welche sowohl auf additiven, synergistischen als auch antagonistischen Effekten be-

ruhen kann. Hierdurch ist es nicht möglich, eine eindeutige Toxizitätsbewertung eines Schadstoffes zu erhalten.

- Die mit diesem Testsystem möglichen zu ermittelnden Effekt-Konzentrationen besitzen die Einheit einer Flächenkonzentration, welche sich nicht einfach auf eine Volumenkonzentration zurückführen lässt. Hierdurch wird eine Bewertung der Schadstoffwirkung auf die aquatische Umwelt nur bedingt möglich.
- Unter der Voraussetzung der Blindwertelimination wird das Potential dieses Testsystems in der schnellen und einfachen Bestimmung von relativen Toxizitäten in Form von „Schadstoff X weist bei gleicher Konzentration eine x-fach so hohe Toxizitätswirkung im Vergleich zu Schadstoff Y auf“ gesehen.

Die hier beschriebenen Erkenntnisse zeigen deutlich, dass der Fokus zukünftiger Arbeiten in der Beseitigung des durch die Probenauftragung verursachten Blindwertes liegen sollte, damit das Testsystem für eine toxikologische Bewertung von Schadstoffen eingesetzt werden kann. Weiterhin sollte geprüft werden, ob die Polarität einer Substanz evtl. Auswirkung auf die Benetzbarkeit der Applikationsfläche mit den *A. fischeri*-Bakterien besitzt, so dass eine detektierte Abnahme der Biolumineszenz nicht auf die Substanztoxizität zurückzuführen ist, sondern auf die verminderte Anzahl von Leuchtbakterien im Vergleich zum Referenzbereich.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass ein Effektorientiertes Schadstoffscreening mittels der Kombination aus HPTLC-Probenauftrennung und anschließender *A. fischeri*-Detektion für komplexe Umweltproben nur bedingt geeignet ist und das Testsystem besser für ein überwachendes Monitoringkonzept in Form von Probenvergleichen eingesetzt werden sollte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein chemisch-analytisches Non-Target Screening zur Identifizierung von Schadstoffen mittels der Kombination HPTLC-HPLC-MS/MS effizienter gegenüber einem reinem MS-Non-Target Screening ist, da Matrixeffekte reduziert werden und hierdurch zusätzliche Stoffinformationen erhalten werden. Hierdurch kann eine effektivere Auswahl an Substanzen erfolgen, welche für weiterführende Identifizierungsversuche herangezogen werden sollen. Entsprechend konnten für die aquatische Umwelt relevante Schadstoffe identifiziert werden. In diesem Zusammenhang konnten erstmalig das Insektizid Fipronil und zwei seiner Transformationsprodukte in Elbe- und Nordseewasser, sowie aus der Elbe entnommenen Aalen nachgewiesen und quantitativ erfasst werden. Bezüglich der Bewertung von Schadstoffen mit Hilfe des Testsystems wird dessen Potential in der Bestimmung relativer Toxizitäten gesehen. Unter der Voraussetzung zukünftiger Optimierungsarbeiten, stellt

das hier verwendete Testsystem eine sinnvolle Ergänzung zum allgemeinen Schadstoffmonitoring dar, um Schadstoffe in der Umwelt zu erfassen und einer ersten Bewertung zu unterziehen.

Literaturverzeichnis

- [1] J. L. Anderson, A. Berthod, V. Pino Estévez, and A. Stalcup. *Analytical Separation Science*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 2015.
- [2] A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, and V. Cerdà. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80:641 – 654, 2016.
- [3] T. Azuma, K. Otomo, M. Kunitou, M. Shimizu, K. Hosomaru, S. Mikata, M. Ishida, K. Hisamatsu, A. Yunoki, Y. Mino, and T. Hayashi. Environmental fate of pharmaceutical compounds and antimicrobial-resistant bacteria in hospital effluents, and contributions to pollutant loads in the surface waters in japan. *Science of The Total Environment*, 657:476 – 484, 2019.
- [4] S. Baird, A. Garrison, J. Jones, J. Avants, R. Bringolf, and M. Black. Enantioselective toxicity and bioaccumulation of fipronil in fathead minnows (*Pimephales promelas*) following water and sediment exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(1):222–227, 2013.
- [5] V. Baumgartner, C. Hohl, and U. Hauri. Bioactivity-based analysis of sunscreens using the luminescent bacteria *vibrio fischeri*. *Jpc-journal of Planar Chromatography-modern Tlc - JPC-J PLANAR CHROMAT-MOD TLC*, 22:19–23, 02 2009.
- [6] V. Baumgartner, C. Hohl, and W. Schwack. Rolling-A new application technique for luminescent bacteria on high-performance thin-layer chromatography plates. *Journal of Chromatography A*, 1218(19):2692 – 2699, 2011. Planar Chromatography.
- [7] V. Baumgartner, C. Hohl, and W. Schwack. Screening for Antimicrobials in Mouthwashes Using HPTLC-Bioluminescence Detection. *Chromatographia*, 76, 10 2013.
- [8] V. Baumgartner and W. Schwack. ENHANCED QUANTITATIVE EVALUATION OF THE HPTLC-BIOLUMINESCENCE DETECTION. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33(7-8):980–995, 2010.

- [9] B. Björlenius, M. Ripszám, P. Haglund, R. H. Lindberg, M. Tysklind, and J. Fick. Pharmaceutical residues are widespread in Baltic Sea coastal and offshore waters - Screening for pharmaceuticals and modelling of environmental concentrations of carbamazepine. *Science of The Total Environment*, 633:1496 – 1509, 2018.
- [10] W. Brack, S. Ait-Aissa, R. M. Burgess, W. Busch, N. Creusot, C. D. Paolo, B. I. Escher, L. M. Hewitt, K. Hilscherova, J. Hollender, H. Hollert, W. Jonker, J. Kool, M. Lamoree, M. Muschket, S. Neumann, P. Rostkowski, C. Ruttkies, J. Schollee, E. L. Schymanski, T. Schulze, T.-B. Seiler, A. J. Tindall, G. D. A. Umbuzeiro, B. Vrana, and M. Krauss. Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments - An in-depth overview. *Science of The Total Environment*, 544:1073 – 1118, 2016.
- [11] M. Brumovský, J. Bečanová, J. Kohoutek, H. Thomas, W. Petersen, K. Sørensen, O. Sánka, and L. Nizzetto. Exploring the occurrence and distribution of contaminants of emerging concern through unmanned sampling from ships of opportunity in the north sea. *Journal of Marine Systems*, 162:47 – 56, 2016. Progress in marine science supported by European joint coastal observation systems: The JERICO-RI research infrastructure.
- [12] A. A. Bulich. *Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments*. Aquatic Toxicology, ASTM STP 667. American Society for Testing and Materials, pp. 98-106, 1979.
- [13] Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie (BSH). Auswirkungen des Elbehochwassers vom Juni 2013 auf die Deutsche Bucht. Abschlussbericht September 2014. *Berichte des Bundesamtes für Seeschifffahrt und Hydrographie Nr. 52*, 2014.
- [14] K. Burger. DC-PMD, Dünnschicht-Chromatographie mit Gradienten-Elution im Vergleich zur Säulenflüssigkeits-Chromatographie. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*, 318(3):228–233, Jan 1984.
- [15] K. Burger. *Thin Layer Chromatography with Automated Multiple Development (AMD-TLC)*, pages 181–195. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1995.
- [16] P. Caboni, R. Sammelson, and J. Casida. Phenylpyrazole Insecticide Photochemistry, Metabolism, and GABAergic Action: Ethiprole Compared with Fipronil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51:7055–61, 12 2003.
- [17] N. Cech and C. Enke. Practical Implications of Some Recent Studies in Electrospray Ionization Fundamentals. *Mass spectrometry reviews*, 20:362–87, 11 2001.

- [18] Chemspider. Royal Society of Chemistry, <http://www.chemspider.com> (letzter Zugriff am 15.08.2018), 2015.
- [19] Y. Chen and W. Schwack. High-performance thin-layer chromatography screening of multi class antibiotics in animal food by bioluminescent bioautography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1356:249 – 257, 2014.
- [20] N. Cheremisinoff. *Perfluorinated Chemicals (PFCs): Contaminants of Concern*. Wiley, 2016.
- [21] I. Choma and W. Jesionek. Chapter 11 - effects-directed biological detection: Bioautography. In C. F. Poole, editor, *Instrumental Thin-Layer Chromatography*, pages 279 – 312. Elsevier, Boston, 2015.
- [22] B. Clasen, V. Loro, R. Cattaneo, B. Moraes, T. Lopes, L. Avila, R. Zanella, G. Reimche, and B. Baldisserotto. Effects of the commercial formulation containing fipronil on the non-target organism *Cyprinus carpio*: Implications for rice - fish cultivation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 77:45–51, 11 2011.
- [23] L. Cole, R. Nicholson, and J. Casida. Action of Phenylpyrazole Insecticides at the GABA-Gated Chloride Channel. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 46(1):47 – 54, 1993.
- [24] L. Cole, R. Nicholson, and J. Casida. Action of Phenylpyrazole Insecticides at the GABA-Gated Chloride Channel. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 46(1):47 – 54, 1993.
- [25] DAIOS. <http://www.daios-online.de> (letzter Zugriff am 15.08.2018), 2018.
- [26] DAS EUROPÄISCHE PARLAMENT UND DER RAT DER EUROPÄISCHEN UNION. RICHTLINIE 2000/60/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik. *Amtsblatt der Europäischen Union L 327*, 2000.
- [27] DAS EUROPÄISCHE PARLAMENT UND DER RAT DER EUROPÄISCHEN UNION. RICHTLINIE 2008/56/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 17. Juni 2008 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Meeresumwelt (Meeresstrategie-Rahmenrichtlinie). *Amtsblatt der Europäischen Union L 164/19*, 2008.

- [28] Das Europäische Parlament und der Rat der Europäischen Union. VERORDNUNG (EG) Nr. 1107/2009 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 21. Oktober 2009 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln und zur Aufhebung der Richtlinien 79/117/EWG und 91/414/EWG des Rates. *Amtsblatt der Europäischen Union L301/1*, 2009.
- [29] E. de Hoffmann and V. Stroobant. *Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3rd Edition*. Wiley-Interscience, 2007.
- [30] DER RAT DER EUROPÄISCHEN UNION. VERORDNUNG (EG) Nr. 199/2008 DES RATES vom 25. Februar 2008 zur Einführung einer gemeinschaftlichen Rahmenregelung für die Erhebung, Verwaltung und Nutzung von Daten im Fischereisektor und Unterstützung wissenschaftlicher Beratung zur Durchführung der Gemeinsamen Fischereipolitik. *Amtsblatt der Europäischen Union L 60/1*, 2008.
- [31] DIE EUROPÄISCHE KOMMISSION. BESCHLUSS DER KOMMISSION vom 18. Dezember 2009 über ein mehrjähriges Gemeinschaftsprogramm für die Erhebung, Verwaltung und Nutzung von Daten im Fischereisektor für den Zeitraum 2011-2013. *Amtsblatt der Europäischen Union L 41/8*, 2010.
- [32] DINENISO11348-3:2009-05. Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest) - Teil 3: Verfahren mit gefriergetrockneten Bakterien (ISO 11348-3:2007); Deutsche Fassung EN ISO 11348-3:2008.
- [33] B. Domon and R. Aebersold. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*, 312(5771):212–217, 2006.
- [34] E. Durham, B. Siegfried, and M. Scharf. In vivo and in vitro metabolism of fipronil by larvae of the European corn borer *Ostrinia nubilalis*. *Pest management science*, 58:799–804, 08 2002.
- [35] C. Durif, S. Dufour, and P. Elie. The silvering process of *anguilla anguilla*: a new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. *Journal of Fish Biology*, 66(4):1025–1043, 2005.
- [36] G. Eberz, H. G. Rast, K. Burger, W. Kreiss, and C. Weisemann. Bioactivity screening by chromatography-bioluminescence coupling. *Chromatographia*, 43(1):5–9, Jul 1996.

- [37] J. Fenn, M. Mann, C. Meng, S. Wong, and C. Whitehouse. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246(4926):64–71, 1989.
- [38] K. Fisch, J. J. Waniek, and D. E. Schulz-Bull. Occurrence of pharmaceuticals and UV-filters in riverine run-offs and waters of the German Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 124(1):388 – 399, 2017.
- [39] R. J. Flanagan, A. Taylor, I. D. Watson, and R. Whelpton. *Mass Spectrometry*, chapter 10, pages 249–280. John Wiley & Sons, Ltd, 2008.
- [40] M. Freese, R. Sühling, J.-D. Pohlmann, H. Wolschke, V. Magath, R. Ebinghaus, and R. Hanel. A question of origin: dioxin-like PCBs and their relevance in stock management of European eels. *Ecotoxicology*, 25:41–55, 10 2016.
- [41] L. für Hochwasserschutz und Wasserwirtschaft Sachsen-Anhalt-Gewässerkundlicher Landesdienst. *Arzneistoffe in Sachsen-Anhalt 2008 - 2012 Untersuchungen in Fließgewässern und im Grundwasser*. Landesbetrieb für Hochwasserschutz und Wasserwirtschaft Sachsen-Anhalt, 2018.
- [42] J. Gan, S. Bondarenko, L. Oki, D. Haver, and J. Li. Occurrence of fipronil and its biologically active derivatives in urban residential runoff. *Environmental science & technology*, 46:1489–95, 02 2012.
- [43] H. Greim and R. Snyder. *Toxicology and Risk Assessment: A Comprehensive Introduction*. Wiley, 2018.
- [44] J. H. Gross. *Mass Spectrometry- A Textbook*. Springer-Verlag, Heidelberg, 2011.
- [45] A. Gunasekara, T. Truong, K. Goh, F. Spurlock, and R. Tjeerdema. Environmental fate and toxicology of fipronil. *Journal of Pesticide Science - J PESTIC SCI*, 32:189–199, 01 2007.
- [46] J. W. Hager. A new linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16(6):512–526, 2002.
- [47] E. Hahn-Deinstrop. *Applied Thin-Layer Chromatography: Best Practice and Avoidance of Mistakes*. Wiley, 2007.
- [48] D. Hainzl and J. E. Casida. Fipronil insecticide: Novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(23):12764–12767, 1996.

- [49] D. Hainzl, L. M. Cole, and J. E. Casida. Mechanisms for Selective Toxicity of Fipronil Insecticide and Its Sulfone Metabolite and Desulfinyl Photoproduct. *Chemical Research in Toxicology*, 11(12):1529–1535, 1998h. PMID: 9860498.
- [50] J. E. Haky and A. M. Young. Evaluation of a simple hplc correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. *Journal of Liquid Chromatography*, 7(4):675–689, 1984.
- [51] S. J. Hawkes. Modernization of the van deemter equation for chromatographic zone dispersion. *Journal of Chemical Education*, 60(5):393, 1983.
- [52] HELCOM. CONVENTION ON THE PROTECTION OF THE MARINE ENVIRONMENT OF THE BALTIC SEA AREA, 1992 (HELSINKI CONVENTION), 2014.
- [53] W. Henderson and J. Scott McIndoe. *Mass Spectrometry of Inorganic, Coordination and Organometallic Compounds: Tools - Techniques - Tips*. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England, 11 2005.
- [54] M.-C. Hennion. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 856(1):3 – 54, 1999.
- [55] M. Hesse. Mass Spectrometry. A Textbook. By Jürgen H. Gross. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(35):4552–4552, 2004.
- [56] G. Hopfgartner, E. Varesio, V. Tschäppät, C. Grivet, E. Bourgogne, and L. A. Leuthold. Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(8):845–855, 2004.
- [57] C. Hug, N. Ulrich, T. Schulze, W. Brack, and M. Krauss. Identification of novel micropollutants in wastewater by a combination of suspect and nontarget screening. *Environmental Pollution*, 184:25 – 32, 2014.
- [58] H. Issaq. *A Century of Separation Science*. Taylor & Francis, 2001.
- [59] T. Iwafune, A. Yokoyama, T. Nagai, and T. Horio. Evaluation of the risk of mixtures of paddy insecticides and their transformation products to aquatic organisms in the Sakura River, Japan. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 30:1834–42, 08 2011.

- [60] A. Jaeger, M. Posselt, A. Betterle, J. Schaper, J. Mechelke, C. Coll Mora, and J. Lewandowski. Spatial and Temporal Variability in Attenuation of Polar Organic Micropollutants in an Urban Lowland Stream. *Environmental Science & Technology*, 53, 02 2019.
- [61] S. Kern, K. Fenner, H. P. Singer, R. P. Schwarzenbach, and J. Hollender. Identification of Transformation Products of Organic Contaminants in Natural Waters by Computer-Aided Prediction and High-Resolution Mass Spectrometry. *Environmental Science & Technology*, 43(18):7039–7046, 2009. PMID: 19806739.
- [62] P. Key, K. Chung, A. Opatkiewicz, E. Wirth, and M. Fulton. Toxicity of the Insecticides Fipronil and Endosulfan to Selected Life Stages of the Grass Shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 70:533–40, 04 2003.
- [63] D. E. Kommission. RICHTLINIE 2011/79/EU DER KOMMISSION vom 20. September 2011 zur Änderung der Richtlinie 98/8/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zwecks Aufnahme des Wirkstoffs Fipronil in Anhang I. *Amtsblatt der Europäischen Union L243/10*, 2011.
- [64] Kommission der Europäischen Gemeinschaft. ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen. (2002/657/EG). *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 221/8*, 2002.
- [65] Kommission der Europäischen Gemeinschaft. VERORDNUNG (EU) Nr. 1127/2014 DER KOMMISSION vom 20. Oktober 2014 zur Änderung der Anhänge II und III der Verordnung (EG) Nr. 396/2005 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Höchstgehalte an Rückständen von Amitrol, Dinocap, Fipronil, Flufenacet, Pendimethalin, Propyzamid und Pyridat in oder auf bestimmten Erzeugnissen. *Amtsblatt der Europäischen Union L 305/47*, 2014.
- [66] B. Konwick, W. Garrison, M. Black, J. Avants, and A. Fisk. Bioaccumulation, Biotransformation, and Metabolite Formation of Fipronil and Chiral Legacy Pesticides in Rainbow Trout. *Environmental Science & Technology*, 40:2930–6, 06 2006.
- [67] B. J. Konwick, A. T. Fisk, A. W. Garrison, J. K. Avants, and M. C. Black. Acute

- enantioselective toxicity of fipronil and its desulfinyl photoproduct to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(9):2350–2355, 2005.
- [68] M. Krauss. *High-Resolution Mass Spectrometry in the Effect-Directed Analysis of Water Resources*, chapter Chapter 15. 04 2016.
- [69] M. Krauss, H. Singer, and J. Hollender. LC–high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(3):943–951, Jun 2010.
- [70] S. Kromidas. *Validierung in der Analytik*. Die Praxis der instrumentellen Analytik. Wiley-VCH, 2011.
- [71] S. Kromidas and H. Kuss. *Chromatogramme richtig integrieren und bewerten: ein Praxishandbuch für die HPLC und GC*. John Wiley & Sons, Limited, 2008.
- [72] A. Lebedev. *Comprehensive Environmental Mass Spectrometry*. ILM Publications, 01 2012.
- [73] A. T. Lebedev. Environmental mass spectrometry. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 6(1):163–189, 2013. PMID: 23527549.
- [74] C. Lenehan. Chromatography: Basic Principles. In J. A. Siegel, P. J. Saukko, and M. M. Houck, editors, *Encyclopedia of Forensic Sciences (Second Edition)*, pages 573 – 578. Academic Press, Waltham, second edition edition, 2013.
- [75] A. Luft, M. Wagner, and T. Ternes. Transformation of Biocides Irgarol and Terbutryn in the Biological Wastewater Treatment. *Environmental Science & Technology*, 48:244–254, 12 2013.
- [76] H. Luftmann, M. Aranda, and G. Morlock. Automated interface for hyphenation of planar chromatography with mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 21:3772–6, 12 2007.
- [77] MassBank. European MassBank (NORMAN MassBank), <https://massbank.eu/MassBank/index.html> (letzter Zugriff am 15.08.2018), 2018.
- [78] X. Mei, Q. Sui, S. Lyu, D. Wang, and W. Zhao. Pharmaceuticals and personal care products in the urban river across the megacity Shanghai: Occurrence, source apportionment and a snapshot of influence of rainfall. *Journal of Hazardous Materials*, 359:429 – 436, 2018.

- [79] V. Meyer and J. W. . Sons. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. Wiley, 2004.
- [80] N. Michel, M. Freese, M. Brinkmann, J.-D. Pohlmann, H. Hollert, U. Kammann, M. Haarich, N. Theobald, W. Gerwinski, W. Rotard, and R. Hanel. Fipronil and two of its transformation products in water and european eel from the river elbe. *Science of The Total Environment*, 568:171 – 179, 2016.
- [81] A. Miranda, H. Roche, M. Randi, M. Menezes, and C. O. Ribeiro. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. *Environment International*, 34(7):939 – 949, 2008.
- [82] T. Miyashiro and E. G. Ruby. Shedding light on bioluminescence regulation in *Vibrio fischeri*. *Molecular Microbiology*, 84(5):795–806, 2012.
- [83] S. Moldoveanu and V. David. *Essentials in Modern HPLC Separations*. Elsevier Science, 2012.
- [84] S. Moldoveanu and V. David. Chapter 7 - Solid-Phase Extraction. In S. Moldoveanu and V. David, editors, *Modern Sample Preparation for Chromatography*, pages 191 – 286. Elsevier, Amsterdam, 2015.
- [85] R. Moreno-González, S. Rodriguez-Mozaz, M. Gros, D. Barceló, and V. León. Seasonal distribution of pharmaceuticals in marine water and sediment from a mediterranean coastal lagoon (se spain). *Environmental Research*, 138:326 – 344, 2015.
- [86] K. Nödler, D. Voutsas, and T. Licha. Polar organic micropollutants in the coastal environment of different marine systems. *Marine Pollution Bulletin*, 85(1):50 – 59, 2014.
- [87] O. Novillo, J. Pertusa, and J. Tomás. Exploring the presence of pollutants at sea: Monitoring heavy metals and pesticides in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the western Mediterranean. *Science of The Total Environment*, 598:1130 – 1139, 2017.
- [88] OECD. *Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method*. 2004.
- [89] M. Otto. *Analytische Chemie*. Wiley-VCH-Verlag, Weinheim, 2011.

- [90] T. Pluskal, S. Castillo, A. Villar-Briones, and M. Orešič. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*, 11(1):395, Jul 2010.
- [91] C. Poole. THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY | Principles. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, 2013.
- [92] C. Poole and S. Poole. 2.14 - Principles and Practice of Solid-Phase Extraction. In J. Pawliszyn, editor, *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, pages 273 – 297. Academic Press, Oxford, 2012.
- [93] C. Prasse, M. Wagner, R. Schulz, and T. A. Ternes. Oxidation of the Antiviral Drug Acyclovir and Its Biodegradation Product Carboxy-acyclovir with Ozone: Kinetics and Identification of Oxidation Products. *Environmental Science & Technology*, 46(4):2169–2178, 2012. PMID: 22300376.
- [94] F. Rabel and J. Sherma. Thin-Layer Chromatography - Plate Technology. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, 2018.
- [95] M. Raveton, A. Aajoud, J. Willison, H. Aouadi, T. Michel, and P. Ravanel. Phototransformation of the Insecticide Fipronil: Identification of Novel Photoproducts and Evidence for an Alternative Pathway of Photodegradation. *Environmental science & technology*, 40:4151–7, 08 2006.
- [96] Rayleigh. Xx. on the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 14(87):184–186, 1882.
- [97] C. Ribeiro, Y. Vollaire, E. Coulet, and H. Roche. Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls in the eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve - France. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 153:424–431, 06 2008.
- [98] R. Richter, L. Kraus, A. Koch, and S. Hoffstetter-Kuhn. *Dünnschichtchromatographie*. Springer Labormanuale. Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [99] H. Roche, Y. Vollaire, A. Persic, A. Buet, C. Ribeiro, E. Coulet, D. Banas, and F. Ramade. Organochlorines in the Vaccarès Lagoon trophic web (Biosphere Reserve of Camargue, France). *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 157:2493–506, 05 2009.

- [100] W. Schulz, W. Seitz, S. Weiss, W. H. Weber, M. Böhm, and D. Flottmann. Use of *Vibrio fischeri* for Screening for Bioactivity in Water Analysis. *Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 21:427–430, 12 2008.
- [101] W. Schulz, S. Weiss, W. H. Weber, and R. Winzenbacher. The reciprocal iso-inhibition volume concept: A procedure for the evaluation in effect-directed analysis with thin-layer chromatography - using the thin-layer chromatography-luminescent bacteria assay as an example. *Journal of Chromatography A*, 1519, 09 2017.
- [102] G. Schwedt, T. Schmidt, and O. Schmitz. *Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis*. Wiley, 2016.
- [103] E. L. Schymanski, H. P. Singer, P. Longrée, M. Loos, M. Ruff, M. A. Stravs, C. Ripollés Vidal, and J. Hollender. Strategies to Characterize Polar Organic Contamination in Wastewater: Exploring the Capability of High Resolution Mass Spectrometry. *Environmental Science & Technology*, 48(3):1811–1818, 2014. PMID: 24417318.
- [104] J. Sherma and B. Fried. *Handbook of Thin-Layer Chromatography*. Chromatographic Science. Taylor & Francis, 2003.
- [105] J. Sherma and G. Morlock. Chronology of thin-layer chromatography focusing on instrumental progress. *JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 21:471–477, 12 2008.
- [106] R. Smith. *Retention and Selectivity in Liquid Chromatography: Prediction, Standardisation and Phase Comparisons*. Journal of Chromatography Library. Elsevier Science, 1995.
- [107] B. Spangenberg, C. Poole, and C. Weins. *Quantitative Thin-Layer Chromatography: A Practical Survey*. Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [108] J. Stark and R. Vargas. Toxicity and hazard assessment of fipronil to *Daphnia Pulex*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 62:11–6, 10 2005.
- [109] Theobald, Norbert and Schäfer, S. and Baass, A.C. and Schroeter-Kermani, Christa. Retrospective monitoring of perfluorinated compounds in fish from German rivers and coastal marine ecosystems. *Organohalogen Compd.*, 73:440–443, 01 2011.
- [110] Undine-Informationsplattform. <http://undine.bafg.de> (letzter Zugriff am 12.08.2018), 2018.

- [111] United Nations Environment Programme. Global Environment Outlook GEO 5: Environment for the Future we Want. UNEP, Nairobi, Kenya. 2012.
- [112] H. Urbanczyk, J. C. Ast, M. J. Higgins, J. Carson, and P. V. Dunlap. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(12):2823–2829, 2007.
- [113] USEPA. New Pesticide Fact Sheet (*EPA – 737_F – 96 – 005*). 1996.
- [114] G. van den Thillart, S. Dufour, and J. Rankin. *Spawning Migration of the European Eel: Reproduction index, a useful tool for conservation management*. Fish & Fisheries Series. Springer Netherlands, 2008.
- [115] M. Čelić, M. Gros, M. Farré, D. Barcelo, and M. Petrović. Pharmaceuticals as chemical markers of wastewater contamination in the vulnerable area of the Ebro Delta (Spain). *Science of The Total Environment*, 652, 10 2018.
- [116] K. Wafford, D. Sattelle, D. Gant, A. Eldefrawi, and M. Eldefrawi. Noncompetitive inhibition of GABA receptors in insect and vertebrate CNS by endrin and lindane. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 33(3):213 – 219, 1989.
- [117] S. Walse, S. Morgan, L. Kong, and J. Ferry. Role of Dissolved Organic Matter, Nitrate, and Bicarbonate in the Photolysis of Aqueous Fipronil. *Environmental science & technology*, 38:3908–15, 08 2004.
- [118] S. Walse, P. Pennington, G. Scott, and J. Ferry. The fate of fipronil in modular estuarine mesocosms. *Journal of Environmental Monitoring : JEM*, 6:58–64, 02 2004.
- [119] G. Wegrzyn and A. Czyz. How do marine bacteria produce light, why are they luminescent, and can we employ bacterial bioluminescence in aquatic biotechnology? *Oceanologia*, 44(3):291–305, 2002.
- [120] S. Weigel, J. Kuhlmann, and H. Hühnerfuss. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. *Science of The Total Environment*, 295(1):131 – 141, 2002.

- [121] D. Weston and M. Lydy. Toxicity of the Insecticide Fipronil and Its Degradates to Benthic Macroinvertebrates of Urban Streams. *Environmental science & technology*, 48, 12 2014.
- [122] S. Wiegel, A. Aulinger, R. Brockmeyer, H. Harms, J. Löffler, H. Reincke, R. Schmidt, B. Stachel, W. von Tümpling, and A. Wanke. Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere*, 57(2):107 – 126, 2004.
- [123] H. Wu, C. Gao, Y. Guo, Y. Zhang, J. Zhang, and E. Ma. Acute toxicity and sublethal effects of fipronil on detoxification enzymes in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 115, 10 2014.
- [124] J. Wu, J. Lu, H. Lu, Y. Lin, and P. Chris Wilson. Occurrence and ecological risks from fipronil in aquatic environments located within residential landscapes. *Science of The Total Environment*, 518-519:139 – 147, 2015.
- [125] A. Xu and T. Madden. *LC-MS in drug bioanalysis*. Springer, Boston, 01 2012.
- [126] W. A. Yehye, N. A. Rahman, A. Ariffin, S. B. A. Hamid, A. A. Alhadi, F. A. Kadir, and M. Yaeghoobi. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 101b:295 – 312, 2015.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1	Arbeitsschritte einer SPE (verändert nach [2]).	17
Abbildung 2.2	Grafische Darstellung der Van-Deemter-Gleichung	20
Abbildung 2.3	Neunstufiges HPTLC-Entwicklungsprogramm	22
Abbildung 2.4	Darstellung einer entwickelten HPTLC-Platte.	23
Abbildung 2.5	Aufbau eines HPLC-Anlage (nach [89]).	25
Abbildung 2.6	Darstellung eines HPLC-Chromatogramms mit zugehörigen Kenn- größen.	26
Abbildung 2.7	Prinzipieller Ablauf eines Effektorientierten Schadstoffscreenings (verändert nach [10]).	27
Abbildung 2.8	Entstehung der Biolumineszenz in <i>A. fischeri</i> (verändert nach [82]).	28
Abbildung 2.9	Darstellung einer idealisierten Dosis-Wirkungs-Kurve.	29
Abbildung 2.10	Aufbau eines Massenspektrometers mit Beispielen von gängigen Baukomponenten. (EI, Elektronenstoßionisation; ESI, Elektrospray- Ionisation; API, Atmosphärendruck-Ionisation; MALDI, Matrix- unterstützte Laser-Ionisation; SEV, Sekundärelektronenvervielfa- cher; MCP, Mikrokanalplatte)	30
Abbildung 2.11	Aufbau und Funktion der ESI-Quelle (verändert nach [17])	31
Abbildung 2.12	Aufbau eines Quadrupol- Massenspektrometers (verändert nach[39]).	32
Abbildung 2.13	Schema zur Definition der Trennung zweier Signalpeaks (nach [72]).	33
Abbildung 2.14	Zusammenhang zwischen dem Auflösungsvermögen und der Massen- genauigkeit in der Massenspektrometrie; links: Peak niedrigaufge- löst, rechts: Peak hochaufgelöst (nach [29]).	34
Abbildung 2.15	Darstellung des MRM Messmodus (verändert nach [33]).	36
Abbildung 2.16	Zusammenhang zwischen dem TIC und dem XIC.	37
Abbildung 2.17	Darstellung des Product Ion Scans (verändert nach [33]).	37
Abbildung 3.1	Methodischer Ablauf der Detektion toxischer Fraktionen mittels HPTLC und <i>A. fischeri</i>	40

Abbildung 3.2	HPTLC-aufgetrennter Kontrollstandard mit 19-stufigem Gradientenprogramm: 1) mit Zusatz von Methansäure, 2) ohne Zusatz von Methansäure, 3) 9-stufiges Gradientenprogramm. Detektion unter UV-Licht bei 254 nm.	44
Abbildung 3.3	Aufgetrennter Kontrollstandard; links: Detektion unter UV-Licht (254 nm), mittig: <i>A. fischeri</i> -Detektion, rechts: unter UV-Licht (366 nm).	49
Abbildung 3.4	Detektion der Biolumineszenzhemmung des in unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragenen und aufgetrennten Kontrollstandards.	50
Abbildung 3.5	Detektion des neuen Kontrollstandards, links: UV-Licht bei 254 nm; mittig: <i>A. fischeri</i> -Detektion; rechts: UV-Licht bei 366 nm.	51
Abbildung 3.6	Vergleich zweier Elbewasser-Extrakte: links: ohne Internen Standard; rechts: mit Internem Standard	52
Abbildung 3.7	Blindwerte der getesteten SPE-Materialien.	54
Abbildung 3.8	Schematische Abbildung des für die HPTLC Elution verwendeten Elutionskopfes (verändert nach [76].)	57
Abbildung 3.9	Extrahierte Massenspur des Analyten Atrazin-D5 ($t_R = 17,36$ min).	59
Abbildung 3.10	Extrahierte Massenspuren der Internen Standards Atrazin-D5 (oben) und PFOA- $^{13}C_4$ (unten) bei einem Eluentenzusatz von 0,1 % Methansäure.	59
Abbildung 3.11	Extrahierte Massenspuren der Internen Standards Atrazin-D5 (oben) und PFOA- $^{13}C_4$ (unten) bei einem Eluentenzusatz von Methansäure und Ammoniumhydroxid.	60
Abbildung 3.12	Extrahierte Massenspur des Analyten Atrazin-D5 ($t_R = 17,34$ min) eines Scanlaufes über den Massenbereich 100 Da–500 Da.	62
Abbildung 3.13	Zusammenhang zwischen den in zwei Klassen eingeteilten R_f -Werten (Klasse 1: R_f -Wert < 0,6 , Klasse 2: R_f -Wert > 0,6) und den zugehörigen HPLC-Retentionszeiten	64
Abbildung 3.14	Korrelation zwischen den log KOW-Werten von 24 Substanzen und deren zugehörige Retentionszeiten (min) für die verwendete RP-HPLC Messung.	66
Abbildung 3.15	Messstationen (rot umrandet) der Nordseewasserproben, welche auf Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon hin untersucht wurden.	68

Abbildung 4.1	Mittelwerte ($n = 9$) und Standardabweichungen der Biolumineszenzhemmung (%) der vier getesteten Konzentrationsstufen (1–4) für die Substanzen Fluoranthen, Dimethylgelb, Koffein und Thioharnstoff.	75
Abbildung 4.2	Ausschnitt der detektierten Biolumineszenzhemmung dreier nach der Entwicklung unterschiedlich lang (Zeit t , mit $t_1 > t_2 > t_3$) gelagerten HPTLC-Platten. Der rote Kasten zeigt den R_f -Bereich von Thioharnstoff.	76
Abbildung 4.3	Mittelwerte der Biolumineszenzhemmungen sowie zugehörige Standardabweichungen von 11 <i>A. fischeri</i> -Kulturen für die Substanzen Fluoranthen, Dimethylgelb (DMG) und Koffein.	79
Abbildung 4.4	Aufgetrennte Meerwasserextrakte (Applikationsvolumen 10 μL) verschiedener Probenahmestationen der Deutschen Bucht unter UV-Licht bei 254 nm (oben links) und UV-Licht bei 366 nm (oben rechts) sowie die Detektion der <i>A. fischeri</i> -Biolumineszenz (unten). 83	
Abbildung 4.5	Probenahme-Stationsnetz des BSH. Rot markiert: Probenahmestandorte der für die Untersuchung des Konzentrations-Arbeitsbereiches verwendeten Meerwasserproben.	85
Abbildung 4.6	Aufgetrennter Elbewasserextrakt mit zugehörigem Blindwert unter UV-Licht bei 366 nm. Links: Applikationsvolumen 5 μL , rechts: Applikationsvolumen 10 μL	85
Abbildung 4.7	Detektion der Biolumineszenzhemmung des aufgetrennten Elbewasserextraktes mit zugehörigen Blindwert. Links: Applikationsvolumen 5 μL , rechts: Applikationsvolumen 10 μL	86
Abbildung 4.8	Schematische Darstellung der Konzentrationsbereiche der hier betrachteten 55 organischen Schadstoffe in Meer- und Elbewasser und der daraus resultierenden Konzentration auf der HPTLC-Platte (bei einem Applikationsvolumen von 10 μL für Meerwasserextrakte und 5 μL für Elbewasserextrakte) sowie den für eine <i>A. fischeri</i> -Detektion abgeschätzten benötigten Konzentrationsbereich.	91
Abbildung 4.9	Detektierte Biolumineszenzhemmungen des zu sieben unterschiedlichen Konzentrationen (1200 ng/Bande bis 12 ng/Bande; entspricht entspricht 20 ng/Bande und Substanz bis 0,2 ng/Bande und Substanz) applizierten Schadstoffgemisches.	92

Abbildung 4.10	HPTLC-aufgetrennte Probenextrakte verschiedener Probenahmestationen aus der Deutschen Bucht unter UV-Licht bei 254 nm (oben) und 366 nm (unten).	97
Abbildung 4.11	Kontrastansicht des R_f -Bereiches 0,6 unter UV-Licht bei 254 nm.	98
Abbildung 4.12	Detektion der Biolumineszenzhemmung verschiedener HPTLC-aufgetrennter Meerwasserprobenextrakte (Deutsche Bucht).	99
Abbildung 4.13	Durchflüsse (Tagesmittelwerte: 25.5.-5.7.2013) an verschiedenen Pegeln der Elbe [110].	99
Abbildung 4.14	Probenahmestelle Wittenbergen in Hamburg für Elbewasserproben (rot umrandet). ©OpenStreetMap-Mitwirkende, openstreetmap.org	100
Abbildung 4.15	Detektion der Biolumineszenzhemmung verschiedener HPTLC-aufgetrennter Elbehochwasserextrakte.	101
Abbildung 4.16	Zeitlicher Verlauf der berechneten Biolumineszenzhemmungen (%) der Hemmbanden in den R_f -Bereichen 0,15; 0,4 und 0,75.	102
Abbildung 4.17	Zeitlicher Konzentrationsverlauf verschiedener Pestizide während des Elbehochwassers [13].	102
Abbildung 4.18	Zeitlicher Konzentrationsverlauf verschiedener Pharmazeutika während des Elbehochwassers. [13]	103
Abbildung 4.19	HPTLC-aufgetrennter Elbewasserextrakt einer Elbewasserprobe vom 28.4.14 mit dem zugehörigen Blindwert unter UV-Licht bei 254 nm (links) und 366 nm (mitte) sowie die zugehörige <i>A. fischeri</i> -Detektion (rechts).	104
Abbildung 4.20	Biolumineszenzhemmung des untersuchten Elbewasserextraktes.	105
Abbildung 4.21	Aus dem Full- Scan extrahierte Massenspuren im Bereich der Fipronil Monoisotopenmasse (434.7 Da bis 435.1 Da) und dem Bereich der ^{37}Cl -Isotopenmasse (436.7 Da bis 437.1 Da).	106
Abbildung 4.22	Extrahierte Massenspur und Massenspektrum des Product Ion Scans von Fipronil im untersuchten Probenextrakt (oben) und Referenzstandard (unten).	108
Abbildung 4.23	Unterteilung der unter einer Biolumineszenzhemmbande befindlichen Substanzen.	110
Abbildung 4.24	Aus dem Full-Scan extrahierte Massenspur (Fipronil: XIC 434.7 Da bis 435.1 Da) des gemessenen Elbewassergesamtextraktes (oben) und des Extraktes des von der HPTLC-Platte ausgestanzten R_f -Bereiches 0,77 (unten).	111

Abbildung 4.25	Probenahmestationen der untersuchten Wasserproben. x = Schadstoff konnte qualitativ nachgewiesen werden; o = Schadstoff konnte qualitativ nicht nachgewiesen werden; BW = Blindwert	116
Abbildung 4.26	Vergleich der MRM-Messung eines Standards und der untersuchten Elbewasser-Probe für Fipronil (Peak mittig), Fipronil-desulfinyl (Peak links) und Fipronil-sulfon (Peak rechts).	118
Abbildung 4.27	Gemessene Konzentrationen (ng/L) von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in den untersuchten Elbewasserproben, sowie die zugehörige Abflussrate der Elbe (m ³ /s) zur jeweiligen Probenahmezeit.	120
Abbildung 4.28	Gemessene Konzentrationen von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon (pg/L) in den Nordseewasserproben der Messstationen EIDER, HELGO, Sylt1 und ES1 (Abbildung rechts) im Vergleich zu den Konzentrationen der drei Substanzen (ng/L) in einer Elbewasserprobe (Abbildung links).	123
Abbildung 4.29	Detektierte Biolumineszenzhemmung nach Auftragung unterschiedlicher PFOS-Konzentrationen und zugehörige Blindwerte.	127
Abbildung 4.30	Applikationseinheit des ATS4-Probensamplers für die Probenauftragung (links) und detektierte Biolumineszenzhemmung zweier mit unterschiedlichen Auftragesgeschwindigkeiten (100 nL/s und 410 nL/s) applizierten „Luft“-Probe (rechts	129
Abbildung 4.31	Ergebnisse des GC-MS-Scanlaufs des Blindwertextraktes (a) sowie der zugehörigen Blindwertreferenz (b) sowie die Massenspektren des Substanzpeaks bei t _R = 23 min (c) und der Substanz BHT (d).	130
Abbildung 4.32	Ergebnisse der im GC-MS-Full-Scan analysierten Spüeluete der Druckreduzierventil-Gummimembran (a) und -Kunststoffabdeckung (b) sowie der zugehörige Blindwert (c).	131
Abbildung 1	HPTLC-Platte 1 zum Versuch zur Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmung mit einer <i>A. fischeri</i> -Kultur.	163
Abbildung 2	HPTLC-Platte 2 zum Versuch zur Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmung mit einer <i>A. fischeri</i> -Kultur.	163
Abbildung 3	HPTLC-Platte 3 zum Versuch zur Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmung mit einer <i>A. fischeri</i> -Kultur.	164

Abbildung 4	Detektierte Biolumineszenzhemmungen des zu unterschiedlichen Konzentrationen (100 ng/Bande bis 0,01 ng/Bande) aufgetragenen und aufgetrennten Schadstoffgemisches bestehend aus 6 Substanzen: PFOS, PFOA, Carbamazepin, Primidon, Diuron und Alachlor.	166
Abbildung 5	Fragmentmuster und Retentionszeiten der detektierten Schadstoffe in den Probenextrakten im Vergleich zum zugehörigen Referenzstandard.	173

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1	Zusammensetzung des Nährmediums für die Anzucht der <i>A. fischeri</i> -Bakterien	40
Tabelle 3.2	Lösemittelzusammensetzung, Entwicklungshöhe und Trocknungszeiten des 19-stufigen Gradientenprogramms.	42
Tabelle 3.3	Lösemittelzusammensetzung, Entwicklungshöhe und Trocknungszeiten des 9-stufigen Gradientenprogramms.	44
Tabelle 3.4	Zusammensetzung des anfänglich verwendeten Kontrollstandards. . .	48
Tabelle 3.5	Zusammensetzung des optimierten Kontrollstandards	51
Tabelle 3.6	HPLC-Gradientenprogramm für das Non-Target Screening. Äquil. = Äquilibrierung	55
Tabelle 3.7	Vergleich der durchschnittlichen relativen Wiederfindungen (WDF) und Standardabweichungen (STAW) der verwendeten Analyten für die drei getesteten Extraktionsverfahren.	57
Tabelle 3.8	Signalintensitäten (Peakhöhe H) und S/N-Verhältnisse von sechs Analyten bei unterschiedlichen Eluentenzusätzen; n.g. = nicht gemessen. .	60
Tabelle 3.9	HPLC-Gradientenprogramm für die Identifizierung von Schadstoffen. Äquil. = Äquilibrierung	67
Tabelle 4.1	Arithmetische Differenzen (%-Punkte) der einzelnen Hemmwerte (n = 3 pro HPTLC-Platte) zu ihrem Mittelwert für die Substanzen Fluoranthen, Dimethylgelb und Koffein. Überschreitungen des 3%-Punkte Gültigkeitskriteriums sind rot markiert.	77
Tabelle 4.2	Arithmetische Differenzen (%-Punkte) der einzelnen Hemmwerte der HPTLC-Platten 1 und 3 (n = 6) zu ihrem Mittelwert für die Substanzen Fluoranthen, Dimethylgelb und Koffein. Überschreitungen des 3 %-Punkte Gültigkeitskriteriums sind rot markiert.	78
Tabelle 4.3	Biolumineszenzhemmungen von 11 <i>A. fischeri</i> -Kulturen für die Substanzen Fluoranthen, Dimethylgelb und Koffein. Überschreitungen des 3 %-Punkte Gültigkeitskriteriums sind rot markiert. MW = Mittelwert; STAW = Standardabweichung; VK = Variationskoeffizient .	80

Tabelle 4.4	Visuelle Nachweisgrenzen (ng/Bande) und daraus resultierende benötigte Meerwassermindestkonzentration (ng/L) von 12 Substanzen für die <i>A. fischeri</i> -Detektion im Vergleich zu den gemessenen max. Wasserkonzentrationen (ng/L) der Schadstoffe in der Nordsee und der Elbe; k.A. = keine Angabe.	90
Tabelle 4.5	Absolute und relative Anzahl (%) der im Full-Scan (100 Da bis 1000 Da) detektierten Substanzen eines Standardgemisches mit 65 Substanzen in unterschiedlichen Verdünnungsstufen.	94
Tabelle 4.6	Erreichbare Identifizierungspunkte in Abhängigkeit vom gewählten massenspektrometrischen Verfahren nach EU Kommissions-Richtlinie 2002/657/EG.	107
Tabelle 4.7	Vergleich der Retentionszeiten (t_R) sowie der relativen Intensitäten I (%) des Precursors und zweier Fragmente der Substanz Fipronil im Referenzstandard und in der Probe.	108
Tabelle 4.8	Auflistung der analysierten Extrakte sowie die in den Datenbanken dokumentierten Substanzen, die im Vergleich zu den jeweiligen Analysedaten übereinstimmende Fragmentmuster aufwiesen, deren log KOW-Wert, sowie basierend darauf, die resultierende berechnete t_R (min) \pm 95 %-Prognoseintervall im Vergleich zur gemessenen t_R (min). Das Vorhandensein des zu einer Substanz zugehörigen Isotopenpeaks sowie des für die Identifizierung notwendigen Referenzstandards wurde mit x = vorhanden bzw. o = nicht vorhanden markiert. Identifizierte Substanzen sind mit x gekennzeichnet, nicht identifizierte mit o.	114
Tabelle 4.9	Stoffeigenschaften des Insektizids Fipronil und zwei seiner Transformationsprodukte Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon	119
Tabelle 4.10	Durchschnittliche Konzentrationen (ng/g) sowie die zugehörigen Standardabweichungen von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in den untersuchten Muskel- und Leberproben von Aalen bezogen auf das Nassgewicht (NG) und Fettgewicht (FG).	125
Tabelle 4.11	Detektierte Biolumineszenzhemmung (%) der Substanz PFOS und des zugehörigen Blindwertes (MeOH) für unterschiedliche Auftragevolumina	128

Tabelle 1	Biolumineszenzhemmungen (%) der HPTLC-Platten 1,2 und 3 für die jeweils vier Konzentrationsstufen (dreifach Bestimmung) der Substanzen Fluoranthen, Dimethylgelb, Koffein und Thioharnstoff. MW = Mittelwert; STAW = Standardabweichung; VK = Variationskoeffizient	165
Tabelle 2	Schadstoffkonzentrationen (ng/L) verschiedener Messstationen in der Deutschen Bucht der Nordsee (die vier höchsten gemessenen Konzentrationen sind rot markiert), sowie Schadstoffkonzentrationen (ng/L) einer Elbewasserprobe.	167
Tabelle 3	Fortsetzung der Tabelle 2	168
Tabelle 4	Liste der im positiven Messmodus (Scan 100 Da bis 1000 Da) gemessenen Schadstoffe und die getesteten Konzentrationen, die für die Bestimmung der benötigten Schadstoffmindestkonzentration für eine ausreichende Peakdetektion verwendet wurden; x = detektiert, o = nicht detektiert.	169
Tabelle 5	Liste der im negativen Messmodus (Scan 100 Da bis 1000 Da) gemessenen Schadstoffe und die getesteten Konzentrationen, die für die Bestimmung der benötigten Schadstoffmindestkonzentration für eine ausreichende Peakdetektion verwendet wurden; x = detektiert, o = nicht detektiert.	170
Tabelle 6	Liste verschiedener organischer Schadstoffe und deren zugehörige logKOW-Werte, Retentionszeiten (t_R), R_f - und pKa-Werte. (k. A. = keine Angabe)	171
Tabelle 7	Liste der Schadstoffe, welche unter der Biolumineszenzhemmbande im R_f -Bereich 0,77 detektiert wurden sowie deren Konzentrationen (ng/mL) im Elbewasserprobenextrakt und der daraus resultierenden Konzentration (ng/Bande) auf der HPTLC-Platte.	172
Tabelle 8	Gemessene Massenübergänge, zugehörige Kollisionsenergien (eV) und Retentionszeiten der MRM-Methode für die Identifizierung, den qualitativen und quantitativen (für Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon) Nachweis der aufgelisteten Schadstoffe in den untersuchten Proben als auch die Messparameter der für die Quantifizierung verwendeten C13-markierten Internen Standards.	174

Tabelle 9	Konzentrationen (ng/L) von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in den Proben der untersuchten Elbewasser-Proben sowie die Angabe der Bestimmungsgrenzen (LOQ) und Nachweisgrenzen (LOD) in ng/L. MW = Mittelwert, BW = Blindwert	175
Tabelle 10	Messdaten zur Bestimmung von Mittelwert (MW) und Wiederfindung (WDF %) von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in Elbewasser-Proben. STAW = Standardabweichung	176
Tabelle 11	Datum und Uhrzeit der Elbewasser-Probenahme sowie der zugehörige Elbe-Pegelstand (m) und -Abflussrate (m^3/s) als auch die gemessenen Konzentrationen (ng/L) von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon und dem Quotienten aus der Fipronil-, Fipronil-sulfon-Konzentration und dem Pegelstand h (ng/L*m).	176
Tabelle 12	Konzentrationen (pg/L) von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in den Proben der verschiedenen Nordsee-Messstationen sowie deren prozentualen Anteile (%) an der Summenkonzentration, sowie die Angabe Bestimmungsgrenze (LOQ) und Nachweisgrenze (LOD) in pg/L.	177
Tabelle 13	Messdaten zur Bestimmung von Mittelwert (MW) und Wiederfindung (WDF %) von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in Nordseewasser-Proben. STAW = Standardabweichung	177
Tabelle 14	Konzentrationen von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon (ng/g) in den untersuchten Aal-Proben bezogen auf das Nassgewicht (NG), Trockengewicht (TG) und Fettgewicht (FG). M = Muskel, L = Leber, n.d. = nicht detektiert	178
Tabelle 15	Fettanteil (%) der Muskel- und Leberproben. n.m = nicht gemessen .	178
Tabelle 16	Messdaten für die Bestimmung der Wiederfindung (WDF %) von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in Aalmuskel- und Leberproben.	179
Tabelle 17	Toxizitätsdaten für Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon [80].	180

Anhang

1 Projekt I

1.1 Reproduzierbarkeit *A. fischeri*-Detektion

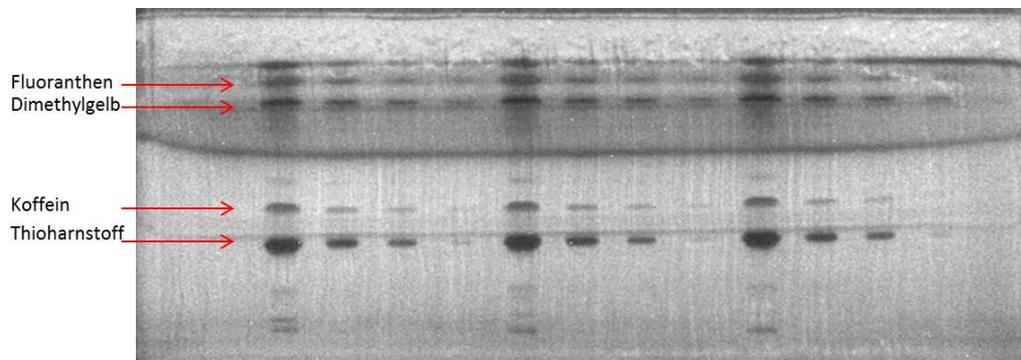


Abbildung 1 HPTLC-Platte 1 zum Versuch zur Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmung mit einer *A. fischeri*-Kultur.

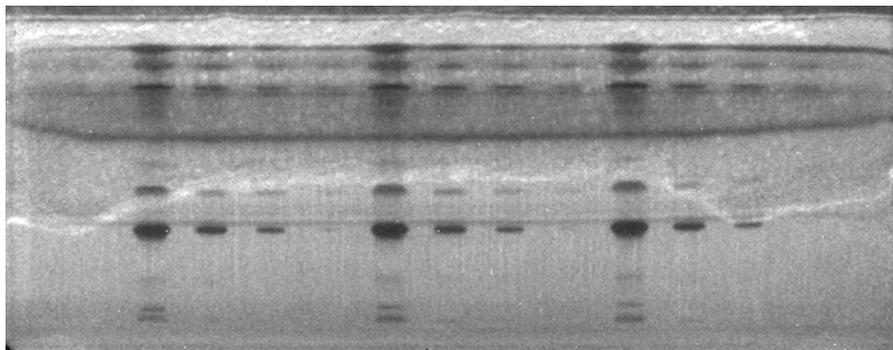


Abbildung 2 HPTLC-Platte 2 zum Versuch zur Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmung mit einer *A. fischeri*-Kultur.

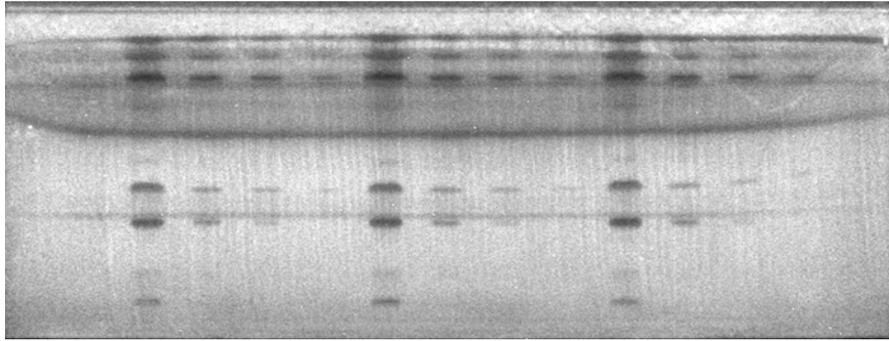


Abbildung 3 HPTLC-Platte 3 zum Versuch zur Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzhemmung mit einer *A. fischeri*-Kultur.

Tabelle 1 Biolumineszenzhemmungen (%) der HPTLC-Platten 1,2 und 3 für die jeweils vier Konzentrationsstufen (dreifach Bestimmung) der Substanzen Fluoranthren, Dimethylgelb, Koffein und Thioharnstoff. MW = Mittelwert; STAW = Standardabweichung; VK = Variationskoeffizient

HPTLC-Platte 1

K.-Stufe	ng/Bande	Fluoranthren					
		Hemmung %					
1	2	3	MW	STAW	VK (%)		
1	62,0	46,9	43,8	45,5	45,7	1,7	3,7
2	12,0	34	30,1	31,9	32,0	2,0	6,1
3	5,0	23,6	23,6	23,4	25,5	3,3	13,1
4	2,5	14,3	16,7	13,6	14,9	1,6	10,9

K.-Stufe	ng/Bande	Dimethylgelb					
		Hemmung %					
1	2	3	MW	STAW	VK (%)		
1	157,5	58,64	59,9	61,5	60,0	1,4	2,4
2	23,9	44,15	46,1	45,1	45,1	1,0	2,2
3	11,3	37,64	40	39,8	39,1	1,3	3,3
4	4,7	25,1	26	23,9	25,0	1,1	4,2

HPTLC-Platte 2

K.-Stufe	ng/Bande	Fluoranthren					
		Hemmung %					
1	2	3	MW	STAW	VK (%)		
1	62,2	49,5	46,3	46,6	47,5	1,8	3,7
2	12,4	37,7	34,8	29,1	33,9	4,4	12,9
3	5,0	23,9	27,4	23,6	23,6	1,8	6,8
4	2,5	12,8	23,3	19,8	18,6	5,3	28,7

K.-Stufe	ng/Bande	Dimethylgelb					
		Hemmung %					
1	2	3	MW	STAW	VK (%)		
1	157,5	58,9	59	64,4	60,8	3,1	5,2
2	23,94	39,9	45,9	44,6	43,5	3,2	7,3
3	11,34	30	37,8	36,5	34,8	4,2	12,0
4	4,725	20,7	21,4	20,2	20,8	0,6	2,9

HPTLC-Platte 3

K.-Stufe	ng/Bande	Fluoranthren					
		Hemmung %					
1	2	3	MW	STAW	VK (%)		
1	62,2	43,4	44,4	42,4	43,4	1,0	2,3
2	12,4	35	30,6	26,3	30,6	4,4	14,2
3	5	24,7	21,3	23,9	23,3	1,8	7,6
4	2,5	14,6	18,5	14,5	15,9	2,3	14,4

K.-Stufe	ng/Bande	Dimethylgelb					
		Hemmung %					
1	2	3	MW	STAW	VK (%)		
1	157,5	58,7	58,9	56,1	57,9	1,6	2,7
2	23,94	42,5	41,2	44,6	42,8	1,7	4,0
3	11,34	36,9	35,1	41,2	37,7	3,1	8,3
4	4,725	23,1	25,2	26	24,8	1,5	6,0

HPTLC-Platte 1

K.-Stufe	ng/Bande	Koffein					
		Hemmung %					
1	2	3	MW	STAW	VK (%)		
1	6250,0	52	50,5	52,2	51,6	0,9	1,8
2	950,0	26,5	27	25,7	26,7	0,3	0,9
3	450,0	19,5	20,3	19,4	18,4	2,6	14,3
4	187,5	6,5	12,4	4,7	7,9	4,0	51,2

K.-Stufe	ng/Bande	Thioharnstoff					
		Hemmung %					
1	2	3	MW	STAW	VK (%)		
1	1250,0	68	69	69,3	68,8	0,7	1,0
2	190,0	62,2	61,5	60,6	60,6	2,1	3,5
3	90,0	50,2	49,8	49,9	49,9	0,2	0,5
4	37,5	13,9	11,1	10,8	11,9	1,7	14,3

HPTLC-Platte 2

K.-Stufe	ng/Bande	Koffein					
		Hemmung %					
1	2	3	MW	STAW	VK (%)		
1	6250	54,3	50,6	50,7	51,9	2,1	4,1
2	950	34,4	30,9	25,2	30,2	4,6	15,4
3	450	21,1	18,5	18,3	19,3	1,5	8,1
4	187,5	10,6	12,7	6,3	9,9	3,3	33,1

K.-Stufe	ng/Bande	Thioharnstoff					
		Hemmung %					
1	2	3	MW	STAW	VK (%)		
1	1250	67,7	69	68,6	68,4	0,7	1,0
2	190	59,2	58,8	59,9	59,3	0,6	0,9
3	90	50,1	50,7	43	47,9	4,3	8,9
4	37,5	13,4	8,4	6,5	9,4	3,6	37,8

HPTLC-Platte 3

K.-Stufe	ng/Bande	Koffein					
		Hemmung %					
1	2	3	MW	STAW	VK (%)		
1	6250	49	49,6	51,3	50,0	1,2	2,4
2	950	27,5	30,7	27,1	28,4	2,0	6,9
3	450	20	19,2	15,9	18,4	2,2	11,8
4	187,5	14,9	8,1	9	10,7	3,7	34,6

K.-Stufe	ng/Bande	Thioharnstoff					
		Hemmung %					
1	2	3	MW	STAW	VK (%)		
1	1250	55,4	57,8	58,2	57,1	1,5	2,7
2	190	34,2	32,4	33,3	33,3	0,9	2,7
3	90	12,7	12	9,6	11,4	1,6	14,2
4	37,5	3,2	4,6	0,6	2,8	2,0	72,5

1.2 Konzentrations-Arbeitsbereich

1.2.1 *A. fischeri*-Detektion

Liste der Schadstoffe des Schadstoffgemisches (alphabetisch geordnet), welches verwendet wurden, um die benötigte Mindestkonzentration für eine Detektion mit *A. fischeri* abzuschätzen: 1H-Benzotriazol, 2,4-D, Atrazin, Atrazin-desethyl, Atrazin-desethyl-desisopropyl, Bentazon, Carbamazepin, Carbendazim, Chloridazon, Chloroxuron, Chlorpropham, Chlortoluron, Clofibrinsäure, Crimidine, Cyanazine, Dichlorprop, Diclofenac, Diuron, Fenuron, Hexazinon, Irgarol, Isoproturon, Linuron, MCPA, Mecoprop, Metamitron, Metazachlor, Methabenzthiazuron, Metobromuron, Metolachlor, Metoprolol, Metoxuron, Metribuzin, Monolinuron, Naproxen, Oxazepam, Pendimethalin, PFBA, PFBS, PFDA, PFD_oA, PFHpA, PFHpS, PFHxA, PFHxS, PFNA, PFOA, PFPA, PFTeDA, PFT_rDA, PFUdA, Primidon, Prometryn, Propazine, Propham, Sebuthylazine, Simazine, Terbutylazine, Terbutryn und Triclosan.

Rot markiert: Substanzen, die unter der Hemmbande im R_f- Bereich 0,1 detektiert wurden.

Grün markiert: Substanzen, die unter der Hemmbande im R_f- Bereich 0,7 detektiert wurden.

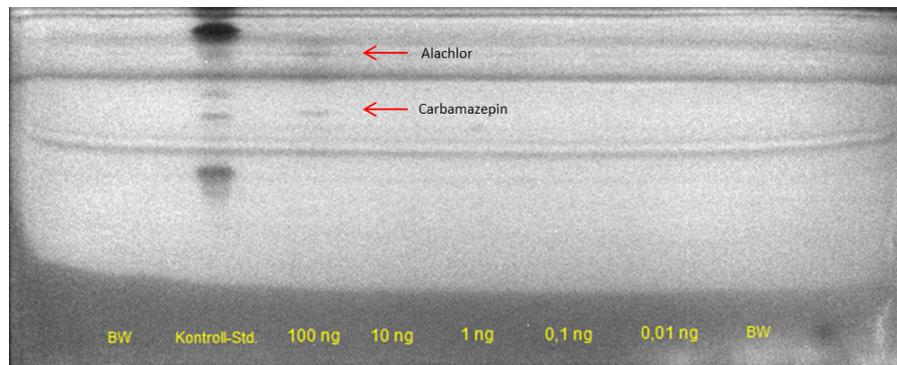


Abbildung 4 Detektierte Biolumineszenzhemmungen des zu unterschiedlichen Konzentrationen (100 ng/Bande bis 0,01 ng/Bande) aufgetragenen und aufgetrennten Schadstoffgemisches bestehend aus 6 Substanzen: PFOS, PFOA, Carbamazepin, Primidon, Diuron und Alachlor.

Tabelle 2 Schadstoffkonzentrationen (ng/L) verschiedener Messstationen in der Deutschen Bucht der Nordsee (die vier höchsten gemessenen Konzentrationen sind rot markiert), sowie Schadstoffkonzentrationen (ng/L) einer Elbewasserprobe.

Analyt	Station						ELBE 06.05.14
	ES1	MEDEM	Sylt1	UFSDB	NSB3	DTEND	
2,4-D	0,25	0,90	0,42	0,16	0,16	0,02	2,03
Alachlor	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Atrazin	0,76	1,58	0,83	0,76	0,75	0,53	2,97
Bentazon	0,79	11,84	1,34	0,52	0,51	0,01	18,48
Benzotriazol	18,22	110,32	20,51	9,07	11,78	1,22	376,63
Carbamazepin	1,64	19,03	2,63	0,92	1,37	0,06	92,97
Carbendazim	0,66	2,50	0,72	0,34	0,45	0,05	6,67
Chlorfenvinphos	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Chloridazon	0,32	0,76	0,39	0,16	0,20	0,01	3,17
Chlortoluron	1,09	2,50	1,18	0,90	0,81	0,06	5,53
Clofibrinsäure	0,02	0,14	0,03	0,02	0,02	k.A.	0,39
Desethylatrazin	0,87	1,65	0,97	0,81	0,81	0,12	2,94
Dichlorprop	0,17	3,02	0,21	0,11	0,11	k.A.	5,62
Diclofenac	k.A.	3,01	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	36,74
Diuron	0,76	4,32	1,01	0,54	0,57	0,14	8,98
Fenuron	0,06	1,19	0,11	0,07	0,07	0,01	21,03
Fluoranthen	0,25	5,18	0,33	0,58	0,34	0,12	k.A.
Hexain	0,03	0,44	0,06	0,03	0,04	0,01	1,15
Irgarol	0,09	0,33	0,09	0,02	0,03	k.A.	0,63
Isoproturon	0,78	5,80	1,63	0,93	0,91	0,02	9,22
Linuron	0,12	0,32	0,07	0,04	0,04	0,02	0,69
MCPA	0,38	3,73	0,38	0,20	0,24	0,03	7,46
Mecoprop	0,50	1,74	0,60	0,31	0,37	0,03	5,76
Metazachlor	0,14	0,96	0,26	0,14	0,17	0,02	2,85
Methabenzthiazuron	0,03	0,07	0,04	0,02	0,03	0,01	0,12
Metolachlor	0,57	4,15	0,46	0,36	0,43	0,05	2,88
Metoprolol	0,17	5,63	0,74	0,19	0,28	k.A.	49,25
Monolinuron	k.A.	0,10	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0,34
Naproxen	0,30	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	6,82
Oxazepam	2,13	4,96	2,01	1,37	1,21	0,17	9,79
Pendimethalin	0,09	k.A.	0,05	0,09	0,09	0,07	0,74
PFBA	k.A.	8,56	k.A.	k.A.	1,36	k.A.	93,73
PFBS	0,53	1,27	0,80	0,44	0,38	0,02	1,90
PFDA	0,03	0,14	0,04	0,00	0,00	k.A.	0,48
PFDOA	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0,32
PFHPA	0,31	0,88	0,32	0,20	0,20	0,05	1,45
PFHPS	0,01	0,05	0,02	0,01	0,01	0,32	0,01
PFHXA	0,40	1,81	0,46	0,25	0,27	0,05	4,26
PFHXS	0,17	0,47	0,21	0,13	0,14	0,02	0,90
PFNA	0,09	0,22	0,10	0,04	0,05	0,06	0,36
PFOA	0,64	1,61	0,71	0,35	0,40	0,15	3,47
PFOS-1	0,59	1,39	0,47	0,15	0,24	0,04	2,62
PFOSA	0,02	0,10	0,05	0,02	0,05	0,01	0,23
PFPA	0,74	1,30	1,01	0,47	0,34	0,06	2,82
PFTEDA	k.A.	k.A.	0,01	k.A.	0,01	0,00	0,14
PFTRDA	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0,13
PFUDA	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0,21

Tabelle 3 Fortsetzung der Tabelle 2

Analyt	Station						ELBE 06.05.14
	ES1	MEDEM	Sylt1	UFSDB	NSB3	DTEND	
Primidon	1,95	33,67	3,80	1,05	1,32	0,14	60,97
Prometryn	k.A.	0,60	0,03	k.A.	k.A.	k.A.	1,60
Propazin	0,02	k.A.	0,02	0,01	0,02	0,01	0,22
Simazin	0,17	1,16	0,26	0,17	0,18	0,10	2,75
TBBPA	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Terbutryn	0,21	1,25	0,28	0,09	0,12	0,01	3,33
Terbutylazin	1,13	6,42	1,08	0,49	0,63	0,15	7,98
Triclosan	0,01	0,11	0,02	k.A.	0,03	0,00	2,78

1.2.2 Non-Target Screening

Tabelle 4 Liste der im positiven Messmodus (Scan 100 Da bis 1000 Da) gemessenen Schadstoffe und die getesteten Konzentrationen, die für die Bestimmung der benötigten Schadstoffmindestkonzentration für eine ausreichende Peakdetektion verwendet wurden; x = detektiert, o = nicht detektiert.

Analyt	Getestete Konzentrationen					
	10 ng/mL	5 ng/mL	2 ng/mL	0,8 ng/mL	0,1 ng/mL	0,01 ng/mL
Atrazin	X	X	X	o	o	o
1-H Benzotriazol	X	X	o	o	o	o
Atrazin-desethyl	X	X	X	o	o	o
Atrazin-desethyl-desisopropyl	o	o	o	o	o	o
Carbamazepine	o	o	o	o	o	o
Carbendazim	X	X	o	o	o	o
Chloridazon	X	X	X	o	o	o
Chloroxuron	X	X	o	o	o	o
Chlorpropham	o	o	o	o	o	o
Chlortoluron	X	X	X	o	o	o
Crimidine	o	o	o	o	o	o
Cyanazine	X	o	o	o	o	o
Diuron	X	X	X	o	o	o
Fenuron	X	X	o	o	o	o
Hexazinon	X	X	X	o	o	o
Irgarol	X	X	X	o	o	o
Isoproturon	X	X	o	o	o	o
Linuron	X	X	o	o	o	o
Metamitron	X	X	o	o	o	o
Metazachlor	X	o	o	o	o	o
Methabenzthiazuron	X	X	o	o	o	o
Metobromuron	X	o	o	o	o	o
Metolachlor	X	X	X	o	o	o
Metoprolol	X	X	X	o	o	o
Metoxuron	X	X	X	o	o	o
Metribuzin	X	X	X	o	o	o
Monolinuron	X	o	o	o	o	o
Naproxen	X	o	o	o	o	o
Oxazepam	X	o	o	o	o	o
Pendimethalin	o	o	o	o	o	o
Primidone	o	o	o	o	o	o
Prometryn	X	X	X	o	o	o
Propazin	o	o	o	o	o	o
Propham	o	o	o	o	o	o
Sebuthylazine	X	X	X	o	o	o
Simazine	X	X	X	o	o	o
Terbuthylazine	X	X	o	o	o	o
Terbutryn	o	o	o	o	o	o
Diclofenac	o	o	o	o	o	o

Tabelle 5 Liste der im negativen Messmodus (Scan 100 Da bis 1000 Da) gemessenen Schadstoffe und die getesteten Konzentrationen, die für die Bestimmung der benötigten Schadstoffmindestkonzentration für eine ausreichende Peakdetektion verwendet wurden; x = detektiert, o = nicht detektiert.

Analyt	Konz. 10 ng/mL	Konz. 5 ng/mL	Konz. 2 ng/mL	Konz. 0,8 ng/mL	Konz. 0,1 ng/mL	Konz. 0,01 ng/mL
Bentazon	X	X	O	O	O	O
Triclosan	O	O	O	O	O	O
Clofibrinsäure	O	O	O	O	O	O
2,4 D	X	X	O	O	O	O
Dichlorprop	O	O	O	O	O	O
MCPA	O	O	O	O	O	O
MCPB	O	O	O	O	O	O
Mecoprop	O	O	O	O	O	O
2,4,5-T	O	O	O	O	O	O
PFBA	O	O	O	O	O	O
PFPA	X	O	O	O	O	O
PFHxA	X	X	O	O	O	O
PFHpA	X	X	O	O	O	O
PFOA	X	X	O	O	O	O
PFNA	X	X	X	X	O	O
PFDA	X	X	X	X	O	O
PFUda	X	X	X	X	O	O
PFDoA	X	X	X	X	O	O
PFTrDA	O	O	O	O	O	O
PFTeDA	X	X	X	X	O	O
PFBS	X	X	X	X	O	O
PFHxS	X	X	X	X	O	O
PFHpS	X	X	X	X	O	O
PFOS	X	X	X	X	X	O
PFDS	X	X	X	X	O	O
PFOSA	X	X	X	X	O	O

Tabelle 6 Liste verschiedener organischer Schadstoffe und deren zugehörige logKOW-Werte, Retentionszeiten (t_R), R_f - und pKa-Werte. (k. A. = keine Angabe)

Substanz	log KOW	Rt (min)	Rf	pKa
1H-Benzotriazol	1,44	8,1	0,47	8,37
Fenuron	0,98	9	0,58	k.A.
Metoprolol	1,9	9,8	0,06	k.A.
Chloridazon	1,14	10	0,44	3,34
Carbendazim	1,52	10,1	0,48	4,29
Atrazin-desethyl	1,51	10,8	0,51	k.A.
Naproxen	3,18	n.n.	0,37	4,15
Hexazinon	1,85	14,66	0,51	2,2
Simazine	2,18	14,7	0,64	1,62
Carbamazepin	2,45	16	0,48	13,9
Monolinuron	2,3	16,1	0,77	k.A.
Chlortoluron	2,41	16,8	0,61	k.A.
Methabenzthiazuron	2,64	17,3	0,71	k.A.
Atrazin	2,61	17,4	0,71	1,6
Metazachlor	2,13	17,6	0,74	k.A.
Isoproturon	2,87	17,7	0,58	k.A.
Diuron	2,68	18,15	0,64	k.A.
Linuron	3,2	19,7	0,77	k.A.
Propazine	2,93	19,7	0,71	1,7
Terbuthylazine	3,21	20	0,71	2
Prometryn	3,51	21,6	0,71	4,05
Terbutryn	3,74	22,05	0,71	4,3
Metolachlor	3,13	22,12	0,77	k.A.
Irgarol	4,07	22,4	0,71	k.A.

Formel für die Berechnung des 95 %- Prognoseintervalls [70]:

$$x = \frac{y - a}{b} \pm \frac{s_y}{b} \cdot t \cdot \sqrt{\frac{1}{N_c} + \frac{1}{N_a} + \frac{y - \bar{y}}{b^2 \cdot \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (1)$$

a = Achsenabschnitt

b = Steigung

s_y = Reststandardabweichung

t = t(P, f = $N_c - 2$)

N_c = Anzahl der gemessenen Werte

N_a = Anzahl der Wiederholungsmessungen

y = log KOW-Wert einer Substanz

\bar{y} = Mittelwert aller y -Werte

\bar{x} = Mittelwert aller x -Werte

x_i = Retentionszeit einer Substanz

Tabelle 7 Liste der Schadstoffe, welche unter der Biolumineszenzhemmbande im R_f -Bereich 0,77 detektiert wurden sowie deren Konzentrationen (ng/mL) im Elbewasserprobenextrakt und der daraus resultierenden Konzentration (ng/Bande) auf der HPTLC-Platte.

Substanz	Konz. Extrakt (ng/ml)	Konz. HPTLC Platte (ng/Bande)
Metazachlor	8,50	0,04
Terbuthylazin	20,50	0,10
Propazin	0,50	0,00
Atrazin	7,00	0,04
Linuron	3,25	0,02
Prometryn	3,50	0,02
Terbutryn	8,00	0,04
Monolinuron	0,10	< BG
Cybutryn	1,25	0,01
Metolachlor	8,75	0,04
Fipronil	2,00	0,01
Summe		0,32

2 Projekt II Chemisch-analytisches Schadstoffscreening

2.1 Identifizierte Schadstoffe

Fragmentmuster und Retentionszeiten der detektierten Schadstoffe in den Probenextrakten der extrahierten R_f -Bereiche 0; 0,2; 0,4; 0,6 und 0,8 eines Elbewasserextraktes im Vergleich zum zugehörigen Referenzstandard:

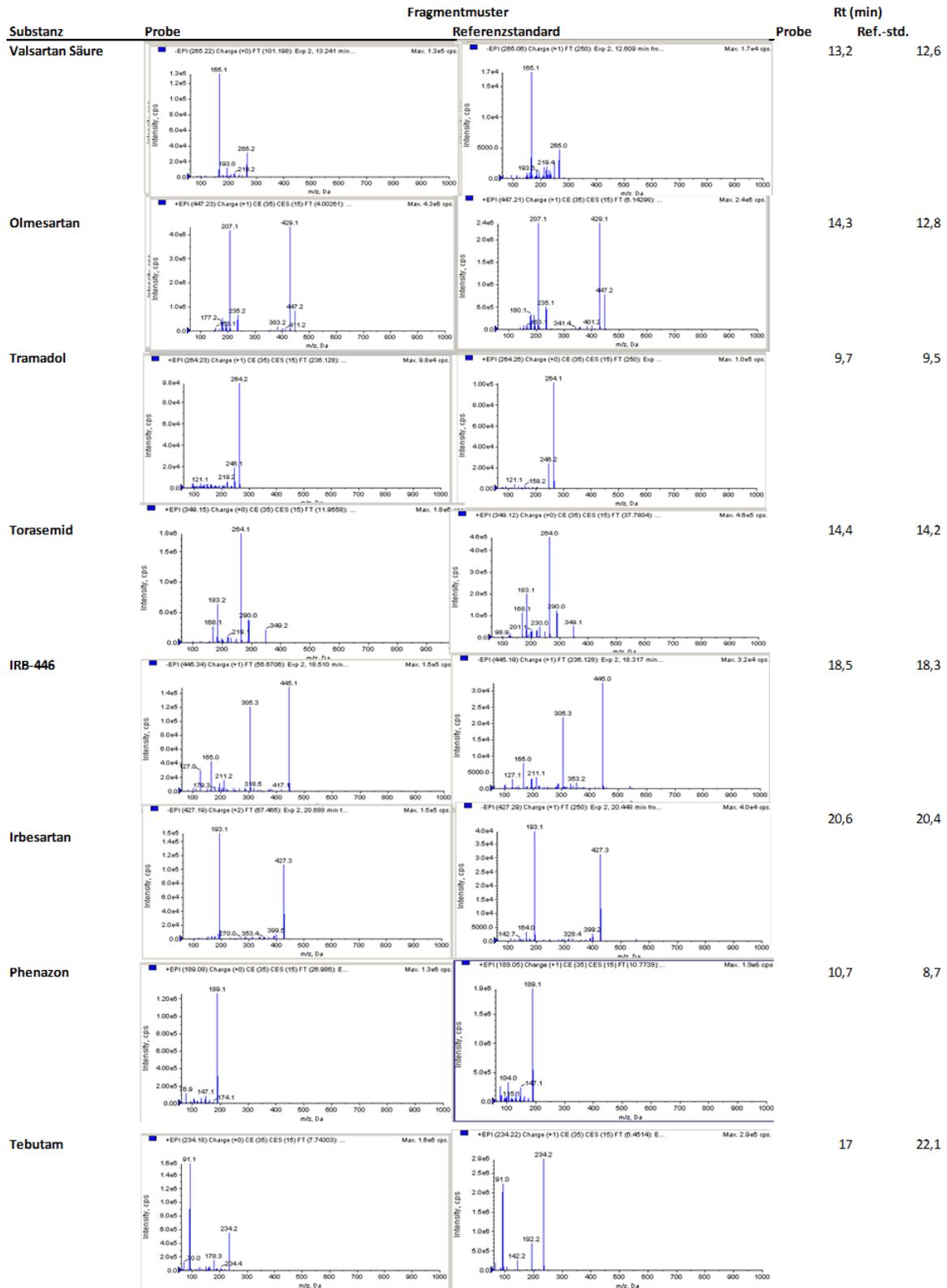


Abbildung 5 Fragmentmuster und Retentionszeiten der detektierten Schadstoffe in den Probenextrakten im Vergleich zum zugehörigen Referenzstandard.

Tabelle 8 Gemessene Massenübergänge, zugehörige Kollisionsenergien (eV) und Retentionszeiten der MRM-Methode für die Identifizierung, den qualitativen und quantitativen (für Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon) Nachweis der aufgelisteten Schadstoffe in den untersuchten Proben als auch die Messparameter der für die Quantifizierung verwendeten C13-markierten Internen Standards.

Substanz	MRM 1	CE	MRM 2	CE	MRM 3	CE	Rt (min)	Modus
Fipronil	434,8 > 330,0	-22	434,8 > 249,9	-38	434,8 > 318,0	-32	17,7	n
Fipronil-desulfinyl	386,9 > 351,0	-22	386,9 > 281,9	-44	386,9 > 330,9	-40	17,4	n
Fipronil-sulfon	450,9 > 414,9	-24	450,9 > 282,0	-38	450,9 > 243,8	-64	18,4	n
PFOA 13C4	417,0 > 414,9	-14					16,6	n
PFOS 13C4	502,9 > 79,9	-101					17,8	n
Indole-3-carboxaldehyd	143,9 > 371,8	-34	143,9 > 65,9	-42	143,9 > 114,2	-38	8,5	n
Tebutam	234,1 > 91,0	29	234,1 > 192,1	20			17,0	p
Phenazon	189,1 > 56,1	57	189,1 > 77,1	53	189,1 > 104,1	33	6,8	p
Irbesartan	427,2 > 193,1	-36	427,2 > 120,9	-86			15,3	n
IRB_442	k.R.		k.R.		k.R.		k.R.	n
IRB_446	445,2 > 305,2	-32	445,2 > 165	b	445,2 > 127,0	-38	13,5	n
Metolachlor ESA	k.R.		k.R.		k.R.		k.R.	n
Torasemid	349,1 > 264,1	25	349,1 > 168,2	63	349,1 > 290,1	19	11,1	p
Tramadol	264,1 > 58,1	87	264,1 > 56,0	87			7,6	p
Olmesartan	447,2 > 207,1	35	447,2 > 429,2	15	447,2 > 235,1	27	9,7	p
Sulpirid	342,2 > 112,2	35	342,2 > 214,1	45	342,2 > 84,1	59	3,8	p
Valsartan Säure	265,1 > 164,9	-26	265,1 > 193,0	-23			8,5	n

CE= Kollisionsenergie (eV), p=positiv, n=negativ, k.R.= kein Referenzstandard vorhanden

2.2 Elbewasser

Tabelle 9 Konzentrationen (ng/L) von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in den Proben der untersuchten Elbewasser-Proben sowie die Angabe der Bestimmungsgrenzen (LOQ) und Nachweisgrenzen (LOD) in ng/L. MW = Mittelwert, BW = Blindwert

Station	Fipronil		Fipronil-desulfinyl		Fipronil-sulfon	
	Wasser ng/L	MW ng/L	Wasser ng/L	MW ng/L	Wasser ng/L	MW ng/L
BW Elbe 25.4	0,00		0,00		0,00	
ELBE 25.4.14	0,81	0,77	0,27	0,25	0,33	0,32
ELBE 25.4.14	0,73		0,24		0,30	
BW Elbe 6.5.1	0,00		0,00		0,00	
ELBE 6.5.14 L	0,87	0,88	0,39	0,37	0,40	0,39
ELBE 6.5.14 L	0,89		0,36		0,39	
BW Elbe 13.5	0,00		0,00		0,00	
ELBE 13.5.14	0,84	0,86	0,35	0,35	0,38	0,39
ELBE 13.5.14	0,88		0,35		0,41	
BW Elbe 24.6	0,00		0,00		0,01	
Elbe 24.6.13	0,23	0,24	0,09	0,09	0,14	0,16
Elbe 24.6.13	0,25		0,10		0,16	
BW Elbe 29.7	0,01		0,00		0,01	
Elbe 29.7.13	0,41	0,41	0,20	0,20	0,22	0,24
Elbe 29.7.13	0,41		0,20		0,25	
BW Elbe 02.1	0,05		0,00		0,08	
Elbe 02.10.1	0,56	0,60	0,19	0,21	0,32	0,32
Elbe 02.10.1	0,63		0,23		0,32	
BW Elbe 03.1	0,01		0,00		0,00	
Elbe 03.12.20	0,69	0,68	0,07	0,08	0,19	0,23
Elbe 03.12.20	0,68		0,09		0,28	
LOQ (ng/L)		0,08		0,08		0,04
LOD (ng/L)		0,04		0,04		0,02

Tabelle 10 Messdaten zur Bestimmung von Mittelwert (MW) und Wiederfindung (WDF %) von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in Elbewasser-Proben. STAW = Standardabweichung

Probe	Fipronil		Fipronil-desulfinyl		Fipronil-sulfon	
	Konz. (ng/L)	Diff (Spike-Probe) (ng/L)	Konz. (ng/L)	Diff (Spike-Probe) (ng/L)	Konz. (ng/L)	Diff (Spike-Probe) (ng/L)
BW ELBE 8.12.14	0,00		0,00		0,00	
ELBE_1 8.12.14	0,93		0,10		0,31	
ELBE_2 8.12.14	0,93		0,11		0,30	
ELBE_3 8.12.14	0,96		0,11		0,33	
ELBE_4 8.12.14	0,88		0,11		0,32	
MW	0,92		0,11		0,32	
ELBE_1 8.12.14 +Spike	3,34	2,42	0,12		0,36	
ELBE_2 8.12.14 +Spike	3,45	2,53	2,32	2,21	2,39	2,28
ELBE_3 8.12.14 +Spike	3,42	2,50	2,41	2,30	2,32	2,21
ELBE_4 8.12.14 +Spike	3,29	2,37	2,36	2,25	2,40	2,29
BW ELBE 21.1.15	0,00		0,00		0,00	
ELBE_1 21.1.15	0,56		0,04		0,23	
ELBE_2 21.1.15	0,55		0,05		0,23	
MW	0,55		0,05		0,23	
ELBE_2 21.1.15+Spike	3,06	2,51	2,26	2,21	2,22	1,99
ELBE_3 21.1.15+Spike	2,98	2,43	2,24	2,19	2,27	2,04
ELBE_4 21.1.15+Spike	2,93	2,38	2,20	2,15	2,24	2,01
ELBE_5 21.1.15+Spike	3,01	2,46	2,34	2,29	2,37	2,14
MW		2,4		2,2		2,1
STAW		0,1		0,1		0,1
WDF (%)		97,8		89,3		85,5
STAW (WDF%)		2,4		2,2		5,1

2.3 Fipronil und Fipronil-Transformationsprodukte

Tabelle 11 Datum und Uhrzeit der Elbewasser-Probenahme sowie der zugehörige Elbe-Pegelstand (m) und -Abflussrate (m^3/s) als auch die gemessenen Konzentrationen (ng/L) von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon und dem Quotienten aus der Fipronil-, Fipronil-sulfon-Konzentration und dem Pegelstand h (ng/L*m).

Datum	Zeit (Wasserprobe)	Pegel [m]	Abfluss [m ³ /s]	Fipronil [ng/L]	Fipronil-desulfinyl [ng/L]	Fipronil-sulfon [ng/L]	Fipronil / Pegel [ng/(L*m)]	Fipronil-sulfon / Pegel [ng/(L*m)]
24.06.13	16:00	7,55	2134,00	0,24	0,10	0,16	0,03	0,02
29.07.13	15:00	3,87	467,00	0,41	0,20	0,24	0,11	0,06
02.10.13	8:30	3,42	515,00	0,60	0,21	0,32	0,18	0,09
03.12.13	9:30	3,68	619,00	0,69	0,08	0,23	0,19	0,06
29.04.14	10:30	3,7	370,00	0,77	0,25	0,32	0,21	0,09
06.05.14	16:45	4,2	372,00	0,88	0,37	0,39	0,21	0,09
13.05.14	9:30	3,94	360,00	0,86	0,35	0,39	0,22	0,10
08.12.14	11:30	4,17	372,01	0,92	0,11	0,32	0,22	0,08
21.01.15	10:00	3,84	1340,00	0,55	0,05	0,23	0,14	0,06

Tabelle 12 Konzentrationen (pg/L) von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in den Proben der verschiedenen Nordsee-Messstationen sowie deren prozentualen Anteile (%) an der Summenkonzentration, sowie die Angabe Bestimmungsgrenze (LOQ) und Nachweisgrenze (LOD) in pg/L.

Messstation	Fipronil [pg/L]	Fipronil-desulfinyl [pg/L]	Fipronil-sulfon [pg/L]	Summe [pg/L]	Fipronil (%)	Fipronil-desulfinyl (%)	Fipronil-sulfon (%)
EIDER	8,6	69,4	53,0	131,0	6,5	53,0	40,5
HELGO	23,1	79,1	61,8	164,0	14,1	48,2	37,7
Sylt 1	7,8	64,7	45,5	117,9	6,6	54,8	38,6
ES1	4,4	54,1	37,5	96,0	4,6	56,3	39,1
DTEND	< LOQ	< LOQ	< LOQ				
LOQ [pg/L]	6,6	3,5	2,1				
LOD [pg/L]	2,6	1,8	1,1				

Tabelle 13 Messdaten zur Bestimmung von Mittelwert (MW) und Wiederfindung (WDF %) von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in Nordseewasser-Proben. STAW = Standardabweichung

Probe	Fipronil		Fipronil-desulfinyl		Fipronil-sulfon	
	Konz. (ng/L)	Diff (Spike-Probe) (ng/L)	Konz. (ng/L)	Diff (Spike-Probe) (ng/L)	Konz. (ng/L)	Diff (Spike-Probe) (ng/L)
GNO 29_1	0,00	0,00	0,00		0,00	
GNO 29_2	0,00	0,00	0,00		0,00	
GNO 29_1 Spike	0,96	0,96	0,94	0,94	0,91	0,90
GNO 29_2 Spike	1,03	1,03	0,98	0,98	1,00	1,00
GNO 29_3 Spike	0,98	0,98	0,96	0,95	0,95	0,95
GNO 29_4 Spike	1,05	1,05	1,01	1,01	0,93	0,93
GNO 29_5 Spike	1,02	1,02	0,95	0,95	0,89	0,89
GNO 29_6 Spike	1,01	1,01	1,01	1,01	0,92	0,92
MW		1,0	1,0	1,0	0,9	0,9
STAW		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
WDF (%)		100,9	97,5	97,1	93,3	93,1
STAW (WDF %)		3,2		3,0		3,9

2.4 Aalproben

Tabelle 14 Konzentrationen von Fipronil, Fipronil-desufinyl und Fipronil-sulfon (ng/g) in den untersuchten Aal-Proben bezogen auf das Nassgewicht (NG), Trockengewicht (TG) und Fettgewicht (FG). M = Muskel, L = Leber, n.d. = nicht detektiert

Probe	Fipronil			Fipronil-sulfon			Fipronil-desufinyl		
	Konz. [ng/g] TG	Konz. [ng/g] NG	Konz. [ng/g] FG	Konz. [ng/g] TG	Konz. [ng/g] NG	Konz. [ng/g] FG	Konz. [ng/g] TG	Konz. [ng/g] NG	Konz. [ng/g] FG
L2401	3.72	1.06	12.09	53.43	15.21	173.86	n.d.	n.d.	n.d.
L2402	0.47	0.16	1.13	49.47	17.30	119.39	n.d.	n.d.	n.d.
L2403	3.65	1.19	8.00	57.61	18.83	126.35	n.d.	n.d.	n.d.
L2406	8.29	1.96	36.71	75.29	17.80	333.22	n.d.	n.d.	n.d.
L2409	1.42	0.38	5.87	49.53	13.11	204.85	n.d.	n.d.	n.d.
L2410	4.60	1.37	14.59	73.56	21.86	233.07	n.d.	n.d.	n.d.
L2411	2.96	0.90	9.20	77.09	23.46	239.77	n.d.	n.d.	n.d.
L2412	1.76	0.47	6.27	76.00	20.09	270.86	n.d.	n.d.	n.d.
L2413	0.38	0.09	1.54	39.33	9.74	161.00	n.d.	n.d.	n.d.
L2414	1.22	0.43	3.54	96.62	34.37	281.22	n.d.	n.d.	n.d.
L3470	0.84	0.22	3.56	60.60	15.95	257.03	n.d.	n.d.	n.d.
L3471	2.53	0.74	10.50	151.15	44.29	626.71	n.d.	n.d.	n.d.
L3472	2.87	0.84	9.31	23.25	6.83	75.29	n.d.	n.d.	n.d.
M2409	0.28	0.13	0.44	9.20	4.25	14.43	0.29	0.13	0.45
M2410	0.26	0.11	0.41	7.64	3.35	12.29	0.20	0.09	0.32
M2413	0.09	0.04	0.14	5.47	2.37	8.64	0.20	0.09	0.32
M3470	0.75	0.32	1.22	5.91	2.55	9.64	0.08	0.04	0.13
M3471	0.14	0.05	0.28	1.55	0.52	3.01	0.05	0.02	0.10
M3472	0.27	0.14	0.47	21.28	11.24	36.98	0.09	0.05	0.15

Tabelle 15 Fettanteil (%) der Muskel- und Leberproben. n.m = nicht gemessen

Probe	Fett % (Leber)	Fett % (Muskel)
2401	8.8	n.m.
2402	14.5	n.m.
2403	14.9	n.m.
2406	5.3	n.m.
2409	6.4	29.5
2410	9.4	27.2
2411	9.8	n.m.
2412	7.4	n.m.
2413	6.1	27.4
2414	12.2	26.5
3470	6.2	17.4
3471	7.1	30.4
3472	9.1	n.m.

Tabelle 16 Messdaten für die Bestimmung der Wiederfindung (WDF %) von Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon in Aalmuskel- und Leberproben.

Fipronil					Fipronil-desulfinyl					Fipronil-sulfon							
Probe	Einwaage (g)	Konz. (ng/ml)	Absolut (ng)	Konz. (ng/g)	Sollkonz. (ng/g)	Probe	Einwaage (g)	Konz. (ng/ml)	Absolut (ng)	Konz. (ng/g)	Sollkonz. (ng/g)	Probe	Einwaage (g)	Konz. (ng/ml)	Absolut (ng)	Konz. (ng/g)	Sollkonz. (ng/g)
L3470 1:10	0,50	0,01	0,42	0,84		M2409 1:10	1,98	0,02	0,66	0,33		L3470 1:10	0,50	1,01	30,30	60,60	
L3470 spike 1:10	0,41	0,17	5,04	12,23	12,98	M2409 spike	2,02	0,20	5,85	2,89	2,81	L3470 spike 1	0,41	1,14	34,20	83,01	84,87
Diff				11,39		Diff				2,56		Diff				22,41	
DiffSoll				12,14		DiffSoll				2,47		Soll				24,27	
% WDF				94,27		% WDF				103,10		% WDF				97,81	
L3471 1:10	0,52	0,04	1,31	2,53		M2410	2,10	0,14	0,41	0,20		L3471 1:10	0,52	2,62	78,60	151,15	
L3471 spike 1:10	0,43	0,21	6,15	14,30	14,15	M2410 spike	2,19	1,89	5,67	2,59	2,48	L3471 spike 1	0,43	2,57	77,10	179,30	174,41
Diff				11,78		Diff				2,39		Diff				28,15	
DiffSoll				11,63		DiffSoll				2,28		Soll				23,26	
% WDF				101,04		% WDF				104,40		% WDF				102,81	
L2401 1:10	0,52	0,06	1,92	3,72		M2410 1:10	2,10	0,01	0,44	0,21		L2401 1:10	0,52	0,92	27,57	53,43	
L2401 spike 1:10	0,51	0,25	7,41	14,64	13,60	M2410 spike	2,19	0,19	5,67	2,59	2,49	L2401 spike 1	0,51	1,14	34,20	67,59	73,19
Diff				10,93		Diff				2,38		Diff				14,16	
DiffSoll				9,88		DiffSoll				2,28		Soll				19,76	
% WDF				107,71		% WDF				103,81		% WDF				92,34	
L2413 1:10	0,55	0,01	0,25	0,45		M2410 Bprot	1,89	0,01	0,36	0,19		L2413 1:10	0,55	0,74	22,11	40,27	
L2413 spike 1:10	0,51	0,17	4,98	9,82	10,31	M2410 spike	2,19	0,19	5,67	2,59	2,47	L2413 spike 1	0,51	0,94	28,23	55,68	60,00
Diff				9,38		Diff				2,40		Diff				15,41	
DiffSoll				9,86		DiffSoll				2,28		DiffSoll				19,72	
% WDF				95,28		% WDF				104,65		% WDF				92,81	
L2413 Bprobe 1:10	0,52	0,01	0,22	0,43		M2413 1:10	2,15	0,01	0,40	0,18		L2413 Bprobe	0,52	0,67	20,04	38,39	
L2413 spike 1:10	0,51	0,17	4,98	9,82	10,29	M2413 spike	2,07	0,19	5,55	2,68	2,60	L2413 spike 1	0,51	0,94	28,23	55,68	58,11
Diff				9,40		Diff				2,50		Diff				17,29	
DiffSoll				9,86		DiffSoll				2,42		DiffSoll				19,72	
% WDF				95,48		% WDF				103,14		% WDF				95,81	
L2411 1:10	0,52	0,05	1,49	2,85		M2413 Bprot	2,15	0,01	0,32	0,15		L2411 1:10	0,52	1,30	39,00	74,57	
L2411 spike 1:10	0,51	0,24	7,05	13,85	12,87	M2413 spike	2,07	0,19	5,55	2,68	2,56	L2411 spike 1	0,51	1,75	52,50	103,14	94,22
Diff				11,01		Diff				2,53		Diff				28,57	
DiffSoll				9,82		DiffSoll				2,42		DiffSoll				19,65	
% WDF				109,33		% WDF				104,58		% WDF				109,48	
L2411 Bprobe 1:10	0,51	0,05	1,55	3,07								L2411 Bprobe	0,51	1,34	40,20	79,60	
L2411 spike 1:10	0,51	0,24	7,05	13,85	12,89							L2411 spike 1	0,51	1,75	52,50	103,14	99,25
Diff				10,78								Diff				23,54	
DiffSoll				9,82								DiffSoll				19,65	
% WDF				107,42								% WDF				103,92	
L2403 1:10	0,53	0,06	1,94	3,64								L2403 1:10	0,53	1,05	31,50	59,10	
L2403 spike 1:10	0,51	0,22	6,72	13,23	13,48							L2403 spike 1	0,51	1,22	36,60	72,05	78,78
Diff				9,59								Diff				12,95	
DiffSoll				9,84								DiffSoll				19,69	
% WDF				98,14								% WDF				91,45	
L2403 Bprobe 1:10	0,54	0,07	1,98	3,66								L2403 Bprobe	0,54	1,01	30,30	56,11	
L2403 spike 1:10	0,51	0,22	6,72	13,23	13,50							L2403 spike 1	0,51	1,22	36,60	72,05	65,95
Diff				9,57								Diff				15,94	
DiffSoll				9,84								DiffSoll				9,84	
% WDF				97,96								% WDF				109,24	
M2409	1,98	0,18	0,55	0,28								M2409 1:10	1,98	0,61	18,21	9,20	
M2409 spike	2,02	1,96	5,88	2,91	2,75							M2409 spike	2,02	0,92	27,57	13,64	14,15
Diff				2,63								Diff				4,44	
DiffSoll				2,47								DiffSoll				4,95	
% WDF				105,88								% WDF				96,41	
M2410	2,10	0,18	0,54	0,26								M2410 1:10	2,10	0,57	17,01	8,08	
M2410 spike	2,19	1,92	5,76	2,63	2,54							M2410 spike	2,19	0,96	28,83	13,16	12,65
Diff				2,37								Diff				5,08	
DiffSoll				2,28								DiffSoll				4,57	
% WDF				103,56								% WDF				104,06	
M2413	2,15	0,07	0,20	0,09								M2413 1:10	2,15	0,41	12,15	5,65	
M2413 spike	2,07	1,91	5,73	2,77	2,51							M2413 spike	2,07	0,74	22,23	10,74	10,48
Diff				2,68								Diff				5,09	
DiffSoll				2,42								DiffSoll				4,83	
% WDF				110,45								% WDF				102,50	
M2410 Bprobe	1,89	0,18	0,16	0,08								M2410 Bprot	1,89	0,51	15,15	8,03	
M2410 spike	2,19	1,92	5,76	2,63	2,37							M2410 spike	2,19	0,96	28,83	13,16	12,59
Diff				2,55								Diff				5,14	
DiffSoll				2,28								DiffSoll				4,57	
% WDF				111,10								% WDF				104,52	
M2413 Bprobe	2,15	0,06	0,18	0,09								M2413 Bprot	2,15	0,38	11,37	5,30	
M2413 spike	2,07	1,91	5,73	2,77	2,50							M2413 spike	2,07	0,74	22,23	10,74	10,13
Diff				2,68								Diff				5,44	
DiffSoll				2,42								DiffSoll				4,83	
% WDF				110,67								% WDF				106,00	

2.5 Toxizitätsbewertung

Tabelle 17 Toxizitätsdaten für Fipronil, Fipronil-desulfinyl und Fipronil-sulfon [80].

Testorganismus	Fipronil	Fipronil-desulfinyl	Fipronil-sulfon	Toxizitätspunkt	Quelle
<i>Daphnia magna</i>	EC ₅₀ = 190 µg L ⁻¹		EC ₅₀ ~ 28.8 µg L ⁻¹ (factor 6.6 reported)	Not specified	(USEPA 1996)
<i>Mysid shrimp (estuarine)</i>	EC ₅₀ = 0.14 µg L ⁻¹		LOEC = 5 ng L ⁻¹	Survival, reproduction, growth	
<i>Bluegill sunfish (Lepomis macrochirus)</i>	LC ₅₀ (96 h) = 83 µg L ⁻¹		LC ₅₀ (96 h) ~ 25 µg L ⁻¹ (factor 3.3 reported)	Death	
<i>Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)</i>	LC ₅₀ (96 h) = 246 µg L ⁻¹		LC ₅₀ (96 h) ~ 39 µg L ⁻¹ (factor 6.3 reported)	Death	
<i>Adult Grass shrimp (P. pugio)</i>	LC ₅₀ (96 h) = 0.32 µg L ⁻¹			Death	(Key et al., 2003)
<i>Larvae Grass shrimp (P. pugio)</i>	LC ₅₀ (96 h) = 0.68 µg L ⁻¹			Death	
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	LC ₅₀ (48 h) = 17.7 µg L ⁻¹	LC ₅₀ (48 h) = 355 µg L ⁻¹		Death	(Konwick et al., 2005)
<i>Daphnia pulex</i>	LC ₅₀ (48 h) = 15.6 µg L ⁻¹			Death	(Stark and Vargas 2005)
<i>Daphnia magna</i>	EC ₅₀ (48 h) = 42.9 µg L ⁻¹	EC ₅₀ (48 h) > 9 µg L ⁻¹	EC ₅₀ (48 h) = 5.17 µg L ⁻¹	Mobility	(Iwafune et al., 2011)
<i>Cheumatopsyche brevilineata</i>	EC ₅₀ (48 h) = 0.133 µg L ⁻¹	EC ₅₀ (48 h) = 0.1377 µg L ⁻¹	EC ₅₀ (48 h) = 0.066 µg L ⁻¹	Mobility	
<i>Carp (Cyprinus carpio)</i>	EC _{tested} (90 d) = 0.65 µg L ⁻¹ - < LOD within 60 d			Enzyme activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT); Lipid peroxidation	(Clasen et al., 2012)
<i>Fathead minnow (Pimephales promelas)</i>	LC ₅₀ (96 h) = 448.5 µg L ⁻¹			Death	(Baird et al., 2013)
	LC ₅₀ (7 d) = 208 µg L ⁻¹			Death	
<i>Chironomus dilutes</i> (most sensitive out of 14 tested freshwater invertebrates)	EC ₅₀ (96 h) = 0.03 - 0.035 µg L ⁻¹		EC ₅₀ (96 h) = 0.0075 - 0.0079 µg L ⁻¹	Ability to thrash when prodded	(Weston and Lydy 2014)
<i>Juvenil Zebrafish (Danio rerio)</i>	LC ₅₀ (24 h) = 220.4 µg L ⁻¹ EC _{min, tested} (24 h) = 2 µg L ⁻¹			Death Cytochrome P450 activity	(Wu et al., 2014)