

Einsatz einer *Non-target* Methode in der Umweltanalytik

Analytik von endokrinen Wirkstoffen in Oberflächengewässer und Abwasser mittels Direkter Bioautographie

Ines Klingelhöfer und Prof. Dr. Gertrud Morlock

Wasser ist der Ursprung allen Lebens, es ist ein wesentlicher Bestandteil aller lebenden Organismen und ebenso ein wichtiger Lebensraum. Heute sind Grundwasser und Flüsse weltweit mit Industrieabwässern, Arzneimittelrückständen, Schadstoffen aus der Landwirtschaft und der extensiven Tierhaltung belastet.

Der Begründer der Mikrobiologie, Louis Pasteur, postulierte vor über 100 Jahren: „Wir trinken 90% unserer Krankheiten“. Endokrin aktive Substanzen sind ein wesentlicher Teil solcher Kontaminationen in unseren Gewässern. Sie beeinflussen die Gesundheit von Menschen und Tieren, indem sie wesentliche Funktionen des Stoffwechsels, des Wachstums und der Entwicklung steuern und regulieren. Neben den natürlichen Estrogenen, wie 17β -Estradiol (E2) und Estron (E1), gehören auch Weichmacher, Biozide und Pestizide zu den als endokrine Disruptoren (endocrine disrupting compounds, EDC) bezeichneten Substanzen.

Ein Verfahren, um EDCs nachzuweisen, ist der planare Yeast Estrogen Screen (pYES). Dieses bekannte Verfahren, eine Kombination von Bioassay und Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie (HPTLC), wurde 2014 substantiell verbessert [1] und bietet nun die Möglichkeit, einzelne EDCs in komplexen Probenmatrices nachzuweisen und ebenso zu quantifizieren [2]. Durch diese Non-target Methode, die endokrin aktive Substanzen detektiert und anschließend über HPTLC/MS-Kopplung charakterisiert, ist ein breites Screening von EDCs in Umweltproben durchführbar. Über einen Zeitraum von sechs Monaten wurden Proben aus dem Einlauf- und Auslaufbereich einer Kläranlage (Gießen, Hessen) und aus fünf Flüssen in ländlicher Umgebung untersucht. Zu den untersuchten Substanzen gehörten die natürlichen Estrogene E1 und E2 sowie Estron (E3), das synthetische Estrogen 17α -Ethinylestradiol (EE2) und die Xenoestrogene Bisphenol A (BPA) und 4-*n*-Nonylphenol (NP). Als Probenvorbereitung wurde eine Flüssig/Flüssig-Extraktion der ansonsten unbehandelten Proben durchgeführt. Dazu wurden 20 mL der Umweltprobe mit 5 mL *t*-Butylmethylether extrahiert. Der Extrakt wurde im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 250 μ L Methanol aufgenommen. Der Methanol-Extrakt wurde als rechteckige Fläche auf wasserbenetzbaren

Umkehrphasen, sogenannten HPTLC-Platten RP18-W, aufgesprüht. Die rechteckige Auftragefläche bedingte einen Fokussierungsschritt, um die EDCs aus der Matrixfläche zu einer scharfen Startbande zu fokussieren. Danach wurden die EDCs chromatographisch getrennt, und der Bioassay wurde direkt im Chromatogramm auf der HPTLC-Platte durchgeführt. EDCs wurden als scharf umgrenzte, blau fluoreszierende 4-Methylumbelliferon (MU)-Zonen nach 4 h Inkubation im wässrigen Medium detektiert (Abb. 1). Deren Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenzmessung bei UV 366/ $>$ 400 nm. Zur Validierung der Methode wurde die Wiederfindungsrate der sechs EDCs untersucht. Die Präzision der Extraktion wurde mit einer nativen Abwasserprobe (n=7) bestimmt und die Laborpräzision wurde mit der Standardsubstanz E2 in einem Bereich von 20–200 pg/Fläche (n=5) untersucht. Nachweisgrenze (limit of detection, LOD) und Bestimmungsgrenze (limit of quantitation, LOQ) wurden jeweils experimentell ermittelt [3]. LOQs für die untersuchten (Xeno)estrogene lagen in Abhängigkeit von der spezifischen Rezeptorbindungsaffinität der einzelnen EDCs zwischen 1 ng/L bis 15 μ g/L. Die Validierungsdaten [3] belegen die Eignung der Methode, EDCs in Umweltproben im Ultraspurenbereich nachzuweisen. Im weiteren Verlauf der Methodenentwicklung wurde versucht, die Umweltproben ohne vorherige Extraktion zu analysieren. Ein Volumen von 1 mL Wasserprobe wurde direkt auf die HPTLC-Platte rechteckig aufgesprüht (ca. 25 min pro Probe). Dazu wurde die Düsentemperatur auf 60°C eingestellt und die Dosiergeschwindigkeit auf 1200 nL/s beschränkt. Die direkte Probenauftragung war durchführbar, bedarf allerdings noch Verbesserungen hinsichtlich der erzielten LODs/LOQs (im Vergleich zur Extraktion um den Faktor 10 bis 20 höher). Die Charakterisierung der EDCs erfolgte durch (1) den Vergleich der hR_f -Werte von Probe und Standard, (2) Standardaddition, indem Proben- und Standardbahn teilweise überlappend aufgetragen wurden, und (3) direkte Elution der bioaktiven Zone in das Massenspektrometer. Hierbei

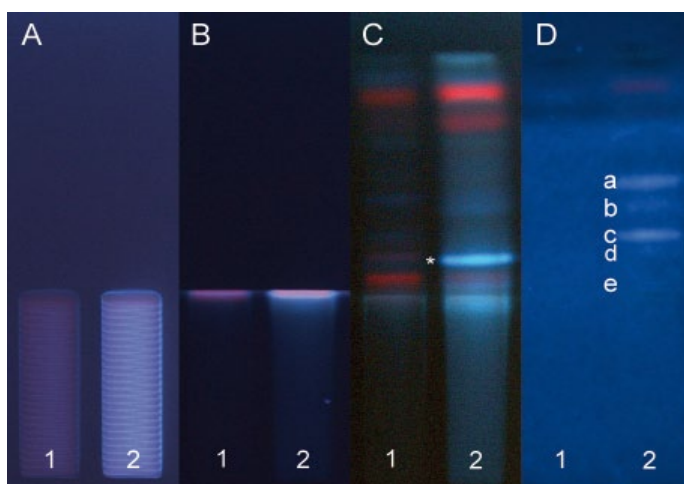


Abb. 1: HPTLC-pYES einer extrahierten Oberflächenwasserprobe (1) und einer extrahierten Kläranlagenprobe (2) nach Sprühauftragung in Rechteckform 7 mm x 25 mm (A), nach zwei Fokussierungsschritten (B), nach Chromatographie (C) und nach dem Bioassay (D): EDCs werden als blau fluoreszierende MU-Zonen a-e detektiert (nativ fluoreszierendeZone* negativ im Bioassay) [3]; reprinted with permission from DOI: 10.1021/acs.analchem.5b03233. © 2015 American Chemical Society

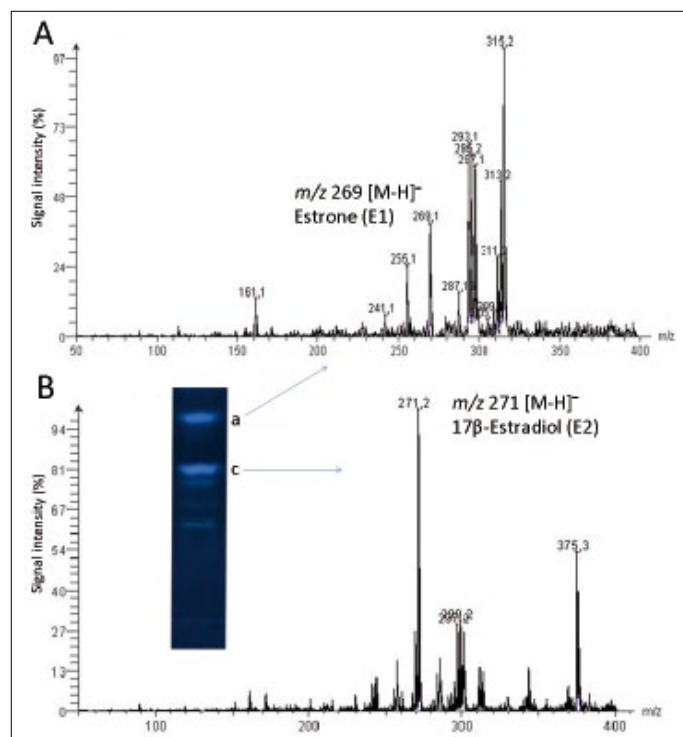


Abb. 2: HPTLC-ESI-MS-Massenspektren der beiden EDC-Zonen a und c in einer extrahierten Kläranlagenprobe: Zuordnung der Zone a als Estron (E1; A) und Zone c als 17β-Estradiol (E2; B) [3]; reprinted with permission from DOI: 10.1021/acs.analchem.5b03233. © 2015 American Chemical Society

wurde der ovale Elutionskopf des TLC-MS-Interfaces auf der Analytzone tief in die modifizierte Kieselschicht gepresst. Die eingeschlossene Analytzone wurde mit einem geeigneten Eluenten (Methanol) in das Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer (ESI-MS) geleitet (Abb. 2). Somit konnten die Estrogene 17β-Estradiol und Estron identifiziert werden. Bei den untersuchten Umweltproben aus dem Einlauf der kommunalen Kläranlage wurde sowohl E1 als auch E2 detektiert, während E3 nur in 60 % der Proben nachgewiesen werden konnte (Abb. 1 D a, c und e). Im Auslauf der Kläranlage wurden weder die untersuchten Estrogene noch die Xenoestrogene gefunden. Bei den analysierten Oberflächengewässern wiesen 50 % der Proben eine Kontamination mit E1 und E2 auf. E3 konnte in keiner der Flussproben detektiert werden. Das synthetische Estrogen EE2 und die Xenoestrogene BPA und NP wurden weder in den Kläranlagen- noch in den Gewässerproben nachgewiesen. Neben den bekannten (Xeno-)Estrogenen wurden im Zulauf der Kläranlage zwei nicht identifizierte EDCs detektiert (Abb. 1 D b und d). Hier zeigt sich der Vorteil dieser Non-target Methode, neben Zielanalyten auch weitere EDCs zu erkennen. Beide unbekannte EDCs werden mittels hochauflösender Massenspektrometrie weitergehend charakterisiert.

Fazit

Dieses direkte bioautographische Verfahren ermöglicht mit nur geringer Probenaufarbeitung und ohne vorherige Auswahl von Zielanalyten ein umfangreiches Screening und Bioprofiling von Umweltproben auf EDCs im Ultraspurenbereich.

[1] Klingelhöfer, I., Morlock, G.E. J Chrom A 1360 (2014) 288-295

[2] Morlock, G.E., Klingelhöfer, I. Anal Chem 86 (2014) 8289-8295

[3] Klingelhöfer, I., Morlock, G.E. Anal Chem, DOI: 10.1021/acs.analchem.5b03233



Autoren | Kontakt

Ines Klingelhöfer und Prof. Dr. Gertrud Morlock

Justus-Liebig-Universität Gießen
 Institut für Ernährungswissenschaften
 Interdisziplinäres Forschungszentrum (IFZ)
 Heinrich-Buff-Ring 26–32 | 35392 Gießen
www.uni-giessen.de/food