

Schlussbericht vom 26.03.2025

zu IGF-Vorhaben Nr. 01IF21954N

Thema

Entwicklung eines Verfahrens für die diskriminierungsarme Anreicherung zur effektdirigierten Analytik von Wasserproben (DA-EDA)

Berichtszeitraum

01.02.2022 - 31.10.2024

Forschungsvereinigung

DVGW - Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches e.V. Technisch-wissenschaftlicher Verein

Forschungseinrichtung(en)

Forschungseinrichtung 1:
IWW - Institut für Wasserforschung gGmbH
Moritzstr. 26, 45476 Mülheim an der Ruhr

Forschungseinrichtung 2:
Institut für Umwelt & Energie, Technik & Analytik e. V. (IUTA)
Bliersheimerstraße 58-60, 47229 Duisburg

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung und Zielsetzung des Projektes.....	3
2. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse.....	5
2.1. Schritt 1: Erweiterung der Biotestbatterie durch Etablierung neuer Testsysteme (AP1.1, FE 1 und FE 2).....	5
2.1.1. Testprinzip und Durchführung der angewendeten Biotests	6
2.1.2. Etablierung zusätzlicher Testsysteme	12
2.2. Schritt 2: Anforderungen und Lösungsmittelverträglichkeit der Biotestbatterie (AP1.2, FE 1 und FE 2).....	16
2.2.1. Zytotoxische und wachstumsinhibierende Effekte von Lösungsmitteln und Ameisensäure.....	18
2.2.2. Mechanismusspezifische Effekte durch Lösungsmittel.....	21
2.2.3. Lösungsmittelbedingte testspezifische Verdünnungsfaktoren	21
2.3. Schritt 3: Blindwertanalyse der Sorbentien (AP3, AP4.1, FE 1 und FE 2) 24	
2.3.1. Vorläufiges Anreicherungsprotokoll	25
2.3.2. Blindwertanalyse mittels Biotests (AP4.1, FE 1 und FE 2)	25
2.3.3. Blindwertanalyse mittels Non-Target Screening (NTS) (AP3, FE 2)....	30
2.3.4. Fazit Blindwertanalyse der Sorbentien	31
2.4. Schritt 4: Erstellung einer Referenzsubstanzliste (AP2, FE 1 und FE 2) .	32
2.5. Schritt 5: Entwicklung und Validierung von LC-MS/MS Target-Methoden zur Quantifizierung der Referenzsubstanzen (FE 1 und FE 2).....	34
2.6. Schritt 6: Optimierung von Wiederfindungen unterschiedlicher Sorbentien, Optimierung des Anreicherungsprotokolls sowie Entwicklung und Herstellung einer Multi-Layer-SPE Kartusche (AP3, FE 1)	39
2.6.1. Charakterisierung von Sorbentien und Optimierung von Wiederfindungen	39

2.6.2.	Entwicklung der DA-EDA-Kartusche und Anpassung des Anreicherungsprotokolls	47
2.6.3.	Herstellung der DA-EDA Kartusche (FE 2).....	48
2.7.	Schritt 7: Wirkungsbezogene Charakterisierung der entwickelten DA-EDA-Kartusche (AP4.2, FE 1 und FE 2).....	49
2.7.1.	Blindwertanalyse der DA-EDA-Kartusche mittels wirkungsbezogener Analytik	50
2.7.2.	Wiederfindung von Effekten in Biotests	50
2.7.3.	Fazit Wiederfindung von Effekten in Biotests	60
2.8.	Schritt 8: Probenstabilität (AP5, FE 2)	61
2.8.1.	Ergebnisse Probenstabilität.....	62
2.9.	Schritt 9: Matrixeinfluss auf die Anreicherung (AP6, FE 2)	67
2.9.1.	Einfluss der Matrix auf die Wiederfindung mit der DA-EDA-Kartusche	67
2.10.	Schritt 10: Verfahrensvalidierung (AP7, FE 2)	70
2.10.1.	Finale Validierung im Biotest und Laborvergleich	70
3.	Fazit und Ausblick	73
4.	Darstellung der durch die Förderung erzielten Ergebnisse im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele.....	76
4.1.	Erhebung von Daten für die gezielte Anwendung der Festphasenextraktion mit effektbasierten Methoden.....	76
4.2.	Optimierung des Anreicherungsverfahrens zur Erreichung einer diskriminierungsarmen Anreicherung und Evaluation geeigneter Sorbentskombinationen	76
4.3.	Anwendung des entwickelten Anreicherungsverfahrens	77
5.	Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten	79
6.	Fortgeschriebener Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft.....	81
6.1.	Information der Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses.....	81

6.2.	Vorstellung der Ergebnisse durch Publikationen, Vorträge und Posterpräsentationen	81
6.3.	Auflistung aller durchgeführten, sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen	81
6.4.	Einschätzung zur Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzepts	83
7.	Verwendung der Zuwendung	85
7.1.	Forschungsstelle (FE 1).....	85
7.1.1.	Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)	85
7.1.2.	Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans).....	85
7.1.3.	Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans)	85
7.2.	Forschungsstelle (FE 2).....	85
7.2.1.	Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)	85
7.2.2.	Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans).....	85
7.2.3.	Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans)	85
8.	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit.....	86
	Abbildungsverzeichnis	87
	Tabellenverzeichnis	89
	Abkürzungsverzeichnis.....	92
	Literatur	95

Zusammenfassung

Die Bewertung von Oberflächen- und Trinkwasser basiert auf Einzelstoffen und deren Überwachung mittels instrumenteller Einzelstoffanalytik. Mischungseffekte sind auf dieser Grundlage allerdings nicht zu erfassen. Die wirkungsbezogene Analytik (WBA) ermöglicht es Effekte entlang verschiedener Endpunkte sowohl von einzelnen Spurenstoffen als auch von unbekannten Gemischen zu bestimmen. Sie bietet damit ein geeignetes Werkzeug für die ganzheitliche Betrachtung der Wasserqualität.

Bedingt durch die zu geringe Sensitivität vieler WBA-Methoden ist eine vorherige Probenanreicherung im Roh- und Trinkwasserbereich unabdinglich. Bestehende Methoden arbeiten allerdings nicht über den gesamten Polaritätsbereich diskriminierungsfrei, wodurch viele relevante Substanzen während der Anreicherung verloren gehen können. Bestehende Anreicherungsverfahren sind meist nur auf die instrumentelle Analytik ausgerichtet und somit aufgrund spezieller Anforderungen der WBA-Methoden mit diesen nicht kompatibel (Blindwert- und Lösungsmittelproblematik). Methoden, welche wiederum an die WBA angepasst wurden, sind meist nur auf einen bestimmten Endpunkt ausgelegt und erfassen somit nur Stoffe in gewissen Polaritätsfenstern.

Das Ziel des Forschungsvorhabens war die Entwicklung eines speziell an WBA-Methoden angepassten Anreicherungsverfahrens, welches von der Breite der Labore routinemäßig durchgeführt werden kann. Dieses Verfahren sollte ein breites Stoffspektrum möglichst diskriminierungsfrei anreichern um die Grundlage für eine ausreichend sensitive Bestimmung der toxischen Wirkung einer Gesamtprobe zu schaffen.

Im Forschungsprojekt wurde ein Anreicherungsverfahren auf Basis einer Multi-Layer-Festphasenextraktionskartusche entwickelt, welches auf die speziellen Anforderungen der wirkungsbezogenen Analytik abgestimmt wurde und zudem in der chemischen Analytik eingesetzt werden kann. Für die Entwicklung der Multi-Layer-Kartusche, wurden zunächst umfangreiche Blindwertuntersuchungen von potenziell geeigneten Sorbentien durchgeführt. Zudem wurde die Kompatibilität von unterschiedlichen Lösungsmitteln mit den eingesetzten Biotests untersucht. Darauf aufbauend erfolgte die Entwicklung der Multi-Layer Kartusche sowie die Optimierung des Anreicherungsverfahrens in Bezug auf die Wiederfindung ausgewählter Referenzsubstanzen. Die Anwendbarkeit des Verfahrens in der wirkungsbezogenen

Analytik wurde anhand von Wiederfindungsversuchen für einen Großteil der eingesetzten Biotests erfolgreich dargestellt. Erste Studien zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse zeigen, dass speziell die einheitliche Herstellung der Kartuschen noch Verbesserungspotenzial birgt.

Das Verfahren kann für eine Vielzahl an Endpunkten und Biotests eingesetzt werden, wodurch die Notwendigkeit und der Aufwand, für jedes Testsystem und in jedem Labor separate Anreicherungsverfahren zu entwickeln, zu validieren und durchzuführen, entfällt. Durch die Skalierbarkeit des Verfahrens, können unterschiedliche Kartuschenformate hergestellt werden, um den jeweiligen Anforderungen an Anreicherungsfaktoren und benötigten Extraktionsmengen gerecht zu werden. Das Verfahren wurde praxisnah und wirtschaftlich konzipiert, sodass es einfach von Anwendern umgesetzt werden kann.

Das entwickelte Anreicherungsverfahren stellt somit auf dem Gebiet der WBA und für die weiterführende effektdirigierte Analytik eine wesentliche Innovation dar, da bisher kein vergleichbares Verfahren existiert, das eine einheitliche Basis für WBA und instrumentelle Analytik bietet. Auf dieser Basis gelingt eine ganzheitliche effektbasierte Bewertung von Wasserproben, die sichere Aussagen über den Zustand der Wasserqualität ermöglichen. Es trägt maßgeblich dazu bei, die Aussagekraft, Akzeptanz und Vergleichbarkeit wirkungsbezogener Untersuchungen von Wasserproben deutlich zu steigern und Kosten zu senken.

Das Forschungsziel wurde nur teilweise erreicht, da die im Rahmen des Forschungsprojektes durchgeführten Laborvergleichsstudien nur unzureichende Resultate hinsichtlich der Vergleichbarkeit von Ergebnissen lieferten. Dadurch konnte keine abschließende Verfahrensvalidierung vorgenommen werden. Um dies zu erreichen, sollte über maschinelle Fertigung zunächst eine einheitliche Herstellung der Multi-Layer-Kartuschen sichergestellt werden.

1. Einleitung und Zielsetzung des Projektes

Der gesetzlichen Betrachtung von wenigen Einzelstoffen oder Substanzgruppen steht entgegen, dass weltweit über 160 Millionen organische und anorganische Verbindungen bekannt sind [1]. Davon werden etwa 350.000 Substanzen regelmäßig hergestellt und genutzt [2]. In Industrieländern befinden sich davon über 70.000 im täglichen Gebrauch, wodurch sie potentiell in Oberflächengewässer und ins Grundwasser eingetragen werden können. Im Weiteren ist ihr Eintrag über Uferfiltrat und Brunnen in die Trinkwassergewinnung nicht auszuschließen. Diese Stoffe liegen in Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser meist im Ultraspurenbereich ($< 10 \text{ ng/L}$) vor. Aus den bisherigen Datenbanken für registrierte Chemikalien werden allerdings erhebliche Datenlücken in Bezug auf die Gefährdungsanalysen von Mensch und Umwelt ersichtlich [2]. Insbesondere im Hinblick auf die Bildung und der Toxizität von Transformations- und Desinfektionsnebenprodukten, wie sie während der Trink- und Badebeckenwasseraufbereitung sowie der Abwasserreinigung entstehen, herrscht noch erheblicher Forschungsbedarf [3, 4, 5].

Um eine Gefährdung, durch bislang unbekannte Substanzen, für den Menschen über die Aufnahme von Trinkwasser auszuschließen, wird in Deutschland das Konzept des gesundheitlichen Orientierungswertes (GOW-Konzept) angewendet. Sobald teil- oder nicht bewertete Stoffe im Trinkwasser den vorsorglichen GOW von $0,1 \text{ } \mu\text{g/L}$ überschreiten, erfolgt eine toxikologische Bewertung dieser Stoffe durch das Umweltbundesamt (UBA). Um Datenlücken zu schließen, steht dem UBA eine Batterie aus toxikologischen Testsystemen [6] zur Verfügung, um humanrelevante Endpunkte (endokrine Wirkung, Gen-, Immun- und Neurotoxizität, subchronische und chronische Toxizität) abzudecken. In Abhängigkeit der verfügbaren toxikologischen Daten wird dann nach einem Stufenkonzept der GOW zwischen $0,01$ und $3,0 \text{ } \mu\text{g/L}$ für den jeweiligen Stoff abgeleitet [7, 8]. Somit wird durch die Nutzung von *in-vitro* Testsystemen das konventionelle Gefährdungsmanagement dem wissenschaftlichen Fortschritt angepasst. Die bisherige Bewertung von Oberflächen- und Trinkwasser basiert lediglich auf Einzelstoffen für die auf Grundlage toxikologischer Daten unterschiedliche Regelungswerte festgelegt wurden. Diese werden derzeit allerdings ausschließlich mittels instrumenteller Target-Analytik überwacht. Mischungseffekte und die Toxizität der Gesamtprobe werden aktuell nicht betrachtet.

Hier kann die wirkungsbezogene Analytik (WBA) Abhilfe schaffen, welche mittels effektbasierter Methoden (EBM) die Wirkung der Gesamtprobe wiedergibt und somit

auch Effekte von Stoffmischungen abbildet. Für die Überwachung von Oberflächengewässern im Rahmen der EU-WRRL wird der Einsatz einer Batterie aus EBM, welche mehrere relevante Wirkungspfade abdeckt, als sinnvoll erachtet und von der Wissenschaft gefordert [9, 10].

Ein großer Nachteil von einigen EBM ist ihre zu geringe Sensitivität (Empfindlichkeit). Vor diesem Hintergrund ist eine Anreicherung möglichst aller in der Wasserprobe enthaltenen organischen Spurenstoffe notwendig. Bislang existiert kein genormtes oder allgemein anerkanntes diskriminierungsfreies Anreicherungsverfahren. Bestehende Anreicherungsverfahren sind meistens nur auf die Zwecke der instrumentellen Analytik für ein zuvor spezifiziertes Stoffspektrum ausgerichtet. Für umfassende instrumentelle als auch wirkungsbezogene Analysen mit unterschiedlichen toxikologischen Endpunkten sind derzeit immer mehrere spezifische Anreicherungsverfahren erforderlich. Dies führt zu einem erheblichen Aufwand in puncto Zeit sowie technischer und personeller Ressourcen. Zudem gibt es bislang keine Erkenntnisse darüber, ob die Ergebnisse der gleichen EBM durch die Verwendung unterschiedlicher Anreicherungsverfahren in den jeweiligen Laboren überhaupt vergleichbar sind. In der wissenschaftlichen Literatur sind ebenso wie in Normen derzeit nur individuelle Verfahren zu finden, die einen Vergleich der erzielten Daten erschweren oder gar unmöglich machen.

Das Ziel des Projektes war es deshalb, ein speziell an die Methoden der wirkungsbezogenen Analytik angepasstes und für die effektdirigierte Analytik geeignetes, diskriminierungsarmes Anreicherungsverfahren für Roh- und Trinkwasser zu entwickeln. Auf Grundlage chemischer und toxikologischer Analysen sollte dazu eine für Festphasenextraktion (SPE) geeignete Sorbentskombination ermittelt werden, welche in verschiedenen Formaten als Multi-Layer-SPE im Labor, als auch für eine vor-Ort Anreicherung eingesetzt werden kann. Das Verfahren sollte eine möglichst diskriminierungsarme Anreicherung eines breiten Stoffspektrums für unterschiedliche toxikologische Endpunkte, als auch für die instrumentelle Einzelstoffanalytik ermöglichen. Ein solches Verfahren schafft die notwendige Grundlage für eine ausreichend sensitive Bestimmung der toxischen Wirkung einer Gesamtwasserprobe und ermöglicht eine sichere Aussage über (Un)Bedenklichkeit der untersuchten Wässer für Mensch und Umwelt. In der Verwendung für die effektdirigierte Analytik (EDA) trägt das Verfahren maßgeblich zur Identifizierung bisher unbekannter und toxikologisch relevanter Substanzen bei.

2. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

Aufgrund der Quervernetzung von einzelnen Arbeitspaketen wird der weitere Bericht zur besseren Übersicht chronologisch in Arbeitsschritte eingeteilt.

2.1. Schritt 1: Erweiterung der Biotestbatterie durch Etablierung neuer Testsysteme (AP1.1, FE 1 und FE 2)

Um insbesondere die humanrelevanten Endpunkte (endokrine Wirkung, Gen-, Immun- und Neurotoxizität, subchronische und chronische Toxizität) abzudecken, welche auch bei der Bewertung von Stoffen im Trinkwasser nach dem GOW-Konzept herangezogen werden, wurde eine (in-vitro) Biotestbatterie zusammengestellt und durch die Forschungseinrichtungen etabliert, welche sich an dem in der BMBF-Fördermaßnahme RiSKWa entstandenen Leitfaden „Gefährdungsbasiertes Risikomanagement für anthropogene Spurenstoffe zur Sicherung der Trinkwasserversorgung (ToxBox)“ [6] orientiert. Im Zuge der neuen Trinkwassereinzugsgebieteverordnung [11] treten auch die Rohwässer (Grundwasser, Oberflächenwasser) stärker in den Fokus des Risikomanagements, wodurch die Biotestbatterie durch einige für diese Matrices relevante und geeignete Tests ergänzt wurde. So wurden beispielsweise für die endokrinen Endpunkte neben humanzellbasierten Assays auch hefezellbasierte Tests in die Untersuchungen einbezogen. Die humanzellbasierten Assays zeichnen sich durch eine höhere Empfindlichkeit aus, wohingegen die hefezellbasierten Tests robuster gegenüber zytotoxischen Effekten sind. Somit sind erstgenannte besonders für den Trinkwasserbereich und letztere eher für stärker belastete Wässer geeignet.

Die Biotestbatterie wurde dementsprechend zu Projektbeginn an beiden Forschungseinrichtungen um zusätzliche Endpunkte erweitert. In Tabelle 1 ist die gesamte Biotestbatterie nach Endpunkten aufgegliedert dargestellt. Ein Großteil der relevanten Testsysteme wurde bereits routinemäßig an den beiden Forschungseinrichtungen angewandt. Zur Erfassung weiterer hormoneller Effekte erfolgte am IWW die Etablierung der Reporterassays GR- und TTR-TRß-CALUX (CALUX = Chemical Activated LUCiferase gene eXpression der Firma Bio Detection System). Diese Assays ermöglichen es neben glukokortikoiden Effekten auch Effekte von Per- und polyfluorierte Alkylverbindungen (PFAS) auf die Transkription Rezeptor-abhängiger Gene zu bestimmen. Am IUTA wurde der A-YGS- und der A-YPS-Assay zur Bestimmung der glukokortikoiden und progestagenen Aktivität etabliert. Zusätzlich

wurde am IUTA der Leuchtbakterien-Test als schnelles Screening-Verfahren zum Nachweis der allgemeinen Toxizität etabliert. Im folgenden Kapitel wird für jeden Biotests eine Kurzfassung des Testprinzips und der Durchführung aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht über die im Projekt eingesetzten Biotests

Endpunkt	IWW	IUTA
Zytotoxizität	MTT-Test (Mitochondrien Aktivität)	
Allgemeine Toxizität		Leuchtbakterien-Test (Metabolismus-Hemmung)
Gentoxizität	in-vitro Mikrokern-Test (DNA-Schädigung) umu-Test (Aktivierung des DNA-Reparatursystems)	
Mutagenität	Ames-Fluktuationstest (Irreversible Erbgutveränderung/Mutation)	
Neurotoxizität		Acetylcholinesterase-Test (Enzymhemmung)
Endokrine Wirkung	ER-, AR-, GR-, TTR-TRß-CALUX (in humanen U2OS-Zelllinien)	A-YES, A-YAS, A-YGS, A-YPS (in <i>Arxula</i> -Hefe-Zelllinien)

2.1.1. Testprinzip und Durchführung der angewendeten Biotests

2.1.1.1. Zytotoxizität – MTT-Test

Die Methode beruht auf der Reduktion des löslichen, gelben Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT) zu einem blau-violetten, unlöslichen Formazan. Da die Reduktion des MTT nur in lebenden Zellen stattfindet, ist eine verringerte metabolische Aktivität ein Maß für die allgemeine Zellschädigung (Zytotoxizität). Der MTT-Test wird in der Regel als Vorläufer-Test herangezogen, um eine zytotoxische Wirkung der jeweiligen Probe auf die eingesetzten humanen Zelllinien auszuschließen. Dadurch wird eine Überlagerung des eigentlichen Endpunktes durch zytotoxische Wirkungen und somit die Wahrscheinlichkeit für falsch negative Ergebnisse reduziert.

Die Aktivität der Zellen in einer Probe wird mit der Aktivität von Zellen verglichen, die parallel in geeignetem Medium getestet wurden (Negativkontrolle). Wenn die Anzahl lebender Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle auf < 80 % reduziert ist, weist die Probe ein schwach zytotoxisches Potential auf. Parallel dazu wurde Dimethylsulfoxid (10 %, DMSO) als Positivkontrolle und Zellkulturwasser als Lösungsmittelkontrolle getestet.

Nach Aussaat der Zellen in 96-well Mikrotiterplatten wurden diese gegenüber den Proben für 24 Stunden exponiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit MTT versetzt. Nach zweistündiger Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Absorption bei 595 nm gemessen.

2.1.1.2. Allgemeine Toxizität - Leuchtbakterientest

Der Leuchtbakterientest (DIN EN ISO 11348), auch bekannt als Biolumineszenztest, basiert auf der Fähigkeit des Bakteriums *Aliivibrio fischeri* Biolumineszenz zu erzeugen, wenn sie aktiv sind. Es enthält ein Gen, welches das Enzym Luciferase codiert, das Lumineszenz als Nebenprodukt einer biochemischen Reaktion erzeugt. In der Testdurchführung wird die Bakterienkultur mit der zu testenden Probe 30 Minuten inkubiert. Enthält die Probe Schadstoffe oder andere Substanzen, die das Bakterium beeinflussen, kann dies die Lumineszenz beeinträchtigen. Die Menge des emittierten Lichts wird dann mit einem Mikroplattenleser zu Beginn und zum Ende der Inkubation erfasst. Eine Abnahme der Lichtemission weist auf eine Hemmung der Enzymaktivität hin und deutet somit auf die Präsenz toxischer Substanzen in der Probe hin. Der Leuchtbakterientest ist besonders zur schnellen und sensitiven Detektion toxischer Stoffe nützlich.

2.1.1.3. Gentoxizität - in-vitro Mikrokern-Test

Der *in-vitro* Mikrokerntest wurde in Anlehnung an die OECD-Richtlinie Nr. 487 mit eukaryotischen HepG2-Zellen durchgeführt. Mit dem *in-vitro* Mikrokern-Test lassen sich DNA-Schäden wie Chromosomenschäden (klastogener Effekt) und Schäden des Spindelapparates (aneugener Effekt) durch Einwirkung gentoxischer bzw. mutagener Substanzen nachweisen. Mikrokerns stellen, von einer eigenen Kernmembran umschlossene, Chromosomen-Bruchstücke oder ganze Chromosomen dar, welche während der Zellteilung nicht in den eigentlichen Zellkern integriert wurden. Die Mikrokerns können mit Hilfe einer DNA-Färbung detektiert werden. Bei einer signifikanten Erhöhung der Mikrokernfrequenz in den behandelten Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle, ist von einer genotoxischen Wirkung der Probe auszugehen. Als Positivkontrolle wird Mitomycin C verwendet.

Um zu analysieren, ob eine Probe ein gentoxisches Potenzial aufweist, wurden die gemittelten Mikrokernraten jeder Probe mit der der parallel getesteten Negativkontrolle auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Dazu wurden die Ergebnisse mit dem Chi2-Test (nicht-parametrisch, zweiseitig, $\alpha = 0.05$) untersucht. Die Nullhypothese,

welche getestet wurde, lautet: Die Proben zeigen im Vergleich zur Negativkontrolle keine Abweichung in der Mikrokernrate. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 10.

2.1.1.4. Gentoxizität - umu-Test

Der umu-Test erfolgt mit dem gentechnisch veränderten Bakterium *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 (Moltox, USA) und wird nach DIN EN ISO 38415-T3 1996-12 durchgeführt [29]. Das Testsystem erfasst primäre DNA-Schäden in bakteriellen Zellen, durch die Aktivierung des SOS-Reparatursystems der Bakterien. Gentoxine induzieren die Transkription des sogenannten umuC-Gens, das zum SOS-Reparatursystem der Zelle gehört und somit dazu beiträgt, einer Schädigung der bakteriellen Erbsubstanz entgegenzuwirken. Durch die Kopplung des umuC-Gens mit dem lacZ-Gen, welches das Enzym β -Galaktosidase kodiert, kann die Aktivierung des umuC-Gens durch enzymatische Spaltung von o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG) als Farbstoffwechsel direkt nachgewiesen werden. Da das umuC-Gen an allen wesentlichen Schritten der bakteriellen Mutagenese beteiligt ist, können mit einem einzigen Testsystem unterschiedlichste DNA-Schäden detektiert werden. Die detektierbaren DNA-Schäden können von reversibler oder irreversibler Natur sein. Der Test ist somit ein Indikator test für die gentoxische Wirkung einer Probe, welche nicht zwingend auch eine mutagene Wirkung hervorruft. Er liefert Indizien, ob potentielle Gentoxine, Mutagene oder Kanzerogene in einer Probe enthalten sind.

Da einige Substanzen erst durch deren Metabolisierung aktiv werden, wird der Test zusätzlich unter Zugabe von Leberenzymen (S9) durchgeführt. Bakterien fehlen die entsprechenden Enzyme des Säuerstoffwechsels. Dadurch findet eine in-vitro Metabolisierung der Substanz statt, die es erlaubt auch Metabolite auf ihre gentoxische Wirkung zu untersuchen. Als Positivkontrolle wurde 4-Nitroquinolin N-oxid (4-NQO) im Testansatz ohne S9-Fraktion und Aminoanthracene (2-AA) im Ansatz mit S9-Fraktion eingesetzt.

Nachdem eine Übernachtskultur der Bakterien angesetzt und ein exponentielles Wachstum durch Messungen der optischen Dichte sichergestellt wurde, wurden die Bakterien gegenüber den Proben für 2 Stunden exponiert. Die Exposition erfolgte sowohl mit als auch ohne Rattenleber-Extrakt S9. Um eine Hemmung des Bakterienwachstums durch die Probe auszuschließen, wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm sowohl sofort als auch 2 Stunden nach Inkubation ein Wachstumsfaktor bestimmt. Bei Wachstumsfaktoren unter 0,5 (50%

Wachstumshemmung im Vergleich zur Negativkontrolle) wurden die Ergebnisse nicht gewertet.

Um die Aktivierung des umuC-Gens durch enzymatische Spaltung von o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG) nachzuweisen, erfolgte nach ONPG-Zugabe und Inkubation von 30 Minuten, eine photometrische Bestimmung des Farbumschlags bei 420 nm. Die Induktionsrate (IR) entspricht der Zunahme der Extinktion bei 420 nm gegenüber der Negativkontrolle. Bei einer $IR \geq 1,5$ erfolgte eine signifikant höhere Induktion des umuC-Gens im Vergleich zur Negativkontrolle.

2.1.1.5. Mutagenität – Ames-Fluktuationstest

Der Ames-Fluktuationstest wird nach ISO 11350 durchgeführt [30]. Er dient dem Nachweis mutagener Wirkpotentiale von Testsubstanzen und erfasst irreversible, vererbare DNA-Schäden. Die hier verwendeten Histidin-abhängigen *Salmonella typhimurium* Stämme YG1041 und YG1042 besitzen eine Leseraster- bzw. eine Basenpaarsubstitutionsmutation im Histidin-Operon. Sie sind also nicht in der Lage Histidin selbst zu synthetisieren und können folglich nur auf Histidin-haltigem Medium wachsen. Werden sie nun gegen eine Substanz mit mutagener Wirkung exponiert, revertieren sie durch Basenpaarsubstitution bzw. Leserastermutation zu Histidin-Phototrophen. Die Bakterien können dann wieder auf Histidin freiem Medium wachsen, indem sie ihre Fähigkeit zur Histidinsynthese zurückerlangt haben. Durch den bakteriellen Metabolismus wird der pH-Wert im Medium verringert und eine Farbänderung des Histidin-freien Indikatormediums von lila zu gelb findet statt. In allen gelb gefärbten Wells sind somit Revertanten vorhanden, die durch Mutation die Fähigkeit Histidin zu bilden, wiedererlangt haben. Um eine zytotoxische Wirkung der Proben auszuschließen, wird für den Stamm YG1041 ($\pm$ S9) die optische Dichte bei 595 nm vor und nach 100 Minuten Exposition gegenüber der Probe gemessen. Die Hemmung des Bakterienwachstums im Vergleich zur Kontrolle darf 30 % nicht überschreiten. Die Exposition erfolgte sowohl mit als auch ohne Rattenleber-Extrakt S9, um eine mögliche Metabolisierung der Probeninhaltsstoffe zu berücksichtigen und die Mutagenität gebildeter Metabolite zu prüfen. Als Positivkontrollen wurden für beide Stämme 1-Nitropyren im Testansatz ohne S9-Fraktion und Aminoanthracene im Ansatz mit S9-Fraktion eingesetzt.

Um zu beurteilen, ob eine Probe mutagen wirkt, wird der Induktionsfaktor im Vergleich zur Basislinie der Negativkontrollen bestimmt. Eine Probe wird als eindeutig mutagen

bewertet, wenn dieser Befund wiederholt auftritt und eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung zu Grunde liegt.

2.1.1.6. Neurotoxizität – Acetylcholinesterase-Hemmtest

Der Acetylcholinesterase-Hemmtest basiert auf der Messung der Aktivität des Enzyms Acetylcholinesterase (AChE), das für den Abbau des Neurotransmitters Acetylcholin in Cholin und Essigsäure verantwortlich ist. Im Test wird Acetylthicholin-Iodid als Substrat verwendet, und die enzymatische Reaktion führt zur Bildung von Thicholin und Essigsäure. Ellmans Reagenz (5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure)) ist zusätzlich ein Farbreagenz, das zur Bestimmung der Menge an Thiolen im Test verwendet wird, sodass eine kolorimetrische Messung der Enzymaktivität möglich ist. Wenn Hemmstoffe vorhanden sind, blockieren sie die AChE-Aktivität, was zu einer verminderten Spaltung des Acetylcholins führt. Der Hemmgrad der AChE-Aktivität wird durch den Nachweis der Reaktionsprodukte gemessen. Bei einer Adsorption bei 405 nm in der Mikrotiterplatte kann die Aktivität des Enzyms nach einer Stunde gemessen werden. Die Hemmung wird prozentual ermittelt, indem sie mit einer Referenzreihe verglichen wird, die nur Reinstwasser enthält und somit die volle Enzymaktivität repräsentiert.

2.1.1.7. Endokrine Wirkung - ER-, AR-, GR-, TTR-TRß-CALUX

Die CALUX®-Testsysteme (BioDetection System b.v. Amsterdam, Niederlande) wurden eingesetzt, um Auswirkungen von Substanzen auf das endokrine System von Organismen zu detektieren. Daher wird

en solche Substanzen auch endokrine Disruptoren (ED) genannt. Viele ED sind in der Lage an Rezeptoren des endokrinen Systems zu binden und diese zu aktivieren oder zu blockieren und damit das Hormonsystem von Organismen zu beeinflussen. Die CALUX®-Testsysteme sind in der Lage, solche Stoffe zu identifizieren. CALUX® steht hierbei für Chemical activated luciferase gene expression. Die stabil transfizierten U2OS-Zelllinien (humane Osteosarkom-Zelllinie) sind gentechnisch so verändert, dass sie neben einem Rezeptor ein so genanntes Reporter gen enthalten. Bindet eine endokrin aktive Substanz (Agonist) an den jeweiligen Rezeptor (ER α , AR, GR) in der Zelle, wird daraufhin das entsprechende Gen abgelesen und im Anschluss auch das Reporter gen. Dieses Gen kodiert für das Enzym Luciferase, welches Luciferin unter Erzeugung von Licht umsetzt. Die Leuchtintensität korreliert direkt mit der Menge der an den Rezeptor gebundenen Substanz. Deshalb ist es wichtig das zytotoxische

Effekte durch die Probe ausgeschlossen werden, da es ansonsten zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann. Beim TTR-TR β -CALUX wird die Blockierung des Rezeptors (TR β) durch z.B. PFAS detektiert.

Die Ergebnisse der CALUX®-Testsysteme liefern Äquivalentkonzentrationen der jeweiligen Referenzsubstanz. Sie geben an welche Konzentration der entsprechenden Referenzsubstanz zur identischen Wirkung in der Probe führt.

2.1.1.8. Endokrine Wirkung - A-YES, A-YAS, A-YGS, A-YPS

Die Reportergergenmethode in den Hefezellen *A. adenivorans*, wie zum Beispiel im *Arxula* Yeast Estrogen Screen (A-YES) eingesetzt, basiert auf einem Reportergergen, das nur dann exprimiert wird, wenn ein spezifischer Rezeptor aktiviert wird. In diesem Beispiel werden Hefezellen mit einem Reportergergen ausgestattet, das in Anwesenheit von endokrinen Disruptoren, welche an Estrogen-, Androgen-, Glucocorticoid- oder Progesteronrezeptor binden können, exprimiert wird.

Die grundlegende Durchführung dieser Assays ist dabei identisch: Die Hefezellen sind genetisch verändert, sodass sie das jeweilige Rezeptor-Gen und Reportergergen enthalten. Bei Zugabe von Substanzen, die an die Rezeptoren binden, wird das Reportergergen aktiviert und produziert ein Reporterenzym, die Phytase, welche in den extrazellulären Raum transportiert wird. Nach 22-stündiger Inkubation der Zellen mit den Proben wird der Überstand, der das Reportergergen enthält, von den Hefezellen getrennt und mit dem Substrat p-Nitrophenylphosphat inkubiert (1 Stunde). Die Reaktion zwischen dem Enzym und dem Substrat produziert ein Produkt (p-Nitrophenolat), dessen Menge nach einer alkalischen pH-Wert-Änderung durch Zugabe von Natronlauge kolorimetrisch gemessen werden kann (optische Dichte bei 405 nm). Parallel zur Enzymaktivität muss auch das Zellwachstum kontrolliert werden (optische Dichte bei 620 nm). Das Zellwachstum beeinflusst die Produktion des Reportergergens und könnte andernfalls zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse führen. Damit die Ergebnisse für die weitere Analyse zulässig sind, muss das Zellwachstum mindestens 80% im Vergleich zu Referenzproben, die nur Wasser enthalten, betragen. Der Unterschied bei den verschiedenen Endpunkten liegt in den spezifischen Hormonrezeptoren, jedoch bleibt das Prinzip der Methode – die Messung der Reporterenzymaktivität als Indikator für die Rezeptoraktivierung – in allen Fällen gleich.

2.1.2. Etablierung zusätzlicher Testsysteme

2.1.2.1. Etablierung GR- und TTR-TRß-CALUX (FE 1)

Für die Etablierung des GR- sowie des TTR-TRß-CALUX wurden in jedem Assay voneinander unabhängige Standardkalibrationsreihen getestet. Anschließend wurden unterschiedliche Qualitätskriterien in Bezug auf die jeweiligen Kalibrationsreihen berechnet und mit Literaturangaben verglichen.

Für den GR-CALUX wurden die Qualitätskriterien Bestimmtheitsmaß (R^2), Induktionsfaktor (IF), Z-Faktor, mittlere effektive Wirkkonzentration (EC_{50}) sowie Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenze (BG) berechnet und mit Literaturangaben verglichen (Tabelle 2).

Zusätzlich wurde die Richtigkeit für vier unterschiedliche Konzentrationen der Referenzsubstanz Dexamethason bestimmt. Die Abweichung lag zwischen -2,2 % und -29,2 % vom wahren Wert ($n = 3$). Anschließend wurde die Vergleichspräzision zwischen zwei Labormitarbeiterinnen bestimmt. Die aus den gemessenen Standardreihen berechneten EC_{50} Werte wichen um 16,8 % voneinander ab ($n = 3$). Die Einhaltung der Qualitätskriterien für R^2 , IF und Z-Faktor sowie die geringen Abweichungen des EC_{50} sowie der Richtigkeit und der Vergleichspräzision zeigen, dass der GR-CALUX erfolgreich etabliert werden konnte und zuverlässige Ergebnisse liefert.

Tabelle 2: Qualitätskriterien der Standardkalibrationsreihen im GR-CALUX ($n = 10$) und Vergleich mit Literaturangaben

Qualitätskriterien	Literatur*	Ergebnis	Abweichung [%]
R^2	> 0,98	$0,99 \pm 0,01$	
IF	> 20,0	$55,4 \pm 10,1$	
Z-Faktor	> 0,60	$0,84 \pm 0,11$	
EC_{50} [M] $\pm$ RSD [%]	$9,2E-10 \pm 38,0$	$1,1E-09 \pm 19,5$	19,6
NWG [M] $\pm$ RSD [%]	$6,7E-11$	$6,1E-11 \pm 34,0$	-9,0
BG [M] $\pm$ RSD [%]	$1,2E-10$	$1,1E-10 \pm 30,2$	-9,0

*Herstellerangaben Bio Detection Systems, Amsterdam NL

Für den TTR-TRß-CALUX wurde jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung für die Qualitätskriterien Bestimmtheitsmaß (R^2), Steigung und PC_{80} bestimmt und mit Literaturangaben des Herstellers BioDetection Systems verglichen (Tabelle 3), da für diesen Assay gegenwärtig noch keine allgemeingültigen Akzeptanzkriterien vorliegen. In Abbildung 1 sind die Standardkalibrationsgeraden der Referenzsubstanz PFOA

beispielhaft aufgetragen. Die Bestimmungsgrenze basiert auf der PC80 Konzentration der PFOA Referenzsubstanz sowie den variablen Volumina der angereicherten Proben und des Lösungsmittels, welches für die Rekonstitution des Extraktes verwendet wird. Da unterschiedliche Volumina verwendet wurden, ist ein Vergleich der BG mit den Angaben des Herstellers nicht möglich.

Tabelle 3: Qualitätskriterien der Standardkalibrationsreihen im TTR-TRß-CALUX (n = 12) und Vergleich mit Literaturangaben

Qualitätskriterien	Literatur*	Ergebnis	Abweichung [%]
R²		0,97 ± 0,01	
Steigung		-0,92 ± 0,15	
PC80 [M] ± RSD [%]	4,70E-07 ± 31	4,89E-07 ± 38	3,9
NWG [µg/L]		0,10	
BG [µg/L]		0,31	

* Herstellerangaben Bio Detection Systems, Amsterdam NL

Im Vergleich der PC80 Werte der eigenen Messungen mit denen des Bioassay Entwicklers BioDetection Systems sind lediglich geringe Abweichungen (3,9 %) zu erkennen. Das Bestimmtheitsmaß der Kalibriergeraden liegt im akzeptablen Bereich und zeigt wie die Steigungen der unterschiedlichen Kalibrierkurven nur geringe Standardabweichungen. Da gegenwärtig weitere Akzeptanzkriterien für diesen recht neu entwickelten Biotest fehlen, kann auf Grundlage der hier ermittelten Qualitätskriterien aber von einer hohen Übereinstimmung mit den Daten des Entwicklers ausgegangen und die Etablierung als erfolgreich angesehen werden.

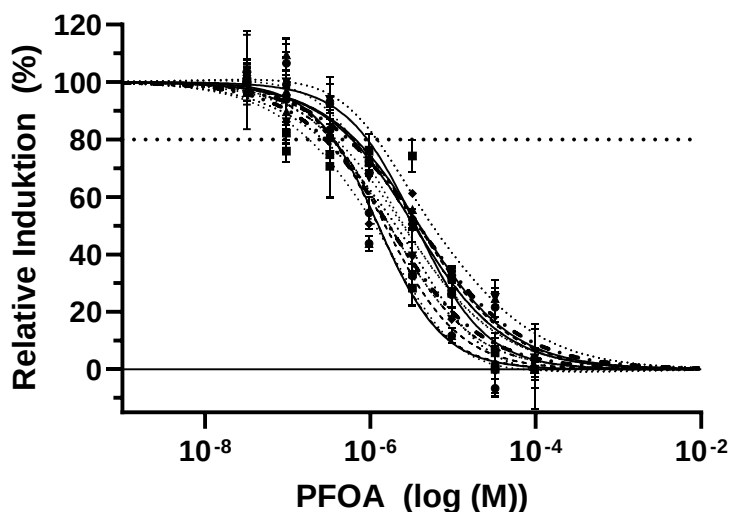


Abbildung 1: Standardkalibrationskurven der Referenzsubstanz PFOA (n = 12) gemessen im TTR-TRß-CALUX

2.1.2.2. Etablierung A-YGS- und der A-YPS-Assay (FE 2)

Zur Etablierung der hormonellen Endpunkte für die Aktivität von Progesteron- und Glukokortikoidrezeptoren wurden zu Beginn drei unabhängige Tests durchgeführt. Dabei kamen unterschiedliche Hefechargen zum Einsatz, die an verschiedenen Tagen mit neu angesetzten Kalibrationsreihen getestet wurden. Die Auswertung der Qualitätskriterien erfolgte mithilfe der Hersteller-Software BioVal (QuoData GmbH, Dresden). Auf Basis der Software wurde die Validität der Tests anhand von Akzeptanzkriterien ermittelt. Die Ergebnisse der Validierung des *Arxula*-Yeast Glucocorticoid Screen (A-YGS) und den *Arxula*-Yeast Progesteron Screen (A-YPS) sind inklusive Akzeptanzkriterien in den Tabellen 4 und 5 dargestellt. Beide Assays erfüllten die Akzeptanzkriterien und wurden somit erfolgreich etabliert. Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) sind spezifische Parameter für die Biotests mit Hefezellen, um das Zellwachstum im Blindwert und die maximale Enzymaktivität der Kalibrationskurve zu kontrollieren. Für die NWG und BG kann auf keine Akzeptanzkriterien referenziert werden. Hier stehen Laborvergleichsuntersuchungen noch aus, um eine Validierungsgrundlage für die noch wenig etablierten Endpunkte zu schaffen. Dies gilt ebenso für den EC50-Wert. Die Werte wurden hier erstmalig systematisch erhoben. Die Ergebnisse sind nachfolgend unter Angabe der Schwankungsbreite der intern durchgeführten Wiederholungen aufgeführt.

Tabelle 4: Qualitätskriterien des *Arxula*-Yeast Glucocorticoid Screens (A-YGS) (n = 3) und Vergleich mit Akzeptanzkriterien. Neben den Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) sind die Messungen der optischen Dichte (OD) spezifische Parameter des Biotests mit Hefezellen (OD620 = Zellwachstum, OD405 = Enzymaktivität).

Qualitätskriterien	Akzeptanzkriterium*	Ergebnis
Optische Dichte des Blindwertes [OD620]	$\leq 1,000$	$0,329 \pm 0,038$
Steigung	$\geq 0,5$	$1,8 \pm 0,2$
EC50 [$\mu\text{g/L}$]	-	112 ± 20
Maximale optische Dichte [OD405]	$\leq 4,00$	$3,67 \pm 0,12$
NWG [$\mu\text{g/L}$]	-	$8,4 \pm 0,70$
Untere BG [$\mu\text{g/L}$]	-	$22,3 \pm 3,9$
Obere BG [$\mu\text{g/L}$]	-	$159,0 \pm 25,0$

*new_diagnostics GmbH, Dresden

Tabelle 5: Qualitätskriterien des *Arxula*-Yeast Progesterone Screens (A-YPS) (n = 3) und Vergleich mit Akzeptanzkriterien. Neben den Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) sind die Messungen der optischen Dichte (OD) spezifische Parameter des Biotests mit Hefezellen (OD620 = Zellwachstum, OD405 = Enzymaktivität).

Qualitätskriterien	Akzeptanzkriterium*	Ergebnis
Optische Dichte des Blindwertes [OD620]	$\leq 1,000$	$0,701 \pm 0,190$
Steigung	$\geq 0,5$	$4,2 \pm 0,2$
EC50 [ng/L]	-	$40,9 \pm 0,5$
Maximale optische Dichte [OD405]	$\leq 4,00$	$3,90 \pm 0,42$
NWG [ng/L]	-	$20,2 \pm 0,7$
Untere BG [ng/L]	-	$22,9 \pm 0,3$
Obere BG [ng/L]	-	$48,1 \pm 4,3$

*new_diagnostics GmbH, Dresden

2.1.2.3. Etablierung Leuchtbakterientest (FE 2)

Die Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission des Bakteriums *Alivibrio fischeri* (Leuchtbakterientest) erfolgte in Anlehnung an DIN EN ISO 11348 [12]. Die ISO 11348 beschreibt den Leuchtbakterientest als Küvettentest. Um die Durchführung in Mikroplatten zu ermöglichen wurde der Test entsprechend angepasst und durchgeführt. Die Durchführung in Mikroplatten ermöglicht die Bearbeitung mehrerer Proben gleichzeitig, sodass der Durchsatz erhöht werden kann. Weitere Vorteile liegen in der Verringerung der Volumina, in der Reduzierung der Kosten und einer erleichterten Automatisierung [13, 14]. Die von der Norm vorgegebenen Akzeptanzkriterien in Bezug auf die Lumineszenzintensität und deren Hemmung wurden dabei erfüllt und sind in Tabelle 6 abgebildet. Die dazugehörige Konzentrations-Wirkungskurve ist in Abbildung 2 dargestellt.

Tabelle 6: Qualitätskriterien zur Validierung des Leuchtbakterien-Tests (n = 3). f_{kt} -Wert = Korrekturfaktor (f_{kt}) aus dem Quotienten der Leuchtintensitäten der Ausgangsmessung (I_0) und der Messung (I_{kt}) nach 30 Minuten.

Qualitätskriterien	Akzeptanzkriterium*	Ergebnis
f_{kt} - Wert	0,60 – 1,30	$0,77 \pm 0,052$
Abweichung der Kontrollansätze [%]	$\leq 3,0 \%$	0,8 %
4,5 mg/L 3,5-Dichlorphenol	Hemmung 20 – 80 %	48 %

*DIN EN ISO 11348-1:2008

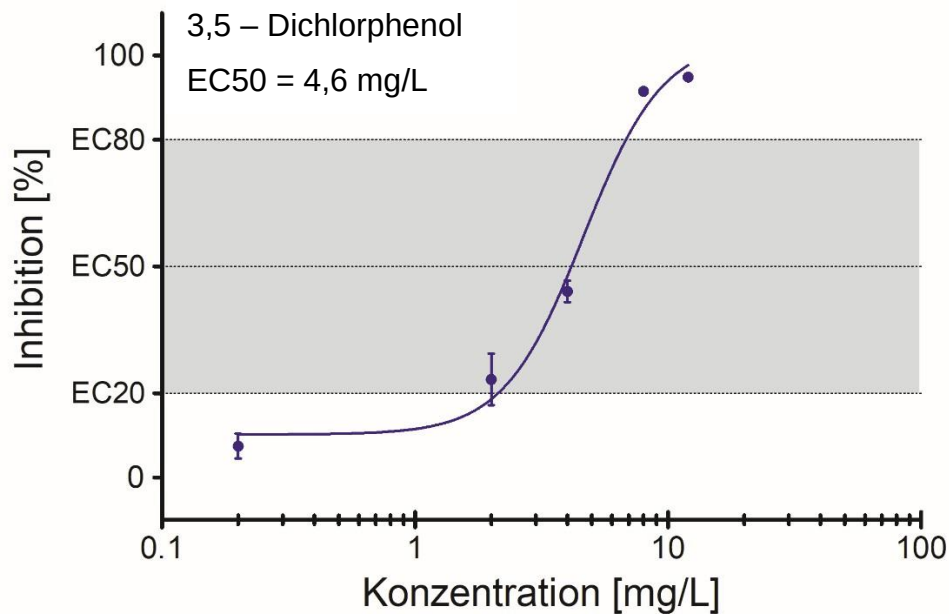


Abbildung 2: Leuchtbakterien-Hemmung in Abhängigkeit zu 3,5-Dichlorphenol mit den Konzentrationen 0,2, 2,0, 4,0, 8,0 und 12,0 mg/L. Jede Konzentration wurde in Dreifachbestimmung gemessen und der Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

2.2. Schritt 2: Anforderungen und Lösungsmittelverträglichkeit der Biotestbatterie (AP1.2, FE 1 und FE 2)

Auf Grundlage der festgelegten Biotestbatterie wurden die unterschiedlichen Anforderungen und Eigenschaften der einzelnen Biotests zusammengetragen, die für die Entwicklung einer Multi-Layer-Festphasenextraktion (Multi-Layer-SPE) von Bedeutung sind. So sind über die Auswahl der Testsysteme die spezifischen Positivkontrollen festgelegt. Diese wurden in die Referenzsubstanzliste (Kapitel 2.4) aufgenommen und dienen letztlich zur Bestimmung von Wiederfindungsraten sowie der Validierung des Anreicherungsverfahrens.

Bei der Testung von Lösungsmittelhaltigen Extrakten (z. B. aus der SPE) bestimmt in der Regel die Toleranz des verwendeten Organismus gegenüber dem verwendeten Lösungsmittel im Extrakt, wie stark ein Extrakt im Biotest mindestens verdünnt werden muss, ohne dass es zu Lösungsmittelbedingten Effekten kommt. Deshalb wurden für die eingesetzten Biotests Lösungsmittelbedingte testspezifische Verdünnungsfaktoren (Kapitel 2.2.3) ermittelt. Dazu wurden sowohl zytotoxische und wachstumsinhibierende (Kapitel 2.2.1) als auch mechanismusspezifische Effekte durch die Lösungsmittel selbst bzw. etwaiger Verunreinigungen in den Lösungsmitteln (Kapitel 2.2.2) untersucht. Diese Informationen sind von entscheidender Bedeutung, da die

lösemittelbedingte testspezifische Verdünnung (Dilution factor (DF), Formel (2.3)) anzeigt, wie stark ein Extrakt im jeweiligen Test mindestens verdünnt werden muss. Sie bestimmt damit, welche relativen Anreicherungs-faktoren (relative enrichment factor (REF), Formel (2.1)) realisierbar sind, bzw. wie groß die angereicherte Wassermenge und damit der Anreicherungs-faktor in der SPE (enrichment factor (EF), Formel (2.2)) sein muss, um einen bestimmten relativen Anreicherungs-faktor realisieren zu können.

$$\text{Relativer Anreicherungs-faktor Biotest (REF)} = \text{Anreicherungs-faktor SPE (EF)} * \text{Verdünnungs-faktor Biotest (DF)} \quad (2.1)$$

$$\text{Anreicherungs-faktor SPE (EF)} = \frac{\text{Volumen Wasserprobe}}{\text{Endvolumen Extrakt}} \quad (2.2)$$

$$\text{Verdünnungs-faktor Biotest (DF)} = \frac{\text{Volumen Extrakt}}{\text{Volumen Biotest}} \quad (2.3)$$

Die lösemittelbedingte testspezifische Verdünnungsfaktoren (Kapitel 2.2.3) bilden somit die Grundlage für die Erstellung von Anreicherungsprotokollen sowie die Planung von Probenahmekampagnen. Zudem können anhand der Untersuchungen Lösungsmittel identifiziert werden, die aufgrund von zu starken zytotoxischen Effekten oder Blindwerten ungeeignet sind, um in der wirkungsbezogenen Analytik eingesetzt zu werden.

Dazu wurden Datenlücken in Bezug auf die Lösungsmittelverträglichkeit der in den Assays verwendeten Organismen durch eigene Verträglichkeitsstudien im Labor ergänzt. Durch umfangreiche Recherchen und nach Absprache mit dem projektbegleitenden Ausschuss wurden insgesamt vier Lösungsmittel (Dimethylsulfoxid, Ethylacetat, Methanol, Acetonitril) identifiziert, die im Projekt entweder zur Konditionierung und/oder zur Elution der Kartuschen dienten oder als sogenannte ‚Keeper‘ eingesetzt wurden. Kriterien für die Auswahl waren die Löslichkeit organischer Substanzen, die Kompatibilität mit der jeweiligen chemischen Analysetechnik sowie toxikologische Eigenschaften.

Keeper sind organische Lösungsmittel mit geringer Flüchtigkeit, die während des Abdampfprozesses verhindern, dass Zielanalyten verloren gehen. Keeper können somit die Wiederfindung von Analyten verbessern [15]. Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ein häufig verwendetes Beispiel für einen Keeper. Außerdem wird DMSO als

Gefrierschutzmittel bei der Langzeitlagerung von Zellkulturen verwendet. Es besitzt zudem die Fähigkeit eine Vielzahl von organischen Verbindungen in Lösung zu bringen. Teilweise werden Lösungsmittel auch von herstellenden Betrieben zur Durchführung bestimmter Assays vorgeschlagen. Auch wenn Acetonitril und Ameisensäure in zellbasierten Verfahren eher selten zum Einsatz kommen, finden sie in der chemischen Analytik häufig Anwendung. Daher wurde parallel zu den aufgeführten Lösungsmitteln auch Ameisensäure ausgewählt und auf unerwünschte Effekte hin charakterisiert.

2.2.1. Zytotoxische und wachstumsinhibierende Effekte von Lösungsmitteln und Ameisensäure

Um Zytotoxizität und Wachstumsinhibierung durch die ausgewählten Lösungsmittel und Ameisensäure auf die unterschiedlichen Organismen der Biotestbatterie (Eukaryotische Zelllinien, Bakterien, Hefen) zu untersuchen wurden je nach Testsystem unterschiedliche Verfahren angewendet. Um die Zytotoxizität für die in den CALUX-Testsystemen und im in-vitro Mikrokerntest eingesetzten eukaryotischen U2OS Zelllinien sowie der Hep-G2 Zelllinie zu untersuchen, wurde der MTT-Test mit der jeweiligen Zelllinie angewandt. Als Akzeptanzkriterium gilt eine Abnahme der Zellvitalität < 10 %. Sowohl beim Ames-Fluktuationstest als auch beim umu-Test wurde das Zellwachstum der verwendeten *Salmonella typhimurium* Stämme nach einer bestimmten Inkubationszeit mit der Probe durch die Messung der optischen Dichte in der Bakteriensuspension bestimmt. Im Ames-Fluktuationstest bzw. umu-Test durfte die Hemmung des Bakterienwachstums im Vergleich zur Kontrolle 30 % bzw. 50 % nicht überschreiten. Bei *A. fischeri* darf die Lumineszenz der Bakterien im Vergleich zur Negativkontrolle höchstens um 10 % vermindert sein. Gleiches gilt für die Hemmung der Enzymaktivität von Acetylcholinesterase (aus *Electrophorus electricus*). Das Wachstum der Hefezellen, die in den *Arxula* Yeast Screens eingesetzt werden, darf im Vergleich zur Negativkontrolle um höchstens 20 % abweichen. Die unterschiedlichen Kriterien sind über entsprechende Normen, Standards oder Herstellervorgaben festgelegt und spezifisch für die verschiedenen Biotest.

Die unterschiedlichen Lösungsmittel wurden in Volumenanteilen von 0,01 %, 0,1 %, 1 % und 10 % in den Biotests eingesetzt. Für Ameisensäure wurden Volumenanteile von 0,001 %, 0,01 %, 0,1 %, 1 % und 10 % getestet.

In Tabelle 7 sind die Volumenanteile der Lösungsmittel dargestellt, welche in den eukaryotischen U2OS Zelllinien der CALUX-Testsysteme mit den Rezeptoren ER α ,

AR und GR sowie in den im in-vitro Mikrokerntest verwendeten Hep-G2 Zellen, nicht zu zytotoxischen Effekten (≤ 10 % Zytotoxizität im MTT-Test) führten.

Tabelle 7: Nicht-zytotoxische Lösungsmittelkonzentrationen (Volumenanteil in %) für die eukaryotische U2OS Zellen aus CALUX-Testsystemen mit unterschiedlichen Rezeptoren (ER α , AR, GR) sowie für die im in-vitro Mikrokerntest eingesetzte Hep-G2 Zelllinie

	U2OS (ER α)	U2OS (AR)	U2OS (GR)	Hep-G2
Dimethylsulfoxid	0,1 %*	0,1 %*	0,1 %*	1 %
Ethylacetat	1 %**	1 %**	0,1 %	1 %**
Methanol	10 %	1 %	1 %	10 %
Acetonitril	1 %	0,1 %	0,1 %	1 %
Ameisensäure	0,01 %	0,01 %	0,01 %	0,01 %

*Herstellerempfehlung BioDetektion Systems, Amsterdam NL

**Ausfällungen im Medium

Die verwendeten eukaryotischen U2OS Zelllinien sowie die Hep-G2 Zelllinie zeigten die größte Toleranz gegenüber Methanol. Dimethylsulfoxid, Ethylacetat und Acetonitril konnten durch die eukaryotischen Zelllinien in Volumenanteilen von bis zu 0,1 % bzw. 1 % toleriert werden. Ameisensäure führte zu den stärksten zytotoxischen Effekten und wurde bis zu einem Volumenanteil von 0,01 % toleriert. Da die Daten, für die mit unterschiedlichen Rezeptoren ausgestatteten U2OS Zelllinien, ein recht einheitliches Bild darstellten, wurde auf die weitere Testung der verwandten Zelllinie für den TR-TTR β -CALUX verzichtet. Die Hep-G2 Ziellinie zeigte sich im Vergleich mit den U2OS Zelllinien etwas unempfindlicher gegenüber Lösungsmitteln. Ethylacetat führte bei Volumenanteilen von 1 % und 10 % zu Ausfällungen im Medium des MTT-Tests, wodurch die erhobenen Daten für diese Konzentrationsstufen einer gewissen Unsicherheit unterliegen.

In Tabelle 8 sind die Konzentrationen der Lösungsmittel dargestellt, welche bei den bakteriellen *S. typhimurium* Stämmen des Ames-Fluktuationstests (*S. typhimurium* YG1041/-1042) bzw. des umu-Tests (*S. typhimurium* TA1535/pSK1002) nicht zur Hemmung des Wachstums (≤ 30 %, ≤ 50 %) führen. Ebenso sind die Ergebnisse für das Bakterium *A. fischeri* aus dem Leuchtbakterientest aufgeführt, bei denen die Fluoreszenzintensität nicht beeinträchtigt wurde (≤ 10 %).

Tabelle 8: Nicht-hemmende Lösungsmittelkonzentrationen (Volumenanteil in %) für die im Ames-Fluktuationstest und umu-Test eingesetzten bakteriellen *S. typhimurium* Stämme sowie dem im Leuchtbakterientest eingesetzten Bakterium *A. fischeri*.

	<i>S. typhimurium</i> YG1041/-1042	<i>S. typhimurium</i> TA1535/pSK1002	<i>A. fischeri</i>
Dimethylsulfoxid	10 %	10 %	1 %
Ethylacetat	10 %	10 %	0,1%
Methanol	10 %	10 %	1 %
Acetonitril	10 %	10 %	1 %
Ameisensäure	0,01 %	0,01 %	n.a.

Die *S. typhimurium* Stämme aus dem Ames-Fluktuationstest sowie dem umu-Test zeigten sich äußerst robust gegenüber Lösungsmitteln. Keines der Lösungsmittel führte in der höchsten getesteten Konzentration von 10 Vol-% zu zytotoxischen Effekten. Ameisensäure hingegen schränkte das Bakterienwachstum deutlich ein. Bei einem Volumenanteil von 0,01 % Ameisensäure konnte keine Wachstumsinhibierung mehr festgestellt werden. *A. fischeri* zeigte sich im Vergleich zu den *S. typhimurium* Stämmen weniger robust gegenüber Lösungsmitteln. Dies ist auch auf das strengere Akzeptanzkriterium bezüglich der im Test tolerierbaren Hemmung zurückzuführen. *A. fischeri* zeigte sich bis zu einer Konzentration von 1 Vol-% tolerant gegenüber den meisten getesteten Lösungsmitteln. Eine Ausnahme stellte Ethylacetat (EtAc) dar, das nur zu 0,1 Vol-% toleriert wurde.

In Tabelle 9 sind die Lösungsmittelkonzentrationen dargestellt, bei denen keine Wachstumshemmung im Hefestamm *Arxula adenivorans* (Wachstumshemmung ≤ 20 %) oder Hemmung der Enzymaktivität der Acetylcholinesterase (≤ 10 %) festgestellt werden konnte.

Tabelle 9: Nicht-hemmende Lösungsmittelkonzentrationen (Volumenanteil in %) für den Hefestamm *A. adenivorans* und das Enzym Acetylcholinesterase

	<i>A. adenivorans</i>	Acetylcholinesterase
Dimethylsulfoxid	1 %	10 %
Ethylacetat	1 %	10 %
Methanol	1 %	10 %
Acetonitril	1 %	10 %
Ameisensäure	0,001%	10 %

In Bezug auf die Verträglichkeit von Lösungsmitteln für Hefezellen wurde festgestellt, dass alle getesteten Lösungsmittel in Konzentrationen bis zu 1 % keine Wachstumshemmung von mehr als 20 % verursachen. Gegenüber Ameisensäure sind die Hefezellen allerdings sehr empfindlich und zeigen ab einer Konzentration von 0,001 Vol-% keine Wachstumshemmung mehr. Ohne negative Wirkung auf die Enzymaktivität toleriert das Enzym Acetylcholinesterase im Test 10 Vol-% der Lösungsmittel sowie der Ameisensäure.

2.2.2. Mechanismusspezifische Effekte durch Lösungsmittel

Zusätzlich zu den zytotoxischen und wachstumsinhibierenden Effekten durch die Lösungsmittel wurde untersucht, ob etwaige Verunreinigungen in den Lösungsmitteln zu unerwünschten Effekten (Blindwerten) in den verwendeten Biotests führen können. Mit Ausnahme von Methanol, dass bei einem Volumenanteil von 10 % im ER α -CALUX zu einer östrogenen Wirkung führte, konnten keine weiteren mechanismusspezifischen Effekte durch die untersuchten Lösungsmittel und Ameisensäure in den verwendeten Bioassays detektiert werden.

Die östrogene Wirkung im ER α -CALUX wurde allerdings nur in einer Charge des Methanols festgestellt. Bei einem Anteil von 10 % Methanol ergab sich im MTT-Test eine durchschnittliche Zellvitalität von $94,8 \% \pm 4,5 \%$ und im ER-CALUX eine östrogene Wirkung von $0,36 \pm 0,1$ ng 17 β -Östradiol Äquivalenten/L. Die Effekte können entweder durch Verunreinigungen in der Methanol Charge mit östrogen wirksamen Substanzen zustande kommen oder durch das „Cytotoxic Burst Phenomenon“ erklärt werden, bei dem kurz vor dem Zelltod Mechanismen in der Zelle unspezifisch ablaufen und es so zu falsch positiven Effekten kommt. Da Methanol in Anteilen von 10 Vol-% in den anderen Zelllinien der CALUX-Testsysteme im MTT schon zytotoxische Effekte $\geq 10 \%$ zeigte und sich die Zellen von Natur aus sehr ähnlich sind spricht dies zusätzlich für das erklärte Phänomen. Daher sollte Methanol in CALUX-Testsystem nicht in Anteilen von 10 Vol-% eingesetzt werden

2.2.3. Lösungsmittelbedingte testspezifische Verdünnungsfaktoren

Aus den Ergebnissen der vorangegangenen Kapitel zur Zytotoxizität und Wachstumshemmung von Lösungsmitteln und Ameisensäure sowie deren mechanismusspezifischen Effekte (Blindwerte), wurde für die unterschiedlichen Organismen je eine Matrix erstellt, in der die erforderlichen Verdünnungsfaktoren für die einzelnen Lösungsmittel und Ameisensäure in den jeweiligen Biotests dargestellt

sind. Da sich der relative Anreicherungsfaktor im Biotest aus dem Anreicherungsfaktor der SPE (EF) und dem testspezifischen Verdünnungsfaktor (DL) ergibt, stellt letzterer eine wichtige Grundlage für die Erstellung von Anreicherungsprotokollen sowie die Planung von Probenahmekampagnen dar.

In Tabelle 10 sind die Verdünnungsfaktoren für die Biotests mit eukaryotischen Zellen dargestellt, die aufgrund der Toleranz gegenüber den jeweiligen Lösungsmitteln mindestens eingehalten werden müssen. Für Ethylacetat wurden zusätzlich die Ausfällungen im Medium, welche ab Volumenanteilen von 1 % auftraten, berücksichtigt und dementsprechend der Verdünnungsfaktor auf 1000 gesetzt. Im Fall von Methanol wurde für den ER α -CALUX auch die bei 10 Vol-% gemessenen Blindwerte im Verdünnungsfaktor berücksichtigt.

Tabelle 10: Lösungsmittelbedingte Verdünnungsfaktoren für Biotests mit eukaryotischen Zelllinien

	ER α -CALUX	AR-CALUX	GR-CALUX	in-vitro Mikrokerntest
Dimethylsulfoxid	1.000	1.000	1.000	1.000
Ethylacetat	1.000	1.000	1.000	1.000
Methanol	100	100	100	100
Acetonitril	100	1.000	1.000	100
Ameisensäure	10.000	10.000	10.000	10.000

In Tabelle 11 sind die Verdünnungsfaktoren für die Biotests mit Bakterien dargestellt, die aufgrund der Toleranz gegenüber den jeweiligen Lösungsmitteln mindestens eingehalten werden müssen.

Tabelle 11: Lösungsmittelbedingte Verdünnungsfaktoren für Biotests mit Bakterien

	Ames- Fluktuationstest	umu-Test	Leuchtbakterientest
Dimethylsulfoxid	10	10	100
Ethylacetat	10	10	1.000
Methanol	10	10	100
Acetonitril	10	10	100
Ameisensäure	10.000	10.000	n.a.

In Tabelle 12 sind die Verdünnungsfaktoren für die Biotests mit Hefen sowie dem Enzym Acetylcholinesterase-Assay dargestellt, die aufgrund der Toleranz gegenüber den jeweiligen Lösungsmitteln mindestens eingehalten werden müssen.

Tabelle 12: Lösungsmittelbedingte Verdünnungsfaktoren für die unterschiedlichen *Arxula* Yeast Screens sowie dem Acetylcholinesterase-Assay

	<i>Arxula</i> Yeast Screens	Acetylcholinesterase-Assay
Dimethylsulfoxid	100	10
Ethylacetat	100	10
Methanol	100	10
Acetonitril	100	10
Ameisensäure	100.000	10

Im Vergleich der unterschiedlichen Organismen zeigten sich die bakteriellen *S. typhimurium* Stämme und das Enzym Acetylcholinesterase robuster gegenüber lösungsmittelbedingten Effekten als die Hefezelle *A. adenivorans* und das Bakterium *A. fischeri*. Am empfindlichsten gegenüber Lösungsmitteln zeigten sich die eukaryotischen U2OS - und Hep-G2 Zelllinien. Dies ist unter anderem auch auf die unterschiedlichen Akzeptanzkriterien hinsichtlich zytotoxischer und wachstumsinhibierender Effekte zurückzuführen. Die hohe Empfindlichkeit der CALUX-Testsysteme macht diese zudem empfänglicher für mechanismusspezifische Effekte, die wie am Beispiel von Methanol festgestellt, bereits durch sehr geringe Kontaminationen in dem verwendeten Lösungsmittel hervorgerufen werden können. Ameisensäure wirkte bei sehr geringen Konzentrationen auf alle Organismen stark zytotoxisch bzw. wachstumsinhibierend. Dies trifft sowohl auf die direkte Anwendung im Test zu als auch auf die Testung nach Anreicherung. Bei direkter Anwendung konnte der Effekt auch durch vorherige Neutralisierung der Säure nicht vermieden werden. Die erhöhte Ionenstärke im Medium könnte trotzdem zu großen osmotischen Stress führen [16]. Lediglich der enzymbasierte Biotest erwies sich als robust gegenüber Ameisensäure. Dementsprechend wurde die Ameisensäure durch die sehr geringe Toleranz bereits vorzeitig für weitere Testungen und die Verwendung im Anreicherungsprotokoll ausgeschlossen.

Generell sei darauf hingewiesen, dass bei der Testung von lösungsmittelhaltigen Extrakten in Biotests, immer eine entsprechende Lösungsmittelkontrolle mitgeführt werden sollte, die zu eventuellen zytotoxischen oder mechanismusspezifischen Effekten in den Biotests führen, nie gänzlich ausgeschlossen werden können.

2.3. Schritt 3: Blindwertanalyse der Sorbentien (AP3, AP4.1, FE 1 und FE 2)

Speziell wirkungsbezogene Methoden sind sehr empfindlich für Blindwerte, da sie die Wirkung aller in der Probe enthaltenen Effekttreiber erfassen. In der chemischen Analytik ist die Wahrscheinlichkeit, dass durch die Anreicherungsmaterialien Blindwerte detektiert werden, wesentlich geringer, da die Anreicherung hier eingesetzt wird, um einzelne Target-Substanzen oder bestimmte Stoffgruppen anzureichern. Deshalb ist es bei der Erstellung einer SPE-Kartusche für die wirkungsbezogene Analytik wichtig, unerwünschte Effekte (Blindwerte) durch Anreicherungsmaterialien von vornherein auszuschließen. Daher wurde im Projekt eine umfangreiche Blindwertanalyse von potentiellen Anreicherungsmaterialien durchgeführt.

Dazu wurden insgesamt sechs auf dem Markt erhältliche SPE-Kartuschen ausgewählt (Tabelle 13). Die Auswahl enthielt Kartuschen mit Aktivkohlen und Polymeren als Sorbentsmaterial sowie ein Forschungsmuster einer in Entwicklung befindlichen Kombinationskartusche, bestehend einem an ein Polymermaterial gebundenen Anionenaustauscher, einem an ein Polymer gebundenen Kationenaustauscher sowie graphitisierten Kohlenstoff.

Tabelle 13: SPE-Kartuschen mit Angaben zum Sorbents-Typ, Sorbentsmenge und Hersteller.

SPE-Kartusche	Sorbents-Typ	Sorbentsmenge	Hersteller
Oasis HLB	Polymer + Umkehrphase	1,2 g	Waters
ISOLUTE® ENV+	Polymer + Kationenaustauscher	1,0 g	Biotage
Bakerbond C	Aktivkohle	1,0 g	JT Baker
Strata® C18-E	Aktivkohle	2,0 g	Phenomenex
Supelclean™ CC	Aktivkohle	2,0 g	Supelco
PMT	Polymer + Anionenaustauscher	0,6 g	Macherey-Nagel
	Polymer + Kationenaustauscher	0,6 g	
	Aktivkohle	0,1 g	

Aktivkohle wird für die Anreicherung polarer Substanzen verwendet, während die Polymermaterialien durch entsprechende Funktionalisierung zur Anreicherung weiterer Substanzen des Polaritätsspektrums eingesetzt werden.

Nach einem definierten, vorläufigen Protokoll (Kapitel 2.3.1), das routinemäßig für die Anreicherung von Proben für die wirkungsbezogene Analytik angewendet wird, wurden für jede Kartusche drei unabhängige Blindwertreplikate hergestellt. Um genügend Extrakt zu erhalten, bestand jedes Blindwertreplikat aus jeweils acht

Einzelblindwerten (8 SPE-Kartuschen). Für jeden Einzelblindwert wurde 1 L Reinstwasser über die Kartuschen angereichert und in 100 µL DMSO aufgenommen, wodurch sich ein Anreicherungsfaktor (EF) von 10.000 ergab.

Die so erzeugten Blindwerte wurden mit der Biotestbatterie sowohl auf zytotoxische als auch mechanismusspezifische Effekte untersucht (Kapitel 2.3.2). Die Blindwertanalytik wurde zudem durch Non-Target Screening (NTS) ergänzt (Kapitel 2.3.3).

2.3.1. Vorläufiges Anreicherungsprotokoll

Im Folgenden sind die Schritte des vorläufigen Anreicherungsprotokolls zusammengefasst. Da das Equipment zur Anreicherung an unterschiedlichen Instituten nicht einheitlich ist, wird hier auf eine detaillierte Darstellung verzichtet und nur die wesentlichen Schritte dargestellt. Das Protokoll wurde neben Schritt 3: „Blindwerte der Sorbentien“ auch unter Schritt 6: „Optimierung von Wiederfindungen unterschiedlicher Sorbentien sowie Entwicklung und Herstellung einer Multi-Layer-SPE Kartusche“ angewandt.

Vorläufiges Anreicherungsprotokoll:

1. Konditionierung der Kartuschen: 2x 6 mL EtAc, 2x 6 mL H₂O.
2. Anreicherung: etwa 1 L Probe pro Stunde über die Kartusche anreichern (Tropfend, kein durchgängiger Wasserstrahl). Anreicherung kurz vor dem Trockenlaufen beenden.
3. Trocknung des Sorbentsmaterials im Stickstoffstrom
4. Elution: 3x 3 ml Ethylacetat, 3x 3 ml Methanol. Am Ende 1 mL Methanol zusätzlich zugeben damit Kartusche nicht trocken läuft
5. Im Evaporator unter leichtem Stickstoffstrom bei 40 °C bis zur Trockene einengen.
6. Resolvatisierung in 100µL DMSO (Biotest) // in 1 mL Reinstwasser (HRMS)
7. Lagerung bei < -15 °C.

2.3.2. Blindwertanalyse mittels Biotests (AP4.1, FE 1 und FE 2)

Zunächst wurden die Blindwerte der ausgewählten Sorbentsmaterialien analog zu den Untersuchungen der eingesetzten Lösungsmittel auf zytotoxische und inhibierende Effekte gegenüber den verwendeten Testorganismen hin untersucht.

Um zu ermitteln, ob die Blindwerte zu zytotoxischen Effekten in den eukaryotischen U2OS Zelllinien der CALUX-Testsysteme mit den Rezeptoren ER α , AR und GR sowie

in den im in-vitro Mikrokernstest verwendeten Hep-G2 Zellen führen, wurden die Blindwerte im MTT-Test gegenüber den entsprechenden Zellen mit einem REF von 10 exponiert. Tabelle 14 zeigt die im MTT-Test ermittelte Zellvitalität ($n = 3$) im Vergleich zur Negativkontrolle. Keiner der getesteten Blindwerte führte dazu, dass die Zellvitalität auf unter 90 % herabgesetzt wurde. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die untersuchten Materialien keine Substanzen freisetzen, die zu zytotoxischen Effekten in den getesteten eukaryotischen Zelllinien führen. Lediglich beim Blindwert der Supelclean™ CC Kartusche zeigte sich bei den U2OS Zellen mit dem ER α -Rezeptor eine Zellvitalität von 92 ± 5 %, wodurch hier leicht zytotoxische Effekte, die in zwei Replikaten auftraten (Zellvitalität $< 90\%$), durch freigesetzte Substanzen aus der Supelclean™ CC Kartusche nicht gänzlich ausgeschlossen werden können.

Tabelle 14: Zellvitalität im MTT-Test in % ($n = 3$) bei Exposition gegenüber Kartuschenblindwerten mit einem REF von 10 für die eukaryotische U2OS Zellen aus CALUX-Testsystemen mit unterschiedlichen Rezeptoren (ER α , AR, GR) sowie für die im in-vitro Mikrokernstest eingesetzte Hep-G2 Zelllinie

Kartusche	U2OS (ER α)	U2OS (AR)	U2OS (GR)	Hep-G2
Oasis HLB	100 ± 1	97 ± 2	96 ± 3	95 ± 4
ISOLUTE® ENV+	100 ± 5	97 ± 3	97 ± 5	97 ± 6
Bakerbond C	104 ± 2	97 ± 2	103 ± 4	101 ± 6
Strata® C18-E	92 ± 1	101 ± 3	99 ± 6	97 ± 7
Supelclean™ CC	92 ± 5	96 ± 4	98 ± 1	100 ± 8
PMT	94 ± 3	96 ± 4	98 ± 1	97 ± 4

In Tabelle 15 sind die Ergebnisse der Blindwertanalyse der Sorbentien in Bezug auf Wachstumshemmung bzw. Hemmung der Lumineszenz, der bakteriellen *S. typhimurium* Stämmen aus dem Ames-Fluktuationstest (*S. typhimurium* YG1041/-1042) und dem umu-Test (*S. typhimurium* TA1535/pSK1002) sowie beim Bakterium *A. fischeri* aus dem Leuchtbakterientest, dargestellt. Die Blindwerte der Sorbentien wurden gegenüber den *S. typhimurium* Stämmen mit einem REF von 100 und gegenüber dem Bakterium *A. fischeri* mit einem REF von 10 getestet. Es ist dargestellt, ob die getesteten Blindwerte zu einer Hemmung des Wachstums der *S. typhimurium* Stämme YG1041/-1042 und TA1535/pSK1002 (≤ 30 %, ≤ 50 % Hemmung $\triangleq$ negative) bzw. der Lumineszenz von *A. fischeri* (≤ 10 % Hemmung $\triangleq$ negative) führten oder nicht.

Tabelle 15: Hemmung des Bakterienwachstums der im Ames-Fluktuationstest und umu-Test eingesetzten bakteriellen *S. typhimurium* Stämme (REF = 100) sowie Hemmung der Lumineszenz des im Leuchtbakterientest eingesetzten Bakteriums *A. fischeri* (REF = 10) durch Kartuschenblindwerte (n = 3)

Kartusche	<i>S. typhimurium</i> YG1041/-1042	<i>S. typhimurium</i> TA1535/pSK1002	<i>A. fischeri</i>
Oasis HLB	negativ	negativ	negativ
ISOLUTE® ENV+	negativ	negativ	negativ
Bakerbond C	negativ	negativ	negativ
Strata® C18-E	negativ	negativ	negativ
Supelclean™ CC	negativ	negativ	negativ
PMT	negativ	negativ	negativ

Wie in Tabelle 15 gezeigt führte keiner der untersuchten Blindwerte zu einer Hemmung des Wachstums bzw. der Lumineszenz. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die untersuchten Materialien keine Substanzen freisetzen die zu hemmenden Effekten in den getesteten Bakterien führen.

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der Blindwertanalyse der Sorbentien in Bezug auf die Wachstumshemmung der im *Arxula* Yeast Screen verwendeten Hefestämme für östrogene - (A-YES), progesterone - (A-YPS), glucocorticoide - (A-YGS) und androgene Wirkung (A-YAS) bzw. der Hemmung der Enzymaktivität der Acetylcholinesterase dargestellt. Aufgeführt ist jeweils das Zellwachstum bzw. die Enzymaktivität in %. Die Blindwerte wurden mit einem REF von 10 getestet. Bei den Hefezellen darf das Zellwachstum 80 % nicht unterschreiten. Die Enzymaktivität der Acetylcholinesterase darf 90 % nicht unterschreiten. Keiner der getesteten Blindwerte führte dazu, dass das Zellwachstum der Hefestämme bzw. die Aktivität der Acetylcholinesterase auf unter 80 % bzw. 90 % herabgesetzt wurde, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass die untersuchten Materialien keine Substanzen freisetzen, die zu zytotoxischen Effekten in den getesteten Hefestämmen bzw. zur Hemmung der Acetylcholinesterase führen. Allerdings ergab sich für den Blindwert der Bakerbond C Kartusche beim Hefestamm aus dem A-YES ein Zellwachstum von 80 % mit einer Standardabweichung von 12 %, wodurch hier leicht zytotoxische Effekte, durch freigesetzte Substanzen aus der Bakerbond C Kartusche, nicht gänzlich ausgeschlossen werden können. Zudem war auffällig, dass das Zellwachstum des Hefestamms aus dem A-YPS im Vergleich zur Kontrolle um bis zu 37 % überschritten wurde. Dies lässt sich durch eine überschrittene Inkubationszeit der Zellen erklären

und hat keine Auswirkungen auf die Beurteilung der Zytotoxizität, da zytotoxische Effekte auch unter diesen Bedingungen erkennbar gewesen wären.

Tabelle 16: Zellwachstum bzw. Enzymaktivität in % (n = 3) bei Exposition gegenüber Kartuschenblindwerten mit einem REF von 10 für die im Arxula Yeast Screen verwendeten Hefestämme bzw. der Acetylcholinesterase

Kartusche	Zellwachstum in %				Aktivität in %
	A-YES	A-YPS	A-YGS	A-YAS	AChE
Oasis HLB	91 ± 4	137 ± 1	94 ± 3	119 ± 2	102
ISOLUTE® ENV+	91 ± 3	125 ± 1	98 ± 5	120 ± 3	95
Bakerbond C	80 ± 12	131 ± 1	100 ± 4	108 ± 6	106
Strata® C18-E	99 ± 3	105* ± 1	98 ± 4	112 ± 0,3	101
Supelclean™ CC	n.a.	136 ± 2	97 ± 4	118 ± 6	101
PMT	n.a.	131 ± 4	95 ± 2	110 ± 4	108

n.a: nicht analysiert

* Einfachbestimmung

Neben zytotoxischen und inhibierenden Effekten auf die in den Biotests eingesetzten Organismen durch die Kartuschenblindwerte, wurden analog zu den Untersuchungen zu lösungsmittelbedingten Effekten auch hier eventuelle mechanismusspezifische Effekte untersucht, die durch freigesetzte Substanzen aus den Anreicherungsmaterialien hervorgerufen werden könnten.

Um zu ermitteln, ob die Kartuschenblindwerte zu endokrinen Effekten (östrogene, androgene, glukokortikoide, Blockierung des TTR β -Rezeptors) in den CALUX-Testsystemen sowie gentoxischen Effekten im in-vitro Mikrokerntest führen, wurden die Blindwerte in allen Testsystemen mit einem REF von 10 getestet. Tabelle 17 zeigt, dass die Kartuschenblindwerte weder zu endokrinen Effekten (<NWG) noch zu gentoxischen Effekten (negativ) in den eukaryotischen Zelllinien führten. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die untersuchten Materialien keine Substanzen freisetzen, die zu endokrinen bzw. gentoxischen Effekten führen.

Tabelle 17: Endokrine Wirkungen in CALUX-Testsystemen bzw. gentoxische Wirkung im in-vitro Mikrokerntest (n = 3) bei Exposition gegenüber Kartuschenblindwerten mit einem REF von 10

Kartusche	ER-CALUX*	AR-CALUX**	GR-CALUX***	TR-TTRβ-CALUX****	in-vitro Mikrokerntest
Oasis HLB	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	negativ
ISOLUTE® ENV+	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	negativ
Bakerbond C	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	negativ
Strata® C18-E	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	negativ
Supelclean™ CC	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	negativ
PMT	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG	negativ

*NWG (ng E-EQ/L) = 0,0059, **NWG (ng DHT-EQ/L) = 0,23, ***NWG (ng DEX-EQ/L) = 1,36,

****NWG (ng PFOA-EQ/L) = 0,11

In Ergänzung zu den Untersuchungen mit den CALUX-Testsystemen wurde auch mit den hefezellbasierten *Arxula* Yeast Screens getestet, ob die Kartuschenblindwerte zu endokrinen Wirkungen führen. Die Kartuschenblindwerte wurden dazu mit einem REF von 10 in die entsprechenden Biotests eingesetzt. Keiner der untersuchten Blindwerte zeigte Anzeichen für endokrine Effekte in den Hefezelltests (< NWG) (Tabelle 18). Daraus kann geschlossen werden, dass keine der getesteten Materialien Substanzen freisetzt, die endokrine Wirkungen verursachen.

Tabelle 18: Endokrine Wirkungen in *Arxula* Yeast Screens (n = 3) bei Exposition gegenüber Kartuschenblindwerten mit einem REF von 10

Kartusche	A-YES*	A-YPS**	A-YGS***	A-YAS****
Oasis HLB	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
ISOLUTE® ENV+	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
Bakerbond C	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
Strata® C18-E	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
Supelclean™ CC	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
PMT	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG

*NWG (ng EEQ/L) = 6,54; **NWG (ng PEQ/L) = 19,1; ***NWG (µg CEQ/L) = 7,89;

****NWG (ng DHTEQ/L) = 18,86

In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der Blindwertanalyse der Sorbentien in Bezug auf mutagene (Ames-Fluktuationstest mit *S. typhimurium* YG1041 und YG1042) und gentoxische (umu-Test mit *S. typhimurium* TA153/pSK1002) Effekte dargestellt. Die Blindwerte der Sorbentien wurden gegenüber den *S. typhimurium* Stämmen sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von S9 mit einem REF von 100 getestet. Wie in Tabelle 19 gezeigt führte keiner der untersuchten Blindwerte zu einer mutagenen bzw.

gentoxischen Wirkung in den unterschiedlichen Testansätzen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die untersuchten Materialien keine Substanzen freisetzen, die zu mutagenen bzw. gentoxischen Effekten führen.

Tabelle 19: Mutagene Wirkung im Ames-Fluktuationstest (*S. typhimurium* YG1041 und YG1042) und gentoxische Wirkung im umu-Test (*S. typhimurium* TA1535/pSK1002) durch Kartuschenblindwerte (REF = 100) (n = 3)

Kartusche	<i>S. typh.</i> YG1041 - S9	<i>S. typh.</i> YG1041 + S9	<i>S. typh.</i> YG1042 - S9	<i>S. typh.</i> YG1042 + S9	<i>S. typh.</i> TA1535/pSK1002 - S9	<i>S. typh.</i> TA1535/pSK1002 + S9
Oasis HLB	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
ISOLUTE® ENV+	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
Bakerbond C	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
Strata® C18-E	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
Supelclean™ CC	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
PMT	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ

2.3.3. Blindwertanalyse mittels Non-Target Screening (NTS) (AP3, FE 2)

Da Biotests sehr empfindlich sind und die Wirkung aller potentiellen Effektverursacher in der Probe als Summenwert anzeigen, wurde durch das NTS untersucht, wie hoch die Anzahl von Substanzen (bzw. Features) ist, die von den unterschiedlichen Sorbentsmaterialien im Rahmen der Blindwertanalyse freigesetzt wurden. Diese Daten wurden anschließend mit den in den Biotests ermittelten Blindwerten verglichen, um eventuelle Zusammenhänge zwischen den detektierten Features und den im Biotest ermittelten Effekten in den Kartuschenblindwerten zu erkennen. Abbildung 3 zeigt eine Übersicht der detektierten Feature im NTS, sowohl aus dem positiven als auch dem negativen Ionisierungsmodus.

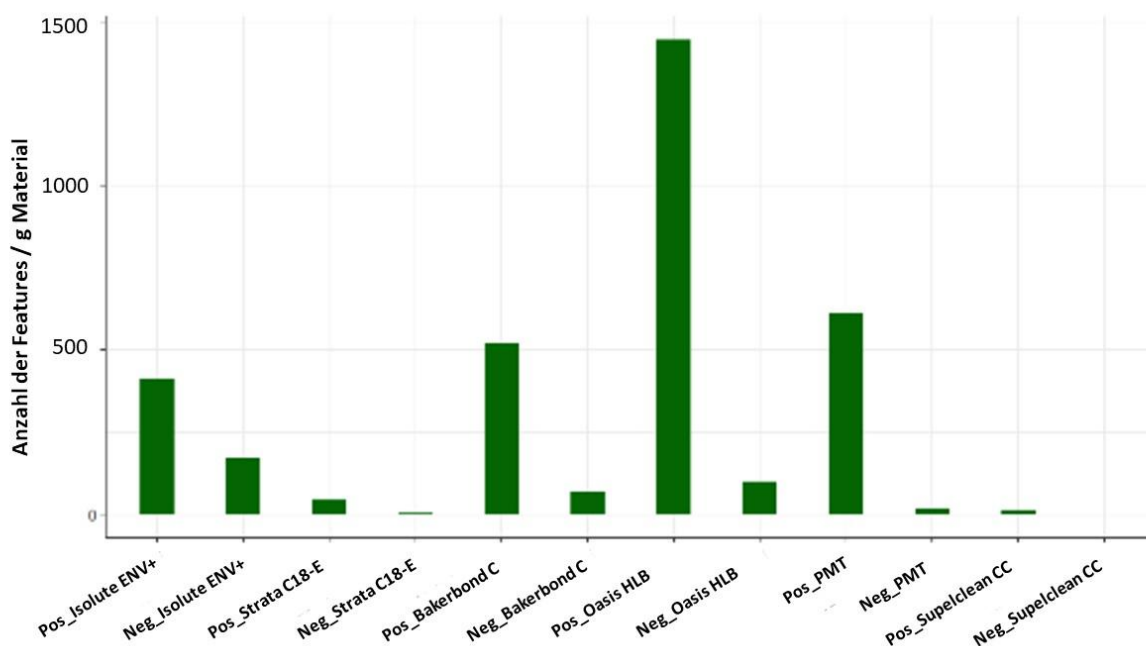


Abbildung 3: Übersicht über die Anzahl der Features aus dem positiven und negativen Ionisierungsmodus für jeden Kartuschenblindwert normiert auf die Masse des Sorbentsmaterials.

Im positiven Ionisierungsmodus wurden im Vergleich zum negativen Ionisierungsmodus deutlich mehr Features detektiert. Allerdings lassen sich die meisten Chemikalien besser positiv ionisieren. Das liegt an ihrer chemischen Struktur, die eine bessere Stabilität und Effizienz in der positiven Ionisierung ermöglicht [17]. Der Blindwert der Oasis HLB Kartusche zeigte mit etwa 1500 Features die höchste Anzahl, gefolgt von den Blindwerten der Isolute ENV+ -, der Bakerbond C - sowie der PMT-Kartusche. In den Blindwerten der Strata C18-E - und der Supelclean CC Kartusche wurden nur wenige Features detektiert. In den Biotests wurden lediglich leichte zytotoxische Effekte durch Blindwerte der Bakerbond C sowie der Supelclean CC hervorgerufen. Trotz teils deutlicher Unterschiede in der Anzahl der Features, konnte kein direkter Zusammenhang zwischen Effekten und Feature-Anzahl gefunden werden.

2.3.4. Fazit Blindwertanalyse der Sorbentien

Insgesamt zeigten sich die Kartuschenblindwerte bei den wirkungsbezogenen Untersuchungen sehr unauffällig. Lediglich zwei Kartuschen zeigten leichte Auffälligkeiten in Bezug auf zytotoxische Effekte. So führte der Blindwert der Bakerbond C Kartusche beim Hefestamm aus dem A-YES zu einer Wachstumshemmung von ca. 20 % und der Blindwert der Supelclean™ CC Kartusche

bei den U2OS Zellen mit dem ER α -Rezeptor in zwei von drei Replikaten zu zytotoxischen Effekten > 10 %. Die Effekte sind zwar nicht signifikant, unter Berücksichtigung der Standardabweichung kann allerdings nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass aus den beiden Kartuschen Substanzen freigesetzt werden, die für die zytotoxischen Effekte verantwortlich sind. Aus Sicht der wirkungsbezogenen Analytik sind somit die unauffälligen Sorbentsmaterialien für die Entwicklung der Multi-Layer- SPE bevorzugt auszuwählen. Das NTS der Kartuschenblindwerte ergab deutliche Unterschiede in der Anzahl der detektierten Feature die aus den unterschiedlichen Sorbentien freigesetzt wurden. Allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen Feature-Anzahl und Effekten gefunden werden.

2.4. Schritt 4: Erstellung einer Referenzsubstanzzliste (AP2, FE 1 und FE 2)

Die in diesem Schritt erstellte Referenzsubstanzzliste diente im nachfolgenden Projektverlauf unterschiedlichen Zwecken. Zunächst wurden die Sorbentsmaterialien im Zuge der Anreicherung hinsichtlich der Diskriminierung der Referenzsubstanzen charakterisiert (Kapitel 2.6.1). Dazu wurden mittels chemischer Analytik Wiederfindungsraten bestimmt, die auch im Zuge der Optimierung des Anreicherungsprotokolls als Entscheidungshilfe dienten. Ferner wurden die Referenzsubstanzen eingesetzt, um die Diskriminierung durch die entwickelten Multi-Layer Kartusche mittels Biotests zu beurteilen (Kapitel 2.7). Letztendlich fanden die Referenzsubstanzen ihren Einsatz auch im Zuge der Stabilitätsuntersuchungen (Kapitel 2.8) der Untersuchung des Matrixeinflusses (Kapitel 2.9) sowie bei der Verfahrensvalidierung (Kapitel 2.10).

Damit die entwickelte Anreicherungs-methode für eine breite Biotestbatterie mit unterschiedlichen Endpunkten eingesetzt werden kann, muss sie ein breites Stoffspektrum möglichst diskriminierungsarm anreichern. Deshalb wurden zunächst die Positivkontrollen der jeweiligen Biotests als Leitsubstanzen in die Referenzsubstanzzliste integriert. Darüber hinaus wurden einzelne Substanzen ausgewählt, die für die Matrices Bade-, Trink-, Roh- und Oberflächenwasser relevante Stoffgruppen abdecken und ein breites Polaritätsfenster abbilden. In Abstimmung mit dem projektbegleitenden Ausschuss wurde so die folgende Referenzsubstanzzliste (Tabelle 20) festgelegt. Eine Stammlösung der 31 Referenzsubstanzen mit einer Konzentration von je 10 mg/L pro Referenzsubstanz, gelöst in Acetonitril, wurde für alle weiteren Untersuchungen hergestellt. Die Stammlösung wird im weiteren als DA-EDA-Stammlösung bezeichnet. Im Laufe des Projekts musste durch die Vielzahl an

Experimenten eine zweite Stammlösung angesetzt werden. Im Vergleich zur ersten Stammlösung, welche Tabelle 20 entsprach, fehlten in der zweiten Stammlösung, die ab Kapitel 2.9 verwendet wurde, die Substanzen Sucralose, Parathion-methyl, und Malaoxon.

Tabelle 20: Referenzsubstanzliste mit Angaben zu Hersteller, molarer Masse und Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (abgerufen von <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). n.a. = nicht angegeben

Name	CAS	Hersteller	M [g/mol]	log Kow
Metformin	657-24-9	LGC Standards	129,16	-2,64
N-Guanylharnstoff	141-83-3	LGC Standards	102,10	n.a.
Oxypurinol	2465-59-0	LGC Standards	152,11	n.a.
Acesulfam	33665-90-6	LGC Standards	163,15	-1,33
Methylisothiazolinon (MIT)	2682-20-4	LGC Standards	115,16	-0,83
Amidotrizoesäure	117-96-4	LGC Standards	613,91	1,37
4-Nitro-o-phenylendiamin (4-NOPD)	99-56-9	Sigma-Aldrich	153,14	0,88
Nitrofurantoin	67-20-9	Sigma-Aldrich	238,16	-0,47
1H-Benzotriazol	95-14-7	LGC Standards	119,12	1,44
Mitomycin C	50-07-7	Sigma-Aldrich	334,33	-0,40
Sucralose	56038-13-2	LGC Standards	397,60	-1,00
Perflourbutansäure (PFBuA)	375-22-4	LGC Standards	214,04	n.a.
4-Nitrochinolin-1-oxid (4-NQO)	56-57-5	Sigma-Aldrich	190,16	n.a.
Perflourbutansulfonsäure (PFBuS)	375-73-5	LGC Standards	300,10	1,82
2-Aminoanthracen	613-13-8	Sigma-Aldrich	193,24	n.a.
Dexametason	50-02-2	Sigma-Aldrich	392,50	1,83
Mifepriston	84371-65-3	Sigma-Aldrich	429,60	5,40
Corticosteron	50-22-6	LGC Standards	346,50	1,94
Parathion-Methyl	298-00-0	LGC Standards	263,21	2,86
17- β -Estradiol	50-28-2	Sigma-Aldrich	272,40	4,01
Flutamid	13311-84-7	LGC Standards	276,21	3,35
Malathion	121-75-5	LGC Standards	330,40	2,36
Tamoxifen	10540-29-1	Sigma-Aldrich	371,50	6,30
Perflouroctansäure (PFOA)	335-67-1	LGC Standards	414,07	6,30
Parathion-Ethyl	56-38-2	LGC Standards	291,26	3,83
Diclofenac	15307-86-5	LGC Standards	296,10	4,51
Dihydrotestosteron	521-18-6	LGC Standards	290,40	3,55
Perflouroctansulfonsäure(PFOS)	1763-23-1	LGC Standards	500,13	4,49
Progesteron	57-83-0	LGC Standards	314,50	3,87
Chlorpyrifos-Methyl	5598-13-0	LGC Standards	322,50	4,31
Chlorpyrifos-Ethyl	2921-88-2	LGC Standards	350,60	4,96

2.5. Schritt 5: Entwicklung und Validierung von LC-MS/MS Target-Methoden zur Quantifizierung der Referenzsubstanzen (FE 1 und FE 2)

Die chemische Analyse wurde zur Quantifizierung der Wiederfindungsraten der Zielsubstanzen in der DA-EDA-Stammlösung durchgeführt. Zur Validierung der LC-MS/MS-Methode an beiden FE wurden verschiedene Tests realisiert (Tabelle 21) deren Ergebnisse exemplarisch für eine Methode (FE 2) in den Tabellen 22 und 23 sowie den Abbildungen 4 und 5 aufgeführt sind. Die Parameter der Analysenmethode sind in den Tabellen 24 bis 26 zu finden. Die an beiden FE genutzten Methoden unterschieden sich einzig in den verwendeten Säulen Eclipse Plus (FE 2) und HSS T3 (FE 1).

Tabelle 21: Übersicht der Validierungsmaßnahmen und deren Gültigkeitskriterien. Alle Standards wurden in Reinstwasser mit 0,1 % Dimethylsulfoxide (DMSO) gemessen.

Art	Maßnahme	Kriterium
Inter-day Assay	20 µg/L an drei unabhängigen Tagen gemessen; Verdünnung jeden Tag frisch vorbereitet	Relative Standardabweichung < 5 %
Intra-day Assay	0,1 µg/L zehnmal innerhalb einer Analyse gemessen	Relative Standardabweichung < 10 %
Linearer Arbeitsbereich	0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25; 50 µg/L	Korrelationskoeffizient > 0,99
Carry-Over	nach der höchsten getesteten Konzentration (50 µg/L) fünf Blindproben	Detektierbare Signale < BG
Bestimmungsgrenze (BG)	DIN 32645:2008-11 [31] Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung	-
Nachweisgrenze (NWG)	DIN 32645:2008-11 Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung	-

Die LC-MS/MS-Methoden wurden für den positiven und negativen Ionisierungsmodus getrennt entwickelt, um eine optimale Ionisierung und maximale Empfindlichkeit zu gewährleisten. Zudem reduziert die Trennung Matrixeffekte und Signalüberlagerungen, was die Genauigkeit der Analyse verbessert.

Die Ergebnisse des Intra- und Inter-Assays sowie der lineare Bereich mit den entsprechenden NWG- und BG-Werten sind in den Tabellen 22 und 23 dargestellt. Die

relative Standardabweichung für den Intra-Assay von 5 % sollte nicht überschritten werden. Die Analyten Amidotrizoesäure und Mitomycin C überschritten diesen Wert jedoch mit etwa 30 %. Für den Inter-Assay wird eine relative Standardabweichung von maximal 10 % empfohlen. Alle Analyten überschritten diesen Wert. Dies konnte im Nachgang auf technische Störungen, verursacht durch die Desolvation Line, einer Transferkapillare des Massenspektrometers, zurückgeführt werden. Im Weiteren wurde die Wiederholpräzision auf Basis kontinuierlich gemessener Qualitätskontrollproben bewertet. Der lineare Bereich wurde anhand der Genauigkeit im Bereich von 80 - 120 % bestimmt. Kalibrierpunkte, die außerhalb dieses Bereichs lagen, wurden ausgeschlossen. Daher wurden für jeden Analyten unterschiedliche lineare Bereiche ermittelt. Verbindungen im negativen Ionisierungsmodus wiesen tendenziell einen breiteren Kalibrierbereich (0,05 – 50 µg/L) auf als Analyten bei positiver Ionisierung. Eine weitere Methode zur Bestimmung des linearen Bereichs ist das Bestimmtheitsmaß R^2 , das > 0,99 betragen sollte. NWG und BG wurden mit dem Quotienten des niedrigsten Kalibrierpunkts des jeweiligen Analyten und dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) bestimmt. Für die NWG wurde der Quotient mit drei und für die BG mit zehn multipliziert. Bezüglich des Carry-Over zeigten nur wenige Verbindungen Peaks in der ersten Blindprobe nach der höchsten getesteten Konzentration (PFBuA, PFOS, 2-Aminoanthracen und Diclofenac).

Tabelle 22: Übersicht der Performance des Intra- und Inter-day Assays sowie des linearen Arbeitsbereichs mit den entsprechenden Bestimmungs- (BG) und Nachweisgrenzen (NWG)-für die jeweiligen Analyten in µg/L. Die Werte für Intra- (0,1 µg/L) und Inter-day (20 µg/L) Assay werden als relative Standardabweichung (SD %) angegeben. Diese Analyten wurden im negativen Ionisierungsmodus gemessen.

Analyt	Intra-day SD [%]	Inter-day SD [%]	Linearer Bereich [µg/L]	R^2	BG [µg/L]	NWG [µg/L]
Oxipurinol	7,54	47,36	0,25 - 50	>0,999	2,03	7,15
Acesulfam	2,89	36,19	0,05 - 50	0,999	1,98	6,79
PFBuA	1,55	18,43	0,05 - 50	>0,999	1,57	5,38
Nitrofurantoin	1,45	35,88	0,1 - 50	>0,999	1,63	5,62
PFBuS	3,34	14,57	0,05 - 50	0,999	2,52	8,63
Flutaminde	3,13	29,59	0,05 - 50	>0,999	1,41	4,85
PFOA	1,18	11,78	0,05 - 50	0,999	2,85	9,73
PFOS	2,66	30,38	0,05 - 50	0,996	4,77	16,5

Tabelle 23: Übersicht der Ergebnisse aus Intra- und Inter-day Assay sowie des linearen Arbeitsbereichs mit den entsprechenden Bestimmungs- (BG) und Nachweisgrenzen (NWG)-für die jeweiligen Analyten in µg/L. Die Werte für Intra- (0,1 µg/L) und Inter-day (20 µg/L) Assay werden als relative Standardabweichung (SD %) angegeben. Diese Analyten wurden im positiven Ionisierungsmodus gemessen.

Analyt	Intra-day SD [%]	Inter-day SD [%]	Linearer Bereich [µg/L]	R ²	BG [µg/L]	NWG [µg/L]
Metformin	2,65	34,80	0,05 - 50	0,994	5,80	20,1
N-Guanylurea	3,01	26,97	0,05 - 50	0,992	6,74	24,0
2-Methyl-4-Isothiazolinon	4,05	28,30	2,5 - 50	0,999	5,31	18,9
Amidotrizoe acid	29,0	28,75	2,5 - 50	0,999	3,91	14,0
4-Nitro-o-phenylendiamin	2,68	31,80	0,25 - 50	>0,999	1,81	6,27
1H-Benzotriazol	1,03	25,05	0,1 - 50	>0,999	1,75	6,01
Mitomycin C	35,3	21,38	0,1 - 50	0,999	2,86	9,81
Sucralose	6,04	24,06	0,05 - 50	0,996	4,55	16,7
4-Nitrochinolin-1-oxide	3,02	21,14	0,05 - 50	>0,999	1,58	5,42
2-Aminoanthracen	1,19	26,27	0,05 - 50	0,999	2,35	8,05
Dexametason	2,55	25,30	0,05 - 50	0,999	2,07	7,08
Mifepiston	1,42	20,34	0,05 - 50	>0,999	1,34	4,59
Corticosterone	0,93	20,47	0,25 - 50	>0,999	1,98	6,85
Parathion-Methyl	6,92	33,45	0,5 - 50	>0,999	2,16	7,52
17-β-Estradiol	1,51	23,77	0,25 - 50	>0,999	2,10	7,25
Malathion	1,03	26,34	0,05 - 50	>0,999	1,68	5,75
Tamoxifen	1,76	13,72	0,05 - 10	>0,999	0,41	1,14
Parathion(-Ethyl)	4,19	26,77	0,25 - 50	0,999	3,56	12,3
Diclofenac	2,10	20,34	0,05 - 50	>0,999	1,56	5,33
Dihydrotestosterone	7,02	19,32	1,0 - 50	>0,999	2,87	10,1
Progesterone	1,69	19,29	0,1 - 50	>0,999	1,83	6,28
Chlorpyrifos-Methyl	1,03	21,45	0,05 - 50	>0,999	1,53	5,24
Chlorpyrifos(-Ethyl)	1,00	20,69	0,05 - 50	>0,999	1,63	5,59

Exemplarische Chromatogramme der Kalibrierung für den positiven und negativen Ionisierungsmodus sind in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt. Im positiven Ionisierungsmodus liegen Retentionszeiten teilweise nah beieinander, was zu Überlagerungen mehrerer Peaks führt. Aufgrund des selektiven Analyseverfahrens lassen sich die Analyten jedoch eindeutig voneinander unterscheiden, sodass diese Überlagerungen als unkritisch bewertet wurden. Die einzelnen Peaks mit den entsprechenden Retentionszeiten und gemessenen Konzentrationen der Substanzen sind in den Abbildungen 4 und 5 zu finden. Insgesamt konnte die Methode mit wenigen Ausnahmen (Amidotrizoesäure, Mitomycin C) erfolgreich validiert werden. Alle Zielsubstanzen der DA-EDA-Stammlösung konnten mittels LC-MS/MS nachgewiesen werden und sind ausreichend stabil, um in weiteren Analysen quantifiziert zu werden.

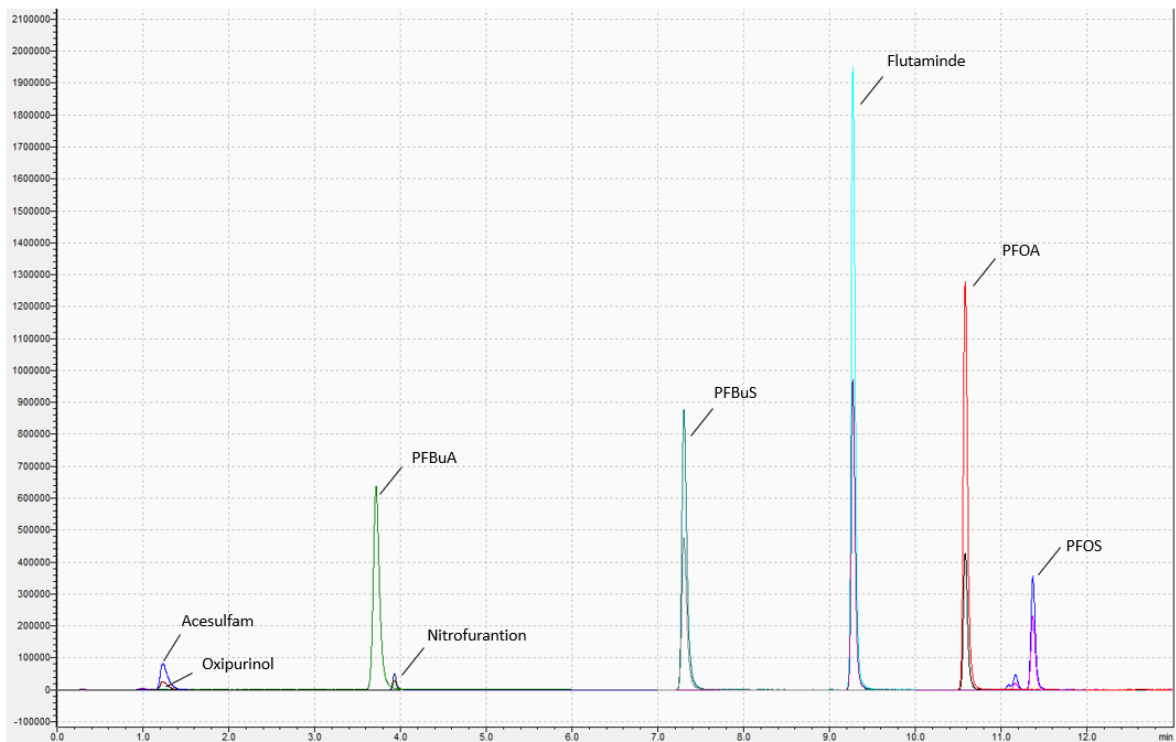


Abbildung 4: Chromatogramm der Kalibrierung bei einer Konzentration von 10 µg/L im negativen Ionisierungsmodus mit den jeweiligen Retentionszeiten (x-Achse) und Intensitäten (y-Achse).

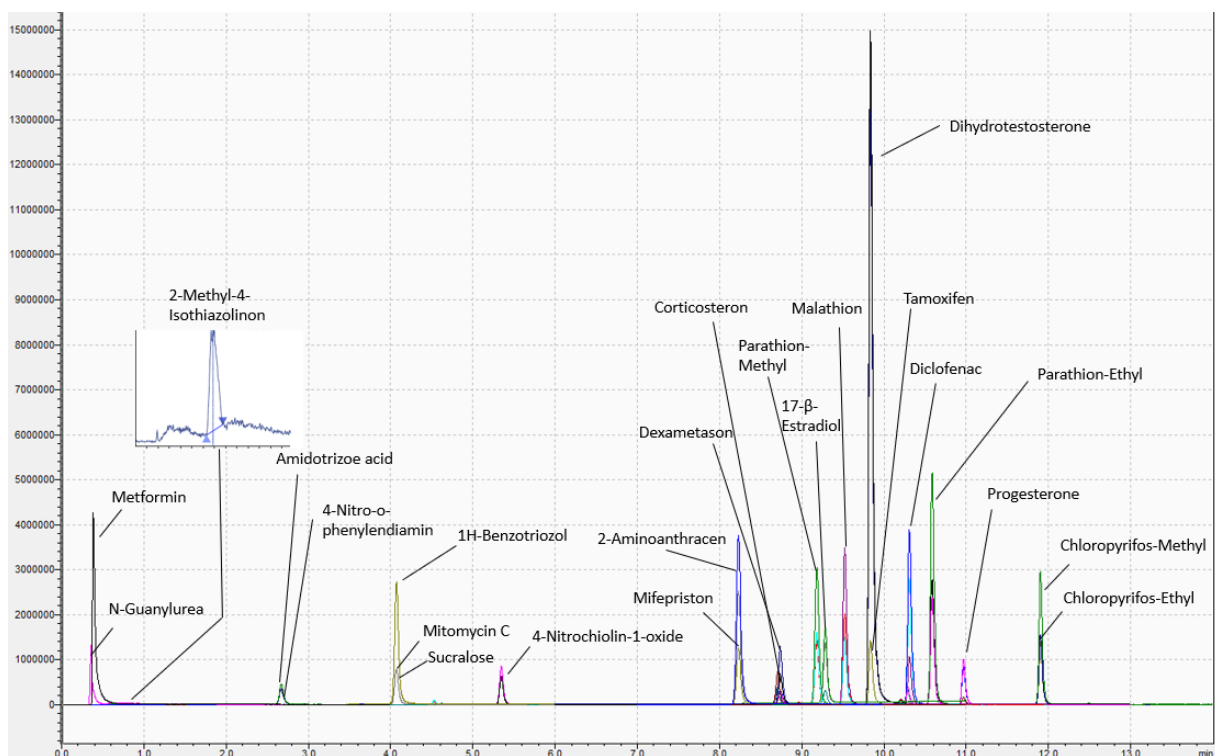


Abbildung 5: Chromatogramm der Kalibrierung bei einer Konzentration von 10 µg/L im positiven Ionisierungsmodus mit den jeweiligen Retentionszeiten (x-Achse) und Intensitäten (y-Achse). Eine Vergrößerung des 2-Methyl-4-Isothiazolinon-Peaks ist im Chromatogramm enthalten, da dieser aufgrund seiner geringen Intensität im Vergleich zu den anderen Substanzen nicht sichtbar war.

Tabelle 24: Detaillierte Parameter der einzelnen Zielsubstanzen für die massenspektrometrische Detektion, einschließlich ihrer Retentionszeit (t_R) für beide chromatographischen Säulen.

Analyt	Addukt	Vorläuferion [m/z]	Produktion [m/z]	t_R Eclipse Plus [min]	t_R HSS T3 [min]
Metformin	M+H ⁺	130	71, 6	0,43	0,88
N-Guanylurea	M+H ⁺	103	60, 4	0,36	0,77
Oxypurinol	M+H ⁺	151	108, 4	0,50	2,68
Acesulfam	M+H ⁺	162	82, 8	1,50	3,13
2-Methyl-4- Isothiazolinon	M+H ⁺	116	101, 7	1,37	3,28
Amidotrizoe acid	M+NH ₄ ⁺	632	361, 2	2,00	3,94
4-NOPD	M+H ⁺	154	107, 8	2,45	4,48
Nitrofurantion	M+H ⁺	237	152, 4	4,00	5,86
1H-Benzotriazol	M+H ⁺	120	65, 4	4,11	6,36
Mitomycin C	M+H ⁺	335	252, 1	4,61	6,35
Sucralose	M+H ⁺	419	239, 2	4,61	6,57
PFBuA	M+H ⁺	213	169,0	3,60	6,68
4-Nitrochinolin-1- oxide	M+H ⁺	191	145, 1	5,46	7,74
PFBuS	M+H ⁺	299	99, 80	7,30	9,44
2-Aminoanthracen	M+H ⁺	194	177, 2	8,00	10,07
Dexametason	M+H ⁺	393	373, 4	8,94	10,80
Mifepriston	M+H ⁺	430	372, 1	8,93	10,91
Corticosteron	M+H ⁺	347	329, 3	8,98	10,92
Parathion-Methyl	M+H ⁺	264	109, 8	9,21	11,14
17- β -Estradiol	M-H ₂ O+H ⁺	255	159, 1	9,61	11,44
Flutaminde	M+H ⁺	275	205, 2	9,56	11,39
Malathion	M+H ⁺	331	285, 1	9,78	11,61
Tamoxifen	M+H ⁺	372	72, 4	10,42	11,66
PFOA	M+H ⁺	413	369, 2	10,50	12,35
Parathion-Ethyl	M+H ⁺	292	264, 2	10,75	12,38
Diclofenac	M+H ⁺	296	250, 2	10,64	12,32
Dihydrotestosterone	M+H ⁺	291	273, 3	10,50	12,46
PFOS	M+H ⁺	499	99, 8	11,25	13,00
Progesterone	M+H ⁺	315	110, 0	10,90	12,86
Chlorpyrifos-Methyl	M37Cl+H ⁺	324	125, 8	11,30	13,08
Chlorpyrifos-Ethyl	M37Cl+H ⁺	352	201, 0	12,30	13,97

Tabelle 25: Allgemeine Parameter der LC-MS/MS Methode (LC40 Nexera X3 und LCMS-8060, Shimadzu).

Parameter	Einstellung
Chromatography column	ZORBAX RRHD Eclipse Plus, C18 2.1x50 mm, 1.8 μ m
T (autosampler) [C°]	10
V (injection) [μ L]	10
T (column) [C°]	40
Flow rate [mL/ min]	0,4
Eluent A	H ₂ O + 0,1 % FA
Eluent B	MeOH + 0,1 % FA
Ionization	ESI +/-
Capillary voltage [kV]	+ 4/ - 3
T (interface) [C°]	400
T (desolvation line) [C°]	250
T (heat block) [C°]	400
Gas flow (nebulizer) [L/ min]	3
Gas flow (heating gas) [L/ min]	10
Gas flow (drying gas) [L/ min]	10
T (dwell) [C°]	10

Tabelle 26: Gradientenprogramm der LC-MS/MS Methode.

T [min]	Eluent B [%]
0.0	1
0.5	1
14.0	99
16.0	99
16.1	1
18.5	1

2.6. Schritt 6: Optimierung von Wiederfindungen unterschiedlicher Sorbentien, Optimierung des Anreicherungsprotokolls sowie Entwicklung und Herstellung einer Multi-Layer-SPE Kartusche (AP3, FE 1)

In diesem Schritt wurden die Sorbentsmaterialien hinsichtlich ihres Diskriminierungsgrades charakterisiert. Dazu wurde die Wiederfindung der Referenzsubstanzen bestimmt. Anschließend erfolgte eine Optimierung der Wiederfindung, indem unterschiedliche Parameter wie beispielsweise pH-Wert, Sorbentsmenge, Art des Keepers und Lösungsmittel getestet wurden. Basierend auf den Ergebnissen wurde das Anreicherungsverfahren fortlaufend optimiert und eine geeignete Sorbentskombination für eine möglichst diskriminierungsarme Anreicherung vorgeschlagen (Kapitel 2.6.1).

Unter Berücksichtigung weiterer Faktoren, wie beispielsweise der Kompatibilität von Sorbentsmaterialien oder Reagenzien mit EBM, wurde eine SPE-Kartusche mit zwei Schichten unterschiedlicher Anreicherungsmaterialien entwickelt (Kapitel 2.6.2) (im weiteren als DA-EDA-Kartusche bezeichnet) und hergestellt (Kapitel 2.6.3).

2.6.1. Charakterisierung von Sorbentien und Optimierung von Wiederfindungen

Im Rahmen der Optimierung von Rekonstitutions- und Elutionsmethoden für die Extraktion und Anreicherung von Substanzen wurde eine Vielzahl von Tests mit unterschiedlichen Sorbentien (Tabelle 27) und Parametern durchgeführt.

Zunächst wurde der Einfluss der Rekonstitution auf die Wiederfindung der Referenzsubstanzen getestet, indem drei unterschiedliche Ansätze untersucht wurden. Nach dreifacher Elution mit Methanol (MeOH) und Ethylacetat (EtAc) wurde das Eluat evaporiert und mit H₂O + 0,1 % FA (Trocknung+H₂O) oder H₂O + 0,1 % FA mit 10 % DMSO (Trocknung+DMSO) rekonstituiert. Zudem wurde in einer dritten Variante DMSO bereits vor der vollständigen Evaporation des Eluats als Keeper angewendet. Für die Untersuchungen wurden die Kartuschen Oasis HLB und Isolute ENV+ miteinander (500 mg) verglichen, wobei nur die Ergebnisse für Isolute ENV+ in Abbildung 6 dargestellt sind. Der Keeper verbesserte die Wiederfindungsraten der

unpolaren Substanzen, wie zum Beispiel Flutamid und Progesteron signifikant. Bei polaren Verbindungen wurde hingegen kein Unterschied festgestellt. Isolute ENV+ zeigte im Vergleich zu Oasis HLB eine bessere Anreicherung von unpolaren Stoffen und eine höhere Wiederfindung.

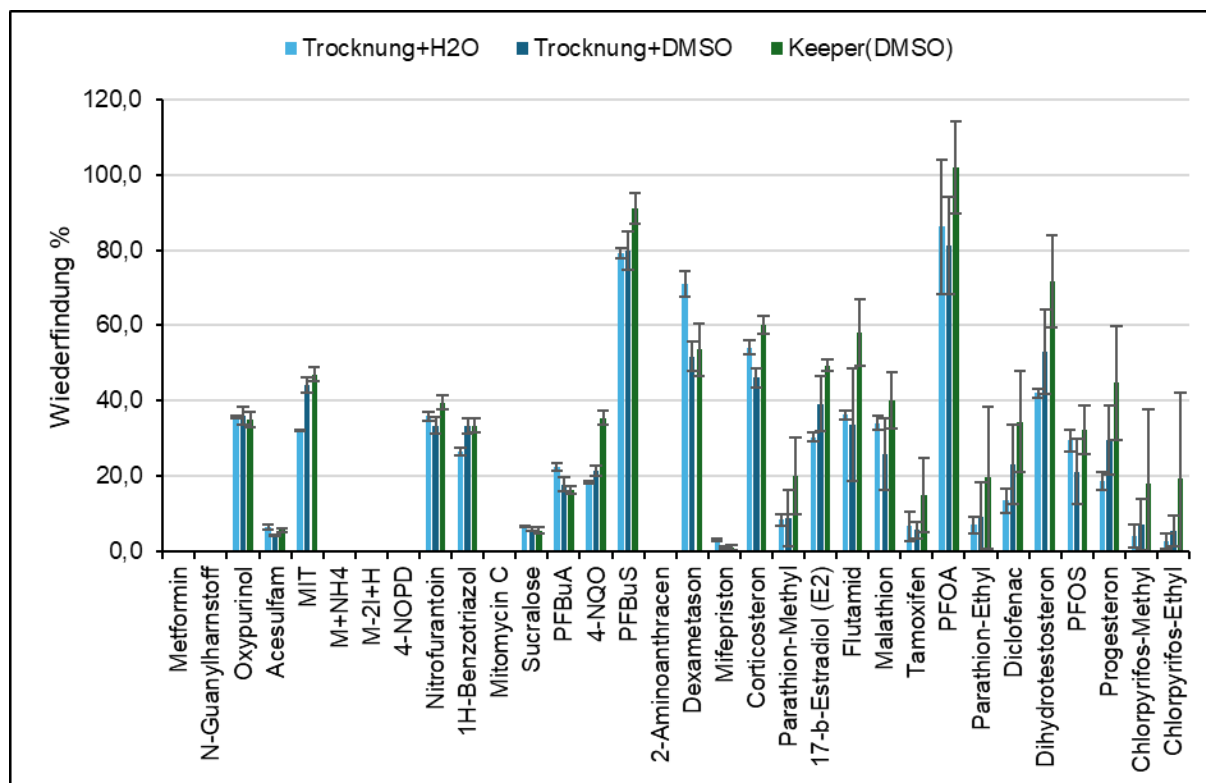


Abbildung 6: Wiederfindungsraten der ersten Testmethode mit Isolute ENV+ (500 mg) bei verschiedenen Rekonstitutionsmethoden.

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss der sauren Rekonstitution ($\text{H}_2\text{O} + 0,1\% \text{ FA}$) auf die Wiederfindung bestimmt. Sowohl bei Oasis HLB als auch bei Isolute ENV+ zeigte sich, dass ein saurer pH-Wert im Vergleich zu neutraler Rekonstitution mit Reinstwasser, insbesondere für unpolare Stoffe, zu höheren Wiederfindungen führte. Für die Rekonstitutionsmethode erwies sich im Hinblick auf die Wiederfindung der Referenzsubstanzen die Verwendung eines sauren Keepers (DMSO mit $0,1\% \text{ FA}$) als beste Variante.

Um die Elution der Referenzsubstanzen von den Sorbentsmaterialien zu optimieren, erfolgten für die Kartuschen Oasis HLB und Isolute ENV+ Versuche zur sequenziellen Elution mit unterschiedlichen Lösungsmittelkombinationen. Es wurden jeweils $3 \times 3 \text{ mL}$ MeOH und ACN, sowie ein Gemisch aus MeOH und ACN (50:50, v/v) verwendet. Zudem wurde für beide Versuche eine nachfolgende Elution mit $3 \times 3 \text{ mL}$ EtAc getestet. Die in Abbildung 7 dargestellten Analyseergebnisse zeigen, dass Isolute ENV+ bei sequenzieller Elution, insbesondere für unpolare Stoffe, signifikant höhere

Wiederfindungen als mit dem MeOH/ACN-Gemisch erzielt. Die besten Wiederfindungen konnten bei der Elution mit jeweils 3x 3 mL MeOH, ACN und EtAc festgestellt werden. Daher wurde diese Elution für nachfolgende Untersuchungen festgelegt. Die Wiederfindungsraten der Kartusche Oasis HLB veränderten sich bei unterschiedlicher Elution nur geringfügig.

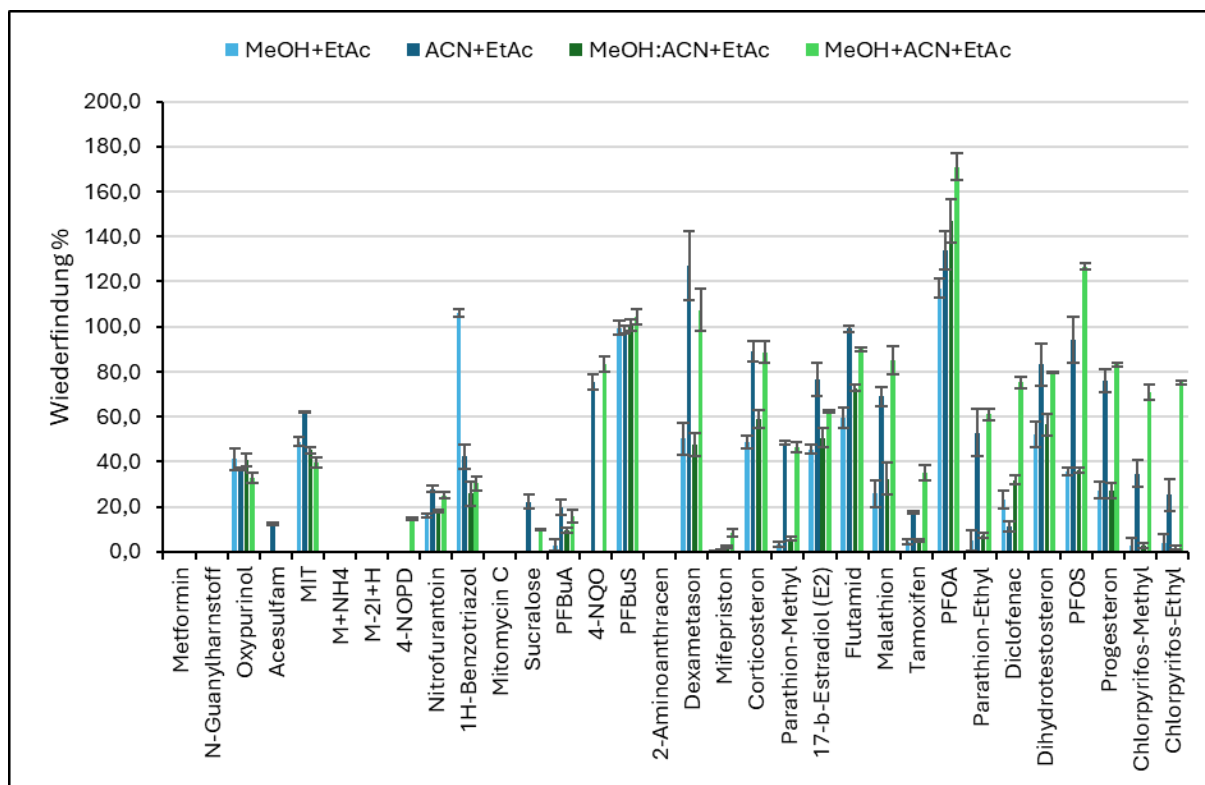


Abbildung 7: Einfluss verschiedener Elutionsmittel auf die Wiederfindungsraten der Referenzsubstanzen. Die gezeigten Ergebnisse wurden mit Isolute ENV+ (500 mg) bei einem Probenvolumen von 0,5 L und pH 7 erzielt.

Durch Anwendung der zuvor optimierten Schritte wurden daraufhin weitere Kartuschenmaterialien (Strata AC, Strata X, Strata X-CW, Strata X-AW und Agela AC, Tabelle 27) bei neutraler Anreicherung und Elution mit den zuvor getesteten Kartuschen verglichen. Dabei zeigte sich, dass die silikagelbasierte C18 Hydra nur eine geringe Anzahl von Substanzen mit Wiederfindungen > 10 % anreichern konnte. Strata X erzielte ähnliche Ergebnisse wie Isolute ENV+, einige Substanzen konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. Strata X-CW und Strata X-AW wiesen tendenziell niedrigere Wiederfindungen auf, Strata X-AW konnte im Gegensatz zu Isolute ENV+ einige saure Substanzen anreichern, während basische Verbindungen nicht angereichert werden konnten. Die beiden kohlebasierten Sorbentien Strata AC und Agela AC zeigten niedrige Wiederfindungen. Wohl aufgrund der größeren Menge und

starken Adsorption der Aktivkohle konnten mit Strata AC zudem insgesamt nur vier Substanzen im Eluat nachgewiesen werden.

Da bei den vorliegenden Bedingungen keines der Materialien einen Vorteil für eine Multi-Layer-Kartusche bieten konnte, wurde das Verfahren zunächst mit den verschiedenen Materialien weiter optimiert.

Tabelle 27: Charakterisierte SPE-Kartuschen mit Angaben zum Sorbents-Typ, Sorbentsmenge und Hersteller

SPE-Kartusche	Sorbents-Typ	Sorbentsmenge	Hersteller
Oasis HLB	Polymer + Umkehrphase	1,2 g	Waters
ISOLUTE® ENV+	Polymer + modifiziert	0,2 g; 0,5 g; 1,0 g	Biotage
Strata® X	Polymer+ Umkehrphase	0,2 g	Phenomenex
Strata® X-AW	Polymer + Anionenaustauscher	0,2 g	Phenomenex
Strata® X-CW	Polymer + Kationenaustauscher	0,2 g	Phenomenex
Strata® AC	Aktivkohle	2,0 g	Phenomenex
Agela AC	Aktivkohle	0,2 g	Agela
Chromabond C18	Kieselgel + Umkehrphase	0,5 g	Macherey-Nagel
Chromabond HLB	Polymer + Umkehrphase	0,2 g	Macherey-Nagel
Chromabond PCA	Kieselgel + Kationenaustauscher	0,5 g	Macherey-Nagel
Chromabond WAX	Polymer + Anionenaustauscher	0,2 g; 0,15 g	Macherey-Nagel
Chromabond AC	Aktivkohle	0,5 g	Macherey-Nagel

Zunächst wurden mögliche Anpassungen bei der Elution untersucht. Dazu wurden Versuche zur sauren Elution mit Isolute ENV+ und verschiedenen Ionenaustauscher-Materialien (Tabelle 27) und unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Dabei wurde neutral, mit 2 % Ameisensäure oder 5 % Ammoniumhydroxid eluiert. Es zeigte sich, dass Isolute ENV+ in der sauren Elution für viele Substanzen höhere, für einige aber auch niedrigere Wiederfindungen zeigte. Strata X-CW konnte Mifepriston nur mit neutraler und Tamoxifen nur mit saurer Elution anreichern und zeigte etwas höhere Wiederfindungen bei saurer Elution. Strata X-AW hatte generell etwas höhere Wiederfindungen bei neutraler Elution.

Eine weitere Untersuchung befasste sich mit der sauren Anreicherung auf ENV+ und Ionenaustauschern (Tabelle 27) bei verschiedenen pH-Werten. Dabei wurden die Proben mit Ameisensäure angesäuert und mit nicht angesäuerten Proben verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die saure Anreicherung bei pH 2,5 für Isolute ENV+ im Schnitt zu 20 % höheren Wiederfindungen führte als die neutrale Elution. Zudem konnten mehr Stoffe angereichert werden. Strata X-AW erzielte ebenfalls deutlich höhere

Wiederfindungen (30 %) bei saurer Anreicherung. Strata X-CW zeigte hingegen kaum Unterschiede zwischen saurer und neutraler Anreicherung.

Der Einfluss der Sorbentsmenge auf Wiederfindung wurde ebenfalls untersucht. Der Vergleich von Isolute ENV+ mit unterschiedlichen Sorbentsmengen (200 mg, 500 mg und 1000 mg) bei saurer und neutraler Elution ergab nur geringe Unterschiede (Abbildung 8). Da 500 mg zu einer erhöhten Wiederfindung bei Oxypurinol und Mifepriston führte, wurde diese Menge für die Multi-Layer-Kartusche festgelegt. 1000 mg zeigte für die beiden Stoffe zwar ebenfalls hohe Wiederfindungen, führte aufgrund der großen Sorbentsmenge aber zu langen Rekonditionierungszeiten und ist für die Multi-Layer-Kartusche somit ungeeignet. Eine saure Elution führte in allen Fällen zu höheren Wiederfindungen, insbesondere für schwer eluierbare Substanzen.

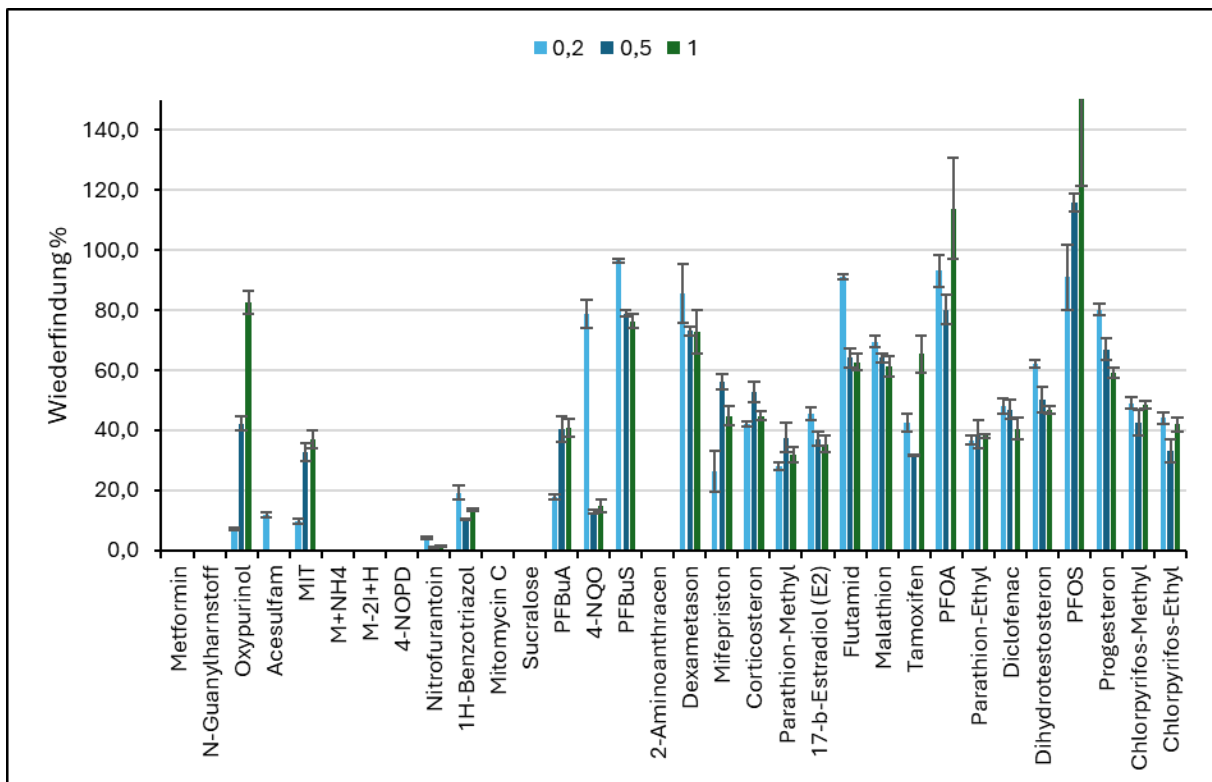


Abbildung 8: Wiederfindungsraten für die Verwendung unterschiedlicher Sorbentsmengen von Isolute ENV+ bei einem Probenvolumen von 1L, Anreicherung bei pH 2,5 und saurer Elution mit 2% FA in MeOH, ACN und EtAc.

Die besten Wiederfindungen wurden innerhalb des Säulenscreenings für Isolute ENV + bei saurer Konditionierung mit 3x 3 mL Ethylacetat, 3x 3 mL Methanol und 3x3 mL Reinstwasser (pH-Wert 2,5), saurer Anreicherung (pH-Wert der Proben = 2,5), sequenzieller saurer Elution mit 3x 3 mL MeOH, ACN und EtAc (alle mit 2 % FA) und saurem Keeper (DMSO mit 0,1 % FA) ermittelt.

Im nächsten Schritt wurde eruiert, welche Sorbentsmaterialien (Tabelle 27) in der Lage sind Substanzen anzureichern, die durch Isolute ENV+ nicht angereichert wurden, um diese als weitere Festphasen in der Multi-Layer-Kartusche zu integrieren. Dazu wurden weitere Kartuschenmaterialien bei optimierten Bedingungen getestet und mit Isolute ENV+ verglichen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 8, 9 und 10 für verschiedene Materialtypen gezeigt. Die Tests zeigen, dass mit Isolute ENV+ der Analyt Oxypurinol angereichert werden konnte. Acesulfam und Sucralose retardieren auf keiner der eingesetzten Festphasen. Die Wiederfindungen der Kationenaustauscher werden in Abbildung 8 mit der Wiederfindung von Isolute ENV+ verglichen. Dabei konnten Strata X-CW und Chromabond PCA vergleichbare Ergebnisse bei unpolaren Substanzen erzielen. Polare Analyten retardierten weder auf der Strata X-CW noch auf der Chromabond PCA. Im mittleren Polaritätsbereich zeigt Strata X-CW ein besseres Rückhaltevermögen als der weitere Kationenaustauscher. Beide Phasen ähneln jedoch sehr dem Analytfenster von Isolute ENV+.

Bei den auf Aktivkohle basierenden Materialien konnten mithilfe der Agela AC Festphase mehr Substanzen angereichert werden als mit dem Konkurrenzprodukt Chromabond Carbon A. Zudem zeigte sich eine höhere oder vergleichbare Wiederfindung für Agela AC, wenn Analyten auf beiden Phasen retardierten (Abbildung 10). Es konnten auch polare Substanzen retardiert werden. Allerdings gab es keine Substanzen, die nicht auch mit Isolute ENV+ angereichert wurden. Bei den Anionenaustauschern, wie in Abbildung 11 dargestellt, konnte Chromabond WAX Acesulfam retardieren und erzielte höhere Wiederfindungen als Strata X-AW. Daher wurde Chromabond WAX als vielversprechendste Kombination mit Isolute ENV+ identifiziert.

Auf Basis der erhobenen Wiederfindungen wurde außerdem entschieden keine Schicht aus Aktivkohle-basierten Materialien in die Multi-Layer-Kartusche einzubringen, da die Elutionskraft der Lösungsmittel häufig nicht ausreicht, um die retardierten Substanzen wieder von der Aktivkohle zu eluieren.

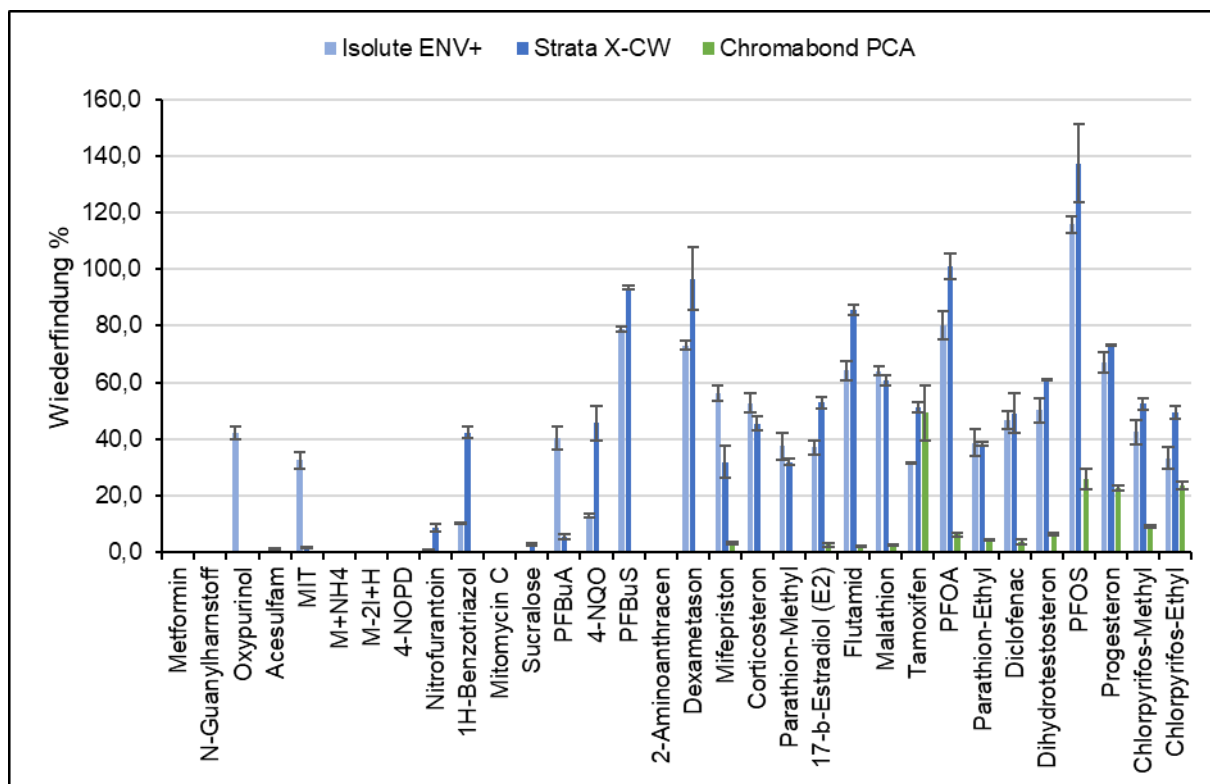


Abbildung 9: Kationenaustauscher als Sorbentsmaterial im Vergleich zu Isolute ENV+, Strata X-CW (6 mL, 200 mg) und Chromabond PCA.

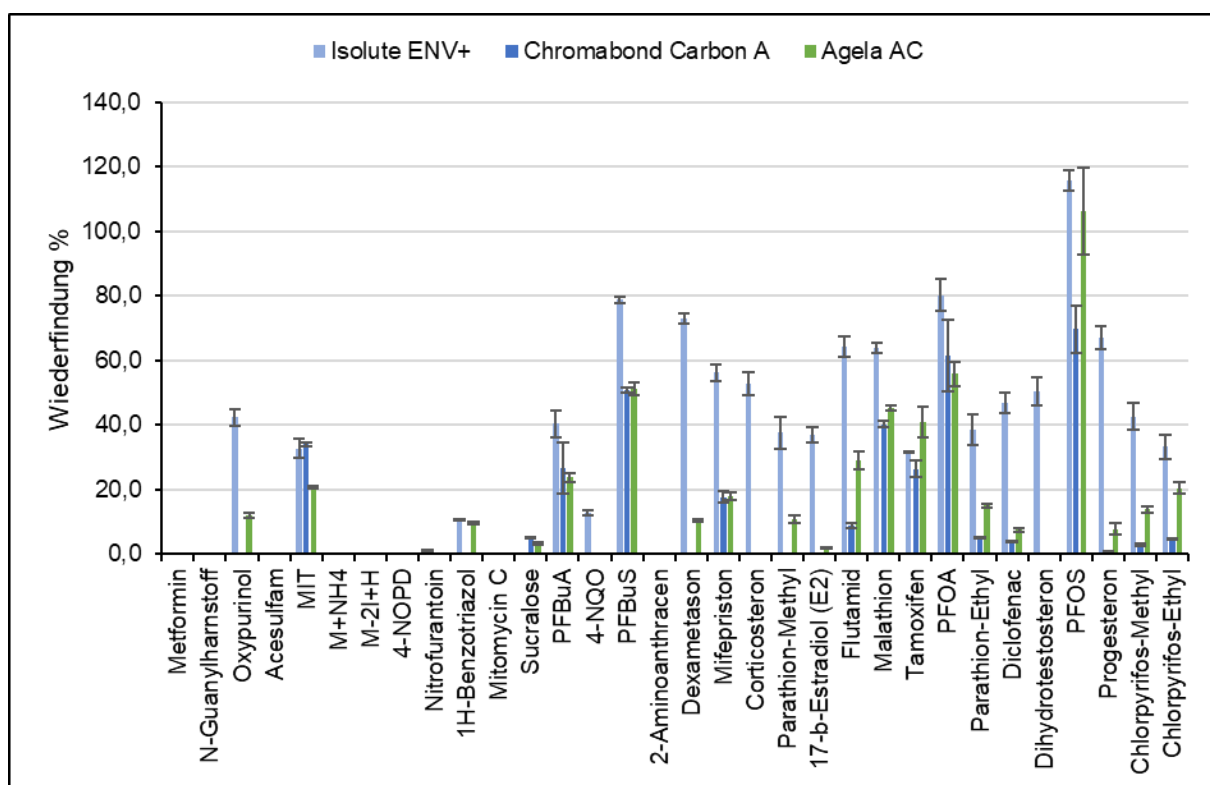


Abbildung 10: Wiederfindungsraten Aktivkohle- bzw. Graphit-basierter Sorbentsmaterialien im Vergleich mit Isolute ENV+. Chromabond Carbon A (6 mL, 500 mg), Agela AC (6 mL, 500 mg).

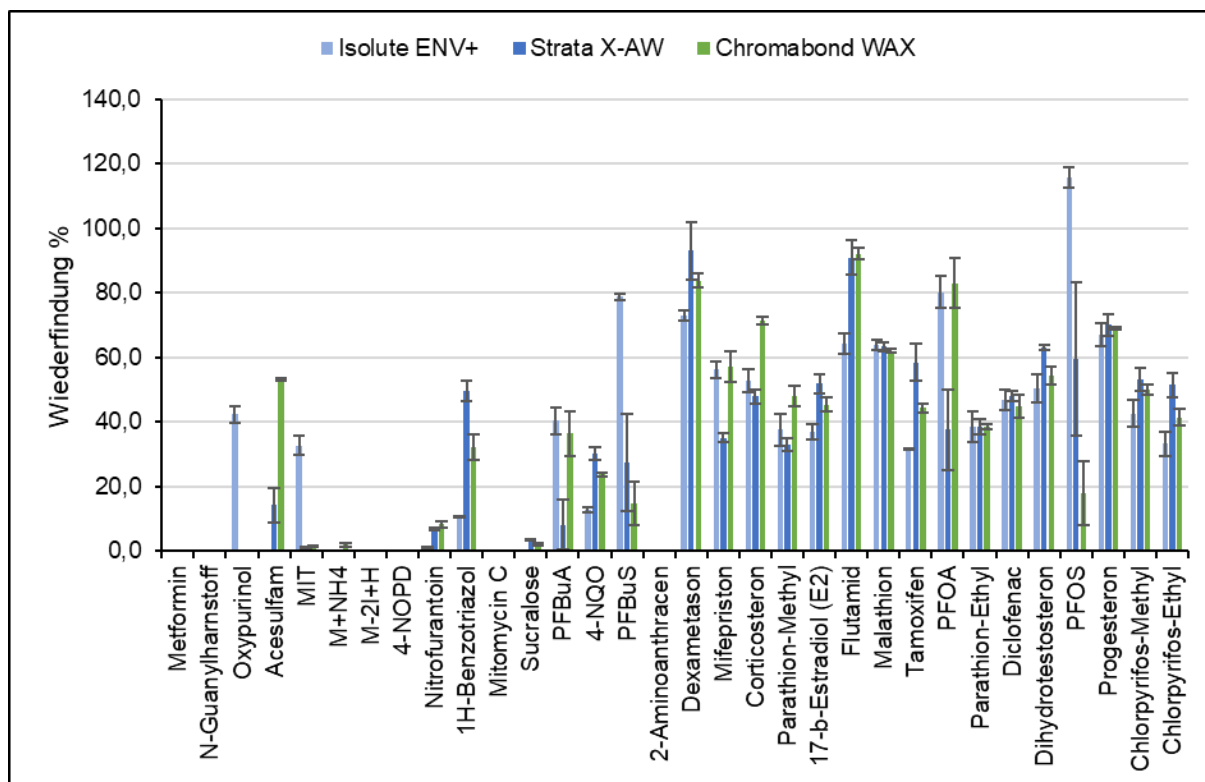


Abbildung 11: Materialien mit Anionenaustauscher Strata X-AW (6 mL, 200 mg) und Chromabond WAX (6 mL, 150 mg) im Vergleich zu Isolute ENV+.

Eine Multi-Layer-Kartusche wurde aus Isolute ENV+ und Chromabond WAX erstellt und mithilfe der optimierten Methode wurde eine Anreicherung durchgeführt. Die optimierte Methode beinhaltete eine saure Konditionierung mit 3x 3 mL Ethylacetat, 3x 3 mL Methanol und 3x 3 mL Reinstwasser (pH-Wert 2,5), eine saure Anreicherung (pH-Wert der Proben = 2,5), eine sequenzielle saure Elution mit 3x 3 mL MeOH, ACN und EtAc (alle mit 2 % FA) und die Rekonstitution in saurem Keeper (DMSO mit 0,1 % FA).

Mit der Kombination beider Festphasen konnten zunächst 23 Substanzen angereichert werden. Der pH-Wert der Anreicherung wurde daraufhin auf 2 erniedrigt, was für Mifepriston und 1H-Benzotriazol zu einer verbesserten Wiederfindung führte. Um die Robustheit der Methode und die Anwendbarkeit auf verschiedene Probenmatrices zu überprüfen, wurde die Kombination auf vier verschiedene Wässer angewandt. Diese umfassten Trinkwasser, Grundwasser, Oberflächenwasser und einen Kläranlagenablauf. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt. Insgesamt wurde die Anreicherung von 26 Referenzsubstanzen in allen getesteten Realmatrices erzielt. Proben aus Oberflächenwasser und Kläranlagenablauf zeigten bei einigen Substanzen ohne Anreicherung bereits hohe Kontaminationen außerhalb des Messbereichs, wodurch für diese Stoffe keine Wiederfindungen bestimmt werden

konnten. Andere Substanzen wurden jedoch auch in Gegenwart verschiedener Matrices mit akzeptablen Wiederfindungen angereichert. Dies zeigt, dass auch bei hohen Konzentrationen von konkurrierenden Analyten eine Anreicherung in der kombinierten Methode möglich ist.

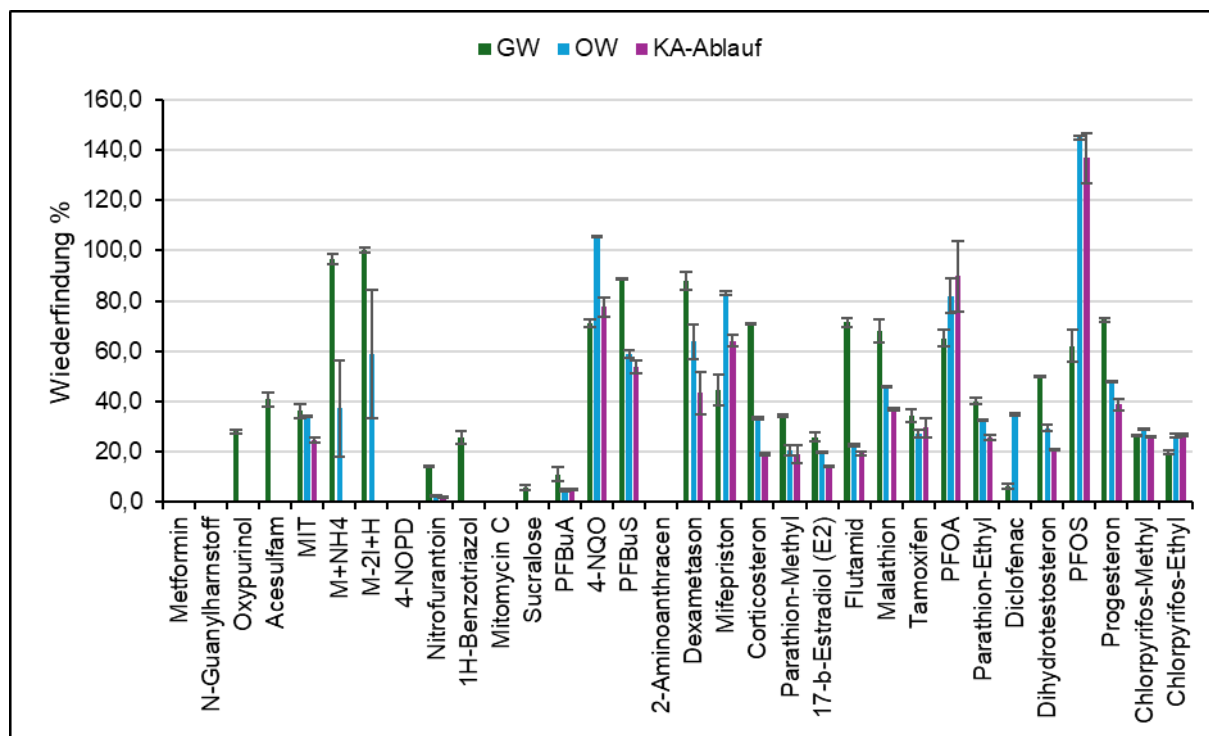


Abbildung 12: Wiederfindung bei verschiedenen Realproben. Die gezeigten Realmatrices sind Grundwasser (GW), Oberflächenwasser (OW) und Kläranlagenablauf (KA-Ablauf).

2.6.2. Entwicklung der DA-EDA-Kartusche und Anpassung des Anreicherungsprotokolls

Aus den zuvor beschriebenen Untersuchungen auf Basis der instrumentellen Analytik ergaben sich 200 mg Chromabond Wax und 500 mg ISOLUTE ENV+ als beste Sorbentskombination. Für die Konditionierung erwiesen sich 3x 3 mL Ethylacetat, 3x 3 mL Methanol und 3x3 mL Reinstwasser (pH-Wert 2,5) für 6 mL Kartuschen am geeignetsten. Die Anreicherung erfolgte sauer, indem der pH-Wert der Proben mit Salzsäure auf 2,5 eingestellt wurde. Für die sequenzielle Elution wurden die beste Wiederfindung mit 3 x 3 mL MeOH, ACN und EtAc, welche alle mit 2 % FA versetzt wurden, bestimmt. Da Ameisensäure sich jedoch als nicht kompatibel mit einigen der Bioassays zeigte, wurde eine neutrale Elution mit reinen Lösemitteln angewandt. Die Rekonstitution erfolgte mit DMSO als Keeper. Das optimierte Anreicherungsprotokoll ist in Kapitel 2.6.2.1 beschrieben.

2.6.2.1. Optimiertes Anreicherungsprotokoll

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus Schritt 6: „Optimierung von Wiederfindungen unterschiedlicher Sorbentien sowie Entwicklung und Herstellung einer Multi-Layer-SPE Kartusche“, wurde das zuvor beschriebene Anreicherungsprotokoll entsprechend überarbeitet und angepasst. Ab Schritt 7 wurde für alle Arbeiten das nachstehende Anreicherungsprotokoll angewandt.

Optimiertes Anreicherungsprotokoll:

1. Saure Konditionierung der Kartuschen: 3x3 mL Ethylacetat, 3x3 mL Methanol und 3x3 mL Reinstwasser (pH-Wert 2,5) für 6 mL Kartuschen
2. Saure Anreicherung: pH-Wert der Proben mit Salzsäure auf 2,5 einstellen und etwa 1 L Probe pro Stunde über die Kartusche anreichern (Tropfend, kein durchgängiger Wasserstrahl). Anreicherung kurz vor dem Trockenlaufen beenden.
3. Trocknung des Sorbentsmaterials im Stickstoffstrom
4. Sequenzielle Elution: In angegebener Reihenfolge mit 3x3 mL MeOH, 3x3 mL ACN und 3x3 mL EtAc; Lösungsmittel jeweils 1 min mit Hilfe eines Absperrhahns einwirken lassen!
5. Im Evaporator im leichten Stickstoffstrom bei 40 °C auf ca. 1 mL einengen
6. Zugabe von 100 µL DMSO als Keeper und weiter einengen
7. Lagerung bei < -15°C

2.6.3. Herstellung der DA-EDA Kartusche (FE 2)

Zur Herstellung der DA-EDA-Kartuschen, wurden zunächst 200 mg Chromabond Wax und 500 mg ISOLUTE ENV+ abgewogen und mit Hilfe eines Metalltrichters in leere 6 mL Kartuschen gefüllt (Abbildung 13). Anschließend wurden die Schichten mit einem 3D-gedruckten Stempel verdichtet. Die einzelnen Sorbentsschichten wurden durch PE-Filterfritten fixiert und voneinander getrennt. Die fertigen DA-EDA-Kartuschen enthielten insgesamt drei Filterfritten. Die zusammengestellten Kartuschen wurden bis zur Verwendung in Kunststoffbeuteln bei Raumtemperatur gelagert.

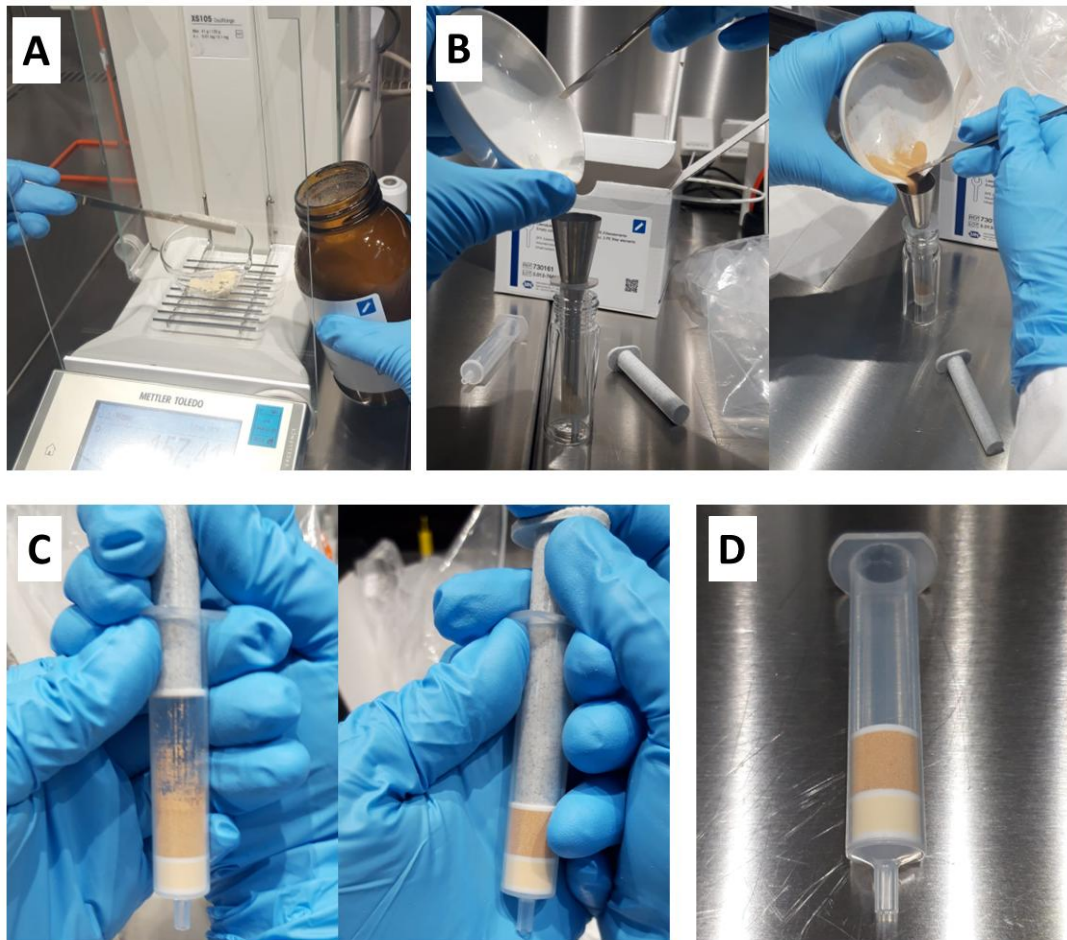


Abbildung 13: Herstellung der DA-EDA-Kartuschen: Einwaage der Sorbentien (A), Befüllung mittels Metalltrichter (B), Einfügen von PE-Filterfritte und Verdichtung mittels Stempel (C), fertige DA-EDA-Kartusche (D).

2.7. Schritt 7: Wirkungsbezogene Charakterisierung der entwickelten DA-EDA-Kartusche (AP4.2, FE 1 und FE 2)

Um die entwickelte DA-EDA-Kartusche in Bezug auf ihre Eignung im Bereich der wirkungsbezogenen Analytik zu untersuchen, wurden zunächst Blindwerte analog zu Kapitel 2.3 unter Berücksichtigung des optimierten Anreicherungsprotokolls (Kapitel 2.6.2.1) hergestellt und mit der Biotestbatterie untersucht. Anschließend wurden Wiederfindungsversuche mit ausgewählten Bioassays durchgeführt, um zu beurteilen, ob das Verfahren in der Praxis umgesetzt werden kann und realistische Ergebnisse liefert. Dazu wurde die entwickelte DA-EDA-Kartusche auch mit einer bereits auf dem Markt erhältlichen Multi-Layer-Kartusche (PMT-Kartusche, Macherey-Nagel) verglichen.

2.7.1. Blindwertanalyse der DA-EDA-Kartusche mittels wirkungsbezogener Analytik

Die Blindwertuntersuchungen waren notwendig, da zum einen das Anreicherungsprotokoll hinsichtlich Konditionierung und Elution optimiert wurde und zum anderen das Sorbentsmaterial Chromabond WAX anfänglich nicht in der Blindwertanalyse berücksichtigt wurde und erst im Zuge von Schritt 6 im Projekt integriert wurde.

Entsprechend wurden von der DA-EDA-Kartusche ebenfalls drei Blindwertreplikate durch Anwendung des optimierten Anreicherungsprotokolls (Kapitel 2.6.2.1) hergestellt und mit der gesamten Biotestbatterie untersucht. Keiner der untersuchten Endpunkte zeigte Auffälligkeiten durch die Blindwerte der selbst hergestellten DA-EDA-Kartuschen. Deshalb wird hier auf die detaillierte Darstellung der Ergebnisse verzichtet. Es ist somit nicht davon auszugehen, dass die hergestellte DA-EDA-Kartusche Substanzen freisetzt, die in den Biotests zu unerwünschten Blindwerten führen.

2.7.2. Wiederfindung von Effekten in Biotests

Um zu beurteilen, ob das entwickelte Anreicherungsverfahren in der Praxis der wirkungsbezogenen Analytik umgesetzt werden kann, wurde die Diskriminierung bei der Anreicherung über die entwickelte DA-EDA-Kartusche mit einzelnen Biotests untersucht. Dazu wurde die Wiederfindung von Referenzsubstanzen berechnet, indem der Effekt in der angereicherten Probe mit dem in der nativen Probe verglichen wurde. In erster Linie sollten dazu alle in der Referenzsubstanzliste ausgeführten Substanzen (DA-EDA-Stammlösung) angereichert werden und der Effekt, mit dem der DA-EDA-Stammlösung verglichen werden. Von den 31 Substanzen in der DA-EDA-Stammlösung, können je nach Biotest, auch mehrere Substanzen an der Wirkung beteiligt sein und Mischungstoxizitäten hervorrufen. Da diese Mischungstoxizitäten in den einzelnen Biotest nicht vorhergesagt werden können, musste zunächst die Wirkung der DA-EDA-Stammlösung im jeweiligen Biotest ermittelt und zytotoxische bzw. inhibierende Effekte ausgeschlossen werden. Dazu wurden Effektkonzentrationen berechnet, aus denen anschließend ein Konzentrationsbereich abgeleitet wurde, indem keine zytotoxischen bzw. inhibierenden Effekte vorlagen. Dieser Konzentrationsbereich wurde dann für die Versuche zur Bestimmung der Wiederfindung in den Biotests angewendet.

Die Versuche zur Wiederfindung wurden zudem parallel mit der PMT-Kartusche (Forschungsmuster von Macherey-Nagel) durchgeführt und verglichen.

2.7.2.1. Bestimmung der Wiederfindung im Leuchtbakterientest und Acetylcholinesterase Hemmtest (FE 2)

Zunächst wurden die EC₅₀-Werte der DA-EDA-Stammlösung in beiden Biotests bestimmt. Dadurch sollten geeignete Konzentrationsbereiche zur Bestimmung der Wiederfindung im LBT sowie im AChE-Hemmtest ermittelt werden. Die DA-EDA-Stammlösung zeigte in allen getesteten Verdünnungsstufen (0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1 und 10 µg Referenzsubstanz/L) einen durchschnittlichen Hemm-Effekt von unter 20 % im LBT und führte im AChE Hemmtest zu keiner signifikanten Inhibition der Enzymaktivität. Eine Bestimmung der Wiederfindung war daher mit der DA-EDA-Stammlösung nicht möglich.

Aus diesem Grund wurde eine höher konzentrierte Stammlösung hergestellt, die allerdings nur aus den beiden Referenzsubstanzen bestand, die im LBT bzw. im AChE Hemmtest eingesetzt werden (LBT: 3,5-Dichlorphenol, AChE Hemmtest: Paraoxon). Dieser Ansatz ermöglicht es mit nur einem Anreicherungsverfahren die Wiederfindung in beiden Tests zu bestimmen. Zudem können Mischungstoxizitäten durch die Substanzen nahezu ausgeschlossen werden. Die Stammlösung wies Konzentrationen von 1,14 g/L Paraoxon und 12,23 µg/L 3,5-Dichlorphenol auf. Mit dieser Stammlösung bestehend aus zwei Referenzsubstanzen wurde 1 L Reinstwasser dotiert. Die dotierten Konzentrationen entsprachen einem Zehntel der Konzentration des EC₅₀ der entsprechenden Referenzsubstanz im jeweiligen Test. Die ermittelten EC₅₀-Konzentrationen betragen 59 µg/L für Paraoxon und 5,5 µg/L für 3,5-Dichlorphenol. Diese Werte wurden zuvor durch unabhängige Mehrfachbestimmungen experimentell bestimmt. Dadurch, dass die Biolumineszenz der *A. fischeri* im LBT durch längere Lagerung etwas nachgelassen hat, ist der EC₅₀ für 3,5-Dichlorphenol im Vergleich zur Etablierung des Assays etwas höher. Anschließend wurde das dotierte Reinstwasser sowohl über die DA-EDA- als auch über die PMT-Kartusche entsprechend dem optimierten Anreicherungsprotokoll (Kapitel 2.6.2.1) je dreimal angereichert. Der Anreicherungsfaktor (EF) betrug 10 000. Das Eluat wurde in den Biotests mit einem REF von 10 getestet. Um die Wiederfindung zu bestimmen, wurde die Wirkung der SPE-Extrakte mit der Wirkung aus der Stammlösung verglichen. Die Wiederfindungsraten in den jeweiligen Biotest sind für beiden Kartuschen in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28: Durchschnittliche Wiederfindung + SD (%) der Effekte im Leuchtbakterientest (LBT) und im Acetylcholinesterase Assay (AChE) für die DA-EDA- und die PMT-Kartusche

Kartusche	LBT (%)	AChE (%)
DA-EDA	57 ± 17	106 ± 21
PMT	73 ± 12	120 ± 14

Die Extrakte zeigten in beiden Biotests eine höhere Wiederfindungsrate für die Extrakte aus PMT-Kartuschen. Der AChE-Inhibitionstest ergab für beide Kartuschen-Typen sehr gute Wiederfindungen von über 100 %, wobei die PMT-Kartusche mit 120 % eine höhere Wiederfindungsrate aufwies als die DA-EDA-Kartusche mit 106 %. Die erhöhten Wiederfindungen liegen allerdings noch im Bereich der Messunsicherheit des AChE Hemmtests.

Die Untersuchungen mit dem LBT ergaben durchschnittliche Wiederfindungsraten von 57 % für die DA-EDA-Kartusche, während die PMT eine durchschnittliche Wiederfindung von 73 % aufwies. Ein möglicher Grund für den Unterschied zwischen den beiden Kartuschen sind die unterschiedlichen Sorbentmaterialien. Beide Kartuschen besitzen je eine Polymerschicht mit Anionen- bzw. Kationenaustauscherkapazität. Die PMT-Kartusche weist zusätzlich noch eine Aktivkohleschicht auf. Bei der DA-EDA-Kartuschen bestehend aus Chromabond WAX und Isolute ENV+ wurde aufgrund der Voruntersuchungen zur Wiederfindung der DA-EDA-Stammlösung entschieden, auf eine zusätzliche Sorbentsschicht aus Aktivkohle zu verzichten, da diese keine entscheidende Verbesserung der Wiederfindungsraten bewirkte. Im Gegensatz dazu enthält die PMT-Kartusche eine Sorbentsschicht aus Aktivkohle, welche für die bessere Anreicherung der Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol verantwortlich sein könnte.

2.7.2.2. Bestimmung der Wiederfindung in *Arxula* Yeast Screens (FE 2)

Unterschiedliche Konzentrationen der DA-EDA-Stammlösung wurden in allen vier Hefetests (A-YES, A-YAS, A-YPS, A-YGS) getestet, um eine detektierbare, nicht zytotoxische Konzentration für die weitere Analyse zu bestimmen. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse des relativen Zellwachstums und der Aktivierung für alle vier Hefetests.

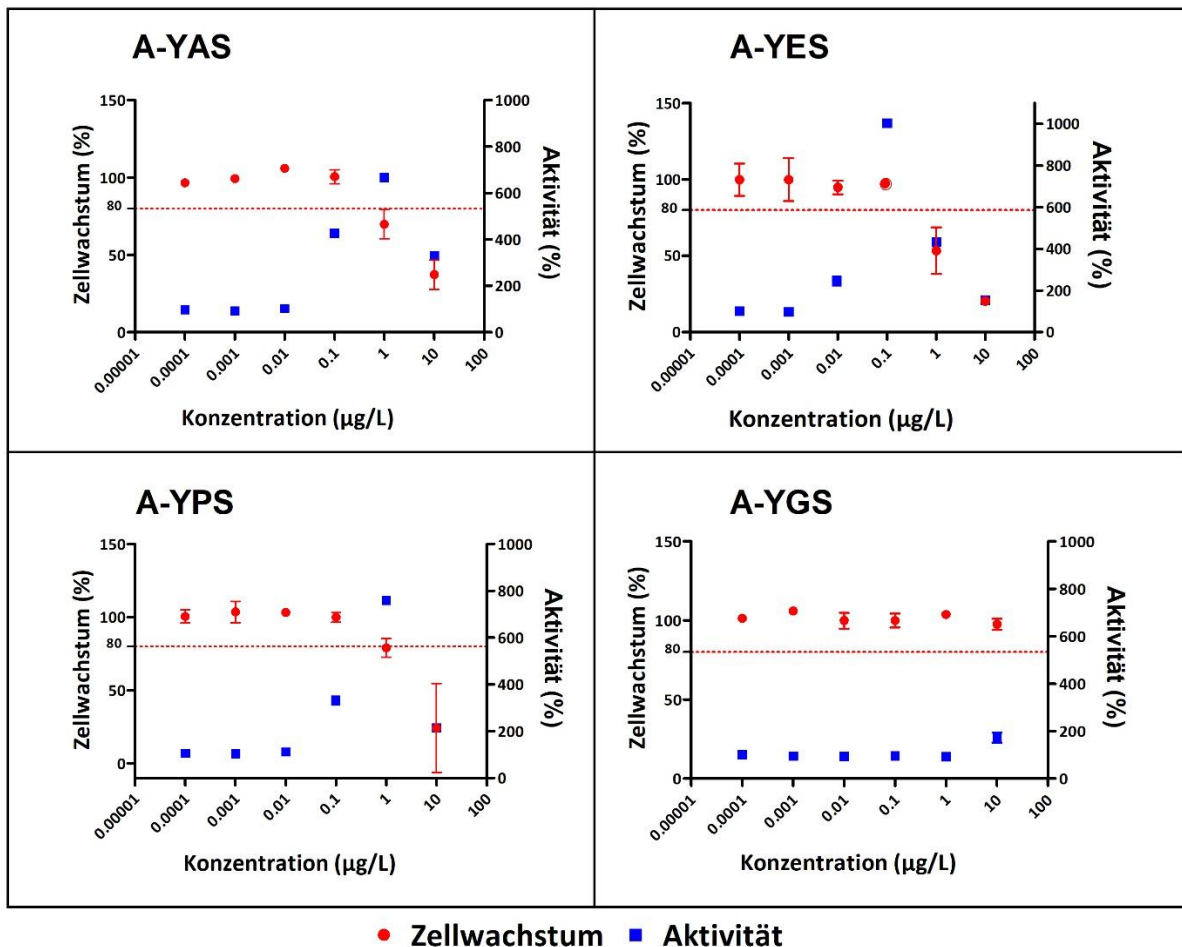


Abbildung 14: Das Zellwachstum und die Aktivität der Hefezellen relativ zur Kontrolle werden als Mittelwerte mit Standardabweichung für alle getesteten Konzentrationen der DA-EDA-Stammlösung in den Assays (A: A-YAS, B: A-YES, C: A-YPS D: A-YGS) dargestellt (n = 3). Einige Fehlerbalken sind nicht sichtbar, da die Standardabweichung zu gering war; alle Standardabweichungen lagen jedoch unter 10 %.

Für die hefebasierten A-YAS, A-YES und A-YPS Assays kam es zu einer übereinstimmenden, geeigneten Konzentration. Bei 1 und 10 µg/L der Referenzsubstanzen in der DA-EDA-Stammlösung wurde eine Hemmung des Zellwachstums festgestellt, (Zellwachstum unter 80 % im Vergleich zur Negativkontrolle), was auf eine zytotoxische Wirkung hinweist. Durch die Verdünnung auf mindestens 10 µg/L betrug die Konzentration des Lösungsmittels Methanol < 1 % (Bestandteil der DA-EDA-Stammlösung) und konnte aufgrund eigener Vorversuche als Ursache für eine erhöhte zytotoxische Wirkung ausgeschlossen werden. Bei diesen Konzentrationen war dennoch die zytotoxische Belastung durch die DA-EDA-Stammlösung zu hoch, sodass mögliche endokrine Effekte durch die zytotoxischen Effekte maskiert werden könnten. Die zytotoxische Last wird bei höheren Konzentrationen durch die synergistischen oder additiven Effekte der unterschiedlichen Substanzen verstärkt, was zu einer Beeinträchtigung der zellulären

Mechanismen und damit zum Zelltod führen kann. Eine deutliche Aktivierung ohne Wachstumshemmung wurde hingegen bei einer Konzentration von 0,1 µg/L erreicht. Unterhalb dieser Konzentration war die DA-EDA-Stammlösung zwar nicht zytotoxisch aber die Aktivierung der Rezeptoren zu gering, weshalb 0,1 µg/L als Konzentration für die folgenden Experimente gewählt wurde. Im Gegensatz dazu ergaben sich für den A-YGS Assay andere Resultate: Hier wurde bei allen getesteten Konzentrationen ein Zellwachstum von > 80 % gemessen. Eine leichte Steigerung der Aktivität trat nur bei der höchsten getesteten Konzentration von 10 µg/L auf. Der A-YGS Assay ist im Vergleich zu den anderen endokrinen Endpunkten mit Hefezellen im µg/L-Bereich relevant. Daraus ergibt sich, dass der A-YGS Assay eine geringere Empfindlichkeit aufweist und höhere Konzentrationen der DA-EDA-Stammlösung erfordert, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Die geringe Empfindlichkeit im Vergleich zu den anderen Assays wurde auch in anderen Studien bereits belegt [19]. Obwohl es sich um die gleiche ursprüngliche Ziellinie der Hefetests handelt, kann die genetische Modifikation zu Veränderungen von zellulären Prozessen führen. Beispielsweise kann die Permeabilität der Zellmembran erhöht werden, was auf strukturelle oder funktionelle Anpassungen im Zuge der Genmodifikation zurückzuführen sein könnte. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei den CAULUX Systemen gemacht werden. Glukokortikoide sind tendenziell eher hydrophil, was ihre Fähigkeit, in die Zellen einzutreten, beeinträchtigen kann ($\log K_{ow}$ Corticosteron = 1,94, 17-β-Estradiol = 4,01 und Progesteron = 3,38). Dies bedeutet, dass sie weniger in die Zellen gelangen, um dort mit den Glukokortikoidrezeptoren zu interagieren. Gleichzeitig führt diese hydrophile Eigenschaft zu einer geringeren Zytotoxizität, da weniger Glukokortikoide in die Zellen eindringen und dort potenziell schädliche Effekte auslösen können. Die Lipophilität beeinflusst außerdem die Affinität zum Rezeptor selbst [20]. Das bedeutet, dass höhere Konzentrationen von Glukokortikoiden erforderlich sind, um die Rezeptoraktivierung herbeizuführen. Darüber hinaus sind Glukokortikoide weniger selektiv und können neben den Glukokortikoidrezeptoren auch andere Rezeptoren aktivieren [21]. Diese breitere Interaktion könnte die Effizienz der spezifischen Rezeptor-Aktivierung verringern und somit die Potenz des Glukokortikoids im Vergleich zu selektiveren Rezeptor-Liganden Kombinationen beeinträchtigen. All diese Faktoren könnten dazu führen, dass im A-YGS-Assay höhere Konzentrationen erforderlich sind, was wiederum den höheren Kalibrierungsbereich (µg/L) erklären würde.

Für jeden der vier effekt-basierten Methoden (EBM) wurden die Wiederfindungen der DA-EDA- und der PMT-Kartuschen getestet. Auch der Einfluss des Ansäuerns vor Anreicherung wurde exemplarisch mit der DA-EDA-Kartusche in endokrinen Assays auf Hefezellbasis untersucht. Die DA-EDA-Stammlösung wurde in einer Konzentration von 0,01 µg/L dotiert. Hierdurch konnte ein Anreicherungsfaktor von 10 erzielt werden. Das entspricht einer Endkonzentration von 0,1 µg/L. Im Test wurde zusätzlich eine Konzentration von 0,1 µg/L ohne vorherige Anreicherung eingesetzt. Die tatsächliche Wirkung der DA-EDA-Stammlösung konnte somit gemessen und die Wiederfindungsrate über die SPE abgeschätzt werden. Das optimierte Anreicherungsprotokoll (Kapitel 2.6.2.1), wurde für diese Experimente angewandt. Die Ergebnisse sind bezüglich der endokrinen Aktivität (OD405 in %) dargestellt.

Insgesamt zeigten die Tests für die A-YAS-, A-YES- und A-YPS Assays zufriedenstellende Ergebnisse: Blankproben (0,1 % DMSO und Reinstwasser) und SPE-Blanks zeigten Werte < NWG und die QC-Werte lagen innerhalb der Akzeptanzgrenzen. Beim A-YGS Assay hingegen ergaben einige Blankwerte > NWG und die QC-Werte stimmten nicht mit den zugesetzten Konzentrationen überein. Der A-YGS-Assay wurde für weitere Untersuchungen nicht mitgeführt, da er nicht für den umweltrelevanten Bereich anwendbar ist. Das haben zum einen die Ergebnisse der Etablierung (Kapitel 2.1.2.2) gezeigt, denn die Messungen mittels A-YGS befinden sich in einem höheren Konzentrationsbereich im Vergleich zu den anderen Assays (µg/L statt ng/L). Durch die Interaktion verschiedener Substanzen in der DA-EDA-Stammlösung bestand die Erwartung, dass eine Aktivierung möglicherweise durch Mischtoxizität auch in niedrigeren Konzentrationsbereichen erreicht werden könnte, was jedoch nicht beobachtet wurde.

Abbildung 15 zeigt den Vergleich der Wiederfindungen für Proben die vor der Anreicherung angesäuerte (pH 2.5) und nicht angesäuerte Proben (nativ) wurden. Um zuverlässige Aussagen treffen zu können, sollte die durchschnittliche Wiederfindung zwischen 50 und 150 % liegen. Der A-YES Assay erzielte hohe Wiederfindungen von etwa 100 % für beide Probenarten. Im A-YAS-Assay wurden bei nicht angesäuerten Proben leicht bessere Wiederfindungen von etwa 70 % erzielt, während angesäuerte Proben eine Wiederfindung von etwa 56 % aufwiesen. Im Gegensatz dazu erzielte der A-YPS-Assay höhere Wiederfindungen von rund 100 % bei angesäuerten Proben im Vergleich zu nicht angesäuerten (68 %). Insgesamt machen die Ergebnisse eine zuverlässige Aussage darüber, ob angesäuerte oder nicht angesäuerte Proben

bessere Wiederfindung liefern, schwierig. Auch, wenn kein klarer Trend zu erkennen ist, wird empfohlen, Umweltproben anzusäuern, um die Integrität verschiedener Analyten während Lagerung und Analyse zu gewährleisten, da eine pH-Senkung die Kinetik bakterieller Abbauprozesse verlangsamt und Adsorptionsprozesse an organisches Material oder Probenbehälter verringern kann. Trotz unvermeidlicher Verluste der Wiederfindungen zeigten die Ergebnisse für A-YES, A-YAS und A-YPS Messungen akzeptable Werte.

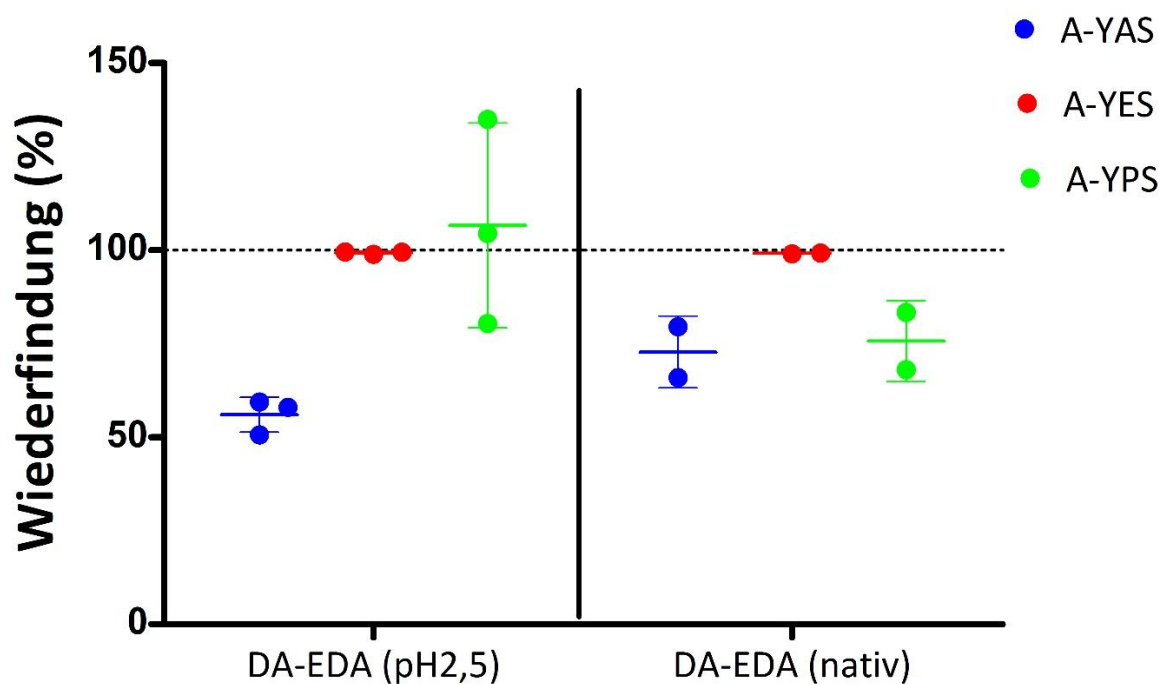


Abbildung 15: Vergleich der Wiederfindungen in Bezug auf die relative Aktivität (OD405 in %) zwischen DA-EDA-Kartuschen mit angesäuerten (pH 2,5; n=3) und nicht angesäuerten Proben (nativ, n=2) in den vier Hefezell-Assays A-YAS, A-YES und A-YPS. Die getestete Konzentration der DA-EDA-Stammlösung lag bei 0,1 µg/L.

Der Vergleich der Wiederfindungen für DA-EDA- und PMT-Kartuschen ist in Abbildung 16 dargestellt. In den Assays A-YAS, A-YES und A-YPS zeigten die DA-EDA-Kartuschen bessere Wiederfindungen als die PMT-Kartuschen. Die Wiederfindung für den A-YES- Assay betrug in etwa 100 %. Die Ergebnisse für den A-YPS-Assay betrugen im Mittel 106 %, jedoch mit einer schlechteren Wiederholpräzision. Für die PMT-Kartuschen zeigten sich Werte von nur 15-34 % der zu erwartenden Ergebnisse. Im A-YAS-Assay lag die Wiederfindung mit der DA-EDA-Kartusche bei etwa 56 % und war damit wiederum besser als bei Verwendung der PMT-Kartuschen (32 %). Insgesamt sind PMT-Kartuschen somit nicht für die Anreicherung der ausgewählten endokrin aktiven Substanzen geeignet.

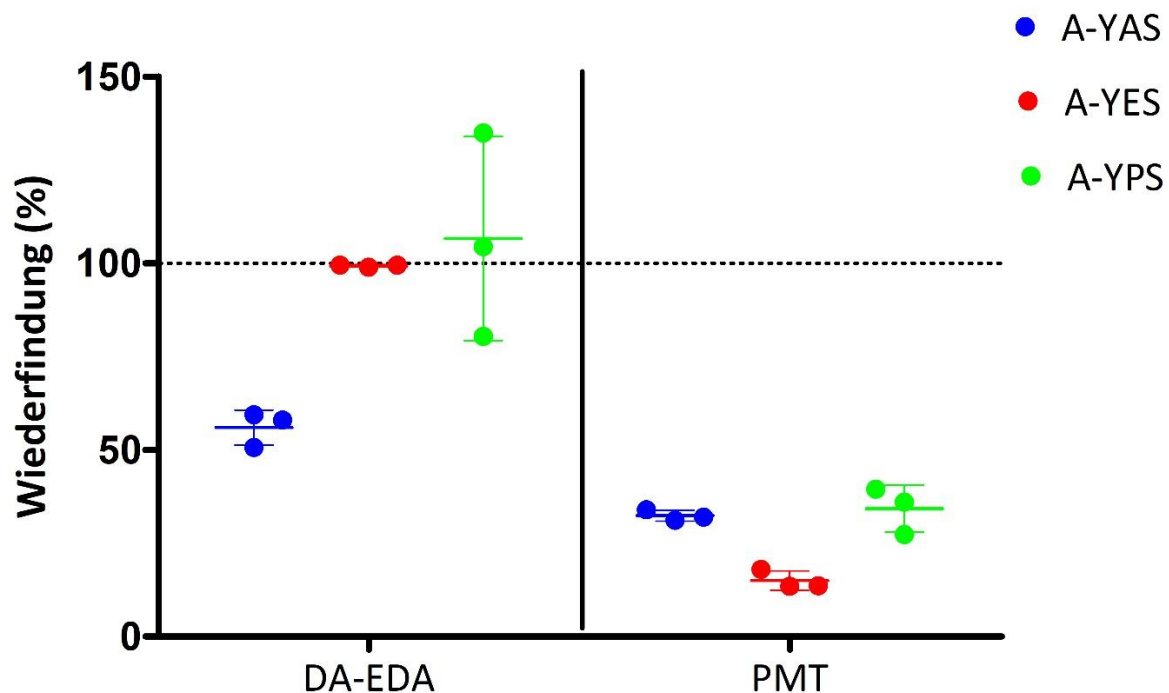


Abbildung 16: Vergleich der Wiederfindungen in Bezug auf die relative Aktivität (OD405 in %) zwischen DA-EDA-Kartuschen (n=3) und PMT-Kartuschen (n=3) in den vier Hefezell-Assays A-YAS, A-YES, A-YPS und A-YGS.

Die PMT-Kartusche zeigte lediglich in den LBT- und AChE-Hemmtests vergleichbare bzw. bessere Wiederfindungen. Allerdings wurden diese Untersuchungen nur mit einer Stammlösung bestehend aus den beiden Positivkontrollen der Biotests durchgeführt. Dies unterstreicht, dass die DA-EDA-Kartusche, im Hinblick auf die Anreicherung eines breiten Stoffspektrums, der PMT-Kartusche überlegen ist. Diese Unterschiede verdeutlichen die Bedeutung der Auswahl geeigneter Testmethoden und Kartuschenmaterialien, um die Effektivität und Wiederfindung von Substanzen in verschiedenen biologischen Assays zu optimieren.

Daher wird für die wirkungsbezogene Analyse mit einer breiten Biotestbatterie die Verwendung von DA-EDA-Kartuschen empfohlen. Die vergleichsweise hohen Standardabweichungen der DA-EDA-Kartusche wurden durch die eigenständige Fertigung der Kartuschen verursacht. Die Herstellung der PMT-Kartusche erfolgte hingegen maschinell. Die automatisierte Fertigung trägt zu einer höheren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei.

Neben einer besseren Wiederfindung für endokrine Aktivitäten unter Einbeziehung vieler verschiedener Stoffklassen und Polaritäten, erwies sich ihre Handhabbarkeit gegenüber der der PMT-Kartusche ebenfalls als überlegen. Die Anreicherung bereits kleiner Mengen (< 500 mL) bereitete bei Verwendung der PMT-Kartusche erhebliche

Schwierigkeiten und gestaltete sich in Bezug auf die Durchflussrate als zeitintensiv. Auf Nachfrage wurde vom Hersteller geäußert, dass dies an der maschinellen Pressung läge und dass durch das Aufquellen des Materials die Durchflussrate verringert würde. In Folge wurden loser gestopfte Kartuschen zur Verfügung gestellt, die jedoch in der Anwendung dasselbe Problem aufwiesen. Dies machte die Anreicherung von 1 – 2 L Probe über eine Kartusche und innerhalb eines Arbeitstages praktisch unmöglich. Eine Anreicherung innerhalb eines Arbeitstages sollte im Hinblick auf die Probenstabilität allerdings eingehalten werden. Um dies zu umgehen kann eine Probe auch über mehrere Kartuschen angereichert werden. Dies erhöht allerdings Kosten, Arbeitsaufwand und Ressourcenverbrauch. Auch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse kann dadurch beeinträchtigt werden. Damit ist eine routinemäßige Anwendung dieser Kartusche für die wirkungsbezogene Analytik unpraktikabel. Im Verlauf des Projekts erwies sich die DA-EDA-Kartusche somit als die geeignetere Multi-Layer-Kartusche um routinemäßig ein breites Stoffspektrum für die wirkungsbezogene Analytik anzureichern. Daher wurde die PMT-Kartusche für weitere Untersuchungen ausgeschlossen.

2.7.2.3. Bestimmung der Wiederfindung in CALUX-Reporterassays (FE 1)

Zu Beginn musste ausgeschlossen werden, dass die DA-EDA-Stammlösung zu zytotoxischen Effekten in den unterschiedlichen U2OS-Zellen (ER α -, AR- und GR-Rezeptor) führt. Dazu wurden alle Ziellinien im MTT-Test gegenüber Verdünnungsreihen der Stammlösung getestet. Die neunstufigen Verdünnungsreihen orientierten sich an dem zuvor, im jeweiligen CALUX-Testsystemen ermittelten Konzentrationsbereich, der möglichst den gesamten Wirkungsbereich zwischen 0 – 100 % abdeckt. Dieser lag für den ER-CALUX zwischen 0,001 und 0,0001 $\mu\text{g/L}$ der einzelnen Referenzsubstanzen in der Stammlösung. Für den AR-CALUX zwischen 10 und 0,001 $\mu\text{g/L}$. Beim GR-CALUX wurde ein Konzentrationsbereich zwischen 10 und 0,01 $\mu\text{g/L}$ getestet, allerdings konnte hier durch die DA-EDA-Stammlösung nur maximal 10 % Rezeptoraktivierung ausgelöst werden. Da dies im Bereich der Messunsicherheit lag konnte für den GR-CALUX keine Wiederfindung bestimmt werden.

Im MTT-Test zeigte keine der getesteten Konzentrationen aus den jeweiligen Konzentrationsbereichen eine zytotoxische Wirkung (> 10 % Hemmung der Zellvitalität) weshalb die angegebenen Konzentrationsbereiche in den CALUX-Reporterassays zur Bestimmung der Wiederfindungsraten getestet wurden. Dazu

wurde die DA-EDA-Stammlösung entsprechend verdünnt und nativ in den jeweiligen Reporterassays getestet. Zudem wurde Reinstwasser mit der DA-EDA-Stammlösung dotiert und entsprechend dem optimierten Anreicherungsprotokoll über die DA-EDA-Kartusche angereichert. Das 10.000-fach angereicherte Eluat wurde ebenfalls entsprechend verdünnt, um theoretisch die gleichen Konzentrationen zu erhalten die nativ getestet wurden. Aus beiden Ansätzen wurden anhand der Dosis-Wirkungsbeziehung anschließend die Effektkonzentrationen berechnet bei der 10 % Rezeptoraktivierung (EC10) auftraten (jeweils n = 3). Die Mittelwerte der EC10-Werte wurden anschließend verglichen, um die Wiederfindung der jeweiligen Effekte nach Anreicherung zu berechnen (Tabelle 29).

Tabelle 29: Effektkonzentrationen (PC10) der nativen und mittels DA-EDA-Kartusche angereicherten DA-EDA-Stammlösung und resultierende Wiederfindung im ER α - und AR-CALUX

	ER α -CALUX		AR-CALUX	
	ng/L	SD	ng/L	SD
PC10 (Probe nativ, n = 3)	918,7	120,3	1948,4	242,7
PC10 (Probe angereichert, n = 3)	961,9	65,3	1753,3	136,1
Wiederfindung in %	104,7		90,0	

Anhand der Wiederfindungen im ER α - und AR-CALUX lässt sich erkennen dass sowohl die Substanzen die für die östrogenen als auch die Substanzen, die für androgenen Effekte verantwortlich sind, mit dem entwickelten Anreicherungsverfahren sehr gut angereichert wurden.

2.7.2.4. Bestimmung der Wiederfindung mittels Ames-Fluktuationstest (FE 1)

Der Ames-Fluktuationstest wurde mit fünf Konzentrationen der DA-EDA-Stammlösung durchgeführt. Die Konzentrationen der einzelnen Referenzsubstanzen entsprachen 10, 25, 50, 75 und 100 $\mu\text{g/L}$. Ebenso wurden die entsprechenden Verdünnungen nach Anreicherung getestet. Keine der Konzentrationsstufen führte zu wachstumshemmenden Effekten in den bakteriellen *S. typhimurium* Stämmen YG1041 und YG1042. Die Versuche wurden jeweils mit und ohne Metabolisierung (+/- S9) der Substanzen durchgeführt, wodurch sich insgesamt vier unterschiedliche Versuchsansätze ergaben.

Die Auswertung erfolgt hier nur qualitativ. Da ein Vergleich der Induktionsfaktoren aufgrund unterschiedlicher Bezugsgrößen hier irreführend wäre sind in Tabelle 30 beispielhaft für eine Konzentrationsstufe (50 $\mu\text{g/L}$) der Referenzsubstanzen die Anzahl

der Revertanten (x aus 48) aus beiden Versuchsreihen (nativ und angereichert) dargestellt. Zur Einordnung sind zudem die Revertanten der Negativ- und Positivkontrollen dargestellt. Die nativ getestete DA-EDA-Stammlösung führte in allen vier Versuchsansätzen zu mutagenen Effekten die jeweils Konzentrations-Wirkungsbeziehungen folgten. Bei der Testung der angereicherten DA-EDA-Stammlösung zeigte sich, dass lediglich in den Ansätzen ohne Probenmetabolisierung durch S9, Wirkungen auftraten, die denen der nativ getesteten Stammlösung entsprachen. Für diesen Ansatz wurde demnach eine sehr gute Wiederfindung erzielt. Die Ansätze mit Metabolisierung der Probe zeigten hingegen in den angereicherten Proben keine mutagenen Effekte (4 und 7 Revertanten entsprechend der Negativkontrolle). Dies ist dadurch zu erklären, dass die Positivkontrolle 2-Aminoanthracen, die in den Ansätzen mit S9 erst nach Metabolisierung zu Effekten führt, mit der DA-EDA-Kartusche nicht angereichert werden konnte. Die Ergebnisse sind somit plausibel.

Tabelle 30: Revertanten im Ames-Fluktuationstest für die native und mittels DA-EDA-Kartusche angereicherte DA-EDA-Stammlösung

Anzahl Revertanten	YG1041 -S9	YG1041 +S9	YG1042 -S9	YG1042 +S9
Negativkontrollen	3 ± 1	3 ± 2	6 ± 2	7 ± 3
nativ	24 ± 5	25 ± 6	26 ± 4	29 ± 8
angereichert	29 ± 3	4 ± 1	24 ± 6	7 ± 5
Positivkontrollen	47 ± 1	46 ± 1	44 ± 3	43 ± 2

2.7.2.5. Bestimmung der Wiederfindung gentoxischer Effekte (FE 1)

Im umu-Test und im in-vitro Mikrokerntest konnte keine Wiederfindung der Effekte nach Anreicherung gemessen werden. Dies ist dadurch zu erklären, dass eine Anreicherung der Positivkontrollen aus diesen Biotests über die DA-EDA-Kartusche nicht möglich war (Aminoanthracen und Mitomycin C) bzw. im Fall von 4-Nitrochinolin-1-oxid nur in sehr geringem Maße erfolgte (Kapitel 2.6.1). Mitomycin C wird im in-vitro Mikrokerntest eingesetzt. Im umu-Test bildet 4-Nitrochinolin-1-oxid die Positivkontrolle im Ansatz ohne Metabolisierung durch S9 und 2-Aminoanthracen im Ansatz mit Metabolisierung durch S9.

2.7.3. Fazit Wiederfindung von Effekten in Biotests

Die guten Wiederfindungen unterschiedlicher Effekte zeigt, dass das entwickelte Anreicherungsverfahren grundsätzlich geeignet ist ein breites Substanzspektrum

diskriminierungsarm anzureichern. Lediglich die Anreicherung von mutagenen und gentoxischen Substanzen war nicht gänzlich möglich.

Die Ergebnisse belegen, dass das entwickelte Anreicherungsverfahren in der Praxis der wirkungsbezogenen Analytik für die Untersuchung unterschiedlicher Endpunkte angewendet werden kann.

2.8. Schritt 8: Probenstabilität (AP5, FE 2)

Wenn die Wasserprobe nicht vor-Ort oder unmittelbar (innerhalb eines Arbeitstages) nach der Probenahme angereichert werden kann, müssen ergänzend zu den bisherigen normativen Empfehlungen geeignete Maßnahmen zur Stabilisierung getestet werden. Hierzu wurde die gekühlte Lagerung einer nativen Oberflächenwasserprobe mit einer angesäuerten Probe über einen Zeitraum von 4 Tagen verglichen. Beide Proben wurden mit der DA-EDA-Stammlösung dotiert. Eine weitere Möglichkeit der Stabilisierung besteht in der Lagerung nach Anreicherung über die SPE. Die Lagerung der SPE-Kartusche nach Anreicherung einer dotierten Oberflächenwasserprobe bei -20°C für 6 Wochen wurde untersucht. Des Weiteren wurde untersucht, wie sich die Lagerung eines Eluats bei -20°C über die Zeitdauer von einer Woche auf die Stabilität auswirkt. Darüber hinaus wurde analysiert, ob eine chemische Stabilisierung mit Natriumazid, wie sie in der chemischen Analytik bereits routinemäßig eingesetzt wird, auch für die wirkungsbezogene Analytik geeignet ist. Die untersuchten Ansätze sind in Tabelle 31 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** zusammengefasst.

Tabelle 31: Übersicht der untersuchten Stabilisierungsmaßnahmen

Art	Maßnahme	Durchführung	Lagerzeit
Lagerung native Probe vor Anreicherung	Phys., 4 °C	Probe mit DA-EDA-Stammlösung dotieren, Lagerung, Anreicherung	4 Tage
Lagerung angesäuerte native Probe vor Anreicherung	Phys., 4 °C, angesäuert	Probe mit DA-EDA-Stammlösung dotieren, pH auf 2.5 einstellen, Lagerung, Anreicherung	4 Tage
Lagerung SPE-Kartuschen nach Anreicherung	Phys., – 20 °C	Probe mit DA-EDA-Stammlösung dotieren, Anreicherung, Lagerung	6 Wochen
Lagerung Eluat nach Anreicherung	Phys., – 20 °C	Probe mit DA-EDA-Stammlösung dotieren, Anreicherung, Elution, Lagerung	1 Woche

Einfluss chemischer Stabilisierung auf Biotests	Chem., Natriumazid	Probe mit 0,05 M Natriumazid, Anreicherung, Elution, exemplarische Testung des Zellwachstums im A-YES	Keine Lagerung getestet
---	--------------------	---	-------------------------

Als Matrix für diese Untersuchungen wurde Oberflächenwasser gewählt, da es komplexer ist als beispielsweise Reinstwasser und somit eventuelle Wechselwirkungen in Bezug auf die Stabilität besser abbildet, aber gleichzeitig keine hohen Hintergrundkontaminationen, wie sie bei Abwasser zu erwarten sind, aufweist. Für die Untersuchungen, in der eine Anreicherung erfolgte wurden DA-EDA-Kartuschen verwendet und die Anreicherung erfolgte anhand des optimierten Anreicherungsprotokolls (Kapitel 2.6.2.1 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Die Lagerzeiten variieren je nach Art des untersuchten Ansatzes, da sie unterschiedlichen Zielsetzungen dienen. Bei nativen Proben steht die Stabilisierung für wenige Tage nach der Probenahme im Vordergrund. Insbesondere für instabile Substanzen, wie hormonaktive Pharmazeutika, ist eine Anreicherung innerhalb von 24 Stunden einzuhalten [22]. Eine Verlängerung auf bis zu vier Tage beispielsweise durch das Ansäuern der Probe würde die Bearbeitungsdauer verlängern können. Nach der Anreicherung auf Kartuschen können längere Lagerzeiten erzielt werden. Dies ist insbesondere für die Lagerstabilität von Rückstellproben bedeutsam. Am Beispiel der Hormone sowie für Organochlor-Pestizide [23] konnte bereits gezeigt werden, dass das Einfrieren von beladenen SPE-Materialien eine geeignete Alternative gegenüber der Lagerung von Wasserproben oder Eluatn darstellt.

Um die Auswirkung der unterschiedlichen Ansätze auf die Stabilität der dotierten Referenzsubstanzen zu beurteilen, wurden mittels LC-MS/MS Werte ermittelt und miteinander verglichen (Kapitel 2.8.1). Die Eignung der chemischen Stabilisierung unter Verwendung von Natriumazid zur Anwendung in der wirkungsbezogenen Analytik wurde exemplarisch anhand der Bestimmung der Zytotoxizität im A-YES ermittelt und ebenfalls in Kapitel 2.8.1 diskutiert.

2.8.1. Ergebnisse Probenstabilität

Der Einfluss der unterschiedlichen Lagerungsbedingungen der Proben auf die Stabilität der Referenzsubstanzen aus der DA-EDA-Stammlösung wurde mittels LC-MS/MS ermittelt. Die Peakflächen der jeweiligen Analyten zwischen den

unterschiedlichen Stabilisierungsansätzen wurden anschließend miteinander verglichen.

Hierbei wurde das Ansäuern einer wässrigen Probe mit anschließender Lagerung bei 4 °C dem Ansatz ohne pH-Wert-Anpassung vergleichend gegenübergestellt (Abbildung 17). Ebenso verglichen wurden Proben, die nach der Anreicherung entweder auf der Kartusche oder als Eluat bei – 20 °C eingefroren gelagert wurden (Abbildung 18). Aus Gründen der Übersichtlichkeit zeigt jede Abbildung die Ergebnisse für die Hälfte der Referenzsubstanzen. Die Peakflächen von Nitrofurantion, Parathion-Ethyl und Dihydrotestosterone wurde zur Verdeutlichung der Unterschiede in einer weiteren Abbildung vergleichend gegenübergestellt (Abbildung 19).

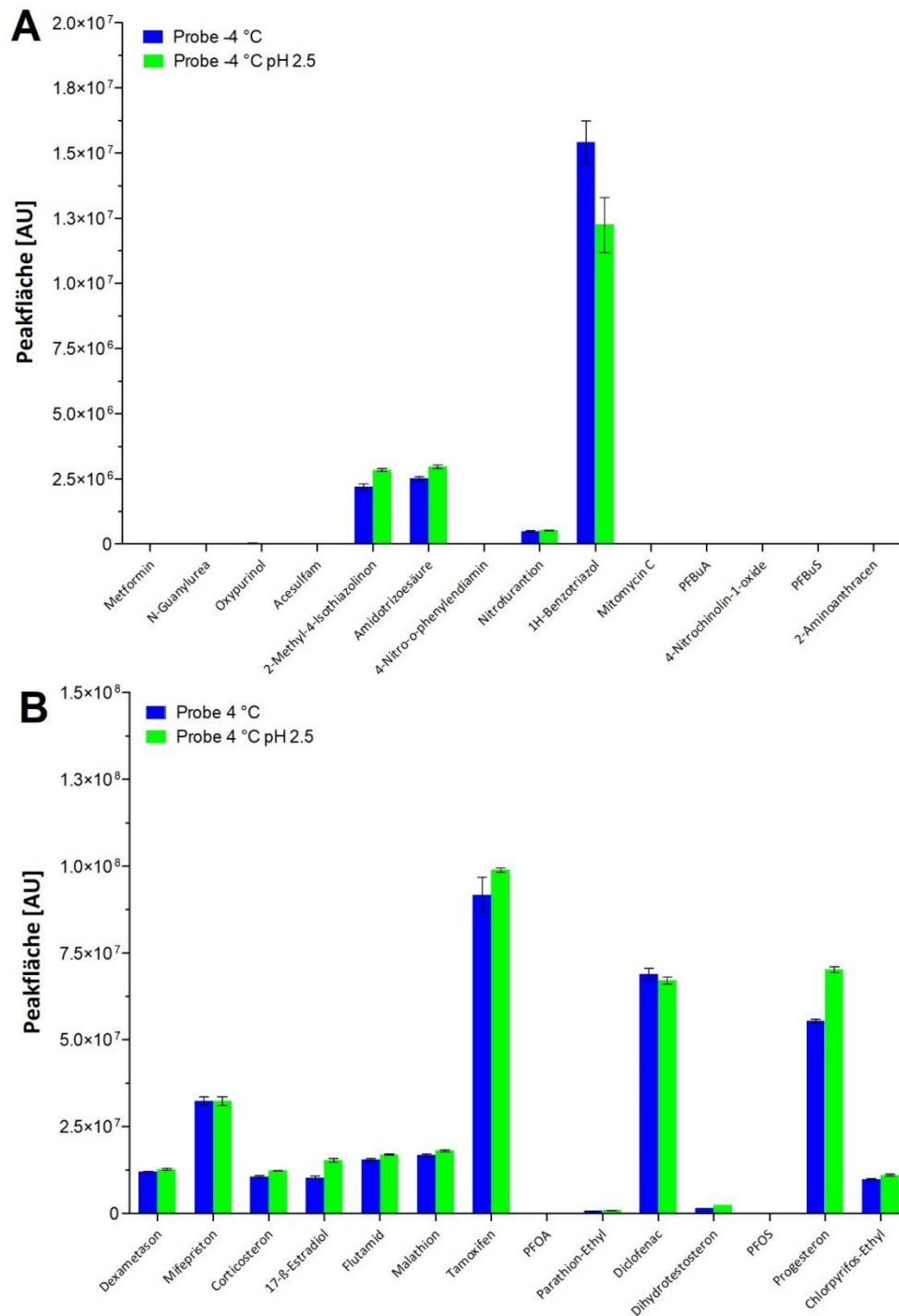


Abbildung 17: Peakflächen (Area Units, AU) der ersten (A) und zweiten (B) Hälfte der Referenzsubstanzen der DA-EDA-Stammlösung in Oberflächenwasser (n = 2). Die Proben wurden vor der Anreicherung bei 4 °C gelagert, und eine Serie wurde auf einen pH-Wert von 2,5 angesäuert.

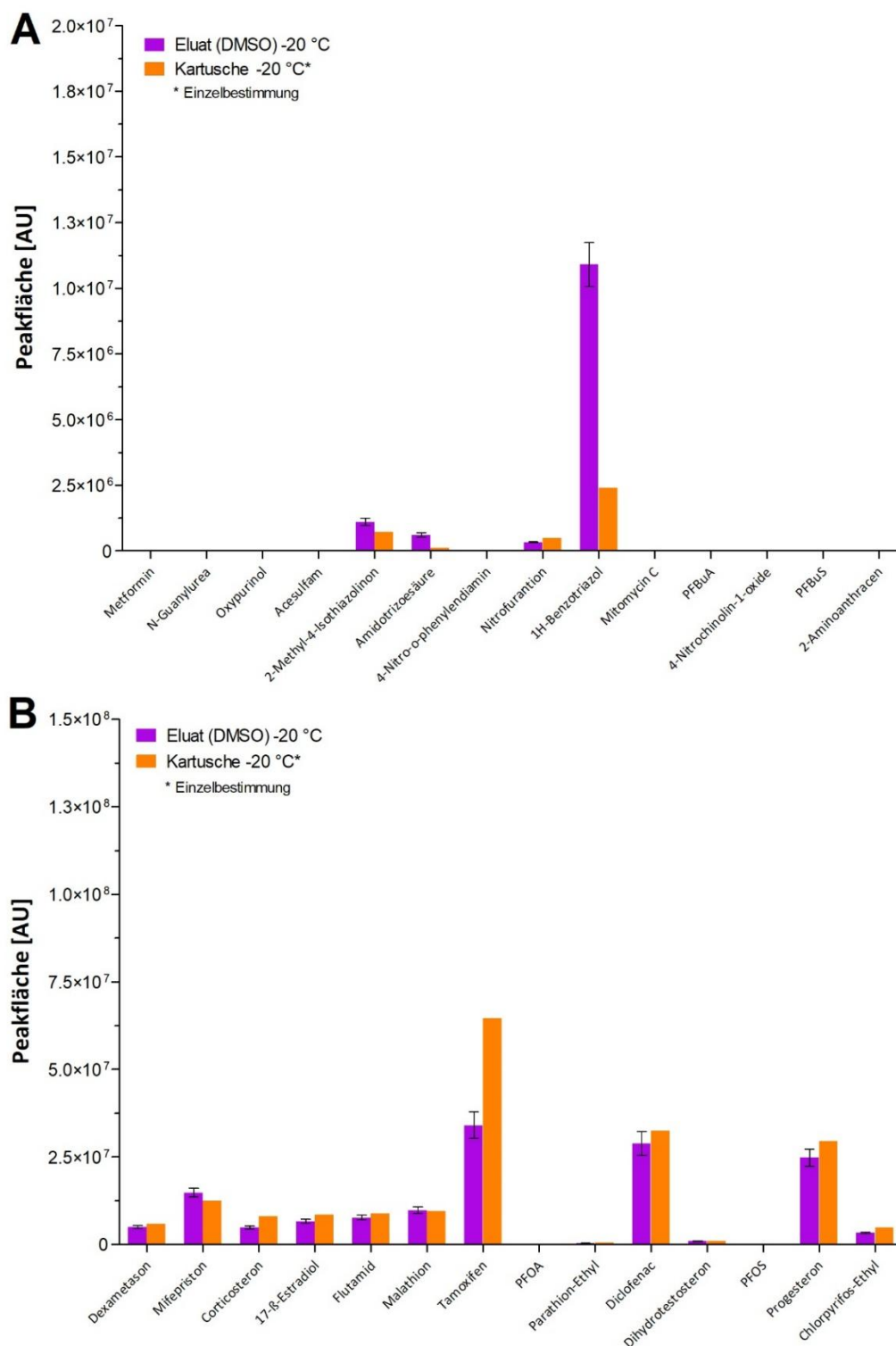


Abbildung 18: Peakflächen (Area Units, AU) der ersten (A) und zweiten (B) Hälfte der Referenzsubstanzen der DA-EDA-Stammlösung in Oberflächenwasser (n = 2). Die Proben wurden nach der Anreicherung einmal auf Kartusche und einmal als Eluat bei – 20 °C gelagert.

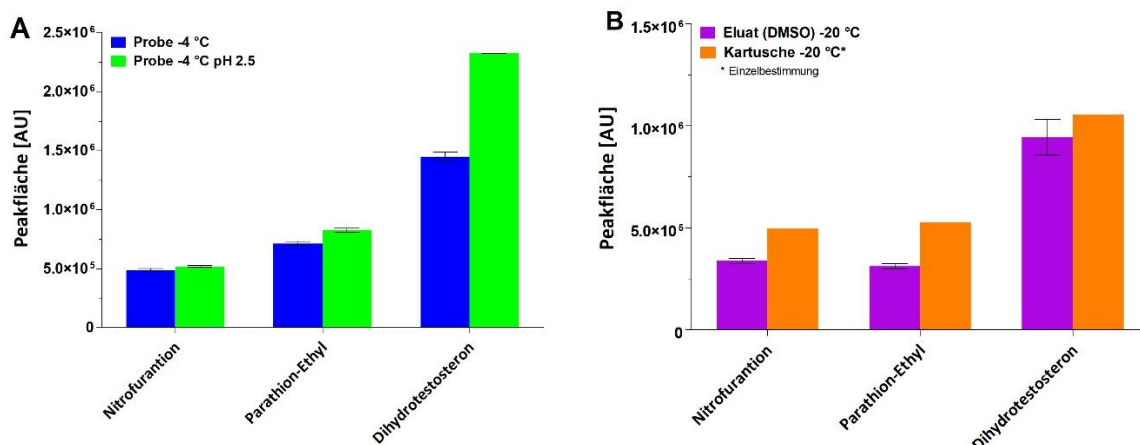


Abbildung 19: Die Analyten Nitrofurantion, Parathion-Ethyl und Dihydrotestosterone sind aus den Abbildungen 17 und 18 vergrößert dargestellt um Unterschiede besser zu erkennen. Die Proben wurden vor der Anreicherung angesäuert auf pH 2,5 und nicht angesäuert bei 4 °C gelagert (A) oder nach der Anreicherung einmal auf Kartusche und einmal als Eluat bei – 20 °C eingefroren (B).

Grundsätzlich ist zu erkennen, dass eine gekühlte Lagerung der wässrigen Proben bei 4 °C besser geeigneter ist als das Einfrieren des Eluats oder der Kartusche bei -20 °C. Der Unterschied in der Eignung zwischen der Lagerung könnte dabei auf mehrere Faktoren zurückzuführen sein. Die Effekte der Lagerungsbedingungen auf die Stabilität scheinen allerdings substanzabhängig zu sein. Für die polare Substanz 1H-Benzotriazol (Abbildung 18) erwies sich das Einfrieren der Kartusche als deutlich vorteilhafter. Hingegen zeigte die unpolare Substanz Tamoxifen (Abbildung 18), dass das Einfrieren des Eluats die Stabilität besser bewahren konnte. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch das Einfrieren mikrobiologische Abbauprozesse, die bei einer Kühlung oder Lagerung bei Raumtemperatur auftreten können, deutlich verlangsamt oder gestoppt werden. Im Vergleich dazu zeigte sich, dass Tamoxifen bei Lagerung auf der Festphase schwerer zu eluieren sein könnte, was auf eine stärkere Bindung an die Sorbentsmaterialien oder der Kartusche hindeutet. Dies könnte zum einen an der unpolaren Natur der Substanz liegen, die eine weniger effiziente Wechselwirkung mit der polaren Phase des Lösungsmittels ermöglicht, und zum anderen an der Tatsache, dass bei der direkten Applikation eine stärkere Adsorption auf der Festphase stattfindet, was die Elution erschwert. Eine gekühlte Lagerung bei unterschiedlichen pH-Werten (sauer, neutral) machte jedoch unter Einbezug der Standardabweichungen keinen Unterschied. Auch hier ist der Einfluss nur bei wenigen Substanzen, wie zum Beispiel 1H-Benzotriazol (Abbildung 17) oder Progesteron (Abbildung 18) zu erkennen. Die Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die Stabilität zwar substanzspezifisch ist, jedoch für den

gewählten Substanzmix von den allgemeinen Erwartungen abweicht, was die Bedeutung einer Analyt-spezifischen Bewertung unterstreicht.

Die Eignung der chemischen Stabilisierung mit Natriumazid für eine Anwendung in der wirkungsbezogenen Analytik wurde exemplarisch anhand der Bestimmung der Zytotoxizität im A-YES ermittelt. Natriumazid ist ein wasserlösliches, kristallines Pulver mit bakteriostatischer Wirkung und hemmt den Elektronentransport in der Atmungskette [24, 25]. Somit ist auch eine Anwendung bei bakteriellen Biotests aufgrund von zu erwartender Wachstumshemmung nicht möglich. Studien zeigen zudem, dass Natriumazid in Anwesenheit von Sauerstoff als Oxidationsmittel fungiert und unerwünschte Nebenprodukte bildet [25]. Dies kann zur Veränderung der Zielanalyten in der Probe und somit zu verfälschten Ergebnissen führen. Zusätzlich birgt Natriumazid ein hohes toxisches Potenzial, weshalb Personen, die damit arbeiten, einem erheblichen Risiko ausgesetzt sind [24, 26, 27].

Zur Überprüfung der Eignung für die Probenstabilisierung in der effekt-dirigierten Analytik wurde eine Reinstwasserprobe mit 0,05 M Natriumazid versetzt, entsprechend dem optimierten Anreicherungsprotokoll über die DA-EDA-Kartuschen angereichert und eluiert. Dies entspricht ungefähr der unteren Grenze der gängigsten Konzentrationen, die in der Literatur zur Probenstabilisierung beschrieben werden [28]. Damit sollte überprüft werden, in welchem Umfang Natriumazid-Rückstände nach der Anreicherung noch durch eine zytotoxische Wirkung das Ergebnis im Test beeinflussen können. Das relative Zellwachstum lag bei einer Konzentration von 0,05 M unter 80 %, wodurch Natriumazid bei Konzentrationen von $\geq 0,05$ M als zytotoxisch eingestuft werden kann. Eine chemische Stabilisierung auf Basis von Natriumazid hat sich demnach als nicht zielführend herausgestellt, da sie in den Hefezell-Assays auch in Folge einer Anreicherung und dem Waschen der Kartuschen zu zytotoxischen Effekten führte.

Aufgrund dieser Erkenntnisse sollte die Verwendung von Natriumazid zur chemischen Stabilisierung, insbesondere im Bereich der wirkungsbezogenen Analytik, nicht empfohlen werden. Zudem wird Natriumazid als umweltschädlich (GHS09 Symbol) eingestuft, was dazu führen würde, dass Proben nach der Anreicherung gesondert entsorgt werden müssen. Dies würde den zeitlichen Aufwand durch zusätzlichen Entsorgungsbedarf erhöhen und zusätzliche Kosten verursachen und den heutigen Bestrebungen, Aspekte der Nachhaltigkeit im Laboralltag zu etablieren, entgegenstehen.

2.9. Schritt 9: Matrixeinfluss auf die Anreicherung (AP6, FE 2)

Die jeweilige Probenmatrix kann die Anreicherung von Substanzen beeinflussen und dadurch ihre Wiederfindung herabsetzen. Zum Beispiel können Huminstoffe im Wasser die Anreicherung von Analyten verändern, da sie in der Lage sind eine Vielzahl von Substanzen zu adsorbieren. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von unterschiedlichen Probenmatrizes (Trinkwasser, Grundwasser, Oberflächenwasser und gereinigtes Abwasser) auf die Anreicherung von Referenzsubstanzen untersucht. Trinkwasser ist in der Regel unbelastet und weist nur minimale Verunreinigungen auf, weshalb es oft als Referenzmatrix für niedrige Störsignale verwendet wird. Oberflächenwasser und gereinigtes Abwasser enthalten einen höheren Anteil an Huminstoffen und auch Mikroverunreinigungen. Grundwasser ist meist unbelasteter, kann jedoch variierende Mengen an gelösten Stoffen enthalten.

Mittels LC-MS/MS wurde der Einfluss der verschiedenen Matrizes auf die Wiederfindungen der einzelnen Analyten überprüft, um festzustellen, wie stark die Matrix die Anreicherung der Referenzsubstanzen beeinflusst. Dazu wurden je zweimal 1 L der unterschiedlichen Wässer (Trinkwasser, Grundwasser, Oberflächenwasser und gereinigtes Abwasser), zunächst mit HCl auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellt und anschließend mit der DA-EDA-Stammlösung dotiert (1 µg/L). Danach erfolgte die Anreicherung über die DA-EDA-Kartuschen entsprechend dem optimierten Anreicherungsprotokoll sowie die Analyse mittels LC-MS/MS untersucht. Die Berechnung der Wiederfindungen erfolgte aus dem Vergleich der Signalintensitäten der DA-EDA-Stammlösung, mit den Signalintensitäten der in den unterschiedlichen Eluat gemessenen Referenzsubstanzen. Blindwerte im Abwasser wurden berücksichtigt und subtrahiert.

2.9.1. Einfluss der Matrix auf die Wiederfindung mit der DA-EDA-Kartusche

Die Wiederfindungen der Referenzsubstanzen sind für die jeweilige Matrix in den Abbildungen 20 und 21 dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse in zwei Abbildungen unterteilt, wobei jede Abbildung die Ergebnisse für die Hälfte der Referenzsubstanzen zeigt. Die Wiederfindung der Analyten wurde prozentual im Vergleich zur DA-EDA-Stammlösung mit gleicher Konzentration, jedoch ohne Anreicherung in Reinstwasser, ermittelt.

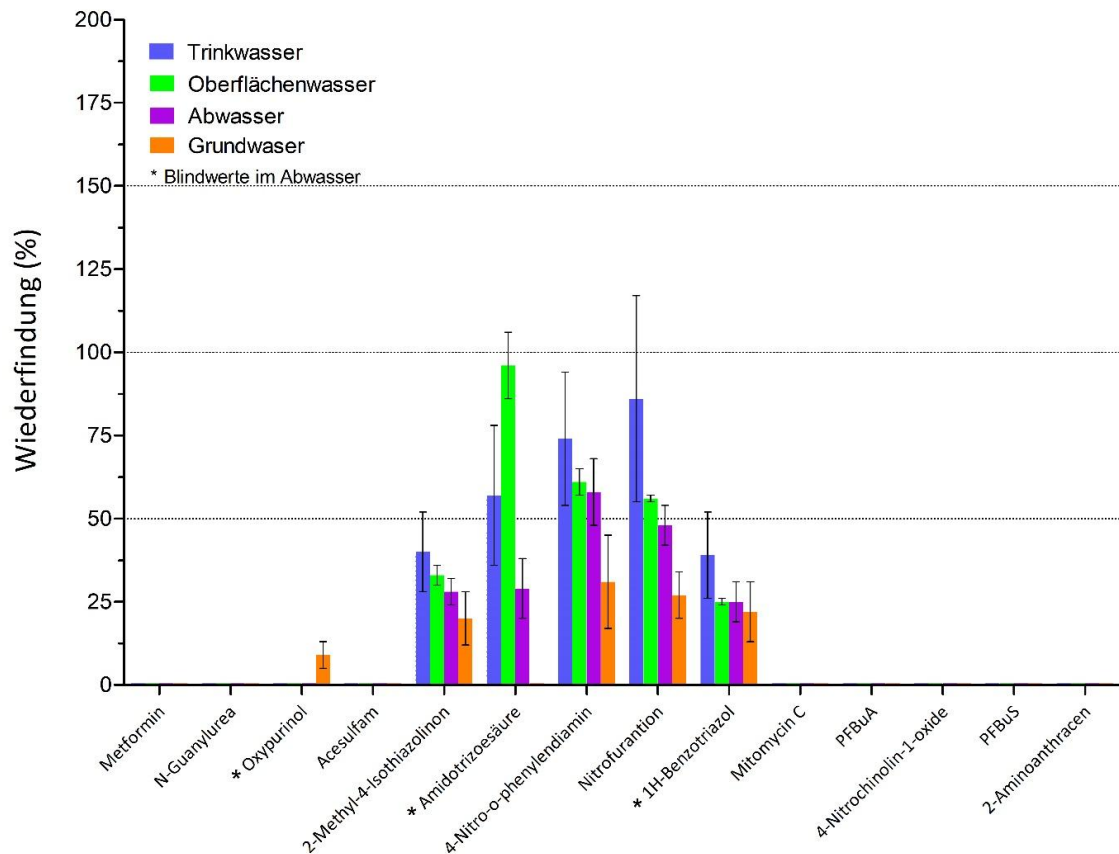


Abbildung 20: Wiederfindung der ersten Hälfte der Referenzsubstanzen der DA-EDA-Stammlösung in unterschiedlichen Matrices

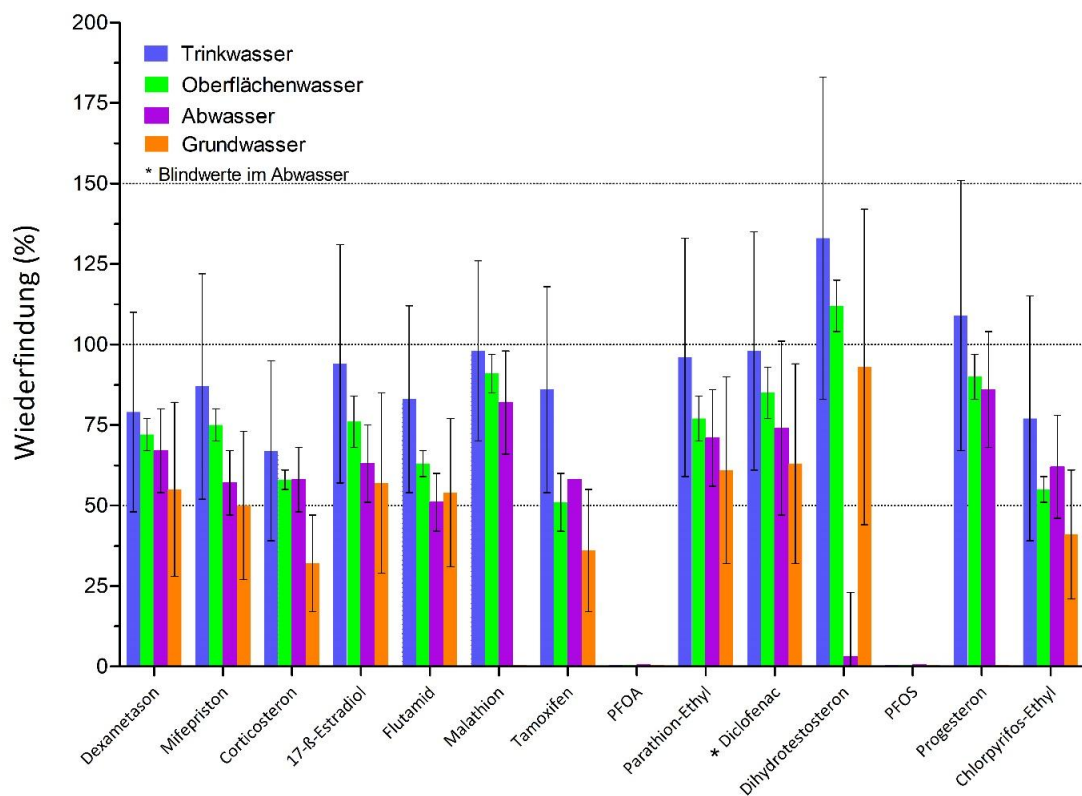


Abbildung 21: Wiederfindung der zweiten Hälfte der Referenzsubstanzen der DA-EDA-Stammlösung in unterschiedlichen Matrices

Zunächst lässt sich feststellen, dass die Wiederfindung polarer bis mittelpolarer Substanzen (Abbildung 20) aus der Referenzliste am geringsten war. Nur die Substanzen 2-Methyl-4-Isothiazolinon (MIT), Amidotrizoesäure, 4-Nitro-o-phenylendiamin (4-NPD), Nitrofurantion (NF) und 1H-Benzotriazol konnten überhaupt angereichert werden, wobei viele Wiederfindungen unter 50 % liegen. Ab Dexametason (DEX) bis hin zur unpolarsten Substanz Chlorpyrifos-Ethyl (Abbildung 21) verbessern sich die Wiederfindungsraten und liegen meist über 50 %. Im unpolaren Bereich war es jedoch auch nicht möglich, Per- und Polyfluorierte Alkylverbindungen (PFAS) nachzuweisen. Polare Substanzen sind oft schwieriger nachzuweisen und anzureichern, weil sie in wässrigen Matrices stärker löslich sind und dazu neigen, stärker mit der Matrix zu interagieren, z. B. mit ionischen oder hydrophilen Bestandteilen des Wassers. Diese Wechselwirkungen können dazu führen, dass die Substanzen in der Matrix gebunden bleiben und sich nicht leicht extrahieren lassen. Ein weiterer möglicher Einflussfaktor ist die Massenüberladung der Säule, bei der die Kapazität des Sorbentmaterials überschritten wird, was dazu führt, dass die Substanzen nicht gebunden und in Folge auch nicht extrahiert werden können. Aufgrund der geringen Grundbelastung der Proben sowie der Dotierung von 1 µg/L im Vergleich zur gesamten Sorbentsmenge von 700 mg ist nicht anzunehmen, dass eine signifikante Auswirkung auf die Ergebnisse vorliegt. Eine weitere Herausforderung kann die Affinität der Analyten zur polaren Phase des Sorbentmaterials sein, die bei Verwendung eines polaren Lösungsmittels erschwert wird und eine Anreicherung erschweren kann. Auch bei der Multi-Layer-Kartusche erweist sich die Extraktion polarer Substanzen teils als unzureichend. Die verschiedenen Schichten und auch das entwickelte SPE-Protokoll zielen zwar darauf ab, ein breites Spektrum an Substanzen zu extrahieren, jedoch können bei einem universellen Ansatz nicht alle Substanzgruppen erfasst werden. Dennoch konnte unabhängig von verschiedenen Matrices ein breites Spektrum der Zielanalyten mit der hier entwickelten Kartusche erfasst werden. Dies ist eine Weiterentwicklung, die über den heutigen Stand der Technik hinaus geht, zeigt jedoch auf, dass die diskriminierungsfreie Anreicherung weiterhin herausfordernd bleibt und mithilfe eines universellen Lösungsansatzes voraussichtlich nicht vollständig erreicht wird. Dennoch stellt die Multi-Layer-Kartusche für die unterschiedlichen wässrigen Matrices einen guten pragmatischen Lösungsansatz dar. Die hohe relative Standardabweichung der LC-MS/MS Messungen von dotierten Wasserproben in Duplikaten könnte auf Variationen

während der Anreicherung zurückzuführen sein, wie z. B. Verluste während des Prozesses. Zusätzlich können probenspezifische Matrixeffekte die Präzision der Messungen beeinflusst haben.

2.10. Schritt 10: Verfahrensvalidierung (AP7, FE 2)

In diesem Arbeitsschritt wurden das entwickelte Protokoll zur SPE sowie die Multi-Layer-Kartusche exemplarisch am A-YES getestet. Ziel war es, die Effektivität und Präzision der entwickelten Anreicherungsverfahren zu überprüfen. Zusätzlich wurde ein Laborvergleich der entwickelten Methode für den A-YES mit dem Kooperationslabor (KL) Emschergenossenschaft/Lippeverband (EGLV) und Ruhrverband (RV) durchgeführt. Diese Validierungsschritte sind entscheidend, um sicherzustellen, dass die Methode zuverlässig und für die Analyse von Proben geeignet sind. Die Wiederholpräzision, also die Konsistenz der Messungen innerhalb eines Labors bei Verwendung derselben Person und desselben Geräts, wird durch die Standardabweichung im Biotest selbst ausgedrückt. Zur Validierung der Gesamtmethode wurden Labor- und Vergleichspräzision untersucht, um Aussagen über die Reproduzierbarkeit zu treffen. Im ersten Schritt wurden sechs Reinstwasserproben (jeweils ein Liter) mit einer Referenzsubstanz in einer Konzentration von 10 % des EC50 (1 ng/L 17 β -Estradiol; E2) angereichert. Diese Proben wurden anschließend mithilfe von DA-EDA-Kartuschen mit einem Anreicherungsfaktor von 10.000 aufkonzentriert. Die Schritte der Anreicherung und Analyse wurden unabhängig voneinander an sechs verschiedenen Tagen durchgeführt und die Eluate eingefroren (- 20 °C). Im zweiten Schritt wurden die Eluate nach 1.000-facher Verdünnung (REF = 10, einer Konzentration von 10 ng/L E2) im Biotest eingesetzt. Die Proben wurden am gleichen Tag eluiert und mit demselben Gerät gemessen, um die Mittelwerte der Dreifachbestimmungen miteinander vergleichen zu können. Zum Vergleich wurde Reinstwasser mit 10 ng/L E2 und 0,1 % DMSO dotiert und parallel zu den Extrakten untersucht.

2.10.1. Finale Validierung im Biotest und Laborvergleich

Alle Arbeitsschritte wurden von einer Person durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 32 gezeigt. Die Vergleichspräzision über die sechs Untersuchungstage erweist sich als unzureichend. Lediglich zwei der getesteten Kartuschen erreichen das Akzeptanzkriterium von über 50 %. Der Mittelwert der Wiederfindungsraten über alle sechs Tage beträgt 38 ± 19 %. Die eingeschränkte Wiederfindung lässt sich nicht auf

die Performance des Tests zurückführen. Die testspezifischen Akzeptanzkriterien wurden erfüllt und sowohl die Nachweisgrenze als auch die Bestimmungsgrenze lagen mit $< 10 \text{ ng/L}$ deutlich unterhalb der dotierten Konzentration (Tabelle 33). Die Positivkontrolle im Test zeigte eine Wiederfindungsrate von $88 \pm 1,5 \%$ und die Blindwerte lagen unterhalb der Nachweisgrenze, was auf die Zuverlässigkeit der Testdurchführung hinweist.

Tabelle 32: Wiederfindungen von sechs DA-EDA-Kartuschen, welche an sechs unterschiedlichen Tagen angereichert wurden. Ein Liter Reinstwasser wurde dazu jeweils mit 1 ng/L 17β -Estradiol dotiert. Die Kartuschen wurden am gleichen Tag eluiert und gemessen.

Probe	Wiederfindung (%)	Standardabweichung (%)
1	60	2,5
2	35	4,3
3	18	7,2
4	68	2,0
5	20	7,0
6	28	5,0
Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (%)	38 ± 19	

Tabelle 33: Versuchsparmeter des *Arxula* Yeast Estrogen Screens zur Messung der Wiederhol- und Vergleichspräzision der DA-EDA-Kartusche mit dem entwickelten Anreicherungsprotokoll.

Qualitätskriterien	Akzeptanzkriterium	Ergebnis
Optische Dichte des Blindwertes [OD]	$\leq 1,000$	0,386
Steigung	$\geq 0,50$	2,75
EC50 [ng/L]	-	20,4
Maximale optische Dichte [OD]	$\leq 4,0$	3,3
NWG [ng/L]	-	5,0
Untere BG [ng/L]	-	7,5
Obere BG [ng/L]	-	26,1

Für die Vergleichspräzision in unterschiedlichen Laboren (Personen und Gerät) hat das Kooperationslabor (KL) Emschergenossenschaft/Lippeverband (EGLV) und Ruhrverband (RV) drei DA-EDA-Kartuschen mit 10 % des EC50 (1 ng/L E2) und eine Blindwertkartusche nach dem gleichen Protokoll bearbeitet.

Tabelle 34: Wiederfindungen von drei DA-EDA-Kartuschen, welche in einem Vergleichslabor angereichert wurden. Je ein Liter Reinstwasser wurde dazu jeweils mit 1 ng/L 17 β -Estradiol dotiert. Die Kartuschen wurden alle am gleichen Tag angereichert.

Probe	Wiederfindung (%)	Standardabweichung (%)
1	329	7.00
2	181	8.00
3	181	9.40
Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (%)	230 $\pm$ 70.0	

Als Bioassay wurde auch hier der A-YES vom gleichen Hersteller (Quodata GmbH, Dresden) verwendet. Die Versuche in den Vergleichslaboren erzielten gegenteilige Ergebnisse. Hier wurden nur Überbefunde festgestellt (Tabelle 34). Die Blindwertkontrollen des Tests sowie der DA-EDA-Kartusche lagen unterhalb der Bestimmungsgrenze, jedoch hatte die Positivkontrolle im Test (10 ng/L E2 ohne SPE) eine erhöhte Wiederfindung von 195 ± 11 %. Die Ergebnisse des Vergleichslabors könnten auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein. Auffällig ist dabei, dass auch die Positivkontrolle im Test eine erhöhte Wiederfindung aufwies, was auf systematische Probleme in der Methodik oder den Analysebedingungen hindeuten könnte. Variationen oder Fehler bei der Extraktion, Filtration oder Konzentration der Proben können sowohl Überbefunde als auch Abweichungen in der Wiederfindung der Positivkontrolle begünstigen. Möglich wären auch Kontaminationen während der Analyse, beispielsweise durch Kreuzkontamination zwischen Proben oder Verunreinigungen in Reagenzien, Lösungsmitteln oder Verbrauchsmaterialien. Insgesamt deuten die Beobachtungen darauf hin, dass die methodische Robustheit des Protokolls weiterhin verbessert werden sollte.

3. Fazit und Ausblick

Für die Entwicklung einer diskriminierungsarmen Anreicherungs-methode für die effektdirigierte Analytik wurden im Rahmen dieses Projekts wichtige Erkenntnisse gewonnen und Daten generiert. Die Entwicklung eines Anreicherungsverfahrens mittels Multi-Layer-Kartusche, das sowohl in der wirkungsbezogene als auch für die chemische Analytik eingesetzt werden kann, stellt einen hochkomplexen Prozess dar. Angesichts der Vielzahl an Einflussfaktoren und Parametern, die während der Optimierung untersucht und angepasst wurden, wird deutlich, wie zeit- und arbeitsintensiv die Entwicklung eines solchen Multi-Layer-SPE Verfahrens ist. Die Kombination aller funktionalen Schichten für ein breites Polaritätsspektrum stellte bereits eine erhebliche Herausforderung dar, die durch die variierenden Probenbedingungen weiter erschwert wird.

Dennoch konnten in diesem Projekt wichtige Schnittstellen identifiziert und nicht kompatible Ansätze ausgeschlossen werden, was für eine optimierte, gemeinsame Probenvorbereitung von zentraler Bedeutung ist. Insbesondere die Kompatibilität der Biotests stellt einen limitierenden Faktor dar. Dies erforderte eine sorgfältige Anpassung der Probenaufbereitung und der verwendeten Reagenzien.

Um einen funktionalen Ausgangspunkt zu erhalten, wurde in diesem Projekt ein Anreicherungsfaktor von 10.000 (1 L Probe in 100 µl DMSO) realisiert. Dies ist für die Untersuchung endokriner Endpunkte ausreichend. In den Biotests zur Detektion endokriner Wirkungen (CALUX und Yeast Screen) muss aufgrund der Kompatibilität mit dem Keeper DMSO ein Verdünnungsfaktor von 1000 (CALUX) bzw. 100 (Yeast Screen) eingehalten werden, wodurch sich ein relativer Anreicherungsfaktor von 10 bzw. 100 ergibt. Aufgrund der hohen Sensitivität der Biotests reicht dies allerdings aus, um die Nachweisgrenzen so weit zu senken, dass auch die niedrigsten Bewertungskriterien für Oberflächenwasser (östrogen Wirkung bis 0,1 µg/EEQ/L) sicher bewertet werden können. In Bezug auf weitere Biotests könnten aufgrund höherer Toleranzen gegenüber DMSO theoretisch REF von 1000 erzielt werden.

Das Verfahren ist skalierbar und kann in unterschiedlichen Kartuschenformaten angewandt werden, um den jeweiligen Anreicherungsfaktoren und benötigten Extraktionsmengen gerecht zu werden. Auf dem Gebiet der WBA und für die weiterführende EDA stellt dieses Verfahren eine wesentliche Innovation dar, da bisher kein vergleichbares Verfahren existiert, das eine einheitliche Basis für EBM und instrumentelle Analytik bietet.

Die Methode ermöglicht eine vereinfachte Arbeitsweise und eine verbesserte Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Indem das Verfahren zentral für eine Vielzahl an Endpunkten und Tests eingesetzt werden kann, entfallen die Notwendigkeit und der Aufwand, für jedes Testsystem separate Anreicherungsverfahren zu entwickeln, zu validieren und durchzuführen. Dies minimiert den kosten- und zeitintensiven Aufwand des heutigen Technikstandes erheblich und erleichtert die praktische Anwendung. Das Verfahren ist zudem praxisnah und wirtschaftlich konzipiert, sodass es einfach von Anwendern umgesetzt werden kann.

Die entwickelte DA-EDA-Kartusche zeigte sich im besonderen Maße für die wirkungsbezogene Analytik geeignet und lieferte hinsichtlich der Wiederfindung von Effekten sowie der Wiederholbarkeit gute Ergebnisse. Diese Ergebnisse konnten in Vergleichsstudien leider nicht gänzlich bestätigt werden. Die manuelle Herstellung der Kartuschen kann hierfür ursächlich sein. Auch das zur Anreicherung verwendete Equipment ist in den einzelnen Laboren teilweise sehr unterschiedlich, wodurch der beschriebenen Vorgehensweise bei der Anreicherung nicht vollständig nachgekommen werden konnte und es zwangsläufig zu Unterschieden bei der Anreicherung kam, die die Wiederfindungen beeinträchtigten. Im Anschluss an das Projekt ist zunächst eine maschinelle Fertigung der Kartuschen anzustreben, bevor weitere Vergleichsstudien mit mehreren Laboren angestrebt werden. Um darüber hinaus die Akzeptanz für eine weitreichende Anwendung und Implementierung zu stärken, sind zusätzliche Ringversuche erforderlich, die mindestens sieben teilnehmende Einrichtungen umfassen sollten, um die Übertragbarkeit und Robustheit der Methode zu bestätigen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die durchgeführten Arbeiten deutlich über den aktuellen Stand der Technik hinausgehen und einen wichtigen Fortschritt auf dem Gebiet der effektdirigierten Analytik darstellen. Zwar zeigen die Ergebnisse, dass die Kartusche in ihrer derzeitigen Form noch weiter optimiert werden muss, doch bereits jetzt stellt das entwickelte Verfahren einen erheblichen Mehrwert im Vergleich zu herkömmlichen Ansätzen dar. Im Gegensatz zu den in einzelnen Laboren verwendeten Hausverfahren, die keine Multi-Layer-SPE-Kartuschen einsetzen und eine eingeschränkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse aufweisen, bietet dieses Verfahren einen standardisierten und diskriminierungsärmeren Ansatz.

Im Rahmen von Vorträgen vor Fachpublikum wurde immer wieder deutlich, wie zentral ein diskriminierungsarmes Anreicherungsverfahren für die effektdirigierte Analytik ist.

Die Forschung in diese Richtung wurde mit großem Interesse verfolgt und ausdrücklich geschätzt. Dies bestätigt die Relevanz und Notwendigkeit das entwickelte Anreicherungsverfahren weiter zu optimieren und über Ringversuche die Akzeptanz und Anwendung zu steigern, sodass mittelfristig eine Verankerung in Normen angestrebt werden kann.

4. Darstellung der durch die Förderung erzielten Ergebnisse im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

4.1. Erhebung von Daten für die gezielte Anwendung der Festphasenextraktion mit effektbasierten Methoden

Trotz jahrelanger Forschung auf dem Gebiet der EBM existiert bis heute keine standardisierte Anreicherungs-methode, welche die Grundlage für eine einheitliche und vergleichbare Bewertung von Wasserproben durch unterschiedliche Labore schafft. Die auf dem Markt zur Verfügung stehenden Anreicherungsverfahren sind für die Detektion mittels instrumenteller Analytik ausgelegt und können bei EBM zu Beeinträchtigungen führen.

Die Erhebung der Daten zur Lösungsmittelverträglichkeit unterschiedlicher Testorganismen und Enzyme durch Lösungsmittel war daher essentiell für den Erfolg des Projektes. Aus diesen Untersuchungen konnten nachfolgend geeignete Lösemittel und deren maximalen Konzentrationen oder lösungsmittelbedingte, testspezifische Verdünnungsfaktoren für die getesteten Biotests abgeleitet werden. Dies bildet eine wichtige Grundlage für die Erstellung von Anreicherungsprotokollen und die Planung von Probenahmekampagnen.

Die erhobenen Daten sind nicht nur für das DA-EDA Projekt von essentieller Bedeutung, sondern können auch darüber hinaus angewendet werden.

4.2. Optimierung des Anreicherungsverfahrens zur Erreichung einer diskriminierungsarmen Anreicherung und Evaluation geeigneter Sorbentskombinationen

Um ein geeignete Sorbentskombination zu bestimmen, die in der Lage ist ein breites Substanzspektrum möglichst diskriminierungsarm anzureichen und gleichzeitig auf die Anforderungen aus der WBA angepasst ist, mussten unterschiedliche SPE-Materialien charakterisiert und das Anreicherungsprotokoll entsprechend angepasst und optimiert werden.

Die im Rahmen der Optimierung des Anreicherungsverfahrens gewonnenen Daten stellen wichtige Erkenntnisse dar, die in der Entwicklung von Multi-Layer-SPE Verfahren einen erheblichen Mehrwert bedeuten. So wurden unterschiedlichste Parameter bei der Probenvorbereitung, der Konditionierung, der Elution sowie der Rekonstitution verändert und die Auswirkungen auf die Wiederfindung von Referenzsubstanzen bestimmt. Zusätzlich wurden unterschiedlichste Sorbentien

bezüglich ihres Vermögens Substanzen anzureichern charakterisiert und miteinander verglichen.

Neben der direkten Anwendung der gewonnenen Erkenntnisse im DA-EDA Projekt, können diese auch im Nachgang für weitere Zwecke genutzt werden.

4.3. Anwendung des entwickelten Anreicherungsverfahrens

Ziel war es neben der prinzipiellen Anwendbarkeit des entwickelten Anreicherungsverfahrens in der WBA auch die Praxistauglichkeit zu erproben. Zudem sollte gezeigt werden, dass das Verfahren eine Probe geringfügig diskriminiert und wiederholbare und vergleichbare Ergebnisse liefert.

Dazu wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt. Um prinzipiell darzustellen, dass das Anreicherungsverfahren für die WBA geeignet ist, wurden zunächst Blindwerte in den EBM durch die entwickelte DA-EDA-Kartusche sowie die verwendeten Lösungsmittel ausgeschlossen. Dadurch zeigte sich zugleich die Praxistauglichkeit des entwickelten Verfahrens. Das kostengünstige Verfahren konnte durch unterschiedliche Labormitarbeiter schnell und einfach umgesetzt werden. Die guten Durchflussraten erlauben es problemlos auch Volumina von bis zu 2 L anzureichern.

Hinsichtlich der Wiederfindung von Effekten konnte für die untersuchten Endpunkte sehr gute bis gute Wiederfindungen erzielt werden. Auch im Vergleich mit der PMT-Kartusche, welche als Referenz genutzt wurde, schloss die DA-EDA-Kartusche -mit Ausnahme des Leuchtbakterientests- deutlich besser ab.

Um die Wiederhol- und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu bestimmen, wurde intern die Wiederholpräzision ermittelt sowie eine Laborvergleichsstudie durchgeführt. Die Untersuchungen konnten die zuvor ermittelten sehr guten Wiederfindungen nicht bestätigen und zeigten zudem eine höhere Varianz zwischen den einzelnen Ergebnissen. Auch im Laborvergleich wurden deutliche Abweichungen vom wahren Wert sowie zwischen den Laboren deutlich. Insgesamt wiesen diese Beobachtungen darauf hin, dass die methodische Robustheit des Protokolls weiterhin verbessert werden muss, um verlässlichere Ergebnisse zu erzielen. Neben der maschinellen Fertigung der Kartuschen könnte die Einführung einer regelmäßigen Qualitätskontrolle der Kartuschen die Ergebnisse verbessern. Zudem könnten Schulungen der Mitarbeitenden und die Bereitstellung von unterstützenden Ressourcen, wie Beispielvideos, die methodische Sicherheit weiter stärken sowie die

Reproduzierbarkeit erhöhen. Damit einhergehend würden Langzeitüberwachungen zur Identifikation systematischer Schwächen hilfreich sein. Die Untersuchungen unterstreichen daher die Notwendigkeit von umfangreichen Laborvergleichsstudien und Ringversuchen, um die Streuung in den Ergebnissen unterschiedlicher Labore zu ermitteln und deren Ursachen zu erforschen. Nur so kann langfristig eine Vereinheitlichung über Standardisierung und Normung erzielt werden.

Grundsätzlich zeigen die Ergebnisse aber die prinzipielle Anwendbarkeit des Verfahrens in der WBA sowie dessen Praxistauglichkeit. Auch die ermittelten Wiederfindungsraten für unterschiedliche Endpunkte zeigen, dass das Ziel der Entwicklung einer diskriminierungsarmen Anreicherungs-methode für die Anwendung auf eine breite Biotestbatterie erfolgreich war.

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

Die Ergebnisse aus diesem Forschungsvorhaben liefern einen wichtigen Beitrag zur direkten Anwendung diskriminierungsarmer Anreicherungsverfahren. Die ganzheitliche Untersuchung aller Probenvorbereitungsschritte unter Verwendung aller Vielzahl an Testsystemen bietet einen erheblichen Mehrwert. Die gewonnenen Erkenntnisse verhelfen dem Anwender effektbasierter Methoden zu einem besseren Prozessverständnis und ermöglichen eine Assay - unabhängige Vereinheitlichung der Anreicherung, wodurch Ressourcen massiv eingespart werden können. Darüber hinaus bietet dieser universelle Ansatz eine gute Grundlage, um die toxikologische Bewertung von Roh- und Trinkwasserproben durch entsprechende Labore zu vereinheitlichen, sodass Daten besser miteinander vergleichbar sind.

Lebensmittel- und Wasserlabore profitieren beispielsweise von Ressourceneinsparungen, da sie lediglich ein Anreicherungsverfahren zur Analyse verschiedenster Endpunkte und Substanzklassen etablieren, validieren und durchführen müssen.

Das beschriebene Anreicherungsverfahren kann auf Basis der ermittelten wissenschaftlich-technischen Erkenntnisse aus Sicht der Forschungseinrichtungen unmittelbar durch entsprechende Labore umgesetzt werden. Auch die ermittelten Daten zur Lösungsmittelverträglichkeit (lösungsmittelbedingte testspezifische Verdünnungsfaktoren) von Biotests, kann zur Planung von Anreicherungsprotokollen und Probenahmekampagnen, durch KMU, Labore, Institute und Universitäten direkt genutzt werden. KMU, die unmittelbar von den Ergebnissen partizipieren, kommen aus dem Bereich der Laboranalytik. In der Laboranalytik sind rund 1.300 Prüf- und Kalibrierlaboratorien tätig, darunter ca. 530 in der Umweltanalytik, 364 in der medizinischen Analytik und 311 in der Industrieanalytik, die im besonderen Maße von den Ergebnissen profitieren [32, 33, 34]. Durch steigende regulatorische Anforderungen und technologische Fortschritte wächst der Anteil der Umweltlabore fortwährend.

Die Herstellung und Vermarktung der entwickelten DA-EDA-Kartusche kann unmittelbar erfolgen. Hierzu müssen nur die selektierten Festphasen in einem maschinellen Verfahren verarbeitet werden. Diese lukrative Aufgabe kann von Unternehmen aus dem Bereich der deutsche Analysen-, Bio- und Labortechnikbranche übernommen werden. Die Branche erwirtschaftet jährlich einen Umsatz von 10,9 Mrd. Euro. Hiervon entfällt ein erheblicher Teil des Umsatzes auf mittelständische Unternehmen [33]. Während große Unternehmen vermehrt durch Übernahmen wachsen, bleibt der Mittelstand eine tragende Säule der Branche, insbesondere in Nischenmärkten und der Entwicklung innovativer Technologien. Durch die Ergebnisse dieses Projektes können KMU ihre Marktposition weiter festigen. Es wird erwartet, dass durch einen maschinellen Herstellungsprozess die Vergleichbarkeit der Ergebnisse deutlich steigt. Mithilfe der maschinell gefertigten Kartuschen sollte mittelfristig die Durchführung von Ringversuchen und weiteren Laborvergleichsstudien angegangen werden, um die Anreicherungs-methode zu etablieren und weiter zu optimieren. Hierdurch kann gewährleistet werden, dass die Projektergebnisse auf lange Sicht zur Standardisierung und Normung von Anreicherungsverfahren für die wirkungsbezogene Analytik genutzt werden. Darüber hinaus helfen Laborvergleichsstudien bei der detaillierten Ausarbeitung eines standardisierten Protokolls und bewirkt gleichzeitig eine Steigerung der Akzeptanz. Vor diesem Hintergrund können Standardisierungs- und Normungsbestrebungen eines Anreicherungsverfahrens speziell für die wirkungsbezogene und effektdirigierte Analytik angegangen werden. Dieser Schritt ist absolut notwendig, um wirkungsbezogene Verfahren langfristig auch regulatorisch zu verankern.

6. Fortgeschriebener Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

6.1. Information der Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses

Die Unternehmen nutzten die Möglichkeit sich über die Sitzungen des projektbegleitenden Ausschusses über den aktuellen Stand des Forschungsprojektes zu informieren und sich in das Projekt einzubringen. Dazu wurden insgesamt vier Sitzungen sowohl in Präsenz als auch im Hybrid- bzw. Online-Format abgehalten (Tabelle 35), um möglichst vielen Unternehmen die Teilnahme zu ermöglichen. Ferner erfolgte über die gesamte Projektlaufzeit ein Austausch zwischen den Forschungseinrichtungen und Unternehmen bzw. Wasserversorgern. Hier wurde zum einen über aktuelle Ergebnisse berichtet und diskutiert, zum anderen über Durchführungen und Anforderungen von Bioassays beraten, oder sich zu technischen Herausforderungen insbesondere bei der Auswahl der Anreicherungsmaterialien, ausgetauscht.

6.2. Vorstellung der Ergebnisse durch Publikationen, Vorträge und Posterpräsentationen

Die Vorstellung des Projektes sowie der Ergebnisse gegenüber einem breiten Fachpublikum erfolgte während der Projektlaufzeit durch eine Publikation in einer Fachzeitschrift sowie sechs Vorträgen und einem Poster auf spezifischen Fachtagungen, dem Analytik-Tag in Duisburg und weiteren Veranstaltungen. Während der Projektlaufzeit wurden zudem zwei Bachelorarbeiten sowie zwei Masterarbeiten erfolgreich abgeschlossen (Tabelle 35).

6.3. Auflistung aller durchgeführten, sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen

Informationen zur zeitlichen Abfolge der durchgeführten Transfermaßnahmen können in Tabelle 35 eingesehen werden. Geplante Transfermaßnahmen, die über die Projektlaufzeit hinausgehen, können der Auflistung in Tabelle 36 entnommen werden.

Tabelle 35: Auflistung aller durchgeführten Transfermaßnahmen

Transfermaßnahme	Ort	Bezeichnung	Datum
Vortrag	Aschaffenburg, Fortbildungs- veranstaltung	Vorstellung des DA-EDA-Projektes und Diskussion von Anreicherungsverfahren mit Teilnehmern aus der Wirtschaft im Rahmen des Seminars LC-MS Kopplung	17.05.2022
Publikation	Laborpraxis, Fachbericht	Effekte im Blick – eine Frage der Anreicherung	09.08.2022
Bekanntmachung	IWW-Website	Forschungsprojekt DA-EDA	11.08.2022
Masterarbeit (M.Sc. Environmental Toxicology)	IUTA	Titel: Effect-based analysis of endocrine activities in ground and surface water	18.08.2022
Poster	MWAS 2022, Mülheim a.d.R.	Projektvorstellung und erste Ergebnisse zum DA-EDA-Projekt	14.09.2022
Vortrag	AnalytikTag, Duisburg	Kurzvorstellung Forschungsprojekt DA-EDA	10.11.2022
1. PA-Sitzung	IUTA (Hybrid)	Projektbegleitender Ausschuss	23.11.2022
Bekanntmachung	DVGW-Website	Forschungsprojekt DA-EDA	15.03.2023
2. PA-Sitzung	IUTA (Online)	Projektbegleitender Ausschuss	04.05.2023
Bachelorarbeit (B.Sc. Water Science)	IWW	Titel: Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode zur diskriminierungsarmen Anreicherung von Wasserproben anhand von Leitsubstanzen für die effektdirigierte Analytik	31.08.2023
3. PA-Sitzung	IWW (Online)	Projektbegleitender Ausschuss	27.09.2023
Vortrag	AnalytikTag 2023, Duisburg	Kurzvorstellung Forschungsprojekt DA-EDA	09.11.2023
Vortrag	Langenauer Wasserforum 2023, Langenau	Vorstellung Forschungsprojekt DA-EDA	14.11.2023
Bachelorarbeit (B.Sc. Water Science)	IUTA	Titel: Diskriminierungsfreie Anreicherung für die wirkungsbezogene Analytik (Acetylcholinesterase-Hemmung & Leuchtbakterien-Test)	29.04.2024

Transfermaßnahme	Ort	Bezeichnung	Datum
Masterarbeit (M.Sc. Environmental Toxicology)	IUTA	Titel: Diskriminierungsfreie Anreicherung in der wirkungsbezogenen Analytik für endokrine Disruptoren mittels hefebasierten Reporterassays	09.07.2024
Vortrag	MWAS 2024, Mülheim a.d.R.	Diskriminierungsfreie Anreicherung für die Effekt-Dirigierte Analytik Ergebnisse des IGF-Forschungsvorhabens Nr. 21954	11.09.2024
4. PA-Sitzung	IUTA	Projektbegleitender Ausschuss	26.09.2024
Vortrag	AnalytikTag 2024, Duisburg	Impulsvortrag Forschungsprojekt DA-EDA	07.11.2024

Tabelle 36: Auflistung der über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen

Transfermaßnahme	Ort	Bezeichnung	Datum
Bekanntmachung Projektabschluss	Homepage (IWW, IUTA, DVGW)	Kurzbericht zum Projektabschluss mit Verweis auf den Abschlussbericht	Mai 2025
Fachbericht	gwf - Wasser/ Abwasser	Kurzbericht der wesentlichen Forschungsergebnisse	Mai 2025
Fachpublikation (peer reviewed)	Internationales Journal z. B. Water Research	DA-EDA Projektergebnisse	Juni 2025
Verwendung der Ergebnisse in universitärer Lehre	Universität Duisburg-Essen	Studiengang Water Science	Ab 2025 fortlaufend
Verbreitung der Ergebnisse über Kolloquien	IWW	Kolloquium zum Einsatz von wirkungsbezogener Analytik in der Wasseraufbereitung	August 2025

6.4. Einschätzung zur Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzepts

Wie in den vorangegangenen Kapiteln erläutert und in Tabelle 36 zusammengefasst, wurden von den Forschungseinrichtungen zahlreiche Maßnahmen ergriffen, um ein breites Fachpublikum zu erreichen. Zu Beginn des Projekts wurden, aufgrund der COVID-19-Pandemie, Transfermaßnahmen durch die Verschiebung und den Ausfall

zahlreicher Tagungen eingeschränkt. Gegen Ende des Projekts konnten jedoch Beiträge auf Tagungen entsprechend der Auflistung präsentiert werden.

Die Projektergebnisse werden im Anschluss an das Forschungsvorhaben für die wissenschaftliche und wirtschaftliche Verbreitung klassisch in Form von rezensierten Fachzeitschriften aufbereitet. Mitarbeiter beider Forschungseinrichtungen sind aktiv in zahlreichen nationalen und europäischen Fach- und Beratungsgremien, Projektkreisen und wissenschaftlichen Netzwerken (CEN, DIN, NORMAN-Netzwerk, DVGW, ZWU, WaterEurope) tätig, wodurch neuste Erkenntnisse und Ergebnisse aus der Forschung direkt in diese Institutionen einfließen können.

Die Methodenkompetenz und Referenzlage der beteiligten Institute wurden erweitert, wodurch potenziell neue Tätigkeitsfelder in den Bereichen Forschung, Lehre und Beratung entstehen. Im Rahmen der zahlreichen Beratungs- und Entwicklungsaktivitäten bringen beide Institute neueste Forschungserkenntnisse direkt in die Praxis der Wasserver- und Abwasserentsorgung ein. Dank langjähriger Erfahrung und Kooperationen mit KMU aus den Bereichen Umweltanalytik und Wasseraufbereitung besteht auch ein hervorragendes Industrie-Netzwerk, das einen effizienten Wissenstransfer in die Wirtschaft ermöglicht. Beide Institute verfügen über langjährige Erfahrungen in der Organisation und Durchführung von Schulungs- und Trainingsmaßnahmen im Wassersektor, so dass eine weitere Verwertung durch die Erweiterung des Schulungs-Portfolios und eine multiplikative Einbringung der Ergebnisse in das Wasserfach langfristig sichergestellt ist. Im Rahmen der fortlaufend von IWW und IUTA organisierten nationalen und internationalen Veranstaltungen (Tagungen, Konferenzen, Seminare, Kolloquien) bestehen weitere vielfältige Möglichkeiten, neue Erkenntnisse zu präsentieren und an die Praxisanwender zu vermitteln. Zudem fließen die Ergebnisse in die von Mitarbeitern beider Institute durchgeführten Lehrveranstaltungen an der Hochschule Ruhr-West und der Universität Duisburg-Essen ein.

7. Verwendung der Zuwendung

7.1. Forschungsstelle (FE 1)

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

Es wurden insgesamt 21,3 Personenmonate (PM) für wissenschaftlich-technisches Personal abgerechnet (geplant 21,9 PM). Tabelle 37 zeigt die Verteilung der PM für wissenschaftliches-technisches Personal an FE 1 über die Kalenderjahre 2022 bis 2024.

Tabelle 37: Verteilung der Personenmonate des wissenschaftlich-technischen Personals an FE 1 über die Kalenderjahre 2022 - 2024

	Bewilligt	2022	2023	2024	Summe
HPA-A	21,90	8,39	9,55	3,36	21,30
HPA-B					

7.1.2. Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans)

Entfällt

7.1.3. Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans)

Entfällt

7.2. Forschungsstelle (FE 2)

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

Es wurden insgesamt 28,0 PM für wissenschaftlich-technisches Personal abgerechnet (geplant 28,5 PM). Tabelle 38 zeigt die Verteilung der PM für wissenschaftliches-technisches Personal an FE 2 über die Kalenderjahre 2022 bis 2024.

Tabelle 38: Verteilung der Personenmonate des wissenschaftlich-technischen Personals an FE 2 über die Kalenderjahre 2022 - 2024

	Bewilligt	2022	2023	2024	Summe
HPA-A	28,50	4,55	10,65	12,80	28,00
HPA-B	-	-	-	-	-

7.2.2. Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans)

Entfällt

7.2.3. Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans)

Entfällt

8. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die geleistete Arbeit entspricht in vollem Umfang dem begutachteten und bewilligten Antrag. Die geleisteten Arbeiten waren für den Projektverlauf notwendig und angemessen. Verzögerungen im Arbeitsplan durch technische Herausforderungen und Einschränkungen bei der Verwendung der Gebäudeinfrastruktur an FE 2 wurden im Rahmen der bewilligten, kostenneutralen Verlängerung der Laufzeit um sechs Monate kompensiert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Standardkalibrationskurven der Referenzsubstanz PFOA (n = 12) gemessen im TTR-TRB-CALUX	13
Abbildung 2: Leuchtbakterien-Hemmung in Abhängigkeit zu 3,5-Dichlorphenol mit den Konzentrationen 0,2, 2,0, 4,0, 8,0 und 12,0 mg/L. Jede Konzentration wurde in Dreifachbestimmung gemessen und der Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.	16
Abbildung 3: Übersicht über die Anzahl der Features aus dem positiven und negativen Ionisierungsmodus für jeden Kartuschenblindwert normiert auf die Masse des Sorbentsmaterials.	31
Abbildung 4: Chromatogramm der Kalibrierung bei einer Konzentration von 10 µg/L im negativen Ionisierungsmodus mit den jeweiligen Retentionszeiten (x-Achse) und Intensitäten (y-Achse).	37
Abbildung 5: Chromatogramm der Kalibrierung bei einer Konzentration von 10 µg/L im positiven Ionisierungsmodus mit den jeweiligen Retentionszeiten (x-Achse) und Intensitäten (y-Achse). Eine Vergrößerung des 2-Methyl-4-Isothiazolinon-Peaks ist im Chromatogramm enthalten, da dieser aufgrund seiner geringen Intensität im Vergleich zu den anderen Substanzen nicht sichtbar war.	37
Abbildung 6: Wiederfindungsraten der ersten Testmethode mit Isolute ENV+ (500 mg) bei verschiedenen Rekonstitutionsmethoden.	40
Abbildung 7: Einfluss verschiedener Elutionsmittel auf die Wiederfindungsraten der Referenzsubstanzen. Die gezeigten Ergebnisse wurden mit Isolute ENV+ (500 mg) bei einem Probenvolumen von 0,5 L und pH 7 erzielt.	41
Abbildung 8: Wiederfindungsraten für die Verwendung unterschiedlicher Sorbensmengen von Isolute ENV+ bei einem Probenvolumen von 1L, Anreicherung bei pH 2,5 und saurer Elution mit 2% FA in MeOH, ACN und EtAc.	43
Abbildung 9: Kationenaustauscher als Sorbentsmaterial im Vergleich zu Isolute ENV+. Strata X-CW (6 mL, 200 mg) und Chromabond PCA.	45
Abbildung 10: Wiederfindungsraten Aktivkohle- bzw. Graphit-basierter Sorbents-materialien im Vergleich mit Isolute ENV+. Chromabond Carbon A (6 mL, 500 mg), Agela AC (6 mL, 500 mg).	45
Abbildung 11: Materialien mit Anionenaustauscher Strata X-AW (6 mL, 200 mg) und Chromabond WAX (6 mL, 150 mg) im Vergleich zu Isolute ENV+.	46
Abbildung 12: Wiederfindung bei verschiedenen Realproben. Die gezeigten Realmatrices sind Grundwasser (GW), Oberflächenwasser (OW) und Kläranlagenablauf (KA-Ablauf).	47
Abbildung 13: Herstellung der DA-EDA-Kartuschen: Einwaage der Sorbentien (A), Befüllung mittels Metalltrichter (B), Einfügen von PE-Filterfritte und Verdichtung mittels Stempel (C), fertige DA-EDA-Kartusche (D).	49
Abbildung 14: Das Zellwachstum und die Aktivität der Hefezellen relativ zur Kontrolle werden als Mittelwerte mit Standardabweichung für alle getesteten Konzentrationen der DA-EDA-Stammlösung in den Assays (A: A-YAS, B: A-YES, C: A-YPS D: A-YGS) dargestellt (n = 3). Einige Fehlerbalken sind nicht sichtbar, da die Standardabweichung zu gering war; alle Standardabweichungen lagen jedoch unter 10 %.	53

Abbildung 15: Vergleich der Wiederfindungen in Bezug auf die relative Aktivität (OD405 in %) zwischen DA-EDA-Kartuschen mit angesäuerten (pH 2,5; n=3) und nicht angesäuerten Proben (nativ, n=2) in den vier Hefezell-Assays A-YAS, A-YES und A-YPS. Die getestete Konzentration der DA-EDA-Stammlösung lag bei 0,1 µg/L.	56
Abbildung 16: Vergleich der Wiederfindungen in Bezug auf die relative Aktivität (OD405 in %) zwischen DA-EDA-Kartuschen (n=3) und PMT-Kartuschen (n=3) in den vier Hefezell-Assays A-YAS, A-YES, A-YPS und A-YGS.	57
Abbildung 17: Peakflächen (Area Units, AU) der ersten (A) und zweiten (B) Hälfte der Referenzsubstanzen der DA-EDA-Stammlösung in Oberflächenwasser (n = 2). Die Proben wurden vor der Anreicherung bei 4 °C gelagert, und eine Serie wurde auf einen pH-Wert von 2,5 angesäuert.	63
Abbildung 18: Peakflächen (Area Units, AU) der ersten (A) und zweiten (B) Hälfte der Referenzsubstanzen der DA-EDA-Stammlösung in Oberflächenwasser (n = 2). Die Proben wurden nach der Anreicherung einmal auf Kartusche und einmal als Eluat bei – 20 °C gelagert.	64
Abbildung 19: Die Analyten Nitrofurantion, Parathion-Ethyl und Dihydrotestosterone sind aus den Abbildungen 17 und 18 vergrößert dargestellt um Unterschiede besser zu erkennen. Die Proben wurden vor der Anreicherung angesäuert auf pH 2,5 und nicht angesäuert bei 4 °C gelagert (A) oder nach der Anreicherung einmal auf Kartusche und einmal als Eluat bei – 20 °C eingefroren (B).	65
Abbildung 20: Wiederfindung der ersten Hälfte der Referenzsubstanzen der DA-EDA- Stammlösung in unterschiedlichen Matrices	68
Abbildung 21: Wiederfindung der zweiten Hälfte der Referenzsubstanzen der DA-EDA-Stammlösung in unterschiedlichen Matrices	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die im Projekt eingesetzten Biotests	6
Tabelle 2: Qualitätskriterien der Standardkalibrationsreihen im GR-CALUX (n = 10) und Vergleich mit Literaturangaben	12
Tabelle 3: Qualitätskriterien der Standardkalibrationsreihen im TTR-TRß-CALUX (n = 12) und Vergleich mit Literaturangaben	13
Tabelle 4: Qualitätskriterien des <i>Arxula</i> -Yeast Glucocorticoid Screens (A-YGS) (n = 3) und Vergleich mit Akzeptanzkriterien. Neben den Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) sind die Messungen der optischen Dichte (OD) spezifische Parameter des Biotests mit Hefezellen (OD620 = Zellwachstum, OD405 = Enzymaktivität).	14
Tabelle 5: Qualitätskriterien des <i>Arxula</i> -Yeast Progesterone Screens (A-YPS) (n = 3) und Vergleich mit Akzeptanzkriterien. Neben den Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) sind die Messungen der optischen Dichte (OD) spezifische Parameter des Biotests mit Hefezellen (OD620 = Zellwachstum, OD405 = Enzymaktivität).	15
Tabelle 6: Qualitätskriterien zur Validierung des Leuchtakterien-Tests (n = 3). <i>fkt</i> -Wert = Korrekturfaktor (<i>fkt</i>) aus dem Quotienten der Leuchtintensitäten der Ausgangsmessung (<i>I</i> ₀) und der Messung (<i>Ikt</i>) nach 30 Minuten.	15
Tabelle 7: Nicht-zytotoxische Lösungsmittelkonzentrationen (Volumenanteil in %) für die eukaryotische U2OS Zellen aus CALUX-Testsystemen mit unterschiedlichen Rezeptoren (ERα, AR, GR) sowie für die im in-vitro Mikrokernstest eingesetzte Hep-G2 Zelllinie	19
Tabelle 8: Nicht-hemmende Lösungsmittelkonzentrationen (Volumenanteil in %) für die im Ames-Fluktuationstest und umu-Test eingesetzten bakteriellen <i>S. typhimurium</i> Stämme sowie dem im Leuchtbakterientest eingesetzten Bakterium <i>A. fischeri</i> .	20
Tabelle 9: Nicht-hemmende Lösungsmittelkonzentrationen (Volumenanteil in %) für den Hefestamm <i>A. adenivorans</i> und das Enzym Acetylcholinesterase	20
Tabelle 10: Lösungsmittelbedingte Verdünnungsfaktoren für Biotests mit eukaryotischen Zelllinien	22
Tabelle 11: Lösungsmittelbedingte Verdünnungsfaktoren für Biotests mit Bakterien	22
Tabelle 12: Lösungsmittelbedingte Verdünnungsfaktoren für die unterschiedlichen <i>Arxula</i> Yeast Screens sowie dem Acetylcholinesterase-Assay	23
Tabelle 13: SPE-Kartuschen mit Angaben zum Sorbents-Typ, Sorbentsmenge und Hersteller.	24
Tabelle 14: Zellvitalität im MTT-Test in % (n = 3) bei Exposition gegenüber Kartuschenblindwerten mit einem REF von 10 für die eukaryotische U2OS Zellen aus CALUX-Testsystemen mit unterschiedlichen Rezeptoren (ERα, AR, GR) sowie für die im in-vitro Mikrokernstest eingesetzte Hep-G2 Zelllinie	26
Tabelle 15: Hemmung des Bakterienwachstums der im Ames-Fluktuationstest und umu-Test eingesetzten bakteriellen <i>S. typhimurium</i> Stämme (REF = 100) sowie Hemmung der Lumineszenz des im Leuchtbakterientest eingesetzten Bakteriums <i>A. fischeri</i> (REF = 10) durch Kartuschenblindwerte (n = 3)	27

Tabelle 16: Zellwachstum bzw. Enzymaktivität in % (n = 3) bei Exposition gegenüber Kartuschenblindwerten mit einem REF von 10 für die im Arxula Yeast Screen verwendeten Hefestämme bzw. der Acetylcholinesterase	28
Tabelle 17: Endokrine Wirkungen in CALUX-Testsystemen bzw. gentoxische Wirkung im in-vitro Mikrokerntest (n = 3) bei Exposition gegenüber Kartuschenblindwerten mit einem REF von 10	29
Tabelle 18: Endokrine Wirkungen in Arxula Yeast Screens (n = 3) bei Exposition gegenüber Kartuschenblindwerten mit einem REF von 10	29
Tabelle 19: Mutagene Wirkung im Ames-Fluktuationstest (<i>S. typhimurium</i> YG1041 und YG1042) und gentoxische Wirkung im umu-Test (<i>S. typhimurium</i> TA1535/pSK1002) durch Kartuschenblindwerte (REF = 100) (n = 3)	30
Tabelle 20: Referenzsubstanzzliste mit Angaben zu Hersteller, molarer Masse und Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (abgerufen von [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/]). n.a. = nicht angegeben	33
Tabelle 21: Übersicht der Validierungsmaßnahmen und deren Gültigkeitskriterien. Alle Standards wurden in Reinstwasser mit 0,1 % Dimethylsulfoxide (DMSO) gemessen.	34
Tabelle 22: Übersicht der Performance des Intra- und Inter-day Assays sowie des linearen Arbeitsbereichs mit den entsprechenden Bestimmungs- (BG) und Nachweisgrenzen (NWG)-für die jeweiligen Analyten in µg/L. Die Werte für Intra- (0,1 µg/L) und Inter-day (20 µg/L) Assay werden als relative Standardabweichung (SD %) angegeben. Diese Analyten wurden im negativen Ionisierungsmodus gemessen.	35
Tabelle 23: Übersicht der Ergebnisse aus Intra- und Inter-day Assay sowie des linearen Arbeitsbereichs mit den entsprechenden Bestimmungs- (BG) und Nachweisgrenzen (NWG)-für die jeweiligen Analyten in µg/L. Die Werte für Intra- (0,1 µg/L) und Inter-day (20 µg/L) Assay werden als relative Standardabweichung (SD %) angegeben. Diese Analyten wurden im positiven Ionisierungsmodus gemessen.	36
Tabelle 24: Detaillierte Parameter der einzelnen Zielsubstanzen für die massenspektrometrische Detektion, einschließlich ihrer Retentionszeit (t_R) für beide chromatographischen Säulen.	38
Tabelle 25: Allgemeine Parameter der LC-MS/MS Methode (LC40 Nexera X3 und LCMS-8060, Shimadzu).	38
Tabelle 26: Gradientenprogramm der LC-MS/MS Methode.	39
Tabelle 27: Charakterisierte SPE-Kartuschen mit Angaben zum Sorbents-Typ, Sorbentsmenge und Hersteller	42
Tabelle 28: Durchschnittliche Wiederfindung + SD (%) der Effekte im Leuchtbakterientest (LBT) und im Acetylcholinesterase Assay (AChE) für die DA-EDA- und die PMT-Kartusche	52
Tabelle 29: Effektkonzentrationen (PC10) der nativen und mittels DA-EDA-Kartusche angereicherten DA-EDA-Stammlösung und resultierende Wiederfindung im ER α - und AR-CALUX	59
Tabelle 30: Revertanten im Ames-Fluktuationstest für die native und mittels DA-EDA-Kartusche angereicherte DA-EDA-Stammlösung	60
Tabelle 31: Übersicht der untersuchten Stabilisierungsmaßnahmen	61

Tabelle 32: Wiederfindungen von sechs DA-EDA-Kartuschen, welche an sechs unterschiedlichen Tagen angereichert wurden. Ein Liter Reinstwasser wurde dazu jeweils mit 1 ng/L 17β-Estradiol dotiert. Die Kartuschen wurden am gleichen Tag eluiert und gemessen.	71
Tabelle 33: Versuchsparameter des <i>Arxula</i> Yeast Estrogen Screens zur Messung der Wiederhol- und Vergleichspräzision der DA-EDA-Kartusche mit dem entwickelten Anreicherungsprotokoll.	71
Tabelle 34: Wiederfindungen von drei DA-EDA-Kartuschen, welche in einem Vergleichslabor angereichert wurden. Je ein Liter Reinstwasser wurde dazu jeweils mit 1 ng/L 17β-Estradiol dotiert. Die Kartuschen wurden alle am gleichen Tag angereichert.	72
Tabelle 35: Auflistung aller durchgeführten Transfermaßnahmen	82
Tabelle 36: Auflistung der über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen	83
Tabelle 37: Verteilung der Personenmonate des wissenschaftlich-technischen Personals an FE 1 über die Kalenderjahre 2022 - 2024	85
Tabelle 38: Verteilung der Personenmonate des wissenschaftlich-technischen Personals an FE 2 über die Kalenderjahre 2022 - 2024	85

Abkürzungsverzeichnis

2-AA	Aminoanthracene
4-NOPD	4-Nitro-o-phenylendiamin
4-NQO	4-Nitrochinolin-1-oxid
AChE	Acetylcholinesterase
ACN	Acetonitril
AR	Androgenrezeptor
AU	Preakfläche - Area Units
A-YAS	<i>Arxula</i> -Yeast Androgen Screen
A-YES	<i>Arxula</i> -Yeast Estrogen Screen
A-YGS	<i>Arxula</i> -Yeast Glucocorticoid Screen
A-YPS	<i>Arxula</i> -Yeast Progesteron Screen
BG	Bestimmungsgrenze
C	Corticosteron
CALUX	Cell Activated LUCiferase eXpression
DEX	Dexamethason
DF	Verdünnungsfaktor - Dilution Factor
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
E2	17- β -Estradiol
EBM	effektbasierter Methoden
EC10	Effektive Wirkkonzentration bei 10% des maximalen Effekts
EC50	mittlere effektive Wirkkonzentration
ED	Endokrine Disruptoren
EDA	effektdirigierte Analytik
EF	Anreicherungsfaktor – Enrichment Factor
EGLV	Emschergenossenschaft/Lippeverband
EQ	Äquivalenzquotient
ER α	Estrogenrezeptor α
ESI	Electron Spray Ionisation - Elektrosprayionisierung
EtAc	Ethylacetat
EU-WRRL	Europäische Wasserrahmenrichtlinie
FA	Ameisensäure - Formic Acid
GR	Glucocorticoidrezeptor

GW	Grundwassermatrix
H ₂ O	Reinstwasser
Hep-G2	Humane Leberkrebszelllinie
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie – High Resolution Mass Spectrometry
IR	Induktionsrate
IUTA	Institut für Energie & Umwelt, Technik & Analytik
IWW	Institut für Wasserforschung gGmbH
KA	Kläranlage
KL	Kooperationslabor
LBT	Leuchtbakterientest
LC	Flüssigkeitschromatographie – Liquid Chromatography
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
MeOH	Methanol
MIT	Methylisothiazolinon
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl der Replikate
NF	Nitrofurantion
NTS	Non-Target Screening
NWG	Nachweisgrenze
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
OW	Oberflächenwassermatrix
P	Progesteron
PFAS	Per- und polyfluorierte Alkylverbindungen
PFBuA	Perflourbutansäure
PFBuS	Perflourbutansulfonsäure
PFOA	Perflouroctansäure
PFOS	Perflouroctansulfonsäure
PMT	Persistent, Mutagen, Toxisch
R ²	Bestimmtheitsmaß der Kalibrationsgeraden
REF	Relativer Anreicherungsfaktor - Relative Enrichment Factor
RV	Ruhrverband

S/N	Signal-zu-Rausch Verhältnis – Signal-to-Noise Ratio
S9	Mischung von Leberenzymen
SPE	Festphasenextraktion – Solid Phase Extraction
T4	Thyroxin
TIC	Totalionenstrom - Total Ion Current
TTR-TR	Thyroidrezeptor
U2OS	Osteosarkom-Zelllinie
UBA	Umweltbundesamt
WBA	wirkungsbezogene Analytik
WF	Wiederfindung
<i>I0</i>	Ausgangsmessung - Leuchtbakterientest
<i>Ikt</i>	Messung nach 30 Minuten - Leuchtbakterientest
<i>fkt</i>	Korrekturfaktor - Leuchtbakterientest

Literatur

- [1] CAS (2024). Chemical Abstract Service, <https://www.cas.org/support/documentation/chemical-substances>
- [2] Wang Z., Walker G.W., Muir D.C.G., et. al. (2020): Toward a Global Understanding of Chemical Pollution: A First Comprehensive Analysis of National and Regional Chemical Inventories. *Environ. Sci. Technol.*, 54(5):2575-84.
- [3] Richardson S.D., DeMarini D.M., Kogevinas M., et. al. (2010): What's in the pool? A comprehensive identification of disinfection by-products and assessment of mutagenicity of chlorinated and brominated swimming pool water. *Environ. Health Perspect.*, 118, 1523–1530. doi:10.1289/ehp.1001965
- [4] Richardson S.D., Plewa M.J., Wagner E.D., et. al. (2007): Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research, The Sources and Potential Hazards of Mutagens in Complex Environmental Matrices - Part II* 636, 178–242. doi:10.1016/j.mrrev.2007.09.001
- [5] Dopp E., Pannekens H., Gottschlich A., et. al. (2021): Effect-based evaluation of ozone treatment for removal of micropollutants and their transformation products in waste water. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*, 2021:1-22, doi:10.1080/15287394.2021.1881854
- [6] Grummt T., Braunbeck T., Hollert H., Kramer M. (2018): Gefährdungs-basiertes Risikomanagement für anthropogene Spurenstoffe zur Sicherung der Trinkwasserversorgung (Tox Box). Leitfaden (BMBF-Fördermaßnahme RiSKWa). Herausgeber: Umweltbundesamt. https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/374/dokumente/toxbox_leitfaden_2018.pdf
- [7] UBA - Umweltbundesamt (2013). Bewertung der Anwesenheit teil- oder nicht bewertbarer Stoffe im Trinkwasser aus gesundheitlicher Sicht. Empfehlung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trinkwasserkommission beim Umweltbundesamt. *Bundesgesundheitsbl. – Gesundheitsforsch. – Gesundheitsschutz*, 46:249–251. DOI 10.1007/s00103-002-0576

- [8] Umweltbundesamt (2023): Liste der nach GOW bewerteten Stoffe (Stand: März 2023,
https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/5620/dokumente/li-stegowstoffeohne-psm-20230317-homepage_0.pdf.
- [9] Wernersson A., Carere M., Maggi C. et al. (2015): The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environ. Sci. Eur.*, 27, 7, <https://doi.org/10.1186/s12302-015-0039-4>
- [10] Brack W. (2003): Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Anal. Bioanal. Chem.*, 377, 397–407.
- [11] Trinkwassereinzugsgebieteverordnung (2023): Verordnung über Einzugsgebiete von Entnahmestellen für die Trinkwassergewinnung* (Trinkwassereinzugsgebieteverordnung - TrinkwEGV). BGBl. 2023 I Nr. 346
- [12] DIN EN ISO 11348-1 (2023): Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest) - Teil 1: Verfahren mit frisch gezüchteten Bakterien (ISO 11348-1:2007 + Amd 1:2018); Deutsche Fassung EN ISO 11348-1:2008 + A1:2018
- [13] Hirman D., Loibner A.P., Braun R., Szolar O.H.J. (2007): Applicability of the bioluminescence inhibition test in the 96-well microplate format for PAH-solutions and elutriates of PAH-contaminated soils. *Chemosphere*, 67-6, 1236-1242, ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.047>.
- [14] X. Y. Ma, X. C. Wang, H. H. Ngo, W. Guo, M. N. Wu, N. Wang (2014): Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements, and applications. *Science of The Total Environment*, 468–469, 1-11, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.028>.
- [15] Dąbrowski Ł. (2016): Review of use of keepers in solvent evaporation procedure during the environmental sample analysis of some organic pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80, 507-516, ISSN 0165-9936, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.014>.
- [16] Hohmann S. (1997): Shaping up: the responses of yeast to osmotic stress. In: *Yeast Stress Responses* pp. 101–146 R.G. Landes Company, Austin, TX

- [17] Schulz W., Lucke T. et al. (2019): Non-Target Screening in Water Analysis - Guideline regarding the application of LC-ESI-HRMS for Screening. <http://www.wasserchemische-gesellschaft.de>
- [18] DIN EN ISO 11348-1 (2023): Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest) - Teil 1: Verfahren mit frisch gezüchteten Bakterien (ISO 11348-1:2007 + Amd 1:2018); Deutsche Fassung EN ISO 11348-1:2008 + A1:2018
- [19] Pham H. M., Chamas A., Nieter A., et. al. (2016): Determination of glucocorticoids using photometric (A-YGS) and spectrofluorometric (A-YGFS) bioassays based on modified *Arxula adeninivorans* cells: Applications in environmental analysis. *Sensors and Actuators B-chemical*, 223, 540-549.
- [20] Ponec M, Kempenaar J, Shroot B, Caron JC (1986): Glucocorticoids: binding affinity and lipophilicity. *J Pharm Sci.* (10):973-5. doi: 10.1002/jps.2600751013. PMID: 3795028.
- [21] He Y., Yi W., Suino-Powell K., et al. (2014): Structures and mechanism for the design of highly potent glucocorticoids. *Cell Res* 24, 713–726. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.52>
- [22] DIN EN ISO. (2024): DIN EN ISO 13646:2024-02 - Draft: Water quality - Determination of selected estrogens in whole water samples - Method using solid phase extraction (SPE) followed by liquid chromatography (LC) or gas chromatography (GC) coupled to mass spectrometry (MS) detection (ISO/DIS 13646:2024); German and English version prEN ISO 13646:2024. 02, 146. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.31030/3516694>
- [23] Barion A., Balsaa P., Werres F., et. al. (2018): Stability of organochlorine pesticides during storage in water and loaded SPE disks containing sediment. *Chemosphere*, 210:57-64.
- [24] Chang S., & Lamm S. H. (2003): Human Health Effects of Sodium Azide Exposure: A Literature Review and Analysis. *International Journal of Toxicology*, 22(3), 175–186. <https://doi.org/10.1080/10915810305109>
- [25] Hendrix K., Bleyen N., Mennecart, T., et. al. (2019): Sodium azide used as microbial inhibitor caused unwanted by-products in anaerobic geochemical

- studies. Applied Geochemistry, 107, 120–130.
<https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2019.05.014>
- [26] Le Blanc-Louvry I., Laburthe-Tolra P., Massol V., et. al. (2012): Suicidal sodium azide intoxication: An analytical challenge based on a rare case. Forensic Science International, 221(1–3), e17–e20.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.04.006>
- [27] Petrie B., Proctor K., Youdan J., et. al. (2017): Critical evaluation of monitoring strategy for the multi-residue determination of 90 chiral and achiral micropollutants in effluent wastewater. Science of The Total Environment, 579, 569–578. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.059>
- [28] Hillebrand O. (2014): Fate of organic micropollutants in a karst aquifer system— Implications for sustainable raw water management [Georg-August-University Göttingen]. <https://doi.org/10.53846/goediss-4655>
- [29] DIN 38415-3 (1996): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) - Teil 3: Bestimmung des erbgutverändernden Potentials von Wasser mit dem umu-Test (T 3)
- [30] ISO 11350 (2012): Water quality — Determination of the genotoxicity of water and waste water — Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test)
- [31] DIN 32645 (2008): Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung
- [32] Trendreport 2022 Analysen-, Bio- und Labortechnik - Märkte, Entwicklungen, Potenziale. SPECTARIS - Deutscher Industrieverband für Optik, Photonik, Analysen- und Medizintechnik e.V., https://www.spectaris.de/fileadmin/Content/Analysen-Bio-und-Labortechnik/Zahlen-Fakten-Publikationen/Trendreport_Analysen_Bio_und_Labortechnik_2022.pdf?utm
- [33] Mittelstand im Einzelnen, 2022. Institut für Mittelstandsforschung, Bonn, <https://www.ifm-bonn.org/statistiken/mittelstand-im-einzelnen/umsaetze?utm>

- [34] K. Schöneberg, H. Riede, 2024: Branchenanalyse Laboranalytik: Zweites Update: Auswirkungen von Corona-Pandemie und Energiekrise. Working Paper Forschungsförderung No. 350, Hans Böckler Stiftung.
<https://hdl.handle.net/10419/305284>