

RISK-IDENT – Identifizierung, Bewertung und Minderung bislang unbekannter Spurenstoffe in Gewässern

Anne Bayer^a, Marco Luthardt^b, Frank Leßke^b, Giorgia Greco^c, Sylvia Grosse^c, Thomas Letzel^c, Wolfgang Schulz^d, Willi Kopf^a, Robert Asner^a, Klaus Weiß^a, Friederike Bleckmann^a, Angela Kolb^a, Manfred Sengl^a, Marion Letzel^a

^aBayerisches Landesamt für Umwelt (LfU), ^bHochschule Weihenstephan-Triesdorf (HSWT), ^cTechnische Universität München (TUM), ^dZweckverband Landeswasserversorgung (LW)

Das Projekt RISK-IDENT

Arzneimittel, Reinigungsmittel, Duftstoffe und andere anthropogene Spurenstoffe gelangen täglich mit unserem Abwasser in die Kläranlagen. Werden sie dort nicht vollständig abgebaut, schädigen sie möglicherweise später im Gewässer Mikroorganismen, Pflanzen und Tiere. Viele dieser Spurenstoffe werden bei derzeitigen Routineanalysen nicht erfasst. Auch weiß man oft noch wenig darüber, welche Abbauprodukte entstehen und wie sie wirken. Doch wie identifiziert man unbekannte Stoffe? Wie bewertet man das von ihnen ausgehende Risiko und minimiert ihren Eintrag?

Das vom Bundesministerium für Forschung und Gesundheit (BMBF) geförderte Projekt RISK-IDENT sucht nach Methoden, um die nur in Spuren auftretenden anthropogenen Stoffe und ihre Abbauprodukte zu identifizieren. Ihre Persistenz, Mobilität, Ökotoxizität und Rohwasserrelevanz werden ebenso untersucht wie das von ihnen ausgehende Risiko für Gewässerorganismen. Um ihren Eintrag in die Umwelt zu verringern, wird ein Verfahren zur Elimination von Spurenstoffen in der Abwasserreinigung entwickelt und erprobt. Die gewonnenen Erkenntnisse werden in Form von Handlungsanweisungen sowie Veröffentlichungen und Fachtagungen den Zielgruppen Kommunen, Wirtschaft, Gesetzgeber, Bürger und Fachgremien zugänglich gemacht.

RISK IDENT Identifizieren | Bewerten
Handeln | Kommunizieren

Dabei koordiniert das Bayerische Landesamt für Umwelt (LfU) das Projekt, beteiligt sind auch die Hochschule Weihenstephan-Triesdorf (HSWT), die Technische Universität München (TUM), der Zweckverband Landeswasserversorgung (LW) und die Firma CONDIAS GmbH.



Abb. 1: In die Datenbank STOFF-IDENT werden Stoffe wie Arzneimittel, Haushaltschemikalien, Biozide und unter REACH registrierte Stoffe hinterlegt.

STOFF-IDENT: Eine Datenbank für die Wasseranalytik

In vielen Bereichen der Wissenschaften spielen mittlerweile allgemein zugängliche Datenbanken eine sehr bedeutende Rolle für die Forschungsgemeinschaft. So sind z.B. in der Molekularbiologie Sequenzdatenbanken mit den dazugehörigen Algorithmen (etwa zum Vergleich von Sequenzen) ein wesentlicher Bestandteil moderner Forschung. Auch im Bereich der Chemie gibt es einige solcher Datenbanken (z.B. ChemSpider.com oder chemicalize.org), die es erlauben Eigenschaften und Informationen über chemische Strukturen abzufragen.

Im Rahmen des Projekts RISK-IDENT wird nun eine Arbeitsplattform speziell für den Bereich der Wasseranalytik entwickelt. Diese Plattform besteht aus einer Datenbank (STOFF-IDENT), die Kenndaten aller potentiell gewässerrelevanten Stoffe enthält, sowie einer modularen Software basierend auf dem openMASP System, das die analytischen Schritte beim Suspected-Target Screening unterstützt. Weiterhin integriert es bereits bestehende analytische Datenbanken wie DAIOS, um etwa den Vergleich von MS/MS-Spektren zu ermöglichen.

Die Datenbank STOFF-IDENT stellt alle für den Nachweis im Gewässer benötigten analytischen Informationen und darüber hinausgehende Stoffeigenschaften zur Verfügung. Dazu wurden zunächst Stoffe aufgenommen, die bisher im Rahmen der REACH-Verord-

nung schon registriert werden mussten. Dies sind:

- alle hochtonnagigen Stoffe mit einem Produktionsvolumen über 1000 t/a
- R50/53-Stoffe (Stoffe, die sowohl sehr giftig für Wasserorganismen sind als auch in Gewässern längerfristige schädliche Wirkungen haben können) mit Produktionsvolumina über 100 t/a
- CMR-Stoffe (Stoffe, die kanzerogen, mutagen und/oder reproduktionstoxisch sind) mit Produktionsvolumina über 1 t/a

Bei diesen mehreren tausend Stoffen kann man davon ausgehen, dass sie umweltrelevant sind. Derzeit startet die Einbindung weiterer Stoffe, die in unseren Gewässern auftreten können, wie zugelassene Pflanzenschutzmittel, Biozide und Arzneimittel.

Um Laboren die Identifizierung von bis dahin unbekanntem Spurenstoffen zu erleichtern, enthält die Datenbank zu allen Stoffen deren CAS-Nummer, Namen, sowie physikalisch-chemische Informationen und Metadaten wie Summenformel, monoisotopische Masse, Strukturformel, Hydrophobizität (logP, logD) und Wasserlöslichkeit.

Die Funktionalität der entwickelten Arbeitsplattform basiert auf der komponentenbasierten Software openMASP. Hierbei handelt es sich um ein Projekt der HSWT und TUM mit dem Ziel eine frei zugängliche modulare Software für die Analytik zu etablieren. Das Konzept der Modularität ist dabei zentral, denn es soll dem Benutzer möglich sein die

Software frei je nach Art der Anwendung zu konfigurieren. Die Module beinhalten Funktionalitäten die z.B. bei der Auswertung von Massenspektren nötig sind. Jedes Modul ist dabei zunächst möglichst autark und unabhängig von anderen Systemkomponenten. Dadurch ergibt sich eine größtmögliche Flexibilität, mit der unter geringem Aufwand weitere Datenquellen (Datenformate) hinzugefügt und zusätzliche Analyse-Werkzeuge zur Verfügung gestellt werden können. Diese wiederum können sehr eng miteinander verzahnt werden.

Als Analysetool steht schon jetzt das sogenannte RTI-Modul bereit. Es nutzt die im RISK-IDENT Projekt eingeführte Retentionszeitnormierung um einem analytischen Signal mit bestimmter Masse und bestimmtem Retentionszeitindex (RTI) jeweils eine exakte Masse und einen logP-Wert (bzw. logD) zuzuordnen zu können. Dies ist ein extrem wichtiger Schritt, um analytische Daten aus verschiedenen Laboren vergleichbar zu machen.

Als dritte Komponente der Arbeitsplattform wird in Zukunft auch die Datenbank DAIOS integriert, die von der LW entwickelt wurde und im Bereich der Wasseranalyse bereits seit längerem im Einsatz ist. Diese unterstützt die Identifizierung von unbekanntem Spurenstoffen auf Grund von MS/MS Messungen und den dort abgespeicherten Strukturdaten.

Die vierte Säule wird die Verknüpfung zu anderen bereits bestehenden Modulen bzw. Datenbanken darstellen. Speziell dafür ist die Arbeitsplattform aufgrund ihrer programmierten Grundstruktur besonders gut aufgestellt.

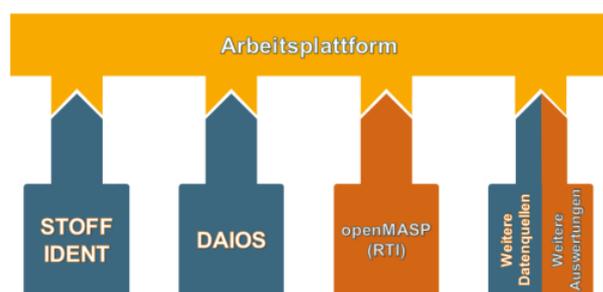


Abb. 2: Struktur der im RISK-IDENT-Projekt entwickelten Arbeitsplattform.

Die Software der Datenbank STOFF-IDENT basiert auf einer SQL-Datenbank und wird über eine Web-Schnittstelle angesprochen. Die openMASP-Komponenten basieren auf dem Equinox-Framework von Eclipse. Eine erste Version der Arbeitsplattform mit der Datenbank STOFF-IDENT und dem RTI-Modul wurde im April 2013 auf einem Workshop an der HSWT vorgestellt.

Suspected-Target Screening: Die analytische Strategie in RISK-IDENT

Was ist in der Wasserprobe enthalten? Die zielsicherste Technologie, um dies herauszubekommen ist aktuell das sogenannte „Suspected-Target Screening“. Dabei werden die Analysen zunächst mittels etablierter Non-Target-Screening-Technologien, besonders LC-MS(/MS), vermessen. Anschließend werden die Daten jedoch nicht wie üblich gegen eine chemische oder massenspektrometrische (Spektren-)Datenbank, sondern gegen die oben beschriebene Stoffdatenbank STOFF-IDENT abgeglichen. Diese enthält im Wesentlichen nur potentiell im Wasser vorkommende Substanzen und macht demzufolge erwartete Moleküle leichter bestimmbar.

Der Begriff „Non-Target Screening“ oder „General Unknown Screening“ wird in der Literatur häufig bei Anwendung der LC-MS mit einem akkurat messenden Massenanalysator verwendet. Es handelt sich hierbei prinzipiell eher um eine Analysetechnik und weniger um eine neue Strategie. So ist das Screening nach organischen Spurenstoffen in einer Wasserprobe mit GC-MS seit Jahrzehnten ein bewährtes und erprobtes Verfahren. Die im Chromatogramm auftretenden Peaks können bei der GC auch über deren Retentionsindex (dem sog. RI) und dem Massenspektrum charakterisiert werden. Mithilfe von Spektrenbibliotheken und massenspektrometrischer Interpretationstechniken ist es dort möglich, die flüchtige Substanz zu identifizieren und eventuell anschließend per Referenzsubstanz zu validieren. Die Spektrenbibliotheken sind meist eindeutig nutzbar, da man mit normierter Ionisation, d.h. Electron Impact (EI) 70eV arbeitet und die Ionisation und Fragmentierung bei unterschiedlichen Geräten demzufolge zu gleichen Ergebnissen der Spektren führt.

Eine direkte Übertragung dieser bewährten Vorgehensweise von der GC-MS auf die LC-MS ist bisher jedoch leider nicht möglich. Messtechnisch ist man heute zwar in der Lage, viele nichtflüchtige polare Verbindungen in Wasser mittels LC-MS sehr gut zu detektieren, aber entsprechende, allgemein nutzbare Spektrenbibliotheken sind erst in ihrer Anfangsphase. Bei der am häufigsten eingesetzten Elektrospray Ionisation (ESI) entsteht durch den Eluenten der HPLC-Trennung (Analytionen und Matrixionen) eine Vielzahl an Molekülionen, Molekülion-Addukten bzw. Molekülion-Fragmente. Des Weiteren entstehen in den verschiedenen Massenspektrometertypen

häufig unterschiedliche Molekülfragmente, die in ihrer Gesamtheit nur schwer in Datenbanken zu hinterlegen sind. Die Auswertung der Datensätze unterschiedlicher Massenspektrometertypen kann dann in unterschiedlicher Weise erfolgen, beispielsweise durch direkten Vergleich mit einer passenden Spektrenbibliothek oder einer Target-Liste (Post-Target Analyse, Suspected-Target Screening). Diese Listen sollten aber neben den Spektren eben auch die Polaritäten der Moleküle (bzw. den logP und logD) berücksichtigen, da diese – in der Chromatographie – normierte molekülspezifische Ergebnisse liefert.



Abb. 3: LC-MS-Analytik im Labor.

Zur besseren Nutzbarkeit und Vergleichbarkeit der Chromatographie etablieren wir deshalb wie oben erwähnt den RTI. Hierzu wird ein Referenzmix mit bekannten Substanzen und bekanntem logP analysiert. Über eine neu programmierte Software (openMASP.hswt.de) kann der RTI anschließend berechnet werden.

Potenzielle Einsatzmöglichkeiten des RTI:

- Bei regelmäßiger Nutzung des Referenzmixes kann automatisch die Chromatographie (über RTI), die massenspektrometrische Spezifität (über m/z) und die massenspektrometrische Sensitivität (über die Signalfäche) validiert werden.
- Die Chromatographie aus einem Labor kann direkt mit denen aus anderen Laboren abgeglichen werden, die ebenfalls den Referenzmix nutzen.
- Der logP für unbekannte ungeladene Moleküle kann auch per Chromatographie ermittelt werden, ähnlich der OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS 117.
- Der RTI kann als einfaches Vorhersagewerkzeug für Retentionszeiten eingesetzt werden.

Die Nutzung aller vorhandenen analytischen Kenndaten und bereitgestellten Datenbanken wird in naher Zukunft zu einer wesentlich

schnelleren und zielgerichteten Auswertung analytischer Wasserproben führen.

Wasserrelevante Untersuchungsbereiche in RISK-IDENT

Angewendet werden konnte die analytische Vorgehensweise schon bei Wasserproben, die aus dem Labor kamen. In Kläranlagen im Labormaßstab wurden verschiedene Arzneimittel einzeln untersucht (mehr zu den Laborkläranlagen unter Letzel et al., 2010). Ausgewählt wurden bisher Arzneimittel, die in großen Mengen in Deutschland verordnet werden und die schon in Gewässerproben nachgewiesen werden konnten.

Mithilfe eines Vorhersage-Programms der University of Minnesota werden die Transformationsprodukte (TPs) prognostiziert und damit eine Liste potentieller TPs inklusive Strukturformel, exakter Masse und logP (aus EPI SuiteTM v4.10) erstellt. In den Abläufen der Kläranlagen wird mit der oben genannten Vorgehensweise (Suspected-Target Screening) nach entstandenen TPs gesucht. Die so per LC-MS-Analyse gewonnenen Daten wurden in diesem Fall nicht mit Daten verglichen, die in STOFF-IDENT hinterlegt sind, sondern mit den Daten (exakten Massen) der vorhergesagten potentiellen TPs. Da noch sehr wenig zu TPs der untersuchten Arzneimittel bekannt ist, sind diese Daten in der STOFF-IDENT noch nicht zu finden. Deshalb wird eine Liste möglicher TPs mit den gleichen analytischen Informationen erstellt, die auch in STOFF-IDENT hinterlegt werden können. Können TPs als mögliche Kandidaten detektiert werden, wird über MS/MS die vorhergesagten Strukturen der TPs überprüft.

Das beschriebene Procedere wurde am Beispiel von blutdrucksenkenden Arzneimitteln aus der Gruppe der Sartane, wie Valsartan, durchgeführt. Mit Erfolg: Es konnten mehrere TPs der Sartane identifiziert werden, inklusive der bekannten TPs von Valsartan (Kern et al., 2009). Auch konnten diese TPs und die dazugehörigen Ausgangssubstanzen sowohl in realen Kläranlagenabläufen als auch in Flüssen nachgewiesen werden.

Noch einer weiteren Frage geht das Projekt RISK-IDENT nach: Was passiert mit Stoffen, wenn sie bei der Uferfiltration zur Gewinnung von Rohwasser (der Vorstufe zu Trinkwasser) den Boden passieren? Welche TPs entstehen dabei? Mobilitätsversuche mit verschiedenen Stoffen in Aquifersäulen sollen diese Fragen beantworten. Hierzu wird aerober oder anaerober Boden in Säulen gefüllt. Aerobes Wasser bzw. anaerobes Grundwasser wird mit Stoffen versetzt und ca. 50 Tage im Kreislauf durch die Säulen gepumpt. Bislang wurden Pflanzenschutz-

mittel, Arzneimittel und deren humane Metaboliten untersucht. Der Abbau der Stoffe in den Säulen, der in aerober Umgebung anders als in anaerober Umgebung sein kann, wird verfolgt. Es ist wichtig zu wissen, ob sich Stoffe unterschiedlich in aerober und anaerober Umgebung verhalten, denn in der Natur gibt es sowohl aerobe als auch anaerobe Böden. Hier leben unterschiedliche Mikroorganismen, die die verschiedenen Stoffe unterschiedlich gut abbauen können. Dadurch können dann auch verschiedene TPs entstehen. Auch hier wird mit der oben genannten analytischen Vorgehensweise nach entstandenen TPs gesucht.

Zusätzlich werden Uferfiltratproben genommen und mit den Ergebnissen aus den Säulenversuchen verglichen. Zu bislang noch nicht identifizierten Signalen aus den Proben sollen mithilfe der Datenbank STOFF-IDENT Stoffe zugeordnet werden (Skizze der Vorgehensweise siehe Abbildung 4).

Die ökotoxikologische Strategie in RISK-IDENT

Haben die untersuchten Stoffe und ihre TPs eine schädigende Wirkung auf Organismen, die in den Gewässern leben? Im Projekt RISK-IDENT wird die akute und chronische Wirkung von Spurenstoffen anhand standardisierter biologischer Testverfahren ermittelt. Die Labortests werden mit Organismen verschiedener trophischer Ebenen wie Algen, Daphnien (Wasserflöhe) und Fischen durchgeführt, sowie neuartige Wirkungen wie

Mutagenität und endokrine Wirkungen untersucht. Es wird sowohl die Ökotoxizität der Reinstoffe als auch die Mischtoxizität mehrerer Stoffe in Abwässern aus den Laborkläranlagen bestimmt.

Im Focus liegt auch die mögliche Bildung von TPs während der Abwasserbehandlung sowie deren Relevanz für die Umwelt.

Bislang ist bekannt, dass beispielweise Valsartan in Konzentrationen von bis zu 580 mg/l keine akuten Effekte auf *Daphnia magna* (Hoeger, 2008) zeigt. Eigene ökotoxikologische Tests weisen darauf hin, dass auch die in der Umwelt auftretenden Konzentrationen der Sartane und ihrer TPs für die in den Gewässern lebenden Organismen vermutlich nicht relevant sind. Insbesondere wurden keine akut toxischen Wirkungen auf Fische (Letalität) und auch keine chronischen Effekte auf Daphnien (Reproduktion) und Algen (Wachstumsrate) festgestellt.

Diese ökotoxikologischen Daten werden als Grundlage für eine Gefährdungsabschätzung (risk assessment) der polaren Spurenstoffe selbst, aber auch für die Eignung der eingesetzten Eliminationsverfahren als Teil des Risikomanagements herangezogen. Das ökotoxikologische Risiko in Gewässern wird aus dem sogenannten PEC/PNEC-Verhältnis geschätzt. Chronische Effekte gegenüber Organismen (Langzeit-Tests) unterschiedlicher Trophieebenen liefern ökotoxikologische Kenngrößen wie z.B. die NOEC (no observed effect concentration). Unter Be-

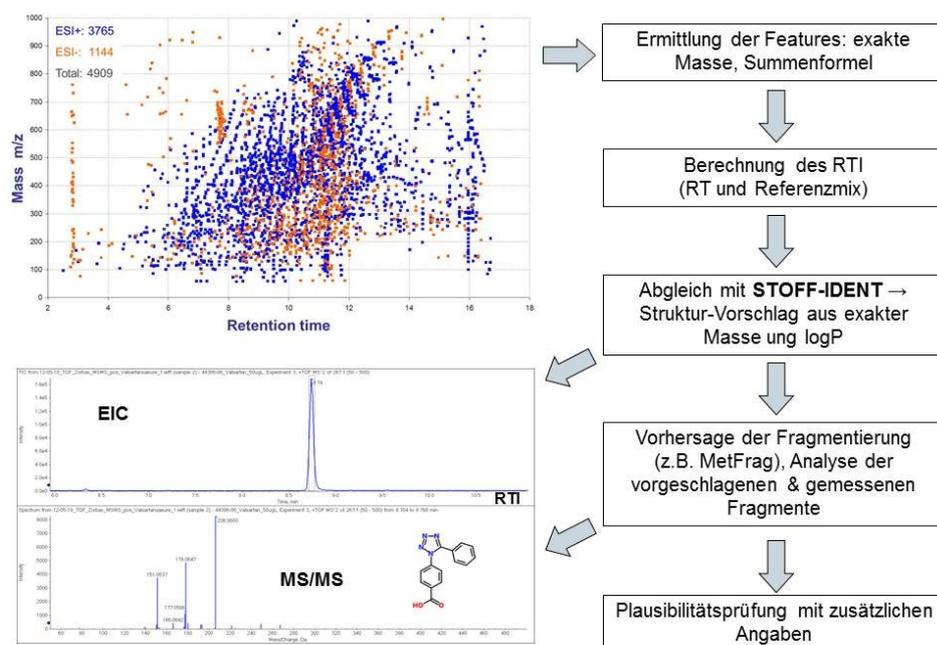


Abb. 4: Die Schritte von den unbekanntem Signalen in einer Wasserprobe (z. B. kontaminiertes Grundwasser) bis zur möglichen Zuordnung zu einer Substanz (hier Valsartansäure) mithilfe von RTI und STOFF-IDENT.

rücksichtigung eines entsprechenden Sicherheitsfaktors wird daraus die PNEC (predicted no effect concentration) abgeleitet. Dieser „Vorsorgewert“ wird verglichen mit der PEC (predicted environmental concentration), d.h. mit der im Gewässer ermittelten Konzentration. Bei einem PEC/PNEC-Verhältnis von <1 wird ein Umweltrisiko als gering erachtet.

Eine ökotoxikologische Gefährdungsabschätzung kann auch durch einen Vergleich von Zu- und Abläufen auf Kläranlagen vorgenommen werden. Hierbei können insbesondere Maßnahmen zur Elimination von polaren Spurenstoffen hinsichtlich ihrer ökotoxikologischen Relevanz beurteilt werden. Der Vorteil von ökotoxikologischen Tests ist, dass integrierend die Wirkung aller Wasserinhaltsstoffe – also auch von möglichen TPs – erfasst wird, ohne dass diese im Einzelnen bekannt sein müssen.

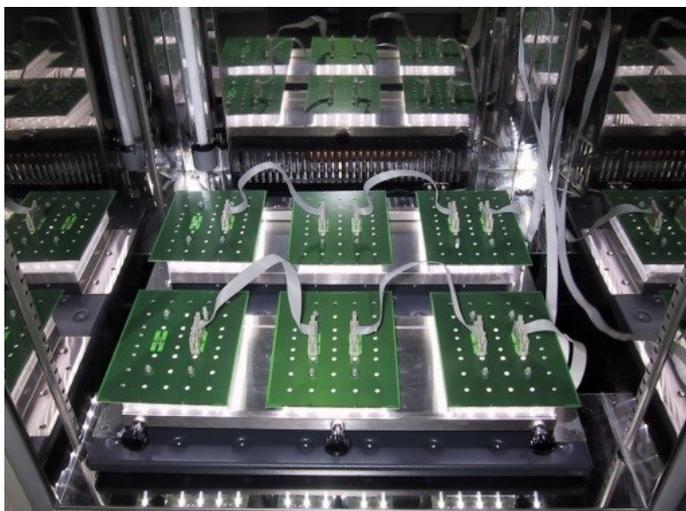


Abb. 5: Algentest auf Mikrotiterplatten

Ziele der Wissensvermittlung und Verbreitung

Die gewonnenen Erkenntnisse werden auf der Projekt-Homepage (<http://risk-ident.hswt.de/>), auf Fachtagungen, als Handlungsanweisungen für Labore und Kläranlagen sowie in Veröffentlichungen den Zielgruppen Kommunen, Wirtschaft, Gesetzgeber, Bürger und Fachgremien zugänglich gemacht.

Literatur

Hoeger, B., 2008. *Novartis Environmental Assessment: Aliskiren / Valsartan*. in: *Novartis (Ed.). Global Pharma Environment*, http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2009/022217s000ea.pdf.

Kern, S., Fenner, K., Singer, H., Schwarzenbach, R.P., Hollender, J., 2009. *Identification of Transformation Products of Organic Contaminants in Natural Waters by Computer-Aided Prediction and High-Resolution Mass Spectrometry*. *Environmental science & technology* 43, 7039-7046.

Letzel, M., Weiss, K., Schüssler, W., Sengl, M., 2010. *Occurrence and fate of the human pharmaceutical metabolite ritalinic acid in the aquatic system*. *Chemosphere* 81, 1416-1422.