



Festphasenmikroextraktion (SPME) für die Bestimmung hydrophober organischer Chemikalien in Biokonzentrationsstudien

Leonard Böhm¹ (leonard.boehm@envr.jlug.de), Christian Schlechtriem² (christian.slechtriem@ime.fraunhofer.de), Rolf-Alexander Düring¹ (rolf-alexander.duering@envr.jlug.de)

¹ Institut für Bodenkunde und Bodenerhaltung, iFZ für Umweltsicherung, Justus-Liebig-Universität Gießen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen

² Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME, Auf dem Aberg 1, 57392 Schmallenberg

Zusammenfassung

Für die Risikobewertung von Chemikalien werden in der Regel Biokonzentrationsstudien mit Fischen gemäß OECD-Richtlinie 305 durchgeführt; Endpunkt ist der Biokonzentrationsfaktor (BCF). Die Extraktion der Wasserphase erfolgt meistens lösungsmittelbasiert und führt zur Bestimmung von Gesamtgehalten. Durch Sorptionsprozesse kann es jedoch zu einer Unterschätzung der BCF-Werte für stark hydrophobe Chemikalien (HOC) kommen. Die automatisierte Festphasenmikroextraktion (solid-phase microextraction, SPME) ermöglicht hingegen die lösungsmittelfreie Extraktion der Wasserphase, erlaubt die Unterscheidung von frei gelösten und gesamten Konzentrationen und liefert somit wertvolle Zusatzinformationen zum Anteil bioverfügbarer Konzentrationen. Die revidierte OECD-Richtlinie 305 und das zugehörige Guidance Document empfehlen daher den Einsatz der SPME für die Extraktion von HOCs.

Einleitung

Im Rahmen von Zulassungsstudien wird entsprechend nationaler bzw. internationaler Regulierung eine umfangreiche Bewertung der Chemikalien auf Grundlage verschiedener experimenteller Studien durchgeführt. Für die Risikoabschätzung von hydrophoben Chemikalien wird ihr Bioakkumulationspotential, also ihre Affinität zur Anreicherung in Organismen, untersucht. Für aquatische Systeme werden üblicherweise Biokonzentrationsstudien mit Fischen gemäß der OECD-Richtlinie 305 durchgeführt [1]. Der maßgebliche Aufnahmepfad ist hier über die Kiemen der Tiere gegeben. Endpunkt der Studien ist der Biokonzentrationsfaktor (bioconcentration factor, BCF), ein Quotient, der als steady state BCF das Gleichgewicht der Verteilung einer Substanz zwischen Fisch und Wasser beschreibt.

Bei der Konzentrationsbestimmung wird die Extraktion der Wasserphase in der Regel lösungsmittelbasiert durchgeführt, beispielsweise mit der Flüssig-Flüssig-Extraktion (liquid-liquid extraction, LLE). Neben dem Verbrauch (toxischer) Lösungsmittel geht mit diesem klassischen Verfahren v.a. ein hoher manueller Arbeitsaufwand im Labor einher. Da es sich um ein weitestgehend erschöpfendes Extraktionsverfahren handelt, wird die LLE jedoch auch hinsichtlich möglicher Artefakte bei der Extraktion stark hydrophober organischer Chemikalien (HOC) diskutiert. BCF-Werte neutraler organischer Chemikalien steigen in der Regel mit steigender Hydrophobizität der Chemikalien, wobei die Hydrophobizität durch die Höhe des n-

Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (K_{ow}) abgeschätzt wird. Gelöste und partikuläre organische Substanzen im Testsystem können jedoch durch Sorptionsprozesse zu einem Rückgang der frei gelösten, bioverfügbaren Chemikalienkonzentration führen. Sofern BCF-Werte auf Basis von Gesamtgehalten statt bioverfügbarer Chemikalienkonzentrationen berechnet werden, kann es somit theoretisch zu einer Unterschätzung der Bioakkumulation kommen [2,3]. Im Gegensatz zur LLE lassen sich mit der Festphasenmikroextraktion (solid-phase microextraction, SPME) [4,5], bei gleichzeitig geringerem Arbeitsaufwand, gesamte und freie Substanzkonzentrationen unterscheiden [6]. Bei der SPME handelt es sich um ein miniaturisiertes, lösungsmittelfreies, nichterschöpfendes Extraktionsverfahren, welches auf der Verteilung einer Substanz zwischen der Probe und einer beschichteten Faser basiert (Abbildung 1).

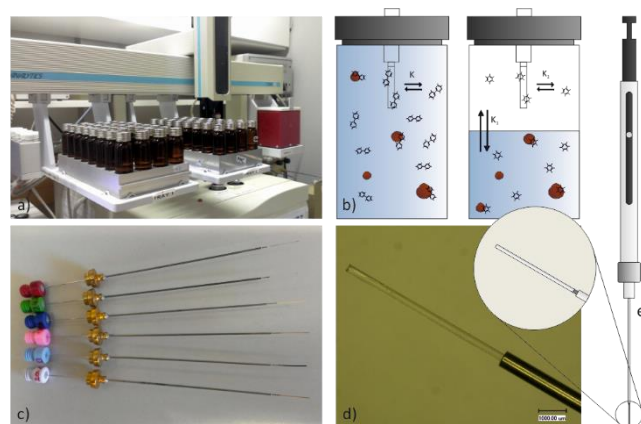


Abb. 1. Schematische Darstellung der automatisierten SPME. a) GC/MS mit Autosampler und SPME-Ausrüstung (Halterung für 20-mL Gefäße, Faser-Halterung im Autosampler-Arm, Ofen mit horizontaler Schüttel-Funktion), b) SPME Extraktion direkt aus der Probe bzw. aus dem Gasraum über der Probe, c) wiederverwendbare Fasern mit verschiedenen Beschichtungsmaterialien und -volumen, d) mikroskopische Vergrößerung einer Faser außerhalb der Schutzkanüle, e) Faserhalter für den Autosampler [12].

Durch die SPME-Fasern wird lediglich ein Anteil der frei gelösten, bioverfügbaren Chemikalienkonzentration extrahiert. Durch die Zugabe eines internen Standards mit gleichen physikochemischen Eigenschaften (im besten Fall die mit stabilen Isotopen markierte Testsubstanz) lassen sich jedoch auch Gesamtgehalte ermitteln, da die Sorption des internen Standards an organische Substanz in den Proben in gleichem

Maße erfolgt wie die sorptionsbedingte Reduktion der freigelösten Testsubstanzkonzentration.

In einer durch das Umweltbundesamt geförderten Studie (FKZ 3710 63 402 2) wurde die mögliche Verwendung der SPME für die Wasseranalytik in BCF-Studien im Vergleich zur LLE geprüft. Die parallele Bestimmung von Gesamtgehalten und bioverfügbaren HOC-Konzentrationen mittels SPME wurde in Durchflussstudien mit Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) und drei HOC (log K_{ow} 5,7–7,8) getestet und die potentielle Ersetzung der LLE durch die SPME überprüft (Abbildung 2).

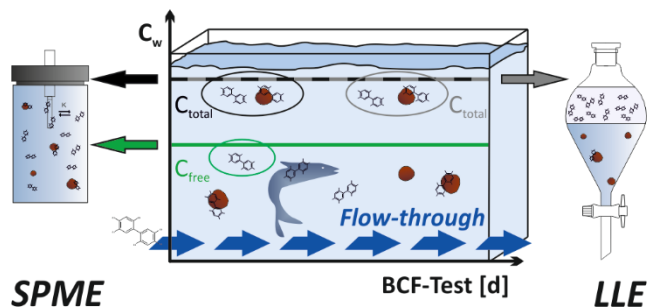


Abb. 2. Schematische Darstellung der Biokonzentrationsstudien: Vergleich von Festphasenmikroextraktion (solid-phase microextraction, SPME) und Lösungsmittlextraktion (liquid-liquid extraction, LLE) zur Bestimmung von Gesamtgehalten (C_{total}) und frei gelösten/bioverfügbaren Konzentrationen (C_{free}) von hydrophoben organischen Chemikalien in der Wasserphase (C_w) in Biokonzentrationsstudien mit Fischen (BCF-Test), bei Anwesenheit von organischer Substanz im Testsystem (braune Partikel) (Bild nicht maßstabsgetreu) [9].

Tab. 1: Physiko-chemische Parameter der Testsubstanzen

Analyt	Struktur	CAS RN	Molmasse [g mol ⁻¹]	Wasserlöslichkeit [µg L ⁻¹] [13]	log K_{ow} [13]	log K_{TOC} [8]
HCB	C ₆ Cl ₆	118-74-1	284,78	6,2 ^a	5,73	4,95–5,05 ^c
OTP	C ₁₈ H ₁₄	84-15-1	230,30	1 239 ^a	5,52	4,99–5,06 ^c
PCB 153	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	35065-27-1	360,88	0,95 ^b	7,75	5,96–6,01 ^c

^a 25 °C ; ^b 24 °C ; ^c TOC relevant für BCF-Studien: Fischfutter bzw. Ausscheidungen

Während der Aufnahme- (56 Tage) und der Ausscheidungsphase (28 Tage) wurden regelmäßig Fische beprobt und die aufgenommene bzw. verbliebene HOC-Konzentration bestimmt. Die Fische wurden mittels beschleunigter Lösemittel-extraktion (Aceton : Dichlormethan, 1:1 [v/v]) extrahiert und nach Aufreinigung und Aufkonzentrierung mittels GC/MS gemessen. Für die Quantifizierung erfolgte ein Abgleich mit einer Matrix-Kalibrierung. Da am Ende der Aufnahme-phase keine Gleichgewichtskonzentration der HOC im Fisch vorlag, wurde der kinetische BCF (BCF_k) als Verhältnis aus Aufnahme-konstante (k_1) und Ausscheidungskonstante (k_2) berechnet [9]. Die Gleichgewichtskonzentration der HOC im Fisch ließ sich aus dem jeweiligen BCF_k ableiten (11 383 µg kg⁻¹ [HCB], 4 527 µg kg⁻¹ [OTP], 393 µg kg⁻¹ [PCB 153]) [9].

Material und Methoden

Die Biokonzentration der drei HOC (Hexachlorbenzol [HCB], o-Terphenyl [OTP] und dem polychlorierten Biphenyl [PCB] 153) wurde in zwei Durchflussstudien nach OECD-Richtlinie 305 mit juvenilen Regenbogenforellen bestimmt. Abweichungen zwischen erster und zweiter Studie sind im Folgenden als (Studie 1 [HCB, OTP]/Studie 2 [PCB 153]) angegeben. Tabelle 1 zeigt ausgewählte physiko-chemische Parameter der Testsubstanzen. Die kontinuierliche Applikation der schwer wasserlöslichen Substanzen wurde lösungsmittelfrei mit einem „solid-phase desorption dosing system“ durchgeführt [7]. Je Studie fungierte ein HOC-freies System als Kontrolle. Futterreste und Ausscheidungen wurden aus der Wasserphase abgesaugt, um den Einfluss der organischen Substanz auf die Sorption der HOC so gering wie möglich zu halten. Der Anteil organischer Substanz im Testsystem wurde wöchentlich als gesamter und gelöster organischer Kohlenstoff gemessen (total bzw. dissolved organic carbon, TOC bzw. DOC). Der Einfluss relevanter organischer Substanz (Fischfutter, Ausscheidungen) im Testsystem wurde dabei separat in systematischen Sorptionsversuchen geprüft [8,9].

Innerhalb der Testdauer wurde die Wasserphase regelmäßig beprobt, mit internen Standards (¹³C₆-HCB, OTP-*d*₁₄, PCB 138) versetzt und mittels LLE (50 mL, n=2, MTBE/Toluol) und automatisierter SPME (20 mL, n=4–8) extrahiert. An ausgewählten Probenahmetagen wurden Wasserproben an ein Partnerlabor versendet, um die Reproduzierbarkeit der SPME-Analytik in einem Laborvergleich zu prüfen [9]. Die Extraktion mittels SPME erfolgte automatisiert (CTC CombiPAL) mit Polydimethylsiloxan (PDMS)-Fasern (100 µm/7 µm, Supelco). Die Proben wurden während der Equilibration (5 min) und Extraktion (30 min/60 min) geschüttelt (250 rpm) und konstant temperiert (30 °C). Im Anschluss wurden die Fasern im Injektor des GC/MS thermisch desorbiert. Zwischen jeder Probe wurde die Faser in einem separaten Ausheizofen platziert, um Verschleppungen zu vermeiden (280 °C für 8 min/ 320 °C für 10

min). Die Wasserkonzentrationen wurden als zeitlich gewichtete mittlere Konzentrationen berechnet.

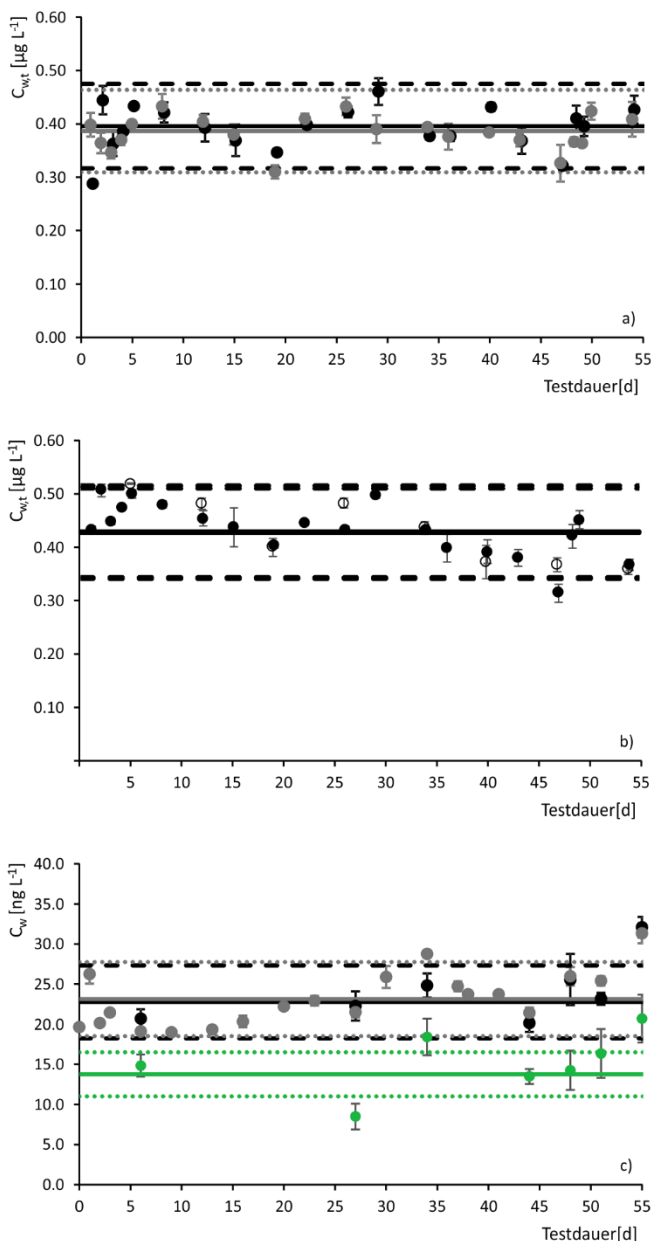


Abb. 3. Konzentrationen hydrophober organischer Chemikalien in der Wasserphase im Verlauf von Biokonzentrationstudien. Durchgehende Linien zeigen die zeitlich gewichteten mittleren Konzentrationen in der Wasserphase $\pm 20\%$ (gestrichelte Linien), Fehlerbalken zeigen Standardabweichung. a) Vergleich von SPME (schwarz) und LLE (grau) für die Bestimmung von Gesamtgehalten ($C_{w,t}$) am Beispiel von Hexachlorbenzol ($n = 2-4$). b) Laborvergleich der Gesamtgehalte ($C_{w,t}$) von o-Terphenyl nach Probentransport und Extraktion mit SPME (Labor 1: gefüllte Kreise, Labor 2: offene Kreise, durchgehende Linien für beide Labore sind überlappend) ($n = 2-4$). c) PCB 153-Konzentrationen nach Extraktion von Gesamtgehalten durch LLE (grau) und SPME (schwarz) sowie frei gelöster Konzentrationen mit SPME (grün) ($n = 2-8$) [9].

Ergebnisse und Diskussion

Gleichwertigkeit von LLE und SPME bei den Gesamtgehalten: Die vergleichende Extraktion von HOC-Konzentrationen aus der Wasserphase der BCF-Studien mittels LLE und SPME führte bei Verwendung interner Standards zu Gesamtgehalten gleicher Höhe (SPME/LLE \pm SD: HCB: $0,40 \pm 0,04 \mu\text{g L}^{-1} / 0,39 \pm 0,03 \mu\text{g L}^{-1}$; OTP: $0,43 \pm 0,05 / 0,45 \pm 0,04 \mu\text{g L}^{-1}$; PCB 153: $23 \pm 4 \text{ ng L}^{-1} / 23 \pm 3 \text{ ng L}^{-1}$). Abbildung 3a zeigt dies beispielhaft für HCB. Der Laborvergleich nach Probenversand führte zu identischen Messergebnissen für alle untersuchten Substanzen, was in Abbildung 3b am Beispiel von OTP dargestellt ist. Für die Testsubstanzen ergaben sich, basierend auf ihren Konzentrationen im Fisch und ihren Gesamtgehalten in der Wasserphase, BCF-Werte von 29 187 (HCB), 10 060 (OTP) und 17 079 (PCB 153).

Einfluss organischer Substanz auf bioverfügbare Konzentrationen: Die Ergebnisse der systematischen Sorptionsstudien im Labor ließen auf einen hohen Einfluss der untersuchten organischen Substanz auf die freien HOC-Konzentrationen schließen. Für die Sorption von 11 HOCs an Fischfutter und den Filterrückstand eines Kontrollbeckens (enthält v.a. Ausscheidungen und Futterreste) konnten hohe Sorptionskoeffizienten bestimmt werden, die in ihrer Höhe von den Moleküleigenschaften der HOC und der Zusammensetzung der organischen Substanz abhängig waren ($\log K_d$ 4,45–5,86; $\log K_{TOC}$ 4,88–6,28; $\log K_{DOC}$ <4,0–6,63) [8]. Dabei zeigte sich insbesondere die aus dem Fischfutter freigesetzte, gelöste organische Substanz als besonders sorptionsstark, während die gelöste organische Substanz aus dem Filterrückstand lediglich zu einer vergleichsweise geringen Sorption der HOC führte. Je nach organischer Substanz und Hydrophobizität der HOC ergaben sich entsprechend starke Unterschiede für die Abschätzung des Einflusses der Sorption auf die Bestimmung von BCF-Werten [8]. Die Sorption der HOC an organische Substanz wurde auch in den BCF-Studien beobachtet, sie fiel jedoch deutlich geringer aus als in den systematischen Sorptionsstudien ($\log K_{TOC}$ 5,04 für PCB 153). Dies wurde mit der unterschiedlichen Zusammensetzung der organischen Substanz in den jeweiligen Studien erklärt.

Die Bestimmung der frei verfügbaren HOC-Konzentrationen mittels SPME war im unteren ng L^{-1} -Bereich möglich. Für PCB 153 wurde im Vergleich mit der Gesamtkonzentration eine signifikant verringerte frei gelöste bzw. bioverfügbare Konzentration von 14 ng L^{-1} gemessen ($p=0,001$) (Abbildung 3c). Die Berücksichtigung der im Testsystem frei gelösten Konzentration bei der Berechnung des BCF-Werts führte im Fall von PCB 153 zu einem deutlichen Anstieg des ermittelten BCF-Wertes von 17 079 auf 28 058, was einer Erhöhung um ca. 65 % entspricht. Dieser Anstieg zeigt den hohen Einfluss selbst niedriger Konzentrationen organischer Substanz im Testsystem (hier $5,98 \text{ mg TOC L}^{-1}$), kann jedoch nicht allein die in der Vergangenheit häufig beobachteten verringerten BCF-Werte oberhalb von $\log K_{OW}$ 5–6 („hydrophobicity cutoff“) durch den Einfluss von organischer Substanz erklären, sondern weist

auf die Relevanz weiterer, vermutlich physiologischer Einflussfaktoren hin (z. B. reduzierte Membranpermeation). Eine Bio-transformation der Testsubstanz kann zu einer Unterschätzung der BCF-Werte führen, was jedoch für PCB 153 in dieser Studie weitestgehend ausgeschlossen werden kann [10].

Einordnung und regulatorischer Ausblick: Die Ermittlung von Gesamtgehalten ist regulatorisch weiterhin gefordert, nicht zuletzt, um die Vergleichbarkeit neuer mit bestehenden Datensätzen zu gewährleisten. Auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse kann die Verwendung der automatisierten SPME mit internen Standards anstelle der LLE als Extraktionsmethode für die Bestimmung von Gesamtgehalten wässriger HOC-Konzentrationen ohne Einschränkungen empfohlen werden. Die Verwendung der SPME erlaubt dabei die Einsparung (toxischer) Lösungsmittel. Im Vergleich zur LLE ergibt sich durch die automatisierte SPME darüber hinaus ein deutlich verringerter Arbeitsaufwand für die Extraktion. Da die Verwendung der SPME die parallele Bestimmung bioverfügbarer Konzentrationen ermöglicht, steht ohne zusätzlichen experimentellen Aufwand ein Parameter zur Interpretation der Genauigkeit der zu bestimmenden BCF-Werte zur Verfügung. Die mittels automatisierter SPME gemessenen bioverfügbaren Konzentrationen sind jedoch aufgrund von Methodik-inhärenten Einflussfaktoren einer größeren Streuung unterworfen als die Gesamtgehalte [9]. Da die zur Probe dotierten internen Standards an die organische Substanz binden, führt ihre Verwendung zur Korrektur der Messergebnisse zwangsläufig zur Bestimmung von Gesamtgehalten. Ihr Einsatz ausschließlich zur Korrektur potentiell auftretender Faseralterung bzw. Schwankungen in der Stabilität des GC/MS-Systems ist daher nicht möglich. Darüber hinaus kann bei der Extraktion von Spurenkonzentrationen die gemessene frei gelöste Konzentration durch zu kurze oder zu lange Extraktionszeiten in gewissem Umfang beeinflusst werden [9]. Die Genauigkeit der frei verfügbaren Konzentrationen lässt sich durch Anwendung der SPME in situ erhöhen, geht jedoch gegenüber der automatisierten SPME mit einem erhöhten Arbeitsaufwand einher. Aus diesem Grund wird die Messung mittels automatisierter SPME und Erfassung der bioverfügbaren Konzentrationen als Screening empfohlen, um den Einfluss von organischer Substanz im Testsystem auf die Ermittlung der BCF-Werte abschätzen zu können. Die Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit studienbegleitend stets für eine Reduzierung des TOC-Gehalts im Testsystem zu sorgen, beispielsweise durch erweiterte Reinigungsmaßnahmen in den Becken wie das Absaugen von Futterresten und von Ausscheidungen der Fische.

Schlussfolgerung

Die Festphasenmikroextraktion (SPME) kann bei der Wasseranalytik gegenüber der lösungsmittelbasierten Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) mit deutlichen Vorteilen punkten. Die Extraktion mit beiden Verfahren führte zu identischen Gesamtgehalten. Darüber hinaus ermöglicht die automatisierte SPME die parallele Bestimmung frei gelöster Konzentrationen und bietet somit wertvolle Zusatzinformationen für die Interpretation

der Daten, bzw. um die Validität der Ergebnisse hinsichtlich bioverfügbarer Konzentrationen zu erhöhen.

Basierend auf den Studienergebnissen wurde die SPME bei der Revision der OECD-Richtlinie 305 berücksichtigt und zur Messung von HOC empfohlen. Darüber hinaus fanden die Ergebnisse der Studie Eingang in ein Guidance Document zur Ergänzung der OECD-Richtlinie 305 [11].

Literatur

- [1] Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, Degradation and Accumulation. Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure. DOI: 10.1787/2074577x.
- [2] Arnot JA, Gobas FAPC. 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environmental Reviews* 14: 257–297. DOI: 10.1139/a06-005.
- [3] Jonker MTO, van der Heijden SA. 2007. Bioconcentration factor hydrophobicity cutoff: An artificial phenomenon reconstructed. *Environmental Science & Technology* 41: 7363–7369. DOI: 10.1021/es0709977.
- [4] Arthur CL, Pawliszyn J. 1990. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry* 62: 2145–2148. DOI: 10.1021/ac00218a019.
- [5] Ouyang G, Jiang R (Hrsg.) *Solid Phase Microextraction. Recent Developments and Applications*. 2017. Springer-Verlag Berlin.
- [6] Bondarenko S, Gan J. 2009. Simultaneous measurement of free and total concentrations of hydrophobic compounds. *Environmental Science & Technology* 43: 3772–3777. DOI: 10.1021/es8037033.
- [7] Schlechtriem C, Böhm L, Bebon R, Bruckert H-J, Düring R-A. 2017. Fish bioconcentration studies with column generated analyte concentrations of highly hydrophobic organic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36: 906–916. DOI: 10.1002/etc.3635.
- [8] Böhm L, Schlechtriem C, Düring R-A. 2016. Sorption of highly hydrophobic organic chemicals to organic matter relevant for fish bioconcentration studies. *Environmental Science & Technology* 50: 8316–8323. DOI: 10.1021/acs.est.6b01778.
- [9] Böhm L, Düring R-A, Bruckert H-J, Schlechtriem C. 2017. Can solid-phase microextraction replace solvent extraction in fish bioconcentration studies for highly hydrophobic organic chemicals? *Environmental Toxicology and Chemistry* 36: 2887–2894. DOI: 10.1002/etc.3854.
- [10] Buckman AH, Wong CS, Chow EA, Brown SB, Solomon KR, Fisk AT. 2006. Biotransformation of polychlorinated biphenyls (PCBs) and bioformation of hydroxylated PCBs in fish. *Aquatic Toxicology* 78: 176–185. DOI: 10.1016/j.aquatox.2006.02.033.
- [11] Organisation for Economic Co-operation and Development, Series on Testing & Assessment No. 264: Guidance Document on Aspects of OECD TG 305 on Fish Bioaccumulation. Paris, 2017 [ENV/JM/MONO(2017)16].
- [12] Böhm L. 2017. Solid-phase microextraction in ecotoxicological testing – progress with regard to highly hydrophobic organic chemicals in bioconcentration experiments. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- [13] SRC FatePointers Search Module, PHYSPROP database; <http://esc.syrres.com/fatepointer/search.asp>

Korrespondenzadresse

Leonard Böhm (leonard.boehm@envr.jlug.de)
 Institut für Bodenkunde und Bodenerhaltung
 iFZ für Umweltsicherung
 Justus-Liebig-Universität Gießen
 Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen