

## 6. Zusammenfassung

Pflanzenschutzmittel (PSM) sind ein integraler Bestandteil der modernen Landwirtschaft. Die weitläufige Applikation von PSM führt jedoch zu einer deutlichen Belastung des gesamten Ökosystems. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, ein detailliertes Monitoring durchzuführen.

In der Umweltanalytik finden in letzter Zeit immunchemische Analysemethoden verstärkt Beachtung. Im Vergleich mit Methoden der instrumentellen Analytik ermöglichen sie bei niedrigen Kosten die Untersuchung einer großen Zahl von Proben. Die PSM-Analytik setzt geeignet validierte Analyseverfahren voraus. Bislang existieren jedoch keine verbindlichen Leitlinien zur Validierung von Immunoassays, was die Beurteilung und den Vergleich der erzielten Ergebnisse erschwert. Im Rahmen dieser Arbeit stand der Atrazinspezifische Enzymimmunoassay auf der Basis des polyklonalen Antikörpers AS46 in Kombination mit dem Enzymtracer ET Isopropyl zur Verfügung, der exemplarisch validiert wurde.

Es wurden die Parameter Genauigkeit, Sensitivität, Spezifität und Robustheit bestimmt. Es wurde gefunden, dass die Genauigkeit des Tests von der vorliegenden Matrix abhängt. In entionisiertem Wasser wurden im Bereich zwischen 0,02-3 µg/L Atrazin hinreichend genaue Werte bestimmt. In Oberflächenwasserproben verschiebt sich die untere Quantifizierungsgrenze durch Matrixeffekte, und es wurde ein Arbeitsbereich von 0,1-3µg/L erkannt. Eine hinreichend genaue Quantifizierung ist nur innerhalb dieses Bereichs möglich. Bei Über- bzw. Unterschreitung kann eine Überschätzung der Atrazinkonzentration nicht ausgeschlossen werden und von daher die häufig in der ELISA-Analytik anzutreffende Überschätzung der Atrazinbelastung Folge des Testformats sein. In Abhängigkeit von der betrachteten Matrix wurden Nachweisgrenzen zwischen 0,01µg/L und 0,021µg/L bestimmt. Da man jedoch nicht voraussagen kann, in welcher genauen Zusammensetzung die Matrix vorliegt, ist eine exakte Festlegung der Quantifizierungs- und Nachweisgrenze streng genommen nicht möglich. Sie dienen nur als Richtwerte bei der Interpretation von ELISA-Daten.

Der pAb AS46 ist nicht ausschließlich Atrazin-spezifisch. Er bindet auch strukturell verwandte Triazinherbizide. Das Chlor-s-triazin Propazin zeichnet sich sogar durch eine signifikant höhere Kreuzreaktion aus. Andere wichtige Vertreter dieser Substanzklasse, die ebenfalls stark vom Antikörper gebunden werden, sind Terbutylazin und Simazin. Im Falle von Huminstoffen trat ab DOC-Konzentrationen von 30mg/L signifikante unspezifische Bindung auf. Proben mit hohem Huminstoffgehalt, die sich im Enzymimmunoassay als schwach positiv herausgestellt haben, müssen daher mit einer etablierten instrumentellen Methode validiert werden. In einem pH-Bereich zwischen 3-11 wird die Quantifizierung nicht beeinträchtigt.

Mit dem validierten Enzymimmunoassay wurde das Oderflusssystem auf seine Belastung mit Triazinen geprüft. Im Juni 1999 sowie im Mai 2000 erfolgten Probennahmen und anschlie-

ßend Untersuchungen mit dem kompetitiven ELISA. Validierung der Ergebnisse erfolgte durch GC/MS.

Die Triazine erreichen in der Oder in den Applikationsmonaten der PSM recht hohe Konzentrationen. Punktuell wird sogar der Summengrenzwert der EU-Trinkwasserverordnung für PSM und Biozide überschritten. Atrazin wird zu einem beträchtlichen Teil über Tschechien eingetragen. Bereits an der tschechisch-polnischen Grenze bei Chalupki (OR01CH) wurden  $0,21\mu\text{g/L}$  (Juni 1999) und  $0,31\mu\text{g/L}$  (Mai 2000) Atrazinäquivalente bestimmt. In beiden Jahren befand sich die Maximalbelastung bei Opole an der oberen Oder ( $0,54\mu\text{g/L}$  (Juni 1999) und  $0,45\mu\text{g/L}$  (Mai 2000)), wo große Teile der landwirtschaftlich genutzten Saatflächen in Polen liegen. Besondere Beachtung verlangt die Barycz, ein Nebenfluß der Oder vor Glogow, welche sich an der Mündung als mit Triazinen ( $0,79\mu\text{g/L}$  (Mai 2000)) belastet erwies. Die Barycz fließt durch die Milicz-Teiche in Schlesien nahe Wroclaw, die ein wichtiges Naturschutzgebiet in Europa darstellen. Aufgrund der ökotoxikologischen Relevanz des Atrazins sollten weitergehende Untersuchungen erfolgen.

Triazine bilden mit aquatischen und terrestrischen Huminstoffen gebundene PSM-Rückstände, was zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Belastung führt, da sich diese einer Untersuchung mit konventionellen Methoden entziehen. Enzymimmunoassays sind zur Quantifizierung dieser Rückstände geeignet, die Entwicklung entsprechender Methoden setzt jedoch das Vorhandensein von geeigneten Standardmaterialien zur Kalibration voraus. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Strategien zur Darstellung neuartiger Standardmaterialien evaluiert.

Die „Inkubationsstrategie“ beruht auf der Bereitung von synthetischen Mixturen mit natürlichen Huminstoffen bzw. synthetischen Modellsubstanzen und Triazinen. Inkubationslösungen mit definierten Ausgangskonzentrationen an Huminstoffen ( $\text{DOC}=0,3\text{g/L}$ ) und Triazinherbiziden ( $100\mu\text{g/L}$ ) wurden angesetzt und nach 8 Wochen Inkubationszeit die freien Triazine von den Huminstoffen und gebundenen Rückständen mit Festphasenextraktion abgetrennt. Eingesetzt wurden natürliche Huminstoffe aus dem Hohlohsee im Nordschwarzwald und synthetische Modellsubstanzen für Huminstoffe, die aus Hydrochinon dargestellt worden waren. Letztere simulieren physikochemische Eigenschaften der Huminstoffe bezüglich der Polydispersität, Elementarzusammensetzung sowie Art und Quantität der funktionellen Gruppen. Die verwendeten Antikörper erweisen sich als prinzipiell in der Lage, die mit der Festphasenextraktion nicht-extrahierbaren Triazinrückstände zu detektieren. Der pAb AS46 beschränkt sich hierbei vermutlich auf die Detektion von adsorptiv gebundenem Schadstoff, während sich mit dem mAb K1F4 die Möglichkeit bietet, auch die kovalent durch Substitution des Chloratoms gebundenen Triazine zu detektieren. Dies ist auf die eingesetzten, unterschiedlichen Immunkonjugate für AS46 und K1F4 zurückzuführen.

Der Antikörper AS46 detektiert die höchsten Mengen an adsorptiv gebundenem Atrazin an der Huminsäure HO13HA ( $0,55\text{ng/mg DOC Atrazin}$ ), jedoch fällt diese Menge, verglichen

mit der Konzentration in den Inkubationslösungen, gering aus. Der mAb K1F4 detektiert deutlich mehr gebundenes Atrazin und Terbutylazin. Die synthetisch dargestellten Huminstofffraktionen binden über 20ng Atrazin je mg DOC. Bei den natürlichen Huminstoffen lag dieser Wert bei 4-6ng/mg. Die kovalent gebundenen Anteile an Atrazin übersteigen die adsorptiv komplexierten Anteile um zwei Größenordnungen. Die EIA-Untersuchungen am Terbutylazin mit Antikörper K1F4 zeigen vergleichbare Tendenzen, dieses Triazinherbizid wird anscheinend jedoch weniger stark an die Huminstoffe gebunden. Insgesamt wurden durch die „Inkubationsstrategie“ jedoch nur niedrige Beladungen mit gebundenen Triazinrückständen realisiert.

Die „Direktpolymerisation“ stellt das zweite Verfahren zur Darstellung einer Modellsubstanz mit gebundenen Triazinrückständen dar. Mit Hydrochinon wird eine diskrete organische Substanz in einem alkalischen, oxidativen Medium zu Makromolekülen polymerisiert. Wird dem Ansatz ein Triazin hinzugefügt, wird dieses in das Polymergerüst einpolymerisiert. Einpolymerisierte Triazinmengen konnten unter Nutzung der Elementaranalyse bestimmt werden, da die synthetischen Modelle bei Abwesenheit von Triazinen keinen Stickstoff enthalten. Sie lagen bei 8µg/mg „Atrazin“ im HS100A bzw. 12µg/mg „Terbutylazin“ im HS100T.

Die Validierung dieser Ergebnisse erfolgte mit verschiedenen Enzymimmunoassays. Abhängig vom eingesetzten Antikörper und Verfahren wurden unterschiedliche Quantitäten zwischen 4 und 12100ng/mg DOC an gebundenen Rückständen bestimmt. Die durch ELISA detektierte Menge an gebundenen Rückständen variiert also sehr stark. Die „Direktpolymerisation“ ergab im Vergleich mit der „Inkubationsstrategie“ bei der Modellsubstanz HS100A eine um den Faktor 600 höhere Beladung.

Ähnlich wie bei der „Inkubationsstrategie“ werden die vorliegenden gebundenen Strukturen beim Modellhuminstoff HS100A durch den mAb K1F4 besser erkannt als durch mAb K4E7 und pAb AS46. Bei der „Inkubations-,“ und „Direktpolymerisationsstrategie“ entstehen vermutlich gebundene Rückstände mit Strukturen ähnlich dem Immunogen des K1F4. Es wird angenommen, dass die Triazine durch nukleophile Substitution des Chloratoms in das Huminstoffgerüst eingebunden werden. Das verringerte Erkennungsvermögen von pAb AS46 und mAb K4E7 kann mit einer geringeren Kreuzreaktion mit den vorliegenden chlorsubstituierten Strukturen erklärt werden.

Dieser Ansatz ist nicht allgemein auf andere PSM und Umweltschadstoffe übertragbar, da hierfür eine reaktive funktionelle Gruppe vorhanden sein muß. Bei der vorliegenden Synthese besteht eine Limitierung durch die beschränkte Löslichkeit der Triazine in Wasser. Damit sind wesentlich größere Beladungen, wie sie für die Untersuchung mit spektroskopischen Methoden wünschenswert sind, nicht realisierbar.

Die „Monomerenstrategie“ beruht auf der Synthese eines Triazin-Monomer-Addukts mit definierter Struktur. Es wurden zwei Zielstrukturen synthetisiert. Die Triazinstruktur im Modellhuminstoff BQ310A resultiert formal aus der Umsetzung der freien Aminogruppe des Phase-I-Metaboliten Desethylatrazin mit einem chinoiden System. Die Struktur BQ400A re-

sulziert aus der nukleophilen Substitution des Chloratoms am Atrazin durch ein aromatisches Amin. Danach wurde in einer schnellen Polymerisationsreaktion mit p-Benzochinon das Triazin-, „Monomer“ in einen Modellhuminstoff einpolymerisiert. Durch Elementaranalyse wurde die Quantität an gebundenen Triazinrückständen abgeschätzt. Für BQ310A wurden 46,5 µg/mg, sowie für BQ400A 11,5 µg/mg „Atrazin“ bestimmt. Dies übertrifft die mit „Direktpolymerisation“ erzielte Beladung. Mit Enzymimmunoassay wurde das Vorhandensein gebundener Rückstände validiert. Abhängig vom Antikörper wurden bis zu 0,8 µg Atrazinäquivalente je mg Modellsubstanz BQ310A bzw. 0,1 µg/mg bei BQ400A ermittelt. Bei der „Monomerenstrategie“ besteht der Vorteil, dass die Quantität der gebundenen Rückstände über einen großen Bereich variierbar ist. Durch Erhöhung der Triazin-Monomer-Adduktkonzentration sollte die Quantität an gebundenen Triazin gesteigert werden können, da die Addukte sehr gut in das Polymer eingebaut werden. Die „Direktpolymerisationsstrategie“ ist jedoch einfacher als die „Monomerenstrategie“, da im letzteren Fall vor der Polymerisation Triazin-Monomer-Addukte über mehrere Stufen synthetisiert werden müssen.

Huminstoffe können im ELISA unspezifisch an Antikörper binden und dadurch ein falsch-positives Signal erzeugen. Durch Zugabe von Rinderserumalbumin wird das unspezifische Huminstoffsignal experimentell inhibiert. Es wird jedoch vermutet, dass durch die Bindung der Huminstoffe an Blockierungsreagenzien nicht nur die Huminstoffe einer Detektion entzogen werden, sondern auch die Huminstoff-gebundenen Rückstände nicht mehr voll von den Antikörpern erkannt, das Signal drastisch reduziert und so nur ein Teil der gebundenen Rückstände erfasst wird.

Insgesamt stellt der Enzymimmunoassay ein wertvolles analytisches Werkzeug zur Detektion von gebundenen Triazinrückständen dar, das Informationen über das Bindungsverhalten von nicht-extrahierbaren Rückständen und ihre Quantität bietet. Allerdings besteht ein hohes Potential für systematische Fehler, weshalb mit ihm erhaltene Ergebnisse einer besonders strengen Validierung durch Resultate anders arbeitender Methoden bedürfen.