

**Entwicklung und Anwendung von GC/MS-Methoden zum
Nachweis phenolischer Xenoestrogene sowie natürlicher
und synthetischer Estrogene in aquatischen
Umweltproben unter Berücksichtigung einer
wirkungsbezogenen Analytik (E-Screen-Assay)**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2000

vorgelegt von

ULRIKE BOLZ

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juni 2000

Dekan:	Prof. Dr. U. Nagel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Hagenmaier
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. P. Krauß

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1997 bis April 2000 am Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. H. Hagenmaier angefertigt.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. H. Hagenmaier danke ich sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und besonders für die guten Arbeitsbedingungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. Körner, der mir im Rahmen seiner Habilitation die Bearbeitung dieses Themas ermöglichte. Insbesondere möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die in allen Phasen dieser Arbeit gewährte umfassende Unterstützung bedanken.

Herrn Dr. W. Schuller danke ich für die gute Einarbeitung und vielen Ratschläge bei der Durchführung des E-Screen-Assays.

Bei Frau PD Dr. R. Triebkorn, Zoologisches Institut der Universität Tübingen und Herrn W. Süßmuth, Zweckverband Klärwerk Steinhäule, Ulm/Neu-Ulm bedanke ich mich recht herzlich für die Probenahme der Wasser- und Sedimentproben aus Körsch und Krähenbach sowie der Abwasser- und Klärschlammproben.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei meinem Kollegen und guten Freund B. Kuch für anregende Diskussionen, heitere Momente sowie die gemeinsam entwickelte Freude an der GC/MS-Analytik und bei unserer geschätzten Mitarbeiterin Frau S. Senhaji für die schnelle zuverlässige Erledigung von vielerlei Dingen.

Zuallerletzt danke ich meinem Freund Frank Messmer, meiner Familie und meinen Freunden für die Hilfestellung in alltäglichen Dingen, die sicherlich nicht unwesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ein großes Dankeschön möchte ich hierbei meinen beiden unermüdlichen Korrektorinnen Beatrice Klem und Alexandra Bolz aussprechen.

„Generelle Ansichten erhöhen den Begriff von der Würde und der Größe der Natur. (...) Generelle Ansichten gewöhnen uns, jeden Organismus als Teil des Ganzen zu betrachten, in der Pflanze und im Tier minder das Individuum oder die abgeschlossene Art, als die mit der Gesamtheit der Bildungen verkettete Naturform zu erkennen“

Alexander von Humboldt, Kosmos (1845)

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung und Problemstellung	1
II	Allgemeiner Teil	3
1	Überblick	3
2	Auswahl der zu untersuchenden hormon wirksamen Substanzen	6
3	Charakterisierung der estrogen wirksamen Substanzen	7
3.1	Phenolische Xenoestrogene	7
3.2	Steroide	14
4	E-Screen-Assay	18
III	Ergebnisse und Diskussion	21
III.I	Methodenentwicklung zur chemischen Analytik	21
1	Einleitung	21
2	Bestandsaufnahme	22
2.1	Extraktions- und Aufreinigungstechniken	22
2.2	HRGC/LRMS	23
2.3	Quantifizierung	24
3	Methodische Vorgehensweise zur Entwicklung eines Analysen- verfahren	25
4	Phenolische Xenoestrogene	27
4.1	HRGC/LRMS	28
4.1.1	Massenspektrometrische Identifizierung	29
4.1.2	Derivatisierung	30
4.1.3	Gaschromatographische Trennung	33
4.1.4	4-Nonylphenol	35
4.2	Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	40
4.2.1	Quantifizierung	40
4.2.2	Interner Standard	40
4.2.3	Quantifizierungsbereich, Bestimmungs- und Nachweisgrenzen	41
4.3	Wässrige Proben	44
4.3.1	Extraktionstechniken	44
4.3.2	Wiederfindungsraten	46
4.3.3	Methodische Nachweis- und Bestimmungsgrenze	53
4.3.4	Anwendung auf reale Proben	54

4.3.5	Vollwasserprobe (Wasserphase und Partikelphase)	58
4.3.5.1	Probenahme	61
4.3.5.2	Probenlagerung	62
4.3.5.3	Probenvorbereitung	62
4.3.6	Zusammenfassung	63
4.4	Feste Proben	65
4.4.1	Extraktion	65
4.4.1.1	Extraktionsmittelvergleich	66
4.4.1.2	Wiederfindung	68
4.4.2	Aufreinigung	70
4.4.3	Methodische Nachweis- und Bestimmungsgrenze	74
4.4.4	Reproduzierbarkeit und Anwendung auf reale Proben	75
4.4.5	Probenahme, Probenlagerung und -vorbereitung	76
4.4.6	Zusammenfassung	77
5	Natürliche und synthetische Estrogene und 17β-Sitosterol in wässrigen Proben	80
5.1	HRGC/LRMS	81
5.1.1	Derivatisierung	81
5.1.2	Massenspektrometrische Identifizierung	82
5.1.3	Gaschromatographische Trennung	85
5.1.4	Quantifizierung und Linearität	86
5.2	Extraktion und Aufreinigung	88
5.2.1	Extraktion	89
5.2.2	Aufreinigung	90
5.2.3	Überprüfung des gesamten Extraktions- und Aufreinigungsverfahrens	91
5.2.3.1	Dotiertes Leitungswasser und dotierte reale Probe	91
5.2.3.2	Methodische Nachweis- und Bestimmungsgrenze	93
5.2.4	Probenahme, Probenlagerung, und -vorbereitung	93
5.3	Zusammenfassung	94
6	Zusammenfassung der entwickelten Analysenverfahren	96
III.II	Verbreitung hormonartig wirkender Substanzen in der aquatischen Umwelt	97
1	Oberflächengewässer	98
1.1	Monitoring in Körsch und Krähenbach	98
1.2	Neckar, Donau, Erms	104
1.3	Diskussion	107

2	Sedimente	115
2.1	Verbreitung von phenolischen Xenoestrogenen	116
2.1.1	Akkumulation phenolischer Xenoestrogene nach Abwassereintrag	118
2.1.2	Vergleich Körsch und Krähenbach	119
2.2	Diskussion	120
3	Kommunale Kläranlage	122
3.1	Phenolische Xenoestrogene und Steroide im Abwasser	124
3.2	Phenolische Xenoestrogene in Klärschlamm	132
3.3	Bilanzierung des Ein- und Austrages phenolischer Xenoestrogene während der Abwasser- und Schlammbehandlung	135
3.4	Diskussion	138
4	Biologische Analytik (E-Screen-Assay)	148
5	Ökotoxikologische Aspekte	152
IV	Experimenteller Teil	154
IV.I	Chemische Analytik	154
1	Chemikalien und Geräte	154
1.1	Chemikalien	154
1.2	Geräte	155
2	Arbeitsvorschriften	157
2.1	Reinigung der Glasgeräte und Einmalmaterialien	157
2.2	Herstellung von Standardlösungen	157
2.2.1	Stammlösungen der Referenzstandards	157
2.2.2	Arbeitsstandardlösung	158
2.2.3	Interne Standardlösungen zur Quantifizierung	158
2.3	Probenahme und Probenlagerung und -vorbereitung	158
2.3.1	Flüssige Proben	158
2.3.2	Feste Proben	160
2.3.3	Bestimmung des Glühverlustes	161
2.4	Extraktion	161
2.4.1	Flüssige Proben	161
2.4.2	Feste Proben	163
2.5	Aufreinigung	163
2.5.1	Wässrige Proben	163
2.5.2	Feste Proben	164
2.6	Quantitative Analyse	165
2.6.1	Vorbereitung zur Analyse	165

2.6.1.1	Extrakte	165
2.6.1.2	Referenzstandard	166
2.6.2	HRGC/LRMS-Analytik	167
2.6.3	Quantifizierung	168
IV.II	Zellkultur	169
1	Chemikalien und Geräte	169
1.1	Chemikalien	169
1.2	Geräte	170
1.3	Zelllinie	171
2	Arbeitsvorschriften	171
2.1	Allgemein	171
2.2	Probenvorbereitung	173
2.3	E-Screen-Assay	174
2.3.1	Durchführung des E-Screen-Assay	174
2.3.2	Bestimmung der Zellzahl mit dem Sulforhodamin B-Assay	175
2.3.3	Quantitative Auswertung des E-Screen-Assays	176
V	Zusammenfassung	177
VI	Literaturverzeichnis	180
VII	Anhang	198

Abkürzungsverzeichnis

A	Ablauf
a	Jahr
BG	Bestimmungsgrenze
C _{18nec}	C ₁₈ Reversed Phase nicht endcapped (keine Desaktivierung der freien Silanolgruppen, um polare sek. Wechselwirkungen auszunützen)
CAS Nr.	Chemical Abstract Service Registriernummer
d	Tag
DDD	1,1-Dichlor-2,2-bis-(4-chlorphenyl)-ethan
DDE	1,1-Dichlor-2,2-bis-(4-chlorphenyl)-ethen
DDT	1,1,1-Trichlor-2,2-bis-(4-chlorphenyl)-ethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	Effektive Konzentration bei der 50 % des max. Effektes erreicht sind
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEF	Estradiol-Äquivalenzfaktor
EEQ	Estradiol-Äquivalentkonzentration
EI	Electron Impact Ionisation, Elektronenstoßionisation
ENV+	Styroldivinylbenzol-Copolymer
FCS	Fötale Kälberserum
GC	Gaschromatographie
h	Stunde(n)
HCH	Hexachlorcyclohexan
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
HRGC	hochauflösende Gaschromatographie
ID	Innendurchmesser
KA	Kläranlage
LC ₅₀	Letale Konzentration für 50 % (der Versuchstiere)
log K _{OW}	n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
LRMS	niederauflösende Massenspektrometrie
µg	microgramm, 10 ⁻⁶ g
M ⁺	positiv geladenes Molekülion
MS	Massenspektrometrie
MSD	Massenspektrometer
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
m/z	Masse/Ladung
n	Anzahl

ng	nanogramm, 10^{-9} g
PCB	polychlorierte Biphenyle
PE	Proliferationseffekt
pg	picogramm, 10^{-12} g
ppb	parts per billion, ng/g bzw. $\mu\text{g}/\text{kg}$ und $\mu\text{g}/\text{l}$
ppt	parts per trillion, ng/g und ng/l
RPE	Relativer Proliferationseffekt
RSD	Relative Standardabweichung
SD	Standardabweichung
SIM	Selected oder Single Ion Monitoring
SPE	Festphasenextraktion
SRB	Sulforhodamin B
TIC	Totalionenchromatogramm
TMS	Trimethylsilanol-Gruppe
TS	Trockensubstanz
Z	Zulauf

1 Einleitung und Problemstellung

Das Auftreten von Hermaphroditismus (Zwitterbildung) bei Fischen in englischen Flüssen unterhalb von Kläranlagen führte zu der Überlegung, dass in gereinigtem Abwasser estrogen wirksame Substanzen enthalten sind (Purdom et al. 1994). Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden erwachsene, männliche Regenbogenforellen über einen Zeitraum von drei Wochen im Kläranlagenablauf gehalten. Bereits nach einer Woche stieg der Vitellogeninplasmaspiegel der männlichen Regenbogenforellen signifikant an (Purdom et al. 1994). Weitere Untersuchungen bei männlichen Forellen und Karpfen im Abflussbereich von Kläranlagen in England (Harries et al. 1996, 1997) und den USA (Folmar et al. 1996) bestätigten die erhöhten Vitellogeninplasmaspiegel. Normalerweise wird Vitellogenin, eine Vorstufe des Eidotterproteins, von allen weiblichen eierlegenden Vertebraten in der Leber unter dem Einfluss von in den Ovarien gebildeten Estrogenen synthetisiert. Da aber auch bei Exposition gegenüber exogenen Estrogenen eine Vitellogeninbildung sowohl von weiblichen als auch von männlichen Forellen beobachtet wurde (Clemens 1978), können erhöhte Vitellogeninplasmaspiegel männlicher Fische als Biomarker für die Exposition gegenüber estrogen wirksamen Substanzen herangezogen werden. In England wurde als mögliche Ursache für die erhöhten Vitellogeninplasmaspiegel die estrogenartig wirkende Substanz 4-Nonylphenol an einigen Flussabschnitten in erheblichen Konzentrationen identifiziert (Blackburn und Waddock 1995). In neueren Untersuchungen konnten sogar in Kläranlagenabläufen von rein häuslichem Ursprung natürliche und synthetische Estrogene gemessen werden (Desbrow et al. 1998).

Bereits zu einem früheren Zeitpunkt wurden bei Wildpopulationen von verschiedenen Vertebraten Reproduktionsstörungen und Missbildungen an Genitalien beobachtet. Diese adversen Effekte konnten teilweise bestimmten estrogen-, aber auch antiandrogenerartig wirkenden Substanzen zugeordnet werden (Colborn et al. 1993). 1981 wurde ein Zusammenhang zwischen nachweisbaren Anzeichen einer Feminisierung bei Seemöwen und ihrer hohen Belastung mit dem in der Nahrungskette akkumulierenden Insektizid DDT und dessen Metabolite festgestellt (Fry und Toone 1981). Der seit 1980 durch einen Unfall in einer nahegelegenen Pestizidfabrik kontaminierte Lake Apopka in Florida bekräftigte den Verdacht, dass DDT und dessen Metabolite in einem direkten Zusammenhang zu Reproduktionsstörungen stehen. Im Gegensatz zu anderen in der Nähe gelegenen Seen zeigte sich dort bereits einige Jahre nach dem Unfall eine Abnahme der Alligatorpopulation. Bei jungen männlichen Alligatoren wurden verringerte Testosteronplasmaspiegel, verkümmerte Penisse und Zwitterbildung festgestellt (Guillette et al. 1994). Im Gebiet der Grossen Seen der USA konnten bei fischfressenden Wasservögeln, deren Beutefische erhöhte PCB-Konzentrationen aufwiesen, eine erhöhte Embryosterblichkeit und Missbildungen festgestellt werden (Gilbertson et

al. 1991). Aber nicht nur bei Wirbeltieren konnten adverse Effekte beobachtet werden. Verschiedene weibliche Meeresschnecken in der Nord- und Ostsee zeigen seit Mitte der 80er Jahre irreversible Vermännlichungsphänomene (Imposex, Intersex). Diese Veränderungen waren auf die Exposition gegenüber Tributylzinn, einer in Antifouling-Anstrichen von Schiffsrümpfen eingesetzten Chemikalie, zurückzuführen. Die Wirkung, die sowohl als indirekt antiestrogen- als auch androgenartig bezeichnet werden kann, erfolgt über eine kompetitive Hemmung der Cytochrom-P450-abhängigen Aromatase, die in weiblichen Organismen bei der Bildung von 17β -Estradiol aus Testosteron beteiligt ist (Matthiesen und Gibbs 1998). Dieses Beispiel ist aufgrund der zentralen Rolle der Wirbellosen in den Nahrungsnetzen und -ketten von Bedeutung, da Veränderungen in deren Bestand indirekt weitgreifende Auswirkungen auf höhere Trophiestufen haben können.

Die hier aufgeführten Beispiele von Reproduktionsstörungen bei der Exposition gegenüber estrogen wirksamen Substanzen zeigen, dass insbesondere wildlebende Tiere, deren Lebensraum das Wasser selbst ist oder die sich von dort lebenden Organismen ernähren, gefährdet sind. Die Substanzen die mit den genannten adversen Effekten in Zusammenhang gebracht werden, gelangten auf unterschiedlichen Wegen in die Gewässer. Neben dem direkten Eintrag oder dem Eintrag über die Luft scheinen Kläranlageneinleitungen die Oberflächengewässer kontinuierlich zu belasten. Die in Stillgewässern lebenden Tierarten sind, wie die gut dokumentierten Beispiele des Lake Apopka und der Grossen Seen in den USA zeigen, bei einer Kontamination offensichtlich besonders gefährdet. Aber vermutlich werden auch kleinere Fließgewässer, die eine große Fracht an gereinigtem Abwasser aufnehmen, durch den kontinuierlichen Eintrag von estrogen wirksamen Substanzen erheblich belastet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb im Besonderen die Belastungssituation kleinerer Fließgewässer mit ausgewählten estrogen wirksamen Substanzen untersucht. Die Grundlage für Untersuchungen über den Eintrag dieser Substanzen in die aquatische Umwelt und deren Verbleib in den Fließgewässern ist eine abgesicherte Analytik im relevanten Konzentrationsbereich. Nach Auswahl der zu untersuchenden estrogen wirksamen Substanzen wurden Analysemethoden entwickelt und diese für die relevanten aquatischen Umweltkompartimente Oberflächenwasser, Sediment, ungereinigtes und gereinigtes Abwasser und Klärschlamm validiert. Neben einem Monitoring des Oberflächenwassers zweier kleiner Fließgewässer mit unterschiedlicher Belastung durch Abwassereinleitung und der Untersuchung von Sedimenten verschiedener Gewässer wurden am Beispiel einer süddeutschen Kläranlage Eintrags/Austrags-Bilanzen der estrogen wirksamen Substanzen erstellt. Die Ergebnisse der chemischen Analytik wurden teilweise durch eine wirkungsbezogene biologische Analytik unter Verwendung des E-Screen-Assays überprüft. Hierbei wird die estrogen Gesamtaktivität in Kulturen humaner Brustkrebszellen bestimmt.

II Allgemeiner Teil

1 Überblick

Die aktuelle Diskussion in Europa seit Anfang der 90er Jahre über den möglichen Zusammenhang von unerwünschten biologischen Wirkungen und der Belastung der Umwelt durch hormonell wirksame Chemikalien hatte neben den beobachteten Störungen der Geschlechtsdifferenzierung und Reproduktion bei Wildpopulationen verschiedener Wirbeltiere noch einen anderen Ursprung. In epidemiologischen Studien konnte in den letzten Jahrzehnten ein signifikanter Rückgang der durchschnittlichen Spermienzahl bei gesunden Männern in Europa und Nordamerika, ein stetiger Anstieg von Brust- und Hodenkrebsneuerkrankungen und die Zunahme von Fehlbildungen des männlichen Genitaltraktes (Hodenhochstand, untere Harnröhrenspalte) festgestellt werden (Carlsen et al. 1992, Harris et al. 1992, Österlind 1986, Giwercman und Skakkebak 1992). Dazu kam die zufällige Entdeckung der estrogenen Wirkung einer sehr wichtigen Industriechemikalie, des 4-Nonylphenols, in einer estrogensensitiven humanen Brustkrebszelllinie (Soto et al. 1991).

In den USA fanden bereits 1979 und 1985 wissenschaftliche Symposien zum Thema „Estrogens in the Environment“ statt. Unter dem Begriff **“endokrine Disruptoren”** (*endocrine disruptors* oder *endocrine disrupting chemicals*) wurden von der Environmental Protection Agency (EPA) *„Fremdstoffe, die mit der Produktion, Freisetzung, Transport, Metabolismus, Bindung, Wirkung oder Ausscheidung von natürlichen Hormonen, welche im Organismus die Homöostase und die Regulation der Entwicklungsprozesse aufrechterhalten, interferieren“* zusammengefasst (Kavlock et al. 1996).

Wirkort und Wirkung endokriner Disruptoren

Endokrine Disruptoren können in den Steroid-, aber auch in den Thyroidhormonkomplex (Brouwer 1998) eingreifen. Bisher sind jedoch überwiegend nichtsteroidale Chemikalien mit einer Wirkung auf die Hormonsysteme der Estrogene und Androgene nachgewiesen, Wirkungen auf die der Gestagene und Glucokortikoide sind nur vereinzelt oder gar nicht bekannt.

Die nichtsteroidalen Chemikalien können auf zwei prinzipiell unterschiedliche Weisen mit dem Hormonsystem interferieren. Nach dem **Wirkort** kann unterschieden werden:

- die direkte rezeptorvermittelte Wirkung (volle und partielle Agonisten, kompetitive Antagonisten) und
- die indirekte Wirkung über die Veränderung der Biosynthese oder des Metabolismus der natürlichen Hormone

Im weiblichen und männlichen Sexualhormonsystem können sich die endokrinen Disruptoren in ihrer **Wirkung** durch entsprechende Ausprägung der Wechselwirkung mit dem Steroidrezeptor oder durch den unterschiedlichen Eingriff in den Stoffwechsel der Steroide folgendermaßen unterscheiden:

- estrogenartige, z.B. Methoxychlor, *p*-Alkylphenole
- antiestrogenartige, z.B. chlorierte Dibenzodioxine und -furane (PCDD und PCDF)
- androgenartige, z.B. Tributylzinn
- antiandrogenartige, z.B. Vinclozolin, *p,p'*-DDT

Bisher sind weitaus am häufigsten Substanzen mit einer rezeptorvermittelten estrogenartigen Wirkung bekannt. Diese nicht steroidalen Chemikalien können an den Estrogenrezeptor binden und dadurch Wirkungen der natürlichen weiblichen Estrogene „nachahmen“.

Estrogen wirksame Substanzen

Seit den 30er Jahren ist bekannt, dass nichtsteroidale Chemikalien wie Bisphenol A, *p*-Alkylphenole, 1-Keto-1,2,3,4-tetrahydrophenanthren, Diethylstilbestrol ähnlich wirken können wie die körpereigenen weiblichen Sexualhormone des Menschen und aller Wirbeltiere (Cook et al. 1933, Dodds und Lawson 1936, Dodds und Lawson 1938). Das synthetische Estrogen Diethylstilbestrol wurde deshalb seit Mitte der 40er Jahre bei drohendem Abort zur Erhaltung der Schwangerschaft eingesetzt. Ende der 60er Jahre wurde jedoch bei Töchtern dieser mit Diethylstilbestrol behandelten Mütter eine sehr seltene Form von Vaginalkarzinomen festgestellt.

In den 60er Jahren wurde die estrogene Aktivität von Organochlorinsektiziden wie Methoxychlor und *o,p'*-DDT und für einige technische PCB-Mischungen entdeckt (Tuller 1961, Bitman et al. 1968, Bitman und Cecil 1970). Bis heute ist für mehr als 40 nicht steroidale Chemikalien (Xenoestrogene) eine estrogenartige Wirkung *in vitro* und z.T. auch *in vivo* nachgewiesen. Daneben besitzen auch zahlreiche Pflanzeninhaltsstoffe (z.B. Quercetin, Apigenin, Daidzein, Coumestrol, Zearealenol, Zearalenon) die Fähigkeit, die Wirkung der weiblichen Sexualhormone nachzuahmen (Phytoestrogene). Bereits 1954 entdeckten Bradbury und White die estrogene Aktivität von Genistein, ein in Leguminosen vorkommendes Isoflavonoid. In Tab. 1 ist neben den natürlichen und synthetischen Estrogenen eine Übersicht der wichtigsten Vertreter der Substanzen mit bekannter estrogener Wirkung dargestellt. Die einzelnen Substanzen sind unter anderem nach gemeinsamen Strukturmerkmalen zusammengefasst. Zu den Substanzen, die die Estrogene nachahmen, gehören Phytoestrogene, Phenole, Chlorkohlenwasserstoffe, Phthalate, Alkylphenolderivate und sonstige Verbindungen.

Tab. 1: Einteilung der Substanzen mit bekannter estrogenen Aktivität nach strukturellen Gesichtspunkten. Für die fettgedruckten Substanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit Analysemethoden erarbeitet und Analysen in aquatischen Proben durchgeführt.

Substanzgruppe	Wichtigste Vertreter
Natürliche Steroide	17β-Estradiol, Estron, 16α-Hydroxyestron, Estriol
Synthetische Steroide	17α-Ethinylestradiol, Mestranol
Phytoestrogene	Isoflavonoide, Flavone, Lignane, Resorzyklische Lactone, 17β-Sitosterol*
Phenole	4-tert-Octylphenol, 4-Nonylphenol, Bisphenol A, 4-Hydroxybiphenyl, 2-Hydroxybiphenyl, 3-tert-Butyl-4-hydroxyanisol, 4-Chlor-3-methylphenol, 4-Chlor-2-methylphenol, 2-tert-Butyl-4-methylphenol, 4,4'-Dihydroxybiphenyl, Phenolphthalein, Phenolrot, Tetrabrom-bisphenol A
Chlorkohlenwasserstoffe	<i>o,p'</i> -DDT/DDE/DDD, Methoxychlor, Endosulfan, Dieldrin, Toxaphen, α -, β -, γ -HCH, Chlordan, Alachlor, PCB, Hydroxy-PCB
Phthalate	Benzylbutylphthalat, Di- <i>n</i> -butylphthalat, Diisobutylphthalat, Diethylphthalat, Diisononylphthalat
4-Alkylphenolderivat	4-Nonylphenoldiethoxylat, 4-Nonylphenoxyessigsäure
Sonstige	Benzophenon u. Derivate, Phenylsiloxane, 1-Naphthol, 2-Naphthol

*Kontroverse Ergebnisse zur estrogenartigen Wirkung (Kap. II 3.2)

In Abb. 1 sind einige Strukturformeln dieser Substanzen ausgewählt und dem natürlichen Steroidhormon 17 β -Estradiol gegenübergestellt. Die Xenoestrogene und Phytoestrogene unterscheiden sich untereinander nicht nur in ihrer Struktur, sondern auch von der natürlichen Estrogene. Erst mit Aufklärung der Kristallstruktur der Ligandenbindungsdomäne des humanen Estrogenrezeptors alpha, die weitaus größer ist als die Bindung von 17 β -Estradiol erfordert, wurde klar, dass für viele andere nichtsteroidale Substanzen die Möglichkeit besteht, mit dem Estrogenrezeptor zu interagieren (Brzozowski et al. 1997).

Die Xeno- und Phytoestrogene unterscheiden sich nicht nur in der Struktur, sondern auch in der estrogenen Potenz von 17 β -Estradiol. Die in Tab. 1 aufgeführten Chemikalien besitzen eine um vier bis sieben Größenordnungen geringere estrogenen Aktivität als 17 β -Estradiol, d.h. es sind 10⁴- bis 10⁷-fach höhere Konzentrationen notwendig, um

die gleiche definierte Wirkung auszulösen. 4-*tert*-Octylphenol, 4-Nonylphenol und Bisphenol A zeigen von all diesen Stoffen die stärkste Potenz.

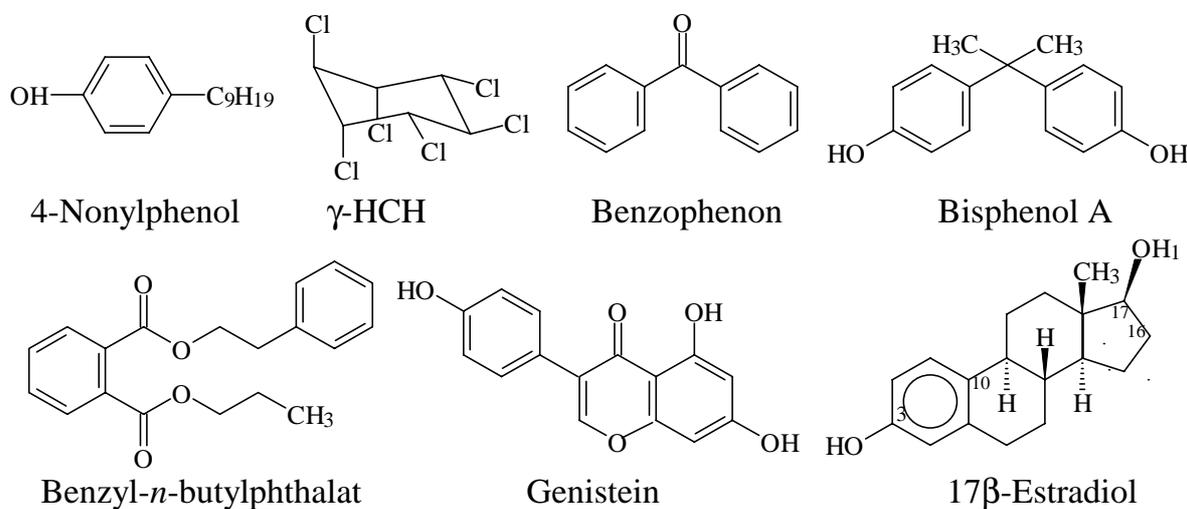


Abb. 1: Vergleich der Strukturformeln einiger ausgewählter Xeno- und Phytoestrogene mit der des natürlichen Steroidhormone 17 β -Estradiol.

2 Auswahl der zu untersuchenden estrogen wirksamen Substanzen

Viele der bisher bekannten estrogen wirksamen Xenoestrogene sind phenolische Substanzen. In Tab. 1 (s. unter I 2) sind die „phenolischen Xenoestrogene“ markiert, die im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt wurden. *In vitro*- und einige *in vivo*-Studien konnten die Estrogenität von 4-Nonylphenol und 4-*tert*-Octylphenol, Metabolite von nichtionischen Tensiden, von Bisphenol A, einem Monomer zur Epoxidharz- und Polycarbonatherstellung, von 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol, einem synthetischen Antioxidans und von der vielfältig verwendeten Industriechemikalie 4-Hydroxybiphenyl nachweisen (Soto et al. 1995, Jobling et al. 1995, Klotz et al. 1996, Körner et al. 1998, Dodds und Lawson 1936, Krishnan et al. 1993, Bitman und Cecil 1970, Jobling und Sumpter 1993). Vor kurzem wurde von Körner et al. (1998) in einer humanen Brustkrebszelllinie eine schwache estrogen Aktivität des Desinfektionsmittels 4-Chlor-3-methylphenol, des Herbizideduktes 4-Chlor-2-methylphenol, des Fungizids 2-Hydroxybiphenyl und von 2-*tert*-Butyl-4-methylphenol gemessen. Viele dieser Substanzen werden weltweit in großen Mengen produziert und eingesetzt. Da sie vielfältige Anwendungen besitzen, unter anderem in wässriger Zubereitung, werden sie verdächtig, über die Kläranlagen in die aquatische Umwelt zu gelangen. Außer für 4-Nonylphenol gibt es bisher sehr wenige Untersuchungen über die Verbreitung und Persistenz dieser phenolischen Substanzen in Kläranlagen und Oberflächengewässern.

Deshalb wurden primär chemische Analysenverfahren entwickelt, die die gemeinsame Bestimmung der phenolischen Xenoestrogene in den verschiedenen aquatischen Umweltkompartimenten ermöglichte.

Die natürlichen und synthetischen Estrogene sind die potentesten estrogen wirksamen Substanzen. Noch in geringsten Konzentrationen können sie bei Vertebraten eine estrogen Wirkung auslösen. Die synthetischen Estrogene scheinen wesentlich stabiler zu sein als die natürlichen Estrogene (Schweinsfurth und Länge 1998). Um den Abbau der natürlichen und synthetischen Estrogene in Kläranlagen untersuchen zu können, sollte mit der entwickelten Analysenmethode auch ungereinigtes Abwasser analysierbar sein. Neben 17 β -Estradiol, Estron und Estriol wurde in diese Analysengruppe nur das synthetische 17 α -Ethinylestradiol aufgenommen. Mestranol, ein Prodrug von 17 α -Ethinylestradiol, spielt in Deutschland nur noch eine untergeordnete Rolle (BPI 1999). Mestranol konnte in den letzten Jahren nur in sehr wenigen untersuchten Proben (gereinigtes Abwasser) nachgewiesen werden (Desbrow et al. 1998, Ternes et al. 1999a, Spengler et al. 1999a). Zusätzlich wurde in diese Analysengruppe das pflanzliche 17 β -Sitosterol aufgenommen, da es wie die Estrogene strukturell den Steroiden zuzuordnen ist.

3 Charakterisierung der estrogen wirksamen Substanzen

Die Aspekte zur chemischen Analytik der einzelnen ausgewählten estrogen wirksamen Substanzen werden im Kapitel der Methodenentwicklung (vgl. III.I) erwähnt und diskutiert.

3.1 Phenolische Xenoestrogene

Alkylphenole (4-Nonylphenol, 4-*tert*-Octylphenol):

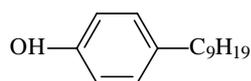
Verwendung

70 bis 80 % der produzierten *p*-Alkylphenole bestehen aus 4-Nonylphenol, der Rest aus 4-*tert*-Octylphenol und 4-*tert*-Butylphenol. 85 % der Produktion von 4-Nonylphenol werden in Deutschland zu Nonylphenolpolyethoxylaten umgesetzt (über 35.000 t/a). Neben der hauptsächlichen Anwendung als Detergentien in Wasch- und Reinigungsmitteln werden die Alkylphenolpolyethoxylate unter anderem als Schmieröladditiven, zur Herstellung von Epoxidharzen, als Polymerisationshilfsmittel in Kunststoffen, als Zusatzstoffe in Farben, als Komponenten in Pestizidformulierungen und in Flotationsmitteln eingesetzt (Thiele et al. 1997, Landtagsbericht Bayern 1998,

Hager 1999). Aufgrund der hohen aquatischen Toxizität des Metaboliten 4-Nonylphenol verpflichtete sich die chemische Industrie in Deutschland selbst, ab dem 31.12.1986 auf die Verwendung von Alkylphenolpolyethoxylaten in Haushaltsreinigern zu verzichten (BUA 1988). Stufenweise sollten bis Ende 2000 auch im Bereich der Industrie in ganz Europa die Alkylphenolpolyethoxylate ersetzt werden (Landtagsbericht Bayern 1998).

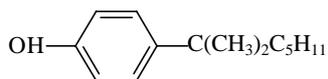
Eigenschaften

4-Nonylphenol besteht im Gegensatz zu 4-*tert*-Octylphenol aus einem Gemisch aus *p*-Isomeren mit verschiedenen Verzweigungen an der Nonylseitenkette. Beide Substanzen weisen eine relativ hohe Lipophilie auf (log K_{OW} -Wert 4,48 bzw. 4,12, Ahel und Giger 1993). Für 4-Nonylphenol ist die Anreicherung im Klärschlamm und Sediment gut dokumentiert (Giger et al. 1984, Giger et al. 1986, Brunner et al. 1988, Ahel et al. 1994a und 1994b). Bei 20 °C weist das technische Gemisch 4-Nonylphenol eine Wasserlöslichkeit von 3000 mg/l auf, der Siedebereich liegt zwischen 175 und 188 °C (27 mbar) und der Dampfdruck bei 0,1 hPa (20 °C) (BUA 1988). Die freien Alkylphenole zeigen eine wesentlich höhere akute Toxizität als ihre Elternverbindungen (Thiele et al. 1997). 4-Nonylphenol weist einen EC_{50} -Wert von 0,18 mg/l gegenüber Daphnien (Bringmann und Kühn 1982) und einen LC_{50} -Wert von 0,135 mg/l (96 h) gegenüber Süßwasserfischen (Holcombe et al. 1984) auf. Gleichzeitig konnte von Ahel et al. (1993) ein beträchtliches Potential zur Bioakkumulation in Frischwasser-Organismen festgestellt werden.



4-Nonylphenol
(CAS Nr. 25 154-52-3)

$C_{15}H_{24}O$
 $M_r = 220,3 \text{ g/mol}$



4-*tert*-Octylphenol

$C_{14}H_{22}O$
 $M_r = 206,3 \text{ g/mol}$

Verbleib in der Umwelt

Da Alkylphenolpolyethoxylate häufig in wässriger Lösung eingesetzt werden, gelangen sie überwiegend in Kläranlagen, wo sie nicht vollständig abgebaut werden. Es entstehen Alkylphenolmono- und diethoxylate, Alkylphenoxyessigsäuren und die freien Alkylphenole (z.B. Ahel et al. 1994a). Neben Alkylphenolmono- und diethoxylaten und den Alkylphenoxyessigsäuren, die nur relativ schwach an Klärschlamm adsorbieren, gelangen auch die freien Phenole in die aquatische Umwelt. Detaillierte Untersuchungen in der Schweiz haben gezeigt, dass diese Komponenten in den Gewässern und ihren Sedimenten persistieren und sogar ins Grundwasser durchbrechen können (Ahel et al. 1994b, 1996). Diese Substanzen, vorallem die freien Alkylphenole, reichern sich in Organismen wie Fischen und Vögeln an (Ahel et al.

1993). Erst kürzlich konnte in England in Muskel- und Lebergewebe von Flundern, die überwiegend im Sediment leben 4-*tert*-Octylphenol, 4-Nonylphenol und Nonylphenol-monoethoxylat gemessen werden (Lye et al. 1999).

Estrogene Effekte und Exposition

Die Estrogenität von Alkylphenolen (4-*tert*-Pentylphenol) wurde bereits in den 30er Jahren von Dodds und Lawson (1938) entdeckt. 1978 konnte in einem Bindungsassay mit isolierten Estrogenrezeptoren aus Gebärmuttergewebe von Ratten festgestellt werden, dass *p*-Alkylphenole die gleichen Bindungsstellen wie 17 β -Estradiol besitzen (Müller und Kim 1978). Soto et al. (1991) entdeckten zufällig einen estrogenen Effekt von 4-Nonylphenol in humanen Brustkrebszellen MCF-7 und später konnte dieser Effekt ebenso für 4-*tert*-Octylphenol bestätigt werden (Soto et al. 1995). Estrogene Effekte wurden auch bei Regenbogenforellen-Hepatozyten, Embryofibroblasten von Hühnern und bei anderen Estrogenrezeptoren-Bindungsstudien nachgewiesen (Jobling und Sumpter 1993, White et al. 1994). In einer *in vivo* Studie konnten Sharpe et al. (1995) bei der Exposition von trächtigen Ratten und ihrer Nachkommen, auch einige Zeit nach ihrer Geburt, gegenüber 4-*tert*-Octylphenol (1 mg/l Trinkwasser) eine Abnahme der Testes-Größe und eine verringerte Spermienzahl bei der Nachkommenschaft feststellen. Erwachsene männliche Regenbogenforellen zeigten nach Exposition gegenüber 30 μ g/l 4-*tert*-Octylphenol bzw. 4-Nonylphenol eine Produktion des weiblichen Eidotterproteins Vitellogenin (Ashfield et al. 1995). Vitellogenin ist der Vorläufer des Eidotterproteins, das physiologischerweise in der Leber weiblicher Fische unter dem Einfluss von 17 β -Estradiol gebildet wird.

Eine geringere Fruchtbarkeit konnte bei mit 4-*tert*-Octylphenol exponierten Medaka-Männchen (*Oryzias Latipes*) festgestellt werden (Gray et al. 1999). Die Embryos der exponierten Männchen zeigten bereits bei Konzentrationen von 10 μ g/l starke Entwicklungs- und Differenzierungsprobleme (pericardiale Ödeme, Anisophtalmia, Probleme beim Aufblasen der Schwimmblase nach dem Schlüpfen etc.)

Zu der Exposition des Menschen liegen noch keine genauen Angaben vor. Nach ersten Schätzungen werden pro Tag 1,26 μ g/kg Körpergewicht 4-Nonylphenol aufgenommen (Bolt 1998). Eine Aufnahme über kontaminiertes Trinkwasser, kontaminierte Nahrungsmittel von Feldern, die mit Alkylphenol-haltigem Klärschlamm gedüngt oder mit Pestiziden behandelt wurden und eine Aufnahme über die Haut durch Kosmetika, Shampoo, Industriereinigern etc. wäre denkbar.

Bisphenol A

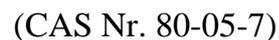
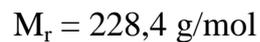
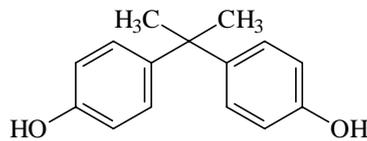
Verwendung

Bisphenol A wird als Monomer in der Produktion von Epoxidharzen und Polycarbonaten verwendet. 1993 lag die Weltproduktion bei 640.000 t. Polycarbonat-

Kunststoffe werden in vielen Verpackungsmaterialien für Lebensmittel, unter anderem auch zur Herstellung von Baby-Trinkflaschen eingesetzt. Epoxidharze finden eine breite Anwendung als Lacke, um Metallprodukte wie Konservendosen, Flaschenverschlüsse und Wasserleitungen zu überziehen und als Material für Zahnfüllungen.

Eigenschaften (Staples et al. 1998)

Bisphenol A ist mäßig wasserlöslich (120 bis 300 mg/l bei pH 7) und besitzt nur eine geringe Flüchtigkeit (Schmelzpunkt 150 - 157 °C, Siedepunkt 220 °C (4 mm Hg) bzw. 398 °C (760 mm Hg). Aufgrund seiner mittleren Lipophilie kann Bisphenol A an Sediment adsorbieren (log K_{OW} -Wert 3,4). Bisphenol A ist schwach bis mäßig toxisch (EC_{50} von 1000 µg/l bei Algen) und weist ein geringes Potential zur Bioakkumulation in aquatischen Organismen auf (Biokonzentrationsfaktor 5 bis 68).



Estrogene Effekte

1936 wurde an ovariectomierten Ratten zum ersten Mal das estrogene Potential nachgewiesen (Dodds und Lawson 1936). Kürzlich wurde ein estrogener Effekt in humanen MCF-7 Brustkrebszellen gemessen (Krishnan et al. 1993, Brotons et al. 1995, Olea et al. 1996, Soto et al. 1995, Körner et al. 1998). Identische Effekte wie durch 17 β -Estradiol konnten für Bisphenol A an Uterus und Vagina von Ratten festgestellt werden (Steinmetz et al. 1998).

Exposition

Zum Vorkommen von Bisphenol A in der aquatischen Umwelt liegen bisher noch sehr wenige Daten vor (Staples et al. 1998). Erst in jüngster Zeit wurde verstärkt das Vorkommen von Bisphenol A in Kläranlagenabläufen untersucht, wogegen in Oberflächengewässern (inkl. der Sedimente) immer noch sehr wenige Ergebnisse vorliegen. Zur Exposition beim Menschen liegen verschiedene Untersuchungen vor. Die Migration von Bisphenol A aus beschichteten Konservendosen in Lebensmittel und die Freisetzung aus frisch gelegten Kunststoffzahnfüllung in den Speichel, sowie aus auto-klavierten Polycarbonatflaschen konnte festgestellt werden (Brotons et al. 1995, Olea et al. 1996, Krishnan et al. 1993). Genaue Expositionsdaten für die Allgemeinbevölkerung fehlen jedoch nach wie vor.

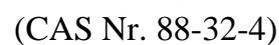
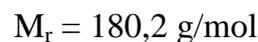
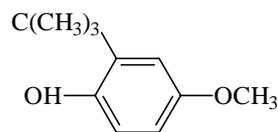
3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol

Verwendung

3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol wird als Antioxidans in Lebensmitteln, Arzneimitteln und Kosmetika verwendet. Ebenso wird es auch in verschiedenen Kautschuk-Produkten eingesetzt. In der Regel wird ein Gemisch aus > 85 % 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol und < 15 % 2-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol als Antioxidans eingesetzt.

Eigenschaften (Verhagen et al. 1991)

3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol ist praktisch unlöslich in Wasser, als Gemisch mit 2-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol schmilzt es zwischen 48 und 55 °C. Der Siedepunkt liegt bei 264 bis 270 °C. 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol weist eine relativ geringe akute Toxizität auf. Die toxikologischen Effekte von 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol können in drei Klassen eingeteilt werden: (1) die direkte Toxizität, die biochemische Effekte auf die Enzymaktivität einschließt (2) die Modulation der (Geno-)Toxizität von anderen Chemikalien und (3) seine Karzinogenität.



Estrogene Effekte

Bisher wurde eine estrogenartige Wirkung nur *in vitro* festgestellt. 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol induziert in humanen MCF-7 Brustkrebszellen die estrogenabhängige Proliferation (Soto et al. 1995, Körner et al. 1998). Jobling et al. (1995) konnten nach Isolierung von Lebergewebe der Regenbogenforelle an den Estrogenrezeptoren eine direkte Bindung messen.

Exposition

Für den aquatischen Bereich liegen bisher nur sehr wenige Daten vor. Vom Menschen wird 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol schnell resorbiert, aber auch wieder schnell eliminiert (Conning und Phillips 1986). Die tägliche Aufnahme beträgt ca. 0,13 mg/kg Körpergewicht (Addis und Hassel 1992).

2-*tert*-Butyl-4-methylphenol

Die estrogenartige Wirkung konnte von Körner et al. (1998) erstmals im E-Screen-Assay entdeckt werden. 2-*tert*-Butyl-4-methylphenol könnte als Verunreinigung bzw. Abbauprodukt des als Antioxidans eingesetzten 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol auftreten.

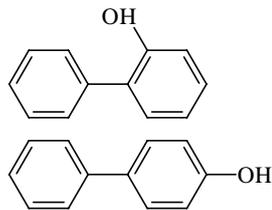
Hydroxybiphenyle (2-Hydroxybiphenyl, 4-Hydroxybiphenyl)

Verwendung

2-Hydroxybiphenyl, auch unter der Bezeichnung *o*-Phenylphenol bekannt, wird hauptsächlich als Desinfektions- und Konservierungsmittel verwendet. Aufgrund der zahlreichen Produkte ist die Anwendung als Desinfektionsmittel im medizinischen Bereich sehr gängig (BPI 1999). Die fungistatische Wirkung wird zur Konservierung von Zitrusfrüchten eingesetzt. 2-Hydroxybiphenyl wird außerdem als Kühlflüssigkeit und zur Herstellung von Detergentien und Gummiprodukten eingesetzt. 4-Hydroxybiphenyl (*p*-Phenylphenol) wird auch zur Herstellung von Gummiprodukten eingesetzt und unter anderem bei der Herstellung von Azofarbstoffen und Harzen verwendet.

Eigenschaften

Die Wasserlöslichkeit von 2-Hydroxybiphenyl liegt bei 7000 mg/l, der Schmelzpunkt zwischen 58 und 60 °C und der Siedepunkt bei 286 °C. Die akute Toxizität von 2-Hydroxybiphenyl (LC₅₀-Wert von 5,99 mg/l (96 h)) lag bei der gleichen Studie wesentlich niedriger als die von 4-Nonylphenol (Holcombe et al. 1984).



2-Hydroxybiphenyl	C ₁₂ H ₁₀ O
(CAS Nr. 90-43-7)	M _r = 170,2 g/mol
4-Hydroxybiphenyl	C ₁₂ H ₁₀ O
(CAS Nr. 92-69-3)	M _r = 170,2 g/mol

Estrogene Effekte

Für beide Hydroxybiphenyle wurde bisher nur *in vitro* ein estrogener Effekt gemessen (Soto et al. 1992, 1995, 1998). Die estrogene Potenz von 4-Hydroxybiphenyl lag sowohl im E-Screen-Assay als auch in einem Hefezell-Assay höher als die von 2-Hydroxybiphenyl (Körner et al. 1998, Routledge et al. 1997).

Verbleib in der Umwelt

Zum Vorkommen dieser beiden Substanzen in der aquatischen Umwelt liegen überwiegend aktuellere Studien vor, die sich allerdings nur auf 2-Hydroxybiphenyl beziehen.

In aeroben und anaeroben Abbauprobungen mit Belebtschlamm wurde 2-Hydroxybiphenyl vollständig abgebaut (Voets et al. 1975). Auch bei Kompostierungsversuchen mit dotierten Südfruchtschalen wurde von Wilke (1997) eine gute Abbaubarkeit ermittelt.

Chlorkresole (4-Chlor-3-methylphenol, 4-Chlor-2-methylphenol)

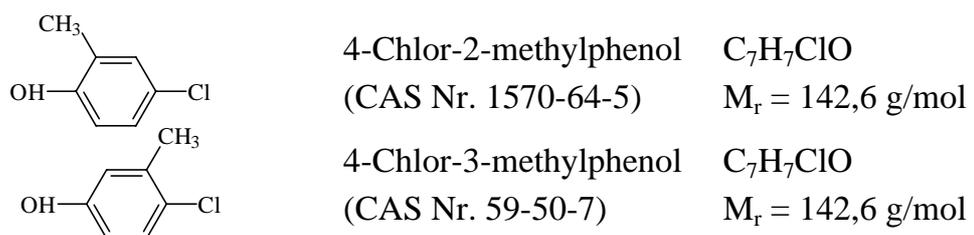
Verwendung

4-Chlor-3-Methylphenol und sein Natrium-Salz werden als Desinfektionsmittel im klinischen Bereich und als Konservierungsmittel in der Leder-, Textil-, Klebstoff-, Papier-, Farbstoff-, Baustoff- und metallverarbeitenden Industrie eingesetzt. Von den jährlich in der Bundesrepublik produzierten 2000 t 4-Chlor-3-Methylphenol werden im Inland 400 t verbraucht, der Rest wird exportiert (UBA 1996). 4-Chlor-2-Methylphenol wird selbst nicht angewendet, es wird als Edukt der Phenoxyalkansäure-Herbizide eingesetzt. Seit 1991 wird 4-Chlor-2-Methylphenol bundesweit nicht mehr hergestellt, Importe und Exporte sind nicht bekannt (BUA 1994b).

Eigenschaften (BUA 1994a, 1994b)

4-Chlor-3-Methylphenol (3,6 - 4,0 g/l) weist eine bessere Wasserlöslichkeit auf als 4-Chlor-2-Methylphenol (4,0 - 7,6 g/l). Die Schmelz- und Siedepunkte von 4-Chlor-3-Methylphenol (45 - 49 °C bzw. 220 - 225 °C) liegen minimal höher als die von 4-Chlor-2-Methylphenol (63 - 66 °C bzw. 235 - 239 °C). Obwohl ein log K_{OW} -Wert von 3,02 bis 3,1 (4-Chlor-3-Methylphenol) bzw. 3,06 bis 3,1 (4-Chlor-2-Methylphenol) ermittelt wurde, zeigte sich für beide Substanzen experimentell nur eine geringe Bioakkumulation bei Fischen.

Zahlreiche Untersuchungen zur akuten Toxizität von 4-Chlor-3-Methylphenol wurden durchgeführt. Als empfindlichste aquatische Spezies erwiesen sich Fische für die eine *Predicted No Effect Concentration* (PNEC) von 50 µg/l abgeschätzt wurde (UBA 1996).



Estrogene Effekte

Die estrogenartige Wirkung dieser beiden Chlorkresole wurde von Körner et al. (1998) im E-Screen-Assay entdeckt.

Verbleib in der Umwelt

Einträge von 4-Chlor-3-Methylphenol erfolgen hauptsächlich über Abwasser in die aquatische Umwelt. Die höchsten Konzentrationen sind in ungereinigtem Abwasser von Textil- und Gerbereibetrieben zu erwarten (UBA 1996). 4-Chlor-2-Methylphenol

kann in Deutschland im Prinzip nur als Verunreinigungs-komponente aus importierten Phenoxyalkansäure-Herbiziden oder beim Abbau dieser Herbizide im Boden oder auf den Pflanzen in die Umwelt gelangen (BUA 1994b). In kommunalen Kläranlagen wurden Abbauraten zwischen 72 und > 96 % für 4-Chlor-3-Methylphenol (Arent et al. 1983) und bei 94 % für 4-Chlor-2-Methylphenol bestimmt (BUA 1994b).

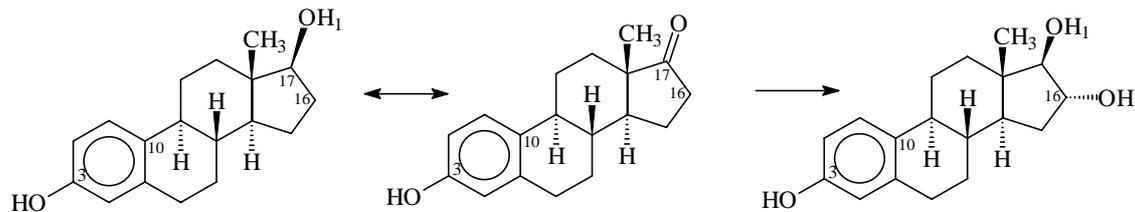
3.2 Steroide

Natürliche Estrogene

Das natürliche Estrogen 17β -Estradiol der Vertebraten wird überwiegend in den Ovarien und zu geringen Mengen auch in der Nebennierenrinde, dem Fettgewebe und den Hoden gebildet. Die tägliche Estrogenproduktion, die über eine Rückkoppelung über Hypothalamus und Adenohypophyse gesteuert wird, liegt bei der Frau je nach Zyklusphase bei 25 bis 100 μg . In der Schwangerschaft wird die Estrogenproduktion von der Plazenta übernommen und kann bis auf 30 mg/d ansteigen, in der Postmenopause sinkt die Bildung dagegen auf 5 bis 10 $\mu\text{g}/\text{d}$. Männer produzieren täglich 2 bis 25 μg Estrogene. Trächtige Stuten scheiden pro Tag sogar bis zu 100 mg aus (Turan 1995).

Der größte Teil der im Körper vorliegenden Estrogene ist an das spezifische Sexualhormon-bindende Plasmaglobulin (SHBG) aber auch an Albumin gebunden und besitzt dadurch keine physiologische Aktivität. Für die Xenoestrogene ist im Gegensatz eine derartige Bindung nicht beschrieben. Die Wirkung der Estrogene erfolgt rezeptorvermittelt. Die Zielorgane für Estrogene sind der Uterus, die Cervix, Vagina und die Mamma. Die Estrogene fördern das Wachstum der weiblichen Sexualorgane und prägen die sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale (Mamma). In der Pubertät bewirken sie den Schluss der Epiphysenfugen in den Knochen zur Beendigung des Längenwachstumes. Nahezu alle weiblichen Vorgänge der Reproduktion werden zusammen mit den Gestagenen reguliert.

17β -Estradiol und Estron, die im Körper wechselseitig ineinander umgewandelt werden können, werden überwiegend in der Leber metabolisch inaktiviert. Die Plasmahalbwertszeit von 17β -Estradiol liegt bei etwa 50 min, die von Estron bei etwa 90 min. Der vielfältige Metabolismus erfolgt in der oxidativen Phase I-Reaktion (Hydroxylierung und Dehydrierung), in der Phase II-Reaktion werden die Metaboliten konjugiert, um als Sulfate und Glucuronide über Galle und Harn ausgeschieden werden zu können. Während der Schwangerschaft ist Estriol der Hauptmetabolit, während in der übrigen Zeit und auch beim Mann Estron und 2-Hydroxyestron überwiegen (Fotsis und Adlercreutz 1987).

17 β -Estradiol $C_{18}H_{24}O_2$ $M_r = 272,4$ g/mol

(CAS Nr. 50-28-2)

Estron

 $C_{18}H_{22}O_2$ $M_r = 270,4$ g/mol

(CAS Nr. 53-16-7)

Estriol

 $C_{18}H_{24}O_3$ $M_r = 288,4$ g/mol

(CAS Nr. 50-27-1)

Verwendung

Die therapeutische Anwendung von 17 β -Estradiol erfolgt über die Haut oder oral in Form seiner Ester zur Estrogensubstitution im Klimakterium. Estriol wird überwiegend im vaginalen Bereich bei lokalem Estrogenmangel eingesetzt (BPI 1999).

Eigenschaften

Die Wasserlöslichkeit nimmt von 17 β -Estradiol über Estron bis zu Estriol zu. Die Wasserlöslichkeit der Estrogene ist ziemlich gut und damit besser als die vieler anderer Steroide (Rurainski et al. 1977). Der Schmelzpunkt von 17 β -Estradiol liegt bei 178 °C und der von Estriol bei 282 °C (Kommentar zum Deutschen Arzneibuch 1996 und Europäischen Arzneibuch, Nachtrag 1999).

Bei einer umfangreichen Untersuchung, in der das potentielle Verhalten von 17 β -Estradiol in Fließgewässern untersucht wurde, ergab sich ein log K_{OW} -Wert von 3,1 (Jürgens und Johnson 1999). Aus diesen Ergebnissen geht auch hervor, dass 17 β -Estradiol an Schwebstoffe und Sedimente gebunden werden kann.

Estrogene Potenz und Effekte

Die physiologische Aktivität nimmt in der Reihenfolge 17 β -Estradiol > Estron > Estriol um jeweils den Faktor drei ab (Pschyrembel 1998). Im E-Screen-Assay wirkte Estriol deutlich stärker als Estron (Schuller 1998). Estriol wirkte um einen Faktor 5 schwächer als 17 β -Estradiol und Estron sogar um einen Faktor 60. Soto et al. (1995) konnten vergleichbare Ergebnisse erzielen.

Bei der Exposition über 3 Wochen gegenüber 17 β -Estradiol und Estron wurde in männlichen Regenbogenforellen ab Konzentrationen von 1 - 10 ng/l bzw. 25 ng/l eine Induktion der Vitellogeninsynthese gemessen (Routledge et al. 1998).

Vorkommen im aquatischen Bereich

Zum Vorkommen von 17 β -Estradiol und Estron im aquatischen Bereich gibt es bereits einige Daten, Estriol wurde bisher kaum untersucht (z.B. Stumpf et al. 1996, Ternes et

al. 1999a, Belfroid et al. 1999). Da in Abwässern und Oberflächengewässern synthetische und natürliche Estrogene nachgewiesen werden können, müssen offensichtlich während der Abwasserbehandlung und bereits in der Kanalisation die mit dem Urin ausgeschiedenen Konjugate gespalten werden (Schweinsfurth und Länge 1998, Jürgens und Johnson 1999).

Bereits in den 70er Jahren wurden die natürlichen und synthetischen Steroide im Trinkwasser untersucht (Rurainski et al. 1977). 17β -Estradiol lag nur zwischen 0,12 und 0,42 ng/l vor.

17 α -Ethinylestradiol

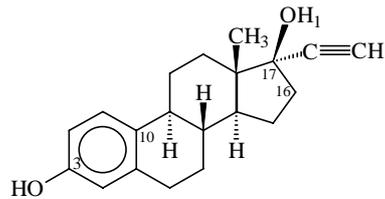
Aufgrund der raschen Metabolisierung (First-Pass-Effekt) der natürlichen Estrogene bei gleichzeitig schlechter oraler Bioverfügbarkeit wurde nach Wirkstoffen gesucht, die therapeutisch in geringeren Konzentrationen angewendet werden konnten und dadurch wesentlich verträglicher waren. Bereits 1938 gelang es Ethinylestradiol zu synthetisieren. Mit Einführung der Ethinylgruppe in Position 17α von 17β -Estradiol konnte die orale Bioverfügbarkeit wesentlich verbessert werden und das Molekül gegen Oxidation stabilisiert werden. Seit 1957 mit der ersten Zulassung der oralen Kontrazeption („Pille“) wird 17α -Ethinylestradiol neben der Gestagenkomponente als Estrogenkomponente eingesetzt. Derzeit sind mehr als 40 orale Kontrazeptiva auf dem deutschen Arzneimittelmarkt, die 17α -Ethinylestradiol enthalten (BPI 1999). Die kontrazeptive Wirkung besteht darin, dass die Bildung des FSH (Follikel stimulierendes Hormon) in der Adenophyse unterdrückt wird und dadurch die Follikelreifung verhindert wird.

Der Metabolismus erfolgt überwiegend unter Bildung eines Katechol (Hydroxylierung an Position 2) und oder unter Konjugation. Nur ca. 1 % der aufgenommenen Menge wird unverändert ausgeschieden (Schweinsfurth und Länge 1998).

Eigenschaften (Schweinsfurth und Länge 1998)

17α -Ethinylestradiol besitzt eine geringe Wasserlöslichkeit (4,7 - 4,8 mg/l). Mit einem deutlich höheren $\log K_{OW}$ -Wert von 4,2 als 17β -Estradiol scheint eine Adsorption an Sedimentpartikeln möglich und ein Potential zur Bioakkumulation vorhanden zu sein.

Bei akuten Toxizitätstests scheinen Fische als die empfindlichste Spezies gegenüber 17α -Ethinylestradiol zu reagieren (die LC_{50} bei 96 h von Regenbogenforellen betrug 1,6 mg/l).



$C_{20}H_{24}O_2$
 $M_r = 296,4 \text{ g/mol}$
 (CAS Nr. 57-63-6)

Estrogene Potenz

Im E-Screen-Assay zeigte 17 α -Ethinylestradiol eine dem 17 β -Estradiol vergleichbare estrogene Aktivität (Soto et al. 1995, Schuller 1998). Bei *in vivo* Experimenten wurden bei männlichen Regenbogenforellen nach der Exposition über 3 Wochen gegenüber 17 α -Ethinylestradiol noch bei einer Konzentration unter 0,5 ng/l deutlich erhöhte Vitellogeninplasmaspiegel gemessen (Purdom et al. 1994).

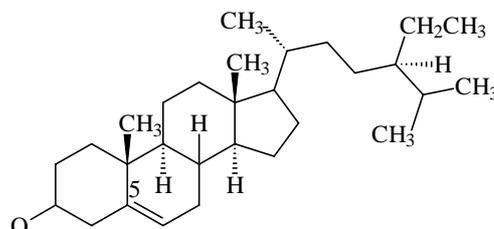
Vorkommen in der Umwelt

Ältere Messungen weisen im Vergleich zu 17 β -Estradiol höhere Konzentrationen in gereinigtem Abwasser und Trinkwasser auf (Rurainski et al. 1977, Stumpf et al. 1996). Neuere Studien zeigen für beide Substanzen vergleichbare Konzentrationen im unteren ppt-Bereich (Ternes et al. 1999a). Aufgrund verschiedener Daten zum Abbau scheint 17 α -Ethinylestradiol deutlich stabiler als die natürlichen Steroide zu sein (Schweinsfurth und Länge 1998).

17 β -Sitosterol

In höheren Pflanzen liegt das Sterol 17 β -Sitosterol nahezu ubiquitär vor. Seine genaue physiologische Wirkung ist bisher noch nicht bekannt.

Estrogene Wirkungen wurden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beschrieben (Mellanen et al. 1996). Von Körner (persönliche Mitteilung) konnte im E-Screen-Assay keine estrogenartige Wirkung bis zu einer Konzentration von 2 μM gemessen werden. In einer androgensensitiven Zelllinie konnte jedoch ein schwacher androgenartiger Effekt festgestellt werden.



$C_{29}H_{50}O$
 $M_r = 414,7 \text{ g/mol}$
 (CAS Nr. 83-46-5)

Verwendung

17 β -Sitosterol wird neben Cholesterin und Stigmasterin industriell zur Synthese von Estron und Gestagenen verwendet. Hierzu wird es aus Pflanzenölen, besonders aus

Sojabohnen- und Weizenkeimöl gewonnen (Wagner 1993). Therapeutisch wird 17 β -Sitosterol in Form von Fertigarzneimittelpräparaten überwiegend zur Behandlung von Miktionsbeschwerden bei benigner Prostatahyperplasie und bei Hyperlipoproteinämie eingesetzt. In der Roten Liste 1999 sind 9 Präparate aufgeführt (BPI 1999).

Vorkommen in der aquatischen Umwelt

In der Partikel- und Wasserphase von Abwasser konnten teilweise Konzentrationen im $\mu\text{g/l}$ -Bereich gemessen werden (Quéméneur u. Marty 1994). Zum Vorkommen in Fließgewässern liegen nur sehr wenige Daten vor (Stumpf et al. 1996, Fromme et al. 1999). Sedimentanalysen zeigten Konzentrationen von 0,194 $\mu\text{g/g}$ TS (Benfenati et al. 1994).

4 E-Screen-Assay

Der E-Screen-Assay ist ein *in vitro* Biotest, bei dem die estrogenabhängige Proliferation der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 gemessen wird (Soto et al. 1992). Die Zunahme der Proliferation erfolgt über eine rezeptorvermittelte Wirkung. Als Maß für die estrogenische Wirkung einer Substanz oder einer Umweltprobe wird die Zellproliferation im Vergleich zu Kontrollen mit und ohne 17 β -Estradiol bestimmt. Der von Soto et al. (1992) entwickelte E-Screen-Assay wurde von Körner et al. (1998) wesentlich vereinfacht und miniaturisiert. Das Schema zur Durchführung des modifizierten E-Screen-Assay ist in Abb. 2 dargestellt.

Die Vereinfachung und Miniaturisierung bestand darin:

- Anstelle von Humanserum wurde kommerziell erhältliches fötales Kälberserum verwendet.
- Alternativ zur direkten Zellzählung konnte eine kolorimetrische Zellzählung durchgeführt werden.
- Der Assay konnte statt in 24-Well-Platten in 96-Well-Platten durchgeführt werden.

Die Nachweisgrenze des optimierten E-Screen-Assays liegt für 17 β -Estradiol bei etwa 1 pmol/l (0,27 ng/l). Verschiedene Umweltchemikalien und die natürlichen und synthetischen Estrogene wurden in diesem E-Screen-Assay getestet (Körner et al. 1998, Schuller 1998). Zur Bewertung der estrogenen Aktivität dieser Substanzen wurde die estrogenische Wirkungsstärke (relativer Proliferationseffekt) und die estrogenische Potenz (Estradiol-Äquivalenzfaktor) relativ zu 17 β -Estradiol bestimmt. Die relativen Proliferationseffekte (RPE) und die Estradiol-Äquivalenzfaktoren (EFF) der in dieser Arbeit ausgewählten estrogen wirksamen Substanzen sind in Tab. 2 zusammengefasst.



Abb. 2: Schema für die Durchführung des modifizierten E-Screen-Assay mit MCF-7-Zellen.

Tab. 2: Im E-Screen-Assay ermittelte relative Proliferationseffekte und Estradiol-Äquivalenzfaktoren für die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen (Körner et al. 1998, Schuller 1998).

Substanz	Relativer Proliferations- effekt [% 17β-Estradiol]	Estradiol-Äquivalenzfaktor (17β-Estradiol = 1)
4- <i>tert</i> -Octylphenol	97	1,1E-04
4-Nonylphenol	105	1,1E-04
Bisphenol A	97	6,0E-05
3- <i>tert</i> -Butyl-4-hydroxyanisol	31	2,4E-06
2- <i>tert</i> -Butyl-4-methylphenol	28	3,0E-06
4-Hydroxybiphenyl	71	1,1E-05
2-Hydroxybiphenyl	35	1,5E-06
4-Chlor-3-methylphenol	46	3,1E-07
4-Chlor-2-methylphenol	28	1,8E-07
Estron	112	0,016
Estriol	92	0,21
17α-Ethinylestradiol	102	0,92
17β-Sitosterol	n.n.	n.n.

Dieser modifizierte E-Screen-Assay wurde zur Bestimmung der estrogenen Gesamtaktivität von aquatischen Umweltproben validiert und bereits erfolgreich auf Abwasser- und Flusswasserproben angewendet (Körner et al. 1999a, Körner et al. 1999b, Körner et al. 1999c, Körner et al. 2000).

III Ergebnisse und Diskussion

III.I Methodenentwicklung zur chemischen Analytik

1 Einleitung

Das Ziel dieser Arbeit lag darin, die Verbreitung und Belastungssituation der ausgewählten estrogen wirksamen Substanzen in der aquatischen Umwelt mit Hilfe chemischer Analytik und zusätzlich z.T. mit einer biologischen Methode zu untersuchen. Besonderes Augenmerk wurde auf Abwasser gelegt, da es vermutlich der Haupteintragspfad dieser Substanzen in die aquatische Umwelt ist.

Die wesentliche Voraussetzung für jede Art von Untersuchungen sind geeignete Analyseverfahren, die einen routinemäßigen Einsatz erlauben. Die entwickelten Verfahren sollten sich durch eine einfache und schnelle Handhabung auszeichnen und im Besonderen eine hohe Reproduzierbarkeit mit Nachweis- und Bestimmungsgrenzen unterhalb des umweltrelevanten Konzentrationsbereichs aufweisen. Um die ausgewählten estrogen wirksamen Substanzen in den einzelnen Kompartimenten der aquatischen Umwelt erfassen zu können, müssen die chemischen Analyseverfahren auf Flusswasser, ungereinigtes und gereinigtes Abwasser, Sediment und Klärschlamm anwendbar sein.

Ein chemisch-analytisches Verfahren beinhaltet generell die Substanzanreicherung aus der Probenmatrix (Extraktion) und die Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Substanzen aus dem Extrakt (quantitative Analytik). Zwischen diesen beiden Schritten muss je nach Probenart und Substanzklasse ein Aufreinigungsschritt (*clean up*) geschaltet werden, der die quantitative Analytik vereinfacht oder gar erst ermöglicht. Sowohl die Unterschiedlichkeit der Umweltmatrizes als auch der zu untersuchenden Substanzklassen stellen verschiedene Ansprüche an die Analyse-methode hinsichtlich der Anreicherung und Aufreinigung. Demnach wurden sinnvollerweise die natürlichen und synthetischen Estrogene einschließlich 17 β -Sitosterol zu einer Analysengruppe und die unter dem Begriff „phenolische Xenooestrogene“ zusammengefassten nichtsteroidalen Chemikalien zu einer weiteren Analysengruppe zusammengeschlossen. Für Sediment und Klärschlamm wurde aufgrund ihrer komplexen Matrix eine eigenständige Aufarbeitungsmethode zur Extraktion und Aufreinigung entwickelt.

Unterstützend zur chemischen Analytik sollten die Umweltproben mit einem *in vitro*-Biotest, dem E-Screen-Assay auf estrogen Gesamtaktivität getestet werden. Um die Ergebnisse beider Methoden unmittelbar miteinander vergleichen zu können, war es Voraussetzung, dass der Extrakt, der für die chemische Analytik aufgearbeitet wurde,

auch in den E-Screen-Assay eingesetzt werden konnte. Das Ziel, ein und denselben Extrakt mit beiden Methoden zu analysieren, wurde während der Methodenentwicklung der chemischen Analytik berücksichtigt und gleichzeitig im E-Screen-Assay überprüft (Körner et al. 1999a).

2 Bestandsaufnahme

2.1 Extraktions- und Aufreinigungstechniken

Bei der Extraktion sollten die in der Probe enthaltenen estrogenartig wirkenden Substanzen quantitativ in einem geringen Volumen eines organischen Lösungsmittels angereichert werden und so der quantitativen Analytik zugänglich gemacht werden. Die Substanzanreicherung sollte deren Nachweis im Spurenbereich ermöglichen, ohne dass unverhältnismäßig große Probenmengen eingesetzt werden.

Im Wesentlichen kommen drei verschiedene Phasenverteilungen als Trennprinzipien zur Extraktion in Betracht:

- Flüssig-fest-Verteilung (Festphasenextraktion)
- Flüssig-flüssig-Verteilung (Ausschütteln mit dem Scheidetrichter, Mikroseparation)
- Fest-flüssig-Verteilung (Soxhletextraktion, Ultraschallextraktion)

Allen drei Extraktionsprinzipien ist gemein, dass eine Stofftrennung über eine Verteilung auf zwei nicht miteinander mischbare Phasen stattfindet (Schwedt 1996). Welches Prinzip zum Einsatz kommt, ist zuallererst von der zu extrahierenden Probenmatrix abhängig. Die ersten beiden Prinzipien können zur Extraktion von flüssigen Proben eingesetzt werden. Feststoffproben können nur durch Fest-flüssig-Verteilung aufbereitet werden. Neben dem Extraktionsverfahren trägt das Extraktionsmittel entscheidend zur quantitativen Anreicherung der Substanzen bei. Welche der beispielhaft aufgeführten Extraktionstechniken und welches Extraktionsmittel letztendlich ausgewählt werden, muss aus dem Zusammenspiel verschiedener Faktoren, wie z.B. Praktikabilität auf die zu untersuchenden Substanzen (Wiederfindungsraten), Reproduzierbarkeit, Leistungsfähigkeit und Handhabung der Methode getroffen werden.

Eine leistungsfähige Aufreinigung (*clean up*) erleichtert idealerweise die quantitative Analytik und liefert einen wesentlichen Beitrag zum Erhalt eines richtigen Ergebnisses. Durch Anwendung eines *clean up* nach der Extraktion sollten bei der Analyse störende, mitextrahierte Matrixbestandteile abgetrennt werden. Die Aufreinigung des Extraktes ermöglicht dessen weitere Aufkonzentrierung. Dadurch können letztendlich

ausreichend niedrige Nachweisgrenzen erzielt werden. In der organischen Umweltanalytik kommen vorwiegend flüssigkeitschromatographische Techniken (Adsorption an Kieselgel, basischem Aluminiumoxid, etc.), die auf der Flüssig-fest-Verteilung basieren, zum Einsatz. Weitere Techniken basieren auf der Flüssig-flüssig-Verteilung oder auf dem Trennprinzip nach Molekülgröße (Gelfiltration). Die Flüssig-flüssig-Verteilung kann z.B. auf Phenole angewendet werden. Sie können als Phenolate mit alkalisch-wässriger Lösung ausgeschüttelt werden. Die Gelfiltration kann z.B. zur Abtrennung von Fetten eingesetzt werden.

Ein geeignetes und leistungsfähiges Aufreinigungsverfahren muss im Einzelnen auf die Anforderungen der Probenmatrix der zu untersuchenden Substanzen abgestimmt werden. Die Probenaufreinigung muss ebenso wie die Extraktion qualitativ abgesichert werden, indem Wiederfindungsraten bestimmt und Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit durchgeführt werden.

2.2 HRGC/LRMS

Zur chemischen Analytik der zu untersuchenden estrogen wirksamen Substanzen stand die hochauflösende Gaschromatographie mit anschließender niederauflösender massenspektrometrischer Detektion (HRGC/LRMS) zur Verfügung. Durch Einsatz dieser Gerätekombination ist sowohl die Identifizierung der Substanzen als auch ihre Quantifizierung möglich.

Bei der HRGC werden kommerziell hergestellte Quarzkapillarsäulen mit kleinem Innendurchmesser (0,25 mm) verwendet, die eine direkte Koppelung mit dem Massenspektrometer (MSD) ermöglichen. Durch Einsatz von Quarzkapillarsäulen mit einer dünnen Filmdicke (0,1 - 0,25 μm) werden Substanzgemische bei relativ kurzen Retentionszeiten sehr effizient getrennt, allerdings ist die Kapazität der stationären Phase auf ein Injektionsvolumen von 1 bis maximal 3 μl und auf absolute Konzentrationen der zu analysierenden Substanzen im ng-Bereich beschränkt. Die in dieser Arbeit eingesetzte stationäre Phase (DB XLB), ein unpolares quervernetztes Methylpolysiloxan mit ca. 12 % Phenylsubstitution, zeichnet sich durch eine hohe thermische Stabilität (Maximaltemperatur von 300 - 320 °C) aus und weist auch bei einem hohem Probendurchsatz ein geringes Säulenbluten auf. Im Laufe der Methodenentwicklung wurde festgestellt, dass ein Injektionsvolumen von 1 μl die besten Chromatogramme erzielte. Die Erhöhung des Injektionsvolumens auf 2 - 3 μl führte nicht zu einer Erniedrigung der Nachweisgrenze, vielmehr erhöhte sich das Rauschsignal entsprechend und häufig verbreiterten sich die Signalpeaks.

Die Gaschromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie (GC/MS) eignet sich in besonderem Maße zur Analytik von Komponenten im Spurenbereich (unterer ng-

Bereich). Durch Detektion in Form der Massenfragmentographie (Selected oder Single Ion Monitoring, SIM) an Stelle der Aufnahme kompletter Massenspektren erhöht sich die Empfindlichkeit des MSD um etwa zwei Zehnerpotenzen. Im SIM-Modus wird kontinuierlich die Intensität charakteristischer Massen einzelner Kationen, die durch Elektronenstoßionisation erzeugt werden, aufgenommen. Die Aufnahme eines Totalionenchromatogramms (Scan-Modus) wurde während der Methodenentwicklung zur Ermittlung charakteristischer Massen verwendet, die anschließend im SIM-Modus registriert wurden.

2.3 Quantifizierung

Die quantitative Auswertung in der Analytik kann auf zwei verschiedene Arten durchgeführt werden: (1) kann die Quantifizierung über die interne Standardmethode und (2) über die externe Standardmethode (externe Kalibrierung) erfolgen.

Die interne Standardmethode stellt eine sehr elegante Methode dar, vor allem wenn isotopenmarkierte Standards (Isotopenverdünnungs-Methode) verwendet werden, die bereits langjährig in der Dioxin-Analytik zum Einsatz kommen (Hagenmaier et al. 1987). Der interne Standard wird hierbei der Probe vor der Extraktion zugesetzt. Substanzverluste während der Aufreinigung werden wegen des identischen chemischen Verhaltens des isotopenmarkierten Standards und der nativen Substanz kompensiert. Ferner werden Volumenfehler aufgehoben, auch wenn ein interner Standard eingesetzt wird, der nicht isotopenmarkiert ist, aber chemisch ähnliche Eigenschaften aufweist. Bei der Massenspektrometrie kann die Quantifizierung durch unmittelbaren Flächen- oder Höhenvergleich der Intensität charakteristischer Massen des Standards und der nativen Substanz erfolgen.

Bei der externen Standardmethode wird durch Vermessung unterschiedlicher Konzentrationen des Referenzstandards eine Kalibriergerade (Flächen- oder Höhenintensität gegen Konzentration aufgetragen) ermittelt oder der Responsefaktor (= Konzentration/ Flächen- oder Höhenintensität) berechnet. Die Probe wird anschließend separat gemessen und über Vergleich der Kalibriergerade bzw. des Responsefaktors mit der gemessenen Flächen- oder Höhenintensität der nativen Substanz die Konzentration ermittelt.

Während der vorliegenden Arbeit standen für die chemische Analytik der estrogen wirksamen Substanzen keine entsprechenden isotopenmarkierten Standards zur Verfügung (Ausnahme D₂-markiertes 17 β -Estradiol). Zum einen waren zu Beginn der Methodenentwicklung nicht alle entsprechenden isotopenmarkierten Standards kommerziell erhältlich und zum anderen wäre ihre Anschaffung vor ihrem routinemäßigen Einsatz unverhältnismäßig teuer. Folglich wurden Methoden mit einer

internen Quantifizierung unter Verwendung extern bestimmter Responsefaktoren erarbeitet.

3 Methodische Vorgehensweise zur Entwicklung eines Analyseverfahrens

Die nach strukturellen Ähnlichkeiten in zwei Gruppen (Gruppe 1 der phenolischen Xenooestrogene und Gruppe 2 der Steroide) zusammengefassten estrogen wirksamen Substanzen wurden während der Methodenentwicklung getrennt untersucht.

Aufgrund der unterschiedlichen Matrix und der daraus resultierenden Anforderung an die Probenaufbereitung wurden feste und wässrige Umweltproben auf eine andere Art und Weise extrahiert bzw. aufgereinigt. Die quantitative Analytik der erhaltenen Extrakte der wässrigen und festen Proben erfolgte anschließend mit derselben Methode. Für die Steroide konnte im Rahmen dieser Arbeit nur eine Aufarbeitungsmethode für wässrige Proben entwickelt werden.

Bei der Entwicklung geeigneter Analyseverfahren wurde methodisch folgendermaßen vorgegangen:

1. Literaturrecherche nach bereits bestehenden Methoden, die während der gesamten Zeit fortgeführt wurde, um den Kenntnisstand zu verfolgen.
2. Massenspektrometrische Identifizierung im Scan-Modus zur Ermittlung charakteristischer Molekül- bzw. Fragmentionen. Eine Derivatisierung der Substanzen wurde durchgeführt, um ihre Flüchtigkeit zu erhöhen und überhaupt eine gaschromatographische Trennung zu ermöglichen oder eine bessere massenspektrometrische Empfindlichkeit zu erzielen.
3. Entwicklung und Optimierung der gaschromatographischen Trennung (Vordruck, Ofentemperaturprogramm, etc.). Die ermittelten Retentionszeiten konnten als weiteres Identifizierungskriterium herangezogen werden.
4. Bestimmung des linearen Quantifizierungsbereichs und Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen jeder einzelnen Substanz.
5. Entwicklung geeigneter Extraktionsverfahren. Optimierung durch Überprüfung der Wiederfindungsraten und Reproduzierbarkeit.
6. Erarbeitung eines Aufreinigungsverfahrens, sofern es für die GC/MS-Analyse notwendig war. Das Aufreinigungsverfahren wurde ebenfalls durch Bestimmung von Wiederfindungsraten auf mögliche Verluste überprüft und Reproduzierbarkeitsuntersuchungen unterworfen.

Zur Methodenentwicklung wurde für flüssige Proben demineralisiertes Wasser oder sehr gering belastetes Quellwasser als Testmatrix herangezogen. Als Feststoffproben wurden Sediment- und Klärschlammproben, sowie Schwebstoffproben aus ungereinigtem Abwasser eingesetzt. Bei Dotierung von realen Proben zur Bestimmung der Wiederfindungsrate war die schwankende Hintergrundbelastung problematisch. Besonders bei festen Proben konnten die Schwankungen aufgrund von Inhomogenitäten in der Probenmatrix trotz gleicher Probenaufbereitung (z.B. Pulverisierung) nicht vollständig eliminiert werden. Vor allem bei Sedimentproben, die durch Alterung erhebliche Unterschiede in ihrer Strukturzusammensetzung aufweisen (Einschlüsse, schwankende Gehalte an organischer Matrix) ist die Extraktion mit weiteren Unsicherheiten verbunden. Die absolute Ausbeute läßt sich im Prinzip nicht mit vollständiger Sicherheit bestimmen. Nach Kooke et al. (1981) kann oftmals nur durch Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden das beste Verfahren ermittelt werden.

Die Aufreinigungsschritte wurden zuerst an dotiertem Lösungsmittel auf Wiederfindung und Reproduzierbarkeit erprobt. Anschließend wurde die Reinigung an einem realen Extrakt überprüft. Bei Feststoffproben musste allerdings immer ein Matrixeffekt berücksichtigt werden, der sich aufgrund des hohen Anteils an organischen Stoffen auf das Trennverhalten auswirken könnte. Folglich musste damit gerechnet werden, dass sich jede dieser Proben bei der Trennung unterschiedlich verhält. Auf die Problematik wird in den einzelnen Kapiteln näher eingegangen.

Neben der Bestimmung der Wiederfindungsraten und deren Reproduzierbarkeit ist die Bestimmung von Blindwerten ein wesentlicher Bestandteil der analytischen Qualitätskontrolle. Während der Methodenentwicklung und bei der Messung realer Proben wurde der Blindwert ständig bestimmt und überprüft.

4 Phenolische Xenoestrogene

Die neun phenolischen Xenoestrogene weisen als gemeinsames Strukturmerkmal mindestens eine phenolische Gruppe auf. Darüber hinaus bilden sie eine eher strukturell heterogene Verbindungsklasse. Abb. 3 stellt die strukturelle Vielfalt der neun phenolischen Xenoestrogene in einer Übersicht dar.

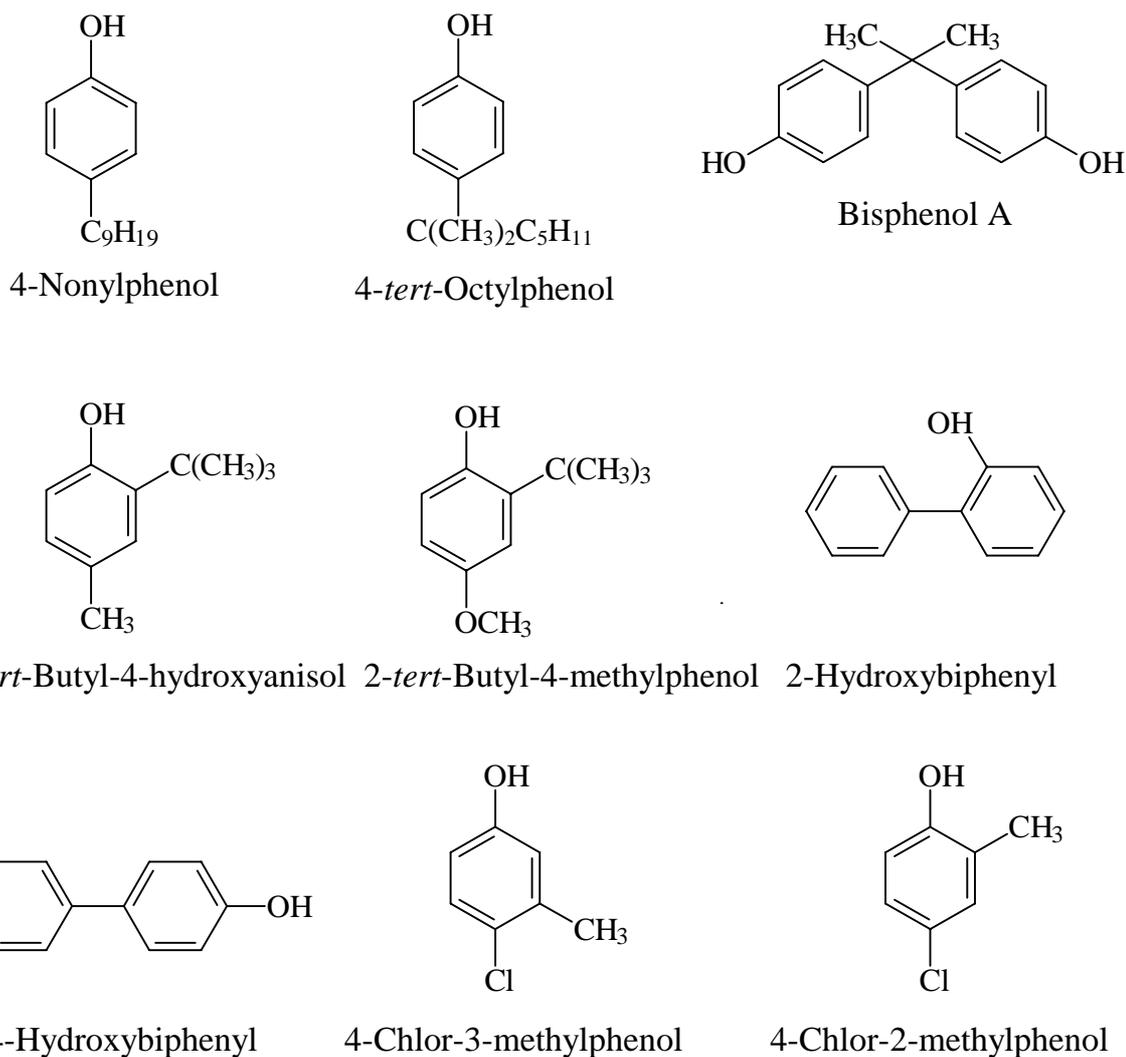


Abb. 3: Übersicht über die strukturelle Vielfalt der neun phenolischen Xenoestrogene.

Diese Verbindungen umfassen in *para*-Stellung alkylierte Phenole (4-Nonylphenol und 4-*tert*-Octylphenol), einfach hydroxylierte Biphenyle (4-Hydroxybiphenyl und 2-Hydroxybiphenyl), zwei *p*-Chlorkresole, das Diphenylmethanderivat Bisphenol A, das butylierte *p*-Hydroxyanisole und ein in *ortho*- und *para*-Position alkyliertes Phenol (2-*tert*-Butyl-4-methylphenol). Diese strukturelle Variation ließ bereits im Vorfeld der

Methodenentwicklung größere Unterschiede bei der Polarität vermuten. Die einzelnen Substanzen könnten sich z.B. hinsichtlich der Adsorptionsstärke auf Sorbentien oder beim Ausschütteln in wässrige NaOH-Lösung unterschiedlich verhalten. Dadurch könnten sich Schwierigkeiten bei der Entwicklung einer gemeinsamen Aufreinigung ergeben.

4.1 HRGC/LRMS

Zur Analytik von leicht flüchtigen Verbindungen wie Phenolen eignet sich die GC/MS in besonderem Maß. Die phenolischen Xenoestrogene weisen einen relativ hohen Dampfdruck auf und konnten folglich underivatisiert unter den üblichen gaschromatographischen Bedingungen im Inlet verdampft und auf der Säule getrennt werden. In der Literatur ist der Einsatz dieser Gerätekombination im großen Umfang zum Nachweis der einzelnen zu untersuchenden phenolischen Xenoestrogene beschrieben: *p*-Nonylphenol (Giger et al. 1981, Stephanou und Giger 1982, Wahlberg et al. 1990, Jobst 1995, De Voogt et al. 1997, Bennie et al. 1997, Bennett und Metcalfe 1997), 4-*tert*-Octylphenol (Bennie et al. 1997, Bennett und Metcalfe 1997), Bisphenol A (Masumoto et al. 1977, Hendriks et al. 1994, Del Olmo M. et al. 1997, Biles et al. 1997, Yamamoto und Yasuhara 1999), *p*-Chlorkresole (Bao et al. 1996, Heberer und Stan 1997, Ternes et al. 1998), 2-Hydroxybiphenyl (Heberer und Stan 1997, Ternes et al. 1998) und 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol (Baily et al. 1981). Aufgrund der hohen Selektivität und Empfindlichkeit wird die GC/MS-Kopplung in der organischen Spurenanalytik immer mehr zur dominierenden Identifizierungs- und Bestimmungsmethode. Die Analytik der Alkylphenolpolyethoxylate und Alkylphenole, die in den achtziger Jahren ihren Anfang nahm, wird zunehmend mittels GC/MS durchgeführt (Thiele et al. 1997). Diese Substanzklasse wurde häufig durch High Performance Liquid Chromatography (HPLC) getrennt und durch Fluoreszenz (FD)- oder UV-Spektrometrie detektiert (Ahel und Giger 1985a, Ahel und Giger 1985b, Marcomini und Giger 1987, Scullion et al. 1996, Kreisselmeier und Dürbeck 1997). Für diese Substanzklasse und die anderen phenolischen Xenoestrogene sind in der Literatur neben HPLC/FD (Verhagen et al. 1987, Verhagen und Kleinjans 1989) noch andere Identifizierungs- und Bestimmungsmethoden beschrieben, wie z.B. PBLC/MS (Particle Beam Liquid Chromatography/Mass Spectrometry), GC/FID (Gas chromatography/ Flame Ionisation Detection), COC-GC/MS (Cool On Column-GC/MS), LC/EC (Liquid Chromatography/Electrochemistry): Clark et al. (1992), Knaak und Sullivan (1966), Markham et al. (1998), Cardellicchio et al. (1997).

4.1.1 Massenspektrometrische Identifizierung

Zur massenspektrometrischen Identifizierung wurde von jeder Substanz ein komplettes Massenspektrum (Scan-Modus) aufgenommen. Hierzu wurden die einzelnen Substanzen mit einer Konzentration von 100 µg/ml (1 µl Injektionsvolumen) injiziert. Charakteristische Molekül- und Fragmentionen mit definierter Masse (m/z) wurden zur quantitativen Analytik im SIM-Modus herangezogen.

Tab. 3: Registrierte m/z-Werte von phenolischen Xenoestrogenen. M/z-Werte von Molekülion und charakteristischen Fragmentionen sind jeweils angegeben. Das intensivste Ion (100 %) ist **fett** gekennzeichnet.

Substanz	m/z Molekülion	m/z charakteristische Ionen
4- <i>tert</i> -Octylphenol (4 <i>t</i> OP)	206	135 , 107
4-Nonylphenol (4NP)	220	149, 135* , 121, 107
Bisphenol A (BPA)	228	213 , 228
3- <i>tert</i> -Butyl-4-hydroxyanisol (3 <i>t</i> B4OHA)	180	165 , 137
2- <i>tert</i> -Butyl-4-methylphenol (2 <i>t</i> B4MP)	164	149 , 121
4-Hydroxybiphenyl (4OHBiP)	170	170 , 154
2-Hydroxybiphenyl (2OHBiP)	170	170 , 154
4-Chlor-3-methylphenol (4Cl3MP)	142, 144	142 , 144
4-Chlor-2-methylphenol (4Cl2MP)	142, 144	142 , 144

*vgl. Kapitel III.I 4.1.4

Von den im Massenspektrometer erzeugten charakteristischen Ionen (vgl. Tab. 3) ist bei beiden Hydroxybiphenylen und beiden *p*-Chlorkresolen jeweils das Molekülion (M⁺-Ion) das intensivste Ion. Molekülionen zeigen direkt das Molekulargewicht der untersuchten Verbindung an und eignen sich somit mit hoher Spezifität zu deren Identifikation (Seibl 1970) und Quantifizierung. Chlorierte Verbindungen weisen aufgrund des natürlichen Isotopenverhältnisses von ³⁵Cl und ³⁷Cl (3:1) charakteristische Isotopenverteilungsmuster auf. Bei einfach chlorierten Verbindungen wie 4-Chlor-2-methylphenol und 4-Chlor-3-methylphenol traten somit neben dem M⁺-Ion auch das (M+2)⁺-Ion mit einer Intensität von 33 % auf. Dieses Intensitätsverhältnis konnte während der quantitativen Analytik neben der Retentionszeit zur eindeutigen Identifizierung herangezogen werden.

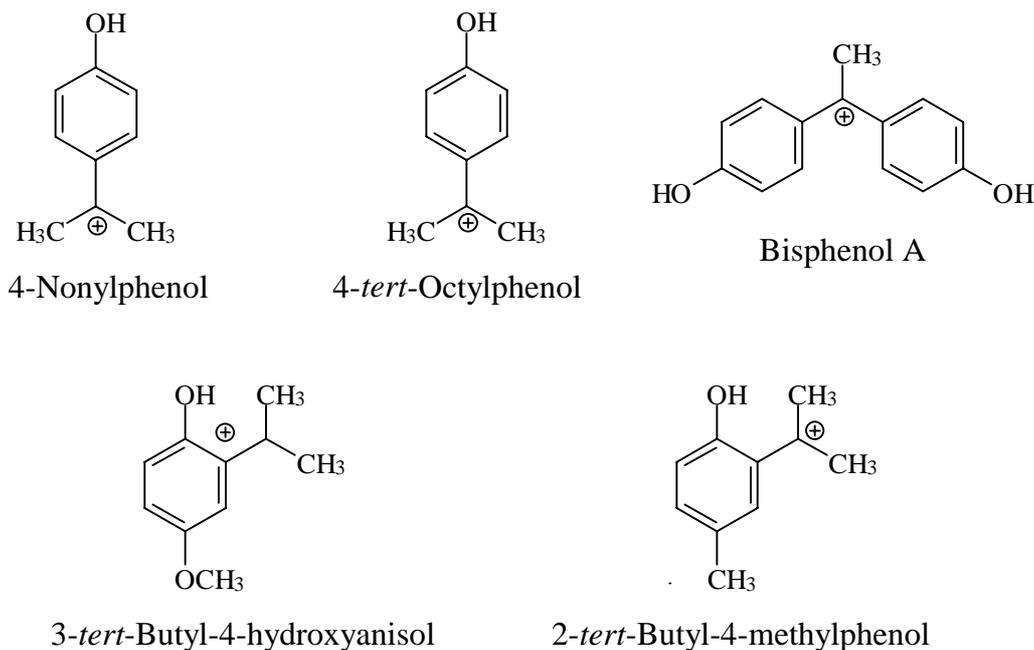


Abb. 4: Massenspektrometrisch erzeugte intensivste Fragmentionen einzelner phenolischer Xenoestrogene

Die anderen Verbindungen, insbesondere die *p*-Alkylphenole, 4-*tert*-Octylphenol und 4-Nonylphenol, weisen eine starke Fragmentierung auf, sodass das M^+ -Ion nicht zur quantitativen Analytik im SIM-Modus geeignet war. Ihr Nachweis im ppt-Bereich (ng/l bzw. $\mu\text{g}/\text{kg}$) wäre aufgrund mangelnder Empfindlichkeit unmöglich. Für die Detektion im SIM-Modus wurde das intensivste Fragmention (100 %) zur Quantifizierung gewählt und ein weiteres intensives Fragmention zur Absicherung der Identifikation eingesetzt (vgl. Tab. 3). Auf die Problematik bei der Auswahl eines geeigneten Fragmentions für 4-Nonylphenol, das in der Tab. 3 mit * markiert ist, wird unter III.I 4.1.4 detailliert eingegangen.

Die charakteristischen Zerfallsprodukte (100 % Intensität) der einzelnen Verbindungen sind in Abb. 4 wiedergegeben. Aus den entstandenen Fragmentionen wird deutlich, dass die Zerfallsreaktionen den bekannten Gesetzmäßigkeiten von Kationen und Radikalen folgen und es folglich bevorzugt zu einer Spaltung an tertiären C-Atomen in Alkylketten kommt.

4.1.2 Derivatisierung

Eine Derivatisierung der phenolischen Xenoestrogene war für die GC/MS-Bestimmung prinzipiell nicht notwendig (vgl. III.I 4.1.1). Durch Derivatisierung konnte aber eine effektivere gaschromatographische Trennung und eine sensitivere massenspektrometrische Detektion erreicht werden. Chalaux et al. (1994) und Lee und Peart

(1995) beschreiben einen sensitiveren und selektiveren GC/SIM-MS-Nachweis von 4-Nonylphenol in derivatisierter Form.

Phenole können auf verschiedenste Weise derivatisiert werden. Neben der gängigsten in der GC/MS-Analytik eingesetzten Derivatisierungsmethode, der Acetylierung (Coutts et al. 1979, Abrahamsson und Xie 1983, Lee et al. 1984b, Tschochner et al. 1989, Passivirta et al. 1990, Owens et al. 1994, Sellström und Jansson 1995, Palm und Lammi 1995, Tavendale et al. 1995, Lee und Peart 1995, Bennett und Metcalfe 1997, Bennie et al. 1997, Ternes et al. 1998), sind in der Literatur noch weitere Derivatisierungsverfahren beschrieben. Phenole können in Pentafluorbenzoylderivate bzw. -benzyl-derivate (Lee et al. 1984a, Wahlberg et al. 1990, Chalaux et al. 1994) und Silylether (Heberer und Stan 1997, Rudel et al. 1998) umgesetzt werden. Die Methylierung wurde bisher hauptsächlich bei Alkylphenoxyessigsäuren angewendet. Hierzu kamen verschiedene Reagenzien, wie Diazomethan (Reinhard et al. 1982), 10%ige BF_3 -Lösung in Methanol (Ahel et al. 1987), 1 N HCl-Lösung in Methanol (Ahel et al. 1987) oder Methyljodid (Field und Reed 1996) zum Einsatz. Im Arbeitskreis von Prof. Hagenmaier wurde bereits erfolgreich das Methylierungsreagenz Phenyltrimethylammoniumhydroxid (0,1 M methanolische Lösung) zur Derivatisierung von Chlorphenolen eingesetzt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zum einen wegen ihrer Gängigkeit die Acetylierung und zum anderen wegen der Erfahrung im Arbeitskreis die Methylierung mit dem bereits erwähnten Reagenz getestet. Die Acetylierung wurde wie unter IV.I 2.6.1.2 beschrieben durchgeführt. Die Methylierung erfolgte lediglich durch simples Versetzen der Referenzstandard-Lösung und später des Probenextraktes mit mindestens dem gleichen Volumen Methylierungsreagenz.

Entscheidend für die Einführung eines Derivatisierungsschrittes zur GC/MS-Analytik und für die Auswahl der geeigneten Methode waren folgende Aspekte:

- Effektivere gaschromatographische Trennung, vor allem der beiden *p*-Chlorkresole, die durch Variation des Ofentemperaturprogramms nicht erreicht werden konnte.
- Minimierung von Peak-, „Tailing“ z.B. bei Bisphenol A.
- Höhere Empfindlichkeit bei der massenspektrometrischen Detektion mit Hinblick auf tiefere Nachweisgrenzen.
- Stabiler linearer Bestimmungsbereich mit niedriger Bestimmungsgrenze
- Handling

Beide Derivatisierungsverfahren ergaben eine deutliche Empfindlichkeitssteigerung und eine effektivere gaschromatographische Trennung, die sich in einer Minimierung der Peak-Tailings und einer verbesserten Peaktrennung der beiden *p*-Chlorkresole äußerte. Die Methylierung stellte die geeignetere Derivatisierungsmethode dar. Ent-

scheidend war, dass ein wesentlich stabilerer linearer Bestimmungsbereich ermittelt werden konnte. Die gut reproduzierbare Linearität aller neun phenolischen Xenöstrogene erstreckte sich über einen weiten Konzentrationsbereich (vgl. I.III 4.2.3). Das Methylierungsreagenz bestach darüber hinaus durch eine besonders einfache Handhabung. Im Gegensatz zur Acetylierung, die zwei Ausschüttelschritte beinhaltet, konnte bei der Methylierung praktisch kein Substanzverlust stattfinden.

Die Retentionszeiten sowohl der Methylether als auch der Acetate erhöhten sich bei der gaschromatographischen Trennung gegenüber denen der freien Phenole. Bei der massenspektrometrischen Detektion der Methylether und der Acetate ergaben sich folgende Unterschiede: Die Molekülonen der Methylether erhöhten sich um $m/z = 14$ bzw. um $m/z = 28$ (Bisphenol A) und die der Acetate um $m/z = 42$ bzw. um $m/z = 82$. Das Molekölion der Acetate wurde nur mit sehr geringer Intensität registriert, da die Acetate sofort nach Elektronenstoßionisation in die freien Phenole zerfielen. Die intensivsten Fragmente der Acetate und der freien Phenole waren sehr ähnlich. Lee und Peart (1995) beschreiben ebenfalls eine sehr große Ähnlichkeit der Massenspektren bzw. der intensivsten Fragmente des 4-Nonylphenolacetats und des freien Phenols. Methylether stellen im Gegensatz zu Acetaten sehr stabile Verbindungen dar. Die Alkylphenol-, Bisphenol A-, 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol- und 2-*tert*-Butyl-4-methylphenolmethylether fragmentierten also zuerst an den Alkylseitenketten. Für ihre charakteristischen Fragmente ergab sich eine Massenerhöhung um $m/z = 14$ bzw. 28. Die Stabilität der Methylether wurde auch bei den Hydroxybiphenylen und den *p*-Chlorkresolen deutlich, ihre Molekülonen waren wie die der freien Phenole am intensivsten. Nach Abspaltung der phenolischen Methylgruppe dieser Verbindungen entstanden weitere charakteristische Fragmentationen $(M - 14)^+$. Zur Detektion der Hydroxybiphenyle im SIM-Modus wurden neben den Molekülonen diese $(M - 14)^+$ -Fragmente aufgenommen. Die Responsefaktoren der $(M - 14)^+$ -Fragmente waren über den ermittelten linearen Bestimmungsbereich konstanter als die der Molekülonen (geringere Standardabweichungen bei der Qualitätskontrolle, vgl. III.I 4.2.3). Aufgrund dieser kleinen Besonderheit erfolgte die Quantifizierung der Hydroxybiphenyle über das Fragmention $(M - 14)^+$ und nicht wie bei allen anderen Substanzen über das intensivste Ion. In Tab. 4 (s. unter III.I 4.1.3) sind die Molekül- und Fragmentationen, die zur quantitativen Analytik im SIM-Modus detektiert wurden, zusammengefasst.

Die Methylierung wurde ohne Temperaturbehandlung durchgeführt. In drei unabhängigen Experimenten wurde die Linearität innerhalb des Quantifizierungsbereiches vor und nach einer Temperaturbehandlung bei 50 °C (10 min) miteinander verglichen. Nach der Temperaturbehandlung konnte keine verbesserte Linearität der Response-

faktoren festgestellt werden, vielmehr waren die Standardabweichungen der Responsefaktoren größer als vor der Temperaturbehandlung (vgl. III.I 4.2.3).

4.1.3 Gaschromatographische Trennung

Die gaschromatographische Trennung der neun phenolischen Xenoestrogene und des internen Quantifizierungsstandards erfolgte nach den unter IX.I 2.6.2 beschriebenen Bedingungen. Aufgrund unterschiedlicher Polaritäten und Dampfdrücke der einzelnen Substanzen wurde ihre Auftrennung temperaturprogrammiert durchgeführt. Durch die optimierte temperaturprogrammierte Trennung bei konstantem Heliumfluss ergab sich für eine GC/MS-Analyse eine Gesamtlaufzeit von 24,29 min. Diese kurze Analysenzeit ermöglichte einen hohen Durchsatz an Proben.

Die Substanzen wurden über eine heiße splitlose Injektionstechnik auf die Säule aufgebracht. Der Injektionsheizblock wurde ebenfalls temperaturprogrammiert betrieben. Dadurch sollten Memory-Effekte aufgrund unvollständig verdampfter Substanzen minimiert werden. Allgemein liegt der Vorteil der Splitless-Injektion darin, dass schwerflüchtige Verunreinigungen des Probenextraktes die Säule nicht belasten und im Inlet verbleiben. Dadurch kann die Lebensdauer der Säule verlängert werden. Nachteile dieser Injektionsart für die quantitative Analytik können Diskriminierungen höher siedender Substanzen und Artefaktbildung bzw. Polymerabbau (Markham et al. 1998) sein. Diskriminierungen höher siedender Substanzen spielten bei der gemeinsamen Analytik der neun phenolischen Xenoestrogene keine Rolle, da zum einen alle neun Verbindungen niedere Siedepunkte aufwiesen und zum anderen ihre Responsefaktoren extern ermittelt wurden. Markham et al. (1998) berichteten bei der Analytik von Bisphenol A, dass es bei der heißen Splitless-Injektionstechnik zum Abbau von Polymeren zum freien Bisphenol A kommt. Dies könnte zu verfälschten Ergebnissen führen, wenn lediglich das freie Bisphenol A in der Probe bestimmt werden sollte. Allerdings wurden die Abbaureaktionen bei einer Injektionstemperatur von 310 °C beobachtet, während die Temperatur im Injektionsblock bei dieser Arbeit nur 240 °C betrug.

Das Totalionenchromatogramm (TIC) eines methylierten Arbeitsstandards nach Zugabe des Quantifizierungsstandards zeigt die Elutionsfolge der einzelnen phenolischen Xenoestrogene bei ihrer gaschromatographischen Trennung (vgl. Abb. 5). Die Peaks sind den einzelnen Komponenten (vgl. Nummerierung in Tab. 4) und dem internen Quantifizierungsstandard zugeordnet.

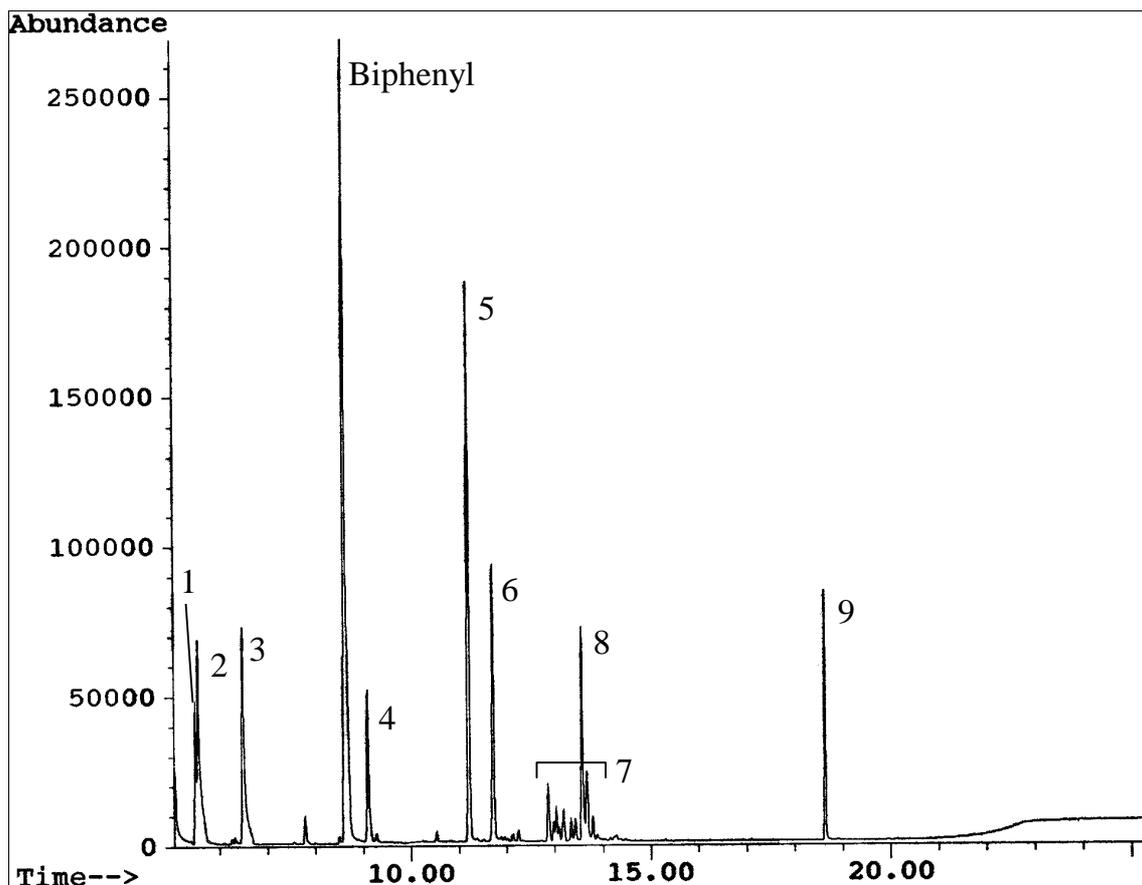


Abb. 5: TIC der methylierten phenolischen Xenoestrogene und des internen Standards Biphenyl (SIM-Modus).

Die Elutionsfolge auf der unpolaren DB XLB-Säule wurde durch die Polarität der einzelnen Substanzen bestimmt: Nach ca. 5 min eluierten bereits die beiden Chlorphenole, die durch *para*-substituiertes Chlor einen ausgeprägten negativen Induktionseffekt aufweisen und somit ihre Ladung stark polarisieren. Die beiden Isomere, die sich nur in der Position ihrer Methylsubstitution (*ortho* bzw. *meta*) unterscheiden, eluierten direkt nacheinander. Die Auflösung der beiden Peaks ist deutlich besser als „brauchbar aufgelöst“ (Seibl 1970). Der Intensitätenbeitrag des Peaks von 4-Chlor-2-methylphenol zum Peak von 4-Chlor-3-methylphenol betrug nicht mehr als 20 %. Die Methylether der anderen phenolischen Xenoestrogene eluierten nach und nach mit Zunahme des lipophilen Strukturanteils (vgl. Abb. 5 und Tab. 4). Im Gegensatz zu den Chlorphenol-Isomeren wurden die Isomere der beiden Hydroxybiphenyle in einem Abstand von ca. 2 min detektiert.

In Tab. 4 sind die Retentionszeiten, die von Messung zu Messung in Abhängigkeit von der exakten Säulenlänge und der einzelnen Probe variierten, aufgeführt. Die Tabelle wird durch Angabe der im SIM-Modus in zwei Zeitfenstern registrierten Molekül- und Fragmentationen vervollständigt.

Tab. 4: Auflistung der phenolischen Xenoestrogene nach steigender Retentionszeit. Das Molekülion der Methylether und die im SIM-Modus in 2 Zeitfenstern registrierten charakteristischen Ionen sind angegeben. Das Quantifizierungsion, das mit Ausnahme von 2- bzw. 4-Hydroxybiphenyl (vgl. Text III.I 4.1.2) das intensivste Ion ist, ist **fett** gekennzeichnet.

Zeitfenster (SIM-Modus)	Substanz	Retentionszeit [min]	Molekülion m/z	registrierte Ionen m/z
1	(1) 4-Chlor-2-methylphenol	5,50	142, 144	142 , 144
	(2) 4-Chlor-3-methylphenol	5,56	142, 144	142 , 144
	(3) 2- <i>tert</i> -Butyl-4-methylphenol	6,48	178	163 , 135
	(4) 3- <i>tert</i> -Butyl-4-hydroxyanisol	9,10	194	179 , 151
2	(5) 4- <i>tert</i> -Octylphenol	11,21	220	149 , 121
	(6) 2-Hydroxybiphenyl	11,71	184	184, 169 , 168
	(7) 4-Nonylphenol*	12,86/13,67	234	149 , 121
	(8) 4-Hydroxybiphenyl	13,57	184	184, 169 , 168
	(9) Bisphenol A	18,64	256	256, 241 ,

*4-Nonylphenol-Isomere: Retentionszeiten von Peak 2 und 10.

Das TIC und die Retentionszeiten (vgl. Abb. 5 und Tab. 4) zeigen deutlich, dass die 4-Nonylphenol-Isomere und 2-Hydroxybiphenyl zur gleichen Zeit eluierten. Bei der massenspektrometrischen Detektion im SIM-Modus kam es bei keiner der Massenspuren zu einer Überlagerung der registrierten Ionen. Demnach war eine fehlerfreie Quantifizierung möglich.

4.1.4 4-Nonylphenol

Technisches 4-Nonylphenol besteht aus einem Gemisch an *p*-Isomeren mit verschiedenen Verzweigungen an der Nonylseitenkette. Folglich zeigte sich im TIC des Scan-Laufes sowohl der underivatisierten als auch der methylierten Referenzsubstanz (technisches Gemisch mit 85 % *p*-Isomeren) ein komplexes Muster verschiedener Peaks. Abb. 6 zeigt das TIC der methylierten Substanz. Unter den bereits genannten gaschromatographischen Bedingungen konnten auf der 15 m DB XLB-Säule 12 Peaks aufgelöst werden.

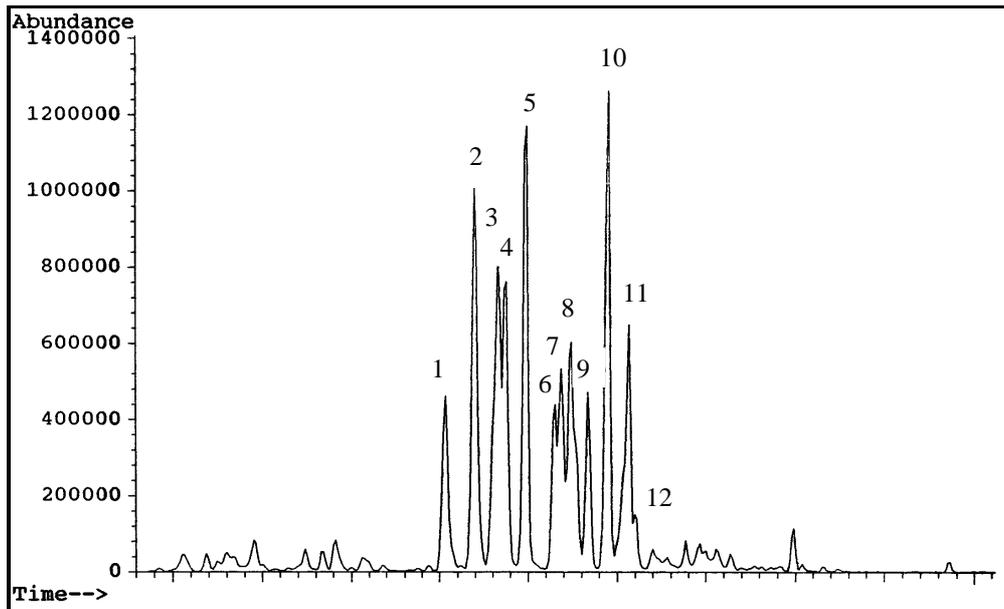


Abb. 6: TIC (Scan-Modus) des methylierten 4-Nonylphenols. Die einzelnen getrennten Isomere sind nummeriert.

Günther et al. (Publikation in Vorbereitung) verwendeten Normalphasen-HPLC offline-gekoppelt an GC/SIM-MS zur Bestimmung von 4-Nonylphenol im Ultra-spurenbereich in biologischen Proben und konnten auf diese Weise 16 Peaks trennen. Wheeler et al. (1997) konnten mittels HRGC/EI-MS auf einer 100 m Kapillarsäule (Petrocol DH, 100 m x 0,25 mm, 0,5 μm Filmdicke) sogar 22 Peaks trennen. Üblicherweise können nach Wheeler et al. (1997) in der Routine-Gaschromatographie 8 bis 12 Peaks getrennt werden.

Die Massenspektren der Methyl-derivate der einzelnen Isomere zeigten unterschiedliche Fragmentierungen, die auf die verschiedenen Verzweigungen in der Nonylseitenkette zurückzuführen sind. Die einzelnen Peaks wiesen jeweils das gleiche Moleküllion von $m/z = 234$ auf. Wenn man die einzelnen Massenspektren genauer betrachtet, können die Isomere des *p*-Nonylphenols in Gruppen eingeteilt werden (vgl. Abb. 7). Die Massenspektren von Peak 1 und 3 können keiner der in Abb. 7 aufgeführten Gruppe zugeteilt werden. Die durch Abspaltung entstandenen Massenfragmente können Hinweise auf die Strukturen in der Alkylseitenkette der einzelnen Isomere geben. Die Massenspektren der Peaks 2, 6, 10 und 12 (Abb. 7 A) zeigten ein nahezu identisches Massenspektrum mit einem deutlichen Basispeak $m/z = 149$, der auf eine α,α -Dimethyl-Struktur hinweist. Die in Abb. 7 C zusammengefassten Isomere deuten auf eine α -Methyl-Struktur und die in Abb. 7 D zusammengefassten Isomere auf eine α -Methyl- β -methyl-Struktur hin. Abbildungen der Massenspektren von Peak 1 und 3 sind nicht aufgeführt. Peak 3 mit einem Basispeak von $m/z = 163$ und charakteristischen Fragmentationen $m/z = 121, 135, 205$ läßt eine α -Methyl- α -ethyl-Struktur

vermuten. Das Massenspektrum von Peak 1 mit Fragmenten $m/z = 135$ (Basispeak), 121, 177, 191 deutet auf eine α -Methyl- α -propyl-Struktur in der Alkylseitenkette. Den Isomeren Peak 4 und 5 konnte auch nach Vergleich mit bereits publizierten Massenspektren der freien und acetylierten Isomere (Bhatt et al. 1992, Lee und Peart 1995, Weehler et al. 1997) keine eindeutige Struktur zugewiesen werden. Die Überlagerung einzelner Isomere durch eine unvollständige gaschromatographische Trennung kann sich auch in den Massenspektren zeigen und die Strukturzuordnung erschweren.

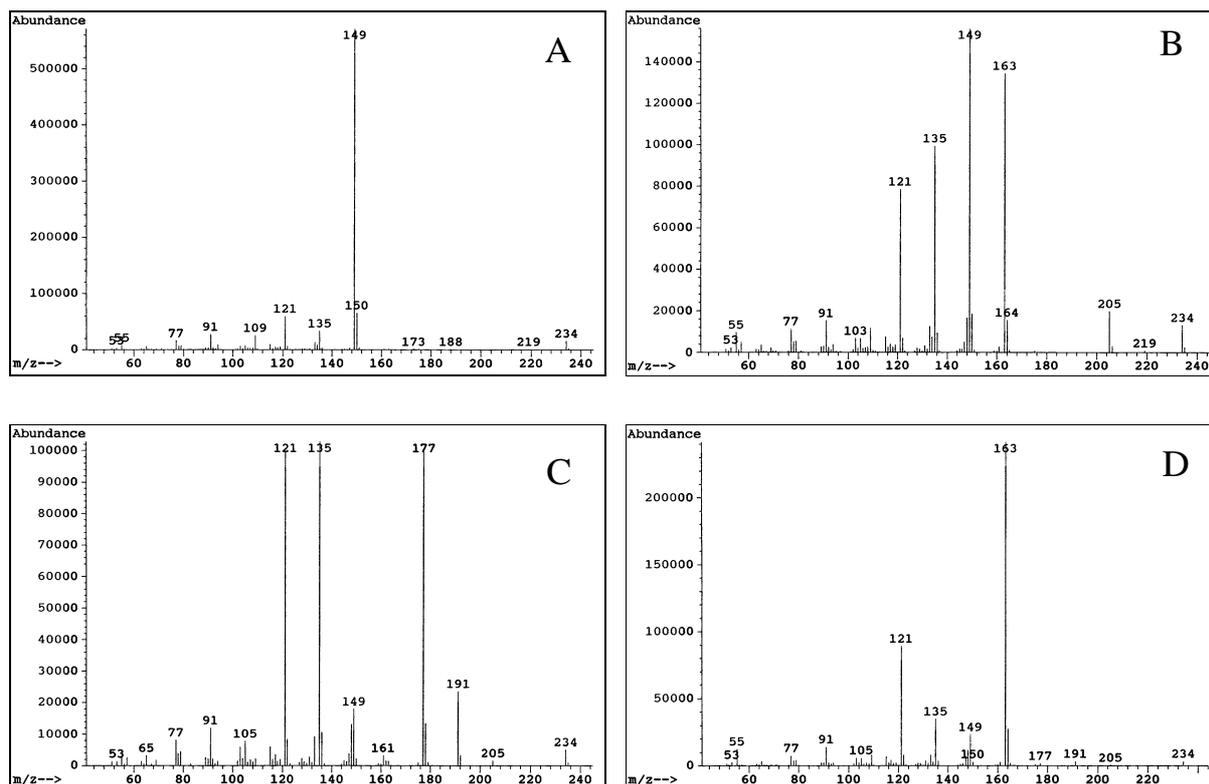


Abb. 7: Massenspektren der Methylether verschiedener 4-Nonylphenol-Isomere. (A) Massenspektrum von Peak 2 (Peak 6, 10 und 12 ergaben sehr ähnliche Massenspektren) (B) Massenspektrum von Peak 4 (ähnliches Massenspektrum von Peak 5). (C) Massenspektrum von Peak 7 (ähnliches Massenspektrum von Peak 9). (D) Massenspektrum von Peak 8 (sehr ähnliches Spektrum ergab Peak 11).

Eine Gruppeneinteilung der getrennten Isomere wurde bereits von Lee und Peart (1995) für die 4-Nonylphenolacetyl-derivate und von Weehler et al. (1997) für das freie 4-Nonylphenol vorgenommen. Vergleicht man die den einzelnen Isomeren zugeordneten Massenspektren, so ist festzustellen, dass sich die Reihenfolgen der Methyl- und Acetyl-derivate bzw. der freien Phenole teilweise unterscheiden. Die unterschiedlichen Säulen bzw. Säulenlängen, die zur gaschromatographischen Trennung der Isomere eingesetzt wurden, und der Vergleich der beiden derivatisierten und der freien Formen,

sind für die unterschiedlichen Elutionsfolgen der *p*-Nonylphenol-Isomere verantwortlich.

Die vollständige Identifizierung der einzelnen *p*-Nonylphenol-Isomere ist bisher noch nicht möglich, da die reinen Standardsubstanzen gegenwärtig nicht verfügbar sind (Thiele et al. 1997). Bhatt et al. (1992) charakterisierten nach Messung mit GC/FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrometry) und Vergleich mit einer Spektrenbibliothek 14 Isomere. Zur einfachen und zuverlässigen Quantifizierung von 4-Nonylphenol erfolgte die Bestimmung der Summe aller Isomere im Rahmen dieser Arbeit durch Vergleich der Peakhöhe von zwei Hauptpeaks im technischen Gemisch (Bolz et al. 1999, Bolz et al. 2000). Folgt man der numerischen Ordnung von 16 getrennten Peaks von Thiele et al. 1997, wurde über Peak 3 und Peak 15 mit $m/z = 149$, äquivalent zu $m/z = 135$ des underivatisierten 4-Nonylphenol, quantifiziert. In Abb. 6 sind die beiden zur Quantifizierung betrachteten Peaks den Isomeren 2 und 10 zuzuordnen (vgl. auch Abb. 8).

Abb. 8 zeigt charakteristische Massenspuren des methylierten 4-Nonylphenols. Die Massenspur $m/z = 149$ wurde aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit zur Quantifizierung ausgewählt. Wheeler et al. (1997) berechneten die prozentuale Verteilung für die einzelnen Strukturtypen der Alkylseitenketten des *p*-Nonylphenol. Die 4-Nonylphenol-Isomere mit einer α,α -Dimethyl-Struktur, die als Methylether das Basision $m/z = 149$ zeigen, wurden mit 48,6 % als häufigster Strukturtyp ermittelt. Die in Abb. 8 detektierten Intensitäten der einzelnen Massenspuren bestätigen die von Wheeler et al. (1997) ermittelte Verteilung.

In der Literatur wurde die GC/MS-Bestimmung von 4-Nonylphenol hauptsächlich durch Integration der Peakflächen über den entsprechenden Retentionszeitbereich des Referenzstandards durchgeführt (Stephanou und Giger 1982, Lee und Peart 1995, Rudel et al. 1998, Bennett und Metcalf 1998). Die Quantifizierung über einzelne getrennte Peaks, wie in dieser Arbeit, reduziert das Risiko, koeluiierende Substanzen mitzubestimmen. Abb. 9 zeigt die $m/z = 149$ -Spur einer Kläranlagenzulaufprobe im Vergleich zu der des Referenzstandards des techn. 4-Nonylphenols. Durch Integration über den Retentionsbereich von 12,44 bis 13,36 min würde der markierte unbekannte Peak mit in die Quantifizierung einbezogen werden. Dies würde die Konzentration fälschlicherweise um über 140 % erhöhen.

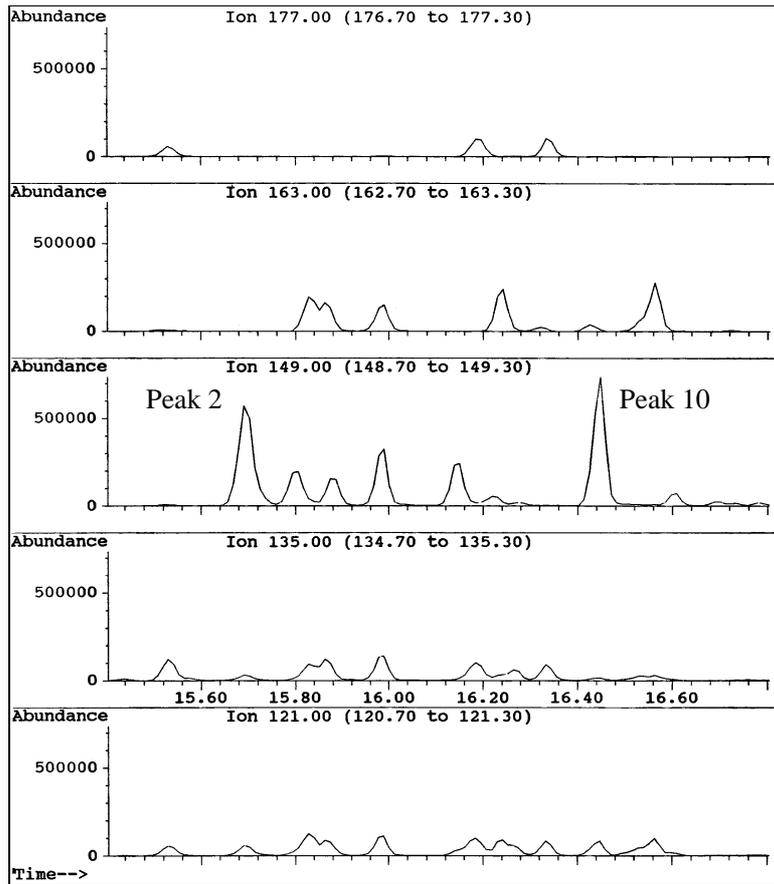


Abb. 8: Charakteristische Massenspuren von methyliertem 4-Nonylphenol im Scan-Modus aufgenommen.

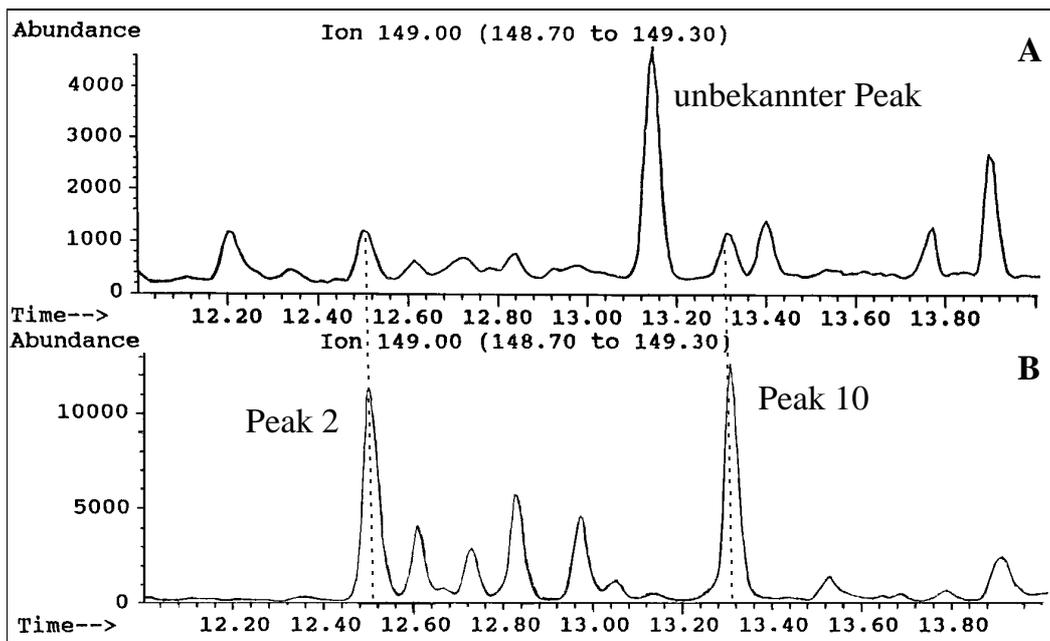


Abb. 9: Vergleich der SIM-Spur $m/z = 149$ einer Kläranlagenzulaufprobe (A) und des Referenzstandards techn. 4-Nonylphenol (B).

4.2 Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

4.2.1 Quantifizierung

Die Quantifizierung erfolgte, wie bereits unter III.I 2.3 erwähnt, aufgrund fehlender isotope markierter Standards über eine interne Quantifizierung unter externer Bestimmung der Responsefaktoren. Sowohl den Referenzstandardlösungen und den Probenextrakten wurde die interne Standardsubstanz zugesetzt (vgl. IV IV.I 2.6.1.1). Bei der Quantifizierung wurden die Peakhöhen der intensivsten Molekül- und Fragmentionen der phenolischen Xenoestrogene (vgl. III III.I 4.1.3 Tab. 4) auf die Peakhöhe des Molekülions des internen Standards bezogen. Diese Vorgehensweise kommt einem Abgleich auf diese Substanz gleich. Dadurch wurden Empfindlichkeitsschwankungen innerhalb verschiedener GC/MS-Läufe ausgeglichen bzw. herausgerechnet. Die Schwankungen traten oftmals bereits innerhalb einer Messsequenz auf.

Wichtig beim Zusatz des internen Standards war, dass jeder Probe exakt die gleiche Menge zugesetzt wurde. Während der Methodenentwicklung wurde festgestellt, dass nur eine der beiden „Konzentrationsvariablen“ variiert werden konnte. Wurde mit abnehmender Konzentration ebenfalls in gleichem Maß die Konzentration des internen Standards reduziert, ergaben sich bei der Berechnung der Responsefaktoren über den Konzentrationsbereich große Abweichungen.

Die genaue rechnerische Vorgehensweise bei der Quantifizierung ist detailliert unter IV.I 2.6.3 beschrieben. Hierbei sei nochmals auf die intensive Qualitätskontrolle bei der Responsefaktorbestimmung hingewiesen, die bei jeder Probensequenz durchgeführt wurde. Der Responsefaktor wurde nicht aus einer einzigen Referenzstandardverdünnung berechnet, sondern aus dem Mittelwert der fünf Arbeitsstandards 1:10 bis 1:5000. Die Linearität wurde durch Berechnung der zugehörigen Standardabweichung verifiziert.

4.2.2 Interner Standard

Biphenyl wurde als interner Standard zur Quantifizierung aufgrund seines ähnlichen gaschromatographischen Trennverhaltens mit einer Retentionszeit zwischen 7 und 7,5 min ausgewählt. Die Detektion eines intensiven Peaks des Molekülions nach Elektronenstoßionisierung ermöglichte die problemlose Quantifizierung der neun phenolischen Xenoestrogene. Aufgrund der fehlenden phenolischen Hydroxylgruppe war bei der Methylierung keine chemische Reaktion zu erwarten.

Da Biphenyl als Fungizid und Insektizid (Wilke 1997) eingesetzt wird, ist mit einem Vorkommen in der aquatischen Umwelt zu rechnen. Um eine richtige Analyse von

realen Proben zu garantieren, musste die Abwesenheit dieser Verbindung in der Probe überprüft werden. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde deshalb bei der Analytik von realen Proben auf D₁₀-Biphenyl ausgewichen.

Im SIM-Modus wurde für Biphenyl $m/z = 154$ zur Quantifizierung und zur Bestätigung $m/z = 152$ detektiert. Bei D₁₀-Biphenyl erhöhten sich die Massen um jeweils $m/z = 10$.

4.2.3 Quantifizierungsbereich, Bestimmungs- und Nachweisgrenzen

Der lineare Bereich, innerhalb dessen die Quantifizierung fehlerfrei erfolgen konnte, sowie die dazugehörigen Bestimmungs- und Nachweisgrenzen wurden für jede Komponente der neun phenolischen Xenoestrogene separat ermittelt. In der Analytik wird üblicherweise die Nachweisgrenze über das Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 bestimmt. Auf dieselbe Art und Weise wurde in dieser Arbeit vorgegangen. In der Regel repräsentieren die Bestimmungsgrenzen ein Signal/Rausch-Verhältnis von 6:1. In dieser Arbeit wurden die Bestimmungsgrenzen jedoch experimentell durch Analytik der Arbeitsstandards 1:10 bis 1:10000 (5 ng - 5 pg absolut) und der daraus berechneten individuellen Responsefaktoren ermittelt. Die in Tab. 5 angegebenen instrumentellen Nachweis- und unteren Bestimmungsgrenzen sind in absoluter (Injektions-)menge angegeben.

Die absoluten Nachweisgrenzen lagen bei 5 pg und darunter. Die unteren Bestimmungsgrenzen lagen zwischen 5 und 20 pg. Neben dem analysierten Injektionsvolumen, das generell bei dieser Arbeit bei 1 µl lag (vgl. III.I 2.2), ist die Empfindlichkeit auf messtechnischer Seite ausschlaggebend für die Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Deshalb wurde vor jeder Sequenz der Zustand des Gerätes und die Trennleistung der Säule überprüft. Sofern die Empfindlichkeit des Detektors nachließ, wurde die Ionenquelle des MSD gereinigt oder Verschleißteile (z.B. Filamente) ausgetauscht. Bei nachlassender Trennleistung konnte es hilfreich sein, inletseitig ca. 20 cm der Säule abzuschneiden.

Der lineare Quantifizierungsbereich wurde über die Responsefaktoren ermittelt, die aus der Messung der Referenzstandards (absoluter Konzentrationsbereich zwischen 5 pg und 5 ng) resultierten. Der Responsefaktor einer Substanz ist idealerweise innerhalb des linearen Bestimmungsbereiches konstant. In dieser Arbeit wurden relative Standardabweichungen der Mittelwerts-Responsefaktoren bis zu 30 % akzeptiert. Bei Dreifachbestimmung der einzelnen Konzentrationen sanken die relativen Standardabweichungen sogar unter 15 %. Der ermittelte lineare Quantifizierungsbereich lag für die neun phenolischen Xenoestrogene innerhalb von 5 pg bis 5 ng. Zur graphischen

Darstellung der Linearität wurden die gemessenen Abundanzen der Peaks auf die des internen Standards abgeglichen und gegen die absolute Konzentration aufgetragen. Es wurde eine doppeltlogarithmische Skalierung gewählt, um den gesamten Quantifizierungsbereich übersichtlich in einer Graphik darzustellen. In Abb. 10 ist die Linearität über den Konzentrationsbereich von 10 pg bis 5 ng dargestellt, der üblicherweise in dieser Arbeit bei der Analyse von realen Proben durch Vermessen der Arbeitsreferenzstandardlösungen von 1:10 bis 1:5000 erhalten wurde. Die relativen Standardabweichungen der Responsefaktoren lagen bei dieser Messung für alle neun Komponenten unter 18 %. Die Qualität der Kalibrierung konnte zusätzlich über die Korrelationskoeffizienten aus der Kalibriergeraden ermittelt werden. In Tab. 5 sind die Korrelationskoeffizienten aufgeführt, die zwischen 0,9995 und 1 lagen.

Tab. 5: Die instrumentelle Nachweis- und untere Bestimmungsgrenze der neun phenolischen Xenoestrogene sowie die Korrelationskoeffizienten aus den Kalibriergeraden der Abb. 10.

Substanz	Nachweisgrenze [pg absolut]	untere Bestimmungsgrenze [pg absolut]	Korrelationskoeffizient R^2
4- <i>tert</i> -Octylphenol	< 4.5	9.1	1
4-Nonylphenol*	5.1	10.2	0,9999/1
Bisphenol A	< 4.7	20.4	1
3- <i>tert</i> -Butyl-4-hydroxyanisol	4.7	9.4	1
2- <i>tert</i> -Butyl-4-methylphenol	4.7	9.4	1
4-Hydroxybiphenyl	< 4.6	9.3	1
2-Hydroxybiphenyl	< 4.7	9.5	0,9995
4-Chlor-3-methylphenol	< 5.0	5.0	1
4-Chlor-2-methylphenol	< 5.2	5.2	0,9999

*4-Nonylphenol-Isomere über Peak 2 und 10 ermittelt.

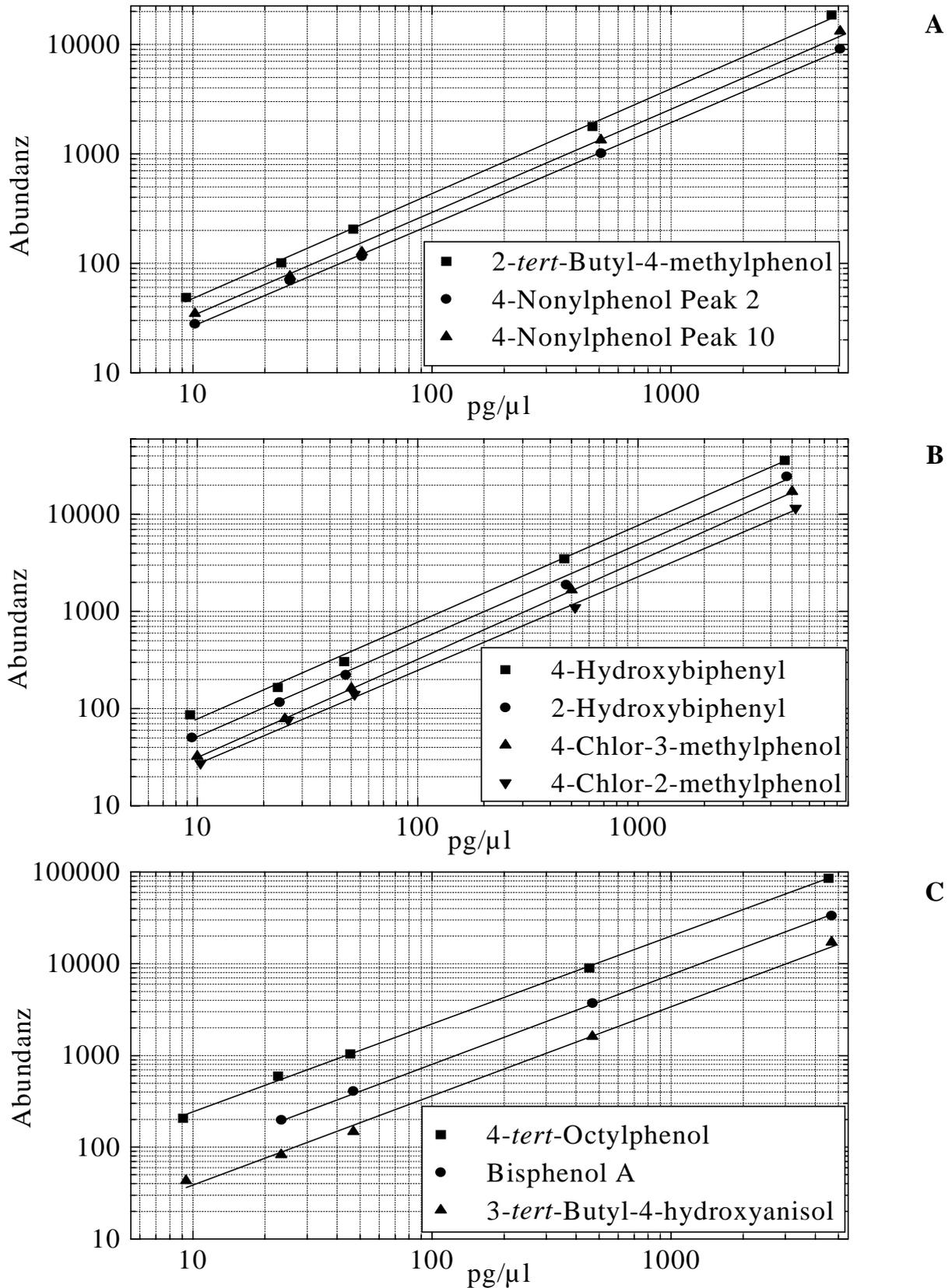


Abb. 10: Diagramme A - C zeigen die Linearität der neun phenolischen Xenoestrogene innerhalb des Konzentrationsbereiches 10 pg - 5 ng (absolut). Die Werte wurden in einer doppeltlogarithmischen Skalierung aufgetragen.

4.3 Wässrige Proben

4.3.1 Extraktionstechniken

Die Extraktionstechniken, die im Rahmen der Methodenentwicklung zur Bestimmung der phenolischen Xenooestrogene in wässrigen Proben getestet wurden, basieren auf dem Flüssig-flüssig- und dem Flüssig-fest-Verteilungsprinzip (vgl. III.I 2.1). Als Testmatrix wurde demineralisiertes Wasser verwendet, das mit den phenolischen Komponenten dotiert wurde.

Flüssig-flüssig-Extraktion

Die beiden Flüssig-flüssig-Extraktionstechniken, Ausschütteln im Scheidetrichter und Mikroseparation, wurden in Anlehnung an verschiedene Verfahren zur Extraktion von einwertigen Phenolen bzw. Chlorphenolen (DEV 1996, DIN 1990, DIN 1997, Tschochner et al. 1989, Brunner 1990) wie unter IX.I 2.4.1 beschrieben, konzipiert. Vorteil des Mikroseparationsverfahrens im Vergleich zum Ausschütteln war, dass geringe Lösungsmittelmengen benötigt wurden (5 bis 10 ml) und somit Arbeitsschritte wie mehrfaches Umfüllen oder Einengen im Rotationsverdampfer wegfielen. Allerdings war bei der Mikroseparation entscheidend, dass das Extraktionsmittel auch bei einem geringen Volumen von 5 ml nicht mit 1 l Wasser mischbar sein sollte. Diese Forderung grenzte die Auswahl des Extraktionsmittels und somit den Polaritätsbereich stark ein. Es wurden verschiedene Extraktionsmittel, unter anderem *n*-Heptan, eine Mischung aus *n*-Heptan und Dichlormethan (1:1), Cyclohexan und eine Mischung aus Toluol und Cyclohexan (1:1) getestet. Die Extraktion mit Toluol und Cyclohexan im Verhältnis 1:1 erbrachte die besten Ergebnisse, allerdings waren die Wiederfindungsraten nicht für alle neun Substanzen befriedigend.

Das Ausschütteln im Schütteltrichter mit anschließender Acetylierung wurde aufgrund des aufwendigen Vorgehens und vor allem wegen mangelnder Reproduzierbarkeit sowohl der Wiederfindungsraten als auch des linearen Quantifizierungsbereiches der Acetate (vgl. III.I 4.1.2) nicht weiter verfolgt.

Flüssig-fest-Extraktion (Festphasenextraktion)

Die Flüssig-fest-Extraktion, die auch als Festphasenextraktion (engl.: Solid Phase Extraction (SPE)) bezeichnet wird, stellte eine sehr gute Alternative zur Flüssig-flüssig-Extraktion dar. Bei der SPE werden die zu extrahierenden Komponenten auf speziellen Adsorbentien angereichert und anschließend mit einem Lösungsmittel eluiert. Durch Auswahl des Adsorbens (Festphasenmaterial) und eines geeigneten Elutionsmittels ist neben der Extraktion eine Abtrennung von Matrixbestandteilen

möglich. Eine Vielfalt an chemisch modifizierten Silicaphasen (z.B. Reversed Phase mit *n*-Alkyl-, Cyanopropyl-, Phenylgruppen etc.), die zur Extraktion eingesetzt werden können, decken einen breiten Polaritätsbereich ab. Weitere Vorteile bietet die SPE durch einen geringen Lösungsmittelverbrauch und vor allem durch eine einfache Handhabung, die die Extraktion von mehreren Proben (acht oder mehr) bei gleichem Arbeitsaufwand ermöglicht.

Die Festphasenextraktion ist eine sehr gängige Methode zur Anreicherung von Komponenten im Spurenbereich aus geringen Probenvolumina wie Blutseren, Urinproben etc.. Die SPE kommt zunehmend bei der Extraktion der einzelnen phenolischen Xenoestrogene aus Trink-, Fluss- und Abwasserproben zum Einsatz (Nielsen 1984, Chladek und Marano 1984, Marcomoni et al. 1987, Ventura et al. 1988, Marcomoni et al. 1990, Schlett und Pfeifer 1992, Marcomini et al. 1993, Di Corcia et al. 1994, Blackburn and Waldock 1995, Bao et al. 1996, Heberer und Stan 1997, De Voogt et al. 1997, Jahr 1998, Ternes et al. 1998). Bisher wurde jedoch kein SPE-Verfahren beschrieben, mit dem alle neun phenolischen Xenoestrogene gemeinsam angereichert werden konnten. Ziel bei der Entwicklung eines Festphasenextraktionsverfahrens war, ausreichende Wiederfindungsraten für alle neun Substanzen zu erreichen, auf die Anwendung von chlorierten Lösungsmitteln zu verzichten und die Extraktion einer sogenannten „Vollwasserprobe“ zu ermöglichen, d.h. die Schwebstoffe in einer Wasserprobe sollten vor der Extraktion nicht abgetrennt werden (s. III.I 4.3.5).

Auswahl des Adsorbens

Eine Styroldivinylbenzol-Copolymer-Festphase (Isolute ENV+, 200 mg) wurde als Adsorbens getestet. Sie wurde speziell zur Anreicherung von phenolischen Verbindungen entwickelt und zeichnet sich gegenüber der C18-Phase durch eine höhere Kapazität aus. Zum Vergleich wurden die Wiederfindungsraten der phenolischen Xenoestrogene auch unter Verwendung einer C18-Festphase (Isolute C18_{nec} reversed phase, 1 g) bestimmt. Die C18-Festphase ist die klassische Festphase, die im Allgemeinen zur Extraktion lipophiler Substanzen aus einem flüssigen Medium eingesetzt wird. Beide Phasen wurden als Fertigprodukte in Polyethylen-Säulen mit einem Reservoir von 6 ml von International Sorbent Technology über die Firma ICT bezogen. Die Festphasenextraktion von 4-Nonylphenol, 4-Chlor-3-methylphenol, 4-Chlor-2-methylphenol an C18-Phasen ist mehrfach in der Literatur beschrieben. Dagegen findet die Styroldivinylbenzol-Copolymer-Festphase erst neuerdings Anwendung (Jahr 1998, Ternes et al. 1998).

Versuchsaufbau

Die Anreicherung der phenolischen Xenoestrogene erfolgte aus 0,5 bis 1 l einer wässrigen Probe. Die Probe wurde durch das Festphasenmaterial gesaugt (10 bis 15

ml/min), indem die Säule über einen Teflonschlauch mit der Adsorbex SPU-Apparatur verbunden war (Abb. 11).

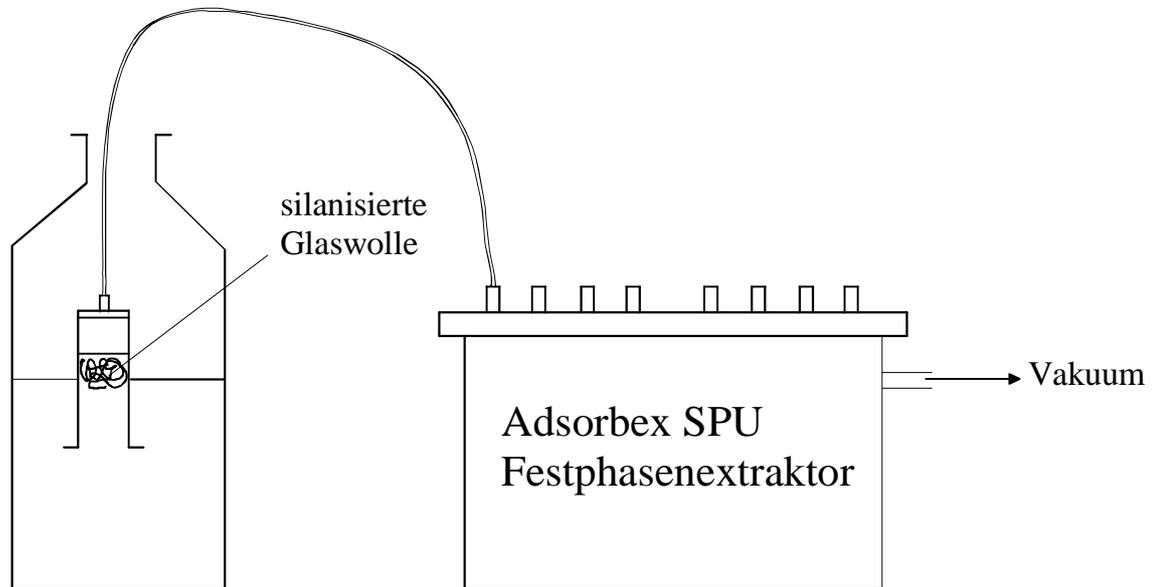


Abb. 11: Apparativer Aufbau bei der Festphasenextraktion.

Durch diese Versuchsanordnung wurde eine kontinuierliche Probenaufgabe gewährleistet und das Trockenlaufen der Säule vermieden. In Abb. 11 ist auch die silanisierte Glaswolle dargestellt, die bei stark partikelhaltigen Wasserproben auf das Adsorbens gepackt wurde. Dadurch wurde ein Verstopfen der Säule verhindert.

Nach dem Trocknen der Festphase im Stickstoffstrom wurde die Säule auf die Adsorbex SPU-Apparatur aufgesetzt und mit zweimal 2,5 ml Lösungsmittel eluiert. Als Elutionsmittel wurden Methanol, Aceton und Ethylacetat getestet. Die Wiederfindungsraten, die bei Anwendung von Aceton und Ethylacetat erzielt wurden, sind in Tab. 6 aufgelistet.

4.3.2 Wiederfindungsraten

Zur Konzipierung und Optimierung einer Festphasenextraktionsmethode wurden Wiederfindungsraten unter verschiedenen Bedingungen bestimmt. Es wurde stets mindestens eine Dreifachbestimmung durchgeführt, um parallel die Reproduzierbarkeit zu überprüfen: (1) Die Wiederfindungsraten der neun phenolischen Xenooestrogene wurden unter Verwendung von 200 mg Styroldivinylbenzol-Copolymer (ENV+) nach Zusatz verschiedener Mengen NaCl zur Probe (je 1 l) und nach Variation des

Elutionsmittels bestimmt. Ein Aussalzeffekt wurde vermutet, da die Wiederfindung aus dotiertem Quellwasser (Breitenbach) höher lag als aus dotiertem demineralisiertem Wasser. Das Wasser der Breitenbachquelle wies eine spezifische Leitfähigkeit von $5,7 \times 10^{-4}$ S/cm auf. Durch Erhöhung der Leitfähigkeit des demineralisierten Wassers, konnte die Extraktion wahrscheinlich effizienter sein. Der Zusatz von 5 g NaCl zu 1 l demineralisiertem Wasser ergab eine Leitfähigkeit von ca. $7,8 \times 10^{-3}$ S/cm und der von 10 g ca. $1,4 \times 10^{-3}$ S/cm. (2) Die beiden ausgewählten Adsorbentien Isolute ENV+ (200 mg) und Isolute C18_{nec} reversed phase (1 g) wurden unter Verwendung des gleichen Eluenten miteinander verglichen.

Die Dotierung des demineralisierten Wassers und des Quellwassers mit den neun phenolischen Xenoestrogenen erfolgte immer im unteren Konzentrationsbereich des Bestimmungsbereiches der Methode (vgl. III.I 4.3.3.) Da es mit abnehmendem „Spiking-Level“ zu irreversiblen Adsorptionen am Adsorbens kommen kann und dadurch zu einer Verringerung der Wiederfindungsraten, wurde in Vorversuchen eine höhere Konzentration (1 µg/l) eingesetzt. Die Wiederfindungsraten der phenolischen Xenoestrogene lagen bei diesem hohen „Spiking-Level“ mit Ausnahme von 4-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol über 80%. Deshalb wurde die Festphasenextraktionsmethode im unteren Konzentrationsbereich von 100 ng/l je Komponente auf ihre Qualität hin untersucht. Furtman (1993), der die Wiederfindung für eine Reihe von Phthalaten bei drei verschiedenen Konzentrationsbereichen (durchschnittlich 6,4 µg/l, 726 ng/l und 185 ng/l) ermittelte, konnte im oberen und mittleren Konzentrationsbereich annähernd die gleichen Wiederfindungsraten erzielen, im unteren Bereich stiegen die Standardabweichungen jedoch bis 18 % an.

Die Ergebnisse der Wiederfindungsraten der neun phenolischen Xenoestrogene nach Extraktion von 1 l gespiktem demineralisiertem Wasser auf der ENV+-Festphase und Elution mit zweimal 2,5 ml Aceton sind in Abb. 12 zusammengefasst.

Mit Ausnahme von 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol lagen die Wiederfindungsraten über 60 %. Durch Zusatz von 5 g NaCl zur Probe vor der Extraktion erhöhten sich die Wiederfindungsraten auf 80 bis 100 %. Besonders für 4-Hydroxybiphenyl und 2-*tert*-Butyl-4-methylphenol zeigte sich eine deutliche Steigerung. Die Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 10 g pro Liter führte wieder zu einer Verringerung der Wiederfindungsraten, im Falle von Bisphenol A lag sie sogar niedriger als ohne Zusatz von NaCl. Die Ergebnisse der Wiederfindungsraten nach Variation der NaCl-Konzentration deuteten auf ein Optimum des Salzgehaltes bei 5 g NaCl pro Liter demineralisiertem Wasser hin.

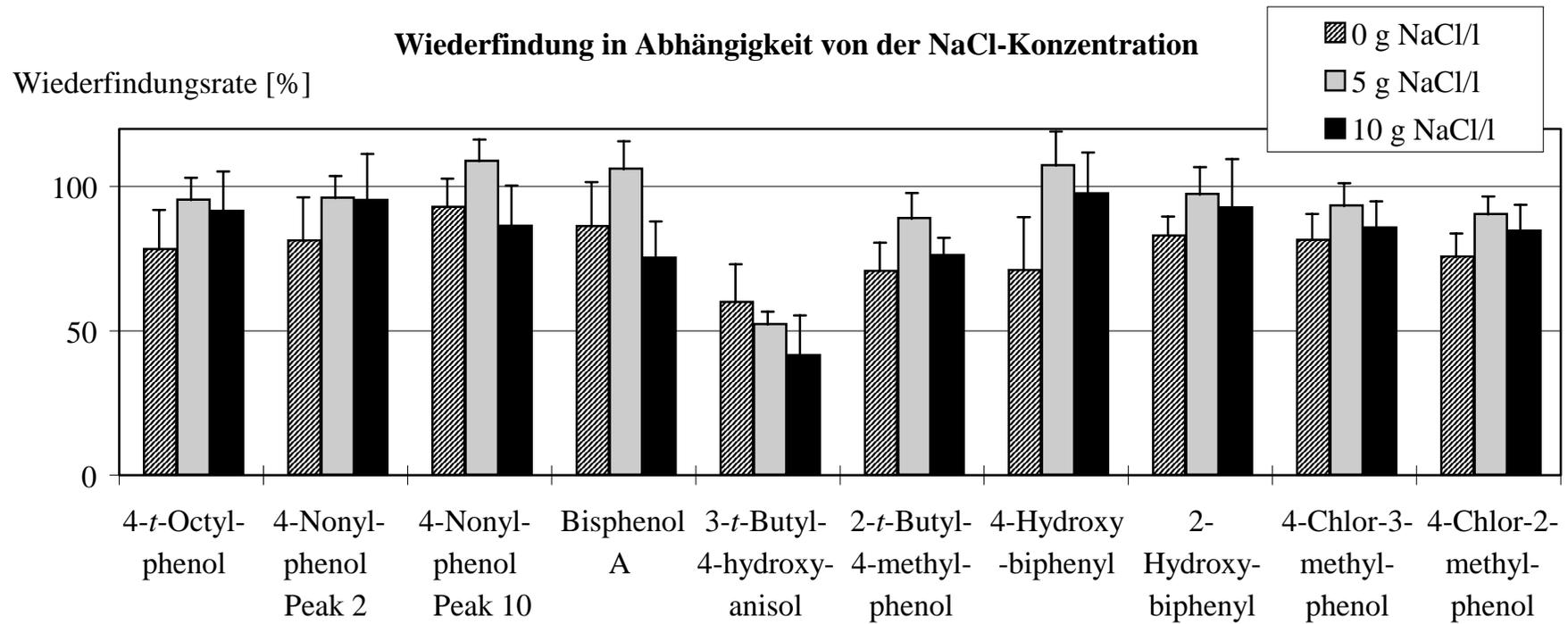


Abb. 12: Wiederfindungsraten der neun phenolischen Xenoestrogene nach Extraktion von gespiktem demineralisiertem Wasser (100 ng je Komponente je Liter) auf 200 mg der ENV+-Festphase. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte (\pm RSD) aus fünf unabhängigen Extraktionen nach Zusatz unterschiedlicher NaCl-Mengen.

Demzufolge wurde jede reale Probe über die Leitfähigkeit auf ihren Salzgehalt überprüft und wenn notwendig durch Zugabe von kleinen Portionen NaCl entsprechend einer Leitfähigkeit von 0,5 % NaCl in demineralisiertem Wasser eingestellt. Diese Probenaufbereitung sollte eine möglichst vollständige Extraktion gewährleisten. Der Aussalzeffekt wurde bereits für verschiedene Phenole detailliert in der Literatur untersucht (Chadlek und Marano 1984, Marcomini et al. 1987, Bao et al. 1996). Der Zusatz von NaCl zu den wässrigen Proben wurde sowohl bei der Festphasenextraktion als auch bei der Flüssig-flüssig-Extraktion durchgeführt (Nielsen 1984, Ahel et al. 1987, Blackburn und Waldock 1995, Heberer und Stan 1997, Yamamoto und Yasuhara 1999).

Für 4-Nonylphenol sind in Abb. 12 die Wiederfindungsraten der beiden für die Quantifizierung verwendeten Isomere aufgeführt. Es wird deutlich, dass die Wiederfindungsraten beider Isomere nur geringfügig voneinander abweichen.

Welche der beiden Festphasen ENV+ und C18_{nec} letztendlich zur Extraktion von realen Proben ausgewählt wurde, wurde unter zwei Gesichtspunkten entschieden: Zuerst wurden die Wiederfindungsraten miteinander verglichen und anschließend Vor- und Nachteile bei der Handhabung der einzelnen Festphasen verglichen.

Die ermittelten Wiederfindungsraten der neun phenolischen Xenoestrogene nach Anreicherung auf 200 mg ENV+ bzw. 1 g C18_{nec} und zweimaliger Elution mit 2,5 ml Aceton sind in Tab. 6 zusammengefasst. Die fünf unabhängig extrahierten Proben wurden jeweils vor der Extraktion mit 5 g NaCl versetzt. Die Wiederfindungsraten unter Verwendung der C18_{nec}-Festphase lagen über 70 % und waren somit vergleichbar mit denen nach Anreicherung auf der ENV+-Festphase. Die Standardabweichungen der Fünffachbestimmungen lagen bei der ENV+-Festphase zwischen 5 und 12 % und bei der C18_{nec}-Festphase zwischen 5 und 24 %. Wie bei der ENV+-Festphase zeigte 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol auch bei der C18_{nec}-Festphase eine geringe Wiederfindung. Die beiden 4-Nonylphenol-Isomere wurden nur mit geringen Unterschieden auf den einzelnen Festphasen wiedergefunden. Der Peak 2 wurde auf der C18_{nec}-Phase geringfügig besser angereichert, dagegen lag die Wiederfindungsrate von Peak 10 bei der ENV+-Phase höher.

Die Handhabung der ENV+-Festphase bei der Konditionierung und vor allem bei der Extraktion war wesentlich einfacher und praktischer. Die Konditionierung der C18-Phase muss deutlich sorgfältiger durchgeführt werden als die der ENV+, da die C18-Ketten der Umkehrphase aufgerichtet werden müssen. Hierzu muss das Konditionierungsmittel sehr langsam durch die Säule laufen. Die ENV+-Phase, ein quervernetztes Polymer, muss dagegen lediglich mit dem Konditionierungsmittel benetzt werden. Bei der Extraktion von 1 l Wasserprobe unter Verwendung der C18-Phase ergaben sich durchschnittlich längere Extraktionszeiten, vor allem bei Proben mit hohen Gehalten

an suspendierten Partikeln (ungereinigtes Abwasser). Selbst nach Anlegen eines deutlich höheren Vakuums konnte die Flussrate von 10 - 15 ml/min nicht eingehalten werden. Aus diesen Gründen erwies sich die ENV+-Phase für den routinemäßigen Einsatz geeigneter.

Tab. 6: Vergleich der Wiederfindungsraten der neun phenolischen Xenoestrogene unter Verwendung der ENV+ (200 mg)- und C18_{nec}(1 g)-Phase. Die Elution erfolgte mit Aceton oder Ethylacetat. Vor der Extraktion wurden die Proben mit 5 g NaCl versetzt. Die Wiederfindungsrate (\pm RSD) wurde aus fünf unabhängigen Extraktionen bestimmt.

Substanz	Wiederfindungsrate (\pm RSD) [%]		
	C18 _{nec} / Elution mit Aceton	ENV+/ Elution mit Aceton	ENV+/ Elution mit Ethylacetat
4- <i>tert</i> -Octylphenol	97 \pm 12	95 \pm 8	99 \pm 8
4-Nonylphenol Peak 2	114 \pm 23	96 \pm 8	110 \pm 6
4-Nonylphenol Peak 10	111 \pm 24	109 \pm 8	117 \pm 8
Bisphenol A	105 \pm 18	106 \pm 10	101 \pm 7
3- <i>tert</i> -Butyl-4-hydroxyanisol	25 \pm 12	52 \pm 5	7 \pm 2
2- <i>tert</i> -Butyl-4-methylphenol	73 \pm 9	89 \pm 9	66 \pm 13
4-Hydroxybiphenyl	102 \pm 15	107 \pm 12	102 \pm 10
2-Hydroxybiphenyl	102 \pm 15	97 \pm 9	96 \pm 9
4-Chlor-3-methylphenol	90 \pm 6	93 \pm 8	90 \pm 6
4-Chlor-2-methylphenol	89 \pm 11	90 \pm 6	79 \pm 6

Da bei der SPE der fünf Steroide die Elution mit Ethylacetat höhere Wiederfindungsraten ergab als die Elution mit Aceton, wurden die Wiederfindungsraten der neun phenolischen Xenoestrogene auch mit diesem Elutionsmittel bestimmt (vgl. III.I 5.2.1). Ein wesentliches Ziel bei der Methodenentwicklung bestand darin, aus ein und demselben Extrakt alle Substanzen sowohl der biologischen Analytik (E-Screen) als auch der chemischen Analytik zugänglich zu machen. Nur so konnten die Ergebnisse beider Methoden verglichen werden.

Die Elution mit Ethylacetat nach Anreicherung der phenolischen Xenoestrogene an 200 mg ENV+-Festphase ergab mit Ausnahme von 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol Wiederfindungsraten zwischen 66 und 117 % und somit ähnlich wie unter Verwendung von Aceton. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefasst. Bei der Elution mit Ethylacetat war jedoch zu beachten, dass die Säule vollständig trocken war. Auf

der Säule verbleibendes Restwasser wäre mit Ethylacetat nicht mischbar und im Eluat entstünde ein Zweiphasensystem.

Um eindeutig zu klären, ob ein irreversibler Adsorptionseffekt auf der Festphase der Grund für die geringen Wiederfindungsraten von 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol ist, wurde demineralisiertes Wasser mit größeren Mengen an 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol dotiert (500 ng/l und 1000 ng/l). Die Wiederfindungsraten zeigten bei keiner der beiden Konzentrationen einen Anstieg, sodass der Aspekt der Adsorption als Ursache für geringe Wiederfindungsraten ausgeschlossen werden konnte.

Oxidative Veränderungen dieser Substanz in der Testmatrix konnten eine weitere Ursache für seine schlechte Wiederfindung darstellen. 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol, das als Antioxidans in Kosmetika und Arzneimitteln eingesetzt wird, weist unter oxidativen Bedingungen eine starke Tendenz zur Dimerisierung bzw. Trimerisierung auf (Taylor und Battersby 1967) und wäre somit im SIM-Modus nicht nachweisbar. Bei eigenen Untersuchungen konnten nach Einleiten von Sauerstoff in eine wässrige 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol-Lösung mit GC/MS (Scan-Modus) Dimere und Trimere identifiziert werden. Nach Reynolds (1997) führen bereits Spuren von Metallen, Eisensalzen und anderen Oxidantien zum Aktivitätsverlust von 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol.

Zur Überprüfung, ob eine Oxidation für den Gehaltsverlusts von 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol verantwortlich war, wurde bidestilliertes Wasser (Wasser zur Injektion von Fresenius), das wahrscheinlich frei von Metallspuren etc. war, mit ca. 100 ng/l dotiert, extrahiert und quantifiziert. Die Wiederfindungsrate von 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol steigerte sich bei einmaliger Extraktion auf über 70 %. Daraus läßt sich vermuten, dass nicht Adsorption sondern Oxidation der Grund für die geringe Wiederfindung von 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol ist.

Interessanterweise konnte bei dieser Messung im bidestillierten Wasser, das medizinisch zu Injektionszwecken eingesetzt wird, 4-*tert*-Octylphenol und 4-Nonylphenol nachgewiesen werden.

Der Vergleich der erzielten Wiederfindungsraten und der Reproduzierbarkeit mit Ergebnissen aus der Literatur zeigte, dass die zur Bestimmung der neun phenolischen Xenooestrogene entwickelte Festphasenextraktion unter Verwendung der Isolute ENV+-Festphase geeignet ist. 4-Nonylphenol und 4-*tert*-Octylphenol konnten von Blackburn und Waldock (1995) nach Anreicherung auf einer C18-Phase und Elution mit Ethylacetat („Spiking Level“ von 5 µg/l) zwischen 74 und 110 % ($\pm 7 - 12$ %) wiedergefunden werden. Marcomini et al. (1987) bestimmten für 4-Nonylphenol nach Extraktion an einer C18-Phase („Spiking Level“ von 76 µg/l) Wiederfindungen zwischen 92 und 95 % ($\pm 2,5 - 3$ %). Ternes et al. (1998) konnten bei Verwendung einer C18-Festphase bzw. einer Mischphase aus Lichrolut-EN/C18 und anschließender

Elution mit Methanol 2-Hydroxybiphenyl und 4-Chlor-3-methylphenol mit 56 und 90 % ($\pm 7 - 11$ %) bzw. 54 und 65 % ($\pm 6 - 9$ %) wiederfinden („Spiking Level“ von 100 ng/l).

Matrixeffekte

Um zu überprüfen, ob sich Matrixeffekte nachteilig auf die Wiederfindung der neun phenolischen Xenöstrogene auswirken, wurde Quellwasser (Breitenbach) mit 100 ng/l je Komponente versetzt.

Drei unabhängige Extraktionen unter Verwendung der ENV+-Festphase wurden durchgeführt, quantitativ analysiert und die Wiederfindungsraten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 zusammengefasst und zeigen Wiederfindungsraten zwischen 41 und 142 %.

Tab. 7: Wiederfindungsraten (\pm RSD) der neun phenolischen Xenöstrogene nach drei unabhängigen Extraktionen von dotiertem Quellwasser (Breitenbach) unter Verwendung der ENV+ und Elution mit Aceton. Die Proben wurden nicht auf ihre Leitfähigkeit überprüft.

Substanz	Wiederfindungsrate (\pm RSD) [%]
4- <i>tert</i> -Octylphenol	102 \pm 10
4-Nonylphenol*	113 \pm 12
Bisphenol A	109 \pm 11
3- <i>tert</i> -Butyl-4-hydroxyanisol	41 \pm 25
2- <i>tert</i> -Butyl-4-methylphenol	60 \pm 7
4-Hydroxybiphenyl	142 \pm 24
2-Hydroxybiphenyl	129 \pm 15
4-Chlor-3-methylphenol	94 \pm 18
4-Chlor-2-methylphenol	97 \pm 14

*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

Matrixbestandteile wirken sich demnach nicht nachteilig auf die Extraktionsausbeute aus. Stattdessen lagen die Wiederfindungsraten für 4-Hydroxybiphenyl, 2-Hydroxybiphenyl, 4-Chlor-3-Methylphenol und 4-Chlor-2-Methylphenol bei diesem Experiment höher als bei dotiertem demineralisiertem Wasser ohne Zusatz von NaCl (vgl. Abb.

12), obwohl das Quellwasser nicht auf seinen Salzgehalt eingestellt wurde. Hieraus läßt sich folgern, dass sich Matrixbestandteile, wie sie in Quellwasser enthalten sind, positiv auf die Extraktionsausbeute auswirken können.

4.3.3 Methodische Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Um zu überprüfen, ob die instrumentellen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen mit den Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der analytischen Methode übereinstimmen, wurde 1 l deionisiertes Wasser mit der 1:5000 (20 ng/l je Komponente) bzw. der 1:10000 (10 ng/l) Arbeitsstandardverdünnung versetzt, analysiert und die Wiederfindungsraten bestimmt.

Tab. 8: Nachweis- und untere Bestimmungsgrenzen der gesamten analytischen Methode in 1 l wässrige Probe. Die Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Extraktionen ermittelt.

Substanz	Nachweisgrenze [ng/l]	untere Bestimmungsgrenze [ng/l]
4- <i>tert</i> -Octylphenol	< 10	20
4-Nonylphenol*	10	20
Bisphenol A	< 10	50
3- <i>tert</i> -Butyl-4-hydroxyanisol	50	50
2- <i>tert</i> -Butyl-4-methylphenol	10	20
4-Hydroxybiphenyl	10	20
2-Hydroxybiphenyl	10	20
4-Chlor-3-methylphenol	< 10	10
4-Chlor-2-methylphenol	< 10	10

*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

Ein Methodenblindwert kann unmittelbar die Nachweis- und Bestimmungsgrenze beeinflussen. Um auszuschließen, dass ein Methodenblindwert vorliegt, wurde erstens eine ENV+-Festphase konditioniert, ohne Probenauftrag eluiert und analysiert, und zweitens 1 l deionisiertes Wasser extrahiert und analysiert. Es konnten keine Blindwerte für die neun phenolischen Xenoestrogene bis zur Nachweisgrenze ermittelt werden. Die in diesem Experiment (n = 3) ermittelten Wiederfindungsraten für den

„Spiking-Level“ von 20 ng/l lagen für 4-*tert*-Octylphenol, 4-Nonylphenol, 4-Hydroxybiphenyl, 2-Hydroxybiphenyl, 4-Chlor-3-methylphenol, 4-Chlor-2-methylphenol und 2-*tert*-Butyl-4-methylphenol zwischen 50 und 120 %. Bisphenol A zeigte eine Wiederfindungsrate > 140 %. Hieraus konnte geschlossen werden, dass die Bestimmungsgrenze oberhalb von 20 ng/l liegt. 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol war bei einer Konzentration von 20 ng/l nicht mehr nachweisbar. Tab. 8 zeigt die aus diesen Ergebnissen resultierenden methodischen Nachweis- und unteren Bestimmungsgrenzen.

4.3.4 Anwendung auf reale Proben

Validierung der Methode auf schwierige Matrices

Nach Entwicklung der Methode unter Modellbedingungen musste sie unter realen Bedingungen auf ihre Qualität getestet werden.

Es wurden Abwasserproben ausgewählt, um die entwickelte Methode auf schwierige wässrige Matrices zu überprüfen. Ist die Methode auf Abwasserproben anwendbar, so können auch geringer belastete Proben problemlos analysiert werden. Erstens sollte abgeklärt werden, ob die Extraktion von Proben mit hohem Gehalt an suspendierten Partikeln problemlos möglich ist, denn Verstopfungen der Festphase führen zu extrem verlängerten Extraktionszeiten bis hin zur vollständigen Blockade der Festphase. Zweitens musste unbedingt abgeklärt werden, ob die Analysenmethode ohne zusätzlichen Aufreinigungsschritt auch auf schwierige Proben wie ungereinigtes Abwasser anwendbar ist. Die Analysenmethode wurde darüber hinaus auf Reproduzierbarkeit der Ergebnisse überprüft, indem Aliquote von ungereinigtem Abwasser mehrfach analysiert wurden.

Silanisierte Glaswolle wurde vor der Konditionierung auf die Festphase gepackt (s. III.I 4.3.1 Apparativer Aufbau) um Verstopfung durch suspendierte Partikel zu vermeiden. Die Extraktion von ungereinigtem Abwasser mit einem hohen Gehalt an suspendiertem Material konnte problemlos durchgeführt werden. Abb. 13 zeigt das TIC einer Zulaufprobe (24 h-Probe vom 10./11.3.98 der Kläranlage Steinhäule Ulm/Neu-Ulm) nach Extraktion an 200 mg ENV+-Festphase und Elution mit Aceton. Die quantitative Bestimmung aller neun phenolischen Xenoestrogene war ohne Aufreinigung möglich.

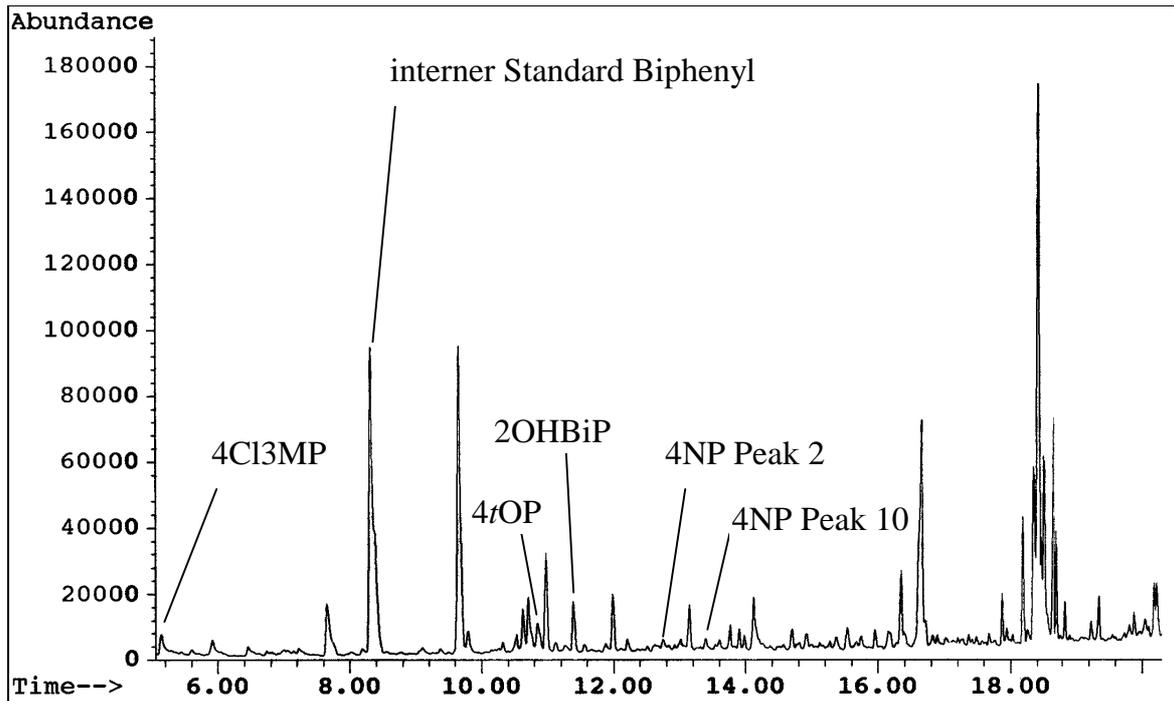


Abb. 13: TIC einer Zulaufprobe (24 h-Probe vom 10./11.3.98 der Kläranlage Steinhäule Ulm/Neu-Ulm) nach Festphasenextraktion an 200 mg ENV+, Elution mit Aceton und Methylierung (10 %-Aliquot) des Extraktes.

Drei unabhängige Extraktionen mit anschließender GC/MS-Analytik von jeweils 1 l-Aliquot einer Ablaufprobe (24 h-Mischprobe vom 10./11.3.98 der Kläranlage Steinhäule Ulm/Neu-Ulm), konnte die entwickelte Methode qualitativ hinsichtlich Reproduzierbarkeit bestätigen. Die Konzentrationen der identifizierten phenolischen Xenooestrogene 4-*tert*-Octylphenol, 4-Nonylphenol und Bisphenol A lagen zwischen 0,2 µg/l und 0,4 µg/l (Abb. 14). Die relativen Standardabweichungen der Dreifachbestimmung demonstrierten mit Werten zwischen 4 und 31 % eine gute Reproduzierbarkeit der Methode. 4-Nonylphenol wurde bereits mehrfach auf seine Akkumulation und Persistenz in Sediment und Klärschlamm untersucht (Giger et al. 1984, Ahel et al. 1994a, Ahel et al. 1994b). Der hohe log K_{OW} (Verteilungskoeffizient Octanol/Wasser) von 4,48 läßt vermuten, dass 4-Nonylphenol ebenfalls auf der Partikelphase einer Wasserprobe angereichert wird. Das adsorbierte 4-Nonylphenol wird bei Analytik einer Vollwasserprobe, die aus Wasser- und Partikelphase besteht, folglich co-extrahiert. Der differierende Partikelgehalt in den Aliquoten der untersuchten 24 h Ablaufprobe wurde auf der silanisierten Glaswolle angereichert und methyliert. Dieser Aspekt könnte die höheren relativen Standardabweichungen des 4-Nonylphenols bei der Dreifachbestimmung erklären.

Abb. 14 zeigt außerdem, dass die Bestimmung der Summe der 4-Nonylphenol-Isomere wie unter III.I 4.1.4 beschrieben möglich ist. Beide quantifizierten Peaks ergaben die gleichen Konzentrationen für die Summe der 4-Nonylphenol-Isomere.

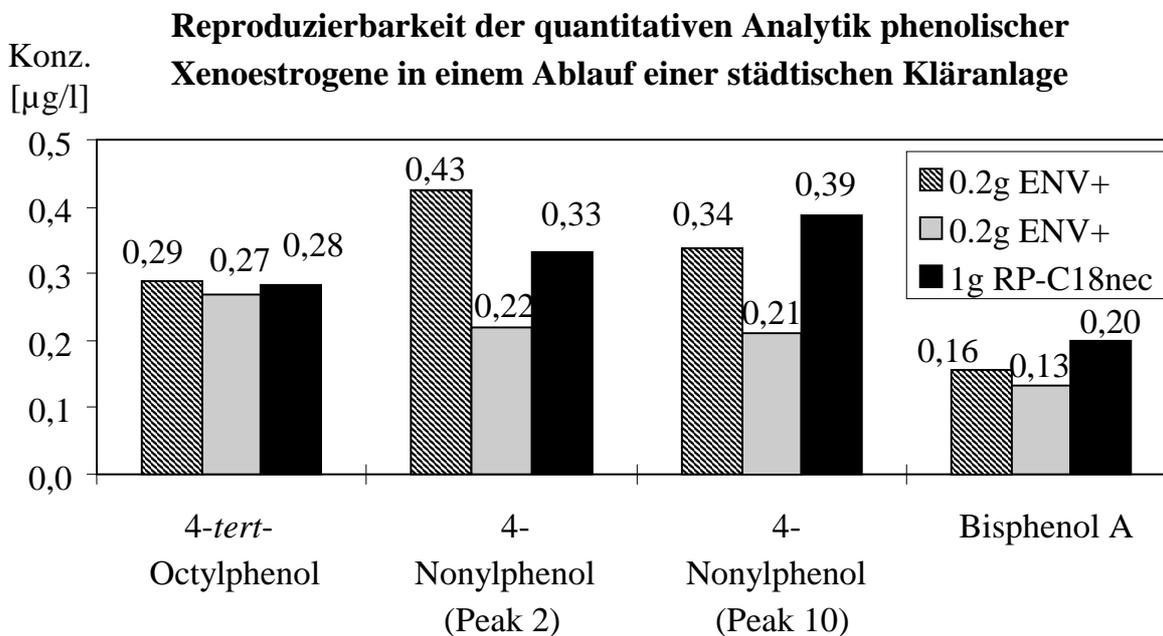
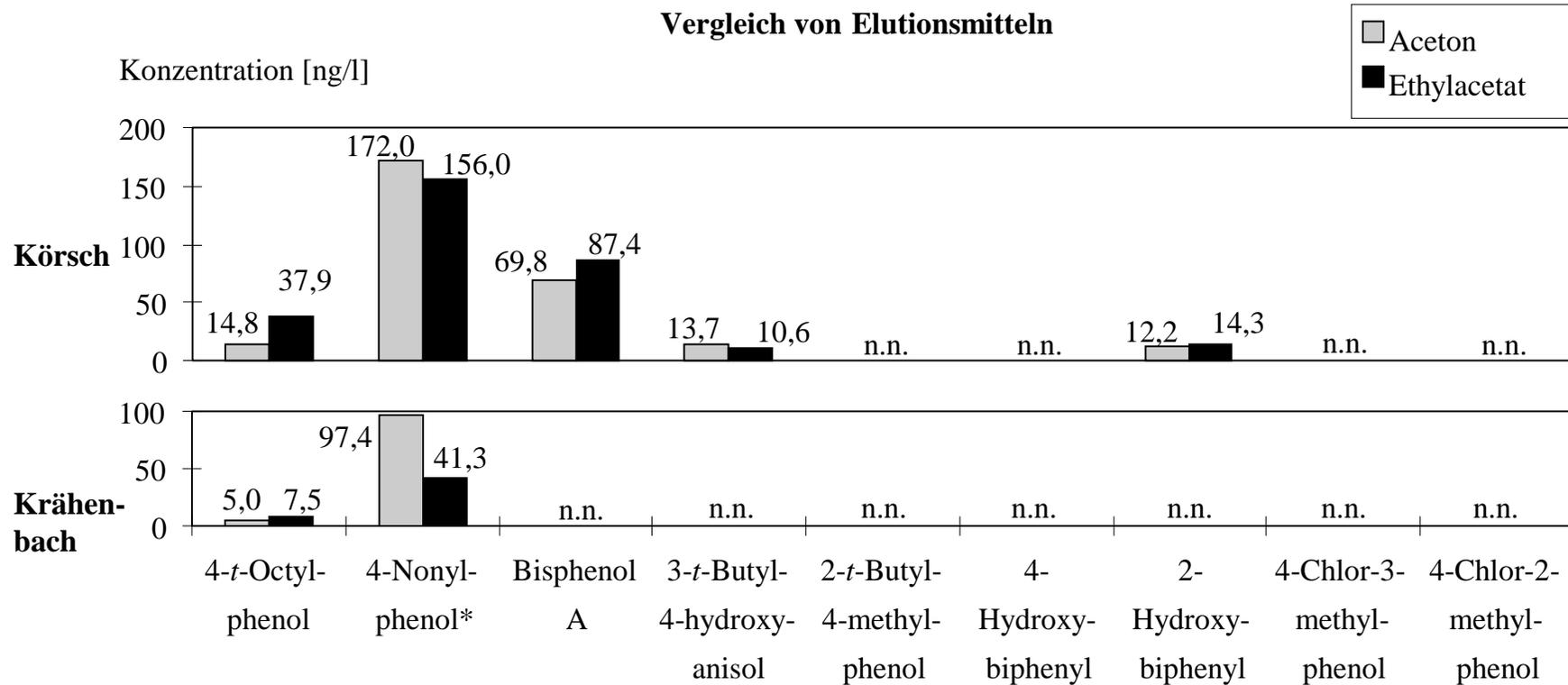


Abb. 14: Drei unabhängige Analysen von 1 l-Aliquoten einer 24 h-Mischprobe des Ablaufes einer städtischen Kläranlage (10./11.03.98 Kläranlage Steinhäule Ulm/Neu-Ulm) unter Verwendung von 0,2 g ENV+ und 1 g RP-C18_{nec} als Festphasen. Die Elution wurde mit Aceton durchgeführt.

Elutionsmittelvergleich bei der Extraktion von Oberflächenwasser

Bei der Festphasenextraktion von dotiertem demineralisiertem Wasser ergab die Elution mit Aceton oder Ethylacetat vergleichbare Wiederfindungsraten der neun phenolischen Xenoestrogene (III.I 4.3.3).

Die Extraktion von 1 l-Aliquoten derselben Wasserprobe an 200 mg ENV+-Festphase und Elution mit Aceton bzw. Ethylacetat sollte zeigen, ob bei realen Proben die beiden Elutionsmittel ebenfalls alternativ verwendet werden können. Dieser Vergleich wurde jeweils bei einer Wasserprobe der Körsch (Stichprobe vom 1.12.98) und des Krähenbachs (Stichprobe vom 1.12.98) durchgeführt. Die Ergebnisse aus beiden Extraktionen der jeweiligen Wasserproben sind in Abb. 15 einander gegenübergestellt.



*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

Abb. 15: Körorsch- und Krähenbach-Wasserproben (Stichproben vom 1.12.98 und 2.12.98) wurden je einmal extrahiert (ENV+-Festphase) und mit Aceton bzw. mit Ethylacetat eluiert. Die quantifizierten Konzentrationen [ng/l] der gleichen Wasserprobe wurden miteinander verglichen.

Es wurden bei der Körsch-Wasserprobe fünf der neun phenolischen Xenoestrogene detektiert und bei der Krähenbach-Wasserprobe wurden zwei Komponenten nachgewiesen. Der Vergleich der quantifizierten Konzentrationen bei Verwendung von Aceton bzw. Ethylacetat zeigte bei beiden Proben gute Übereinstimmungen. Im unteren Konzentrationsbereich zwischen 5 und 100 ng/l, in denen die phenolischen Xenoestrogene bei diesem Experiment detektiert wurden, sind Abweichungen über 50 % nicht abwegig.

Das Experiment konnte zeigen, dass Aceton und Ethylacetat alternativ zur Elution nach Festphasenextraktion von realen Wasserproben eingesetzt werden können. Im Gegensatz zu den dotierten demineralisierten Wasserproben konnte in der Körschprobe 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol sowohl im Aceton-, als auch im Ethylacetat-Extrakt mit einer Abweichung von weniger als 25 % quantifiziert werden (vgl. III.I 4.3.2 Abweichung von 87 %).

4.3.5 Vollwasserprobe (Wasser- und Partikelphase)

Wasserproben aus Kläranlagenzuläufen und Flüssen nach starken Regenfällen enthalten einen hohen Anteil an Schwebstoffen (Partikelphase). Generell sollte bei jeder Analytik geklärt sein, ob die ermittelten Ergebnisse aus der Summe der Wasser- und der Partikelphase oder nur aus der Wasserphase resultieren. Die in dieser Arbeit ermittelten Gehalte beziehen sich immer auf die Summe beider Phasen. Eine Ausnahme bilden die Ergebnisse der Steroide, die bei der quantitativen Analytik von ungereinigtem Abwasser ermittelt wurden (vgl. III.I 5.2.4). Durch die Analytik beider Phasen sollte gewährleistet werden, dass sowohl adsorptiv gebundene als auch freie phenolische Xenoestrogene erfaßt werden. Üblicherweise wird bei der Festphasenextraktion partikelfreies Wasser eingesetzt, um Verstopfungen zu vermeiden. Die Partikelphase wird entweder durch Zentrifugation oder Filtration entfernt. Allerdings besteht bei ausgeprägten Adsorptionseffekten die Gefahr einer Minderbestimmung (Furtmann 1993). Hohe Adsorptionstendenzen lassen sich vor allem für Substanzen mit einem hohen $\log K_{OW}$ vermuten. 4-Nonylphenol und 4-*tert*-Octylphenol weisen einen $\log K_{OW} > 4$ (Ahel und Giger 1993) auf.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde geklärt, ob bei der Festphasenextraktion einer Vollwasserprobe (Wasserprobe bestehend aus Wasser- und Partikelphase) alle neun phenolischen Xenoestrogene vollständig extrahiert werden, d.h., dass sowohl adsorptiv gebundene und freie Komponenten erfaßt werden. Die Verstopfungsgefahr konnte durch Aufbringen von silanisierter Glaswolle auf die Festphase verhindert werden (vgl. III.I 4.3.4). Die Partikelphase reicherte sich während des Probenauftrages

einer Vollwasserprobe auf der silanisierter Glaswolle an. Bei der Elution wurde das Lösungsmittel so aufgegeben, dass die auf silanisierter Glaswolle akkumulierte Partikelphase benetzt wurde und adsorptiv gebundene Substanzen prinzipiell eluiert werden konnten. Das folgende Experiment bestätigte die Vermutung, dass sich adsorptiv gebundene phenolische Xenoestrogene auf der Partikelphase befinden. Gleichzeitig konnte die Extraktion auf ihre Vollständigkeit überprüft werden. Hierzu wurde 1 l Zulaufprobe (24 h-Probe vom 5./6.7.99 des Klärwerkes Steinhäule, Ulm/Neu-Ulm) mit dem Magnetührer gerührt, um eine optimale Vermischung der Partikelphase zu erzielen. Die Probe wurde in zwei Aliquote à 500 ml geteilt und parallel auf einer ENV+-Festphase angereichert. Im ersten Fall wurde die auf der silanisierter Glaswolle angereicherte Partikelphase abgenommen und separat extrahiert. Im anderen Fall wurde die Partikel- und die Festphase mit Ethylacetat eluiert. Die erzielten Resultate der Vollwasserprobe wurden mit den Ergebnissen der Summe der separaten Extraktion von Wasser- und Partikelphase verglichen. Parallel zu diesem Extraktionsexperiment wurde zusätzlich ein ganzer Liter derselben Zulaufprobe durch separate Extraktion der Wasser- und Partikelphase quantitativ analysiert.

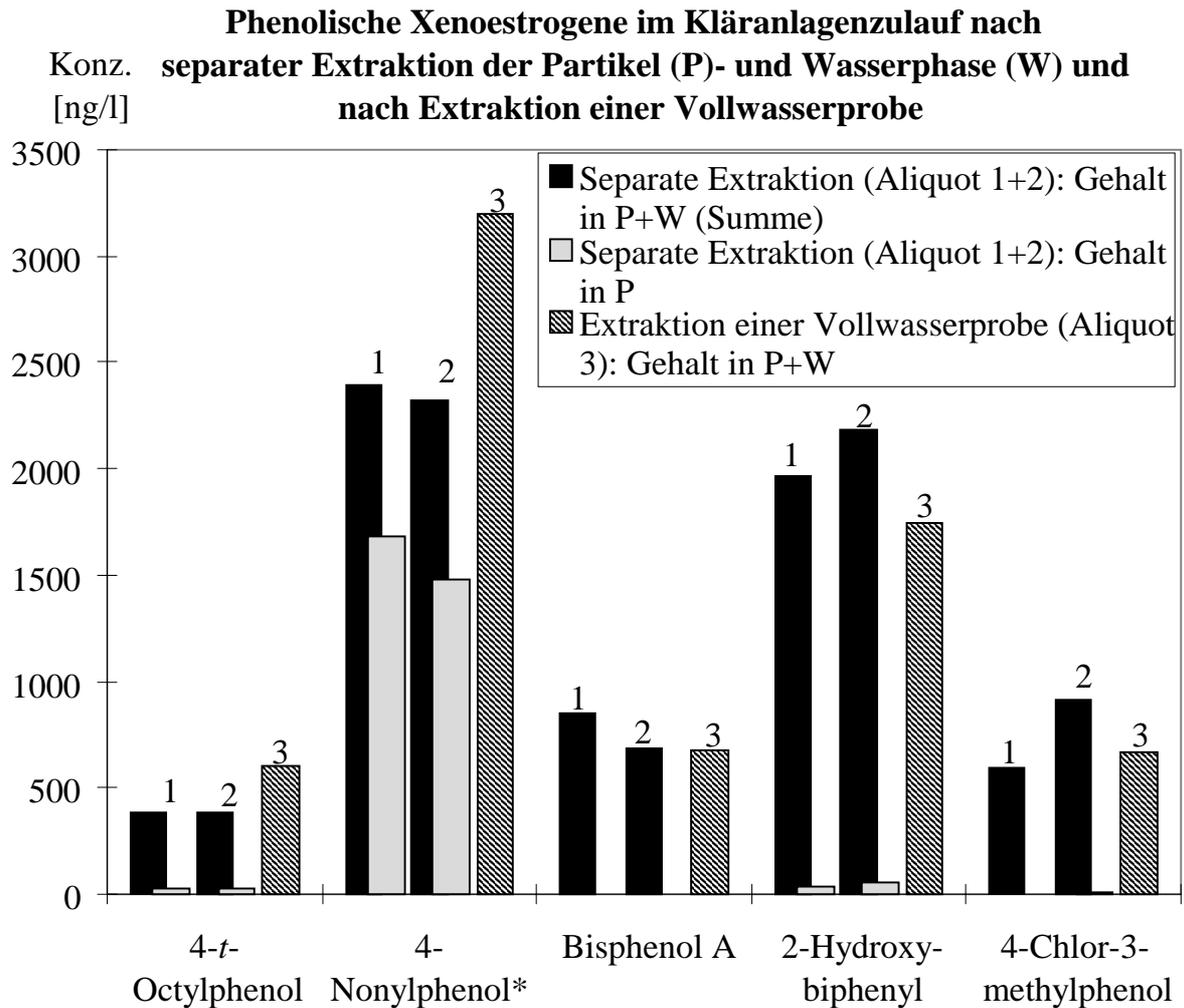
Tab. 9: Der Gesamtgehalt der adsorptiv gebundenen und freien phenolischen Xenoestrogene nach der Extraktion einer Vollwasserprobe (n = 1) und nach separater Extraktion von Wasser- und Partikelphase (n = 2) des Zulaufs des Klärwerkes Steinhäule, Ulm/Neu-Ulm (24 h-Mischprobe vom 5/6.7.99). Es sind jeweils der Mittelwert (MW) der Dreifachbestimmung und die relativen Standardabweichungen (RSD) angegeben.

Substanz	Gesamtkonzentration (MW) aus adsorptiv gebundenen und freien phenolischen Xenoestrogenen [ng/l]	RSD [%]
4- <i>tert</i> -Octylphenol	456,9	28
4-Nonylphenol*	2637,5	19
Bisphenol A	739,4	13
3- <i>tert</i> -Butyl-4-hydroxyanisol	n.n.	-
2- <i>tert</i> -Butyl-4-methylphenol	n.n.	-
4-Hydroxybiphenyl	n.n.	-
2-Hydroxybiphenyl	1967,9	11
4-Chlor-3-methylphenol	725,8	23
4-Chlor-2-methylphenol	n.n.	-

*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

In allen drei Extrakten der Zulaufprobe konnten fünf der neun phenolischen Xenoestrogene nachgewiesen werden. Die ermittelten Konzentrationen der Vollwasserprobe und der beiden separaten Extraktionen zeigten eine gute Übereinstimmung. Der Mittelwert und die zugehörigen relativen Standardabweichungen sind in Tab. 9 angegeben. Die relativen Standardabweichungen $< 28\%$ zeigen, dass sowohl die Extraktion der Vollwasserprobe als auch die getrennte Extraktion der Wasser- und der Partikelphase zum gleichen Ergebnis führen. Das Experiment machte deutlich, dass die Festphasenextraktion einer Vollwasserprobe zur Bestimmung der Gesamtkonzentration an adsorptiv gebundenen und freien phenolischen Xenoestrogenen die einfachere Variante darstellt, bei der die aufwendige Extraktion der Partikelphase wegfällt. Die Anreicherung des Schwebstoffanteils auf der silanisierten Glaswolle stellte eine sehr gute Alternative zur Filtration oder Zentrifugation dar. Der Vorteil dieser Alternative liegt darin, dass ein Arbeitsschritt wegfällt, der eine unnötige Quelle für einen Blindwert darstellen könnte. In den Extrakten der Partikelphasen konnte 4-Nonylphenol, 4-*tert*-Octylphenol und 2-Hydroxybiphenyl nachgewiesen werden. Der prozentuale Beitrag zur Gesamtkonzentration belief sich für 4-Nonylphenol auf 67 %, für 4-*tert*-Octylphenol auf 8 % und für 2-Hydroxybiphenyl sogar nur auf 2 %.

In Abb. 16 ist der Beitrag der Partikelphase zur Gesamtkonzentration der phenolischen Xenoestrogene dargestellt. Es werden die einzelnen Ergebnisse aus der Dreifachbestimmung einander gegenübergestellt. Die Abb. 16 macht besonders deutlich, dass es insbesondere für 4-Nonylphenol unerlässlich ist, den Schwebstoffgehalt zur Gesamtkonzentration aufzuaddieren. Das Fehlen des Beitrags von 68 % zur Gesamtkonzentration würde in der Tat eine wesentliche Minderbestimmung bedeuten. Bei Bilanzierungen von Eintrag und Austrag in Kläranlagen würde das Fehlen des Schwebstoffanteils das Ergebnis verfälschen. Brunner et al. (1988) bestimmten für 4-Nonylphenol vergleichbare Konzentrationen ($1\ \mu\text{g/l}$) auf der Partikelphase einer Zulaufprobe (Kläranlage Zürich-Glatt, 14.6.86). Dagegen lag der gelöste Anteil mit $20\ \mu\text{g/l}$ wesentlich höher. Der prozentuale Beitrag durch die Partikelphase zum Gesamtgehalt an 4-Nonylphenol bei dieser Messung betrug nur knapp 5 %. Jonkers und De Voogt (1999) bestätigten, dass die SPE einer ungefilterten Wasserprobe an einer C18-Phase vergleichbare Ergebnisse für 4-Nonylphenol ergab, wie die berechnete Gesamtkonzentration aus separater Extraktion. Die Ergebnisse einer Zulaufprobe zeigten, dass der prozentuale Beitrag für die 4-Nonylphenol-Gesamtkonzentration durch die Partikelphase 50 % betrug.



*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

Abb. 16: Extraktion und quantitative Bestimmung der phenolischen Xenoestrogene in einer Zulaufprobe (24 h- Probe vom 5.7.99 des Klärwerkes Steinhäule, Ulm/Neu-Ulm). Vergleich der Ergebnisse aus einem Vollwasser-Aliquot mit Ergebnissen von zwei Aliquoten, deren Wasser- und Partikelphase separat extrahiert wurden.

4.3.5.1 Probenahme

Die Probenahme ist ein wesentlicher Bestandteil des Analysenverfahrens. Die Probenahme sollte repräsentativ und der Fragestellung angepasst erfolgen. Wasserproben können als Stich- oder als Mischproben genommen werden. Sowohl Stich- als auch Mischproben weisen Vor- und Nachteile auf. Stichproben spiegeln den Zustand zum Zeitpunkt der Probenahme wider. Konzentrationsspitzen bzw. -minima können ermittelt werden, Aussagen über die Konzentrationsverhältnisse über einen größeren Zeitraum können jedoch nicht getroffen werden. Zur Erfassung der Belastungssituation

in Fließgewässern werden deshalb mehrere Stichproben über einen längeren Zeitraum genommen, wie dies an Körsch und Krähenbach durchgeführt wurde. Der Zeitraum der Probenahme von Mischprobe, die volumen- oder zeitproportional entnommen werden, wird bei der Analytik von organischen Komponenten durch die maximale Lagerungszeit der Probe begrenzt (vgl. III.I 4.3.5.2). In der Regel werden 24 h-Mischproben entnommen. Die Ergebnisse aus einer Mischprobe spiegeln demnach die integrierenden Verhältnisse über diesen Zeitraum wider. Abwasser wurde in dieser Arbeit als 24 h-Mischproben genommen. Eine wesentliche Fehlerquelle bei der Entnahme von Wasserproben stellen bereits kontaminierte Probenahmegefäße und das Einfangen von Blindwerten aus der Luft dar. Deshalb wurden in der Laborspülmaschine gespülte Braunglasflaschen verwendet, die anschließend dreimal mit Aceton nachgespült wurden. Die Probenahme aus Bächen und Flüssen erfolgte möglichst unter der Wasserspiegeloberfläche, um das Einfangen eines Blindwertes aus der Umgebungsluft zu vermeiden.

4.3.5.2 Probenlagerung

Während der Lagerung der Wasserprobe kann es zu Adsorption der Komponenten an die Flaschenwand und vor allem zum Abbau durch mikrobielle Aktivität kommen. Versuche zur Ermittlung der maximalen Lagerungsdauer, bis zu der keine Konzentrationsänderungen in der Probe auftraten, wurden nicht durchgeführt. Die Lagerung der Probe erfolgte in Anlehnung an die Richtlinien der Environmental Protection Agency (EPA) in Braunglasflaschen bei 4 °C. Die Extraktion wurde spätestens nach einer Lagerung von 28 Tagen durchgeführt (Dick 1994). Blackburn und Waldock (1995) konnten experimentell für 4-Nonylphenol zeigen, dass es während einer Lagerungszeit von 10 Tagen zu keiner Veränderung der 4-Nonylphenol-Konzentration kam.

4.3.5.3 Probenvorbereitung

Besonders wichtig bei der Festphasenextraktionstechnik ist, dass die Wasserprobe vor Anreicherung auf der Festphase auf eine Temperatur von ca. 20 °C äquilibriert wird. Ist die Probe zu kalt, so ist die vollständige Adsorption der organischen Substanzen auf der Festphase gefährdet. Jede Wasserprobe wurde, nachdem sie aus dem Kühlschrank genommen wurde, entweder bis zur Angleichung an die Raumtemperatur stehen gelassen oder, um den Prozess zu beschleunigen, im Wasserbad auf 20 °C erwärmt.

Die Probe wurde anschließend mit H_2SO_4 conc. auf pH 2,5 angesäuert. Bei pH 2,5 wird die Ionisation der Phenole unterdrückt und die freien Phenole reichern sich am besten auf einer unpolaren Festphase an. Der Zusatz von Säure zur Wasserprobe wird in anderen Studien für Bisphenol A (Yamamoto und Yasuhara 1999), 4-Chlor-3-methylphenol und 4-Chlor-2-methylphenol (Nielsen 1984) beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine SPE bei pH 7 mit anschließender Zweitextraktion bei pH 2,5 durchgeführt. Es wurden je eine 24 h Zulauf- und Ablaufprobe vom 29.6.98 des Klärwerks Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm) und je eine Donauwasserprobe, stromabwärts und -aufwärts der Einleitung dieser Kläranlage auf diese Weise extrahiert und analysiert. Besonders die Ergebnisse des E-Screen-Assay zeigten, dass die Extraktion bei pH 7 nicht vollständig war (Körner et al. 2000).

Der Zusatz von 5 ml Methanol zur Wasserprobe ist notwendig, da bei der SPE von einem Liter Wasserprobe das Konditionierungsmittel sukzessive von der Säule heruntergewaschen wird. Das enthaltene Methanol konditioniert die Festphase sozusagen „in process“.

Die Überprüfung und Einstellung des Salzgehaltes als vierter Probenvorbereitungsschritt wurde bereits detailliert unter III.I 4.3.2 beschrieben.

4.3.6 Zusammenfassung

Eine GC/MS-Methode zur simultanen quantitativen Bestimmung von 4-Nonyl- und 4-*tert*-Octylphenol, Bisphenol A, 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol, 2-*tert*-Butyl-4-methylphenol, 2- und 4-Hydroxybiphenyl, und 4-Chlor-3-methylphenol und 4-Chlor-2-methylphenol in wässrigen Proben war in der Literatur bisher nicht beschrieben. Die Entwicklung und Validierung eines geeigneten Analysenverfahrens zum gemeinsamen Nachweis der neun phenolischen Xenoestrogene stellte aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede eine Herausforderung dar.

Es gelang im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine sichere und sensitive Analysenmethode für die neun phenolischen Xenoestrogene zu etablieren, mit der wässrige Proben wie Oberflächenwasser, gereinigtes und ungereinigtes Abwasser analysiert werden können. Die entwickelte und validierte Analysenmethode ist zusammenfassend in Abb. 17 dargestellt. Die Anwendung der Festphasenextraktion auf wässrige Proben ermöglicht die Extraktion mehrerer Proben gleichzeitig. Die auf 20 °C äquilibrierte Vollwasserprobe wurde ohne Abtrennung der Partikelphase für die Extraktion folgendermaßen vorbereitet: pH-Einstellung, Überprüfung und Einstellung des Salzgehaltes und Zusatz von Methanol. Die phenolischen Xenoestrogene wurden an 200 mg Styroldivinylbenzol-Copolymer-Festphase (Isolute ENV+) angereichert und mit Aceton oder Ethylacetat eluiert.

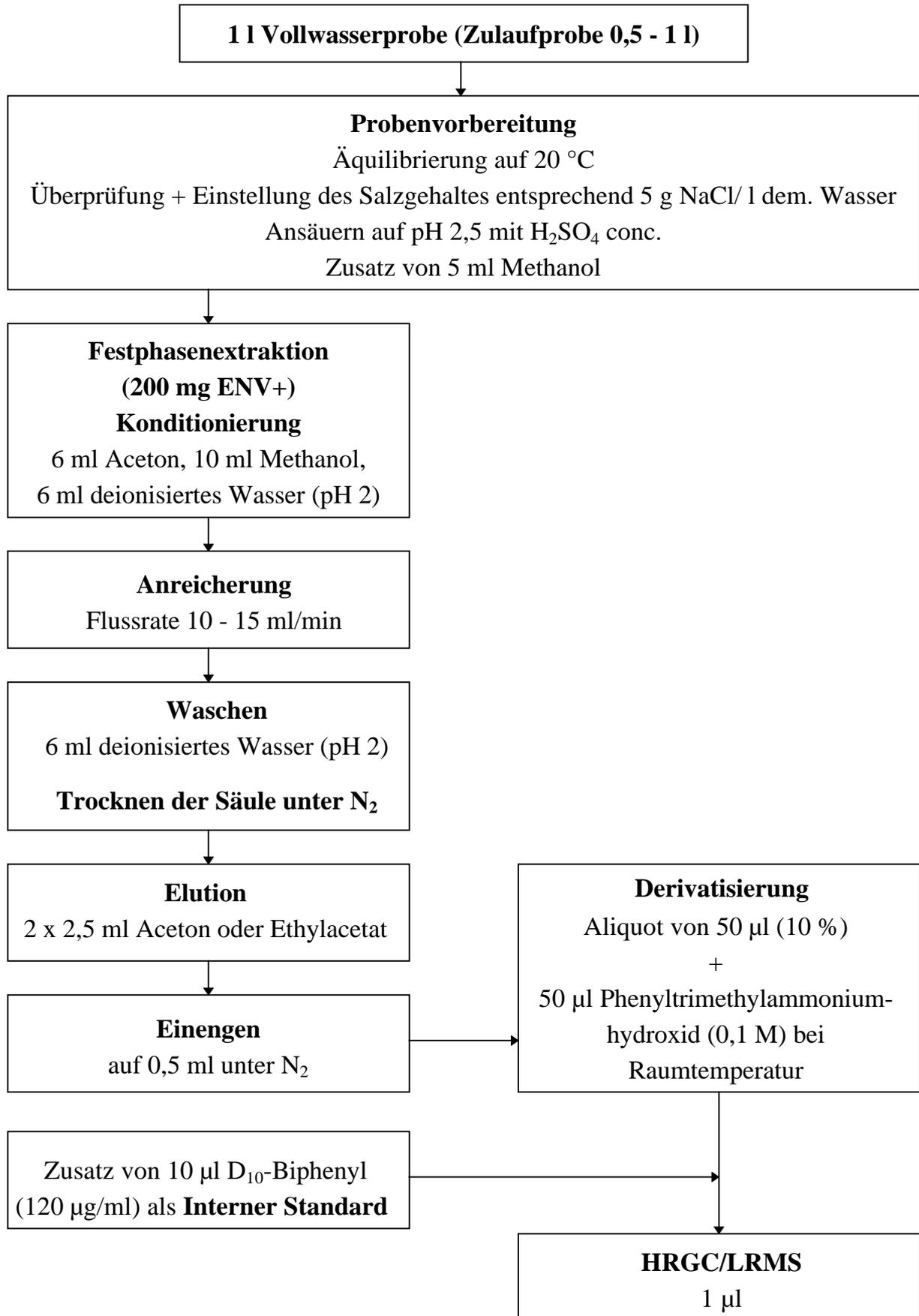


Abb. 17: Schematische Darstellung des Analysenverfahrens zum Nachweis von phenolischen Xenoestrogenen in wässrigen Proben.

Ohne weitere Aufreinigung des Eluates konnten auch Zulaufproben mittels HRGC/LRMS vermessen werden. 10 % des eingeeengten Extraktes wurden methyliert, um sowohl eine schärfere Auflösung bei der gaschromatographischen Trennung zu erzielen, als auch die Empfindlichkeit bei der massenspektrometrischen Detektion zu erhöhen. Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierung. D₁₀-Biphenyl wurde dem methylierten Aliquot vor der HRGC/LRMS-Messung als interner Quantifizierungsstandard zugesetzt. Die unteren Bestimmungsgrenzen lagen bei der etablierten Analysenmethode zwischen 10 und 50 ng/l.

4.4 Feste Proben

Im Rahmen der Methodenentwicklung für Feststoffproben wurde die Eignung der für wässrige Proben entwickelten GC/MS-Methode auf Sedimente und Klärschlamm überprüft. Das Analysenverfahren für Sedimente und Klärschlämme wurde allerdings nur für acht der neun phenolischen Xenoestrogene validiert. 3-*tert*-Butyl-4-hydroxy-anisol wurde bei der Methodenentwicklung und -validierung ausgeschlossen. Die starke Tendenz zur Di- und Trimerisierung unter oxidativen Bedingungen ließ vermuten, dass 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol während der Extraktion und der Aufreinigung oxidiert wird. Bei der Bestimmung ihrer Wiederfindungsrate bestätigte sich diese Vermutung.

Schwebstoffe (Partikelphase einer wässrigen Probe), die im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden, wurden mit einer gesonderten Methode aufbereitet (IV.I 2.4.2). Diese Methode wurde allerdings nicht validiert, da der an Schwebstoffe adsorbierte Gehalt an phenolischen Xenoestrogenen in der Regel direkt bei der Extraktion der Vollwasserprobe mitbestimmt wurde (vgl. III.I 4.3.5).

4.4.1 Extraktion

Bei der Soxhletextraktion wurden die in der festen Probe enthaltenen phenolischen Xenoestrogene in organisches Lösungsmittel überführt. Die Soxhletextraktion, eine einfache und elegante Fest-flüssig-Extraktionstechnik, erlaubte die parallele Extraktion von mehreren Proben. Bei der Überprüfung der Extraktionsmethode ergaben sich verschiedene Probleme. Mitextrahierte Matrixbestandteile verhinderten die störungsfreie quantitative Bestimmung mittels HRGC/LRMS. Die Bestimmung der Wiederfindungsrate einer dotierten Sedimentprobe konnte nur nach Anwendung der parallel entwickelten Aufreinigung durchgeführt werden. Aus der Bestimmung der Wiederfindungsraten einer dotierten realen Probe läßt sich entnehmen, ob die zugesetzte

Menge quantitativ herausgelöst wurde, jedoch nicht, ob tatsächlich alle in der Probe gebundenen phenolischen Xenooestrogene extrahiert wurden. Eine absolute Aussage über die Extraktionsausbeute ist für feste Proben prinzipiell nicht möglich. Hierbei ist zusätzlich zu beachten, dass sich die einzelnen Proben einer Probenart bei der Extraktion unterschiedlich verhalten können. Die Proben differieren in ihrem Gehalt an organischem Material, in der Zusammensetzung ihrer einzelnen Matrixbestandteile, zusätzlich kommen bei Sedimenten unterschiedliche Alterungsprozesse zum Tragen, die zu starken Adsorptionseffekten und chemischen Bindungen bis hin zu Einschlüssen führen können.

Die Extraktion wurde auf zwei verschiedene Arten überprüft. Erstens wurde ein geeignetes Extraktionsmittel durch den Vergleich verschiedener Lösungsmittel ermittelt. Es wurde das Extraktionsmittel ausgewählt, das die höchsten Extraktionsausbeuten erzielte. Zweitens wurden trotz der erwähnten Schwierigkeiten die Wiederfindungsraten der phenolischen Xenooestrogene bei einer dotierten Sedimentprobe bestimmt.

4.4.1.1 Extraktionsmittelvergleich

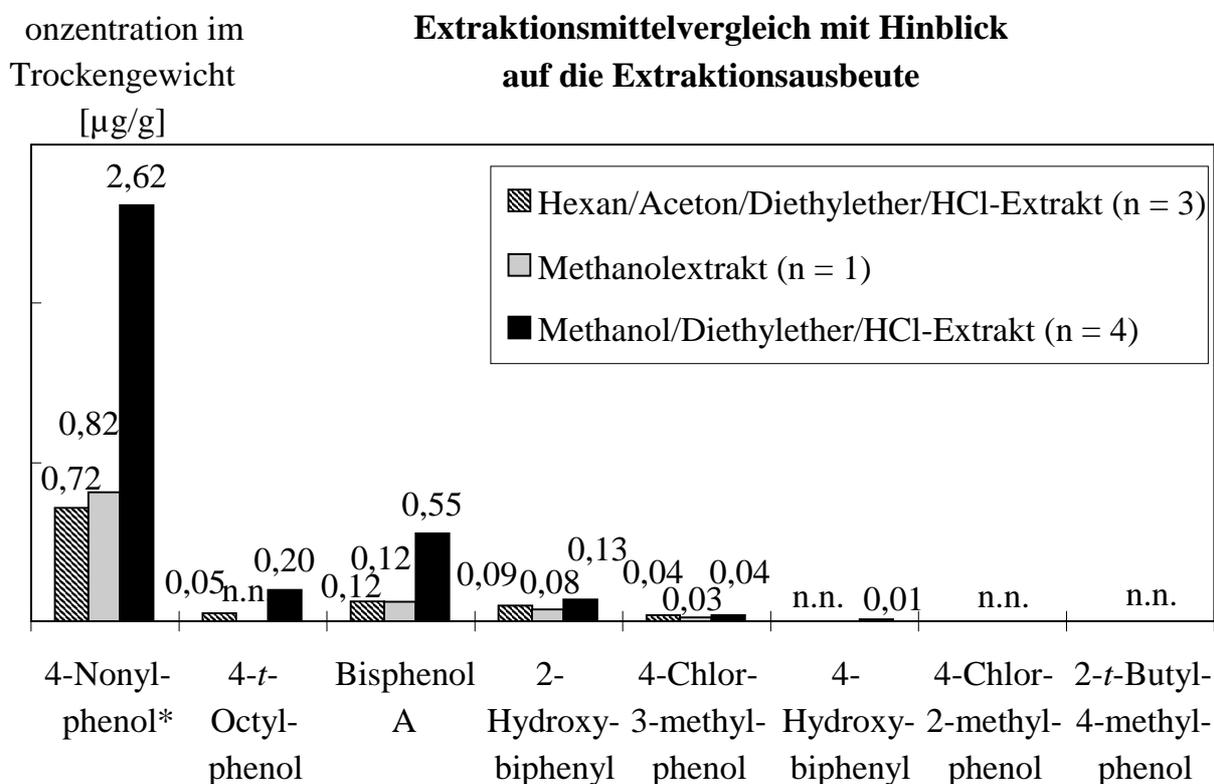
Der Extraktionsmittelvergleich wurde bei einer Klärschlammprobe (Klärschlamm nach der Trocknung vom 13.3.98 des Klärwerks Steinhäule, Ulm/Neu-Ulm) durchgeführt. Es wurden folgende Lösungsmittel(-mischungen) bei der Soxhletextraktion von jeweils ca. 3 g derselben Probe getestet: (1) Hexan/Aceton/Diethylether (5:5:1) + 0,1 % (V/V) HCl conc., (2) Methanol, (3) Methanol/Diethylether (10:1) + 0,1 % (V/V) HCl conc.. Die Probe wurde nach der Gefriertrocknung in einer Kaffeemühle gemahlen, um eine möglichst homogene Matrix zu erhalten.

Extraktionsmittelauswahl

Die Auswahl der Extraktionsmittel(-mischungen) erfolgte nach Orientierung an verschiedenen Extraktionsverfahren aus der Literatur. Tschochner et al. (1989) extrahierten feste Proben mit einer Mischung aus Hexan/Aceton (5:5) und 0,1 % (V/V) HCl conc. zur Bestimmung von chlorierten Phenolen. Brunner (1990) verwendete zur Extraktion von Pentachlorphenol aus getrocknetem Fischpulver eine Mischung aus Hexan/Aceton/Ether (10:5:1) und 0,1 % (V/V) HCl conc.. Der Hexananteil wurde in dieser Arbeit wie bei Tschochner et al. (1989) reduziert, um den polaren Lösungsmittelanteil zu erhöhen, denn die untersuchten phenolischen Xenooestrogene weisen eine höhere Polarität als Pentachlorphenol auf. Zur Bestimmung von Chlorphenolen wurde das Ansäuern von gefriergetrockneten Sedimentproben auch von Chovanec et

al. (1994) beschrieben. Demnach wurden zwei Lösungsmittelmischungen (vgl. (1) + (3)), die im Rahmen dieser Arbeit getestet wurden, mit 0,1 % (V/V) HCl conc. versetzt. Durch Zusatz von HCl sollte, wie bei der Extraktion von wässrigen Proben, die Phenolatbildung verhindert und gleichzeitig gewährleistet werden, dass sowohl chemisch gebundene als auch freie phenolische Xenoestrogene extrahiert werden. Diethylether wurde den Mischungen als Lösungsvermittler und Schlepper für HCl zugesetzt. Reines Methanol (vgl. (2)) wurde als drittes Extraktionsmittel getestet, da es bereits bei der Soxhletextraktion von Nonylphenol und 4-*tert*-Octylphenol eingesetzt wurde (Marcomini und Giger 1987, De Voogt et al. 1997).

In Abb. 18 sind die Extraktionsausbeuten aus den drei aufgereinigten Extrakten für die einzelnen Xenoestrogene dargestellt.



*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

Abb. 18: Drei verschiedene Extraktionsmedien wurden an Aliquoten einer Klärschlammprobe (Klärschlamm nach Trocknung vom 12.3.98 des Klärwerks Steinhäule, Ulm/Neu-Ulm) getestet, um die Extraktionseffizienz zu optimieren. Die Konzentrationen der detektierten phenolischen Xenoestrogene sind in µg/g Trockengewicht angegeben.

Bei der Extraktion mit Methanol/Diethylether (10:1) + 0,1 % (V/V) HCl conc. wurden wesentlich höhere Extraktionsausbeuten für die detektierten phenolischen Xeno-

estrogene erzielt. Dieses Extraktionsmittel ermöglichte auch den Nachweis von 4-Hydroxybiphenyl in der Klärschlammprobe. Die Extraktion mit Hexan/Aceton/Diethylether (5:5:1) + 0,1 % (V/V) HCl conc. bzw. mit Methanol ergaben vergleichbare Konzentrationen. 4-Hydroxybiphenyl war mit beiden Extraktionsmitteln nicht nachweisbar. Die Lösungsmittelmischung Methanol/Diethylether (10:1) + 0,1 % (V/V) HCL conc. wurde als Extraktionsmittel ausgewählt, um eine effiziente Extraktion zu gewährleisten.

4.4.1.2 Wiederfindung

Die Wiederfindungsraten der acht phenolischen Xenoestrogene wurden nach Soxhletextraktion und Anwendung der entwickelten Aufreinigung (*clean up*) bestimmt. Aliquote von 3 g einer dotierten Sedimentprobe (Braunsel-Sediment vom 10.6.99) wurden parallel mit der Extraktionsmittelmischung Methanol/Diethylether (10:1) + 0,1 % (V/V) HCl conc. extrahiert. Voraussetzung für dieses Experiment war eine homogene Probenmatrix und die gleichmäßige Verteilung und Adsorption der Komponenten auf der Probenmatrix. Die Sedimentprobe wurde im Mörser pulverisiert und anschließend folgendermaßen dotiert: 400 µl des Arbeitsstandards (1:10) wurden in ca. 300 ml Methanol gelöst und zu 28 g Sedimentprobe gefügt. Nachdem die Suspension gut geschüttelt wurde, wurde das Methanol am Rotationsverdampfer vollständig entfernt. Beim Abzug des Lösungsmittels erfolgte durch die rotierende Bewegung des Rundkolbens zusätzlich eine gute Durchmischung und Benetzung der Sedimentpartikel mit den gelösten phenolischen Xenoestrogenen. Diese aufwendige Vorgehensweise zur Dotierung der Sedimentprobe sollte reale Adsorptions- und Verteilungsverhältnisse widerspiegeln. Beim Auftrag der reinen Standardlösung auf die Probe werden die Komponenten punktuell in einer verhältnismäßig hohen Konzentration aufgebracht.

Parallel zu den dotierten Sedimentaliquoten wurde ein nicht dotiertes Aliquot als Blindprobe analysiert.

Die Ergebnisse aus diesem Experiment sind in Tab. 10 zusammengefasst. Es sind die Wiederfindungsraten der acht phenolischen Xenoestrogene aus der Dreifachbestimmung und die zugehörigen relativen Standardabweichungen angegeben.

Die Wiederfindungsraten der acht phenolischen Xenoestrogene lagen über 56 %. Die analytische Genauigkeit der Methode war mit relativen Standardabweichungen unter 30 % zufriedenstellend. Zur Beurteilung der Ergebnisse dieses Experimentes wurde der „Spiking Level“ der Komponenten, der bei 140 ng/g lag, herangezogen. In anderen Studien lag er für 4-Nonylphenol mit 5 und 50 µg/g deutlich höher (Kreisselmeier und Dürbeck 1997, Lee und Peart 1995). Die Wiederfindungsraten für 4-Nonylphenol

lagen bei diesen Studien zwischen 90 und 98 %. Kreisselmeier und Dürbeck (1997) konnten zeigen, dass eine gealterte dotierte Sedimentprobe die Wiederfindung von 4-Nonylphenol reduzierte. Die Wiederfindungsrate lag bei 55 %. Kreisselmeier und Dürbeck (1997) vermuteten, dass Komponent-Matrix-Interaktionen, wie Wasserstoffbrückenbindung und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, während des Alterungsprozesses ansteigen und die Extraktion der Komponenten erschweren.

Chaloux et al. (1994), die Sedimentproben ($n = 4$) mit ca. 100 ng/g dotierten, bestimmten für 4-Nonylphenol eine Wiederfindungsrate von 70 ± 10 %. Die Soxhletextraktion der Sedimentprobe erfolgte hierbei mit Dichlormethan/Methanol (2:1). Der „Spiking-Level“ und die Wiederfindungsrate bei Chaloux et al. (1994) sind mit dem Ergebnis dieser Arbeit (71 ± 9 %) vergleichbar.

Tab. 10: Wiederfindungsraten (\pm RSD) nach Soxhletextraktion und *clean up* von 3 Aliquoten einer dotierten Sedimentprobe (Braunsel-Sediment vom 10.6.99).

Substanz	Wiederfindungsrate (\pm RSD) [%] Soxhletextraktion und <i>clean up</i>
4- <i>tert</i> -Octylphenol	70 ± 21
4-Nonylphenol*	71 ± 9
Bisphenol A	56 ± 6
2- <i>tert</i> -Butyl-4-methylphenol	58 ± 29
4-Hydroxybiphenyl	130 ± 4
2-Hydroxybiphenyl	60 ± 5
4-Chlor-3-methylphenol	67 ± 23
4-Chlor-2-methylphenol	60 ± 13

*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

Die in dieser Arbeit ermittelten Wiederfindungsraten sind als gute Resultate einzustufen, wenn Aspekte wie der geringe „Spiking Level“ und mögliche Komponent-Matrix-Wechselwirkungen zur Beurteilung mit herangezogen werden. Bei der Dotierung des Braunsel-Sediments wurde vermutlich die Ausbildung von Komponent-Matrix-Interaktionen durch homogene Verteilung der niedrigkonzentrierten Komponenten auf die verhältnismäßig große Oberfläche der Sedimentpartikel gefördert.

4.4.2 Aufreinigung

Bei der Extraktion werden neben den erwünschten zu bestimmenden phenolischen Xenoestrogenen unerwünschte Matrixbestandteile herausgelöst, die die fehlerfreie quantitative Analytik mittels HRGC/LRMS verhindern oder beeinträchtigen. Zur Abtrennung dieser Matrixbestandteile wurde ein *clean up* zwischen Extraktion und quantitative Analytik geschaltet. Bei der Entwicklung einer leistungsfähigen Aufreinigung wurden niedrige Nachweis- und Bestimmungsgrenzen bei gleichzeitig geringer Probenmenge und die Möglichkeit angestrebt, sowohl Sediment- als auch Klärschlammproben analysieren zu können.

Flüssig-flüssig-Trennung

Das entwickelte und validierte Flüssig-flüssig-Trennverfahren ist in Abb. 19 dargestellt.

Das *clean up*-Verfahren basiert auf dem Prinzip der Phenolatbildung der phenolischen Xenoestrogene in alkalischer Lösung. Die phenolischen Xenoestrogene, die sich mit 2 M NaOH-Lösung ausschütteln lassen, wurden nach Bildung ihrer freien Phenole auf 200 mg ENV+-Festphase angereichert und eluiert. Die in der organischen Phase verbleibenden phenolischen Komponenten wurden ohne weitere Aufreinigung direkt derivatisiert und mittels HRGC/LRMS gemessen.

Zur Validierung des *clean up* wurde die prozentuale Verteilung der phenolischen Xenoestrogene auf die organische und wässrige Phase bestimmt und durch Aufsummierung der prozentualen Verteilungen die Gesamtwiederfindungsraten ermittelt. Drei 50 ml-Aliquote Hexan wurden mit 1 µg je Komponente versetzt, dem *clean up*-Verfahren unterworfen und quantitativ analysiert.

Verteilung der phenolischen Xenoestrogene auf die wässrige und organische Phase

Bisphenol A, 4-Hydroxybiphenyl, 2-Hydroxybiphenyl, 4-Chlor-3-methylphenol und 4-Chlor-2-methylphenol wurden quantitativ im Festphaseneluat der wässrigen Phase wiedergefunden (vgl. Wiederfindungsraten in Tab. 11). 4-Nonylphenol, 4-*tert*-Octylphenol und 2-*tert*-Butyl-4-methylphenol wurden mit 87 %, 75 % und 88 % in der Hexanphase identifiziert. Der lipophile Charakter und die resultierende geringe Phenolatbildung der drei letzteren Verbindungen mögen das Verbleiben in der organischen Phase erklären. Der lipophile Charakter läßt sich für 4-Nonylphenol und 4-*tert*-Octylphenol wiederum durch den hohen Verteilungskoeffizienten $\log K_{OW} > 4$ und für 2-*tert*-Butyl-4-methylphenol durch die mögliche Abschirmung der

phenolischen Hydroxygruppe durch die voluminöse *tert*-Butylgruppe in *ortho*-Stellung erklären.

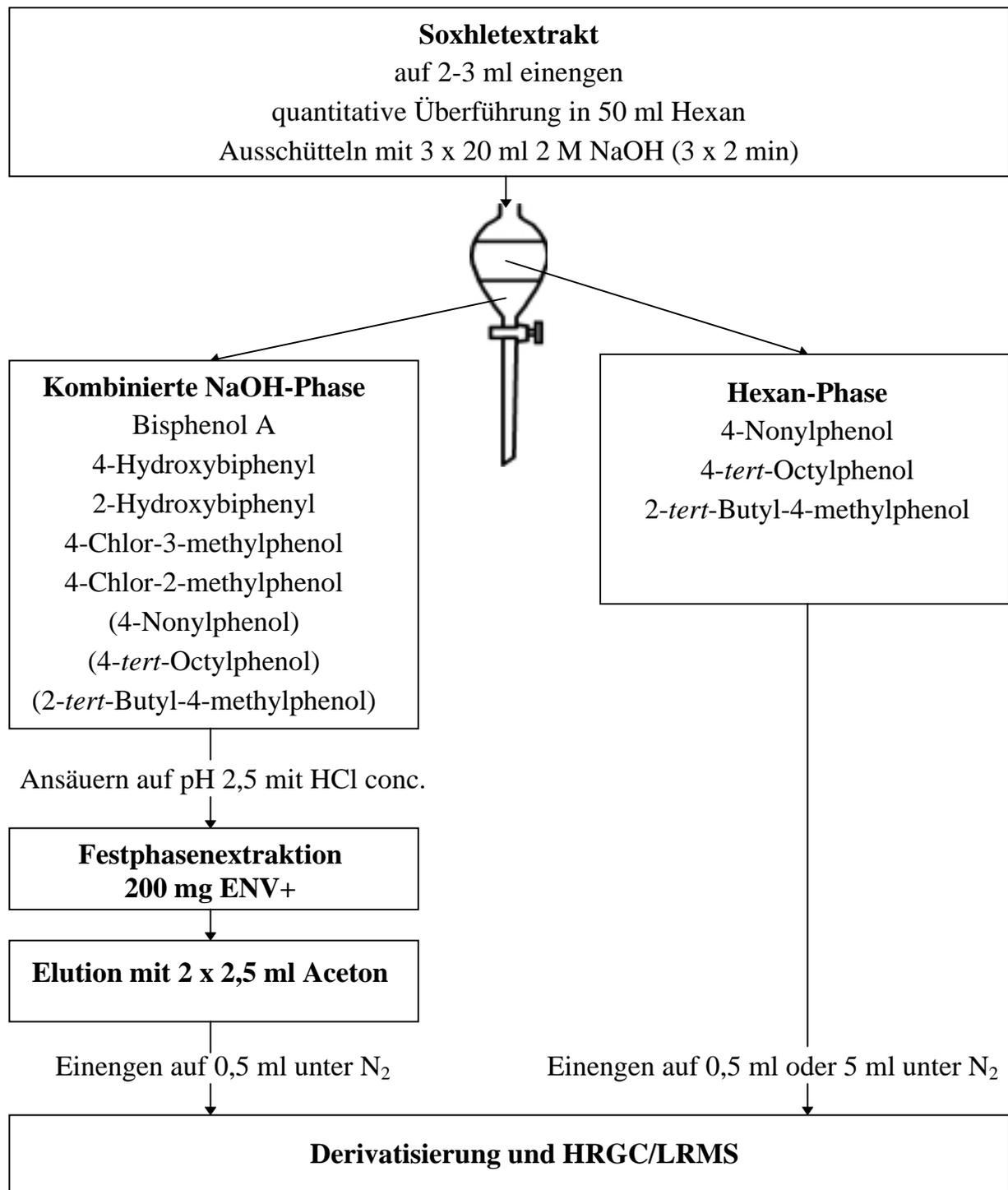


Abb. 19: Schematische Darstellung des *clean up* für die acht phenolischen Xenoestrogene.

Die Verlängerung der Ausschüttelzeit auf dreimal 10 Minuten änderte das Verteilungsgleichgewicht der drei Komponenten zwischen den beiden Phasen nicht. Bei der

Analytik von Sediment- und Klärschlammproben wurde jedoch festgestellt, dass Matrixeffekte die Verteilung dieser drei Komponenten auf die beiden Phasen beeinflussten und veränderten. Das unterschiedliche Verhalten der acht phenolischen Xenoestrogene beim Ausschütteln, das bereits unter III.I 4 vermutet wurde (strukturelle Unterschiede der phenolischen Xenoestrogene), erforderte die Analytik und Quantifizierung beider Fraktionen, um alle Substanzen quantitativ zu bestimmen.

Wiederfindung

Die Wiederfindungsraten, die nach Anwendung der Aufreinigung auf die dotierten Hexan-Aliquote bestimmt wurden, sind in Tab. 11 aufgeführt. Sie lagen zwischen 92 und 123 % und die relativen Standardabweichungen der Dreifachbestimmung lagen für alle acht phenolischen Xenoestrogene unter 10 %. Die hohen Wiederfindungsraten bewiesen, dass durch Anwendung des entwickelten *clean up* keine wesentlichen Verluste auftraten. Die Aufreinigung von Sediment- und Klärschlammextrakten zur parallelen Bestimmung der acht strukturell verschiedenen phenolischen Xenoestrogene ist folglich durch das entwickelte Flüssig-flüssig-Trennverfahren möglich.

Tab. 11: Wiederfindungsraten (\pm RSD) nach Anwendung des *clean up* auf 3 dotierte Hexan-Aliquote (1 $\mu\text{g}/50$ ml je Komponente).

Substanz	Wiederfindungsrate (\pm RSD) [%] Aufreinigung(Scheidetrichter)
4- <i>tert</i> -Octylphenol	110 \pm 4
4-Nonylphenol*	100 \pm 7
Bisphenol A	98 \pm 10
2- <i>tert</i> -Butyl-4-methylphenol	101 \pm 6
4-Hydroxybiphenyl	123 \pm 10
2-Hydroxybiphenyl	98 \pm 9
4-Chlor-3-methylphenol	97 \pm 8
4-Chlor-2-methylphenol	92 \pm 8

*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

Flüssigkeitschromatographische Aufreinigung

Während der Entwicklung einer geeigneten Aufreinigungsmethode wurde eine flüssigkeitschromatographische Aufreinigung konzipiert und getestet. Flüssigkeitschromatographische Aufreinigungen sind für 4-Nonylphenol mehrfach in der Literatur beschrieben. Es werden Adsorbentien wie Silicagel (Lee und Peart 1995), neutrales Alumina (Chaloux et al. 1994) und Aminosilica (Marcomini et al. 1990) verwendet. Bei diesem *clean up*-Verfahren, das detailliert unter IV.I 2.5.2 beschrieben ist, erfolgte die chromatographische Aufreinigung an Silicagel. Diese Methode wurde ebenfalls durch Bestimmung der Wiederfindungsraten von Arbeitsstandards validiert. Es wurde auf fünf Silicagel-Säulen ca. 1 µg je Komponente aufgetragen und anschließend (1) mit 5 ml Pentan und (2) mit 5 ml *n*-Heptan/Ethylacetat/Methanol (6:2:2) eluiert. Zur Überprüfung, ob die Elution vollständig war, wurde nochmals mit 5 ml *n*-Heptan/Ethylacetat/Methanol (6:2:2) nacheluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden separat quantitativ analysiert.

Dieses *clean up*-Verfahren wurde nicht zur routinemäßigen Aufreinigung von Sediment- und Klärschlammproben eingesetzt, da nach Anwendung auf reale Proben festgestellt werden musste, dass keine ausreichende Reinigung der Extrakte, vor allem der von Klärschlämmen erzielt werden konnte. Die eindeutige Identifikation mittels HRGC/LRMS von phenolischen Xenoestrogenen nahe der Nachweisgrenzen war nicht möglich. Dennoch sind die Ergebnisse dieses Wiederfindungsexperiments der Vollständigkeit halber aufgeführt. Das chromatographische Verfahren könnte theoretisch zur Aufreinigung von stark verschmutzten Wasserproben eingesetzt werden.

Das Prinzip der chromatographischen Abtrennung beruht darauf, dass unpolare Substanzen und Schwefel in die Vorfraktion eluieren und anschließend die phenolischen Xenoestrogene von stark polaren Substanzen wie organischen Säuren und Polyphenolen, die auf der Säule adsorbiert bleiben, abgetrennt werden.

Die Ergebnisse aus den einzelnen Fraktionen sind in Tab. 12 dargestellt. In die Pentanfraktion eluierte keines der acht phenolischen Xenoestrogene. Zur ihrer möglichst vollständigen Elution musste ein Eluent mit einem stark polaren Anteil ausgewählt werden. Die Eluentenmischung *n*-Heptan/Ethylacetat/Methanol (6:2:2) ermöglichte eine Wiederfindung zwischen 65 und 85 %. Bei der Erhöhung des Elutionsmittelvolumen auf 10 ml zeigten die Wiederfindungsraten nur einen minimalen Anstieg. Bei Bisphenol A konnten maximal 5 % mehr gefunden werden. Die Erhöhung des Elutionsmittelvolumens birgt jedoch die Gefahr, dass polarere Substanzen abgelöst werden und den Extrakt verschmutzen. Aus diesem Grund sollte das Elutionsvolumen nur 5 ml betragen.

Tab. 12: Wiederfindungsraten (\pm RSD) nach Chromatographie an 1,7 g Silicagel ($n = 5$). Auf die Säulen wurde 1 μ g je Komponente aufgegeben. Die Ergebnisse der einzelnen Fraktionen, sowie die Summe aus der Elution und der Nachelution mit *n*-Heptan/Ethylacetat/Methanol (6:2:2) sind aufgeführt.

Substanz	Wiederfindungsrate (\pm RSD) [%]			
	Vorelution 5 ml Pentan	Elution 5 ml ^a	Nachelution 5 ml ^a	Summe
4- <i>tert</i> -Octylphenol	-	80 \pm 5	2	82 \pm 6
4-Nonylphenol*	-	80 \pm 8	2	82 \pm 9
Bisphenol A	-	77 \pm 9	8	85 \pm 12
2- <i>tert</i> -Butyl-4-methylphenol	-	85 \pm 6	-	85 \pm 6
4-Hydroxybiphenyl	-	81 \pm 10	1	82 \pm 11
2-Hydroxybiphenyl	-	76 \pm 7	1	77 \pm 8
4-Chlor-3-methylphenol	-	79 \pm 7	2	81 \pm 7
4-Chlor-2-methylphenol	-	65 \pm 10	2	67 \pm 9

^aHeptan/Ethylacetat/Methanol (6:2:2)

*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

4.4.3 Methodische Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die methodischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen hängen unmittelbar von Aspekten des Extraktions- und *clean up*-Verfahrens und den instrumentellen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (vgl. III.I 4.2.3) ab. Die extrahierte Probenmenge, das Volumen des eingeeengten Extraktes und das zur Derivatisierung entnommene Aliquot müssen zur Berechnung der methodischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für feste Proben mit einbezogen werden.

Die instrumentellen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind in Tab. 13 angegeben. Sie wurden auf eine Probenmenge von 3 - 10 g, ein Endvolumen des Extraktes von 0,5 bzw. 5 ml und auf ein Aliquot zur Derivatisierung zwischen 20 und 50 μ l bezogen. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass nur die Hexanphase ein Endvolumen von 5 ml erreichte. Der SPE-Extrakt der wässrigen Phase wurde generell auf 0,5 ml eingeeengt. Deshalb resultierten für die phenolischen Xenoestrogene, die vollständig in die wässrige Phase ausgeschüttelt werden konnten, niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Die Nachweisgrenzen lagen für die acht phenolischen Xenoestrogene

zwischen $< 0,5$ und $18,7$ ng/g. Die unteren Bestimmungsgrenzen lagen innerhalb einer Spanne von $0,6$ bis 35 ng/g.

Tab. 13: Nachweis- und untere Bestimmungsgrenzen der analytischen Methoden für 3 bzw. 10 g Trockengewicht (Klärschlamm bzw. Sediment).

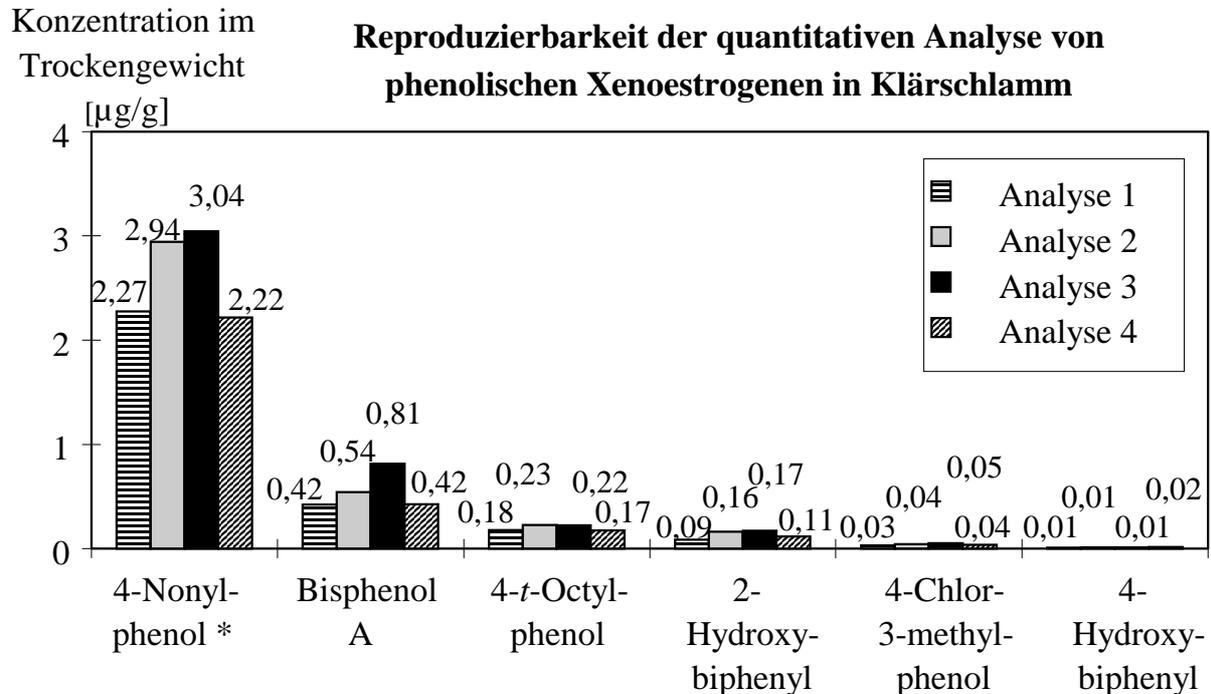
Substanz	Nachweisgrenze [ng/g]	untere Bestimmungsgrenze [ng/g]
4- <i>tert</i> -Octylphenol	$< 0,5 - < 16,5$	1 - 30
4-Nonylphenol*	0,5 - 18,7	1 - 35
Bisphenol A	$< 0,5 - < 1,7$	2 - 8
2- <i>tert</i> -Butyl-4-methylphenol	0,5 - 17,2	1 - 35
4-Hydroxybiphenyl	$< 0,5 - < 1,7$	1 - 3
2-Hydroxybiphenyl	$< 0,5 - < 1,7$	1 - 4
4-Chlor-3-methylphenol	$< 0,6 - < 1,8$	0,6 - 2
4-Chlor-2-methylphenol	$< 0,6 - < 1,9$	0,6 - 2

*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

4.4.4 Reproduzierbarkeit

Das entwickelte Extraktions- und *clean up*-Verfahren für feste Proben wurde auf seine Reproduzierbarkeit getestet. Klärschlamm wurde als komplexe Matrix mit einem hohen organischen Anteil ausgewählt, um die Leistungsfähigkeit der Aufreinigung in besonderem Maße auf die Probe zu stellen. Vier Aliquote einer Klärschlammprobe (Klärschlamm nach Trocknung vom 12.3.98 der Kläranlage Steinhäule, Ulm/Neu-Ulm) wurden mit dem entwickelten Extraktions- und *clean up*-Verfahren aufbereitet. Die quantitativen Ergebnisse aus den vier unabhängigen Analysen sind in Abb. 20 dargestellt. Die identifizierten phenolischen Xenoestrogene sind von links nach rechts mit abnehmender Konzentration angeordnet. Die relativen Standardabweichungen der Vierfachbestimmung lagen zwischen 16 und 34 %. Die Übereinstimmung der Einzelmessungen der sechs quantifizierten Komponenten in Verbindung mit den resultierenden Standardabweichungen beweisen die Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode und ihre Anwendbarkeit auf schwierige Matrices, wie Klärschlamm. Auch bei Verwendung der Mischung Hexan/Aceton/Diethylether (5:5:1) + 0,1 %

(V/V) HCl conc. als Extraktionsmittel konnten im Vorfeld dieses Experimentes fünf der phenolischen Xenoestrogene in derselben Klärschlammprobe (Dreifachbestimmung) reproduzierbar analysiert werden (Bolz et al. 1999 und vgl. Extraktionsausbeuten bei III.I 4.4.1.1).



*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

Abb. 20: Unabhängige Analyse von vier Aliquoten einer Klärschlammprobe (Klärschlamm nach Trocknung vom 12.3.99 des Klärwerks Steinhäule, Ulm/Neu-Ulm) nach Anwendung der entwickelten Extraktions- und *clean up*-Methode. Die Konzentrationen sind in µg/g Trockengewicht angegeben.

4.4.5 Probenahme, Probenlagerung und -vorbereitung

Probenahme

Die Probenahme bei festen Proben erfolgt aus der sogenannten Grundgesamtheit durch eine begrenzte Anzahl an Einzelproben. Bei Sedimentproben gestaltet sich die repräsentative Probenahme in der Regel sehr schwierig, bedingt durch Flussbreite, Wasserstand und steile Uferböschungen. Die Probenahme von Sedimenten erfolgte punktuell oder über einen Bereich von wenigen Metern im leicht zugänglichen Uferbereich. Es wurden mehrere Einzelproben des Oberflächensediments (1 - 4 cm)

direkt in ein gereinigtes Braunglas gefüllt ohne Verwendung sonstiger Probenahme-geräte, wie Schaufeln etc., um Kontaminationen zu vermeiden.

Die Probenahme von Klärschlämmen, die bei der Abwasser- und Schlammbehandlung anfallen, (zentrifugierter bzw. dünnschichtgetrockneter Schlamm, Primär- und Überschussschlamm) erfolgte in Form von Stichproben. Die zentrifugierten und dünnschichtgetrockneten Klärschlammproben hatten dennoch repräsentativen Charakter, da bei der Trocknung eine ständige Durchmischung stattfindet.

Probenlagerung und -vorbereitung

Grundsätzlich sollten feste Proben sofort aufgearbeitet werden, um mikrobielle Abbaureaktionen zu verhindern. Sedimentproben wurden am Tage der Probenahme aufgearbeitet, Klärschlammproben wurden bis zur Aufbereitung bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Bei festen Proben kommt der Probenvorbereitung eine große Bedeutung zu. Das Ziel der Probenvorbereitung war es, eine getrocknete und homogene Probenmatrix zu erhalten. Generell unterscheiden sich feste Proben in ihrem Wasser- bzw. Feststoffgehalt. Sedimente weisen einen sehr hohen Feststoffgehalt auf. Dagegen unterscheiden sich die einzelnen Klärschlammarten stark in ihrem Feststoffgehalt. Dünnschlämme, wie Primär- und Sekundärschlämme weisen einen Feststoffgehalt von 1 - 3 % auf. Entwässerte bzw. getrocknete Schlämme, sogenannte stichfeste Schlämme, erreichen z.B. nach Zentrifugation bis zu 25 % Trockensubstanz (TS) und nach zusätzlicher Dünnschichttrocknung bei 100 °C bis zu 45 % Feststoffgehalt. Zur Gefriertrocknung der Proben wurden die Dünnschlämme teilweise durch Zentrifugation von ihrem hohen Wasseranteil befreit. Feste Proben unterscheiden sich auch in ihrer Feststoffzusammensetzung. Um Inhomogenitäten in einer Probe zu vermeiden, wurden die Proben pulverisiert oder gemahlen. Je feiner die Partikel, desto homogener die Probe und desto größer die Oberfläche, die bei der Extraktion zu einer besseren Benetzung mit Lösungsmittel führt. Folglich konnten Einschlussverbindungen, die bei Sedimenten aus Alterungsprozessen resultieren, besser herausgelöst werden. Sedimentproben wurden vor der Gefriertrocknung gesiebt, um gröberes Material abzutrennen, das die repräsentative Verteilung verfälschen würde.

4.4.6 Zusammenfassung

Die Entwicklung einer geeigneten Analysenmethode zur simultanen Bestimmung von 4-Nonyl- und 4-*tert*-Octylphenol, Bisphenol A, 2-*tert*-Butyl-4-methylphenol, 2- und 4-Hydroxybiphenyl sowie 4-Chlor-3-methylphenol und 4-Chlor-2-methylphenol in

Sediment und Klärschlamm stellte eine noch größere Herausforderung dar als die der Entwicklung eines Analysenverfahrens für wässrige Proben. Wie bereits in den Kapiteln zur Extraktion und zur Aufreinigung (III.I 4.4.1 und 4.4.2) deutlich angeklungen, wurden bisher nur Analysenmethoden zur Bestimmung von 4-Nonylphenol und 4-*tert*-Octylphenol in diesen schwierigen Matrices beschrieben. Die Etablierung eines *clean up*-Verfahrens schien aufgrund der strukturellen Unterschiede der acht phenolischen Xenooestrogene besonders schwierig.

Eine Adsorptionschromatographie an 1,7 g Kieselgel führte nicht zu einer optimalen Aufreinigung der Extrakte. Aufgrund von Interferenzen konnten Substanzen im unteren ppb-Bereich (ng/g) nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Zur Aufreinigung der Klärschlamm- und Sedimentextrakte musste somit eine völlig andere Strategie gewählt werden.

Das entwickelte und validierte Extraktions- und *clean up*-Verfahren ist in einer übersichtlichen Darstellung in Abb. 21 zusammengefasst. Es beinhaltet die Soxhletextraktion der gefriergetrockneten und homogenisierten Probe. Die Extraktion erfolgte unter sauren Bedingungen mit einer Mischung aus Methanol/Diethylether (10:1) + 0,1 % (V/V) HCl, um sowohl die freien als auch die chemisch gebundenen (Phenolate) Phenole aus der Matrix herauszulösen. Nachdem der Extrakt eingeeengt und in Hexan überführt wurde, erfolgte die Aufreinigung, indem die Lösung dreimal mit 2 M NaOH-Lösung ausgeschüttelt wurde. Die Phenole wurden als Phenolate in die wässrige Phase überführt. Nach dem Ansäuern wurden die Komponenten, die in die wässrige Phase übergangen, auf 200 mg ENV+-Festphase angereichert und anschließend mit Aceton (oder Ethylacetat) eluiert. Die in der organischen Phase verbliebenen Komponenten (vgl. Verteilung III.I 4.4.2) wurden ohne weitere Aufreinigung direkt derivatisiert und mittels HRGC/LRMS vermessen.

Die Quantifizierung erfolgte analog dem Analysenverfahren für wässrige Proben über externe Kalibrierung. Die unteren Bestimmungsgrenzen lagen für 3 - 10 g Probe im unteren ppb-Bereich zwischen 0,6 und 35 µg/kg Trockengewicht.

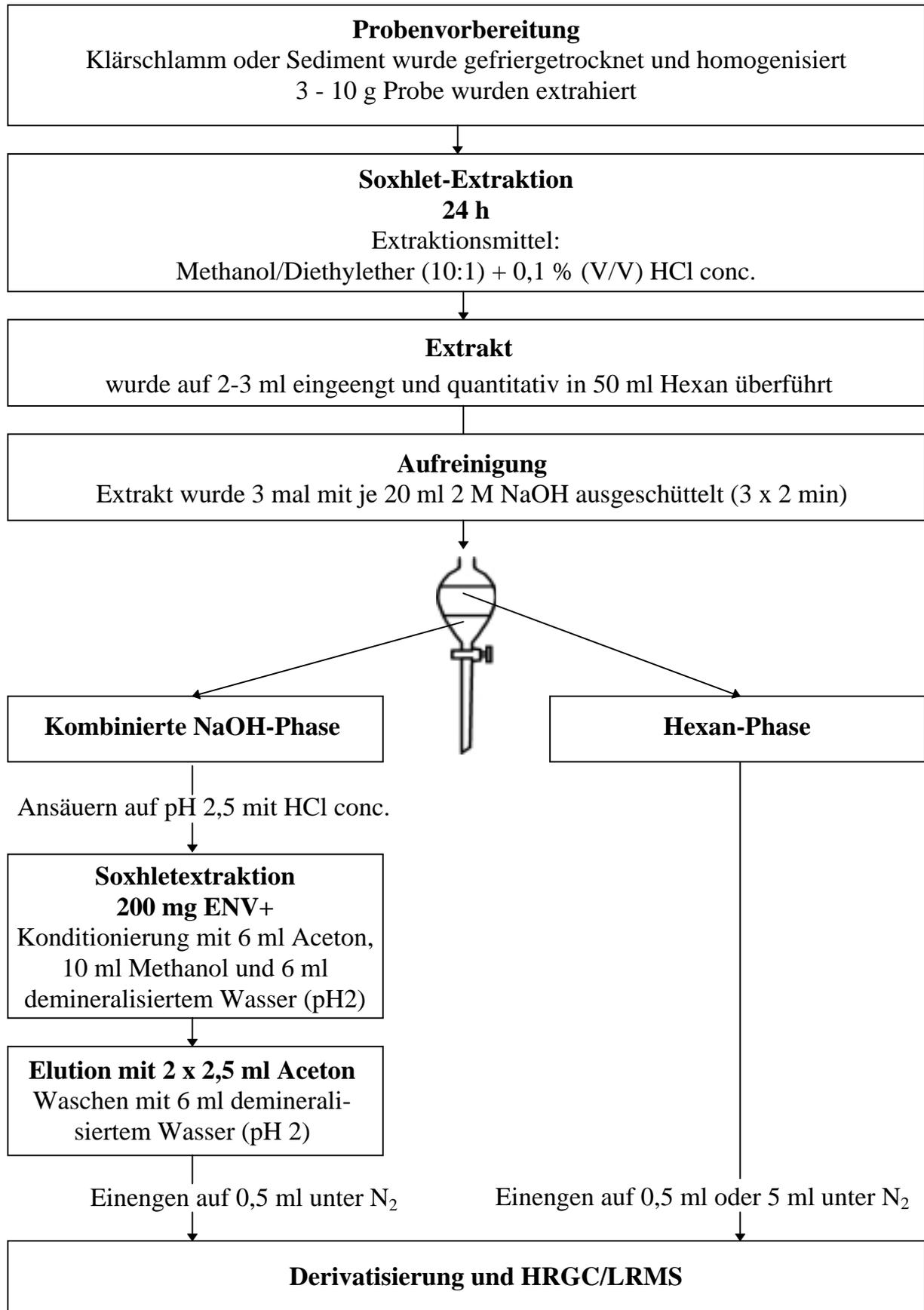


Abb. 21: Schematische Darstellung des Analysenverfahrens zum Nachweis von phenolischen Xenoestrogenen in festen Proben.

5 Natürliche und synthetische Estrogene und 17 β -Sitosterol in wässrigen Proben

Die in dieser Gruppe zusammengefassten Substanzen sind strukturell den Steroiden zuzuordnen. Steroide, zu denen unter anderem Sterole und Sexualhormone gehören, weisen als gemeinsames Grundgerüst das **Gonan** auf (Abb. 22). Die drei weiblichen Sexualhormone 17 β -Estradiol, Estriol und Estron und das synthetische Estrogen 17 α -Ethinylestradiol sind durch einen aromatischen Ring A und durch zwei Sauerstofffunktionen in Position 3 und 17 charakterisiert. Die in Position 3 sitzende Hydroxylgruppe besitzt phenolischen Charakter.

Das pflanzliche Sterol 17 β -Sitosterol, das sich von Cholesterol, dem Grundbaustein der Steroidhormone, nur durch eine C₂-Einheit in der C17-ständigen Seitenkette unterscheidet, weist im Gegensatz zu den natürlichen und synthetischen Estrogenen einen gesättigten A-Ring auf. Strukturmerkmal aller Sterole ist eine 3 β -Hydroxylgruppe und eine an Position 17 β konfigurierte Seitenkette.

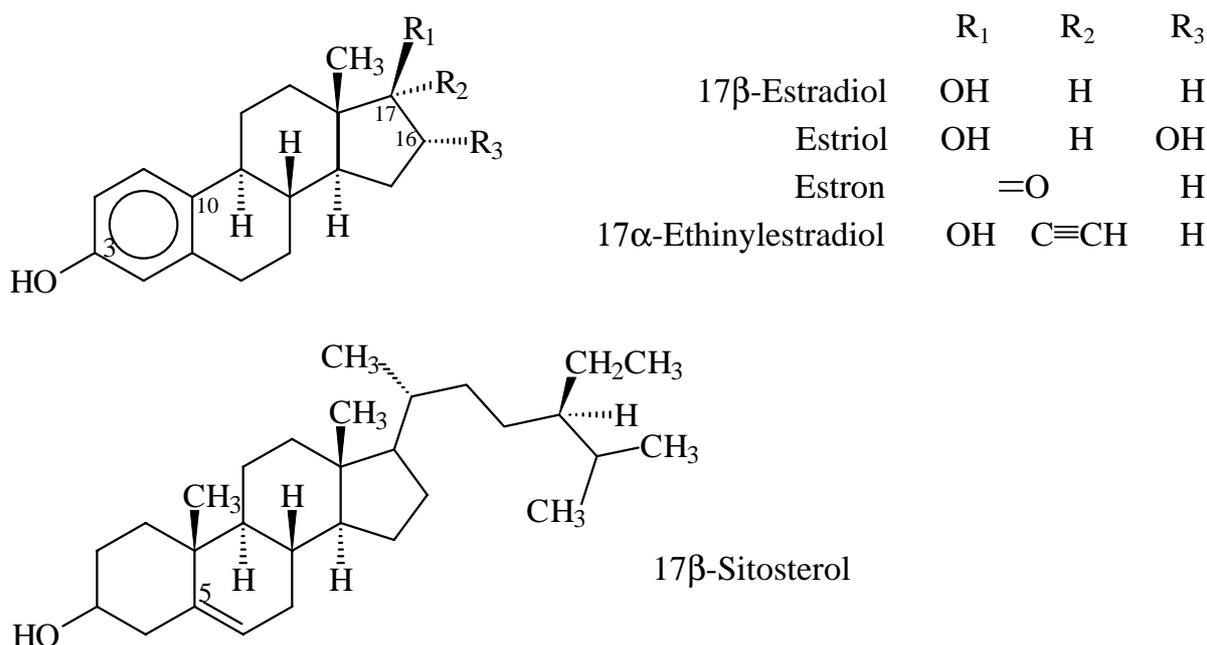


Abb. 22: Gemeinsame Steroidgrundstruktur bei den natürlichen, synthetischen Estrogenen und dem pflanzlichen Sterol 17 β -Sitosterol.

Die in dieser Arbeit untersuchten Steroide weisen aufgrund ihrer variierenden Substituenten unterschiedliche Polaritäten auf. Estriol ist durch die dritte Hydroxylgruppe in Position 16 deutlich polarer als die anderen Verbindungen. Wegen des fehlenden phenolischen Charakters und der voluminösen Seitenkette in Position 17 stellt 17 β -Sitosterol die lipophilste Verbindung dar.

Basierend auf verschiedenen, in der Literatur beschriebenen Methoden und der bereits entwickelten Extraktionsmethode zur quantitativen Bestimmung von phenolischen Xenooestrogenen in wässrigen Proben wurde ein Analysenverfahren zum simultanen Nachweis von 17β -Estradiol, Estriol, Estron, 17α -Ethinylestradiol und 17β -Sitosterol in wässrigen Proben entwickelt. Um Zulauf/Ablauf-Bilanzierungen erstellen zu können, sollte dieses Analysenverfahren auch die Untersuchung von ungereinigtem Abwasser ermöglichen. Das natürliche Estrogen Estriol wurde bisher kaum in wässrigen Proben bestimmt (Kalbfus 1997, Desbrow et al. 1998, Ternes et al. 1999a, Belfroid et al. 1999). Es sind vor allem Methoden beschrieben, die Estriol unter anderem in Urin oder Fleisch nachweisen (Fotsis und Adlercreutz 1987, Hartmann und Steinhart 1997). Eine neu vorgestellte GC-MS/MS-Methode mit On-Line-Silylierung soll zur Bestimmung von Estriol in wässrigen Proben eingesetzt werden (Holtey-Weber et al. 1999a). Allerdings wurden bisher noch keine Wiederfindungsuntersuchungen publiziert, erste Messergebnisse wurden als Posterbeitrag vorgestellt (Holtey-Weber et al. 1999b).

5.1 HRGC/LRMS

Zunehmend wird die quantitative Bestimmung von Steroiden mittels GC/MS bzw. GC-MS/MS durchgeführt (Benfenati et al. 1994, De Brabander et al. 1996, Stumpf et al. 1996, Hynning et al. 1997, Desbrow et al. 1998, Ternes et al. 1999a, Belfroid et al. 1999). Durch Einsatz der hochauflösenden Massenspektrometrie kann die Selektivität und Empfindlichkeit deutlich gesteigert werden (Kalbfus 1997). Die Anwendung von Immunoassays zur Bestimmung von Steroiden wurde bereits in den 70er Jahren in der Literatur beschrieben (Lindner et al. 1972, Korenman et al. 1974, Rurainski et al. 1977). Sie stellen nach wie vor eine sehr populäre Methode dar (Aherne und Briggs 1989, Shore et al. 1993, Gleixner und Meyer 1997). Kehrseite ist die relativ geringe Spezifität der Antikörper und die dadurch mögliche Kreuzreaktivität bei der immunologischen Reaktion, die zu unakzeptablen, falsch positiven Ergebnissen führen (Perona und Paven 1993).

5.1.1 Derivatisierung

Aufgrund ihrer sehr geringen Flüchtigkeit werden Steroide zur Bestimmung mittels GC/MS in der Regel derivatisiert. Adlercreutz et al. (1986) erachten die Derivatisierung als absolut notwendig, da Estrogene und im besonderen 2-Hydroxyestron stark im Inlet und/oder auf der Kapillarsäule adsorbiert werden. Desbrow et al. (1998) detek-

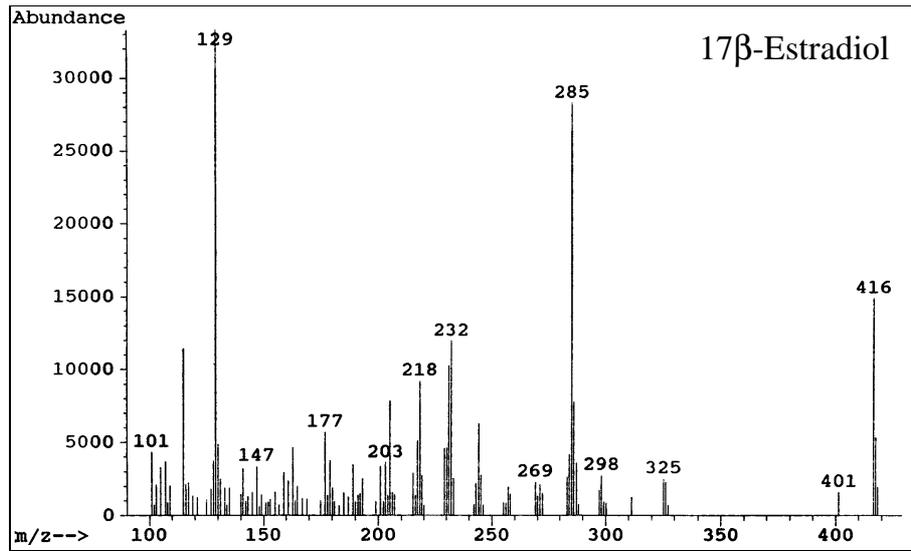
tierten Estron, 17β -Estradiol und 17α -Ethinylestradiol in ihrer freien Form, konnten jedoch bestätigen, dass die GC/MS-Analyse ihrer Silylether eine Empfindlichkeitssteigerung erzielte. Die Silylierung stellt eine sehr gängige Derivatisierungsmethode für Steroide dar (Heikkinen et al. 1981, Fotsis und Adlercreutz 1987, Stumpf et al. 1996, Schlett und Pfeifer 1996). Außerdem werden Steroide mit Heptafluorbuttersäureanhydrid umgesetzt (Perona und Paven 1993, Casademont et al. 1996).

In dieser Arbeit erfolgte die Derivatisierung der Steroide über eine Silylierung (vgl. IV.I 2.6.1). Verschiedenste Varianten und Reagenzien, die zur Silylierung eingesetzt werden können, standen zur Verfügung. Gute Erfolge wurden mit einer 3:2:3-Reagenzmischung aus N,O-bis-Trimethylsilylacetamid (BSA), Trimethylchlorsilan (TMCS) und N-Trimethylsilylimidazol (TMSI) erzielt (Stumpf et al. 1996, Wiesmüller, persönliche Mitteilung 23.6.1998). Da das Silylierungsreagenz sehr feuchtigkeitsempfindlich ist, war es absolut notwendig, dass Probenextrakte, Spritzen und Gläschen kein Restwasser aufwiesen. Die Reagenzmischung konnte vorteilhafterweise als Fertigreagenz Sylon BTZ (Supelco) in kleinen Glasampullen à 2 ml bezogen werden. Durch Inkubation der mit Sylon BTZ versetzten Standards und Probenextrakte für 1 h bei 80 °C konnte eine sehr empfindliche und störungsfreie GC/MS-Analyse aller fünf Steroide erzielt werden. Es wurden je nach Anzahl der Hydroxylsubstituenten Mono-, Bis- oder Tris-(trimethylsilyl)-Derivate (TMS-, Bis-TMS- oder Tris-TMS-Derivate) detektiert (vgl. Tab. 14). Eine Abspaltung der Ethinylgruppe bei 17α -Ethinylestradiol wurde nicht beobachtet. Bei Verwendung von reinem N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid als Silylierungsreagenz wurde neben der Bildung des erwünschten Di-TMS-Ethinylestradiol das Hauptreaktionsprodukt TMS-Estron beobachtet (Holtey-Weber et al. 1999a), das die parallele störungsfreie Detektion von Estron und 17α -Ethinylestradiol gefährdet.

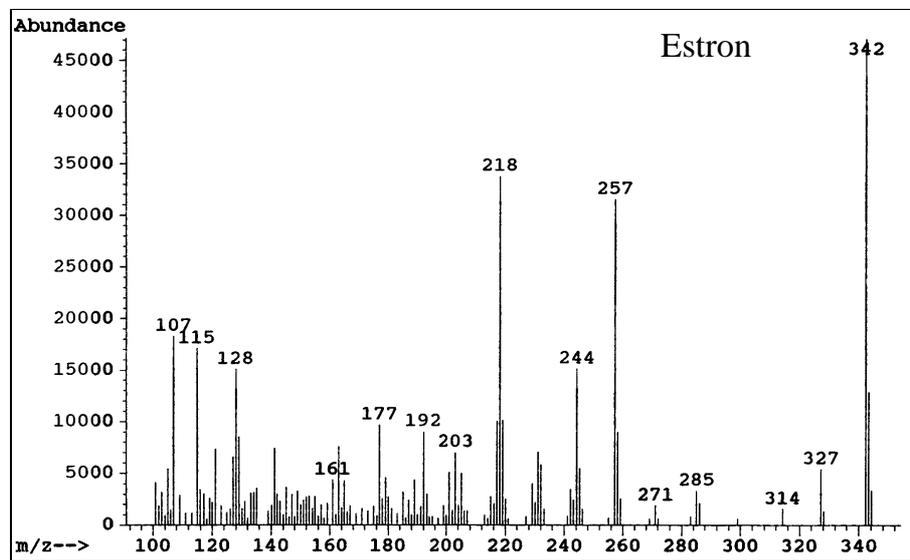
5.1.2 Massenspektrometrische Identifizierung

Die Identifizierung und Quantifizierung der Steroide erfolgte wie die der phenolischen Xenoestrogene im SIM-Modus. Die hierfür ausgewählten signifikanten Molekül- und Fragmentationen wurden durch Aufnahme der Massenspektren im Scan-Modus ausgewählt (vgl. Abb. 23a + 23b).

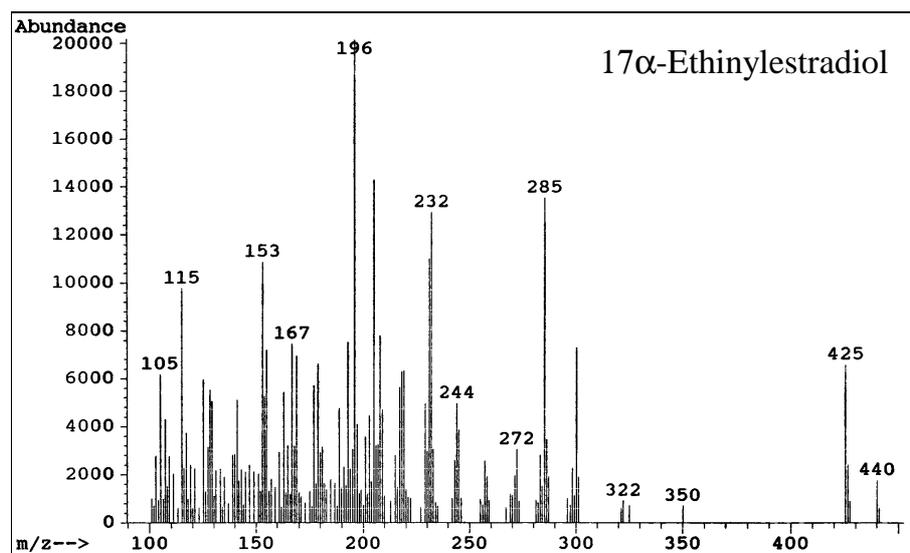
Bei höhermolekularen Substanzen, wie den Steroiden, ist es für eine sichere und empfindliche Identifikation ideal, wenn das Molekülion wie bei Estron die größte Intensität aufweist. Vor allem 17β -Sitosterol, Estriol und 17α -Ethinylestradiol wiesen in ihren aufgenommenen Massenspektren Molekülionen mit geringen Intensitäten auf.



A

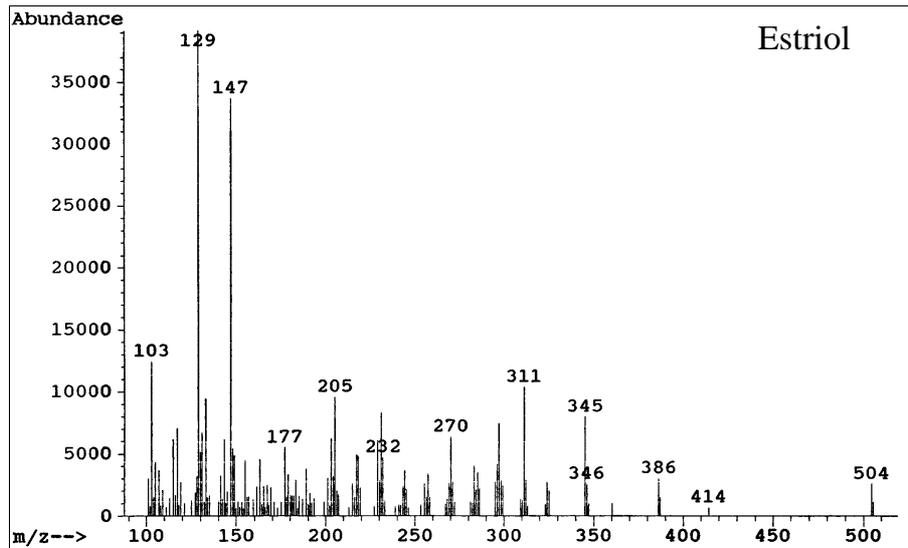


B

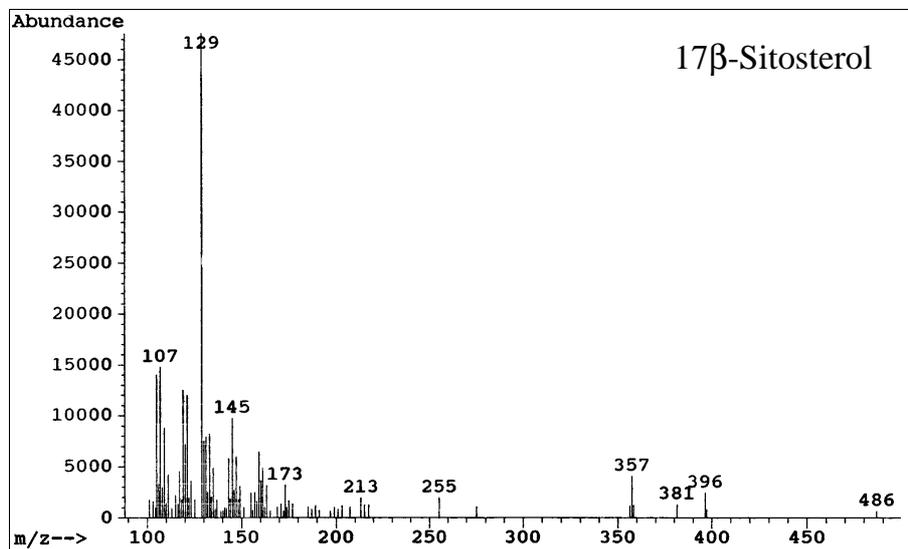


C

Abb. 23a: Massenspektren (A bis C) der Trimethylsilylether von 17 β -Estradiol, Estron und 17 α -Ethinylestradiol, aufgenommen im Scan-Modus.



D



E

Abb. 23b: Massenspektren (D und E) der Trimethylsilylether von Estriol und 17β-Sitosterol, aufgenommen im Scan-Modus.

Die Auswahl der Ionen erfolgte also unter dem Kompromiss, intensive Ionen mit einer möglichst großen Masse auszuwählen. Es wurden mindestens drei Ionen ausgewählt, da nach De Brabander et al. (1993, 1996) bei der Detektion von nur zwei Ionen Isotopeninterferenzen zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Vier oder mehr Ionen wären theoretisch ideal, aber bei Konzentrationen im Spurenbereich ohne Empfindlichkeitsverlust nicht praktikabel. Für eine objektive analytische Entscheidung scheinen drei Ionen ein akzeptabler Kompromiss (De Brabander et al. 1993, 1996).

Die Kompromisse, die bei der Auswahl geeigneter Ionen eingegangen wurden, zeigen die Schwierigkeit der Steroidanalytik deutlich auf. Die Forderung nach Ionen mit hohen Massen wurde vor allem bei der Analytik realer Proben deutlich. Je höher der m/z-Wert des detektierten, ausgewählten Ions, desto niedriger und sauberer die

Basislinie und desto sicherer die Identifikation der Substanz. Das Fragmentation mit $m/z = 129$, das bei 17β -Sitosterol, 17β -Estradiol und bei Estriol mit 100 %-Intensität auftrat, ist der Basispeak der meisten silylierten 5-En-Sterole und auch vieler silylierter Komponenten (Benfenati et al. 1994). Dennoch wurde 17β -Sitosterol über dieses Fragmentation $m/z = 129$ quantifiziert. Die Aufnahme von 17β -Sitosterol in einem eigenen Fenster ermöglichte die Detektion einer Reihe weiterer Ionen und somit seine eindeutige Identifizierung.

Die charakteristischen Ionen wurden im SIM-Modus erst ab 11,50 min registriert, um Filament und Ionenquelle nicht unnötig durch aggressives Silylierungsreagenz zu belasten, das vor diesem Zeitpunkt eluierte. Zur Steigerung der Empfindlichkeit in Folge einer Erhöhung der „dwell time“ (Verweilzeit pro Masse je Registrierzyklus) wurden die Ionen in 3 Gruppen bzw. Fenstern registriert (vgl. Tab. 14.).

Tab. 14: Auflistung der silylierten Steroide mit steigender Retentionszeit und ihrer charakteristischen Ionen, die in 3 Zeitfenstern im SIM-Modus registriert wurden. Das Quantifizierungsson ist **fett** gekennzeichnet und das Molekülion ist separat angegeben. Die Anzahl der Trimethylsilyl (TMS)-Gruppen je Steroid sind angegeben.

Zeitfenster SIM-Modus)	Substanz	Anzahl der TMS	Retentionszeit [min]	Molekülion m/z	charakteristische Ionen m/z
1	(1) 17β -Estradiol	2	13,35	416	416 , 285, 129
	(2) Estron	1	13,51	342	342 , 257, 218
2	(3) 17α -Ethinylestradiol	2	14,52	440	285 , 232, 196
	(4) Estriol	3	15,22	504	345, 311 , 129
3	(5) 17β -Sitosterol	1	22,30	486	396, 357, 145, 129 , 107

5.1.3 Gaschromatographische Trennung

Die Abb. 24 zeigt das TIC der fünf Steroide, das im Scan-Modus unter den in IX IX.I 2.6.2 beschriebenen gaschromatographischen Bedingungen aufgenommen wurde.

Durch Temperaturprogrammierung unter konstantem Heliumfluss konnte eine scharfe Trennung der fünf TMS-Derivate auf der 30 m DB XLB-Säule erzielt werden. Die Retentionszeiten der einzelnen Komponenten sind in Tab. 14 angegeben. Die Steroidderivate eluierten mit abnehmender Polarität. Durch die dreifache TMS-Veretherung

nimmt die Polarität von Estriol ab, sodass es auf der unpolaren DB XLB-Säule erst als vierte Komponente eluierte. Die TMS-Derivate weisen demnach eine andere Polaritätsfolge auf, als die freien Steroide (vgl. III.I 5).

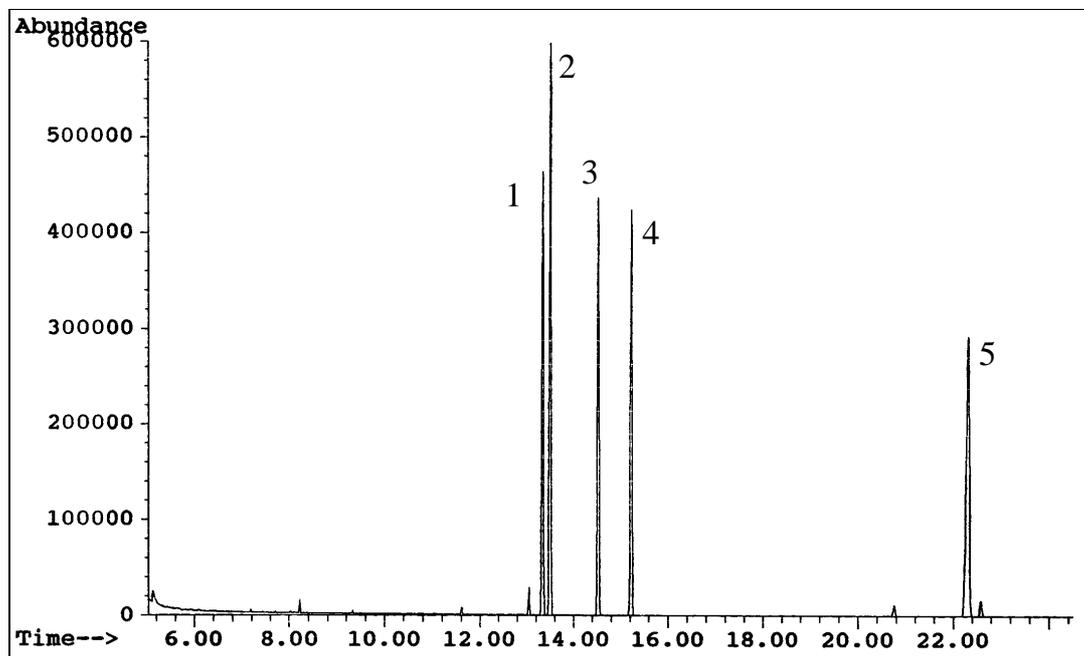


Abb. 24: TIC der fünf Steroide, aufgenommen im Scan-Modus. Bezifferung vergleiche Tab. 14.

5.1.4 Quantifizierung und Linearität

Die Quantifizierung erfolgte analog den phenolischen Xenoestrogenen über eine interne Quantifizierung unter Verwendung extern ermittelter Responsefaktoren (vgl. III.I 4.2.1). Als interne Quantifizierungsstandards standen D_3 -Testosteron und D_2 - 17β -Estradiol zur Verfügung. D_2 - 17β -Estradiol wurde vorgezogen, da es bei der Analytik realer Proben deutlich empfindlicher als D_3 -Testosteron detektiert werden konnte. Vermutlich reagiert D_3 -Testosteron unter den angewandten Inkubationsbedingungen nicht vollständig mit dem Silylierungsreagenz.

Der instrumentelle lineare Quantifizierungsbereich wurde für jedes Steroid separat durch Analytik der sechs Arbeitsstandards 1:100 bis 1:50000 (absolut 2 - 5 ng bis 10 - 25 pg) bestimmt.

Die Nachweisgrenze wurde über das Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 ermittelt. Die untere Bestimmungsgrenze wurde, wie bei den phenolischen Xenoestrogenen, experimentell über die Linearität der einzelnen Responsefaktoren ermittelt. (vgl. III.I 4.2.3). Da selbst nach Erreichen der Nachweisgrenze der lineare Bereich noch nicht verlassen

wurde, waren die Bestimmungs- und Nachweisgrenzen der natürlichen und synthetischen Estrogene identisch (vgl. Tab. 15). Sie lagen zwischen 10 und 17 pg. Die untere Bestimmungsgrenze von 17β -Sitosterol lag bei 150 pg und die Nachweisgrenze war < 25 pg.

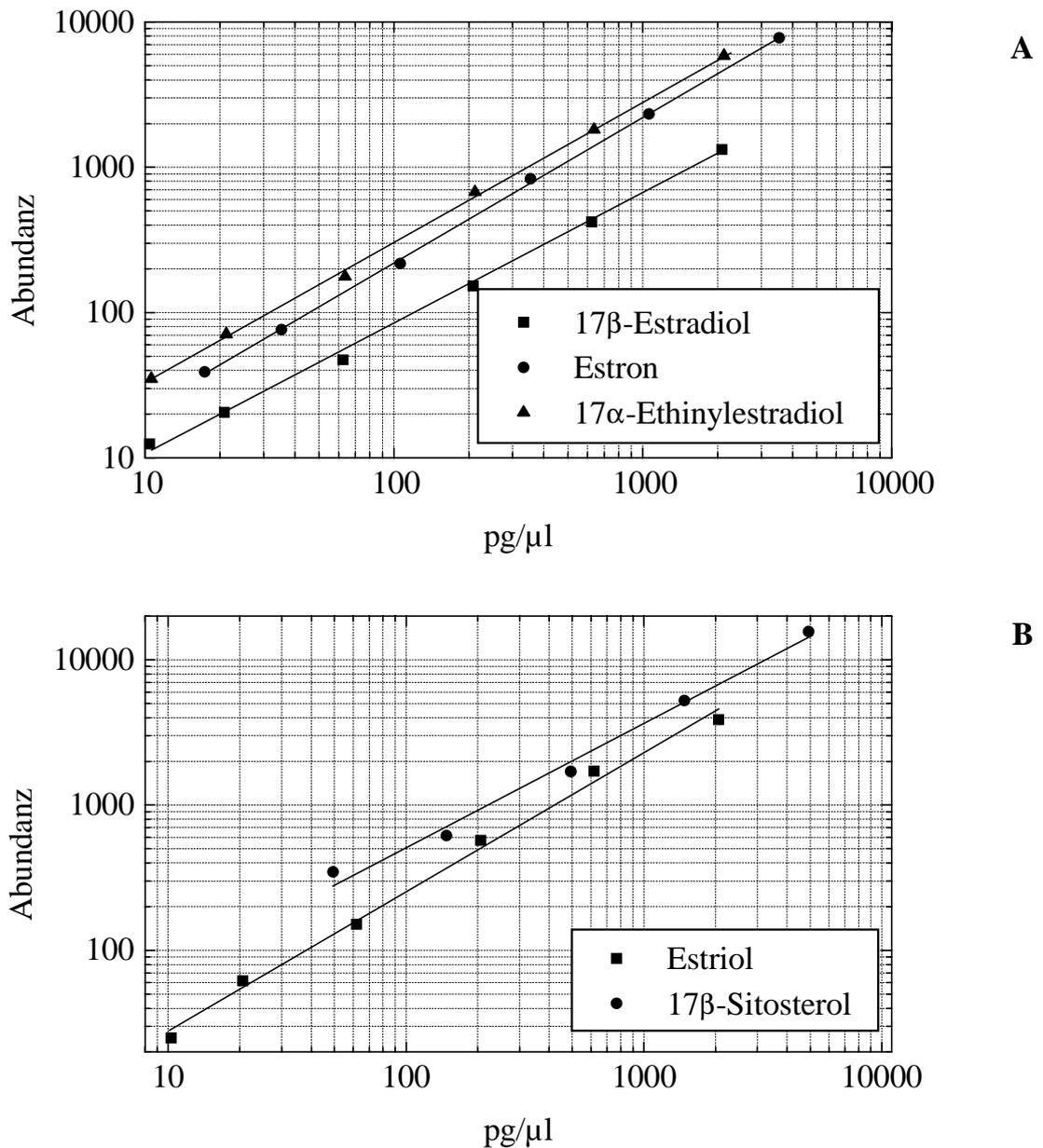


Abb.25: Diagramm A und B zeigen den linearen instrumentellen Quantifizierungsbereich der fünf Steroide (absolut). Die untere Bestimmungsgrenze bildet bei den vier natürlichen und synthetischen Estrogenen auch die Nachweisgrenze. Die Werte wurden in einer doppeltlogarithmischen Skalierung aufgetragen.

Tab. 15: Die instrumentellen Nachweisgrenzen und unteren Bestimmungsgrenzen der fünf Steroide, sowie die Korrelationskoeffizienten der Kalibriergeraden aus Abb. 25.

Substanz	Nachweisgrenze [pg absolut]	untere Bestimmungsgrenze [pg absolut]	Korrelationskoeffizient R^2
17 β -Estradiol	10	10	0,9999
Estron	17	17	1
17 α -Ethinylestradiol	11	11	0,9999
Estriol	10	10	0,9896
17 β -Sitosterol	< 25	150	0,9996

In Abb. 25 ist der lineare Bestimmungsbereich der fünf Steroide dargestellt, der vor jeder Sequenz zur Analytik realer Proben überprüft wurde. Es wurde zur übersichtlichen Darstellung des linearen Bereichs, der sich über einen Konzentrationsbereich zwischen ca. 10 pg und 5 ng erstreckt, analog den phenolischen Xenoestrogenen, eine doppeltlogarithmische Skalierung gewählt.

5.2 Extraktion und Aufreinigung

Da die Steroidanalytik ursprünglich aus dem medizinischen Bereich kommt, hat sich in der Umweltanalytik zur Anreicherung der Steroide aus wässrigen Matrices ebenfalls die Festphasenextraktion durchgesetzt (Schlett und Pfeiffer 1996, Stumpf et al. 1996, Routledge et al. 1998, Belfroid et al. 1999). In Anlehnung an die bereits für phenolische Xenoestrogene entwickelte Analysenmethode wurde die Festphasenextraktion unter Verwendung des Styroldivinylbenzol-Copolymers ENV+ zur Anreicherung der fünf Steroide getestet. Zur Überprüfung des Verfahrens wurden Wiederfindungsraten bestimmt und Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit durchgeführt. Als Testmatrices wurden Leitungswasser und Quellwasser (Breitenbach, Reutlingen) eingesetzt. Die Steroide konnten allerdings im Konzentrationsbereich von 3 ng/l ohne Aufreinigung (*clean up*) nicht mehr detektiert werden. Deshalb wurde parallel ein *clean up*, basierend auf der Methode von Stumpf et al. (1996), entwickelt. Die detaillierten Ergebnisse der Untersuchungen sind in den folgenden Kapiteln zusammengefasst.

5.2.1 Extraktion

Die validierte Extraktionsmethode ist detailliert unter IV.I 2.4.1 beschrieben und unterscheidet sich von der für phenolische Xenoestrogene nur darin, dass ausschließlich Ethylacetat zur Elution eingesetzt wurde. Die Wasserproben wurden analog den phenolischen Xenoestrogenen vor der Extraktion auf pH 2,5 angesäuert. Die Einstellung des Salzgehaltes war für die Steroide nicht notwendig, wurde aber dennoch durchgeführt, um die beiden Methoden aufeinander abzustimmen.

Tab. 16: Elutionsmittelvergleich: Erzielte Wiederfindungsraten (\pm RSD) der fünf Steroide nach Anreicherung von 1 l Leitungswasser (10 - 20 ng/l je Komponente) auf 200 mg ENV+-Festphase und Elution mit Aceton oder Ethylacetat (2 x 2,5 ml).

Substanz	Wiederfindungsrate(\pm RSD) [%]	
	Aceton (n = 3)	Ethylacetat (n = 3)
17 β -Estradiol	73 \pm 6	99 \pm 4
Estron	103 \pm 9	122 \pm 1
17 α -Ethinylestradiol	76 \pm 8	97 \pm 2
Estriol	51 \pm 8	90 \pm 0,4
17 β -Sitosterol	36 \pm 24	78 \pm 28

Die Elution mit Aceton ergab für die fünf Steroide nur mäßig befriedigende Wiederfindungsraten zwischen 36 und 103 % (vgl. Tab. 16). Vor allem Estriol und 17 β -Sitosterol wurden mit 51 bzw. 36 % schlecht wiedergefunden. Löslichkeitsversuche mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln zeigten für 17 β -Sitosterol in Aceton, Methanol und *n*-Heptan eine schlechte Löslichkeit, dagegen in Ethylacetat eine gute Löslichkeit, die durch Zugabe von wenigen Tropfen *n*-Heptan nochmals deutlich gesteigert werden konnte. Demnach war es naheliegend, Ethylacetat als Elutionsmittel zu testen. Die Wiederfindungsraten nach Festphasenextraktion von ca. 10 - 20 ng/l je Komponente und Elution mit zweimal 2,5 ml Ethylacetat sind ebenfalls in Tab. 16 aufgeführt. Sie lagen für alle fünf Komponenten bei über 78 %. Auf Grund dieses guten Ergebnisses wurde die Elution bei der Festphasenextraktion bei allen weiteren Untersuchungen mit Ethylacetat durchgeführt.

5.2.2 Aufreinigung

Das von Stumpf et al. (1996) beschriebene Aufreinigungsverfahren beinhaltet eine Adsorptionschromatographie an 1 g Silicagel (desaktiviert mit 1,5 % H₂O) unter Verwendung einer Mischung aus 65 % Hexan und 35 % Aceton als Laufmittel. In der vorliegenden Arbeit wurde durch Variation des Eluenten die Methode so verändert, dass auch Estriol quantitativ wiedergefunden werden konnte. In Tab. 17 sind die Ergebnisse der einzelnen Wiederfindungsversuche in Abhängigkeit von verschiedenen Eluenten aufgeführt. Die beiden Mischungen aus *n*-Heptan und Aceton bzw. Ethylacetat im Verhältnis 6:4 erbrachten vergleichbare Ergebnisse. Die Wiederfindungsraten lagen für alle Steroide außer für Estriol mit über 82 % sehr hoch. Durch Auftrag der Steroide auf die Kieselgelsäulen in zwei Konzentrationsbereichen („Spiking-Level“: 1 - 2 ng/l und 10 - 20 ng/l) konnte für die Mischung *n*-Heptan/Aceton (6:4) gezeigt werden, dass sich die Wiederfindungsraten über diesen Konzentrationsbereich linear verhalten. Dieses Ergebnis ist vermutlich auch auf die beiden anderen Elutionsmischungen übertragbar.

Tab. 17: Optimierung des *clean up* (Adsorptionschromatographie an 1 g Silicagel, desaktiviert mit 1,5 % H₂O) für Steroide durch Vergleich verschiedener Eluentenmischungen.

Substanz	Wiederfindungsrate (\pm RSD) [%]			
	<i>n</i> -H/A ^a (6 : 4)		<i>n</i> -H/E ^a (6 : 4)	<i>n</i> -H/E/M ^a (6 : 2 : 2)
	(n = 3)		(n = 3)	(n = 5)
„Spiking-Level“	1 - 2 ng/l	10 - 20 ng/l	10 - 20 ng/l	10 - 20 ng/l
17 β -Estradiol	117 \pm 6	88 \pm 11	91 \pm 3	95 \pm 8
Estron	105 \pm 8	95 \pm 10	100 \pm 6	119 \pm 9
17 α -Ethinylestradiol	102 \pm 4	90 \pm 8	91 \pm 11	99 \pm 7
Estriol	65 \pm 15	40 \pm 11	9 \pm 29	80 \pm 5
17 β -Sitosterol	< BG	82 \pm 5	123 \pm 3	n.b.*

*nicht bestimmbar, da das Elutionsmittel mit 17 β -Sitosterol kontaminiert war.

^aA (Aceton); *n*-H (*n*-Heptan); E (Ethylacetat)

Indem 2 der 4 Teile Ethylacetat durch 2 Teile Methanol ersetzt wurden, konnte die Polarität des Eluenten erhöht werden, ohne gleichzeitig prozentual den Volumenanteil der lipophilen Komponente zu verringern. Durch Verwendung des Laufmittels *n*-Heptan/Ethylacetat/Methanol (6:2:2) konnte das deutlich polarere Estriol nun mit einer

Wiederfindung von 80 % von der Kieselgelsäule eluiert werden. Durch Erhöhung der Polarität bestand die Gefahr, dass die auf der Silicagel-Säule adsorbierten polaren Komponenten, die es abzutrennen galt, coeluierten. Extrakte der Abwasserproben konnten jedoch mit der Mischung *n*-Heptan/Ethylacetat/Methanol (6:2:2) ausreichend gereinigt werden, sodass eine störungsfreie GC/MS-Analytik möglich war. Die Aufreinigung unter Verwendung dieser Eluentenmischung stellte demnach einen brauchbaren Kompromiss dar, bei dem die Reinigungsleistung noch nicht beeinträchtigt war. Wichtig bei der Elution mit *n*-Heptan/Ethylacetat/Methanol (6:2:2) war allerdings, dass die Kieselgelsäule vor dem Probenauftrag mit mindestens 10 ml dieser Mischung vorgespült wurde. Dadurch wurde eine vollständige Benetzung des Kieselgels gewährleistet. Ein Entzug einer Elutionsmittelkomponente während der Elution hätte eine Phasentrennung im Eluat zur Folge. *n*-Heptan und Methanol sind in dem vorliegenden Mischungsverhältnis nicht miteinander mischbar, Ethylacetat fungiert in dieser Mischung als Lösungsvermittler.

5.2.3 Überprüfung des gesamten Extraktions- und Aufreinigungsverfahrens

5.2.3.1 Dotierte(s) Leitungswasser bzw. reale Probe

Das entwickelte Extraktions- und Aufreinigungsverfahren wurde durch Bestimmung von Wiederfindungsraten in sechs Aliquoten von dotiertem Leitungswasser überprüft. Zur Ermittlung des Einflusses von Matrixeffekten wurde Quellwasser (Breitenbach) mit den fünf Steroiden versetzt (sechsfacher Ansatz) und ebenfalls die Wiederfindungsraten bestimmt. Parallel wurde zu jedem Ansatz eine Blindprobe analysiert. Durch Mehrfachbestimmung bei diesen beiden Experimenten konnte gleichzeitig die Reproduzierbarkeit der Methode überprüft werden.

Die Ergebnisse der Wiederfindungsraten und relativen Standardabweichungen für die sechs Aliquote Leitungswasser (mit ca. 10 - 20 ng/l je Komponente gespikt) und für die sechs Aliquote Quellwasser (mit ca. 3 - 6 ng/l je Komponente versetzt) sind in Tab. 18 aufgeführt.

Die erzielten Wiederfindungsraten lagen in beiden Experimenten für alle fünf Steroide über 70 % und die relativen Standardabweichungen lagen unter 31 %, bei dem dotierten Quellwasser sogar unter 14 %. Stumpf et al. (1996) erzielten bei einem „Spiking-Level“ von 10 ng/l für 17 β -Estradiol, Estron und 17 α -Ethinylestradiol bzw. 20 ng/l für 17 β -Sitosterol vergleichbare Wiederfindungsraten zwischen 76 (Estron) und 97 % (17 α -Ethinylestradiol). Die relativen Standardabweichungen lagen zwischen 10 und 30 %. Belfroid et al. (1999) konnten Wiederfindungsraten bei einer Dotierung

von ebenfalls 10 ng/l zwischen 88 und 98 % ($\pm 9 - 14$ %) für 17 β -Estradiol, Estron und 17 α -Ethinylestradiol ermitteln.

Tab. 18: Wiederfindungsraten (\pm RSD) in Prozent der fünf Steroide nach **Extraktion und Aufreinigung** von 1 l Leitungswasser (10 - 20 ng/l je Komponente) und 1 l Quellwasser aus dem Breitenbach (3 - 6 ng/l je Komponente).

Substanz	Wiederfindungsrate (\pm RSD) [%]	
	Leitungswasser	Quellwasser
	(n = 6) „Spiking-Level“ 10 - 20 ng/l	(n = 6) 3 - 6 ng /l
17 β -Estradiol	97 \pm 8	96 \pm 11
Estron	92 \pm 9	74 \pm 9
17 α -Ethinylestradiol	93 \pm 7	82 \pm 6
Estriol	72 \pm 31	70 \pm 14
17 β -Sitosterol	126 \pm 11	n.b.*

*nicht bestimmbar, da Gehalt in der Probe bei 165,6 ng/l lag.

Matrixeffekte in der realen Oberflächenwasserprobe hatten auf die Wiederfindung nur einen sehr geringen Einfluss. Bei Estron und 17 α -Ethinylestradiol sanken die Wiederfindungsraten nur geringfügig. Allerdings war nicht mit Sicherheit zu erkennen, ob Matrixeffekte oder das geringere „Spiking-Level“ für die niedrigeren Wiederfindungsraten der beiden Substanzen verantwortlich waren. Aus den Ergebnissen dieser beiden Experimente lässt sich letztendlich festhalten, dass das Extraktions- und Aufreinigungsverfahren über den Konzentrationsbereich 3 - 20 ng/l die reproduzierbare und lineare Wiederfindung der fünf Steroide gewährleistet.

In bisher untersuchten wässrigen Proben lagen die Konzentrationen von 17 β -Estradiol und 17 α -Ethinylestradiol überwiegend im unteren ng/l-Bereich oder sogar darunter (Schweinsfurth und Länge 1998, Schlett und Pfeifer 1996, Desbrow et al. 1998, Routledge et al. 1998). Deshalb war es besonders wichtig, für die natürlichen und synthetischen Estrogene zu überprüfen, ob sie im unteren ppt-Bereich quantitativ analysiert werden konnten.

5.2.3.2 Methodische Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die methodischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden nicht wie die der phenolischen Xenoestrogene durch Anwendung des gesamten Extraktions- und Aufreinigungsverfahrens auf immer geringer dotierte Proben ermittelt. Statt dessen wurden die Nachweisgrenzen für jede einzelne Substanz in jeder Probe über das Signal/Rausch-Verhältnis 3:1 bestimmt. Die Nachweisgrenzen variierten in jeder Probe je nach Gehalt an organischer Matrix und je nach Empfindlichkeit des GC/MS-Gerätes. Für Flusswasserproben wurden Nachweisgrenzen zwischen 0,1 und 4,7 ng/l bestimmt. In Abwasserproben lagen die Nachweisgrenzen auch zwischen 0,1 bis 4,6 ng/l, aber im Durchschnitt waren sie höher, da die komplexere Matrix zu höheren Basislinien führte (vgl. III.I 1.1. und 3.1 Messergebnisse). Die Nachweisgrenzen der Abwasserproben vom 10./11.3.1998 des Klärwerkes Steinhäule, Ulm/Neu-Ulm (3 - 4,6 ng/l) lagen deutlich höher als die der beiden anderen Probenreihen (0,6 - 2,8 ng/l). Das Gleiche galt für die Körsch- und die Krähenbach-Probe vom 16.1.1999. Als Ursache hierfür ließ sich die Injektion von jeweils 2 µl dieser aufbereiteten Probenextrakte vermuten. Die Chromatogramme dieser Messungen zeigten im Vergleich zu allen anderen gemessenen Probensequenzen merklich höhere Basislinien, wodurch keine geringeren Nachweisgrenzen ermittelt werden konnten. Bei allen anderen Proben wurden wie bereits unter III.I 2.2 beschrieben, immer nur 1 µl des derivatisierten Extraktes injiziert.

Bei der Analyse von Oberflächenwasser wurden von Belfroid et al. (1999) auch unterschiedliche Spannen von Nachweisgrenzen in Oberflächenwasser und gereinigtem Abwasser bestimmt. Spengler et al. (1999a) bestätigten, dass die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in Kläranlagenabläufen in Abhängigkeit von der Probenmatrix variieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden keine methodischen Bestimmungsgrenzen ermittelt. Die Bestimmungsgrenzen wurden mit den Nachweisgrenzen der natürlichen und synthetischen Estrogene gleichgesetzt, da die instrumentellen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen identisch waren. Für 17β-Sitosterol lagen die Konzentrationen immer deutlich höher als die instrumentelle Bestimmungsgrenze.

5.2.4 Probenahme, Probenlagerung und -vorbereitung

Für die Probenahme, Probenlagerung und -vorbereitung der wässrigen Proben zur Bestimmung der fünf Steroide galt das bereits unter den Kapiteln III.I 4.3.5.1 bis 4.3.5.3 Erwähnte. Unterschiede bei der Probenvorbereitung ergaben sich darin, dass nur die wässrige Phase analysiert werden konnte. Die Aufreinigung des Extraktes einer

Vollwasserprobe (Partikel- und Wasserphase) war nicht ausreichend, um eine störungsfreie HRGC/LRMS-Analytik zu ermöglichen. Deshalb wurde die auf der silanisierten Glaswolle angereicherte Partikelphase vor der Elution abgenommen oder sie wurde bereits vor der Festphasenextraktion durch Zentrifugation abgetrennt. Der Fehler, der durch Abtrennung der Partikelphase entsteht, beträgt laut einer Untersuchung von Wasserproben aus drei englischen Flüssen, bei der unter anderem der Verteilungskoeffizient von 17β -Estradiol zwischen Wasser und Trübstoffen ermittelt wurde, maximal 10 % (Jürgens und Johnson 1999).

5.3 Zusammenfassung

Basierend auf der bereits für die phenolischen Xenoestrogene entwickelten Festphasenextraktionsmethode und verschiedenen Methoden aus der Literatur konnte ein Extraktions- und Aufreinigungsverfahren entwickelt werden, das den simultanen Nachweis von 17β -Estradiol, Estron, 17α -Ethinylestradiol, Estriol und 17β -Sitosterol in Oberflächenwasser, gereinigtem und ungereinigtem Abwasser ermöglicht. Die Methode erlaubte auch die quantitative Bestimmung des 17β -Estradiol-Metaboliten Estriol, der bis zu diesem Zeitpunkt nur in geringem Umfang in wässrigen Umweltproben bestimmt wurde (Stumpf et al. 1996). Die Nachweisgrenzen, die für jede einzelne Probe über das Signal/Rausch-Verhältnis 3:1 bestimmt wurden, lagen für Oberflächenwasser zwischen 0,1 und 4,7 ng/l und für Abwasser zwischen 0,1 und 4,6 ng/l.

Das entwickelte Extraktions- und Aufreinigungsverfahren (vgl. Abb. 26) beinhaltet eine Festphasenextraktion unter Verwendung der Styroldivinylbenzol-Copolymer-Festphase. Die Elution wurde ausschließlich mit Ethylacetat durchgeführt. Die Probenvorbereitung und die Festphasenextraktion erfolgte wie bei den phenolischen Xenoestrogenen. Im Unterschied zu den Phenolen konnte nur die Wasserphase analysiert werden. Die Partikelphase wurde abgetrennt, indem sie nach Anreicherung auf silanisierter Glaswolle vor der Elution abgenommen wurde oder vor der Festphasenextraktion abzentrifugiert wurde.

Zur Aufreinigung des Eluats wurde eine Adsorptionschromatographie an 1 g Silicagel (desaktiviert mit 1,5 % Wasser) unter Verwendung der Mischung *n*-Heptan/Ethylacetat/Methanol (6:2:2) als Laufmittel durchgeführt. Nach Zusatz des internen Quantifizierungsstandards und Silylierung (1 h bei 80 °C) des zur Trockene abgeblasenen gereinigten Extraktes, wurde 1 μ l mittels HRGC/LRMS vermessen. Die quantitative Auswertung erfolgte intern über den Quantifizierungsstandard D_2 - 17β -Estradiol unter Verwendung extern bestimmter Responsefaktoren.

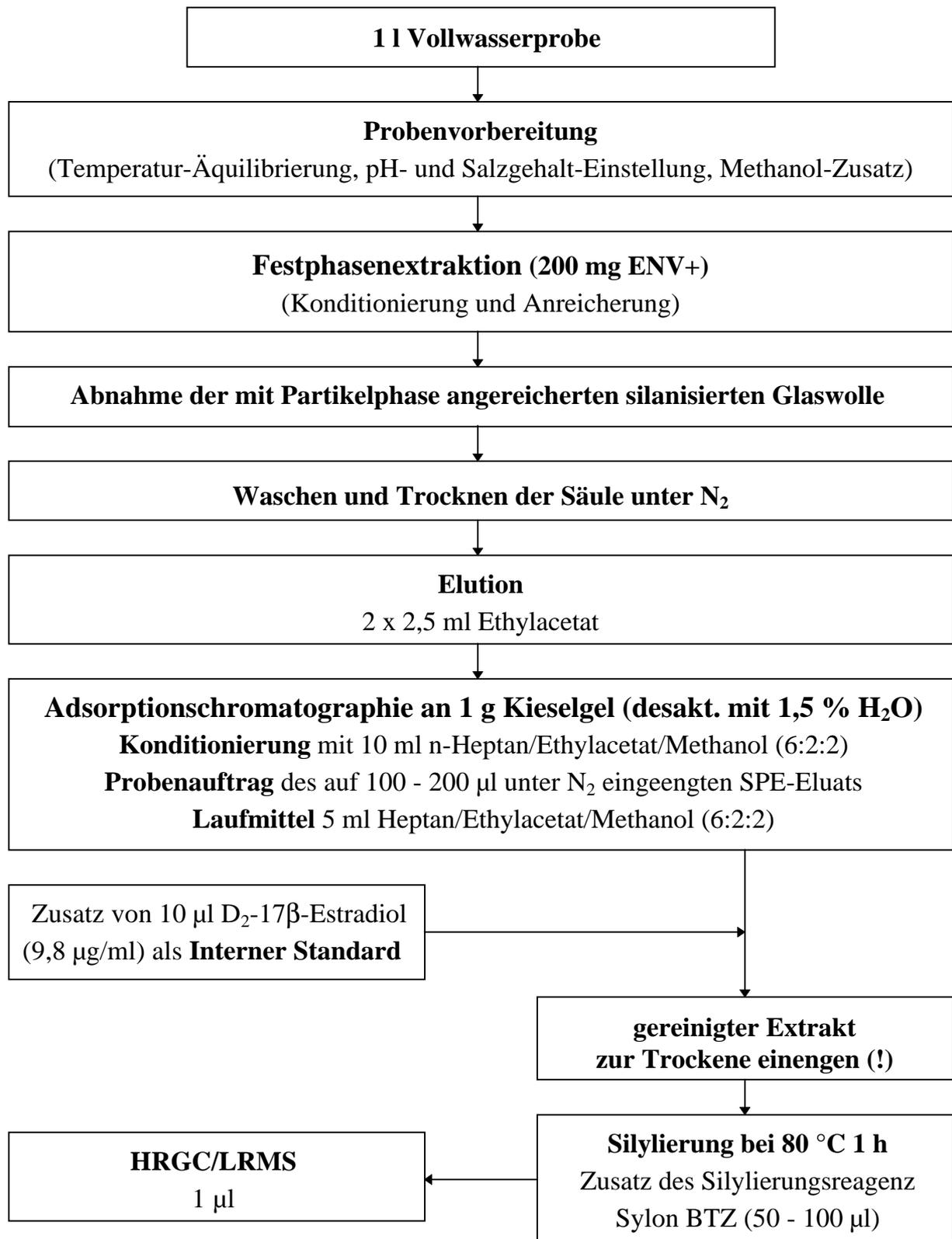


Abb. 26: Schematische Darstellung des Analysenverfahrens zum Nachweis der fünf Steroide in wässrigen Proben.

6 Zusammenfassung der entwickelten Analysenverfahren

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, drei verschiedene Analysenverfahren zu entwickeln, die den quantitativen Nachweis ausgewählter phenolischer Xenoestrogene, natürlicher und synthetischer Estrogene und des pflanzlichen Sterols 17β -Sitosterol in wässrigen und festen Proben ermöglichen. Die dabei erhaltenen Extrakte konnten im E-Screen-Assay eingesetzt werden und somit parallel die estrogene Gesamtaktivität bestimmt werden. Die Ergebnisse der chemischen Analytik und der biologischen Testung konnten unmittelbar miteinander verglichen werden, da die weitere Aufarbeitung aus den gleichen Extrakten erfolgte. Die einzelnen Aufarbeitungsschritte wurden im Rahmen dieser Arbeit für die chemische Analytik eingehend durch Wiederfindungs- und Reproduzierbarkeitsuntersuchungen überprüft, um mögliche Fehlerquellen und Verluste aufzuklären. Die Möglichkeiten, die sich durch die entwickelten Analysenverfahren ergaben, sind in Abb. 27 zusammengefasst.

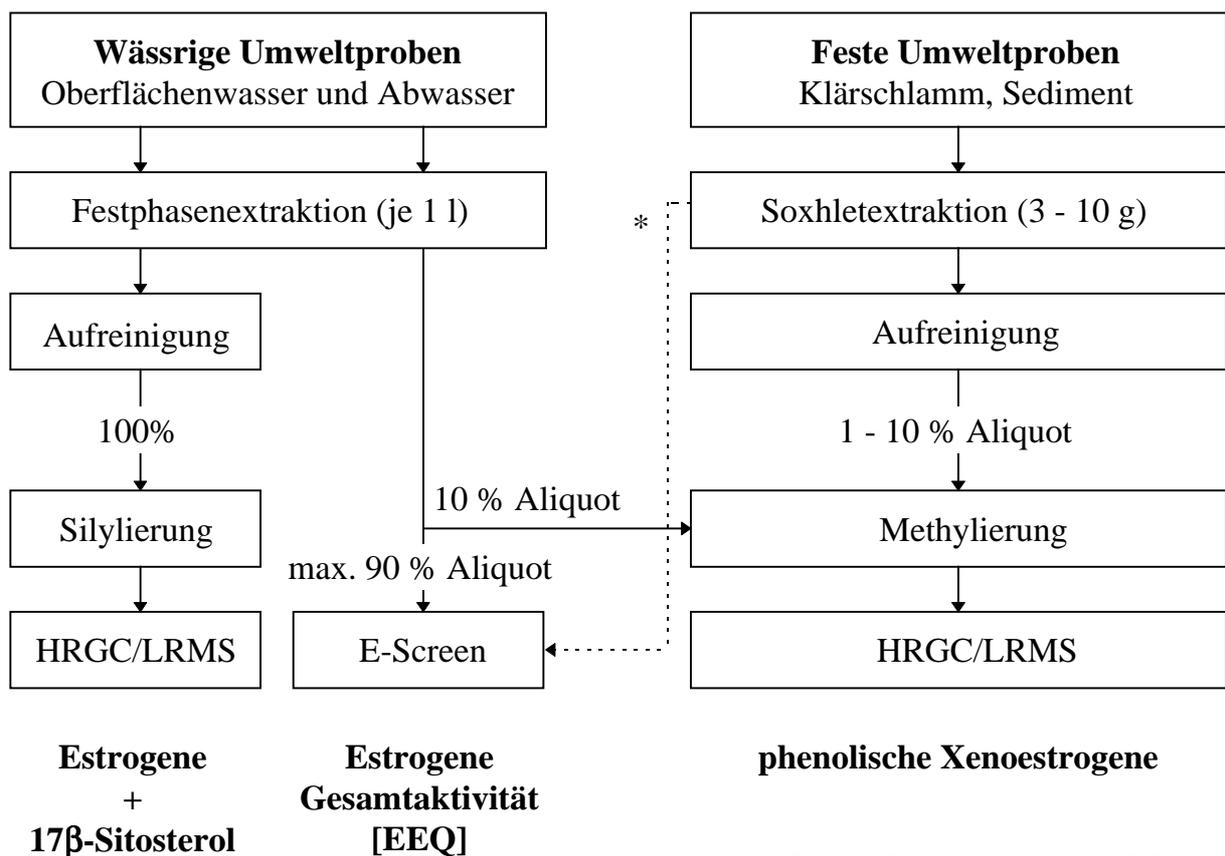


Abb. 27: Zusammenfassung der entwickelten Analysenverfahren zum quantitativen Nachweis von ausgewählten phenolischen Xenoestrogenen und Steroiden in wässrigen und festen Proben. Aliquote der Extrakte konnten im E-Screen-Assay getestet werden.

III.II Verbreitung hormonartig wirkender Substanzen in der aquatischen Umwelt

Die vorliegende Abb. 28 dient zur Übersicht über die Probenahmestellen, an denen Wasser und Sediment aus Oberflächengewässern des süddeutschen Raums im Rahmen dieser Arbeit entnommen wurden. Die Probenahmestellen sind von P1 - P13 nummeriert und in den einzelnen Kapiteln näher charakterisiert.

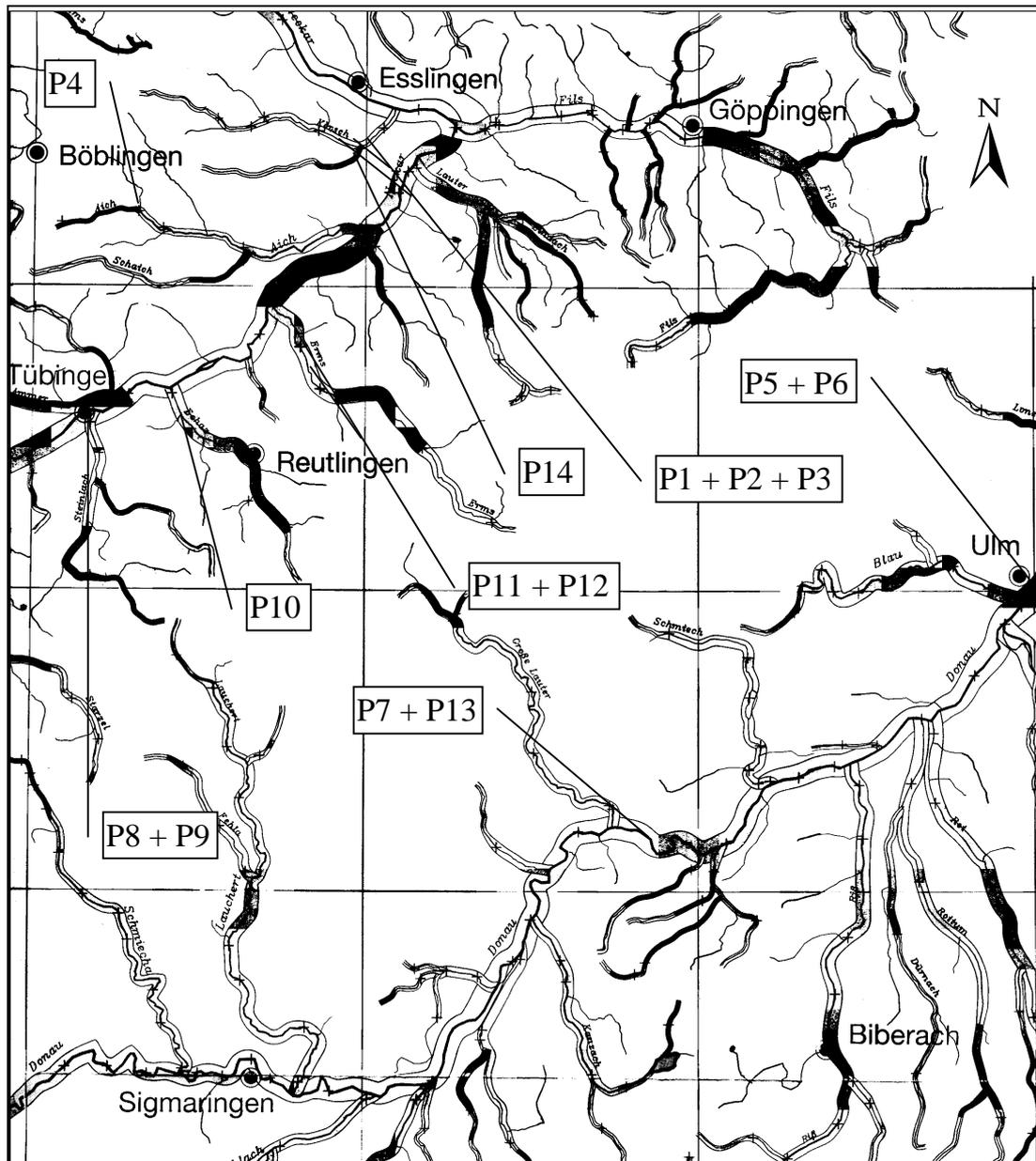


Abb. 28: Probenahmestellen von Wasser und Sediment in Oberflächengewässern in Süddeutschland (Karte aus UM 1992).

1 Oberflächengewässer

1.1 Monitoring in Körsch und Krähenbach

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein dreizehmonatiges Monitoring auf estrogenartig wirkende Substanzen in zwei kleinen Fließgewässern in Baden-Württemberg durchgeführt. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich von April 1998 bis Mai 1999. Die beiden untersuchten Fließgewässer Körsch und Krähenbach wurden bereits als Modellbäche in das BMBF-Verbundprojekt „Valimar“ aufgenommen, um die Eignung von Biomarkern zur Ermittlung der Belastung kleiner Fließgewässer mit Umweltchemikalien zu validieren. Das in dieser Arbeit unter Verwendung chemischer und teilweise biologischer Analytik durchgeführte Monitoring auf estrogenartig wirkende Substanzen stellt eine wertvolle Ergänzung zu den Ergebnissen dar, die aus diesem Projekt resultierten.

Charakterisierung von Körsch und Krähenbach

Die **Körsch** entspringt westlich von Rohr bei Stuttgart und mündet unterhalb von Deizisau in den Neckar. Die Gesamtlänge ihrer Zuflüsse beträgt ca. 95 km. Die Entwässerung umfasst den gesamten, dicht besiedelten und landwirtschaftlich intensiv genutzten Filderraum und den südlichen Raum Stuttgart bis hin zu den Ausläufern des Schönbuchs. Bei Denkendorf mündet der Sulzbach, der Schadstofffracht aus Landwirtschaft und Flughafen transportiert, in die Körsch. Die Körsch dient insgesamt sechs Kläranlagen als Vorfluter und führt somit als verhältnismäßig kleiner Vorfluter mit den in der Tab. 19. aufgeführten Daten eine große Fracht an geklärtem Abwasser. Das geklärte Abwasser wird durchschnittlich nur dreifach verdünnt, in Trockenperioden besteht der Wasserkörper des Baches sogar nahezu vollständig aus geklärtem Abwasser.

Der Quellbereich des **Krähenbach** liegt bei Holzgerlingen in einem Waldgebiet, bei Schönaich mündet er in die Aich. Der Krähenbach entwässert eine schwach besiedelte Landschaft mit überwiegend Waldbeständen und wenig landwirtschaftlich genutzten Flächen. Neben einer stark befahrenen Straße, dem Flugverkehr, den am Oberlauf befindlichen Schwimmbad und Fischteichen, stellen zwei Regenüberlaufbecken eine mögliche Belastungsquelle dar. In den Krähenbach wird kein geklärtes Abwasser eingeleitet.

Bei beiden Gewässern existieren sowohl langsam fließende als auch schnellfließende Gewässerabschnitte mit verschiedenartigem Sohlenuntergrund. Im Gegensatz zur Körsch ist der Krähenbach als naturnaher Bach einzustufen. Er weist bis auf einen kur-

zen Tunnelabschnitt keinerlei Verbauungen auf. Die Körsch dagegen ist im Siedlungsbereich stark verbaut und begradigt.

Wichtige Eckdaten zur Charakterisierung der beiden Gewässer sind in Tab. 19 angegeben.

Tab. 19: Wichtige Eckdaten zur Charakterisierung der beiden Fließgewässer Körsch und Krähenbach.

	Körsch	Krähenbach
Länge [km]	25	3
Einzugsgebiet [km ²]	127	10
Geologie	Keuper	Keuper
Gesamtwasserführung [m ³ /s]	0,6 - 1,8	n.b.
Jahreswassermenge [m ³]	57.000.000	320.000
Fracht an geklärtem Wasser [m ³ /a]	20 Mio.	-
Breite [m]	3 - 5 (max. 8)	2 - 3
Gewässergüte	II - III	I - II
Wasserhärte	hart	hart
pH-Wert	schwach basisch	basisch

n.b. = nicht bekannt.

Bei dem Monitoring auf estrogenartig wirkende Substanzen sind mit dem naturnahen und nahezu durch Schadstoffquellen unbelasteten Krähenbach und der Körsch, einem durch geklärtes Abwasser stark belasteten Gewässer, zwei kleine Fließgewässer gegenübergestellt, die sich in ihrer anthropogenen Belastung gänzlich unterscheiden. Estrogenartig wirkende Substanzen können Störungen in diesem empfindlichen Ökosystem „Fließgewässer“ hervorrufen; deren gemessene Konzentrationen können zur Abschätzung der Belastungssituation herangezogen werden. Außerdem kann die Einleitung von geklärtem Abwasser als mögliche Belastungsquelle identifiziert werden.

Probenahme

Mit Ausnahme der Wasserprobe vom 9. - 17.6.98 wurden alle Proben als Stichproben entnommen (vgl. III.II 1 Abb. 28). Die beiden Mischproben von Körsch A und Krähenbach wurden über den Zeitraum vom 9. - 17.6.98 aus den Zuleitungen zu Halbfreiland-Aquarien (Bypass-Systeme) kontinuierlich durch automatische Probenahmegeräte gesammelt (250 ml/d).

Probenahmestellen (vgl. III.II Abb. 28)

- Probestelle Körsch A (P1): Unterlauf der Körsch nach Einmündung des Sulzbaches bei Denkendorf
- Probestelle Krähenbach (P4): Kurz vor der Einmündung in die Aich bei Schönaich.

Ergebnisse

Die Ergebnisse des Monitorings auf estrogen wirksame Substanzen und auf das pflanzliche Sterol 17 β -Sitosterol in der Körsch und dem Krähenbach sind summarisch in den Tab. 20 und 21 angegeben. Es sind die Einzelergebnisse der verschiedenen Probenahmezeitpunkte, der Median und der Mittelwert in ng/l angegeben. Der Mittelwert (MW) wurde berechnet, indem Werte kleiner der Bestimmungsgrenze (< BG) mit dem halben Wert und nicht nachgewiesene Substanzen (n.n.) mit dem Wert null berücksichtigt wurden.

Phenolische Xenoestrogene

In der **Körsch** konnten die beiden *p*-Alkylphenole, Bisphenol A, 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol und 2-Hydroxybiphenyl in nahezu allen Proben detektiert werden. 4-*tert*-Octylphenol wurde in allen acht Proben innerhalb des Konzentrationsbereichs 19,5 bis 189 ng /l (Mittelwert 58,6 ng/l) mit einem Median von 31,4 ng/l gefunden. Die Konzentrationen von 4-Nonylphenol lagen innerhalb von 38,3 bis 164 ng/l (Mittelwert 76,8 ng/l). Mit einem Median von 66,7 ng/l lag 4-Nonylphenol doppelt so hoch wie 4-*tert*-Octylphenol. Bisphenol A, das auch in allen acht Proben innerhalb < 50 bis 272 ng/l (Mittelwert 94,4 ng/l) detektiert wurde, lag mit einem Median von 72,1 ng/l in derselben Größenordnung wie 4-Nonylphenol. Das Fungizid 2-Hydroxybiphenyl wurde innerhalb des Probenahmezeitraumes immerhin mit einem Median von 23,9 ng/l in sechs der acht Proben nachgewiesen. Der Median von 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol lag mit 11,7 ng/l deutlich unter der während der Methodenentwicklung ermittelten Bestimmungsgrenze von 50 ng/l. Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze wurden dennoch angegeben, da zum Zeitpunkt der Methodenentwicklung die Tendenz von 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol zur Di-/Trimerisierung nicht berücksichtigt wurde (vgl. III III.I 4.3.2). In realen Wasserproben wird sich jedoch vermutlich ein Gleichgewicht zwischen oxidiertem und reduziertem Form einstellen, sodass die gemessenen Konzentrationen von 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol tatsächlich die realen Werte darstellen.

Bei den neun Beprobungszeitpunkten wurden im Wasser des **Krähenbachs** vier der neun phenolischen Xenoestrogene mit geringeren Konzentrationen als in der Körsch nachgewiesen. Allerdings wurde Bisphenol A ebenfalls in allen neun Wasserproben

detektiert, obgleich die Konzentrationen deutlich niedriger lagen. Nur in einer Probe konnte ein Wert über der Bestimmungsgrenze mit 59,4 ng/l ermittelt werden. Die beiden *p*-Alkylphenole konnten ebenfalls in der Mehrzahl der Proben innerhalb des Konzentrationsbereiches n.n. bis 458 ng/l detektiert werden. Die ermittelten Mediane < 20 ng/l (4-*tert*-Octylphenol) und 25,1 ng/l (4-Nonylphenol) zeigen deutlich geringere Konzentrationen als in der Körsch. Eine Ausnahme bilden die beiden Werte aus der Probe vom 16.1.99, die höher bzw. deutlich höher (4-Nonylphenol) lagen, als die der Konzentrationen in der Körsch zum gleichen Probenahmezeitpunkt. Als mögliche Ursache für diese beiden Ausreißer kommen Baumfällarbeiten zum Zeitpunkt der Probenahme in Frage, bei denen es zum Eintrag von Sägespänen in den Krähenbach kam. Die Sägespäne schwammen deutlich sichtbar auf der Wasseroberfläche. Alkylphenolpolyethoxylate könnten über Schmieröl, welches für die Motorsägen verwendet wurde, beim Sägen die Sägespäne kontaminieren und ins Wasser gelangen. Schmieröle werden laut Hager (1999) nach wie vor mit Nonylphenolpolyethoxylaten versetzt. Um die erhöhten Konzentrationen der *p*-Alkylphenole erklären zu können, mussten die Alkylphenolpolyethoxylate allerdings innerhalb kürzester Zeit zumindestens teilweise abgebaut worden sein. Nach Ahel et al. (1994b) beträgt die hydraulische Verweildauer, in der physikalisch-chemische und biologische Umwandlungen ablaufen, für die meisten Nonylphenolkomponenten in Flusswasser jedoch zwischen 10 und 15 h. Wenn ein Eintrag der Alkylphenolpolyethoxylate während der Baumfällarbeiten an den Ufern des Krähenbachs auch bereits an den vorliegenden Tagen der Probenahme stattfand, wäre für ihren Abbau auf jeden Fall genügend Zeit gewesen. In der Regel wird die Gehölzpflege an Gewässern über mehr als einen Tag durchgeführt.

4-Hydroxybiphenyl und 2-*tert*-Butyl-4-methylphenol wurde in keiner der Wasserproben von Körsch und Krähenbach gefunden. Die beiden *p*-Chlorkresole wurden lediglich in einer der Körsch-Proben, allerdings unterhalb der Bestimmungsgrenze von 10 ng/l detektiert.

Natürliche und synthetische Estrogene und das pflanzliche Sterol 17 β -Sitosterol

In den untersuchten Wasserproben der Körsch konnten nur drei der fünf Steroide nachgewiesen werden, in denen des Krähenbachs zwei. Die Konzentrationen der stark estrogen wirksamen, natürlichen Steroidhormone 17 β -Estradiol und Estron zeigten, wie die der phenolischen Xenoestrogene, ein deutliches Gefälle zwischen den beiden untersuchten Fließgewässern.

Tab. 20: Konzentrationen in ng/l (ppt) phenolischer Xenoestrogene, natürlicher und synthetischer Steroide und des pflanzlichen Sterols 17 β -Sitosterol in Körsch-Wasserproben. Bei den Steroiden ist in Klammer die Nachweisgrenze angegeben

Substanz	Konzentrationen [ng/l] im Wasser der Körsch								Median	MW
	14.4.98	9.-17.6	31.8.	1.12.	16.1.99	25.2.99	14.4	11.5.		
4- <i>tert</i> -Octylphenol	189	113	22,0	26,4*	36,4	37,6	19,5	25,0	31,4	58,6
4-Nonylphenol ^a	126	n.n.	n.n.	164*	75,6	38,3	57,8	152	66,7	76,8
Bisphenol A	90,1	< 50	< 50	78,6*	65,5	134	272	65,0	72,1	94,4
3- <i>tert</i> -Butyl-4-hydroxyanisol ^b	27,1	7,6	11,1	12,2*	34,5	n.n.	19,9	n.n.	11,7	14,1
2- <i>tert</i> -Butyl-4-methylphenol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
4-Hydroxybiphenyl	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2-Hydroxybiphenyl	47,2	n.n.	n.n.	< 20*	27,7	< 20	41,5	30,8	23,9	20,9
4-Chlor-3-methylphenol	n.n.	< 10	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1
4-Chlor-2-methylphenol	n.n.	< 10	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1
17 β -Estradiol	0,9	n.n. (1,1) -		1,8	n.n. (2,7)	0,7	0,9	0,7	0,7	0,7
Estron	2,5	22	-	6,7	38,0	7,6	4,0	7,5	7,6	12,6
17 α -Ethinylestradiol	n.n. (0,5)	n.n. (1,4) -		n.n. (0,8)	n.n. (2,3)	n.n. (0,2)	n.n. (0,4)	n.n. (0,4)	n.n.	n.n.
Estriol	n.n. (0,5)	n.n. (0,8) -		n.n. (0,5)	n.n. (4,7)	n.n. (0,7)	n.n. (0,7)	n.n. (0,5)	n.n.	n.n.
17 β -Sitosterol	81,3	119	-	398	1539	698	236	121	236	456

*Mittelwert aus einer Doppelbestimmung (vgl. III.I 4.3.4 Elutionsmittelvergleich). ^aQuantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10. ^b3tB4OHA-Konzentrationen, angegeben obwohl sie < BG (vgl. Text).

Tab. 21: Konzentrationen in ng/l (ppt) phenolischer Xenoestrogene, natürlicher und synthetischer Steroide und des pflanzlichen Sterols 17 β -Sitosterol in Krähenbach-Wasserproben. Bei den Steroiden ist in Klammer die Nachweisgrenze angegeben

Substanz	Konzentrationen [ng/l] im Wasser des Krähenbachs									Median	MW
	14.4.98	9.-17.6	31.8.	25.11.	1.12.	16.1.99	25.2.	14.4	11.5.		
4- <i>tert</i> -Octylphenol	155	110	< 20	< 20	< 20*	59,2	< 20	< 20	n.n.	< 20	41,6
4-Nonylphenol ^a	n.n.	65	n.n.	37,3	69,3*	458	25,1	n.n.	n.n.	25,1	72,7
Bisphenol A	< 50	< 50	< 50	59,4	< 50*	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	28,8
3- <i>tert</i> -Butyl-4-hydroxyanisol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2- <i>tert</i> -Butyl-4-methylphenol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
4-Hydroxybiphenyl	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2-Hydroxybiphenyl	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	< 20	22,9	n.n.	3,7
4-Chlor-3-methylphenol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
4-Chlor-2-methylphenol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
17 β -Estradiol	n.n. (0,5)	n.n. (1,7)	-	n.n. (0,4)	n.n. (0,7)	n.n. (2,2)	n.n. (0,2)	n.n. (0,3)	n.n. (0,2)	n.n.	n.n.
Estron	1,3	21,9	-	1,3	2,03	16,5	2,9	0,8	n.n. (1,5)	2,1	5,8
17 α -Ethinylestradiol	n.n. (0,8)	n.n. (1,5)	-	n.n. (0,6)	n.n. (0,4)	n.n. (2,0)	n.n. (0,6)	n.n. (0,6)	n.n. (0,6)	n.n.	n.n.
Estriol	n.n. (0,8)	n.n. (1,1)	-	n.n. (0,3)	n.n. (0,7)	n.n. (1,5)	n.n. (0,1)	n.n. (0,4)	n.n. (1,2)	n.n.	n.n.
17 β -Sitosterol	200	137	-	153	137	3281	313	532	2266	257	877

*Mittelwert aus einer Doppelbestimmung (vgl. III.I 4.3.4 Elutionsmittelvergleich). ^aQuantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

In der **Körsch** wurde Estron innerhalb des Konzentrationsbereiches 6,7 bis 38,0 ng/l (Mittelwert 12,6 ng/l) in allen sieben untersuchten Wasserproben gefunden. Der Median von 17 β -Estradiol (0,7 ng/l) lag deutlich unter dem von Estron (7,6 ng/l), aber dennoch konnte diese deutlich stärker estrogen wirksame Substanz in fünf der Proben mit durchschnittlich 1 ppt gemessen werden.

Die Konzentrationen von Estron im Wasser des **Krähenbachs** lagen zwischen n.n. und 21,9 ng/l (Mittelwert 5,8 ng/l). Der Median von 2,1 ng/l spiegelt neben dem Mittelwert wider, dass Estron deutlich seltener und in geringeren Konzentrationen als in der Körsch auftrat. Noch deutlicher wird es bei 17 β -Estradiol, das in keiner einzigen der acht Proben nachgewiesen werden konnte.

17 β -Sitosterol wurde in allen analysierten Proben, im Vergleich zu den Estrogenen, in viel höheren Konzentrationen gemessen. Die Werte lagen zwischen 81,3 ng/l und 3,3 μ g/l. Die Mediane, die im Wasser der beiden Fließgewässer ermittelt wurden, waren vergleichbar. Dennoch lagen die Konzentrationen im Durchschnitt im Krähenbach (877 ng/l) etwa doppelt so hoch wie in der Körsch (456 ng/l).

Das synthetische „Pillenhormon“ 17 α -Ethinylestradiol und Estriol konnten in keiner der insgesamt 15 Wasserproben von Körsch und Krähenbach nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenzen lagen bis auf die Proben vom 16.1.99 unter 1,5 ng/l.

1.2 Donau, Neckar und Erms

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neben der Körsch und dem Krähenbach drei weitere Fließgewässer im süddeutschen Raum beprobt. Es wurden insgesamt sechs einzelne Stichproben genommen. Die untersuchten Fließgewässer, deren Probenahmestellen in Tab. 22 charakterisiert sind, unterscheiden sich untereinander deutlich in ihrer Größe (Flusslänge, Einzugsgebiet). Die Donau, mit ihren 2850 km der zweitlängste Fluss Europas, wurde dreimal im Oberlauf beprobt, je einmal oberhalb und unterhalb der Kläranlage Ulm/Neu-Ulm und einmal bei Rechtenstein, in einer gering besiedelten und überwiegend landwirtschaftlich genutzten Gegend. Die Probenahmestelle am Neckar, einem Nebenfluss des Rheins mit ca. 367 km Länge, lag unterhalb der Kläranlage Tübingen. Jeweils eine Wasserprobe wurde in Metzingen, oberhalb der ansässigen Verbandskläranlage und in Riederich, unterhalb der gleichen Kläranlage, aus der Erms genommen. Die Erms ist, wie die Körsch und der Krähenbach, ein kleines Fließgewässer mit einer Länge von ca. 30 km.

In Tab. 22 sind die Ergebnisse der in dieser Arbeit ausgewählten estrogenartig wirkenden Substanzen und des pflanzlichen Sterols 17 β -Sitosterol aus den Wässern

von Donau, Neckar und Erms dargestellt. Um die Konzentrationen mit den Ergebnissen aus Körsch und Krähenbach besser vergleichen zu können, wurden für jede Substanz jeweils der Median und der Mittelwert angegeben.

Phenolische Xenoestrogene

In allen sechs Stichproben waren maximal nur vier der neun phenolischen Xenoestrogene nachweisbar. 4-Nonylphenol zeigte wie bei Körsch und Krähenbach die höchsten Konzentrationen bis maximal 233 ng/l (Mittelwert 102 ng/l). 4-*tert*-Octylphenol (Mittelwert 38,7 ng/l), das lediglich in vier Proben nachweisbar war (in den zwei Wasserproben der Erms n.n.), zeigte jedoch immerhin einen Maximalwert von 163 ng/l im Wasser der Donau bei Ulm/Neu-Ulm, unterhalb der Kläranlage. 2-Hydroxybiphenyl (Mittelwert 10 ng/l) und Bisphenol A (Mittelwert 35,1 ng/l) konnten in allen Proben detektiert werden, lagen jedoch bis auf eine Probe unter der Bestimmungsgrenze. In der Donau-Wasserprobe aus Ulm/Neu-Ulm, oberhalb der Kläranlage, konnte Bisphenol A maximal mit 85,6 ng/l gemessen werden.

Beim Vergleich der beiden Probenpaare von Donau und Erms, jeweils ober- und unterhalb der Kläranlage, zeigte sich unterhalb der Kläranlage nach Einleitung von gereinigtem Abwasser keine Konzentrationserhöhung. Anhand der drei Donauproben war vielmehr ein Einfluss durch die Besiedlungsdichte erkennbar. Die Konzentrationen für 4-Nonylphenol und 4-*tert*-Octylphenol sind in der Probe aus der Donau bei Rechtenstein deutlich niedriger als im dicht besiedelten städtischen Raum Ulm/Neu-Ulm.

Natürliche und synthetische Estrogene und 17 β -Sitosterol

In den sechs Proben aus Donau, Neckar und Erms wurden wie in den Proben aus der Körsch lediglich 17 β -Estradiol, Estron und 17 β -Sitosterol gefunden. 17 β -Estradiol lag mit maximal 0,6 ng/l in allen Proben im Prinzip an der Nachweisgrenze. Deutlich größere Unterschiede innerhalb der einzelnen Proben zeigte Estron, das in allen Proben zwischen 0,5 bis 24,1 ng/l (Mittelwert 8 ng/l) bestimmt wurde. Mit Werten zwischen 216 bis 6276 ng/l wurde 17 β -Sitosterol wie in Körsch und Krähenbach in deutlich höheren Konzentrationen als alle anderen Substanzen gemessen.

Höhere Gehalte wurden, wie für die phenolischen Xenoestrogene, auch für Estron an den Probenahmestellen im dicht besiedelten Raum Ulm gemessen. Die Wasserprobe aus der Donau bei Rechtenstein zeigte im Vergleich zu den beiden Proben von Ulm/Neu-Ulm nur einen Gehalt von 0,5 ng/l versus 24,1 ng/l bzw. 16,7 ng/l. 17 β -Estradiol lag in allen drei Proben unter 0,5 ng/l.

Tab. 22: Konzentrationen in ng/l (ppt) phenolischer Xenoestrogene, natürlicher und synthetischer Estrogene und des 17 β -Sitosterol im Wasser von Donau, Neckar und Erms. Bei den Steroiden ist in Klammer die Nachweisgrenze angegeben. Neben der Charakterisierung der Probenahmestellen sind die Probenahmedaten angegeben

Fließgewässer	Donau (P5)	Donau (P6)	Donau (P7)	Neckar (P9)	Erms (P11)	Erms (P12)		
Probenahmestelle	Ulm/Neu-Ulm		Rechtenstein	Tübingen	Metzingen	Riederich		
	oberhalb KA	unterhalb KA		unterhalb KA	oberhalb KA	unterhalb KA		
Probenahme	30.06.98	30.06.98	10.06.99	02.06.99	04.08.99	04.08.99		
Substanz	Konzentrationen [ng/l]						Median	MW
4- <i>tert</i> -Octylphenol	49,3	163	< 20	< 20	n.n.	n.n.	< 20	38,7
4-Nonylphenol*	172	233	57,5	73,2	73,9	n.n.	73,6	102
Bisphenol A	85,6	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	35,1
3- <i>tert</i> -Butyl-4-hydroxyanisol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2- <i>tert</i> -Butyl-4-methylphenol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
4-Hydroxybiphenyl	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2-Hydroxybiphenyl	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	10
4-Chlor-3-methylphenol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
4-Chlor-2-methylphenol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
17 β -Estradiol	n.n. (0,5)	n.n. (0,9)	0,4	0,6	0,4	0,5	0,4	0,3
Estron	24,1	16,7	0,5	3,1	0,9	2,5	2,8	8,0
17 α -Ethinylestradiol	n.n. (2,0)	n.n. (1,0)	n.n. (0,6)	n.n. (0,4)	n.n. (0,2)	n.n. (0,5)	n.n.	n.n.
Estriol	n.n. (2,4)	n.n. (1,7)	n.n. (0,2)	n.n. (0,3)	n.n. (0,3)	n.n. (0,5)	n.n.	n.n.
17 β -Sitosterol	1037	6276	287	339	219	216	313	1396

*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

1.3 Diskussion

Monitoring in Korsch und Krähenbach

Während des dreizehnmönatigen Monitorings der Korsch und des Krähenbachs konnten weder jahreszeitliche Schwankungen in den Gehalten der phenolischen Xenöstrogene noch der Steroide festgestellt werden. Leider wurden in den Sommer- und Herbstmonaten (Juli - November) nicht genügend Proben genommen, um die in der Literatur beschriebenen jahreszeitlichen Konzentrationsschwankungen für 4-Nonylphenol zu überprüfen. Ahel et al. (1994) beschrieben einen Rückgang der Konzentrationen von 4-Nonylphenol im Sommer im Fluss Glatt (Schweiz), der allerdings für die Precursor-Substanzen 4-Nonylphenolmono- und diethoxylate ausgeprägter war. Mit zunehmenden Temperaturen wurden geringere Konzentrationen dieser Substanzen gemessen (Ahel et al. 1994). Ahel et al. (1996) konnten auch während der Infiltration von Flusswasser in Grundwasser saisonale Unterschiede feststellen. Vor allem im Winter, bei niederen Temperaturen, kann es infolge eines abnehmenden mikrobiellen Abbaus zum Durchbruch von Nonylphenol in das Grundwasser kommen. Die beiden Messreihen aus Korsch und Krähenbach zeigen dagegen zufällige Konzentrationsschwankungen der einzelnen Substanzen.

Die Gehalte der phenolischen Xenöstrogene und Steroide, die in den Wasserproben von Korsch und Krähenbach detektiert wurden, sind in Form ihrer Mediane, Mittelwerte und Maxima in der Abb. 29 einander gegenübergestellt. Vergleicht man die Mediane miteinander, so wird sichtbar, dass der Krähenbach über den untersuchten Zeitraum, April 1998 bis Mai 1999, deutlich geringere Konzentrationen der detektierten phenolischen Xenöstrogene und der natürlichen Estrogene aufwies. Besonders deutlich wird das für Bisphenol A, 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol, 2-Hydroxybiphenyl, 17 β -Estradiol und Estron, deren Maxima niedriger lagen als die der Korsch (vgl. auch III.II 1.1 Tab. 20 und 21). Das dreizehnmönatige Monitoring zeigt aber auch, dass der relativ naturnahe Krähenbach, der keine Kläranlagenabläufe aufnimmt, keineswegs unbelastet von den untersuchten estrogen wirksamen Substanzen ist. Honnen et al. (1999) konnten auch andere Schadstoffe, wie beträchtliche Konzentrationen an polyzyklischen Kohlenwasserstoffen (PAK) und Schwermetallen und geringe Gehalte an Pestiziden im Krähenbach feststellen.

3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol wurde im Gegensatz zur Korsch (Median 11,7 ng/l) in keiner einzigen Krähenbach-Probe detektiert. Aufgrund seiner Anwendung als Antioxidans in Seifen, Kosmetika, Arzneimitteln und Lebensmitteln ist ein direkter oder indirekter Eintrag (Ausscheidung mit dem Urin) in das Abwasser zu erwarten. Gereinigtes Abwasser stellt also eine Haupteintragsquelle für den Eintrag von 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol in die aquatische Umwelt dar. Für Bisphenol A, das am 27.08.98 im

Ablauf der größten, in die Körsch entwässernden Kläranlage Stuttgart-Möhringen immerhin mit einer Konzentration von 81 ng/l gefunden wurde (Körner 1999c), läßt sich ebenfalls gereinigtes Abwasser als Haupteintragsquelle vermuten. Die Gehalte in der stark mit Abwasser belasteten Körsch lagen innerhalb des Untersuchungszeitraumes zwischen < 50 ng/l und 272 ng/l (Median 72,1 ng/l). Im Krähenbach wurde nur einmal ein Gehalt (59,4 ng/l) über der Bestimmungsgrenze von 50 ng/l festgestellt. Der Eintrittspfad über gereinigtes häusliches Abwasser ins Gewässer erklärt sich für 2-Hydroxybiphenyl ebenfalls über seine Anwendung. Das Fungizid, das zur Konservierung von Zitrusfrüchten auf die Schale aufgetragen wird, kann durch Abwaschen der Zitrusfrüchte oder kontaminierter Hände in häusliches Abwasser gelangen. Im Zulauf der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm), die zu ca. 60 % häusliches Abwasser erhält, wurden 1,5 bis 3,7 µg/l 2-Hydroxybiphenyl gefunden (vgl. III.II 3.1). Derart hohe Konzentrationen im Zulauf lassen eigentlich höhere Gehalte im Gewässer vermuten, als die, die in der Körsch gefunden wurden (n.n. bis 47,2 ng/l, Median 23,9 ng/l). Eine Abbaurate des 2-Hydroxybiphenyl von über 96 % während der Abwasserbehandlung erklärte die geringen Konzentrationen. Im Ablauf der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm) konnten nur noch maximal 30 ng/l nachgewiesen werden (vgl. III.II 3.1).

Die natürlichen Estrogene, Estron und 17β-Estradiol, wurden in der Körsch deutlich häufiger und in höheren Konzentrationen gefunden. Überraschenderweise wurde das synthetische Estrogen 17α-Ethinylestradiol, das nur anthropogenen Ursprungs sein kann, in keiner einzigen Wasserprobe der Körsch gefunden. Kalbfus (1997) konnte in bayerischen Fließgewässern auch kein 17α-Ethinylestradiol nachweisen. 17α-Ethinylestradiol (4,1 ng/l) wurde im Ablauf der in die Körsch entwässernden Kläranlage Stuttgart-Möhringen am 27.8.98 in nur geringfügig niedrigerer Konzentration als 17β-Estradiol (6,4 ng/l) gefunden. Dieser Konzentrationsunterschied zwischen Ablauf der Kläranlage und dem Wasser der Körsch deutet auf eine unbekannte Senke für 17α-Ethinylestradiol im Gewässer hin. Die Anreicherung im Sediment könnte eine mögliche Senke darstellen. 17α-Ethinylestradiol weist einen mit 4-Nonylphenol vergleichbaren hohen log K_{OW}-Wert von 4,2 (Schweinsfurth und Länge 1998) auf. 4-Nonylphenol mit einem log K_{OW}-Wert von 4,48 (Ahel und Giger 1993) reichert sich besonders gut in Klärschlamm und Sediment an (Giger et al. 1984, Ahel et al. 1994a und 1994b, Thiele et al. 1997). Erst die Untersuchung von Körsch-Sediment auf 17α-Ethinylestradiol könnte Aufschluss über diese Vermutung geben. Um Estrogene im unteren Nannogramm-Bereich in dieser schwierigen Matrix nachzuweisen können, müssten eigene, vermutlich sehr aufwendige Analyseverfahren entwickelt werden. Estron wurde als der primäre Oxidationsmetabolit von 17β-Estradiol sowohl in Fließgewässern (Jürgens und Johnson 1999) als auch in aeroben Batch-Experimenten

mit aktivem Klärschlamm (Ternes et al. 1999b) identifiziert. Die Gehalte von Estron (Median 7,6 ng/l) lagen im Vergleich zu 17 β -Estradiol (Median 0,7 ng/l), wie erwartet, in der Korsch deutlich höher. Estriol wurde in keiner Probe gefunden, obwohl es zumindest im menschlichen Körper über 16 α -Hydroxyestron eine weitere Oxidationsstufe von 17 β -Estradiol darstellt. In beiden oben erwähnten Studien wurde das Auftreten von Estriol als Oxidationsprodukt nicht überprüft. Ternes et al. (1999b) konnten den möglichen Estron-Metaboliten 16 α -Hydroxyestron im Kontakt mit aktivem Klärschlamm auch nicht identifizieren. Die dominante Präsenz von Estron in Fließgewässern und Ablaufproben läßt sich nach Ternes et al. (1999b) durch seine relativ hohe Stabilität bei der Abwasserbehandlung und durch die oxidative Umsetzung von 17 β -Estradiol und seiner Konjugate nach Spaltung erklären. Der Eintrag der natürlichen Estrogene über geklärtes Abwasser in die Korsch spielt vermutlich die Hauptrolle. Eine Eintragsquelle von natürlichen Steroiden über Auswaschung von Grünflächen wäre denkbar. Natürliche Estrogene und ihre Konjugate, die mit Urin oder Kot von weidenden Kühen oder wildlebenden Tieren ausgeschieden werden, könnten nach Regenfällen ausgewaschen werden und ins Gewässer gelangen. Für den Krähenbach, der keine Kläranlagenabläufe aufnimmt und dessen angrenzende Flächen wenig landwirtschaftlich genutzt werden, könnte diese diffuse Eintragsquelle eine Rolle spielen.

Die Mediane von 4-Nonylphenol und 4-*tert*-Octylphenol zeigten zwischen den beiden Fließgewässern Korsch (66,7 ng/l und 31,4 ng/l) und Krähenbach (< 20 ng/l und 25,1 ng/l) ebenfalls einen Unterschied. Allerdings war der Unterschied der Mittelwerte für 4-Octylphenol nicht sehr ausgeprägt (Korsch 58,6 ng/l und Krähenbach 41,6 ng/l) und für 4-Nonylphenol lag der Mittelwert des Krähenbaches (72,7 ng/l) sogar über dem der Korsch (66,7 ng/l). Für 4-*tert*-Octylphenol wurden in beiden Gewässern vergleichbar hohe Maximalwerte an den Probenahmedaten 14.4.98 und 9.-17.6.98 gemessen (vgl. III.II 1.1 Tab. 20). Verantwortlich für den höheren Mittelwert von 4-Nonylphenol im Wasser des Krähenbaches ist der Ausreißer (458 ng/l) vom 16.1.99, der bereits unter Kap. III.II 1.1 diskutiert wurde. Diese hohen Konzentrationen im Falle des Krähenbaches zeigen, dass es neben dem Eintrag über die Kläranlage noch andere Quellen für die *p*-Alkylphenole geben muss. Der Eintrag über Schmieröl bei Baumfällarbeiten wurde bereits beschrieben (s. III.II 1.1).

Kalbfus (persönliche Mitteilung 14.5.1999) bestimmte zwischen März und November 1998 im Unterlauf der Korsch Konzentrationen für 4-Nonylphenol zwischen 49 und 340 ng/l (Median 68 ng/l), die vergleichbar mit denen der eigenen Analysen waren. Kalbfus analysierte nur eine Wasserprobe des Krähenbaches. Der Gehalt an 4-Nonylphenol lag bei 30 ng/l.

Verteilung estrogen wirksamer Substanzen in Fließgewässern

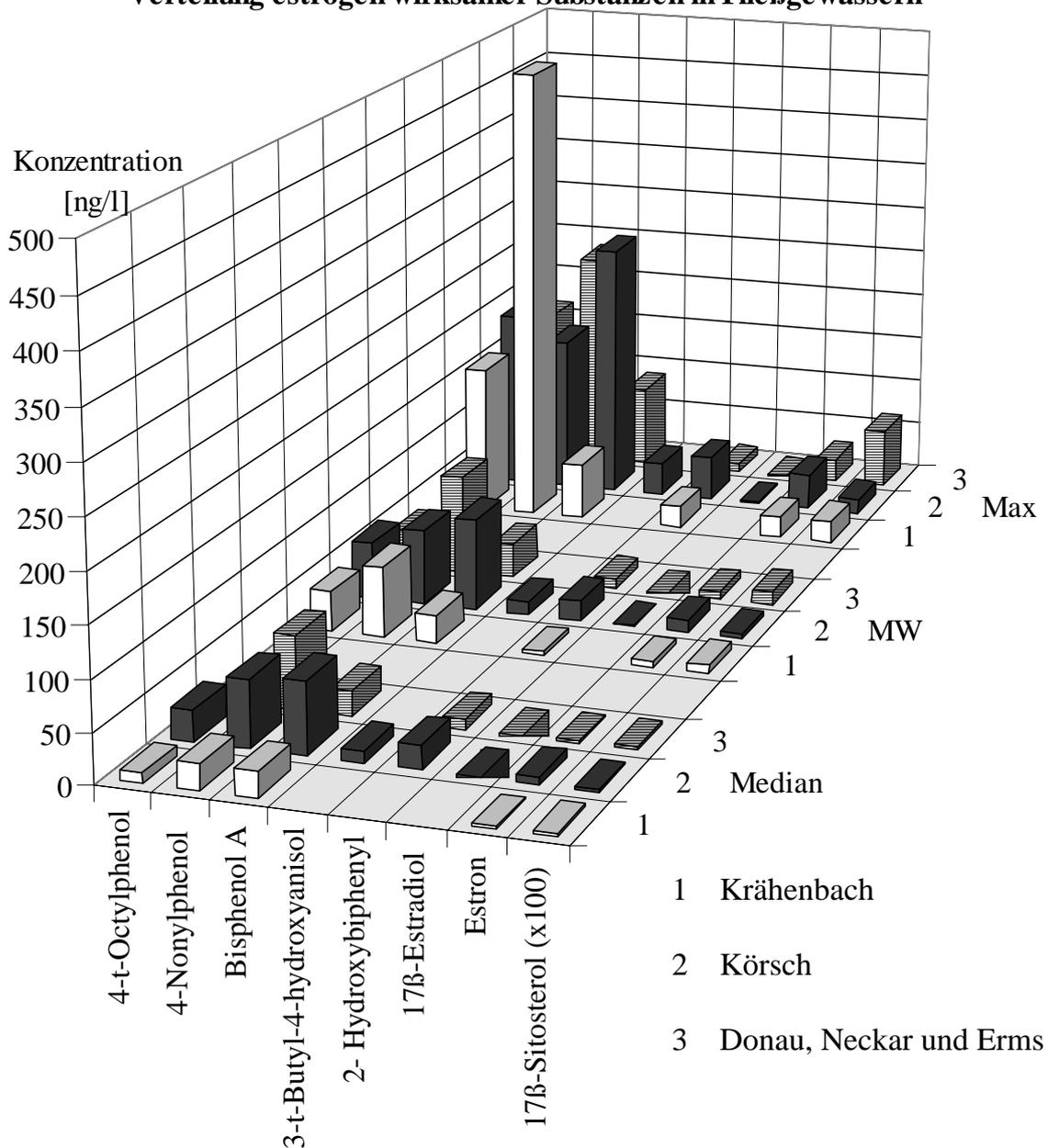


Abb. 29: Konzentrationsverteilung [ng/l] estrogen wirksamer Substanzen und von 17β-Sitosterol in Wässern von Krähenbach (n = 9), Körsch (n = 8) und von Donau, Neckar und Erms (n = 6). Von den drei Probenreihen sind jeweils der Median, der Mittelwert (MW) und das Maximum (Max.) dargestellt.

Vergleich der Konzentrationen von Körsch und Krähenbach mit denen von Donau, Neckar und Erms

Vergleicht man nur die Mediane und Mittelwerte der drei Untersuchungsreihen miteinander, so scheint es, dass Donau, Neckar und Erms genauso gering belastet sind wie der Krähenbach. Da sich die einzelnen, in dieser Arbeit untersuchten Fließ-

gewässer stark in ihrem Frischwasserabfluss unterscheiden, sollten für einen Vergleich auch immer die Gehalte der einzelnen Stichproben herangezogen werden. Eingeleitetes Abwasser, eine dichte Besiedelung oder eine intensive Flächennutzung stellt für ein kleines Fließgewässer mit einem geringen Frischwasserabfluss im Vergleich zu einem großen Fließgewässer mit einem hohen Frischwasserabfluss sicherlich eine wesentlich größere Belastung dar.

In den Stichproben aus der Donau bei Ulm/Neu-Ulm (n.n. - 233 ng/l) wurden im Durchschnitt höhere Konzentrationen von estrogen wirksamen Substanzen als in den Proben aus Neckar und Erms (n.n. - 73,9 ng/l) gemessen. Obwohl die Donau einen wesentlich größeren Frischwasserabfluss aufweist und dadurch eingetragene Schadstoffe stärker verdünnt werden als in der Körsch (n.n. - 189 ng/l), sind die Gehalte der estrogen wirksamen Substanzen in beiden Fließgewässern vergleichbar. Die Probenahmestellen von Neckar und Erms liegen, wie die der Donau bei Ulm/Neu-Ulm ebenfalls, in einem dichter besiedelten Raum und teilweise sogar direkt unterhalb einer Kläranlageneinleitung und dennoch waren die Gehalte sichtlich niedriger. Zur genauen Beurteilung der Belastungssituation der einzelnen Fließgewässer an den untersuchten Probenahmestellen müssten weitere Stichproben genommen und analysiert werden. Die begrenzte Aussagekraft von einzelnen Stichproben wird eindeutig sichtbar.

Vergleich mit Daten aus der Literatur

Es gibt zahlreiche Studien, die das Vorkommen von einzelnen, in dieser Arbeit gemeinsam analysierten Verbindungen untersuchen. Allerdings wurde nur ein Teil dieser Substanzen, wie die *p*-Alkylphenole und die Steroide unter dem Aspekt der estrogen wirksamen Substanzen in Oberflächengewässern untersucht. Für einen Vergleich der eigenen Konzentrationen mit Werten aus anderen Studien stehen für die einzelnen Verbindungen deutlich mehr Literaturdaten für aquatische Proben als für Proben wie Sedimente und Klärschlamm zur Verfügung (Tab. 23 und 24).

4-Nonylphenol ist bei weitem die am besten untersuchte Verbindung, da bereits Anfang der Achtziger Jahre seine akute Toxizität gegenüber aquatische Organismen bekannt wurde (McLeese et al. 1980). In der Tab. 23 ist für 4-Nonylphenol nur eine Auswahl der in Oberflächengewässern gemessenen Konzentrationen aufgeführt. Anhand neuerer Daten (Fromme et al. 1999, Lye et al. 1999, Snyder et al. 1999, Zellner und Kalbfus 1997, Bennie et al. 1997) wird sichtbar, dass die Gehalte abnehmen. Zellner und Kalbfus (1997) bestätigten, dass sich im Mittel ein Rückgang der Gewässerbelastung um etwa 50 % an den selben Probenahmestellen gegenüber Messungen aus den Jahren 1988 - 1991 (Trapp et al. 1992) abzeichnete. Die in dieser Arbeit gemessenen 4-Nonylphenol-Gehalte zwischen n.n und 458 ng/l zeigen ähnlich niedrige Werte. Der Vergleich der Literaturdaten mit den eigenen Konzentrationen von

4-Nonylphenol bestätigt, dass die Körsch (Median 67 ng/l) deutlich belasteter ist als der nicht mit Abwassereinleitung belastete Krähenbach (Median 31 ng/l). Zellner und Kalbfus (1997) fanden für unbelastete Fließstrecken Konzentrationen zwischen 10 und 80 ng/l, die mit den Konzentrationen des Krähenbachs, der Donau bei Rechtenstein und der Erms vergleichbar sind.

Tab. 23: Vergleich der in dieser Arbeit in Fließgewässern gemessenen phenolischen Xenooestrogene mit in der Literatur beschriebenen Konzentrationen in Oberflächengewässern.

Substanz	Literatur	Land/Datum der Probenahme	Konz. [ng/l] (Median)	eigene Konz.[ng/l]
4- <i>t</i> -Octylphenol	Lye et al. (1999)	U.K./1997	n.n. (n = 2)	n.n. (10)
	Syder et al. (1999)	USA/1997	< 2 - 81 (16)	- 189
	Bennie et al. (1997)	Canada/1994-95	< 5 - 470 (< 5)	
4-Nonylphenol	Lye et al. (1999)	U.K./1997	130 ± 50 (n = 2)	n.n. (10)
	Syder et al. (1999)	USA/1997	< 52 - 1190 (693)	- 458
	Fromme et al. (1999)	Deutschland/-	< 80 - 2720	
	Zellner und Kalbfus (1997)	Bayern/1995	5,8 - 340 (47,3)	
	Bennie et al. (1997)	Canada/1994-95	< 10 - 920 (< 10)	
	Blackburn u. Waldock (1995)	U.K./1994	200 - 180000 (1300)	
	Ahel et al. (1994b)	Schweiz/1983-86	< 300 - 45000 (1500)	
	Trapp et al. (1992)	Deutschland/1989-91	50 - 100	
Bisphenol A	Fromme et al. (1999)	Deutschland/-	< 0,1 - 410 (< 50)	< 50 - 272
	Hendriks et al. (1994)	Deutschland/1989	< 10-119	
2-Hydroxybiphenyl	Ternes et al. (1998)	Deutschland/-	< 10 - 250 (23)	n.n. (10)
	Franke et al. (1995)	Deutschland/Elbe	in 28 von 39 Proben	- 47,2
	Dietz und Traud (1978)	Deutschland/Ruhr	< 100 - 1200	
	Jungclaus et al. (1978)	USA	1 - 3	
4-Chlor-3-methylphenol	Dietz und Traud (1978)	Deutschland/Ruhr	< 100 - 400	< 10

Ältere Studien aus der Schweiz und England (Ahel et al. 1994b, Blackburn und Waldock 1995) zeigten eine wesentlich höhere Belastungssituation als in Deutschland (Trapp et al. 1992), obwohl in England z.B. bereits 1976 der Einsatz der Eltern-

Verbindungen des 4-Nonylphenols, die Alkylphenolpolyethoxylate, als Detergentien eingeschränkt wurde (Warhurst 1995). In Deutschland hatten sich verschiedene Industrieverbände erst ab 1986 freiwillig verpflichtet, auf den Einsatz dieser Detergentien in Wasch- und Reinigungsmitteln zur Anwendung im häuslichen Bereich zu verzichten (BUA 1988). Bei der Analytik von Miesmuschelproben aus der Nordsee im Zeitraum von 1985 - 1995 konnte bereits eine signifikante Abnahme von 4 ng/g auf 1,1 ng/g festgestellt werden (Günther 1998). Dennoch wären weitere Beschränkungen wünschenswert, wenn die Konzentrationen von 4-Nonylphenol in Gewässern und ihren aquatischen Bewohnern weiter zurückgehen sollen. In der Schweiz wurde inzwischen die Verwendung jeglicher Alkylphenolpolyethoxylate verboten (Warhurst 1995).

Im Vergleich zu 4-Nonylphenol gibt es zur Belastungssituation der Gewässer durch **4-tert-Octylphenol** nur wenige Studien. Die Gehalte, die in US-amerikanischen und kanadischen Gewässern gefunden wurden (Snyder et al. 1999, Bennie et al. 1997), sind vergleichbar mit den eigenen Konzentrationen. Niedere Konzentrationen wurden in der Tyne in England gemessen (Lye et al. 1999). Im Allgemeinen zeichnen sich ähnliche Verhältnisse wie für 4-Nonylphenol ab. Auf mit Abwässern unbelasteteren Fließstrecken wurden geringere 4-tert-Octylphenol-Konzentrationen gemessen. Dies ist nicht verwunderlich, da auch die Eltern-Verbindungen von 4-tert-Octylphenol als Detergentien eingesetzt werden und nachdem sie die Kläranlage passiert haben, als freies Phenol ins Gewässer gelangen. Bisher ist allerdings nur der aerobe und anaerobe Weg der Bioabbaubarkeit der Eltern-Verbindungen von 4-Nonylphenol während der Abwasser- und Schlammbehandlung detailliert beschrieben (Ahel et al. 1994a).

Die bei Staples et al. (1998) zusammengefassten Studien zur Abbaubarkeit von **Bisphenol A** zeigen eine schnelle biologische Abbaubarkeit in Oberflächenwasser und während der Abwasserbehandlung. Dennoch wurde in allen untersuchten Wasserproben Bisphenol A detektiert (< 50 - 272 ng/l). Die ständige Blindwert-Kontrolle konnte einen Laborblindwert ausschließen. Vergleichbare Konzentrationen in deutschen Gewässern wurden auch von Fromme et al. (1999) und Hendriks et al. (1994) gemessen. **2-Hydroxybiphenyl** scheint ebenfalls eine in deutschen Gewässern sehr häufig auftretende Umweltchemikalie zu sein (Ternes et al. 1998, Franke et al. 1995). Der Median der Körsch (23,9 ng/l) war nahezu identisch mit dem in 16 deutschen Fließgewässern von Ternes et al. 1998 gemessenen Median (23 ng/l). Die beiden **Chlorkresole** konnten nur in einer einzigen Probe unterhalb der Bestimmungsgrenze (< 10 ng/l) gemessen werden. Die in der Ruhr vor 1978 gemessenen Konzentrationen von < 100 bis 400 ng/l lagen deutlich höher (Dietz und Traud 1978).

Tab. 24: Vergleich der in dieser Arbeit in Fließgewässern gemessenen Steroide mit in der Literatur beschriebenen Konzentrationen in Oberflächengewässern.

Substanz	Literatur	Land/Datum der Probenahme	Konz. [ng/l] (Median)	eigene Konz.[ng/l] (Median)
17 β -Estradiol	Snyder et al. (1999)	USA/1997	< 0,1 - 2,6 (0,6)	n.n. (0,2)
	Holtey-Weber et al. (1999b)	Deutschland/-	n.n. (n.n.)	- 1,8
	Ternes et al. (1999a)	Deutschland/1998	< 0,5 (< 0,5)	
	Belfroid et al. (1999)	Niederlande/1997	< 0,3 - 5,5 (< 0,3)	
	Stumpf et al. (1996)	Deutschland/1996	< 1 (< 1)	
Estron	Holtey-Weber et al. (1999b)	Deutschland/-	n.n. - 8,1 (n.n.)	n.n. (1,5)
	Ternes et al. (1999a)	Deutschland/1998	< 0,5 - 1,6 (< 0,5)	- 38,0
	Belfroid et al. (1999)	Niederlande/1997	< 0,1 - 3,4 (0,3)	
	Stumpf et al. (1996)	Deutschland/1996	< 1 (< 1)	
17 α -Ethinyl-estradiol	Snyder et al. (1999)	USA/1997	< 0,05 - 0,5 (< 0,05)	n.n.
	Holtey-Weber et al. (1999b)	Deutschland/-	n.n. (n.n.)	(0,2 - 2,3)
	Ternes et al. (1999a)	Deutschland/1998	< 0,5 (< 0,5)	
	Belfroid et al. (1999)	Niederlande/1997	< 0,1 - 4,3 (< 0,3)	
	Kalbfus (1997)	Bayern/-	< 0,2 (< 0,2)	
	Stumpf et al. (1996)	Deutschland/1996	< 1 - 4 (1)	
Estriol	Holtey-Weber et al. (1999b)	Deutschland/-	n.n. (n.n.)	n.n.
	Stumpf et al. (1996)	Deutschland/1996	< 1 (< 1)	(0,1 - 4,7)
17 β -Sitosterol	Fromme et al. (1999)	Deutschland/-	200 - 800	81,3 - 6276
	Stumpf et al. (1996)	Deutschland/1996	10 - 56 (29)	

Für die **natürlichen und synthetischen Estrogene** zeichnet sich in den deutschen, US-amerikanischen und niederländischen Gewässern ein sehr ähnliches Bild ab. Die gemessenen Estrogene der eigenen Arbeit und anderer Studien liegen überwiegend im unteren ng/l-Bereich (vgl. Tab. 24). Estron wurde deutlich am häufigsten und mit den höchsten Konzentrationen gemessen (Holtey-Weber et al. 1999b, Ternes et al. 1999a, Belfroid et al. 1999). Die Gehalte in der Körsch lagen an manchen Probenahmetagen sogar über 20 ng/l (Median 7,6 ng/l). 17 α -Ethinylestradiol weist in den anderen Studien ebenso wie in Körsch, Krähenbach, Donau, Neckar und Erms (n.n.) sehr niedrige Konzentrationen auf. Es wurden Mediane < 0,5 ng/l bestimmt (Snyder et al. 1999, Ternes et al. 1999a, Belfroid et al. 1999, Kalbfus 1997). In den Niederlanden

wurden für 17β -Estradiol, wie auch in der Körsch, vereinzelt Konzentrationen > 1 ng/l gemessen. Es wurde in der Maas sogar eine Spitzenkonzentration von 5,5 ng/l gemessen (Belfroid et al. 1999). **Estriol** konnte in den untersuchten Fließgewässern nicht detektiert werden. Holtey-Weber et al. (1999b), die südwestdeutsche Oberflächengewässer untersuchten, konnten auch in keiner einzigen Probe Estriol nachweisen.

Die Messungen an der Körsch zeigen, dass bereits in ein und demselben Gewässer die Konzentrationen an natürlichen Estrogenen, vor allem die des Estrons, von Probe zu Probe (4 - 38 ng/l) schwankten. Wenn Stichproben wie aus den vorliegenden Studien (Ternes et al. 1999a, Belfroid et al. 1999, Kalbfus 1997) aus verschiedenen Gewässern miteinander verglichen werden, ist mit weitaus größeren Schwankungen zu rechnen. Dies konnten Harries et al. (1996 und 1997) bestätigen, indem sie in manchen englischen Flüssen direkt nach Einleitung des Abwassers nur geringe estrogenere Effekte bei männlichen Forellen und in anderen Gewässern noch mehrere Kilometer unterhalb der Einleitung eine deutliche Erhöhung der Vitellogenin-Plasmaspiegel nachweisen konnten. Jürgens und Johnson (1999) konnten in ihren Batch-Versuchen mit Wasserproben aus drei verschiedenen englischen Flüssen unterschiedliche Halbwertszeiten zwischen 3 und 27 Tagen für die aerobe Abbaubarkeit von 17β -Estradiol feststellen. Demnach geben die in den einzelnen Studien und der vorliegenden Arbeit gemessenen Konzentrationen natürlicher und synthetischer Estrogene ein erstaunlich einheitliches Bild zur Belastungssituation wider.

17β -Sitosterol wurde in den Fließgewässern Körsch, Krähenbach, Donau, Neckar und Erms in vergleichbaren Konzentrationen wie von Fromme et al. (1999) gemessen.

2 Sedimente

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 11 Sedimentproben aus verschiedenen Fließgewässern in Süddeutschland und zwei Sedimentproben aus den Halbfreiland-Aquarien (Bypass-Systeme) an Körsch (P1) und Krähenbach (P4) entnommen. Die Probenahmestellen sind in Tab. 25 charakterisiert.

Neben der Gewässergüte nach dem Erhebungs- und Bewertungsverfahren der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) ist die Flusslänge und das Probenahmedatum angegeben. Die Gewässergüten der Probenahmestellen weisen einen Verschmutzungsgrad von gering belastet (I - II) bis sehr stark verschmutzt (III - IV) auf (UM 1992). Die Sedimente, die aus sieben, in ihrer Länge stark variierenden Fließgewässern stammten, wurden analysiert, um die Verbreitung phenolischer Xenoestrogene festzustellen, besonders der Substanzen, die bisher kaum untersucht wurden.

Tab. 25: Charakterisierung der Probenahmestellen der Fließgewässer, an denen Sedimente genommen wurden. Die Probenahmedaten und die Gewässergüte sind angegeben.

Gewässername	Charakterisierung	Länge [km]	Probenahmestelle	Gewässergüte ^b	Probenahme
Donau	Oberlauf	2850	Rechtenstein (P7)	II	10.6.1999
Braunsel	kleiner Nebenfluß der oberen Donau	ca. 1,5	Rechtenstein (P13)	I - II ^c	10.6.1999
Neckar	Nebenfluß des Rheins, Unterlauf	367	A: Tübingen, 500 m oberhalb KA ^a (P8) B: Tübingen, 500 m unterhalb KA ^a (P9)	II II - III	26.5.1999 2.6.1999
Echaz	Nebenfluß des unteren Neckars	ca. 20	Reutlingen, 600 m unterhalb KA ^a (P10)	II	25.5.1999
Krähenbach	Nebenfluß der Aich	3	bei Schönaich (P4)	I - II	24.7.1996 27.7.1999
Körsch	Nebenfluß des mittleren Neckars	ca. 25	A: Denkendorf, unterhalb Zufluss Sulzbaches (P1) B: Denkendorf, oberhalb Zufluss Sulzbaches (P2) C: oberhalb KA ^a Nellingen (P3)	III III III	27.7.1999 24.7.1996 24.7.1996
Sulzbach	Nebenfluß der Körsch	ca. 15	Denkendorf, vor Einmündung in Körsch (P14)	III - IV	24.7.1996

^aKA: Kläranlage. ^bUM (1992). ^ceigene Schätzung

2.1 Verbreitung von phenolischen Xenoestrogenen

In Tab. 26a und 26b sind die Konzentrationen der acht phenolischen Xenoestrogene in 11 Sedimentproben der verschiedenen Fließgewässer und in zwei Sedimentproben aus den Halbfreiland-Aquarien (Bypass-Systeme) an Körsch (P1) und Krähenbach (P4) zusammengefasst.

Tab. 26a: Konzentrationen in mg/kg Trockensubstanz (TS) (ppm) phenolischer Xenoestrogene in den Sedimenten der Körsch und des Krähenbaches und aus den Halbfreiland-Aquarien (Bypass-Systeme) an Körsch (P1) und Krähenbach (P4).

Substanz	Konzentrationen [mg/kg] im Sediment						
	Krähenbach			Körsch A		Körsch B	Körsch C
	Bachbett 24.7.96	Bachbett 27.7.99	Aquarium 27.7.99	Bachbett 27.7.99	Aquarium 27.7.99		
4- <i>tert</i> -Octylphenol	0,003	n.n.	0,002	0,005	0,016	0,004	0,004
4-Nonylphenol	0,020	0,010	0,107	0,203	0,557	0,036	0,099
Bisphenol A	n.n.	0,002	0,004	0,007	0,039	0,003	0,005
2- <i>t</i> -Butyl-4-methylph.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
4-Hydroxybiphenyl	0,002	0,002	0,003	0,004	0,007	0,006	0,004
2-Hydroxybiphenyl	0,002	0,003	0,0012	0,002	0,045	0,002	0,003
4-Chlor-3-methylph.	0,001	n.n.	n.n.	0,001	n.n.	0,001	0,015
4-Chlor-2-methylph.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Glühverlust [%]	-	-	-	-		5,2	9,1

Tab. 26b: Konzentrationen in mg/kg Trockensubstanz (TS) (ppm) phenolischer Xenoestrogene in den Sedimenten verschiedener Fließgewässer.

Substanz	Konzentrationen [mg/kg] im Sediment					
	Sulzbach	Neckar A	Neckar B	Echaz	Braunsel	Donau
4- <i>tert</i> -Octylphenol	0,006	0,005	0,008	0,004	0,001	0,009
4-Nonylphenol	0,039	0,078	0,259	0,043	0,010	0,094
Bisphenol A	0,004	0,006	0,015	0,010	0,006	n.n.
2- <i>t</i> -Butyl-4-methylphenol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
4-Hydroxybiphenyl	0,005	0,004	0,006	0,003	0,002	0,002
2-Hydroxybiphenyl	0,002	0,030	0,069	0,048	0,002	0,028
4-Chlor-3-methylphenol	0,002	n.n.	n.n.	n.n.	0,001	0,002
4-Chlor-2-methylphenol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,002
Glühverlust [%]	5,6	8,1	13,6	6,6	6,8	8,2

Die Konzentrationen in den 11 Sedimenten aus den verschiedenen Fließgewässern lagen zwischen nicht nachweisbar (n.n.) und 0,26 mg/kg.

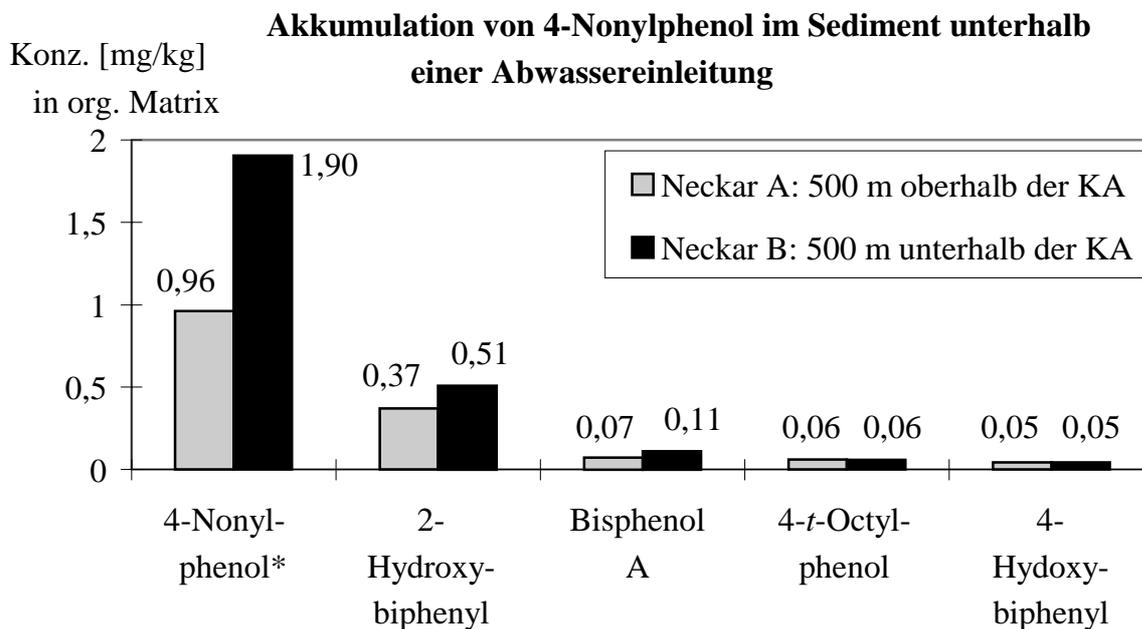
4-Nonylphenol, das in allen 11 Proben zwischen 0,01 und 0,259 mg/kg TS (Median 0,043 mg/kg TS) detektiert wurde, zeigte die höchsten Gehalte der acht Komponenten. Unterhalb der Kläranlage Tübingen (Neckar B) und im Unterlauf der Körsch (Körsch A) wurden im Sediment deutlich höhere Konzentrationen (0,259 bzw. 0,203 mg/kg TS) als in allen anderen Sedimenten gefunden. Die beiden Gewässer Krähenbach und Braunsel, deren Gewässergüte als gering belastet (I - II) eingestuft ist, zeigten für 4-Nonylphenol die niedrigsten Konzentrationen. **4-Hydroxybiphenyl** und **2-Hydroxybiphenyl** konnten auch in allen 11 Sedimenten nachgewiesen werden, allerdings lagen die Mediane (0,004 bzw. 0,002 mg/kg TS) um einen Faktor 10 bzw. 20 niedriger als der von 4-Nonylphenol. Ebenfalls im Neckar B-Sediment wurde 2-Hydroxybiphenyl mit dem Maximum-Gehalt von 0,069 mg/kg TS quantifiziert.

Bisphenol A, das immerhin in 9 Proben nachgewiesen werden konnte (Median 0,005 mg/kg TS), zeigte an dieser Probenahmestelle unterhalb der Kläranlage Tübingen nochmals den höchsten Gehalt von 0,015 mg/kg TS. **4-tert-Octylphenol** wurde mit einer Ausnahme in allen Proben bestimmt. Die Gehalte lagen im Gegensatz zu den Gewässeruntersuchungen deutlich unter denen von 4-Nonylphenol (Median 0,004 mg/kg TS). **4-Chlor-3-methylphenol** wurde in 7 Proben, **4-Chlor-2-methylphenol** nur in einer Probe und **2-tert-Butyl-4-methylphenol** in gar keiner Probe detektiert.

2.1.1 Akkumulation phenolischer Xenoestrogene nach Abwassereintrag

Der tabellarische Vergleich der Gehalte der phenolischen Xenoestrogene bezogen auf das Trockengewicht zeigte, dass die Sedimentprobe des Neckars 500 m unterhalb der Kläranlage Tübingen deutlich höhere Gehalte als die Sedimentprobe oberhalb der Einleitung dieser Kläranlage aufwies. Um beide Proben direkt miteinander vergleichen zu können, wurden die Gehalte auf den Anteil an organischer Matrix (Glühverlust) bezogen. Die Abb. 30 zeigt nur für 4-Nonylphenol der insgesamt fünf nachgewiesenen Substanzen einen deutlichen Anstieg. In der Sedimentprobe 500 m unterhalb der Abwassereinleitung lag seine Konzentration doppelt so hoch wie in der Probe 500 m oberhalb der Kläranlage Tübingen. 2-Hydroxybiphenyl und Bisphenol A zeigten unterhalb der Kläranlage eine Konzentrationserhöhung von ca. 30 %. Da die statistische Genauigkeit des angewandten Analyseverfahrens bei der Vierfachbestimmung einer Klärschlammprobe zwischen ± 16 und 34 % lag (vgl. III.I 4.4.4), kann bei einer Einzelbestimmung keine eindeutige Aussage darüber gemacht werden, ob es sich tatsächlich um eine Konzentrationszunahme handelt. 4-tert-Octylphenol und 4-Hydroxybiphenyl wurden in beiden Sedimentproben mit der gleichen Konzentration gemessen.

Die Akkumulation von 4-Nonylphenol im Sediment unterhalb der Abwassereinleitung bekräftigt die Vermutung, dass einer seiner Haupteintragspfade in die aquatische Umwelt über die Einleitung von gereinigtem Abwasser erfolgt. Allerdings konnten in der Stichprobe des Neckar-Wassers vom 2.6.99, die ebenfalls an der Probenahmestelle P9 genommen wurde, keine erhöhten Gehalte dieser angereicherten Substanz festgestellt werden. Der Neckar führte zum Zeitpunkt der Probenahme vermehrt Wasser, da es die Wochen zuvor stark geregnet hatte. Das Abwasser wurde vermutlich wesentlich stärker verdünnt als während der Trockenwetterperioden, wodurch sich die geringen Konzentrationen erklären lassen.



*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

Abb. 30: Vergleich der Konzentrationen phenolischer Xenoestrogene in Neckar-sedimenten ober- und unterhalb der Kläranlage (KA) Tübingen. Die Gehalte sind in mg/kg organische Matrix angegeben.

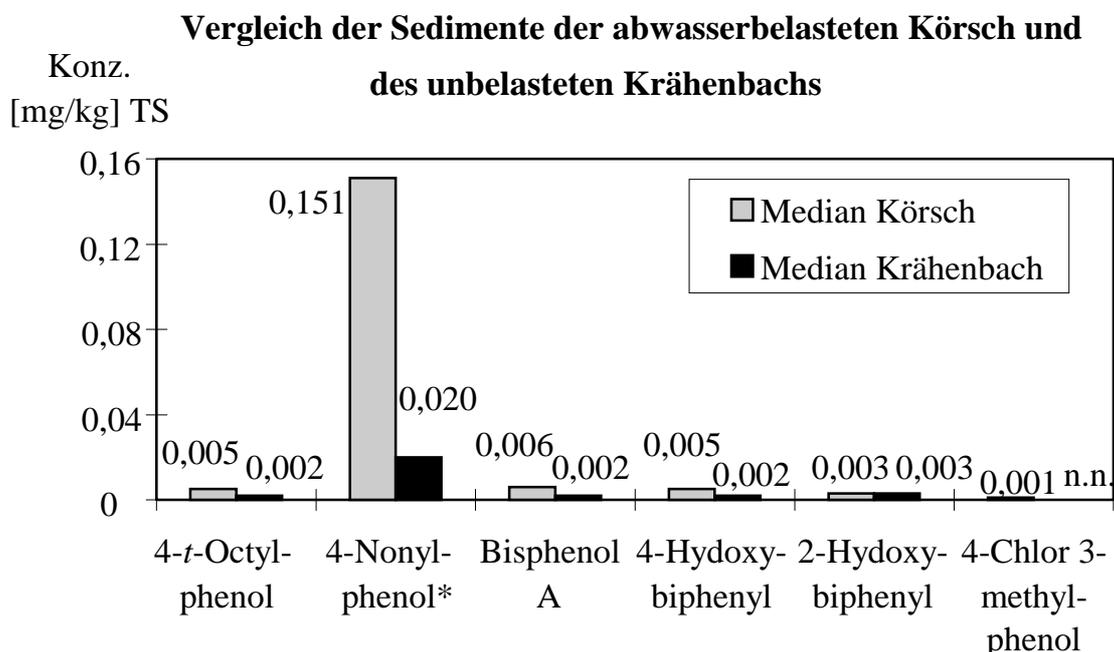
2.1.2 Vergleich Körsch und Krähenbach

Am 27.7.99 wurden aus den Halbfreiland-Aquarien (Bypass-Systeme) an Körsch A (P1) und Krähenbach (P4) je eine Sedimentprobe entnommen. Da die Halbfreiland-Aquarien kontinuierlich von Bachwasser durchflossen werden, reichern sich auch in diesen Sedimenten phenolische Xenoestrogene an. Die bestimmten Konzentrationen sind auch unter III.II 2.1.2 in Tab. 26a aufgeführt.

Die Gehalte der Aquariensedimente lagen im Durchschnitt höher als die der Bachsedimente beider Gewässer (vgl. Tab. 26a). Die Aquariensedimente zeigen wie die

Bachsedimente, eine geringere Belastung für den Krähenbach als für die Körsch. Für 4-Nonylphenol war der Unterschied in beiden Fällen am ausgeprägtesten. In Abb. 31 sind jeweils die Mediane, die aus allen analysierten Sedimenten der Körsch und des Krähenbachs ermittelt wurden, einander gegenübergestellt.

Die höheren Gehalte in den Aquariensedimenten im Vergleich zu denen der Bachsedimente lassen sich durch die unterschiedliche Korngrößenverteilung erklären. Die Aquariensedimente waren wesentlich feiner als die Sedimente aus den Bachbetten. Je feiner die Korngröße, desto größer die Oberfläche und desto besser reichern sich organische Substanzen an.



*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

Abb. 31: Die Mediane der in Sedimenten der Körsch und des Krähenbachs ermittelten Konzentrationen sind einander gegenübergestellt. Die Gehalte sind in mg/kg Trockensubstanz (TS) angegeben.

2.2 Diskussion

Sedimente besitzen die Eigenschaft, Schadstoffe zu adsorbieren und anzureichern, und können somit ein integrierendes Bild über die Belastung der Gewässer liefern. Allerdings akkumulieren überwiegend die Schadstoffe, die einen hohen $\log K_{OW}$ aufweisen. Demnach ist es nicht verwunderlich, dass 4-Nonylphenol in den untersuchten Sedimenten die höchsten Konzentrationen zeigt. Die Anreicherung von 4-Nonylphenol in Sedimenten ist gut dokumentiert. Sedimente werden zu einem großen Teil aus

sedimentierenden Schwebstoffen gebildet. Die adsorptiv an den Schwebstoffen gebundenen Substanzen gelangen somit in das Sediment und akkumulieren. Die Untersuchungen zur Verteilung zwischen Partikel- und Wasserphase in ungereinigtem Abwasser zeigten, dass überwiegend 4-Nonylphenol adsorptiv gebunden wird (s. III.I. 4.3.5 und III.II 3.1). 4-*tert*-Octylphenol, Bisphenol A und 2-Hydroxybiphenyl zeigten nur eine schwache Tendenz zur Adsorption. Dennoch konnten Bisphenol A und 2-Hydroxybiphenyl in den Sedimenten der Echaz und des Neckars mit Gehalten über 0,010 bzw. 0,030 mg/kg TS gemessen werden. Fromme et al. (1999) konnte in Sedimentproben aus verschiedenen Bundesländern sogar höhere Gehalte (0,001 - 0,19 mg/kg TS) für Bisphenol A messen. Im Sediment der Bucht von Tokyo wurden 0,007 mg/kg TS Bisphenol A bestimmt (Nakada et al. 1999). Die wenigen Daten aus der Literatur und die eigenen Messungen zeigen, dass Bisphenol A im unteren bis mittleren ppb-Bereich in den Sedimenten zu finden ist. 2- und 4-Hydroxybiphenyl wurden in allen Proben mit einem Gehalt zwischen 0,002 und 0,006 mg/kg TS detektiert. Dieses ubiquitäre Vorkommen deutet auf natürliche Quellen hin, erst höhere Konzentrationen, wie sie im Sediment der Donau, des Neckars und der Echaz (0,028 - 0,069 mg/kg TS) gemessen wurden, sind vermutlich auf anthropogene Quellen zurückzuführen. 1976 konnten Jungclaus et al. (1978) im Sediment des Brackish River (USA) kein 2-Hydroxybiphenyl nachweisen.

Obwohl die Probenahmestellen der Sedimente überwiegend in industrialisierten und urbanisierten Gebieten und teilweise direkt unterhalb von Abwassereinleitungen (Echaz, Körsch, Neckar und Sulzbach) liegen, waren die Konzentration für 4-Nonylphenol (0,01 - 0,259 mg/kg TS, Median 0,043 mg/kg TS) und 4-*tert*-Octylphenol (n.n. - 0,009 mg/kg TS, Median 0,005 mg/kg TS) teilweise wesentlich niedriger als die, die in englischen und kanadischen Fließgewässern gefunden wurden (Lye et al. 1999, Bennie et al. 1997, Bennett und Metcalf 1998). In der stark mit Abwasser belasteten Tees konnten Konzentrationen bis zu 9,1 mg/kg TS 4-Nonylphenol und 0,34 mg/kg TS 4-*tert*-Octylphenol gemessen werden. Bennie et al. (1997) bestimmten im St. Lorenz Strom bis zu 2,2 mg/kg TS 4-Nonylphenol (Median 0,72 mg/kg TS) und bis zu 0,28 mg/kg TS 4-*tert*-Octylphenol (Median 0,07 mg/kg TS). In den Fließgewässern Detroit River und St. Clair River konnten Bennet und Metcalf (1998) Konzentrationen bis 37,8 mg/kg TS (Median 0,19 mg/kg TS) für 4-Nonylphenol und bis 1,41 mg/kg TS (Median 0,005 mg/kg TS) für 4-*tert*-Octylphenol nachweisen. Im Durchschnitt noch höhere Konzentrationen (bis 72 mg/kg TS) konnten in den Sedimenten der Großen Seen (Kanada) und koreanischer Seen gemessen werden (Bennie et al. 1997, Bennett und Metcalf 1998, Khim et al. 1999). Studien aus der Schweiz und Deutschland fanden in Fließgewässern ähnlich hohe Konzentrationen (bis 13,1 mg/kg TS) für 4-Nonylphenol wie in den kanadischen Fließgewässern (Ahel et al. 1994, Zellner und Kalbfus 1997, Fromme et al. 1999). In Sedimenten des Mains wurde 1989 allerdings ein relativ

niedriger Spitzenwert von 0,7 mg/kg TS (Median ca. < 0,05 mg/kg TS) für 4-Nonylphenol gefunden (Trapp et al. 1992). De Voogt et al. (1997) fanden in Fluss-, Flussmündungs- und Meeressedimenten an der Nordsee ebenfalls niedrige Gehalte für 4-Nonylphenol (0,0001 - 0,017 mg/kg TS) und für 4-*tert*-Octylphenol (n.n. - 0,002 mg/kg TS).

Die Literaturdaten und die eigenen Messungen bestätigen, dass 4-Nonylphenol und 4-*tert*-Octylphenol nach Abwassereinleitungen im Sediment akkumulieren und auf unbelasteteren Fließstrecken in geringeren Konzentrationen vorkommen (Zellner und Kalbfus 1997). Besonders deutlich wurde der Einfluss der Abwassereinleitung in dieser Arbeit im Sediment des Neckars 500 m unterhalb der Kläranlage Tübingen. Die Sedimente des Krähenbachs und der Braunsel weisen die geringsten Gehalte von 4-Nonylphenol und der anderen phenolischen Xenoestrogene auf. Da dennoch in den Sedimenten dieser beiden Fließgewässer, in die kein Abwasser eingeleitet wird (Gewässergüte: I - II), phenolische Xenoestrogene detektiert werden konnten, deutet dies auf run-off als Eintragspfad.

Die im Vergleich zu anderen Studien niedrigen Gehalte von 4-Nonylphenol in den Sedimenten der stark abwasserbelasteten Körsch, des sehr stark belasteten Sulzbaches (Gewässergüte III - IV) und der Echaz lassen sich folgendermaßen erklären: Honnen et al. (1999), die ein vierjähriges Monitoring an Körsch und Krähenbach durchgeführt hatten, konnten für verschiedene Schadstoffe wie Pestizide, PAKs und PCBs (Polychlorierte Biphenyle) in den Sedimenten extrem starke Konzentrationschwankungen von Probenahme zu Probenahme feststellen. Diese Schwankungen werden durch eine häufige Hochwassersituation verursacht, die zu einer ebenso häufigen Umlagerung und mitunter zu einem kompletten Auswaschen der Sedimente führt. Daraus folgern Honnen et al. (1999), dass Schadstoffe in den Sedimenten von kleinen Fließgewässern über einen längeren Zeitraum nicht akkumulieren. Die Sedimente zeigen bei kleineren Fließgewässern kein integrierendes Bild der Schadstoffsituation. Dieses Phänomen trifft wahrscheinlich auch für 4-Nonylphenol zu und erklärt seine geringen Gehalte in den Sedimenten der kleinen Fließgewässer Körsch, Sulzbach und Echaz.

3. Kommunale Kläranlage

Im Rahmen dieser Arbeit wurden im Klärwerk des Zweckverbandes Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm) bei der Abwasser- und Schlammbehandlung anfallende Abwässer und Schlämme auf die Verbreitung estrogen wirksamer Substanzen untersucht.

Die Kläranlage Steinhäule ist eine nach dem neuesten Stand der Technik ausgestattete moderne kommunale Kläranlage, mit einer Kapazität von 350.000 Einwohnerwerten.

Das Abwasser, das zu etwa 60 % häuslichen Ursprungs ist und zu 40 % aus Industrie, Gewerbe, Forschungsinstituten und Kliniken stammt, wird nach dem in Abb. 32 dargestellten Schema behandelt. Die anfallenden Abwässer und Schlämme, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind mit * gekennzeichnet.

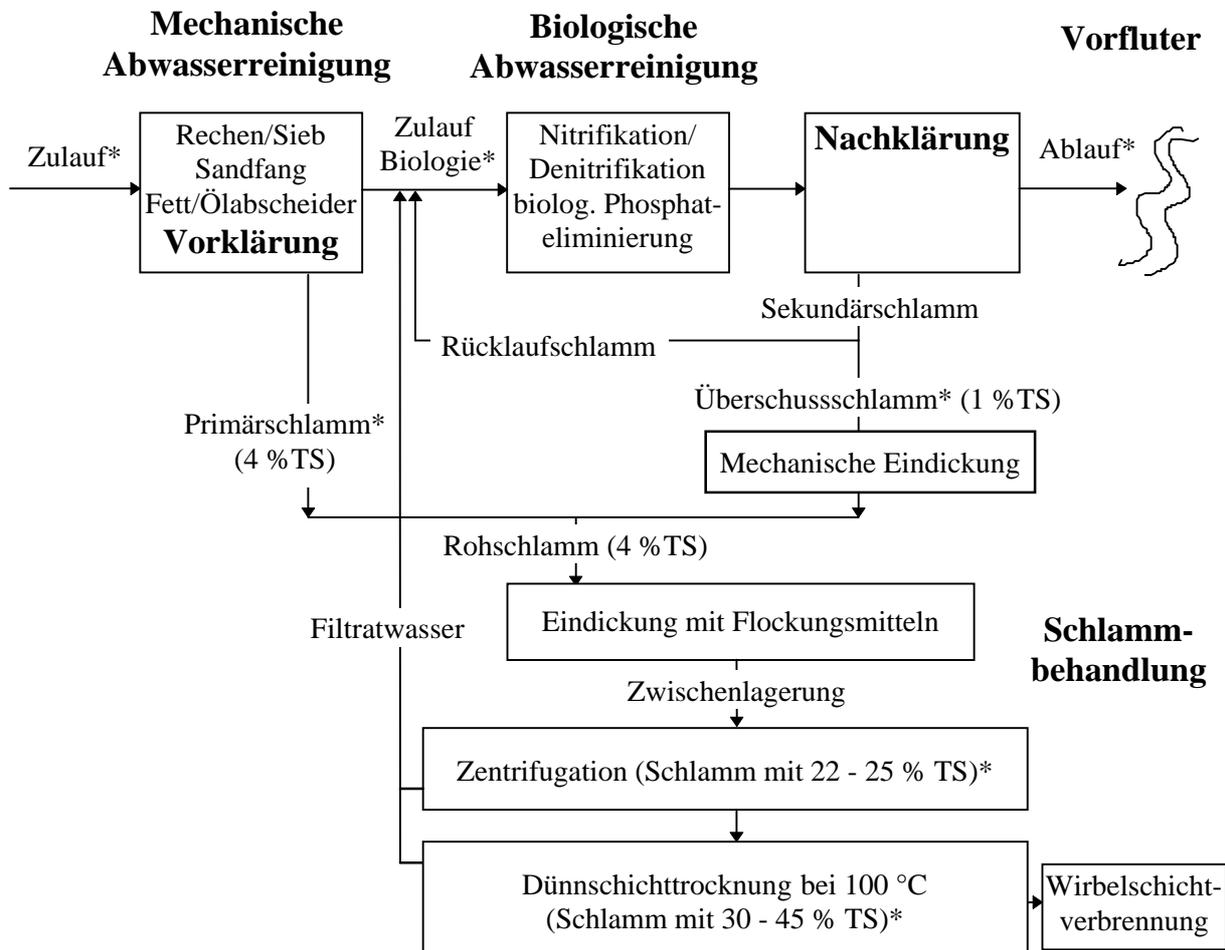


Abb. 32: Schema der Abwasser- und Schlammbehandlung der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm). Die untersuchten Abwässer und Schlämme sind mit * markiert.

Das ungereinigte Abwasser (Zulauf) wird zuerst mechanisch und dann in der biologischen Stufe mit Nitrifikation/Denitrifikation und Phosphatelimination behandelt. Nach der Nachklärung wird der Ablauf in den Vorfluter Donau eingespeist. Der in der Vorklärung anfallende Primärschlamm bildet zusammen mit dem Überschussschlamm (Sekundärschlamm aus der Nachklärung) den Rohschlamm. Dieser wird mit Flockungsmitteln eingedickt und dann nach einer Zwischenlagerung entwässert (Zentrifugation) und getrocknet (Dünnschichttrocknung bei 100 °C). Das hierbei anfallende Wasser (Filtratwasser) wird in die biologische Stufe zurückgeführt. Der Schlamm der Kläranlage Steinhäule, der weder anaerob noch aerob stabilisiert wird,

wird nach der Trocknung mit einem Wirbelschichtverfahren verbrannt. Im Durchschnitt fallen pro Tag 30.000 kg Trockensubstanz (TS) Klärschlamm an. Die gereinigte Abwassermenge (Ablauf) lag bei den Proben zwischen 65.500 und 132.000 m³/d.

Die Probenahme der Kläranlage erfolgte dreimal (10.-12.3.98, 29./30.6.98 und 5./6.7.99). Während der beiden Probenahmen im Jahr 1998 herrschte Trockenwetterlage und am 5./6.7.99 regnete es mehrere Stunden relativ stark.

Unter anderem wurden in dieser Arbeit 24 h-Sammelproben des Ablaufes der Pflanzenkläranlage Ostritz-Bergfrieden (Sachsen), der Kläranlage Ostritz (Sachsen) und der Kläranlage Nellingen (Stuttgart) untersucht.

3.1 Phenolische Xenoestrogene und Steroide im Abwasser

Abwasser der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm)

Bei allen drei Beprobungen wurde jeweils der Zulauf und der Ablauf der Kläranlage Steinhäule auf phenolische Xenoestrogene und Steroide analysiert. Am 5./6.7.99 wurde zusätzlich der Zulauf Biologie, der aus der Vorklärung stammt, untersucht. Der Ablauf am 10./11.3.98 wurde im Klärwerk in einer Ultrafiltrationsanlage im Labormaßstab weiter aufgereinigt. Durch Analytik des Ultrafiltrats sollte die Effektivität der Ultrafiltration als mögliche weitergehende Abwasserreinigung getestet werden.

Die Ergebnisse der gemessenen phenolischen Xenoestrogene und Steroide sind in Tab. 27 zusammengefasst.

Phenolische Xenoestrogene

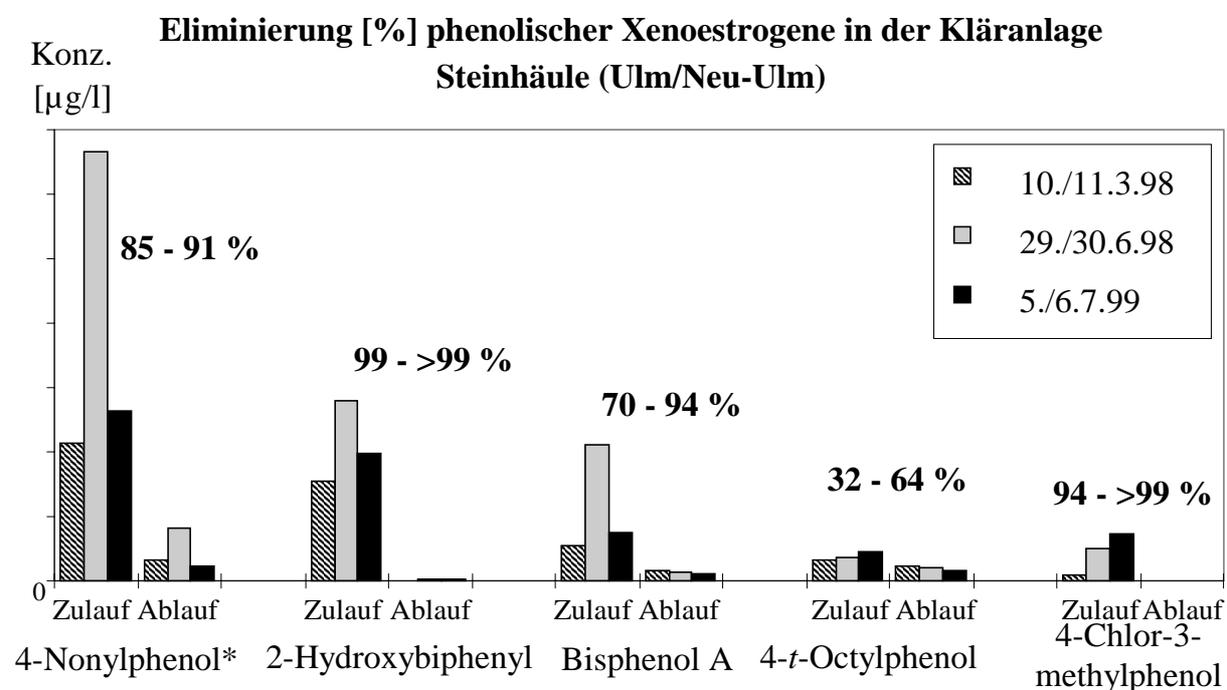
Bei den drei Probenahmen wurden insgesamt sieben der neun phenolischen Xenoestrogene im Abwasser der Kläranlage Steinhäule gefunden (vgl. Tab. 27). In allen drei Zulaufproben konnten fünf, teilweise in erheblich hohen Konzentrationen, und in allen Ablaufproben immerhin noch vier dieser phenolischen Chemikalien nachgewiesen werden. 2-*tert*-Butyl-4-methylphenol und 4-Hydroxybiphenyl waren in keiner und 4-Chlor-2-methylphenol nur in einer einzigen Zulaufprobe mit nur 12,5 ng/l nachweisbar. Die Gehalte der einzelnen Beprobungen waren sehr ähnlich, mit Ausnahme der von 4-Nonylphenol und Bisphenol A im Zulauf vom 29./30.6.98 (drei- bis vierfach höhere Gehalte).

Tab. 27: Konzentrationen in ng/l (ppt) phenolischer Xenoestrogene und der Steroide im Abwasser (24-h-Mischproben) der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm). Die Mittelwerte (\pm SD) von n unabhängigen Analysen von 1 l-Aliquoten sind angegeben. Bei den Steroiden ist in Klammer die Nachweisgrenze angegeben.

Substanz	Konzentrationen [ng/l] im Abwasser der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm)							
	Zulauf	10./11.03.98		29./30.06.98		05./06.07.99		
		Ablauf	Ablauf Ultrafiltrat	Zulauf	Ablauf	Zulauf	Zulauf Biologie	Ablauf
Substanz (Phenole)	n = 3	n = 3	n = 1	n = 2	n = 2	n = 3	n = 1	n = 1
4- <i>tert</i> -Octylphenol	321 (\pm 117)	218 (\pm 11)	124 (\pm 32,5)	367	210	457 (\pm 127)	172	165
4-Nonylphenol*	2129 (\pm 1490)	320 (\pm 90)	200 (\pm 64,6)	6648	827	2638 (\pm 548)	786	232
Bisphenol A	542 (\pm 275)	162 (\pm 35)	3684 (\pm 1646)	2116	126	739 (\pm 98)	530	104
3- <i>tert</i> -Butyl-4-hydroxyanisol	4,6 (\pm 8,0)	n.n.	n.n.	49,8	29,6	n.n.	n.n.	n.n.
2- <i>tert</i> -Butyl-4-methylphenol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
4-Hydroxybiphenyl	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2-Hydroxybiphenyl	1544 (\pm 349)	< 20	< 20	2801	20,8	1968 (\pm 219)	523	30,3
4-Chlor-3-methylphenol	86 (\pm 83)	< 10	< 10	507	n.n.	726 (\pm 167)	108	n.n.
4-Chlor-2-methylphenol	n.n.	n.n.	n.n.	12,5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Substanz (Steroide)	n = 1	n = 1	n = 1	n = 1	n = 1	n = 1	n = 1	n = 1
17 β -Estradiol	2,8	n.n. (4,6)	n.n. (4,0)	14,2	n.n. (2,8)	52,0	59,5	1,7
Estron	15,0	25,9	40	17,7	32,0	151	306,2	12,0
17 α -Ethinylestradiol	19,6	n.n. (3,7)	n.n. (3,4)	11,7	n.n. (2,0)	32,6	47,3	2,8
Estriol	16,7	n.n. (3,0)	n.n. (4,3)	16,6	n.n. (2,5)	73,3	122	n.n. (0,6)
17 β -Sitosterol	154	613	474	2383	147	2068	2138	180

*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

In Abb. 33 sind die einzelnen Konzentrationen der regelmäßig im Zu- und Ablauf gefundenen Komponenten einander gegenübergestellt. Gleichzeitig sind die Eliminierungsraten angegeben, die sich aus der Differenz der Konzentrationen im Zu- und Ablauf, bezogen auf die Konzentration im Zulauf, in Prozent ergaben. Wenn die Konzentration unter der Bestimmungs- bzw. Nachweisgrenze lag, wurde mit 1/2 der Bestimmungs- bzw. 1/3 der Nachweisgrenze gerechnet. Die Ermittlung der Eliminierungsraten war möglich, da bei der parallelen Probenahme von Ab- und Zulauf, der Ablauf entsprechend der mittleren Verweildauer des Abwassers in der Kläranlage 7 - 8 h zeitversetzt genommen wurde. Die Eliminierungsraten zeigten mit Ausnahme der von 4-*tert*-Octylphenol für alle drei Beprobungen eine geringe Abweichung und lagen über 70 % bis > 99 %.



*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

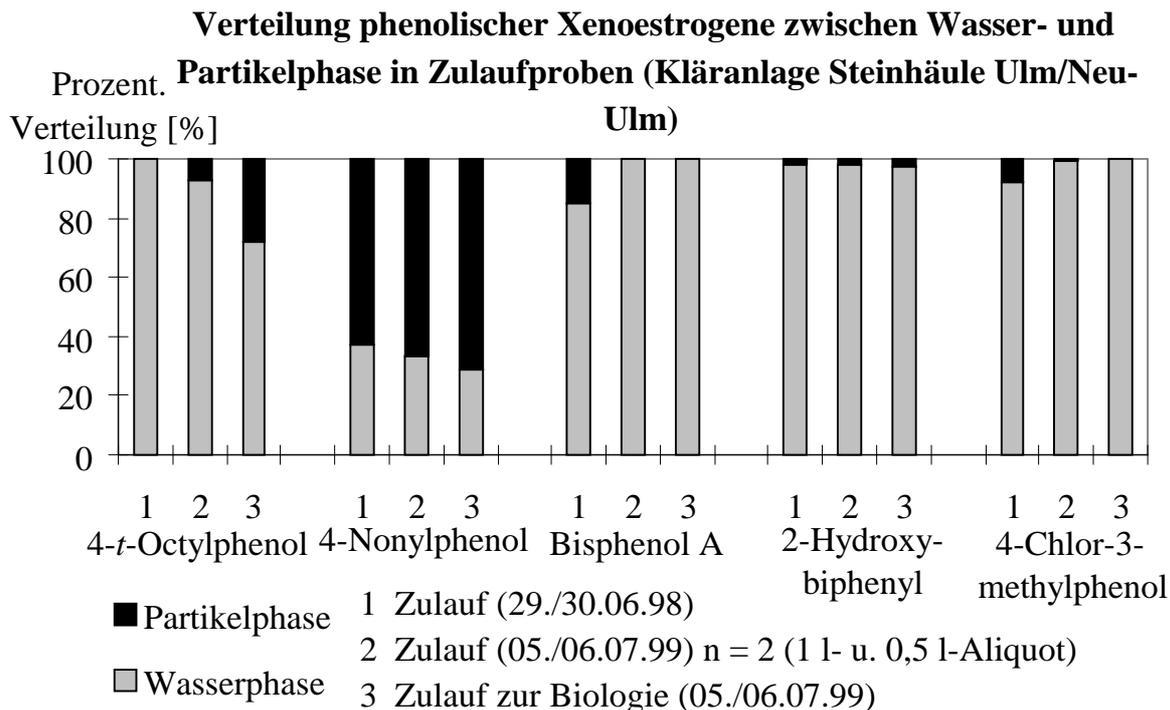
Abb. 33: Gehalte [µg/l] der phenolischen Xenoestrogene im Zu- und Ablauf (24 h-Mischprobe) der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm) an drei verschiedenen Probenahmedaten. Die Eliminierungsraten der Komponenten (Differenz der Konzentrationen im Zu- und Ablauf bezogen auf die Konzentration im Zulauf in Prozent) während der Abwasserbehandlung ist angegeben.

Für 4-Nonylphenyl wurden im Zu- und Ablauf die höchsten Konzentrationen gemessen (2,1 - 6,5 µg/l bzw. 0,2 - 0,8 µg/l). Obwohl sich die Gehalte um 85 bis 91 % verringerten, sind die Konzentrationen, die in den Vorfluter eingeleitet wurden, noch relativ hoch. Im Zulauf zeigten 2-Hydroxybiphenyl und Bisphenol A ebenfalls hohe

Konzentrationen (1,5 - 2,8 µg/l bzw. 0,54 - 2,1 µg/l). Die Gehalte für 2-Hydroxybiphenyl im Ablauf waren nahezu vollständig reduziert, dagegen lagen für Bisphenol A und für 4-*tert*-Octylphenol die Gehalte immer noch über 0,1 µg/l. 4-*tert*-Octylphenol zeigte die niedrigste und am weitesten gestreute Eliminierungsrate (32 - 64 %). 4-Chlor-3-methylphenol wurde nahezu vollständig eliminiert (Zulauf: 86 - 726 ng/l, Ablauf: n.n - < 10 ng/l, Elimination 94 - > 99 %).

Mit 30-minütiger Verzögerung zur Zulaufprobe vom 5./6.7.1999 wurde eine Probe des **Zulaufes Biologie** genommen. In diesem Zulauf Biologie wurden die bereits im Zulauf gemessenen phenolischen Xenoestrogene mit abnehmender Konzentration gefunden: 4-Nonylphenol > Bisphenol A > 2-Hydroxybiphenyl > 4-*tert*-Octylphenol > 4-Chlor-3-methylphenol. Bis auf Bisphenol A (28 %) wurden die Substanzen während der mechanischen Abwasserreinigung deutlich reduziert (4-Nonylphenol 70 %, 2-Hydroxybiphenyl 73 %, 4-*tert*-Octylphenol 62 %, 4-Chlor-3-methylphenol 85 %), allerdings lagen sie im Zulauf Biologie mit Ausnahme von 4-*tert*-Octylphenol immer noch deutlich höher als im Ablauf.

Während der mechanischen Abwasserreinigung kommt es bei der Vorklärung zum Absetzen der in der Wasserphase ungelösten Partikel (Primärschlamm). Konsequenterweise erfolgt die Abwasserklärung organischer Schadstoffe und Schwermetalle also überwiegend auf physikalischem Wege, indem diese an absinkenden Partikeln adsorbieren. Es konnte aber bereits unter III.I 4.3.5 gezeigt werden, dass die Verteilung zwischen Wasser- und Partikelphase zugunsten einer Anreicherung auf der Partikelphase eigentlich nur für 4-Nonylphenol stattfindet. Die Verteilungsverhältnisse zwischen Wasser- und Partikelphase wurden neben der Zulaufprobe vom 5./6.7.1999 (vgl. III.I 4.3.5) auch für die parallel genommene Zulauf Biologie-Probe (5./6.7.1999) und den Zulauf vom 29./30.6.98 untersucht. Es wurden jeweils die Wasser- und die Partikelphase getrennt extrahiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 34 dargestellt. Aus den drei Messungen ergab sich im Durchschnitt eine Anreicherung auf der Partikelphase von 67 % für 4-Nonylphenol, 5,1 % für 4-*tert*-Octylphenol, 5 % für Bisphenol A, 2,9 % für 4-Chlor-3-methylphenol und 2,3 % für 2-Hydroxybiphenyl. Obwohl die Anreicherung von 4-*tert*-Octylphenol, Bisphenol A, 4-Chlor-3-methylphenol und 2-Hydroxybiphenyl auf der Partikelphase sichtlich schlecht ist, waren diese Substanzen dennoch nach der Vorklärung zwischen 28 und 85 % reduziert. Es müssen also neben der Eliminierung durch Adsorption an sedimentierende Partikel andere Eliminierungsvorgänge stattfinden. Im Fall der Kläranlage Steinhäule ist denkbar, dass während der mechanischen Abwasserreinigung bei der Fett/Ölabscheidung sich die phenolischen Xenoestrogene zumindest teilweise mit der abscheidenden Fett/Ölphase aus der Wasserphase abtrennen. Die Untersuchung dieser Fett/Ölphase würde die Eliminierungs- und Verteilungsverhältnisse vervollständigen.



*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

Abb. 34: Prozentuale Verteilung phenolischer Xenoestrogene zwischen der Wasser- und Partikelphase in Aliquoten des Zulaufs und des Zulaufs zur Biologie (24 h-Mischproben der Kläranlage Steinhäule Ulm/Neu-Ulm).

Steroide

In den Zuläufen der drei Beprobungen wurden alle fünf untersuchten Steroide gefunden (vgl. Tab. 27). Die Konzentrationen bei den beiden Probenahmen im Jahr 1998 lagen für die natürlichen und synthetischen Estrogene in derselben Größenordnung (2,8 - 19,6 ng/l), im Zulauf vom 5./6.7.99 konnten dagegen deutlich höhere Konzentrationen gemessen werden (32,6 - 151 ng/l).

In den Abläufen wurden zwischen zwei und vier Komponenten detektiert (vgl. Tab. 27). Die Konzentrationen der natürlichen und synthetischen Estrogene in den Abläufen lagen im Gegensatz zu den Zuläufen bei allen drei Beprobungen in der gleichen Größenordnung (< 0,6 - 32,0 ng/l). Bei den Analysen der beiden Ablaufproben im Jahr 1998 lagen leider die Nachweisgrenzen bei maximal 4,3 ng/l (10./11.3.98) bzw. 2,8 ng/l (29./30.6.98), sodass 17 β -Estradiol, 17 α -Ethinylestradiol und Estriol unterhalb dieser Konzentrationen nicht mehr quantifiziert werden konnten. Am 5./6.7.99 wurden 17 β -Estradiol (1,7 ng/l) und 17 α -Ethinylestradiol (2,8 ng/l) unterhalb dieser Konzentrationen bestimmt. Estron war in allen drei Ablaufproben mit der höchsten Konzentration der Estrogene messbar (12,0 - 32,0 ng/l). Mit Ausnahme der Zulaufprobe vom 10./11.3.98 konnte für 17 β -Sitosterol in allen Zu- und Ablaufproben die höchsten

Konzentrationen der fünf Steroide bestimmt werden (Zulauf 2138 - 2383 ng/l, Ablauf 147 - 613 ng/l).

In Abb. 35 sind die Gehalte der fünf Steroide in den Zu- und Abläufen an den drei Probenahmedaten einander gegenübergestellt. Die Eliminierungsraten während der Abwasserbehandlung sind jeweils angegeben. Alle Steroide erreichten eine Eliminierung von mindestens 92 % und werden also während der Abwasserbehandlung besser entfernt als die phenolischen Xenoestrogene. Allerdings trat vereinzelt das Phänomen eines Anstieges der Konzentration im Ablauf gegenüber dem Zulauf auf. Für Estron wurde in beiden Abläufen im Jahr 1998 eine Erhöhung um 72,7 % bzw. 80,8 % höher gemessen. Die Konzentration von 17 β -Sitosterol lag im Ablauf am 10./11.3.98 sogar um 298 % höher.

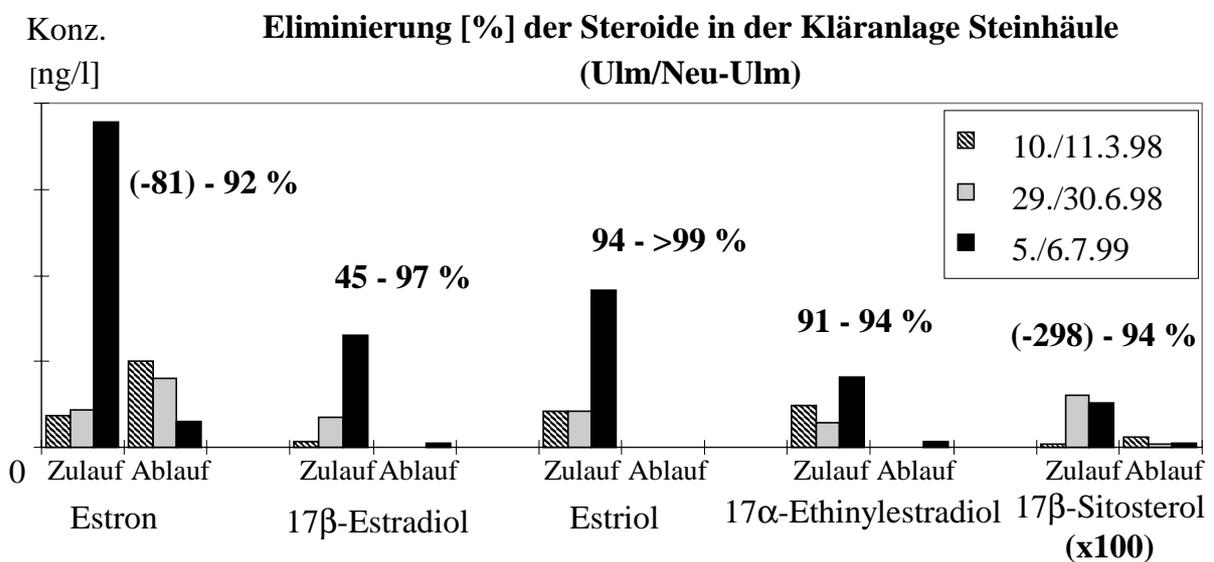


Abb. 35: Gehalte [$\mu\text{g/l}$] der Steroide im Ab- und Zulauf (24 h-Mischprobe) der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm) an drei verschiedenen Probenahmedaten. Die Eliminierungsraten und die prozentualen Konzentrationserhöhungen im Ablauf gegenüber dem Zulauf (-X %) der Komponenten während der Abwasserbehandlung sind angegeben.

Im Gegensatz zu den phenolischen Xenoestrogenen konnte in der Probe des **Zulaufes Biologie**, die mit 30-minütiger Verzögerung zur Zulaufprobe vom 5./6.7.1999 genommen wurde, keine Eliminierung der Gehalte der fünf Steroide festgestellt werden. Im Gegenteil, die Konzentrationen der natürlichen und synthetischen Estrogene stiegen zum Teil bis auf das Doppelte an (vgl. Abb. 36). Nur für 17 β -Sitosterol lagen die Konzentrationen nach der mechanischen Abwasserreinigung gleich hoch. Der Anstieg aller vier Estrogene lässt sich durch die Spaltung von im Abwasser vorliegenden Estrogenkonjugaten zu den freien Steroiden erklären. Von Mensch und Tier werden die natürlichen Estrogene als Sulfate und Glucuronide über Galle und Harn aus-

geschieden. Das „Pillenhormon“ 17α -Ethinylestradiol wird von der Frau ebenfalls in konjugierter Form ausgeschieden. Während der Passage des Abwassers durch die Kanalisation verläuft die Konjugat-Spaltung nicht vollständig, sodass während der mechanischen Abwasserbehandlung und vermutlich auch während der biologischen Abwasserreinigung die Spaltung fortläuft. Die verzögerte Konjugat-Spaltung erklärt auch das oben genannte Phänomen (im Verhältnis höhere Konzentrationen im Ablauf als im Zulauf). Die Konjugate waren offensichtlich am 10./11.3.98 und 29./30.6.98 in den Zuläufen noch nicht vollständig gespalten. Die angewandte Analysenmethode erfasst nur die freien Estrogene und nicht die Glucuronide und Sulfate.

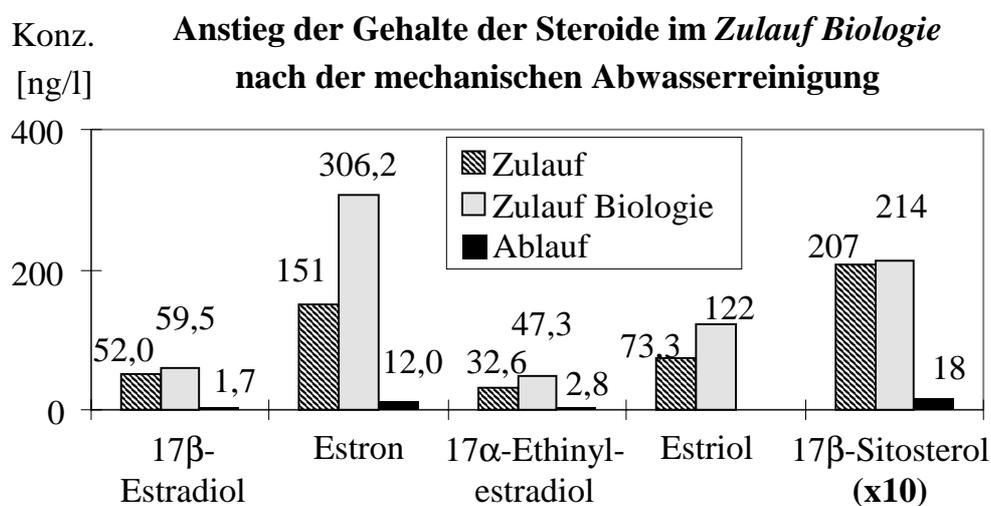
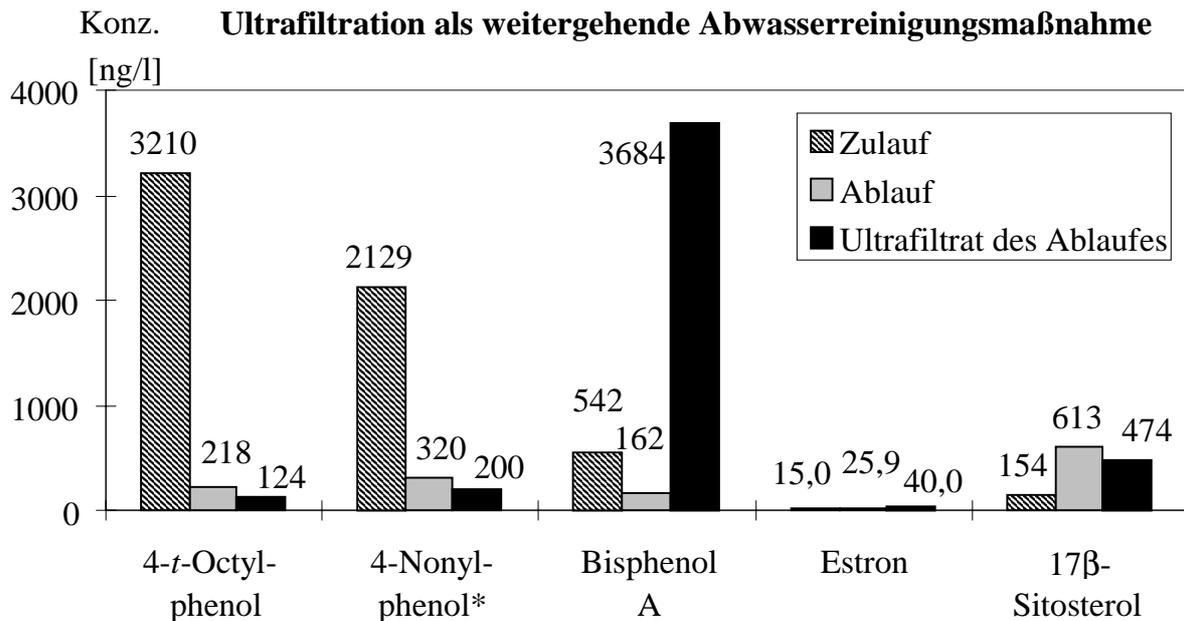


Abb. 36: Gehalte [$\mu\text{g/l}$] der Steroide im Ab- und Zulauf (24 h-Mischprobe) der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm) an drei verschiedenen Probenahmedaten.

Die Analyse des **Ultrafiltrats** des Ablaufes vom 10./11.3.98 zeigt, dass die estrogen wirksamen Substanzen, die im Ablauf nachgewiesen werden konnten, nach der Ultrafiltration mit Ausnahme von Bisphenol A und Estron verringert wurden. Die Abnahme von 4-*tert*-Octylphenol, 4-Nonylphenol und 17β -Sitosterol gegenüber der Ablaufprobe lag zwischen 23 % und 43 %. Die Konzentration von Estron stieg im Ultrafiltrat um 54 % an. Bisphenol A lag im Ultrafiltrat sogar 23-fach höher vor als im Ablauf und wie in Abb. 37 deutlich sichtbar auch 7-fach höher als im Zulauf.



*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

Abb. 37: Vergleich der Gehalte [$\mu\text{g/l}$] von estrogen wirksamen Substanzen im Ultrafiltrat des Ablaufes (24 h-Mischproben) der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm) am 10./11.3.98 und im parallel genommenen Zu- und Ablauf (24 h-Mischproben).

Ablaufproben anderer Kläranlagen

In den Abläufen der Kläranlagen Nellingen (bei Stuttgart), Ostritz (Sachsen) und der Pflanzenkläranlage Ostritz-Bergfrieden konnten ähnliche Gehalte estrogen wirksamer Substanzen gemessen werden. In Tab. 28 sind die Ergebnisse der gefundenen Substanzen zusammengefasst. Insgesamt wurden fünf der neun phenolischen Xenoestrogene detektiert. Die Gehalte der *p*-Alkylphenole und des Bisphenol A lagen allerdings niedriger als die in den Abläufen der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm). Die natürlichen und synthetischen Steroide konnten wie in der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm) im unteren ppt-Bereich gemessen werden.

Die niedrigen Konzentrationen der phenolischen Xenoestrogene im Ablauf der Kläranlage Nellingen sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass während der langen Lagerungszeit bereits ein Teil dieser Substanzen abgebaut wurde.

Tab. 28: Gehalte in ng/l (ppt) phenolischer Xenoestrogene und der Steroide in Abläufen (24 h-Mischproben) von drei Kläranlagen (KA).

Substanz	Konzentrationen [ng/l] in Abläufen		
	KA Nellingen ^a	KA Bergfrieden	KA Ostritz
4- <i>tert</i> -Octylphenol	72,7	< 20	< 20
4-Nonylphenol*	144	215	229
Bisphenol A	< 50	< 50	< 50
2-Hydroxybiphenyl	n.n.	n.n.	32,5
4-Chlor-2-methylphenol	42,5	n.n.	n.n.
17 β -Estradiol	0,9	-	1,1
Estron	12,7	-	1,4
17 α -Ethinylestradiol	n.n. (0,4)	-	6,5
Estriol	0,8	-	n.n. (0,1)
17 β -Sitosterol	14,8	-	593

*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

^a Die SPE eines 1 l-Aliquots wurde erst nach 1-jähriger Lagerung durchgeführt.

3.2 Phenolische Xenoestrogene in Klärschlamm

An zwei Probenahmeperioden (11.-12.3.98 und 5./6.7.99) und am 8.7.98 (eine Woche nach der Probenahme von Ab- und Zulauf am 29./30.6.98) wurde im Klärwerk Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm) jeweils eine Stichprobe des getrockneten Schlammes entnommen, die dennoch aufgrund der ständigen Durchmischung während der Trocknung repräsentativen Charakter hatte. Bei der Probenahme am 5./6.7.99 wurde außerdem zeitgleich zum getrockneten Schlamm je eine Stichprobe des Primär- und des Überschussschlammes genommen.

Die quantitative Auswertung aller untersuchten Klärschlammproben war möglich. Abb. 38 zeigt saubere Massenfragmentogramme der für Bisphenol A und 2-Hydroxybiphenyl charakteristischen *m/z*-Werte der Schlammprobe (getrockneter Schlamm) vom 6.7.99 im Vergleich zur Standardlösung. Die Gehalte der insgesamt acht untersuchten phenolischen Xenoestrogene in den Schlämmen sind in Tab. 29 aufgeführt.

In allen drei getrockneten Schlämmen konnten fünf der acht phenolischen Komponenten nachgewiesen werden. Die Gehalte der fünf Substanzen, die auch in den drei Zulaufproben gefunden wurden, waren mit Ausnahme von Bisphenol A in allen drei

Proben ähnlich. In der Probe vom 8.7.98 lag für Bisphenol A eine 11-fach geringere Konzentration vor als am 6.7.99. 4-Nonylphenol (2,517 - 3,675 mg/kg) zeigte bei weitem die höchste Konzentration; die Gehalte der anderen detektierten Komponenten lagen zwischen 0,011 und 0,770 mg/kg. In zwei getrockneten Schlämmen war außerdem 4-Hydroxybiphenyl in geringen Konzentrationen (0,011 - 0,012 mg/kg) nachweisbar.

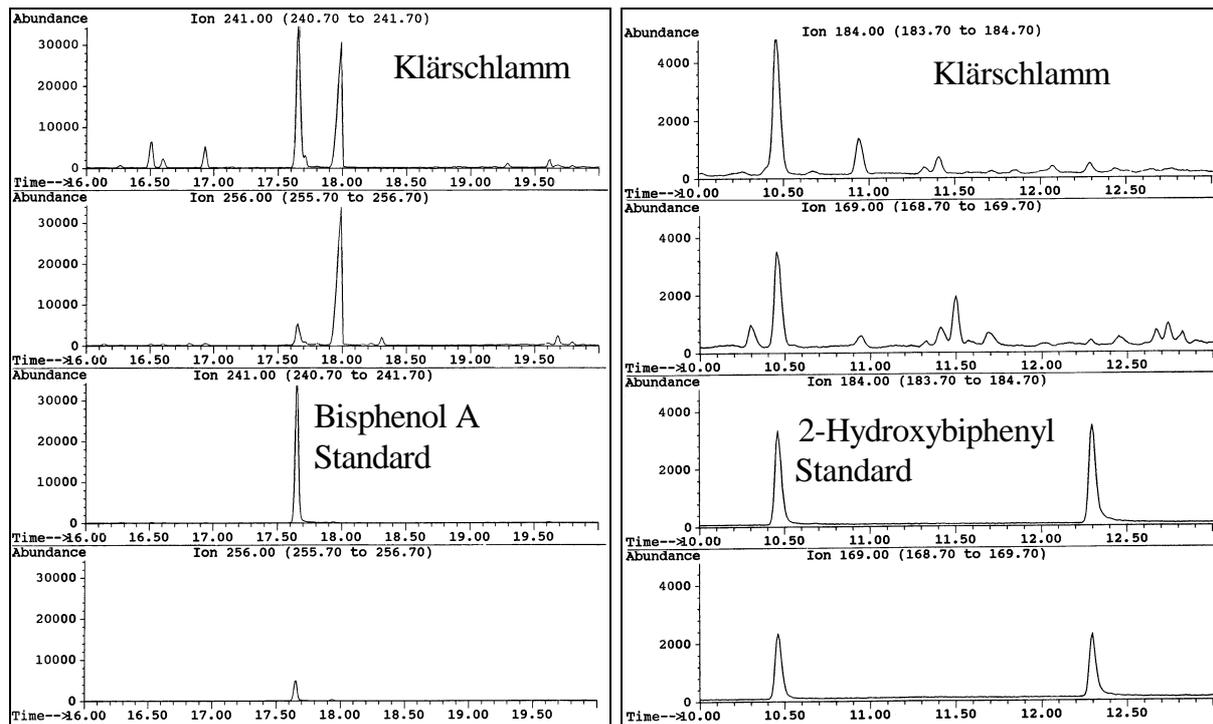


Abb. 38: Massenfragmentogramme der für die Identifizierung und Quantifizierung von Bisphenol A und 2-Hydroxybiphenyl charakteristischen Massenspektren in einer Klärschlammprobe (getrockneter Schlamm des Klärwerks Steinhäule vom 6.7.99) im Vergleich zu denen der Standardlösung.

Die Probenahmeserie am 5./6.7.99, die aus Primär-, Überschussschlamm und dem getrockneten Schlamm bestand, sollte darüber Aufschluss geben, wieviel der Primär- und wieviel der Überschussschlamm zum Gesamtgehalt der einzelnen Komponenten im getrockneten Schlamm beiträgt. Der getrocknete Schlamm setzt sich in der Kläranlage Steinhäule aus ca. 1/4 des Primärschlammes und ca. 3/4 des Überschussschlammes zusammen. Die gemessenen Gehalte des Primär- und Überschussschlammes wurden auf ihren Anteil im getrockneten Gesamtschlamm bezogen (Abb. 39). Die Konzentrationen der phenolischen Xenoestrogene des Primärschlammes tragen nur zu einem Bruchteil zum Gesamtschlamm bei (4-*tert*-Octylphenol: 7,1 %, 4-Nonylphenol 6,0 %, Bisphenol A 0,26 %, 4-Hydroxybiphenyl 27,3 %, 2-Hydroxybiphenyl 0 % und 4-Chlor-3-Methylphenol 2,7 %). Logischerweise müsste der

Hauptanteil der phenolischen Xenoestrogene aus dem Überschussschlamm beige-steuert werden.

Tab. 29: Gehalte phenolischer Xenoestrogene in mg/kg Trockensubstanz (TS) in Klärschlämmen der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm)

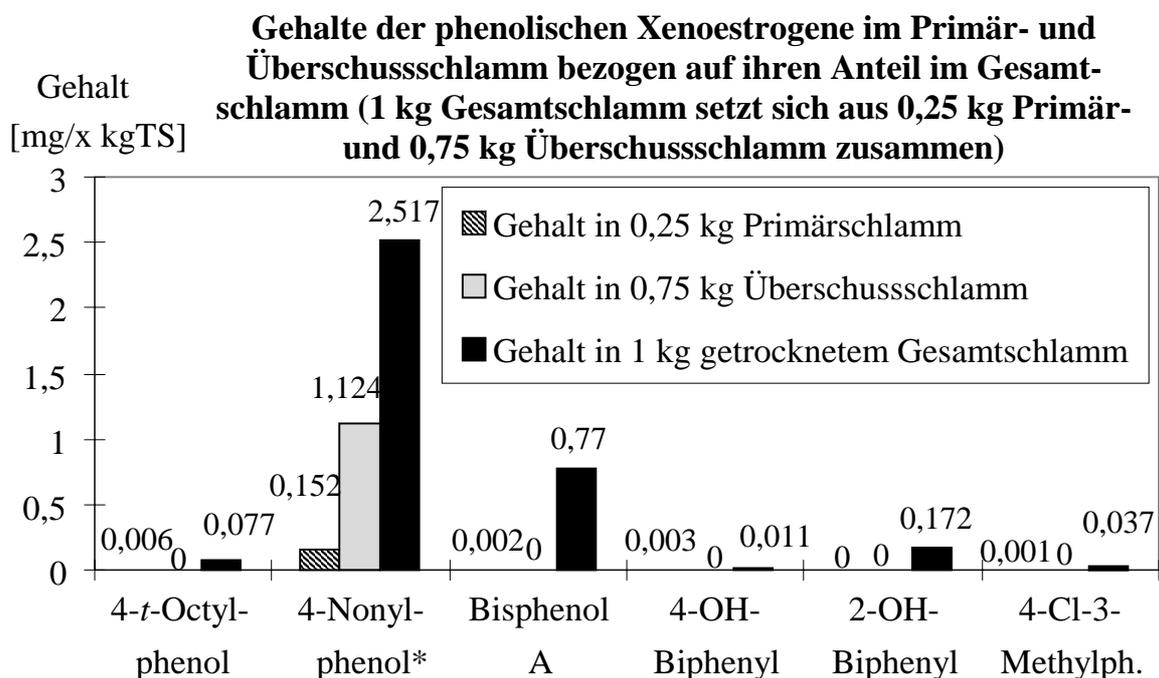
Substanz	Konzentrationen [mg/kg TS] im Klärschlamm				
	getrockn. Schlamm	getrockn. Schlamm	getrockn. Schlamm ^a	Primär-schlamm	Überschuss-schlamm
	12.03.98	08.07.98	06.07.99	06.07.99	06.07.99
4- <i>tert</i> -Octylphenol	0,201	0,142	0,077	0,022	n.n.
4-Nonylphenol*	2,619	3,675	2,517	0,607	1,499
Bisphenol A	0,550	0,070	0,770	0,008	n.n.
2- <i>t</i> -Butyl-4-methylphenol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
4-Hydroxybiphenyl	0,012	n.n.	0,011	0,012	n.n.
2-Hydroxybiphenyl	0,114	0,063	0,172	n.n.	n.n.
4-Chloro-3-Methylphenol	0,040	0,014	0,037	0,004	n.n.
4-Chloro-2-Methylphenol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Glühverlust [%]	63,5	66,6	-	-	-

*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

^aSchlamm nur einfach durch Zentrifugation getrocknet (vgl. III.II 3 Abb. 32)

In der Abb. 39 und in Tab. 29 wird allerdings sichtbar, dass im Überschussschlamm nur 4-Nonylphenol gemessen wurde. Bei der Probenaufbereitung wurde der Überschussschlamm (nur 1 % TS) im Gegensatz zum Primär- und Gesamtschlamm zentrifugiert. Die Wasserphase wurde verworfen. Phenolische Xenoestrogene, die mit der Wasserphase abgetrennt wurden, konnten also nicht bestimmt werden. Aufgrund des Verteilungsgleichgewichtes zwischen Partikel- und Wasserphase (vgl. III.II 3.1 Abb. 34) wurden vermutlich 4-*tert*-Octylphenol, Bisphenol A, 2-Hydroxybiphenyl und 4-Chlor-3-methylphenol mit der Wasserphase verworfen. Die Ergebnisse des Überschussschlammes eignen sich also nicht für eine Gesamtbilanzierung der Abwasser- und Schlammbehandlung. Da aber nur 4-Nonylphenol gefunden wurde, kann daraus gefolgert werden, dass in einem Klärschlamm mit 1 % TS ein ähnliches Verteilungsgleichgewicht zwischen Partikel- und Wasserphase wie im Zulauf vorliegen muss. Theoretisch müsste es während der Schlammbehandlung der Kläranlage Steinhäule bei der Zentrifugation ebenfalls zur Abtrennung der in der Wasserphase gelösten Komponenten kommen und dadurch lägen die Gehalte im getrockneten Schlamm

wesentlich niedriger. Im getrockneten Gesamtschlamm ist aber gegenüber dem Primär- und Überschussschlamm ein starker Anstieg der phenolischen Xenoestrogene zu erkennen. Der hohe Anstieg lässt sich nur daraus erklären, dass vor der Zentrifugation bei der Schlammbehandlung das Phasengleichgewicht zugunsten einer Anreicherung auf der Partikelphase gestört wird. Polyacrylate, die als Flockungsmittel bei der Eindickung zugesetzt werden, binden durch Quellung die Wasserphase im Rohschlamm. Die in der Wasserphase gelösten phenolischen Xenoestrogene werden vermutlich an den Polyacrylaten adsorptiv gebunden und können bei der nachfolgenden Zentrifugation nicht mehr mit dem Filtratwasser abgeschieden werden.



*Quantifizierung der 4-Nonylphenol-Isomere über den Mittelwert der Peaks 2 und 10.

Abb. 39: Gehalte [mg/x kg Trockensubstanz (TS)] phenolischer Xenoestrogene in Klärschlämmen der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm) am 06.07.99.

3.3 Bilanzierung des Ein- und Austrages phenolischer Xenoestrogene während der Abwasser- und Schlammbehandlung

Bei den beiden Probenahmen am 10.-12.3.98 und 5./6.7.99 wurden jeweils 24 h-Mischproben des Zu- und Ablaufes und je eine repräsentative Stichprobe des getrockneten Gesamtschlammes analysiert. Da die Wasserproben 7 - 8 h zeitversetzt und der Schlamm am Ende der Abwasserprobenahme (bzw. 24 h später) genommen wurden, können zwei komplette Massenbilanzen aufgestellt werden.

Tab. 30: Ein- und Austragsfrachten der phenolischen Xenoestrogene [g/d] mit dem Zu- und Ablauf der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm) und der im getrockneten Gesamtschlamm angereicherten Fracht [g/d]. Der aus den Ergebnissen der beiden Probenahmeserien ermittelte prozentuale Anteil der Zulauffracht, der abgebaut wurde*, ist angegeben.

Probenahme	10.-12.3.98				5./6.7.99			
	Zulauf	Ablauf	Schlamm	Ab- bau	Zulauf	Ablauf	Schlamm	Ab- bau
Matrix Abwasser- u. Schlamm- Mengen/d	76800 m ³	76800 m ³	30000 kg	bau	129000 m ³	132000 m ³	30000 kg	bau
Substanz	Frachten/d			[%]	Frachten/d			[%]
4- <i>tert</i> -Octylphenol	24,65	21,58	6,03	kein^a	58,95	21,78	2,31	59,1
4-Nonylphenol	163,6	24,58	78,57	37,0	344,4	30,62	75,51	69,2
Bisphenol A	41,63	12,44	16,50	30,5	95,33	13,73	23,10	61,4
4-Hydroxybiphenyl	n.n.	n.n.	0,360	-	n.n.	n.n.	0,330	-
2-Hydroxybiphenyl	118,3	1,15	3,42	96,1	254,1	3,96	5,16	96,4
4-Chlor-3-Methylph.	9,98	0,61	1,20	81,9	93,65	n.n.	1,11	98,8

*Abbau [%] = Zulauf - (Ablauf + Schlamm)/ Zulauf x 100 %.

^akein Abbau, da die Summe Ablauf + Schlamm um 12,0 % > Zulauf.

In Tab. 30 sind die Massenfrachten pro Tag der nachgewiesenen phenolischen Xenoestrogene in den einzelnen Matrices aufgeführt. Aus den Frachten lässt sich der Anteil der Zulauffracht ermitteln, der tatsächlich während der Abwasser- und Schlammbehandlung abgebaut wurde (Tab. 30). Aus den beiden Probenahmeserien zeichnet sich der Trend ab, dass der abgebaute Anteil bei höherer Zulauffracht ist. Je höher die Zulauffracht, desto effektiver ist der prozentuale Abbau. Dies wird deutlich bei 4-*tert*-Octylphenol, 4-Nonylphenol und Bisphenol A. Sie wurden am 10.-12.3.98 (kein Abbau bis 37,0 %) merkbar schlechter abgebaut als am 5./6.7.99 (59,1 - 69,2 %). Im Zulauf vom 10./11.3.98 betragen die Frachten etwa nur die Hälfte der Werte vom 5./6.7.99. Die mit dem Ablauf und dem Klärschlamm ausgetragene Fracht war jedoch bei beiden Probenahmedaten vergleichbar.

In Abb. 40 sind die Ablauf- und Klärschlammfrachten sowie der Anteil, der tatsächlich abgebaut wurde, prozentual bezogen auf die Zulauffrachten dargestellt. Es sind die Ergebnisse der fünf phenolischen Xenoestrogene, die in allen Matrices nachgewiesen werden konnten, aus den beiden 24 h-Probenahmeserien zusammengefasst.

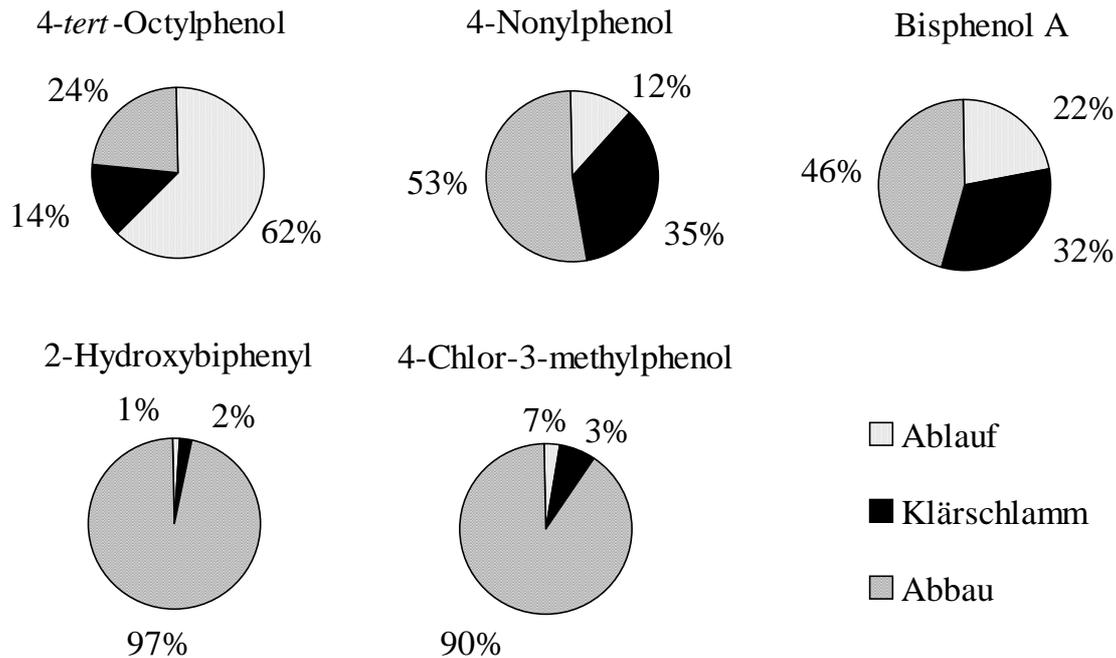


Abb. 40: Prozentuale Verteilung der mit dem Ablauf und dem Klärschlamm ausgetragenen Frachten bezogen auf die Zulauffracht der phenolischen Xenoestrogene, ermittelt aus zwei Probenahmeserien über 24 h der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm). Die Differenz stellt den tatsächlich abgebauten Anteil dar.

4-Nonylphenol und Bisphenol A wurden zu etwa einem Drittel im Klärschlamm angereichert. Der Abbau dieser beiden Substanzen lag im Durchschnitt zwischen 46 und 53 %. 2-Hydroxybiphenyl und 4-Chlor-3-methylphenol wurden sogar zu über 90 % abgebaut. Im Ablauf konnten tatsächlich nur noch geringe Mengen (1 - 3 %) der Zulauffracht nachgewiesen werden.

4-tert-Octylphenol ist im Gegensatz zu 4-Nonylphenol wesentlich schlechter abbaubar. Im Durchschnitt lag die Abbaubarkeit bei 24 %, allerdings zeigten die aus den beiden Probenahmeserien resultierenden Abbauraten eine starke Streuung. Am 10.-12.3.98 war die Summe aus Ablauf- und Klärschlammfracht sogar 12 % höher als die Zulauffracht, sodass rein rechnerisch kein Abbau erkennbar war. Während der Abwasserbehandlung werden parallel zur Elimination von 4-tert-Octylphenol 4-tert-Octylphenolpolyethoxylate zu 4-tert-Octylphenol abgebaut. Neben den freien Phenolen werden hauptsächlich die Eltern-Verbindungen in Kläranlagen eingetragen. Da die Konzentrationen von 4-tert-Octylphenol am 10.-12.3.98 im Vergleich zum 5./6.7.99 im Zulauf um ca. 40 % geringer lagen, erfolgte der Abbau der Precursor-Verbindungen am 10.-12.3.98 vermutlich stärker als der Abbau bzw. die Eliminierung von 4-tert-Octylphenol selbst.

3.4 Diskussion

Phenolische Xenoestrogene im Abwasser

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Gehalte der sechs phenolischen Xenoestrogene im Abwasser wurden Gehalten anderer Studien gegenübergestellt (Tab. 31). Es sind überwiegend aktuelle Literaturdaten aufgeführt. Für ungereinigtes Abwasser (Z) liegen im Vergleich zu gereinigtem Abwasser (A) deutlich weniger Daten vor und 4-Nonylphenol ist wieder die am besten untersuchte Verbindung der sechs phenolischen Xenoestrogene.

Im Vergleich zu älteren Studien von Giger et al. (Stephanou und Giger 1982, Marcomini et al. 1987, Giger et al. 1986, Ahel et al. 1994a), die **4-Nonylphenol** mit Konzentrationen bis zu 280 µg/l bzw. 30 µg/l in Zu- bzw. Abläufen von Schweizer Kläranlagen bestimmten, ist ein rückläufiger Trend der Gehalte zu erkennen. Allerdings wurden in den USA bzw. Kanada in Abläufen von Kläranlagen in Massachusetts (Cape Cod) und Michigan (Detroit River) bzw. bei Toronto und Mississauga noch Konzentrationen bis 37 µg/l gemessen (Lee und Peart 1995, Rudel et al. 1998, Snyder et al. 1999). Europäische Studien zeigen für 4-Nonylphenol Gehalte bis maximal 4 µg/l (Di Corcia et al. 1994, Zellner u. Kalbfus 1997, Buchwald et al. 1998, Larsson et al. 1999, Spengler et al. 1999a, Fromme et al. 1999). Die Gehalte, die in den Abläufen der in dieser Arbeit untersuchten Kläranlagen gefunden wurden (0,22 - 0,83 µg/l), sind vergleichbar mit erst kürzlich in Deutschland gemessenen Werten (Fromme et al. 1999, Spengler et al. 1999a). Der Eintrag von 4-Nonylphenol über die Kläranlagenabläufe in die Gewässer findet also trotz freiwilliger Selbstverpflichtung der chemischen Industrie, auf Alkylphenolpolyethoxylate in Haushaltsreinigern zu verzichten, nach wie vor statt. Im industriellen Bereich wurden 1998 23.000 t Nonylphenolpolyethoxylate eingesetzt (Hager 1999). Im ungereinigten Abwasser der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm), die maximal 40 % Abwasser aus nicht häuslichen Bereichen aufnimmt, konnten deshalb bis zu 6,6 µg/l 4-Nonylphenol gemessen werden.

Bisphenol A, das neben 4-Nonylphenol und 4-*tert*-Octylphenol in allen untersuchten Abläufen (Kläranlagen Steinhäule, Ostritz und Pflanzenkläranlage Ostritz-Bergfrieden) gemessen wurde, stimmte mit den in anderen Studien gemessenen Konzentrationen überein (Buchwald et al. 1998, Rudel et al. 1998, Larsson et al. 1999, Fromme et al. 1999, Spengler et al. 1999b). Die Gehalte in ungereinigtem Abwasser lagen bei Rudel et al. (1998) im Gegensatz zu den eigenen Werten (0,53 - 2,12 µg/l) deutlich niedriger (0,09 - 0,15 µg/l).

Tab. 31: Vergleich der in dieser Arbeit im Abwasser (Zu- und Ablauf) gemessenen Gehalte der phenolischen Xenoestrogene mit in der Literatur beschriebenen Konzentrationen.

	Literatur	ungereinigtes Abwasser (Z) [$\mu\text{g/l}$]	Konz. [$\mu\text{g/l}$] in gereinigtem Abwasser (A)	eigene Konz. [$\mu\text{g/l}$] ^e
4- <i>t</i> -Octylphenol	Snyder et al. (1999)		< 0,002 - 0,67	Z: 0,32 - 0,46
	Rudel et al. (1998)	0,20 - 0,74	0,15	A: < 0,02-
	Buchwald et al. (1998)		0,17	0,22
4-Nonylphenol	Snyder et al. (1999)		< 0,01 - 37,0	Z: 2,13 - 6,65
	Larsson et al. (1999)		0,84	A: 0,22 - 0,83
	Spengler et al. (1999b)		0,19 - 2,3 (0,59 ^b)	
	Fromme et al. (1999)		0,35 - 2,10	
	Rudel et al. (1998)	25,0 - 33,0	16,0	
	Buchwald et al. (1998)		0,34	
	Zellner u. Kalbfus (1997)		0,20 - 0,90	
	Lee und Peart (1995)		0,80 - 15,0 (1,30 ^b)	
	Di Corcia et al. (1994)	2,00 - 40,0 ^c (18,5 ^b)	0,70 - 4,00 ^c (1,70 ^b)	
Bisphenol A	Larsson et al. (1999)		0,49	Z: 0,53 - 2,12
	Fromme et al. (1999)		< 0,0001 - 0,70	A: < 0,05
	Spengler et al. (1999b)		0,02 - 1,04 (0,09 ^b)	- 0,16
	Rudel et al. (1998)	0,09 - 0,15 (0,11 ^a)	0,02 - 0,06 (0,04 ^a)	
	Buchwald et al. (1998)		0,60	
3- <i>t</i> -Butyl-4-hydroxyanis.	Rudel et al. (1998)	0,03 - 0,05 (0,04 ^a)	n.n (< 0,007)	Z: 0,005 - 0,05
	Buchwald et al. (1998)		0,06	A: n.n. - 0,03
2-Hydroxybiphenyl	Ternes et al. (1998)	2,00 \pm 0,80 ^d	0,04 \pm 0,005 ^d	Z: 1,54 - 2,80
	Rudel et al. (1998)	2,20 - 3,50 (2,70 ^a)	< 0,01 - 2,60 (0,03 ^b)	A: n.n. - 0,03
4-Chlor-3-methylph.	Castillo et al. (1999)	2300 (Gerberei)		Z: 0,07 - 0,73
	Ternes et al. (1998)	1,50 \pm 0,50 ^d	< 0,01 ^d	A: n.n. - < 0,01

^aMittelwert; ^bMedian; ^cMonitoring des Zu- und Ablaufes (24 h-Sammelproben) einer Kläranlage bei Rom über ein Jahr; ^dMittelwert über 6 Tage im Zu- und Ablauf einer Kläranlage bei Frankfurt; ^eOhne Berücksichtigung der Konzentrationen im Ablauf der KA Nellingen.

Im Zulauf der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm) wurden noch drei weitere phenolische Xenoestrogene gefunden. **2-Hydroxybiphenyl** wurde im Durchschnitt in höheren Konzentrationen wie Bisphenol A gemessen (1,54 - 2,80 µg/l). Ternes et al. (1998) konnte im Zulauf einer Kläranlage bei Frankfurt/Main ähnlich hohe Gehalte messen (2,0 µg/l ± 0,80). In Abläufen von 49 Kläranlagen in Deutschland konnten bei der gleichen Studie Maximalkonzentrationen bis zu 2,6 µg/l für 2-Hydroxybiphenyl gemessen werden. Der Median (0,03 µg/l) und das 90 %-Perzentil (0,12 µg/l) zeigen allerdings, dass die Konzentrationen überwiegend vergleichbar niedrig lagen wie im Ablauf der Kläranlage Steinhäule. In Sichelhautuntersuchungen wurde neben 4-Nonylphenol und 4-*tert*-Octylphenol regelmäßig 2-Hydroxybiphenyl nachgewiesen (Sauer et al. 1997). Sogenannte Sichelhäute bilden sich an der Wand von allen Kanälen, durch die ungereinigtes Abwasser fließt.

Die hohen Konzentrationen von 2-Hydroxybiphenyl und auch die von **4-Chlor-3-methylphenol** im Zulauf der Kläranlage Steinhäule lassen sich unter anderem durch Aufnahme von Abwasser aus der pharmazeutischen Industrie und den angeschlossenen Kliniken erklären. 2-Hydroxybiphenyl und 4-Chlor-3-methylphenol sind laut der Roten Liste (BPI 1999) in mehr als 10 Desinfektionsmitteln enthalten. Ungereinigtes Abwasser aus Gerbereien zeigte für 4-Chlor-3-methylphenol noch deutlich höhere Gehalte (Castillo et al. 1999) als solches, das sich überwiegend aus häuslichem Abwasser zusammensetzt (eigene Messungen: 0,07 - 0,73 µg/l, Ternes et al. 1998: 1,50 ± 0,50 µg/l). Ternes et al. (1998) konnten im Ablauf der 49 Kläranlagen in Deutschland wie in der Kläranlage Steinhäule 4-Chlor-3-methylphenol nur unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,01 µg/l nachweisen.

3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol wies im Zulauf der Kläranlage Steinhäule die geringsten Gehalte der sechs detektierten phenolischen Xenoestrogene auf. Rudel et al. (1998) fanden in ungereinigtem Abwasser vergleichbar niedrige Gehalte. Die Konzentrationen im Ablauf lagen in anderen Studien und der eigenen Arbeit unter 0,06 µg/l.

Aus den Daten der eigenen Messungen und den Literaturdaten lässt sich erkennen, dass 4-Nonylphenol, 4-*tert*-Octylphenol, Bisphenol A, 2-Hydroxybiphenyl und 4-Chlor-3-methylphenol, die beiden letzteren Verbindungen in deutlich geringerem Ausmaß, über Kläranlagenabläufe in die aquatische Umwelt gelangen und dort mehr oder weniger stark, wie unter Kapitel III.II 1 und 2 beschrieben, akkumulieren.

Natürliche und synthetische Estrogene und 17β-Sitosterol im Abwasser

In Tab. 32 wurden die Konzentrationen der fünf Steroide, die im Rahmen dieser Arbeit in gereinigtem Abwasser gemessen wurden, mit denen aus anderen Studien verglichen. Es sind nur die Ergebnisse neuerer Studien aufgeführt. Estriol in gereinigtem

Abwasser und die Steroide in ungereinigtem Abwasser wurden bisher nur in sehr geringem Umfang untersucht.

Die in dieser Arbeit in Kläranlagenabläufen gemessenen Konzentrationen der **natürlichen und synthetischen Estrogene** stimmen mit den Werten aus den anderen aufgeführten Studien überein. Es zeichnet sich ein einheitliches Bild der Gehalte in Kläranlagenabläufen in den einzelnen Ländern ab. **Estron** wurde in allen Studien wie bereits in den Gewässern (vgl. Kap. III.II 1.3) in höheren Konzentrationen gemessen (bis zu 76 ng/l). In der Kläranlage Steinhäule zeigte Estron die höchsten Gehalte der vier Estrogene (12 - 32 ng/l), in der Kläranlage Ostritz (Sachsen) wurden nur 1,4 ng/l gemessen. Nach Batch-Versuchen mit Belebtschlamm aus einer kommunalen Kläranlage wurde Estron nahezu quantitativ aus 17β -Estradiol gebildet (Ternes et al. 1999b). Daraus erklären sich die höheren Konzentrationen von Estron. **17β -Estradiol** wurde in den Abläufen der Kläranlagen Steinhäule und Ostritz (n.n. - 1,7 ng/l) wie in anderen Studien überwiegend im unteren ppt-Bereich gemessen. Vereinzelt wurden aber auch deutlich höhere Konzentrationen in Kläranlagenabläufen in England und Kanada bestimmt (Ternes et al. 1999a, Desbrow et al. 1998). Nach den Batch-Versuchen von Ternes et al. (1999b) ist mit dem Auftreten von **17α -Ethinylestradiol** in höheren Konzentrationen zu rechnen. Nur 20 % der Initialkonzentrationen waren nach 24 h (1 ng/ml) bzw. nach 48 h (1 μ g/ml) reduziert. Die vorliegenden Untersuchungen und die eigenen Messungen zeigen mit Ausnahme der Abläufe aus Kanada (bis 48 ng/l) Werte, die im unteren ppt-Bereich liegen. Im Ablauf der Kläranlage Steinhäule konnten Konzentrationen bis maximal 3,7 ng/l festgestellt werden, im Ablauf der Kläranlage Ostritz wurden 6,5 ng/l 17α -Ethinylestradiol gemessen. Vermutlich spielen bei der Elimination von 17α -Ethinylestradiol noch weitere Bedingungen als die in den Batch-Versuchen angewandten aeroben Verhältnisse eine Rolle. In modernen Kläranlagen wird in der biologischen Stufe zwischen aeroben und anaeroben Verhältnissen gewechselt (Nitrifikation/ Denitrifikation). Die Elimination durch Adsorption während der Vor- und Nachklärung müsste ebenso wie die Anreicherung in Sedimenten (vgl. III.II 3.1) geklärt werden.

Estriol wurde wie bei Ternes et al. (1996) in keiner der Ablaufproben nachgewiesen. Demnach stimmen die Ergebnisse aus den Messungen der Oberflächengewässer mit den Abwasseruntersuchungen überein. Ein Eintrag von Estriol über Kläranlagenabläufe in die Gewässer ist nach diesen ersten Messungen nicht zu erwarten, da die im Zulauf der Kläranlage gefundenen Konzentrationen vollständig eliminiert wurden.

Tab. 32: Vergleich der in dieser Arbeit im Abwasser gemessenen Gehalte der Steroide mit in der Literatur beschriebenen Konzentrationen.

	Literatur	Probe- nahme	Konz. [ng/l] in gereinigt- em Abwasser (Median)	eigene Konz.[ng/l] ^a	
17β- Estradiol	Snyder et al. (1999)	USA	< 0,1 - 3,7	Z: 2,8 - 52,0	
	Larsson et al. (1999)	Schweden	1,1	A: n.n. (2,8 - 4,6)	
	Spengler et al. (1999b)	Deutschland	< 0,4 - 15,0 (1,9)	- 1,7	
	Ternes et al. (1999a)	Deutschland	< 1 - 3 (< 1)		
		Kanada	< 1 - 64 (6)		
	Belfroid et al. (1999)	Niederlande	< 0,6 - 12 (0,9) häusl. A. < 0,4 - < 0,7 (< BG) ind. A.		
	Desbrow et al. (1998)	England	2,7 - 48,0 (6,3)		
Estron	Larsson et al. (1999)	Schweden	5,8	Z: 15,0 - 151	
	Spengler et al. (1999b)	Deutschland	< 0,7 - 22 (3,3)	A: 1,4 - 32,0	
	Ternes et al. (1999a)	Deutschland	< 1 - 70 (9)		
		Kanada	< 1 - 48 (3)		
	Belfroid et al. (1999)	Niederlande	< 0,4 - 47 (4,5) häusl. A. < 0,1 - 11 (0,4) industr. A.		
		Desbrow et al. (1998)	England	1,4 - 76,0 (9,4)	
17α- Ethinyl- estradiol	Snyder et al. (1999)	USA	< 0,05 - 0,8	Z: 11,7 - 32,6	
	Larsson et al. (1999)	Schweden	4,5	A: n.n. (2,0 - 3,7)	
	Spengler et al. (1999b)	Deutschland	(2,0)	- 6,5	
	Ternes et al. (1999a)	Deutschland	< 1 - 15 (1)		
		Kanada	< 1 - 42 (9)		
	Belfroid et al. (1999)	Niederlande	< 0,2 - 7,5 (< BG) häusl. A. < 0,2 - 2,6 (< BG) ind. A.		
		Desbrow et al. (1998)	England	< 0,2 - 7,0 (< 0,2)	
		Kalbfus (1997)	Bayern	< 0,2 - 0,5	
Estriol	Stumpf et al. (1996)	Deutschland	< 1 (< 1)	Z: 16,7 - 73,3 A: n.n. (0,6 - 4,3)	
17β- Sitosterol	Spengler et al. (1999a)	Deutschland	578 - 883 (709)	Z:154 - 2068	
	Stumpf et al. (1996)	Deutschland	> 20 - 402 (89)	A:147 - 474	
	Quéménéur u. Marty (1994)	Frankreich	1100 - 50200 (gelöst. Anteil)		

^aOhne Berücksichtigung der Konzentrationen im Ablauf der KA Nellingen

Die Gehalte von **17 β -Sitosterol** der anderen Studien unterscheiden sich untereinander und von den Ergebnissen der Kläranlage Steinhäule und Ostritz sehr stark. In französischen Kläranlagenabläufen wurden in der Wasserphase Konzentrationen von über 1 $\mu\text{g/l}$ gemessen. Im partikulären Anteil, der zusätzlich analysiert wurde, lagen die Gehalte nochmals wesentlich höher. Die in dieser Arbeit bestimmten Gehalte von 17 β -Sitosterol (147 - 474 ng/l) lassen sich zwischen den Werten von Stumpf et al. (1996) und Spengler et al. (1999a) einstufen.

Im **Zulauf** der Kläranlage Steinhäule wurden für die natürlichen und synthetischen Estrogene Konzentrationen zwischen 2,8 und 115 ng/l gemessen. Estron wurde wie auch im Ablauf der Kläranlage Steinhäule mit den höchsten Konzentrationen gemessen, gefolgt von Estriol (16,7 - 73,3 ng/l), 17 β -Estradiol (2,8 - 52,0 ng/l) und 17 α -Ethinylestradiol (12 - 33 ng/l). Die gemessenen Konzentrationen von 17 α -Ethinylestradiol stimmen gut mit Abschätzungen von Kümmerer (1999) überein, der für die Kläranlage Freiburger Bucht eine mittlere Konzentration von 18 ng/l im Zulauf und für das gesamte Deutschland eine Durchschnittskonzentration von 10 ng/l berechnete. In den Zuläufen einer Kläranlage bei Frankfurt/Main und einer Kläranlage bei Rio de Janeiro (Brasilien) wurden für Estron mit 40 ng/l und 27 ng/l ebenfalls die höchsten Konzentrationen gemessen. Die Gehalte von 17 α -Estradiol lagen in dieser Untersuchung bei 21 ng/l bzw. 15 ng/l, die Gehalte von 17 α -Ethinylestradiol lagen deutlich niedriger. Ternes et al. (1999a) konnten in den Zuläufen Biologie dieser beiden Anlagen eine ähnliche Erhöhung der Estrogene wie im Zulauf Biologie der Kläranlage Steinhäule vom 5./6.7.99 feststellen. Für Ternes et al. (1999a) resultiert dieser Anstieg nach der Vorklärung ebenfalls aus der Spaltung von Steroidkonjugaten (vgl. III.II 3.1).

Phenolische Xenoestrogene im Klärschlamm

Im getrockneten Klärschlamm der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm) wurden 4-Nonylphenol (2,5 - 3,7 mg/kg TS), gefolgt von Bisphenol A (0,08 - 0,55 mg/kg TS), 4-*tert*-Octylphenol (0,08 - 0,20 mg/kg TS), 2-Hydroxybiphenyl (0,06 - 0,17 mg/kg TS) und 4-Chlor-3-methylphenol (0,01 - 0,04 mg/kg) gemessen. Neben diesen fünf Komponenten, die alle auch im Zulauf der Kläranlage Steinhäule bestimmt werden konnten, war in zwei der drei Klärschlammproben außerdem noch 4-Hydroxybiphenyl nachweisbar. 4-Nonylphenol, dessen Anreicherung im Klärschlamm bereits gut dokumentiert ist (Giger et al. 1986, Brunner et al. 1988, Ahel et al. 1994a), zeigte wie in den Sedimenten die höchsten Gehalte. Die anderen Komponenten lagen in deutlich niedrigeren Konzentrationen vor; über ihr Anreicherungsverhalten im Klärschlamm sind bisher keine detaillierten Untersuchungen bekannt.

Die in den getrockneten Gesamt-, Primär- und Überschussschlämmen gemessenen Gehalte konnten zeigen, wann und in welchem Ausmaß die im Klärschlamm gemessenen phenolischen Xenoestrogene durch Adsorption an den schlammbildenden Partikeln aus dem Abwasser eliminiert wurden. Eigentlich spielte die Anreicherung im Klärschlamm nur für 4-Nonylphenol und Bisphenol A eine Rolle: 35 % bzw. 32 % der Gesamtzulaufmenge wurden im Klärschlamm akkumuliert. Bei 4-*tert*-Octylphenol, 2-Hydroxybiphenyl und 4-Chlor-3-methylphenol wurden nur 14 %, 2 % und 7 % der Gesamtzulaufmenge im Klärschlamm wiedergefunden. Im Gegensatz zu Bisphenol A war für 4-Nonylphenol die gute Anreicherung im Klärschlamm mit dem hohen $\log K_{OW}$ -Wert von 4,48 (Ahel und Giger 1993) zu erklären. Erwartungsgemäß müsste sich 4-*tert*-Octylphenol aber wesentlich besser im Klärschlamm anreichern, da der $\log K_{OW}$ -Wert von 4,12 (Ahel und Giger 1993) deutlich höher ist als der von Bisphenol A ($\log K_{OW} = 3,4$; Staples et al. 1998) und nur minimal niedriger als der von 4-Nonylphenol liegt. Untersuchungen des Verteilungsgleichgewichts zwischen Wasser- und Partikelphase in ungereinigtem Abwasser sprachen allerdings für die niederen Gehalte von 4-*tert*-Octylphenol im Klärschlamm der Kläranlage Steinhäule: 4-Nonylphenol war bis zu 72 % und 4-*tert*-Octylphenol nur bis max. 30 % in der Partikelphase zu finden (vgl. III.II 3.1). Bisphenol A wurde sogar nahezu vollständig in der Wasserphase gefunden. Um wiederum die hohen Gehalte von Bisphenol A im Klärschlamm zu erklären, muss davon ausgegangen werden, dass die Adsorption an den Klärschlamm für 4-Nonylphenol und Bisphenol A zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfand. Die Messungen des Primär- und Überschussschlammes zeigen, dass 4-Nonylphenol während der Vor- und Nachklärung an schlammbildende Partikel adsorbiert wurde. Da Bisphenol A im Rohschlamm, der im Labor zur Probenvorbereitung zentrifugiert wurde, nicht gemessen wurde, konnte die Adsorption von Bisphenol A in der Kläranlage nur vor der Zentrifugation des Gesamtschlammes erfolgen. Vermutlich wurde Bisphenol A bei der Eindickung an die Flockungshilfsmittel adsorbiert (vgl. III.II 3.2).

In der Kläranlage Steinhäule wird keine anaerobe Faulung durchgeführt. Deshalb entspricht der für 4-Nonylphenol im getrockneten Klärschlamm bestimmte Gehalt dem tatsächlich durch Adsorption aus dem Abwasser eliminierten Anteil. Bei der anaeroben Stabilisierung werden die Primärmetabolite der Nonylphenolpolyethoxylate, die Nonylphenolmono- und diethoxylate, bzw. Nonylphenoxyessigsäuren, die bevorzugt während der Abwasserbehandlung entstehen, zum freien, wesentlich toxischeren 4-Nonylphenol abgebaut (Brunner et al. 1988, Ahel et al. 1994a). Wahlberg et al. (1990) konnten in einem Klärschlamm, der vor und nach der anaeroben Stabilisierung analysiert wurde, nach der Stabilisierung vierfach höhere Gehalte für 4-Nonylphenol feststellen. Die in dieser Arbeit gemessenen 4-Nonylphenol-Gehalte können also nicht

unmittelbar mit Gehalten in anaerob stabilisierten Schlämmen verglichen werden. Allerdings konnte Jobst, der in den Jahren 1987 bis 1989 über 149 Klärschlammproben aus Westdeutschland (Median 83,4 mg/kg, Durchschnitt 128 mg/kg, 90 %-Perzentil 264 mg/kg) untersuchte (Jobst 1995) und dann in den Jahren 1994 bis 1995 101 Klärschlammproben aus Rheinland-Pfalz (Median 4,6 mg/kg, 90 %-Perzentil 24,8 mg/kg) analysierte, einen drastischen Rückgang der 4-Nonylphenol-Konzentrationen feststellen (Jobst 1998). Diese Ergebnisse und die geringen Gehalten im Klärschlamm der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm) deuten darauf hin, dass die freiwillige Selbstverpflichtung in Deutschland tatsächlich umgesetzt wurde. In anderen Ländern wie Taiwan und Kanada konnten kürzlich noch Konzentrationen von 243,9 mg/kg bzw. 368 mg/kg für 4-Nonylphenol nachgewiesen werden (Lin et al. 1999 bzw. Bennett und Metcalfe 1998). Im Klärschlamm derselben Kläranlage (Whitby Harbour) in Kanada wurde 4-*tert*-Octylphenol mit 21,8 mg/kg auch in einer wesentlich höheren Konzentration als im Klärschlamm der Kläranlage Steinhäule gemessen.

Fromme et al. (1999) fand für Bisphenol A in 31 Klärschlammproben Gehalte zwischen 0,0039 und 1,36 mg/kg. Die Konzentrationen im Klärschlamm der Kläranlage Steinhäule lagen somit in vergleichbarer Größenordnung.

Eliminierung der phenolischen Xenoestrogene und der Steroide während der Abwasser- und Schlammbehandlung der Kläranlage Steinhäule

Durch Analyse von Zu- und Ablaufproben, die entsprechend der Verweildauer des Abwassers zeitversetzt in der Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm) genommen wurden, konnten für die untersuchten estrogen wirksamen Substanzen die Eliminierungsraten bestimmt werden.

Für die phenolischen Xenoestrogene konnten Eliminierungsraten zwischen 32 und > 99 % ermittelt werden. 4-*tert*-Octylphenol zeigte mit 32 bis 64 % die schlechteste Eliminierung. Die Eliminierung für Bisphenol A und 4-Nonylphenol erfolgte im gleichen Ausmaß (70 - 94 % bzw. 85 - 91 %); 2-Hydroxybiphenyl und 4-Chlor-3-methylphenol wurden nahezu vollständig entfernt (> 99 % bzw. 94 - > 99 %). Durch Messung der Gehalte im getrockneten Klärschlamm konnte für die beiden letzteren Komponenten gezeigt werden, dass sie tatsächlich nahezu vollständig während der Abwasserbehandlung abgebaut wurden (96 % bzw. 82 - 99 %) Im Klärschlamm wurden nur geringe Mengen der Gesamtzulaufkraft gefunden. Bisphenol A und 4-Nonylphenol wurden im Durchschnitt nur zu 46 % und 53 % abgebaut, da im Klärschlamm beträchtliche Mengen der Gesamtzulaufkraft gemessen werden konnten. Die Abbaubarkeit für 4-*tert*-Octylphenol zeigte an den beiden Probenahmedaten (10.-12.3.98 und 5./6.7.99) eine starke Streuung, lag aber deutlich unter der aller anderen Substanzen. Vermutlich wurden in der biologischen Stufe der Kläranlage

Steinhäule die Precursor-Verbindungen an den beiden Probenahmedaten in unterschiedlichem Ausmaß zum freien Phenol abgebaut. Die Eliminierung über den Klärschlamm an beiden Probennahmedaten zeigte ebenfalls eine starke Streuung (25 % bzw. 3,9 %), war aber deutlich niedriger als die von 4-Nonylphenol (48 % bzw. 22 %).

Ähnliche Eliminierungsraten für 4-Nonylphenol wie in der Kläranlage Steinhäule konnten in einer italienischen Kläranlage (bei Rom) bei einem zwölfmonatigen Monitoring bestimmt werden (bis zu 93 %, Di Corcia et al. 1994). Ahel et al. (1994a) ermittelten Eliminierungsraten von 9 bis 82 % (Differenz zwischen Konzentrationen des Zulaufes Biologie und des Ablaufes) in 11 Schweizer Kläranlagen. Bei der Berechnung der Eliminierungsrate der Konzentrationen zwischen Zulauf Biologie und Ablauf der Probenserie vom 5./6.7.99 der Kläranlage Steinhäule ergab sich ein Wert von 71 %, der in den oberen Bereich der von Ahel et al. (1994a) ermittelten Eliminierungsraten einzustufen ist. Ebenfalls von Giger et al. konnte gezeigt werden, dass nach der Vorklärung noch 71 % der Gesamtzulaufschicht in die biologische Stufe übergingen (Brunner et al. 1986). In der Kläranlage Steinhäule waren es im Gegensatz dazu nur noch 30 %, d.h. die mechanische Abwasserreinigung mit Fett/Ölabscheidung in der Kläranlage Steinhäule, einer sehr modernen Kläranlage, muss wesentlich effektiver arbeiten als die mechanische Abwasserreinigung der Schweizer Kläranlage Zürich-Glatt vor über 10 Jahren.

Obwohl für Bisphenol A eine gute Abbaubarkeit in biologischen Abwasserbehandlungsanlagen und Simulationstudien unter anaeroben und aeroben Bedingungen dokumentiert ist (Staples et al. 1998), konnten in dieser Arbeit in der Kläranlage Steinhäule Eliminierungsraten bis maximal 94 % ermittelt werden. Bei relativ hohen Zulaufkonzentrationen erklärt sich, warum in Oberflächengewässern im Wasser und im Sediment Bisphenol A nachgewiesen werden kann.

Ternes et al. (1998) konnten bei der Untersuchung von Zu- und Ablauf einer kommunalen Kläranlage bei Frankfurt/Main über sechs Tage für 2-Hydroxybiphenyl (98 %) und 4-Chlor-3-methylphenol (> 98 %) vergleichbar hohe Eliminierungsraten wie in der Kläranlage Steinhäule feststellen. 1982 konnte bereits für 4-Chlor-3-methylphenol eine Eliminierung in fünf mechanisch-biologischen Kläranlagen bei Darmstadt zwischen 72 und > 96 % gemessen werden (Arendt et al. 1983). Diese Ergebnisse und die parallel zum Ab- und Zulauf gemessenen Konzentrationen im Klärschlamm deuten, wie auch die Ergebnisse der Kläranlage Steinhäule darauf hin, dass die Eliminierung von 4-Chlor-3-methylphenol vorwiegend auf mikrobiellem Abbau beruht. Da die Gehalte im Faulschlamm (< 0,0004 mg/kg TS) dieser fünf Kläranlagen geringer lagen als im Rohschlamm (bis 0,004 mg/kg TS), musste während der anaeroben Schlammfäulung 4-Chlor-3-methylphenol weiter abgebaut worden sein. Im

getrockneten Klärschlamm der Kläranlage Steinhäule, der nicht anaerob stabilisiert wurde, lagen die Gehalte sogar deutlich höher (0,014 - 0,04 mg/kg TS).

Für alle fünf Steroide konnte eine Eliminierung von bis zu 90 % berechnet werden. Estriol und Ethinylestradiol wurden sogar an allen drei Beprobungen zu über 91 % eliminiert. 17 β -Estradiol (45 - 92 % Eliminierung) und sein primärer Metabolit Estron (81 % Konzentrationszunahme bis 92 % Eliminierung) zeigten bei den drei Beprobungen größere Abweichungen bei ihrer Entfernung aus dem Abwasser. Die Eliminierungsraten von 17 β -Sitosterol zeigte ebenfalls eine starke Streuung (298 % Konzentrationszunahme bis 94 % Eliminierung).

Die Eliminierungsraten der natürlichen und synthetischen Estrogene, die in einzelnen Studien berechnet wurden, zeigen untereinander kein einheitliches Bild und unterscheiden sich auch teilweise erheblich von denen, die in dieser Arbeit ermittelt wurden. Stumpf et al. (1996) konnten für 17 β -Estradiol (75 %) und 17 α -Ethinylestradiol (75 %) ähnlich hohe Abbauraten in einer kommunalen Kläranlage ermitteln. Wesentlich niedrigere Eliminierungsraten für 17 α -Ethinylestradiol ergaben sich bei einer sechstägigen Beprobung an einer kommunalen Kläranlage bei Frankfurt/Main (kein Abbau, Ternes et al. 1999a) und bei einer Feldstudie vor 1981 in mehreren Kläranlagen der USA (ca. 20 - 40 %, Schweinsfurth und Länge 1998). Bei der gleichen Studie wurden von Ternes et al. (1999 a) im Gegensatz zu der Kläranlage in Frankfurt/Main in einer brasilianischen Kläranlage bei Rio de Janeiro für 17 α -Ethinylestradiol immerhin ein Abbau zwischen 64 und 78 % gemessen. Als Ursache für den schlechten Abbau in der Kläranlage bei Frankfurt/Main vermuteten Ternes et al. (1999a) die niedrigen Temperaturen (-2 °C) bei der Probenahme. Während der Probenahme in Brasilien lagen die Temperaturen bei 20 °C. In der hessischen Kläranlage wurde 17 β -Estradiol (64 %) ebenfalls schlechter abgebaut als in der brasilianischen Kläranlage (92 - 99,6 %).

Bei den Beprobungen der Kläranlage Steinhäule im Frühjahr (45 % Eliminierung bzw. 298 % Konzentrationszunahme) wurden 17 β -Estradiol und 17 β -Sitosterol wesentlich schlechter bzw. gar nicht abgebaut als bei den beiden Beprobungen Ende Juni 1998 (93 % bzw. 94 %) und Anfang Juli 1999 (97 % bzw. 91 %). Ein Einfluss auf die biologische Abbaubarkeit der Steroide durch die Umgebungstemperatur der Kläranlage scheint denkbar und würde teilweise die stark schwankenden Eliminierungsraten erklären. Bei der Berechnung der Eliminierungsrate sollte nicht vernachlässigt werden, dass die natürlichen und synthetischen Estrogene in der Kläranlage überwiegend als Konjugate ankommen. Mit der entwickelten GC/MS-Methode werden nur die freien Steroide erfasst, d.h. wenn im Zulauf beträchtliche Konzentrationen an Glucuroniden und Sulfaten vorlagen, wurde insgesamt eine zu geringe Konzentration an Steroiden gemessen. Da vermutlich spätestens im Belebtschlammbecken die Konjugate voll-

ständig gespalten werden, lagen im Ablauf nur noch die freien Steroide vor. Wird die Eliminierungsrate über die Differenz der freien Steroidkonzentrationen im Zu- und Ablauf berechnet, kann die Rate zu gering sein oder gar im Negativen liegen (Ablauf $>$ Zulauf), vor allem, wenn der biologische Abbau ohnehin durch äußere Einflüsse wie die Umgebungstemperatur verringert ist. Für eine vollständige Bilanzierung müsste also eine Methode entwickelt werden, die zusätzlich die konjugierten Steroide erfasst.

Die Ergebnisse der Eliminierungsraten zeigen, dass die Kläranlagen und im Besonderen die untersuchte Kläranlage Steinhäule teilweise sehr effektiv arbeiten, dass jedoch eine vollständige Entfernung der estrogen wirksamen Substanzen keineswegs stattfindet. Weitergehende Abwasserreinigungsmaßnahmen können zu einer weiteren Verringerung oder im Idealfall zu einer vollständigen Entfernung der estrogen wirksamen Substanzen führen. Derzeit werden in Pilotprojekten bereits weitergehende Abwasserreinigungsmaßnahmen wie Sandfiltration (z.B. Kläranlage Stockholm), Aktivkohlefiltration (z.B. Kläranlage Albstadt-Ebingen) und Membranfiltration (z.B. Kläranlage Immenstaad/Bodensee) eingesetzt.

4 Biologische Analytik durch Anwendung des E-Screen-Assay

Zum Vergleich der biologischen und chemischen Analytik wurden dieselben Festphasenextrakte der Wasserproben von Körsch und Krähenbach im E-Screen-Assay jeweils dreimal getestet. Es wurde ein Aliquot (zwischen 70 und 90 %) des Extraktes aus 1 l Probe eingesetzt, ein 10 %-Aliquot wurde für die Analytik der phenolischen Xenooestrogene verwendet.

Die Wasserproben, die im Rahmen dieser Arbeit im E-Screen-Assay getestet wurden, konnten nur zum Teil quantitativ ausgewertet werden. Zu dem Zeitpunkt als sie getestet wurden, waren die MCF-7-Zellen vermutlich in einem schlechten Zustand. Das Zellwachstum war insgesamt schlecht, sodass auch der Proliferationseffekt (PE) der Proben zu niedrig lag. Die E-Screen-Assays dieser Proben konnten nur für zwei Proben zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt werden. In Tab. 33 sind die Ergebnisse der E-Screen-Assays der Wasserproben von Körsch und Krähenbach zusammengefasst.

Um eine estrogen Aktivität nachweisen zu können, muss der relative Proliferationseffekt (RPE) über 10 % liegen (Sonnenschein und Soto 1998). Bei den Wasserproben der Körsch vom 31.8.98 und vom 16.1.99 und des Krähenbaches vom 16.1.99 lag der relative Proliferationseffekt über 10 %. In diesen Proben konnte also eine estrogen Aktivität gemessen werden. Die Wasserprobe der Körsch vom 31.8.98 zeigte mit 3,5 ng/l die höchste Estradiol-Äquivalentkonzentration (EEQ). In den Proben vom 14.4.98,

die erst acht Monate nach der Probenahme extrahiert wurden, zeigte sich weder für die Körsch noch für den Krähenbach eine estrogenen Aktivität.

Tab. 33: Ergebnisse der E-Screen-Assays der Wasserproben der Körsch und des Krähenbaches. Angegeben sind die Mittelwerte (\pm SD) von n unabhängigen Assays im achtfachen Ansatz.

Wasserprobe	n	PE Probe	PE 17 β -Estradiol	RPE [%]	EC ₅₀ Probe [l/l]	EC ₅₀ 17 β -Estradiol [pmol/l]	EEQ [ng/l]
Körsch (P1)							
14.4.98 ^a	3	0,07 \pm 0,08	2,20 \pm 0,52	n.n.	n.n.	4,64 \pm 3,04	n.n. (0,08)
31.8.98	3	1,35 \pm 0,14	2,99 \pm 0,63	17 \pm 3	0,69 \pm 0,10	19,3 \pm 6,8	3,5 \pm 0,9
16.1.99	1 ^b	2,26	2,61	78,3	0,72	3,24	0,64
Krähenb. (P4)							
14.4.98	3	0,02 \pm 0,08	2,20 \pm 0,52	n.n.	n.n.	7,86 \pm 3,04	n.n. (0,04)
31.8.98	3	0,90 \pm 0,15	2,99 \pm 0,63	n.n.	n.n.	19,3 \pm 6,8	n.n. (0,02)
16.1.99	1 ^b	2,48	2,61	92,1	0,38	3,24	0,34

^aDer E-Screen-Assay wurde mit einem Aliquot durchgeführt, der 8 Monate nach der Probenahme extrahiert wurde. ^bEin unabhängiger Assay wurde zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt.

Vergleich der estrogenen Gesamtaktivität der Körsch und des Krähenbaches

Da insgesamt eine geringe Probenanzahl auswertbar war, konnte kein eindeutiger Unterschied im Gehalt estrogen wirksamer Substanzen zwischen den beiden Fließgewässern festgestellt werden. Die Wasserproben vom 31.8.98 deuten einen Unterschied zwischen den beiden Fließgewässern an. Zur Veranschaulichung sind in Abb. 41 die Dosis-Wirkungs-Kurven der beiden Proben im Vergleich zur Positivkontrolle 17 β -Estradiol dargestellt. Die Wasserprobe der Körsch zeigt im Vergleich zur Positivkontrolle einen relativ geringen Proliferationseffekt (RPE = 17 %), aber im Gegensatz zur Wasserprobe des Krähenbaches eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung. In der Krähenbach-Probe konnte keine estrogenen Aktivität nachgewiesen werden. Der Unterschied zwischen den Proben vom 16.1.99 war dagegen wenig ausgeprägt. In beiden Proben war ein geringer EEQ-Wert berechenbar (Körsch 0,64 ng/l, Krähenbach 0,34 ng/l).

Von Körner et al. (1999b) wurden in vier Paaren von Wasserproben deutlich höhere EEQ-Werte für die Körsch als für den Krähenbach gemessen (3,6 - 15,4 ng/l versus

n.n. - 0,65 ng/l). Diese Ergebnisse bestätigen den in dieser Arbeit mit chemischer Analytik ermittelten Unterschied im Gehalt estrogen wirksamer Substanzen.

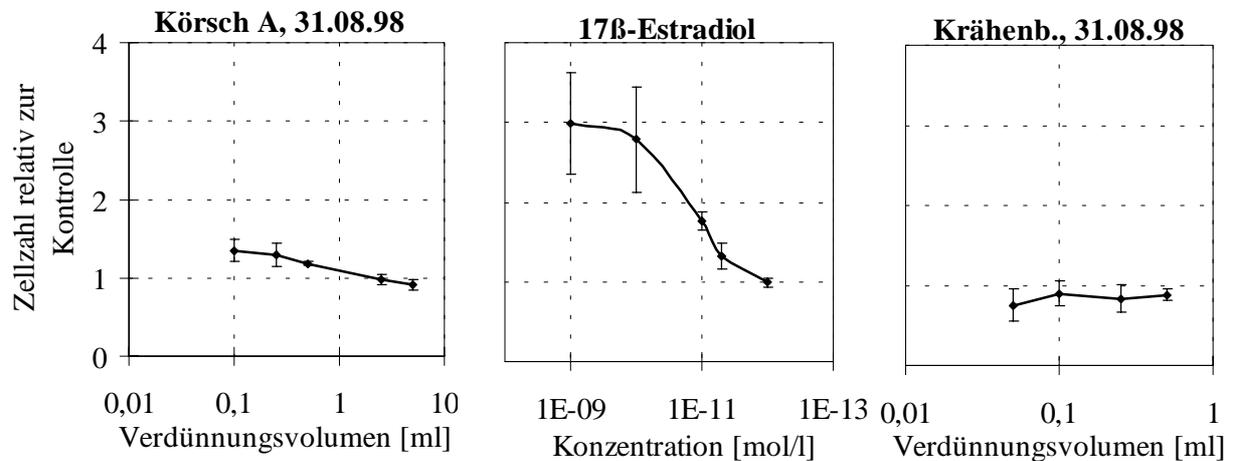


Abb. 41: Konzentrations-Proliferations-Kurven des Festphasenextraktes (0,2 g ENV+) von 0,8 l Wasserprobe der Körsch und des Krähenbaches (31.8.98) und der Positivkontrolle 17β-Estradiol im E-Screen-Assay mit MCF-7-Zellen. Die Diagramme stellen Mittelwerte (\pm SD) von drei unabhängigen Assays im achtfachen Ansatz dar.

Vergleich von chemischer Analytik mit dem E-Screen-Assay

Die auswertbaren Wasserproben der Körsch und des Krähenbaches konnten zeigen, dass die Ergebnisse der biologischen Analytik mit den Ergebnissen der chemischen Analytik übereinstimmen. Für den Vergleich beider Ergebnisse wurden die gemessenen molaren Konzentrationen der einzelnen estrogen wirksamen Substanzen mit den von Körner et al. (1998) und Schuller (1998) ermittelten Estradiol-Äquivalenzfaktoren (EEF) multipliziert (s. II. 4). Nach Aufsummierung der resultierenden EEQ-Werte wurden diese mit den im E-Screen-Assay ermittelten EEQ-Werten verglichen. Diese Vorgehensweise ist möglich, da die estrogen wirksamen Substanzen im Gemisch bei *in vivo* und *in vitro* Tests eine additive Wirkung zeigten (Soto et al. 1994, Routledge et al. 1998). In Tab. 34 ist diese Berechnung exemplarisch für die Körsch-Probe vom 16.1.99 durchgeführt.

Dieses Beispiel und die anderen berechneten und im E-Screen-Assay ermittelten EEQ-Werte sind in Abb. 42 einander gegenüber gestellt. Die Proben vom 14.4.98 (Extraktion nach acht Monaten) und vom 16.1.99 zeigen eine sehr gute Übereinstimmung. Abweichungen wie bei der Körsch-Probe vom 14.4.98 (Extraktion nach einer Woche) wurde bereits von Körner et al. (1999b, 1999c) beobachtet. Durch den E-Screen-Assay, der ein Summenparameter ist, werden alle in einer Wasserprobe enthaltenen estrogen wirksamen Substanzen erfasst, dagegen werden bei der Berechnung

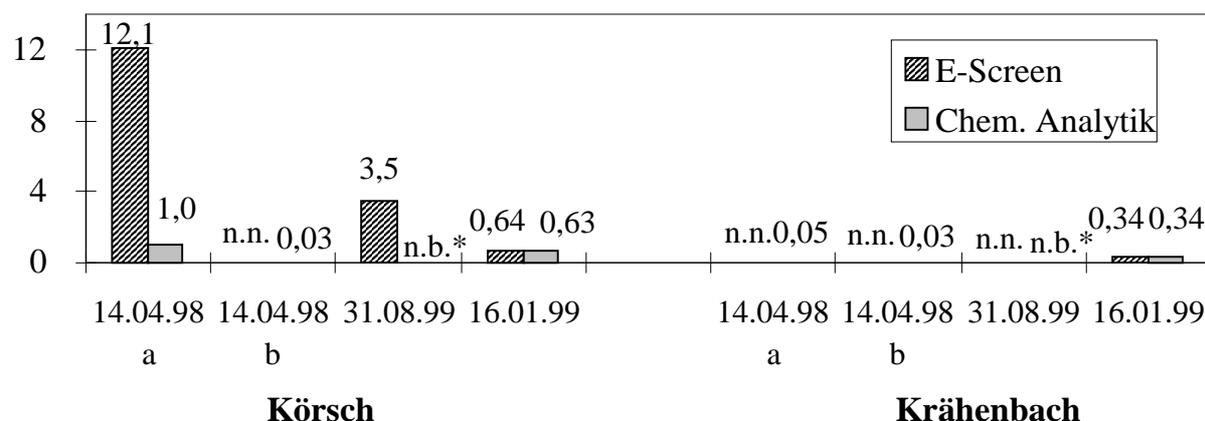
der EEQ-Werte auch tatsächlich nur die Substanzen, die mit der chemischen Analytik erfasst wurden, aufaddiert. In den Umweltproben können noch weitere nicht bestimmte oder sogar bisher noch nicht bekannte estrogen wirksamen Substanzen in die Ergebnisse des E-Screen-Assays mit eingehen.

Tab. 34: Berechnung der EEQ-Werte aus den Ergebnissen der chemischen Analytik am Beispiel der Wasserprobe der Körsch vom 16.1.99.

Substanz	Molmasse [g/mol]	Konz. [ng/l]	Konz. [mol/l]	EEF	EEQ [mol/l]
17 β -Estradiol	272,4			1	
Estron	270,4	38	1,4E-10	0,016	2,3E-12
4- <i>t</i> -Octylphenol	206,3	36,4	1,8E-10	1,1E-04	1,9E-14
4-Nonylphenol	220,4	75,6	3,4E-10	1,1E-04	3,8E-14
Bisphenol A	228,2	65,5	2,9E-10	6,0E-05	1,7E-14
3- <i>t</i> -Butyl-4-hydroxyanisol	170,2	34,5	2,0E-10	2,4E-06	4,9E-16
2-Hydroxybiphenyl	170,2	27,7	1,6E-10	1,5E-06	2,4E-16
Summe					2,3E-12
EEQ chem. Analytik [ng/l]					0,63
EEQ E-Screen [ng/l]					0,64

Aliquote der Wasserproben vom 14.4.98 wurden zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten extrahiert. Aus den EEQ-Werte beider Methoden wird eindeutig ersichtlich, dass es bei einer Lagerung der Proben bei Raumtemperatur über acht Monate zu einem Verlust an estrogener Gesamtaktivität kommt. Das Aliquot, das nach einer Woche extrahiert wurde (12,1 ng/l), zeigte im E-Screen-Assay einen wesentlich höheren EEQ-Wert als das Aliquot, das nach acht Monaten extrahiert wurde (n.n.). Dieses Ergebnis bestätigt, dass es sinnvoll ist die Zeitspanne zwischen Probenahme und Extraktion kurz zu halten. In dieser Arbeit wurden in der Regel Lagerungszeiten von vier Wochen eingehalten (vgl. III.I 4.3.5.2).

EEQ[ng/l]

Vergleich chemischer und biologischer Analytik

*EEQ-Werte nicht berechenbar, da keine Steroidanalytik durchgeführt wurde. ^aExtraktion erfolgte nach einer Woche, die E-Screen-Daten wurden jeweils von Körner et al. (1998b) erhalten. ^bDie Extraktion erfolgte nach 8 Monaten, die Analytik auf natürliche und synthetische Estrogene wurde von Dr. W. Kalbfus, Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München durchgeführt

Abb. 42: Vergleich der EEQ-Werte, die im E-Screen-Assay ermittelt wurden, mit denen, die aus den gemessenen Konzentrationen der einzelnen estrogen wirksamen Substanzen berechnet wurden.

5 Ökotoxikologische Aspekte

Um das Gefährdungspotenzial für die aquatische Umwelt und seine Bewohner abschätzen und beurteilen zu können, reicht es nicht aus, lediglich die einzelnen estrogen wirksamen Substanzen und ihre Gehalte zu betrachten, unbedingt muss die estrogenische Potenz der einzelnen Stoffe und die additive Wirkung aller gemessenen Komponenten mit einbezogen werden. Gehalte von natürlichen und synthetischen Estrogenen im unteren ppt-Bereich (17α -Ethinylestradiol unter 0,5 ng/l, 17β -Estradiol bei 1 - 10 ng/l, Estron bei 25 ng/l) können bereits die Induktion der Vitellogeninsynthese in erwachsenen männlichen Regenbogenforellen auslösen (Purdom et al. 1994, Routledge et al. 1998), dagegen liegt die Wirkschwelle bei Xenoestrogenen deutlich höher (vgl. auch II. 3 und 4). 4-*tert*-Octylphenol induziert ab einer Konzentration von 1 μ g/l die Bildung des Eidotterprotein-Vorläufers (Routledge et al. 1998). Die im Unterlauf der Körsch gemessenen Gehalte an natürlichen Estrogenen (17β -Estradiol 0,7 - 1,8 ng/l, Estron 2,5 - 38,0 ng/l) würden bereits ausreichen, die Vitellogeninsynthese zu induzieren. Da bei einer rezeptorvermittelter estrogenen Wirkung mit einem additiven Verhalten der Substanzen zu rechnen ist, summiert sich die estrogenische Aktivität der phenolischen Xenoestrogene zu der der Estrogene. Das additive Verhalten von Xeno-

estrogenen konnte in *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen bestätigt werden (Soto et al. 1994, Routledge et al. 1998).

Diese auf den Wirkstoff und die Konzentration beschränkten theoretischen Überlegungen zur ökotoxikologischen Relevanz sind nur haltbar, wenn gleichzeitig bei *in vivo* Studien eine negative Auswirkung auf die aquatische Tierwelt feststellbar ist. Bei einem Halbfreilandexperiment am Unterlauf der Körsch konnte bei erwachsenen männlichen Regenbogenforellen, die im Bypass-System vier Wochen im Körsch-Wasser gehalten wurden, innerhalb dieses Zeitraumes eine signifikante Erhöhung des Vitellogeninplasmaspiegel gemessen werden (Körner et al. 1999b). Ob ein erhöhter Vitellogeninplasmaspiegel lediglich ein Biomarker für estrogen wirksame Substanzen darstellt oder tatsächlich bereits negative Auswirkungen auf die Reproduktion von Fischen haben kann, wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Siligato et al. (1999) stellten bei Untersuchungen zur Population der Bachforellen in der Körsch fest, dass juvenile Stadien völlig fehlen. Wie ein weiteres Halbfreilandexperiment in der Körsch mit Bachforellenembryonen zeigte, lag die Ursache in einer erhöhte Mortalität der Embryonen und einer Retardierung ihrer Entwicklung (Luckenbach et al. 1999). Welche Substanzen letztendlich zu diesem Ungleichgewicht in der Population beitragen, ist unklar. Unklar ist auch, ob toxische Effekte anderer Substanzen oder die estrogen Gesamtaktivität oder beide für die erhöhte Embryomortalität und die verlangsamte Entwicklung verantwortlich sind. Da in einer *in vivo* Studie bei Embryonen von Medaka-Männchen (*Oryzias Latipes*), die gegenüber 4-*tert*-Octylphenol exponiert wurden, erhebliche Entwicklungs- und Differenzierungsprobleme beobachtet werden konnten (Gray et al. 1999), ist ein Zusammenhang mit den estrogen wirksamen Substanzen nicht auszuschließen. Die Konzentration bei diesem Experiment lagen allerdings um einen Faktor 100 bis 500 höher als in der Körsch. Da aber mit einer Kollektivwirkung, die toxische Effekte aller Umweltchemikalien und der estrogen wirksamen Substanzen einschließt, zu rechnen ist, ist auch bei Konzentrationen unter der Wirkschwelle von Einzelsubstanzen eine Gefährdung für die aquatischen Lebewesen nicht auszuschließen.

IV Experimenteller Teil

IV.I Chemische Analytik

1 Chemikalien und Geräte

1.1 Chemikalien

Lösungsmittel

Aceton, Diethylether, Ethylacetat, *n*-Heptan, *n*-Hexan, Methanol, Pentan, Toluol (jeweils nanograde/ picograde, Promochem GmbH)

D₆-markiertes Aceton > 99,5 % (Merck)

demineralisiertes Wasser, Leitungswasser (jeweils Universität Tübingen), Wasser zur Injektion (Fresenius)

Materialien zur Probenaufbereitung

Säulen zur Festphasenextraktion (beide über ICT GmbH von International Sorbent Technology):

1. Isolute ENV+ (200 mg, 6 ml Reservoir): cross-linked Styroldivinylbenzol-Copolymer-Phase (Nr. 9150020-C)

2. C18_{nec} (1 g, 6 ml Reservoir) Reversed Phase (Nr. 2200100-C)

Kieselgel: Silica 63 - 200 µm, aktiv (ICN Biochemicals, Nr. 02769), mit 1,5 % H₂O desaktiviertes Kieselgel

silanisierte Glaswolle (Malinckrodt Baker, Nr. 7084-05)

H₂SO₄ 96 %, zur Analyse (Merck)

HCl konz., zur Analyse (Merck)

NaCl zur Analyse (Merck), 4 h bei 400 °C behandelt

NaOH-Rotuli zur Analyse (Merck), 2 N Lösung

K₂CO₃ zur Analyse (Merck), 0,1 M Lösung

Methylierungsreagenz: Phenyltrimethylammoniumhydroxid, 0,1 M Lösung in Methanol (Fluka, Nr. 79265)

Silylierungsreagenz: Sylon BTZ, N,O-bis-Trimethylsilylacetamid/Trimethylchlorsilan/ N-Trimethylsilylimidazol (3:2:3) (Supelco Nr. 3-3030)

Acetanhydrid zur Analyse (Merck)

Standardsubstanzen

Phenolische Xenoestrogene

Referenzstandardsubstanzen

4-*tert*-Octylphenol > 90 %, techn. 4-Nonylphenol mit ~ 85 % *p*-Isomere, Bisphenol A ~ 97 %, 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol > 98 %, 4-Hydroxybiphenyl > 98 %, 2-Hydroxybiphenyl 98 % (jeweils Fluka).

4-Chlor-3-methylphenol 99 %, 4-Chlor-2-methylphenol 97 %, 2-*tert*-Butyl-4-methylphenol 99 % (alle Aldrich).

Interne Standardsubstanzen

Biphenyl > 99 % (Merck), D₁₀-markiertes Biphenyl 98 % (über Promochem GmbH von Cambridge Isotope Laboratories).

Natürliche und synthetische Steroide

Referenzstandardsubstanzen

17 β -Estradiol, Estron, Estriol > 99 %, 17 α -Ethinylestradiol > 8 %, β -Sitosterol 90 % (alle Sigma).

Interne Standardsubstanzen

D₃-markiertes Testosteron: 100 μ g/ml in 1,2-Dimethoxyethan (Sigma), D₂-markiertes 17 β -Estradiol 98 % (Sigma).

1.2 Geräte

Allgemein

Pasteurpipetten mit Silikonhütchen, Meßpipetten (0,5, 1, 2, 5, 10, 20 ml), Messkolben mit Glasstopfen (0,5, 1, 2, 5, 10, 20 ml), Messzylinder (10, 25, 50, 100, 250, 1000 ml), Rundkolben NS 29 mit Glasstopfen (100, 250, 500, 1000 ml), Erlenmeyerkolben (100, 250 ml), Glastrichter, Bechergläser (50, 100, 250, 500, 1000 ml), 1000 ml Braunglasflaschen NS 29 mit Glasstopfen, Aluminiumschalen mit Deckel (Roth), Aluminiumfolie (Melitta), 4 und 5 ml Probengläschen mit Teflondichtung, 1 ml-Injektionsflaschen für Autosampler mit konisch zulaufendem 200 μ l-Einsatz und Alu-Crimp-Kappen mit Teflon/Butylgummi-Septen, 250 und 500 ml Braunglasgläser zur Probenaufbewahrung mit aluminiumbeschichtetem Schraubverschluß, Spritzen (10, 50, 100 μ l von Hamilton), Nickelspatel, Pinzetten, Porzellantiegel, Trockenschrank, Muffelofen.

Reinigung der Glasgeräte

Laborspülautomat Miele G7735 unter Verwendung von Extran AP 13 (Merck).

Probenvorbereitung

Analysenwaage (Sartorius A 200 S), Feinwaage (Sartorius Typ 1413), Zentrifuge (Haeraeus Christ) mit 100 ml Zentrifugengläser, tragbares Leitfähigkeitsmessgerät PW9504/00 (Philips), Ikamag RCT Magnetrührer (Janke & Kunkel), Rüttelsiebturn mit Sieben verschiedener Maschenweite (Retsch), Exsikkator, Kühlaggregat (Bachofer), Ölpumpe (Pfeiffer), Kaffeemühle (Braun), Mörser und Pistill aus Porzellan.

Extraktion

Adsorbex SPU-Festphasenextraktor (Merck) mit Wasserstrahlpumpe, Mikroseparator (Glasbläserei), 30 ml Soxhletextraktoren mit Extraktionshülsen (Macherey-Nagel), Rückflusskühler, 100 und 250 ml Heizpilze.

Abblasen von Lösungsmitteln, Einengen und Tranfer von Extrakten

Abblasevorrichtung (Barkey) betrieben mit Stickstoffgas 4.6 (Messer), Speed Vac Concentrator (Bachofer) mit Wasserstrahlpumpe, IKA-DEST Rotationsverdampfer (Janke & Kunkel) mit Vakuumkontroller (Brand), Ultraschallbad (Branson), Vibrationsgerät (Heidolph).

Aufreinigung

Flüssigkeitschromatographische Aufreinigung

230 mm Pasteurpipetten, Chromatographiesäulen aus Glas mit 14 cm Länge, 0,7 cm Innendurchmesser und 40 ml Elutionsreservoir

Flüssig-flüssig-Trennung

100 ml Scheidetrichter

HRGC/LRMS

Analysensystem

Gaschromatograph HP 5890 Series II mit Splitlos-Injektor und HP Autosampler, direkt gekoppelt an Massenselektiven Detektor HP 5972 A;

Datensystem HP 59970 MS Chemstation; Drucker HP Deskjet 520;

Trärgas Helium 4.6 (Messer);

Aktivkohlepatrone zur Adsorption nach dem Detektor.

GC-Trennsäule

DB-XLB Fused Silica Kapillarsäule mit 0,25 mm ID und 0,25 µm Filmdicke (J & W Scientific):

- 15 m für phenolische Xenoestrogene
- 30 m für Steroide

2 Arbeitsvorschriften

2.1 Reinigung der Glasgeräte und Einmalmaterialien

Glasgeräte wurden mit dem Laborspülautomaten Miele G7735 gereinigt; stark verunreinigte Glasgeräte wurden mechanisch mit Bürste und Spülmittel vorgereinigt. Anschließend erfolgte eine dreimalige Spülung aller Glasgeräte und ebenfalls aller Einmalmaterialien (Pasteurpipetten, Probengläschen, Deckelchen, 200 µl Einsätze, etc.) mit Aceton nanograde. Nach einer Trocknung bei 80 °C im Trockenschrank wurden die Glasgeräte und Einmalmaterialien sofort in Aluminiumfolie eingepackt oder mit einem Glasstopfen verschlossen. Die gereinigten Geräte kamen erst nach Temperierung auf Raumtemperatur zum Einsatz.

Das Steigrohr des Rotationsverdampfers wurde vor jeder einzuengenden Probe mit Aceton nanograde gespült.

2.2 Herstellung von Standardlösungen

2.2.1 Stammlösungen der Referenzstandards

Es wurden 3 Stammlösungen der Referenzstandards mit einer Konzentration von ~ 100 - 200 µg/ml je Komponente hergestellt:

1. Stammlösung mit Referenzsubstanzen der phenolischen Xenoestrogene
2. Stammlösung aus E2, E1, E3, EE2 und β-Sitosterol

An der Analysenwaage wurden die einzelnen Komponenten in gereinigte und getrocknete 100 ml Messkolben eingewogen und nach Lösung bei 20 °C bis zur Eichmarke mit Methanol aufgefüllt. Entsprechende Arbeitsstandardlösungen wurden durch Verdünnung mit Methanol aus der jeweiligen Stammlösung erhalten.

2.2.2 Arbeitsstandardlösung

Phenolische Xenoestrogene

Arbeitsstandards mit folgenden Konzentrationen wurden durch 1:10, 1:100, 1:1000, 1:2000, 1:5000 und 1:10000 Verdünnung erhalten: ~ 10 mg/ml, 1 µg/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 20 ng/ml und 10 ng/ml.

Steroide

1:100, 1:1000 und 1:10000 Verdünnungen ergaben für die Steroide folgende Arbeitsstandardlösungen: 1 - 2 µg/ml, 100 - 200 ng/ml und 10 - 20 ng/ml. Weitere Konzentrationen mit ca. 300 - 600 ng/ml, 30 - 60 ng/ml und 5 - 10 ng/ml wurden ebenfalls in situ hergestellt.

2.2.3 Interne Standardlösungen zur Quantifizierung

Die internen Standardlösungen wurden separat hergestellt:

Interne Standards für die phenolischen Xenoestrogene

Biphenyl in Methanol: 103 µg/ml

D₁₀-markiertes Biphenyl in Methanol: 120 µg/ml

Interne Standards für Steroide

D₃-markiertes Testosteron in Methanol: 1,01 µg/ml

D₂-markiertes 17β-Estradiol in D₆-markiertem Aceton: 9,8 µg/ml

2.3 Probenahme und Probenlagerung und -vorbereitung

2.3.1 Flüssige Proben

Oberflächenwasser

Wasserproben wurden sowohl in Form von Stichproben, als auch in Form von Mischproben genommen. Die Probenahme einer Stichprobe erfolgte durch Befüllen einer gereinigten Braunglasflasche unterhalb der Gewässeroberfläche. Zur Vermeidung von Luftpolstern wurden die Glasflaschen randvoll gefüllt und möglichst unter der Wasseroberfläche verschlossen.

Mischproben wurden kontinuierlich von Körsch und Krähenbach genommen. 250 ml Wasser wurde pro Tag über den Zeitraum vom 9.6. - 17.6.98 kontinuierlich mit einer Pumpe gesammelt und in Braunglasflaschen gefüllt. Während der gesamten Probenahmezeit wurden die Flaschen bei 4 °C gelagert.

Abwasser

Die Probenahme erfolgte in Form von 24 h-Mischproben mit automatisch arbeitenden Probenahmegeräten. Zulaufproben wurden im Klärwerk Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm) volumenproportional und Ablaufproben zeitproportional genommen. Die Proben stammten aus verschiedenen Stufen der Abwasserbehandlung (Zulauf, Zulauf zur biologischen Reinigungsstufe, Ablauf, Ablauf nach Ultrafiltration).

Sonstige wässrige Proben

Demineralisiertes Wasser, Leitungswasser und Wasser aus Destillationsapparaturen wurden nach einem Vorlauf von einigen Minuten direkt durch Abfüllen aus der Leitung entnommen.

Die Wasserproben wurden, soweit nicht sofort extrahierbar, zur Unterdrückung mikrobieller Aktivität bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Extraktion sollte innerhalb von 28 Tagen erfolgen, um wesentliche Veränderungen der Probe auszuschließen (vgl. III.I 4.3.5.2).

Bei Anwendung der Festphasenextraktion mussten die Wasserproben vor der Probenvorbereitung bzw. Extraktion auf Raumtemperatur gebracht werden. Dadurch wurde eine vollständige Anreicherung der Substanzen auf der Festphase gewährleistet. Anschließend wurden die Wasserproben unter Vernachlässigung der Dichte in gereinigte 1 l Braunglasflaschen eingewogen und weiter aufbereitet.

Nach Bestimmung der Leitfähigkeit wurden die Proben durch Zusatz von NaCl in kleinen Portionen auf eine Leitfähigkeit eingestellt, die einer 0,5 %-igen NaCl-Lösung (Verwendung von demineralisiertem Wasser) entsprach. Anschließend wurden die Wasserproben tropfenweise mit H₂SO₄ conc. auf pH 2 - 3 angesäuert und mit 5 ml Methanol je eingewogenem Probenliter versetzt.

Schwebstoffe

Manche Wasserproben, die hohe Gehalte an suspendierten Partikeln aufwiesen, wurden vor dem Zusatz von NaCl, Ansäuern und Methanolzugabe zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde von der Partikelphase abgetrennt und beide Phasen wurden getrennt aufgearbeitet und analysiert. Die meisten Proben wurden wie unter IV.I 2.4.1

(vgl. auch IV.I 2.3.2) beschrieben direkt ohne Partikelabtrennung extrahiert. Zur Bestimmung von Steroiden wurde die Partikelphase immer abgetrennt.

2.3.2 Feste Proben

Sediment

Sedimente wurden an der Oberfläche (1 - 4 cm) leicht zugänglicher Fluss- und Bachufer direkt mit dem gereinigtem Probenahmeglas entnommen. Überschüssiges Wasser wurde abdekantiert. Es wurden auch Sedimentproben aus sogenannten „Bypass-Systemen“ (in Bauwagen installierte Aquarien (200 l), die kontinuierlich mit Bachwasser durchflossen werden) an der Körsch und am Krähenbach auf gleiche Weise entnommen. Die weitere Probenaufbereitung erfolgte generell am Tage der Probenahme. Bevor die Sedimentproben tiefgefroren (- 20 °C) und gefriergetrocknet wurden, erfolgte eine Siebung unter Verwendung eines Siebes mit einer Maschenweite von 1 mm. Die in Aluminiumschalen mit perforiertem Deckel gefriergetrockneten Sedimentproben wurden unmittelbar vor der Extraktion pulverisiert.

Klärschlamm

Klärschlammproben wurden aus verschiedenen Phasen der Abwasser- und Schlammbehandlung (Primärschlamm aus Vorklärung, Überschussschlamm aus der Nachklärung, zentrifugierter und dünnschichtgetrockneter Schlamm) vom Klärwerk Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm) erhalten. Die Proben wurden bis zur Aufarbeitung bei 4 °C gelagert.

Überschüssiges Wasser wurde teilweise durch Zentrifugieren der Proben abgetrennt. Nach Einfüllen der Proben in Aluminiumschalen, deren Deckel mit Löchern versehen waren, wurden die Proben bei - 20 °C tiefgefroren und anschließend gefriergetrocknet. Die getrockneten Proben wurden mit Hilfe einer Kaffeemühle fein gemahlen und bis zur Extraktion in Braunglasgefäßen dicht verschlossen gelagert.

Schwebstoffe

Schwebstoffe wurden einerseits, wie bereits unter IV.I 2.3.1 beschrieben, durch Abzentrifugieren einer Wasserprobe erhalten. Andererseits erwies es sich als besonders praktisch die Partikelphase bei der Festphasenextraktion auf silanisierter Glaswolle anzureichern. Die silanierte Glaswolle wurde hierzu auf die Festphasensäule aufgebracht und dann nach erfolgter Probenanreicherung und anschließender Trocknung der Säulen abgenommen. Die auf der Glaswolle angereicherten Schwebstoffe wurden nicht getrocknet, sondern direkt extrahiert.

2.3.3 Bestimmung des Glühverlustes

Durch Trocknen der Probe im Trockenschrank bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz konnte das Restwasser entfernt werden. Nach Auswiegen der getrockneten Probe wurde diese weiter bis zur Gewichtskonstanz bei 550 °C geglüht (Glühverlust). Der Gehalt an organischer Substanz einer Probe ergab sich aus der Massendifferenz der nach dem Trocknen und nach dem Glühen ermittelten Gewichte.

2.4 Extraktion

2.4.1 Flüssige Proben

Festphasenextraktion

Phenolische Xenooestrogene

Zwei verschiedene Festphasenmaterialien, 1 g einer C18_{nec} Reversed Phase (6 ml Reservoir) und 200 mg einer Styroldivinylbenzol-Copolymer Phase ENV+ (6 ml Reservoir) wurden getestet.

Sofern ein großer Schwebstoffanteil in der Probe enthalten war, wurde die Säule vor der Extraktion mit silanisierter Glaswolle bedeckt (vgl. IV.I 2.3.2), anschließend erfolgte die Konditionierung. Schrittweise wurde die Säule mit 6 ml Aceton gewaschen, mit 10 ml Methanol konditioniert und mit 6 ml deionisiertem Wasser (mit H₂SO₄ conc. auf pH 2 angesäuert) das überschüssige Methanol heruntergewaschen. Zur Gewährleistung einer optimalen Konditionierung und um das Trockenlaufen der Festphase zu vermeiden, liefen die einzelnen Lösungsmittel ohne Unterdruck über die Säule. Die Extraktion erfolgte, indem die Wasserprobe mit einer Flussrate zwischen 10 und 15 ml/min durch die Säule gezogen wurde. Die Säule war hierbei über einen Teflonschlauch mit der Adsorbex-Apparatur verbunden. Nach vollständiger Probenanreicherung wurde die Säule mit 6 ml deionisiertem Wasser (mit H₂SO₄ conc. auf pH 2 angesäuert) gewaschen und anschließend unter Stickstoff getrocknet. Die Elution der angereicherten phenolischen Komponenten erfolgte mit 2 x 2,5 ml Aceton. Die Elution konnte alternativ mit Ethylacetat erfolgen. Das Eluat wurde direkt in der Adsorbex-Apparatur in einem 5 ml Probengläschen aufgefangen und anschließend unter einem schwachem Stickstoff-Strom auf 0,5 ml abgeblasen. Ein Aliquot des Extraktes wurde vor der GC/MS-Analytik derivatisiert (Methylierung).

Steroide

Für die Steroidanalytik wurde lediglich die Styroldivinylbenzol-Copolymer-Phase ENV+ (200 mg, 6 ml Reservoir) als Festphasenmaterial eingesetzt. Die Konditionierung, Probenanreicherung, der Wasch- und Trocknungsschritt und die Elution erfolgte wie für die phenolischen Xenoestrogene. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die auf der silanisierten Glaswolle angereicherte Partikelphase vor der Elution abgenommen wurden. Ob Aceton und/oder Ethylacetat als Elutionsmittel geeignet ist, wurde auch für die Steroide untersucht. Da die Wiederfindungsraten mit Ethylacetat insgesamt höher lagen (vgl. III.I 5.2.1), wurde zur Analyse realer Proben nur Ethylacetat als Elutionsmittel verwendet. Die Steroidanalytik mittels GC/MS konnte nur nach Aufreinigung des Extraktes und anschließender Derivatisierung (Silylierung) erfolgen.

Weitere Flüssig-flüssig-Extraktionstechniken wurden im Rahmen der Methodentwicklung der vorliegenden Arbeit getestet. Der Vollständigkeit halber werden die für die Phenol-Analytik angewandten Arbeitsvorschriften aufgeführt:

Mikroseparator

Die Wasserprobe (1 l) wurde auf pH 2 angesäuert und dann mit 5 ml Extraktionsmittel versetzt. Verschiedene Extraktionsmittel, wurden getestet, unter anderem eine Mischung aus Cyclohexan und Toluol im Verhältnis 1:1. Die Extraktion erfolgte unter 20-minütigem Rühren auf dem Magnetrührer. Nach abgeschlossener Extraktionsdauer wurde der Mikroseparator auf die Schliffglasflasche aufgesetzt und durch Zusatz von demineralisiertem Wasser der Flüssigkeitsspiegel solange erhöht, bis eine problemlose Abnahme des Extraktes aus dem Mikroseparator möglich war.

Flüssig-flüssig-Extraktion durch Ausschütteln

Bei dieser Extraktionsmethode folgt der Anreicherung der phenolischen Substanzen unmittelbar die Derivatisierung (Acetylierung). Ein Liter Wasserprobe wurde mit 2 ml einer Mischung aus H_2SO_4 conc. und H_2O (1:3) auf pH 3 angesäuert und anschließend mit 1 x 50 ml und 1 x 25 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte wurden mit 2 x 15 ml einer 0,1 M K_2CO_3 -Lösung ausgeschüttelt. Die Dichlormethanphase wurde verworfen. Die Kaliumcarbonatphase wurde mit 0,5 ml Acetanhydrid versetzt, solange kräftig geschüttelt bis keine Gasentwicklung mehr erfolgte und 10 min stehen gelassen. Dann wurden 5 ml *n*-Heptan zugegeben und erneut kräftig geschüttelt. Nach erfolgter Phasentrennung wurde die Kaliumcarbonatphase verworfen und die *n*-Heptanphase über Na_2SO_4 bei 4 °C getrocknet.

2.4.2 Feste Proben

Phenolische Xenoestrogene

Klärschlamm und Sediment

Die Extraktion von Klärschlamm- und Sedimentproben erfolgte in 30 ml Soxhlet-extraktoren mit 100 oder 250 ml Rundkolben. Die gesamte Extraktionsapparatur inklusive der Extraktionshülsen wurde ca. 3 bis 24 h mit Aceton vorextrahiert. Dann wurden die gefriergetrockneten und pulverisierten bzw. gemahlten Proben in die Extraktionshülsen eingewogen. In der Regel wurden bis zu 10 g Sedimentprobe und bis zu 4 g Klärschlamm eingesetzt. Bevor die Proben 24 h mit 90 ml einer Mischung aus Methanol und Diethylether im Verhältnis 10:1 mit 0,1 % (V/V) HCl conc. extrahiert wurden, wurden die Rundkolben nochmals 2 mal mit Aceton gespült.

Während der Methodenentwicklung wurden zwei weitere Extraktionsmittel getestet: (1) eine Mischung aus Hexan, Aceton und Diethylether (5:5:1) + 0,1 % (V/V) HCl conc. und (2) reines Methanol.

Die erhaltenen Extrakte wurden in dem Rundkolben auf ca. 1 - 3 ml eingeeengt (nicht bis zur Trockene) und anschließend aufgereinigt.

Schwebstoffe

Die auf silanisierter Glaswolle angereicherten oder durch Zentrifugation abgetrennten Schwebstoffe von einem 1 l-Aliquot einer Wasserprobe wurden dreimal mit 10 ml Aceton im Ultraschallbad extrahiert. Die Acetonextrakte wurden mit der Pasteurpipette abgenommen und vereinigt. Um verbleibende Schwebstoffe abzutrennen wurde der Extrakt zentrifugiert. Die abgetrennte Partikelphase wurde nochmals mit 5 ml Aceton gespült und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Extrakt auf ca. 2 - 3 ml am Rotationsverdampfer eingeeengt und unter dreimaligem Spülen in ein 5 ml Proben-gläschen überführt. Unter schwachem Stickstoffstrom wurde der Extrakt weiter auf 0,5 oder 5 ml eingeeengt. Ein Aliquot des Extraktes wurde vor der GC/MS-Analytik methyliert.

2.5 Aufreinigung

2.5.1 Wässrige Proben

Steroide

Flüssigkeitschromatographische Aufreinigung

Eine Glassäule (230 mm Pasteurpipette) wurde unten mit silanisierter Glaswolle verschlossen und mit 1 g Kieselgel (1,5 % desaktiviert) befüllt. Die Säule wurde mit 10 ml einer Mischung aus *n*-Heptan/Ethylacetat/Methanol (6:2:2) konditioniert. Das Festphaseneluat wurde auf 100 - 200 µl abgeblasen und auf das Kieselgel aufgetragen. Nach kurzer Einwirkzeit wurde mit 5 ml der Mischung aus *n*-Heptan/Ethylacetat/Methanol (6:2:2) eluiert. Das Probengläschen wurde mehrfach mit dem Elutionsmittel nachgespült.

Das Eluat wurde nach Zugabe des internen Standards zur Trockene eingengt.

2.5.2 Feste Proben

Phenolische Xenoestrogene

Flüssig-flüssig-Verteilung

Der auf 1 - 3 ml eingengte Sediment- bzw. Klärschlammextrakt wurde unter mehrmaligem Nachspülen des Rundkolbens in einen mit 50 ml *n*-Hexan gefüllten 100 ml Schütteltrichter transferiert. Der in *n*-Hexan gelöste Extrakt wurde dreimal mit 20 ml 2 N NaOH-Lösung je 2 min ausgeschüttelt. NaCl wurde zur Phasentrennung hinzugefügt. Emulsionen wurden durch Zentrifugation gebrochen. Beide Phasen, die Hexanphase und die vereinigten wässrigen Phasen, wurden anschließend getrennt aufgearbeitet. Die wässrige Phase wurde tropfenweise mit HCl conc. auf pH 2 - 3 angesäuert und nach Äquilibrierung auf Raumtemperatur auf 200 mg Styroldivinylbenzol-Copolymer Phase ENV+ (6 ml Reservoir) angereichert. Silanierte Glaswolle wurde auf die Säule aufgebracht, um ein Verstopfen durch mögliche Ausfällungen in der wässrigen Phase zu vermeiden. Die Säule wurde mit 6 ml Aceton, 10 ml Methanol und 6 ml demineralisiertem H₂O (pH 2) wie unter IV.I 2.4.1 beschrieben konditioniert. Die Probenanreicherung erfolgte mit einer Flussrate von 10 - 15 ml/min. Nach Waschen mit 6 ml demineralisiertem H₂O (pH 2) und Trocknen der Säule wurde zweimal mit 2,5 ml Aceton eluiert. Das Eluat wurde auf ein Endvolumen von 0,5 ml unter Stickstoff abgeblasen. Die Hexanphase wurde am Rotationsverdampfer auf ca. 2 ml eingengt und unter dreimaligem Spülen in ein 5 ml Probengläschen transferiert. Die Hexanphase wurde je nach Färbung auf 0,5 oder 5 ml eingengt. Aliquote beider Phasen wurden getrennt methyliert und mittels GC/MS analysiert.

Flüssigkeitschromatographische Aufreinigung

Während der Methodenentwicklung wurde parallel zur Flüssig-flüssig-Verteilung eine säulenchromatographische Aufreinigung entwickelt. Diese Aufreinigung war jedoch

nur auf Sedimente anwendbar, da die Extrakte von Klärschlamm nicht so sauber waren, dass sie mittels GC/MS analysiert werden konnten.

Eine Glassäule (14 cm lang, 0,7 cm ID, 40 ml Reservoir) wurde unten mit silanisierter Glaswolle verschlossen und mit 1,7 g Kieselgel gefüllt. Die Säule wurde mit 5 ml *n*-Heptan/Ethylacetat/Methanol (6:2:2) konditioniert und mit 5 ml Pentan gewaschen. Die auf 100 - 200 µl eingeeengte Probe wurde aufgetragen, mit 5 ml Pentan voreluiert und anschließend mit 5 ml *n*-Heptan/Ethylacetat/Methanol (6:2:2) eluiert. Das Eluat wurde auf 0,5 ml eingeeengt. Für die GC/MS-Analytik wurde ein Aliquot methyliert.

2.6 Quantitative Analyse

2.6.1 Vorbereitung zur Analyse

Bei der Vorbereitung zur Analyse ist bei der angewandten internen Quantifizierung mit externer Responsefaktor-Bestimmung auf höchste Genauigkeit beim Abmessen der Volumina zu achten. Um Schwankungen der Volumina zu vermeiden, wurden die Standard- und Extraktlösungen einer Probensequenz immer auf die gleiche Temperatur (möglichst 20 °C) äquilibriert.

2.6.1.1 Extrakte

Phenolische Xenoestrogene

Die Aliquote der auf ein definiertes Endvolumen von 0,5 oder 5 ml eingeeengten Extrakte der Wasser-, Sediment-, Klärschlamm- oder Schwebstoffproben wurden vor der HRGC/LRMS in den 200 µl-Inlets der Autosamplergläschen mit Methylierungsreagenz und internem Standard versetzt. Die Methylierung erfolgte bei Raumtemperatur.

Wasserproben

Generell wurde ein Aliquot von 50 µl aus 0,5 ml Extrakt mit 50 µl Methylierungsreagenz und dann mit 10 µl interner Standardlösung versetzt.

Sediment-, Klärschlamm- und Schwebstoffproben

Ein Aliquot von 20 bzw. 50 µl aus 0,5 oder 5 ml Extrakt wurde mit 80 bzw. 50 µl Phenyltrimethylammoniumhydroxid (0,1 M Lösung in Methanol) methyliert und mit 10 µl interner Standardlösung versetzt.

Steroide

Der mit 10 µl interner Standardlösung versetzten und zur Trockene (!) eingedampfte aufgereinigte Extrakt wurde direkt im 5 ml Probengläschen mit 50 µl Silylierungsreagenz (100 µl bei Kläranlagenzuläufen) versetzt und 1 h bei 80 °C im Trockenschrank inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der silylierte Extrakt in ein 200 µl-Inlet der Autosamplergläschen transferiert und sofort verschlossen.

2.6.1.2 Referenzstandard

Vor jeder GC/MS-Probensequenz wurden Referenzstandards verschiedener Konzentrationen aufgearbeitet, die innerhalb des ermittelten linearen Bestimmungsbereichs lagen.

Phenolische Xenoestrogene

Je ein 50 µl-Aliquot von fünf Arbeitsstandardlösungen (1:10, 1:100, 1:1000, 1:2000, und 1:5000), die einen Konzentrationsbereich mit einem Faktor 500 umfassen, wurden mit 50 µl Methylierungsreagenz und 10 µl interner Standardlösung versetzt.

Der Vollständigkeit halber ist die Acetylierungsmethode beschrieben, die während der Methodenentwicklung auf Referenzstandards der phenolischen Xenoestrogene angewandt wurde:

2 ml einer 0,1 M K₂CO₃-Lösung wurden vorgelegt. Die Arbeitsstandards unterschiedlicher Konzentration wurden zugesetzt. Nach Zugabe von einem Tropfen frisch destilliertem Acetanhydrid wurde die Mischung solange geschüttelt bis es zu keiner weiteren Gasentwicklung kam. Die Acetate wurden anschließend in exakt 1 ml *n*-Heptan ausgeschüttelt. Vor der GC/MS-Analytik wurde der *n*-Heptan-Extrakt 10 min stehen gelassen.

Steroide

Ein Konzentrationsbereich mit einem Faktor von 200 wurde durch Einsatz von je 100 µl aus den Arbeitsstandardlösungen 1 - 2 µg/ml, 300 - 600 ng/ml, 100 - 200 ng/ml, 30 - 60 ng/ml, 10 - 20 ng/ml, 5 - 10 ng/ml abgedeckt. Nach Versetzen der Arbeitsstandards mit 10 µl interner Standardlösung wurde das Lösungsmittel vollständig im Speed Vac Concentrator abgezogen. Anschließend wurde den Proben je 50 µl Silylierungsreagenz zugegeben und nach Verschluss der Autosamplergläschen wurden sie 1 h bei 80 °C inkubiert. Die Standardproben wurden vor der GC/MS-Analytik auf Raumtemperatur abgekühlt.

2.6.2 HRGC/LRMS-Analytik

Vor jeder Probensequenz wurde ein Maximum Sensitivity Autotune durchgeführt, um die Empfindlichkeit des MSD zu überprüfen und zu optimieren. Zur Kontrolle der Trennleistung der Säule und Überprüfung der Zeitfenster wurde ebenfalls vor jeder Probenserie eine Referenzstandardprobe eingespritzt.

Jede Probensequenz bestand aus den parallel hergestellten Referenzstandardproben mit den unter IV.I 2.6.1 beschriebenen Konzentrationen und den realen Proben. Um Volumenungenauigkeiten bei der Injektion zu vermeiden, wurde jeweils 1 µl mit dem Autosampler injiziert.

Einer Sequenz wurde immer eine Analyse von reinem Toluol vorangestellt. Den mit steigender Konzentration angeordneten Referenzstandardproben folgte eine erneute Toluolinjektion, um Memory-Effekte zu vermeiden. Die Proben wurden anschließend nach steigender Konzentration angeordnet oder es wurde zwischen Proben mit vermutlich ähnlicher Konzentration eine Toluolanalyse geschaltet.

MS-Bedingungen

Die Ionisation erfolgte mittels Elektronenstoßionisation bei einer Elektronenenergie von 70 eV. Der MSD wurde sowohl im Scan-Modus als auch im SIM (Single Ion Monitoring)-Modus betrieben. Scan-Läufe (50 - 500 amu) eines Standards wurden zur Retentionszeitbestimmung und zur Ermittlung geeigneter Molekül- bzw. Fragmentionenmassen für die quantitative Analytik aufgenommen. Für die quantitative Bestimmung der einzelnen Substanzen in Proben wurden zwei bis vier Molekül- bzw. Fragmentionenmassen je Substanz im SIM-Modus registriert. Möglichst viele Zeitfenster wurden gesetzt, um eine hohe Empfindlichkeit zu erzielen.

GC-Bedingungen

Phenolische Xenoestrogene

Injektor-Temperatur:	240 °C
Injektor-Temperaturprogramm:	240 °C, 1 min isotherm; 10 °C/min auf 320 °C; 5 min isotherm bei 320 °C; 10 °C/min auf 240 °C.
Flussrate des Trägergases:	1,16 ml/min
Ofen-Temperaturprogramm:	65 °C, 1 min isotherm; 20°C/min auf 300°C; 3 min isotherm bei 300 °C.
Offsetspannung (EM):	224 V
Solvent Delay:	4 min
Temperatur der GC/MS-Koppelung:	300 °C

Steroide

Injektor-Temperatur:	250 °C
Injektor-Temperaturprogramm:	250 °C, 1 min isotherm; 10 °C/min auf 300 °C; 1 min isotherm bei 300 °C; 10 °C/min 250 °C
Flussrate des Trägergases:	1,28 ml/min
Ofen-Temperaturprogramm:	120 °C, 1 min isotherm; 20°C/min auf 250°C; 10 °C/min auf 270°C; 3 °C/min auf 300 °C; 5 min isotherm bei 300 °C.
Offsetspannung (EM):	106 V
Solvent Delay:	11,5 min
Temperatur der GC/MS-Koppelung:	290 °C

2.6.3 Quantifizierung

Die Quantifizierung erfolgte intern unter Verwendung extern bestimmter Responsefaktoren. Die externen Responsefaktoren der Referenzstandards (R_f) wurden berechnet, indem die Peakhöhen geeigneter Molekül- bzw. Fragmentenmassen der Referenzstandards (R_{RS}) und des internen Quantifizierungsstandards (R_{iS}) unter Berücksichtigung der Konzentrationen aufeinander bezogen wurden (s. Formeln [I], [II] u. [III]).

$$R_{iS} = \frac{h_{iS}}{c_{iS}} \quad [I]$$

h_{iS} : Peakhöhe_{interner Standard}

h_{RS} : Peakhöhe_{Referenzsubstanz}

h_S : Peakhöhe_{Substanz}

$$R_{RS} = \frac{h_{RS}}{c_{RS}} \quad [II]$$

R_{iS} : Response_{interner Standard}

R_{RS} : Response_{Referenzsubstanz}

$$R_f = \frac{R_{RS}}{R_{iS}} \quad [III]$$

R_f : Responsefaktor

c_{iS} : Konzentration_{interner Standard}

$$c_S = \frac{h_S \times c_{iS}}{R_f \times h_{iS}} \quad [IV] \quad \text{Quantifizierungsformel}$$

c_{RS} : Konzentration_{Referenzsubstanz}

c_S : Konzentration_{Substanz ident.}

Zur ständigen Qualitätskontrolle der Analysen wurden die Linearität der Responsefaktoren und die unteren Bestimmungsgrenzen überprüft. Vor jeder Probensequenz wurden Referenzstandards verschiedener Konzentrationen über den ermittelten linearen Bestimmungsbereich gemessen (vgl. IV.I 2.6.1.2). Für jede Referenzsubstanz

erfolgte die Responsefaktor-Ermittlung aus dem Mittelwert der Responsefaktoren der einzelnen Konzentrationen. Statistisch wurden die Responsefaktoren über die Standardabweichung überprüft. Die Quantifizierung in der realen Probe erfolgte anschließend durch Peakhöhenvergleich der Fragment- bzw. Molekülionenmassen der identifizierten Substanz und des internen Standards unter Berücksichtigung des kalkulierten Responsefaktors (Mittelwert) der Referenzsubstanz (s. Formel [IV] Quantifizierung)

IV.II Zellkultur

1. Chemikalien und Geräte

1.1 Chemikalien

Allgemein

FCS (Fötale Kälberserum, Gibco, Nr. 10081)

Trichloressigsäure zur Analyse (Merck, Nr. 100807)

HCl zur Analyse (Merck), 4 N HCl

NaOH zur Analyse (Merck), 4 N NaOH-Lösung

DMSO Cell culture tested (Dimethylsulfoxid, Sigma, Nr. T-1503)

DMSO 99,5 % (Sigma Nr. D-5879)

Trispuffer 10 mM (Sigma, Nr. T-1503)

Ethanol 99 % vergällt (Chemikalienausgabe)

Ethanol 99 % zur Analyse (Riedel de Haen)

Aktivkohle (Sigma, Nr. C-5510)

Antibiotika-Antimykotika-Lösung 100x (Gibco, Nr. 15240-039)

Dextran T70 (Sigma, Nr. D-1390)

DMEM Dulbecco's Modification of Eagles Medium, w/o Phenolrot (Gibco, Nr. 11880)

DMEM, Dulbecco's Modification of Eagles Medium mit Phenolrot und 2 mM stabilisiertem L-Glutamin (Biochrom, Nr. FG 0415)

HEPES, N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethansulfonsäure] (Sigma, Nr. H-9136)

L-Glutamin 200 mM (Biochrom, Nr. K 0281)

PBS, Phosphate Buffered Saline w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} (Biochrom, Nr. L 1825)

SRB, Suforhodamin B 75 % Farbstoffgehalt (Sigma, Nr. S-1402)

Trypsin/EDTA-Lösung 0,05/0,02 % (w/v) in PBS, w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} (Biochrom, Nr. L 2143)

Essigsäure conc.

Standardsubstanz

17 β -Estradiol (Sigma): Stammlösungen 1E-03 und 1E-05 mol/l in Ethanol

1.2 Geräte

Allgemein

Feinwaage (Mettler-Toledo), pH-Meter (Metrohm), Magnetrührer (Janke & Kunkel)

Probenaufbereitung

Geräte für die Probenextraktion (s. IV.I 1), Vibrationsgerät (Heidolph), Abblasevorrichtung (Barkey) betrieben mit Stickstoffgas 4.6 (Messer)

E-Screen-Assay

Biologische Sicherheitswerkbank Stufe 2 (Nunc GmbH), Brutschrank mit folgenden Bedingungen: 37 °C, 5 % CO_2 in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre (Heraeus Instruments GmbH), Trockenschrank (Memmert), Zentrifuge Type Labofuge^{GL} 2202 (Heraeus Instruments GmbH), Mikroplatten-Photometer Typ MRX 1.2 (Dynatech Deutschland GmbH), Mikroskop (Ernst Leitz GmbH), Neubauerzählkammer, Multipette (Brand), Kolbenhubpipetten (Biohit OY)

Verbrauchsmaterialien

25 und 75 cm² Kulturflaschen aus Polystyrol (Falcon, Nr. 655061 bzw. Sarstedt, Nr. 83.1813.002)

Kanülen (20G x 2^{3/4} bzw. 0,9 x70 mm) und 3 und 5 ml Spritzen (Terumo)

0,45 μm Einwegfilter (Millipore, Nr SLHA025BS)

0,22 μm Einwegfilter (Sarstedt, Nr. 83.1826.001)

96-Well-Platten (Falcon, Nr. 3072)

sterile 15 ml Rörchen (Polypropylen) mit konischem Boden (Sarstedt, Nr. 62.554.502)

sterile 50 ml Rörchen (Polypropylen) mit konischem Boden (Sarstedt, Nr. 62.547.254)

sterile 2 ml Einfrierrörchen (Greiner GmbH)

sterile 5 ml Röhrchen mit Rundboden, Polyethylen (Sarstedt, Nr. 55.526.006)
sterile 2, 5, 10, 25, ml Meßpipetten (Greiner GmbH, Nr. 710180, 606180, 607180,
760180)
Pipettenspitzen 200 und 1000 Öl
1,25 und 2,5 Präzisions-Dispenser-Tips (Brand GmbH & Co, Nr. 702386, 702388)
sterile 140 mm Pasteurpipetten

1.3 Zelllinie

MCF-7: Passage Nr. 145 im Nov. 1995 von Frau Dr. H. Bartsch, Universitäts-
Frauenklinik Tübingen erhalten.

2 Arbeitsvorschriften

2.1 Allgemein

Herstellung verschiedener Medien

Kulturmedium

DMEM

1 % L-Glutamin 200 mM

1 % Antibiotika/Antimykotika 100x

5 % FCS

Experimentalmedium

DMEM w/o Phenolrot

1 % L-Glutamin 200 mM

1 % Antibiotika/Antimykotika 100x

5 % CD-FCS

1 % HEPES 1 M, pH 7,6

Einfriermedien

I: 60 % FCS in Kulturmedium

II: 25 % DMSO in Kulturmedium

Strippen von FCS

Durch Strippen des FCS mit Aktivkohle/ Dextran (CD) wurde ein steroidfreies Serum CD-FCS erhalten. Das Strippen erfolgte nach der Methode von Stanley et al. (1977).

Das langsam aufgetaute FCS (100 ml) wurde mit 4 N HCl auf pH 4,2 angesäuert und anschließend 30 min auf Eis gerührt. Das Serum wurde mit 5 ml einer Dextran/ Aktivkohle-Suspension (0,05 % Dextran und 10 % Aktivkohle in destilliertem Wasser) versetzt und nochmals auf einen pH von 4,2 überprüft. Nachdem die Mischung etwa 15 h bei 4°C gerührt wurde, wurde sie 30 min bei 4 °C mit 3200 rpm zentrifugiert. Das abgenommene Serum wurde mit 4 N NaOH-Lösung auf pH 7,2 eingestellt und steril filtriert (0,45 und 0,22 µm Porendurchmesser). Das so erhaltene sterile CD-FCS wurde in Aliquoten zu 50 ml in Polypropylen-Röhrchen eingefroren (-30 °C).

Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Zellen wurden bei Raumtemperatur durch Umspülen mit 1 - 2 ml frischem Kulturmedium aufgetaut und anschließend sofort in 10 ml Kulturmedium überführt. Die Zellsuspension wurde bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert, um enthaltenes DMSO herauszuwaschen. Nach Abkippen des Flüssigkeitsüberstandes wurde das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert (Aufziehen durch Meßpipette) und in 25 oder 75 cm² Kulturflaschen überführt. Nach 24 h erfolgte der erste Mediumwechsel. Frühestens nach 2 - 4 Tagen konnten die Zellen für den E-Screen-Assay eingesetzt werden, da sie sich erst nach dieser Zeit in der exponentiellen Wachstumsphase befanden.

Kultivierung der Zellen und Mediumwechsel

Die Kultivierung der als Monolayer adhärent wachsenden Zellen erfolgte in 25 oder 75 cm² Kulturflaschen (5 ml bzw 15 ml Kulturmedium) bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ im Brutschrank.

Alle 4 - 5 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Konfluent gewachsene Zellen wurden trypsinisiert und ein Teil der Zellsuspension wurde in frischem Kulturmedium weiterkultiviert. Trypsinieren und Weiterkultivieren bedeutete eine Erhöhung der Passagenzahl, die neben den Daten (Weiterkultivierung, Mediumswechsel) immer auf jeder Kulturflasche angegeben wurde. Nach dem Trypsinieren benötigen die Zellen 2 - 3 Tage bis das exponentielle Wachstum einsetzte.

Trypsinieren von Zellen

Durch das Trypsinieren konnten die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgelöst werden. Das Kulturmedium wurde aus der Kulturflasche abgesaugt und anschließend

wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung (37 °C) gewaschen (2 ml bzw. 1 ml auf 75 cm² bzw. 25 cm²). Durch Zugabe von 2 ml bzw. 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (37 °C) in die 75 cm² bzw. 25 cm² Kulturflasche und Inkubation im Brutschrank zwischen 4 bis 8 min wurden die Zellen vom Boden abgelöst. Die abgerundeten und einzeln sichtbaren (Mikroskop) Zellen konnten durch leichtes Klopfen vom Boden der Kulturflasche abgelöst werden. Um die Wirkung des Trypsins zu stoppen wurden die Zellen mit 10 ml Kulturmedium gewaschen. Nach Zentrifugieren für 5 min bei 1200 rpm wurden die Zellen weiterkultiviert, eingefroren oder für den E-Screen-Assay eingesetzt.

Einfrieren von Zellen

Durch Einfrieren können die Zellen über einen längeren Zeitraum konserviert werden. Hierzu wurden die trypsinierten, in Kulturmedium gewaschenen, ausgezählten und pelletierten (5 min bei 1200 rpm) Zellen in ihrem Röhrchen auf Eis gelegt. Die Zellen wurden zuerst in Einfriermedium I resuspendiert und anschließend wurde das gleiche Volumen Einfriermedium II tropfenweise unter leichtem Schütteln der Zellsuspension zugegeben. Die Volumina wurden so bemessen, dass eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml entstand. Nach fünfminütiger Lagerung auf Eis wurden die Zellen für 24 h bei -30 °C, dann für 2 - 3 Tage bei -80 °C eingefroren bis sie letztendlich in den Stickstofftank eingelagert wurden.

2.2 Probenvorbereitung

Wasserproben wurden wie unter IV.I 2.3. entnommen und vorbereitet und anschließend, wie unter IV.I 2.4 beschrieben, extrahiert. Da die Endkonzentration an organischem Lösungsmittel in der Zellkultur nicht über 0,1 % (V/V) liegen darf (Zytotoxizität des Lösungsmittels), musste der Extrakt mit Experimentalmedium entsprechend verdünnt werden. Aus dem auf 0,5 ml eingeeengten Extrakt wurde in der Regel ein Aliquot zwischen 200 und 450 µl entnommen und mit 50 µl DMSO versetzt. Das Lösungsmittel des Extraktes wurde abgeblasen und der Extrakt wurde insgesamt mit 4,95 ml Experimentalmedium versetzt (steriler 5 ml Messkolben). Beim Transfer des Extraktes in den Messkolben wurde unter Vortexen mehrfach gespült. Der Extrakt wurde in eine Einmalspritze aufgenommen und durch einen 0,22 µl Einmalfilter steril filtriert. Diese Stammlösung mit 1 % DMSO wurde im sterilen 5 ml Messkolben im Kühlschrank aufbewahrt.

2.3 E-Screen-Assay

2.3.1 Durchführung des E-Screen-Assay

Zellaussaat

Die trypsinierten, mit Kulturmedium gewaschenen und pelletierten (5 min bei 1200 rpm) Zellen wurden in 5 ml Experimentalmedium resuspendiert. Die Zellvereinzlung erfolgte, indem die Zellsuspension in eine 5 ml Spritze aufgenommen wurde und mehrmals durch die aufgesetzte feine Kanüle (0,6 x 70 mm) gespritzt wurde. Nach Ermittlung der Zellkonzentration mit der Neubauerzählkammer wurde die Zellsuspension so verdünnt, dass die Zelldichte 10000/ml betrug. Anschließend wurde in jedes Well der 96 Well-Platte 150 µl (ca. 1500 Zellen/Well) der verdünnten Zellsuspension pipettiert. Die erste und letzte Spalte der insgesamt 12 Spalten (8 Wells/-Spalte) wurde ausgespart und in die 4 äußersten Wells wurden je 150 µl Experimentalmedium als Verdunstungsschutz pipettiert. Insgesamt wurden je Assay 3 - 4 96-Well-Platten verwendet.

Inkubation der Zellen

Die ausgesäten Zellen waren nach einer Inkubation von 24 h im Brutschrank am Boden der Kulturplatten angewachsen.

Herstellung der Verdünnungen der Positivkontrolle und der zu testenden Umweltproben

Es wurden von jeder Verdünnung ca. 2 ml hergestellt. Als Positivkontrolle diente 17β-Estradiol (Stammlösung 10^{-5} mol/l). Durch Verdünnen der Stammlösung mit frischem Experimentalmedium wurde zunächst eine 1:100 Verdünnung (10^{-7} mol/l) und danach 5 Verdünnungen von 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 5×10^{-12} und 10^{-12} mol/l hergestellt.

Die Stammlösung der zu testenden Wasserprobe wurde ebenfalls mit Experimentalmedium verdünnt. Im E-Screen-Assay wurden Verdünnungsreihen von 1:10 bis 1:1000 von Flusswasserproben eingesetzt.

Substanzzugabe

Vor der Substanzzugabe wurde das Experimentalmedium mit einer Vierkanalpipette aus den Wells abgenommen. In die Wells der Spalten 2 - 6 der ersten Platte wurde von links nach rechts die Positivkontrolle (150 µl/Well) mit steigender Konzentration (je Spalte) aufgegeben. In die Spalte 7 jeder Platte wurde je Well 150 µl Experimentalmedium als Negativkontrolle einpipettiert. Die verbleibenden Spalten der ersten Platte

und aller weiteren Platten wurden für die Testung der Umweltproben verwendet. Die einzelnen Verdünnungen einer Probe wurden von links nach rechts in 8 Wells/Spalte ebenfalls mit steigender Konzentration aufgegeben (150 µl/Well). Die Zellen wurden anschließend im Brutschrank 5 Tage inkubiert.

2.3.2 Bestimmung der Zellzahl mit dem Sulforhodamin B-Assay

Der SRB-Assay stellt eine sehr empfindliche und einfach durchzuführende kolorimetrische Methode dar, um den Gesamtproteingehalt einer Zelle zu ermitteln. Bei der Extinktionsmessung der Konzentration des an den Zellproteinen anhaftenden SRB wurde indirekt die Zellzahl/Well ermittelt. Zwischen der Extinktion bei 550 nm und der Zellzahl besteht über einen großen Bereich eine lineare Beziehung (Skehan et al. 1990).

Zellfixierung

Nach 5 Tagen Inkubation wurde das weitere Wachstum der Zellen durch Fixierung gestoppt. Das Experimentalmedium wurde abgegossen, die Platte wurde auf Eis gelegt und jedes Well mit 150 µl gekühltem PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte nach Zugabe von 100 µl gekühlter 10 % Trichloressigsäure bei einer 30-minütigen Lagerung im Kühlschrank. Die Zellen wurden anschließend viermal unter einem kalten, schwach fließenden Wasserstrahl gewaschen und anschließend im Trockenschrank bei maximal 40 °C getrocknet.

Anfärben der Zellen

Zur Färbung der Zellen wurde in jedes Well 50 µl SRB-Lösung (0,4 % in 1%iger Essigsäure W/V) pipettiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen solange mit 1 % Essigsäure gewaschen, bis der Überstand farblos war. Die angefärbten Zellen wurden erneut getrocknet.

Messung am Mikroplattenphotometer

Zur Vorbereitung der Messung wurden die Platten auf Eis gelegt und in jedes Well 100 µl kalter Trispuffer 10 mM pipettiert. Während der Inkubation im Kühlschrank (10 - 15 min) löste sich der Farbstoff von den Zellproteinen. Der Inhalt der Wells wurde gut gemischt und anschließend am Mikroplattenphotometer bei 550 nm Wellenlänge vermessen (die Extinktion durfte den Wert von 1,8 nicht überschreiten, da oberhalb dieser Zahl zur Zellzahl keine Linearität mehr bestand). Als Referenzwellenlänge diente 630 nm.

2.3.3 Quantitative Auswertung des E-Sceen-Assays

Basisendpunkt des Tests ist die Zellzahl zur hormonfreien Kontrolle (Negativkontrolle).

Aus dem Verhältnis der höchsten Zellzahl, die mit 17β -Estradiol bzw. mit der Umweltprobe erreichbar war, und derjenigen der Negativkontrolle wurde der Proliferations-effekt (PE) berechnet:

$$PE = \text{Zellzahl max. (17}\beta\text{-Estradiol)} / \text{Zellzahl (Negativkontrolle)}$$

Die estrogene Aktivität einer Umweltprobe wurde quantitativ ermittelt durch die Bestimmung:

(1) der relativen Wirkungsstärke: der relative Proliferationseffekt (RPE)

Der RPE vergleicht die maximale durch 17β -Estradiol induzierbare Proliferation mit der maximalen durch die Umweltprobe induzierbaren Proliferation. So wird der vollständige Agonist (RPE = 100 %) vom partiellen Agonisten (RPE < 100 %) unterschieden.

$$RPE = [\text{PE-1 (Umweltprobe)} / \text{PE-1 (17}\beta\text{-Estradiol)}] \times 100 \%$$

(2) des Gesamtgehaltes an estrogenartig wirkenden Substanzen: die Estradiol-Äquivalentkonzentration (EEQ)

Die Bestimmung der EEQ erfolgte unter der Annahme, dass sich die estrogene Wirkung der einzelnen in der Probe enthaltenen estrogen wirksamen Substanzen additiv verhält. Für flüssige Umweltproben ergab sich die EEQ aus dem Produkt der halbmaximal wirksamen Konzentrationen der Positivkontrolle 17β -Estradiol und dem halbmaximal wirksamen Verdünnungsfaktor der Umweltprobe (EC_{50} -Werte).

$$EEQ = EC_{50} (17\beta\text{-Estradiol}) \times EC_{50} (\text{Umweltprobe}) [\text{pmol/l oder ng/l}]$$

Die Berechnung der EC_{50} -Werte erfolgte über eine Log-Probit-Regression, die mit einem für EXCEL 5 geschriebenen Zusatzprogramm von Herrn Josef Greve, Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie, Schmallenberg, durchgeführt wurde. Der EC_{50} -Wert der flüssigen Umweltprobe stellt keine Konzentration dar, sondern entspricht dem Verdünnungsfaktor der Probe, bei dem der Proliferationseffekt 50 % erreicht. Dieser Faktor ist dimensionslos.

V Zusammenfassung

Um die Verbreitung estrogen wirksamer Substanzen in der aquatischen Umwelt und deren Eintrag über Einleitungen von Kläranlagen untersuchen und bestimmen zu können, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit chemische Analysenverfahren entwickelt und für die relevanten aquatischen Umweltkompartimente Oberflächenwasser, Sediment, ungereinigtes und gereinigtes Abwasser und Klärschlamm validiert. Aufgrund der zahlreichen Anwendungen in wässriger Lösung und der mit Ausnahme von 4-Nonylphenol bisher geringen Datenlage wurden neun strukturell verschiedene phenolische Xenoestrogene ausgewählt und zu einer Analysengruppe zusammengeschlossen. Die andere Analysengruppe bildeten die natürlichen und synthetischen Estrogene, die wegen ihrer hohen estrogenen Potenz bereits in sehr niederen Konzentrationen adverse Effekte in der aquatischen Tierwelt auslösen können. Dieser Gruppe wurde das pflanzliche Sterol 17 β -Sitosterol wegen seiner strukturellen Ähnlichkeit angeschlossen. Vor der quantitativen Bestimmung der estrogen wirksamen Substanzen mit HRGC/LRMS erfolgte ihre Anreicherung (Extraktion) aus der jeweiligen Probenmatrix. Flüssige Umweltproben (Oberflächenwasser, gereinigtes und ungereinigtes Abwasser) wurden durch Festphasenextraktion an 200 mg Styroldivinylbenzol-Copolymer (ENV+) angereichert. Zur Bestimmung der Steroide konnte nur die Wasserphase extrahiert werden, die auf silanisierter Glaswolle adsorbierte Partikelphase wurde vor der Elution abgenommen. Die Elution mit Ethylacetat ergab für alle Substanzen beider Analysengruppen Wiederfindungsraten zwischen 66 und 126 %. Dieser unaufgereinigte Extrakt konnte für die chemische Analytik der neun phenolischen Xenoestrogene und gleichzeitig für die biologische Analytik eingesetzt werden. Nach Methylierung eines 10 %-Aliquots des Extrakts wurden die neun phenolischen Xenoestrogene sicher und empfindlich über einen großen, stabilen linearen Konzentrationsbereich mit HRGC/LRMS bestimmt (untere Bestimmungsgrenzen < 10 - 50 ng/l). Zur quantitativen Bestimmung der fünf Steroide musste der Extrakt vor Silylierung an 1 g Silicagel (mit 1,5 % Wasser desaktiviert) aufgereinigt werden. Um Verluste bei der Aufreinigung des deutlich polareren Estriols zu vermeiden, wurde die Elution mit einer Mischung aus *n*-Heptan/Ethylacetat/Methanol (6:2:2) durchgeführt, die einen guten Kompromiss darstellte, bei dem die Reinigungsleistung noch nicht beeinträchtigt wurde. Mit Ausnahme einer Probenserie lagen die Bestimmungsgrenzen der natürlichen und synthetischen Steroide für Abwasser zwischen 0,1 und 2,8 ng/l und für Oberflächenwasser zwischen 0,1 und 2,4 ng/l. Für feste Umweltproben (Sediment und Klärschlamm) wurde eine Soxhletextraktion unter Verwendung der sauren Extraktionsmittelmischung Methanol/Diethylether (10:1) + 0,1 (V/V) HCl durchgeführt. Zur Aufreinigung wurde der eingeeengte Extrakt in Hexan aufgenommen und mit wässriger NaOH-Lösung ausgeschüttelt. Durch An-

säuern wurden die Phenolate in ihre freie Form überführt und an 200 mg ENV+-Festphase angereichert, mit Aceton eluiert, methyliert und wie bei den wässrigen Proben analysiert. Um die z.T. in der Hexanphase verbliebenen phenolischen Xenoestrogene (4-*tert*-Octylphenol, 4-Nonylphenol und 2-*tert*-Butyl-4-methylphenol) quantitativ erfassen zu können, wurde auch diese Phase analysiert. Die Bestimmungsgrenzen lagen für 3 - 10 g Probe im unteren ppb-Bereich zwischen 0,6 und 35 µg/kg.

Die Quantifizierung der estrogen wirksamen Substanzen beider Analysengruppen erfolgte intern unter Verwendung extern bestimmter Responsefaktoren (interner Standard für die phenolischen Xenoestrogene: D₁₀-markiertes Biphenyl, für die Steroide: D₂-markiertes 17β-Estradiol).

Mit einem Monitoring des Oberflächenwassers über einen Zeitraum von 13 Monate wurden zwei kleine Fließgewässer auf das Vorkommen der ausgewählten estrogen wirksamen Substanzen untersucht. Die stark mit Abwasser belastete Körsch zeigte im Vergleich zum Krähenbach, einem naturnahen Fließgewässer, das keine Kläranlagenabläufe aufnimmt, über den untersuchten Zeitraum April 1998 bis Mai 1999 deutlich höhere Konzentrationen der detektierten phenolischen Xenoestrogene und vor allem der natürlichen Estrogene. Im Unterlauf der Körsch konnten regelmäßig die fünf phenolischen Xenoestrogene Bisphenol A (Median 72 ng/l), 4-Nonylphenol (Median 67 ng/l), 4-*tert*-Octylphenol (Median 31 ng/l), 2-Hydroxybiphenyl (Median 24 ng/l) und 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol (Median 12 ng/l) analysiert werden. Die Gehalte der Estrogene lagen im unteren ppt-Bereich (Median: Estron 7,6 ng/l, 17β-Estradiol 0,7 ng/l) und somit bereits im biologisch aktiven Bereich, sodass adverse Effekte bei Fischen nicht auszuschließen sind. Dagegen wurden im Krähenbach nur 4-Nonylphenol (Median 25,1 ng/l) und Estron (Median 2,1 ng/l) über der Bestimmungsgrenze nachgewiesen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Kläranlagen eine kontinuierliche Belastungsquelle für Fließgewässer sein können. Durch die geringe Verdünnung in kleineren Fließgewässern können höhere Konzentrationen an estrogen wirksamen Stoffen akkumulieren und eine mögliche Gefährdung für die aquatische Tierwelt darstellen. Gleichzeitig zeigten diese Untersuchungen, dass ein Fließgewässer, in das kein gereinigtes Abwasser eingeleitet wird, keineswegs mit estrogen wirksamen Substanzen unbelastet ist. Der Eintrag muß also auch über diffuse Quellen (run-off) oder auf direktem Wege erfolgen.

Die im E-Screen-Assay ermittelte estrogen Gesamtaktivität, die für einige Wasserproben der Körsch und des Krähenbachs bestimmt wurde, zeigte eine relativ gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der chemischen Analytik.

Im Ablauf der in die Donau entwässernden Kläranlage Steinhäule (Ulm/Neu-Ulm) konnten im Prinzip die gleichen estrogen wirksamen Substanzen identifiziert werden wie in den Fließgewässern. Die Konzentrationen lagen vor allem bei den phenolischen

Xenoestrogenen deutlich höher. Bei allen drei Probenahmereinheiten lagen die Gehalte von 4-Nonylphenol, 4-*tert*-Octylphenol und Bisphenol A zwischen 104 und 827 ng/l. In deutlich geringeren Konzentrationen (< 30 ng/l) wurden 3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol, 2-Hydroxybiphenyl und 4-Chlor-3-methylphenol nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Fließgewässern konnte im Ablauf der Kläranlage neben 17 β -Estradiol (1,7 ng/l) und Estron (12 - 40 ng/l) auch 17 α -Ethinylestradiol (2,8 ng/l) gemessen werden.

Parallel zu den Ablaufproben wurde der Kläranlage Steinhäule ungereinigtes Abwasser entnommen, um die Reinigungsleistung ermitteln zu können. Für einzelne Substanzen wurde ein Eliminierungsgrad über 99 % erreicht (2-Hydroxybiphenyl, 4-Chlor-3-methylphenol und Estriol). Bei allen drei Beprobungen lag die Eliminierung von Bisphenol A, 4-Nonylphenol und 17 α -Ethinylestradiol ähnlich hoch (70 - 94 %, 85 - 91 % bzw. 91 - 94%), die Eliminierungsraten von 17 β -Estradiol (45 - 92 % Eliminierung) und seinem primären Metaboliten Estron (81 % Konzentrationszunahme bis 92 % Eliminierung) unterlagen dagegen deutlich größeren Schwankungen. 4-*tert*-Octylphenol zeigte mit 32 bis 64 % die schlechteste Eliminierung der phenolischen Xenoestrogene. Obwohl also moderne Kläranlagen und im Besonderen die untersuchte Kläranlage Steinhäule effektiv arbeiten, findet dennoch keine vollständige Entfernung der estrogen wirksamen Substanzen und somit ein ständiger Eintrag in das Gewässer statt.

Anhand der Analysen von parallel zum Abwasser genommenen Klärschlamm der Kläranlage Steinhäule zeigte sich, dass im Besonderen 4-Nonylphenol (2,5 - 3,7 mg/kg TS) und Bisphenol A (0,08 - 0,55 mg/kg TS) im Klärschlamm angereichert wurden. Der prozentuale Anteil der Zulaufcharge im Klärschlamm lag bei durchschnittlich 35 bzw. 32 %, sodass für den in der biologischen Reinigungsstufe abgebauten Anteil 53 bzw. 46 % berechnet werden konnte. 2-Hydroxybiphenyl und 4-Chlor-3-methylphenol wurden tatsächlich nahezu vollständig biologisch abgebaut (97 % bzw. 90 %), im Klärschlamm waren nur 3 % bzw. 2 % der Zulaufcharge nachzuweisen. Für 4-*tert*-Octylphenol wurde im Klärschlamm eine Konzentration zwischen 0,08 und 0,20 mg/kg TS gemessen, die 4 bis 25 % der eingetragenen Charge entsprach.

Die Konzentrationen von 4-Nonylphenol (Median 0,043 mg/kg TS) waren in den Sedimenten aus verschiedenen Fließgewässern im süddeutschen Raum wie auch in den Klärschlammproben mit Abstand am höchsten. Unter anderem konnte in den Sedimenten Bisphenol A (Median 0,005 mg/kg TS) und 2-Hydroxybiphenyl (Median 0,002 mg/kg TS) nachgewiesen werden. Im Neckar-Sediment 500 m unterhalb der Kläranlage Tübingen wurde im Vergleich zu 500 m oberhalb nur für 4-Nonylphenol eine deutliche Konzentrationserhöhung (100 %) gemessen. Seine Akkumulation im Sediment unterhalb der Abwassereinleitung bekräftigt, dass die Einleitung von gereinigtem Abwasser einer seiner Haupteintragspfade in die aquatische Umwelt darstellt.

VI Literatur

Abrahamsson K. und Xie T.M. (1983). Direct determination of trace amounts of chlorophenols in fresh water, wast water and sea water. *J. Chromatogr.* **279**, 199-208.

Addis P.B. und Hassel C.A. (1992). Safety issues with antioxidants in foods. ACS Symposium Series, 484. Washington, DC: American Society 346-376.

Adlercreutz H., Fotsis T., Bannwart C., Hämäläinen E., Bloigu S. und Ollus A. (1986). Urinary estrogen profile determination in young finnish vegetarian and omnivorous women. *J. Steroid Biochem.* **24**, 289-296.

Ahel M. und Giger W. (1985a). Determination of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in environmental samples by high-performance liquid chromatography. *Analyt. Chem.* **57**, 1577-1583.

Ahel M. und Giger W. (1985b). Determination of nonionic surfactants of the polyoxylate type by high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* **57**, 2584-2590.

Ahel M., Conrad T. und Giger W. (1987). Persistent organic chemicals in sewage effluent. 3. Determination of nonylphenoxy carboxylic acids by high-resolution gas chromatography/mass spectrometry and high-performance liquid chromatography. *Environ. Sci. Technol.* **21**, 697-703.

Ahel M. und Giger W. (1993). Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. *Chemosphere* **26**, 1471-1478.

Ahel M., McEvoy J. und Giger W. (1993). Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. *Environ. Pollution* **79**, 243-248.

Ahel M., Giger W. und Koch M. (1994a). Behaviour of Alkylphenol polyethoxylates surfactants in the aquatic environment-I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Wat. Res.* **28**, 1131-1142.

Ahel M., Giger W. und Schaffner C. (1994b). Behaviour of Alkylphenol polyethoxylates surfactants in the aquatic environment - II. Occurrence and transformation in rivers. *Wat. Res.* **28**, 1143-1152.

Ahel M., Schaffner C. und Giger W. (1996). Behaviour of Alkylphenol polyethoxylates surfactants in the aquatic environment - III. Occurrence and elimination of their persistent metabolites during infiltration of river water to groundwater. *Wat. Res.* **30**, 37-46.

- Aherne G.W.** und Briggs R. (1989). The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment. *J. Pharm. Pharmacol.* **41**, 735-736.
- Arendt G.**, Eggersdorfer R., Faltin M., Frische R., Haag F., Lichtwer L., Rippen G. und Steinsiek E. (1983). Ermittlung der Quellen ausgewählter Schadstoffe und des Verbleibs im Klärschlamm. Forschungsbericht T 83-281, Bundesministerium für Forschung und Technologie.
- Ashfield L.A.**, Pottinger T.G. und Sumpter J.P. (1995). Exposure of rainbow trout to alkylphenolic compounds: Effects on growth and reproductive status. SETAC-UK Meeting on Environmental Endocrine Disrupters and Oestrogenic Mimics, Liverpool, 6 th December 1995.
- Bailey E.**, Della Corte L. Farmer P.B. und Gray A.J. (1981). Determination of the antioxidant 3-tert.-butyl-4-hydroxyanisole in rat plasma using high-resolution gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **225**, 83-89.
- Bao M.L.**, Pantani F., Barbieri K., Burrini D. und Griffini O. (1996). Direct acetylation followed by solid-phase disk extraction and GC-ITDMS for the determination of trace phenols in water. *Chromatographia* **42**, 227-233.
- Belfroid A.C.**, Van der Horst A., Vethaak A.D., Schäfer A.J., Rijs G.B.J., Wegener L. und Cofino W.P. (1999). Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Sci. Tot. Environ.* **225**, 101-108.
- Benfenati E.**, Cools E., Fattore E. und Fanelli R. (1994). A GC-MS method for the analysis of fecal and plant sterols in sediment samples. *Chemosphere* **29**, 1393-1405.
- Bennett E.R.** und Metcalfe C.D. (1997). Distribution of alkylphenol compounds in Great Lakes sediments, United States and Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 1230-1235.
- Bennie D.T.**, Sullivan C.A., Lee H.-B., Peart T.E. und Maguire R.J. (1997). Occurrence of alkylphenols mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St. Lawrence River. *Sci. Tot. Environ.* **1993**, 263-275.
- Bhatt B.D.**, Prasad J.V., Kalpana G. und Ali S. (1992). Separation and characterization of isomers of p-nonylphenol by capillary GC/GC-MS/GC-FTIR techniques. *J. Chromatogr.* **30**, 203-210.
- Biles J.E.**, McNeal T.P., Begley T.H. und Hollifield H.C. (1997). Determination of Bisphenol-A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food-simulating liquids. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3541-3544.

- Bitman J.**, Cecil H.C., Harris S.J. und Fries G.F. (1968). Estrogenic activity of o,p'-DDT in mammalian uterus and avian oviduct. *Science* **162**, 371 - 372.
- Bitman J.** und Cecil H.C. (1970). Estrogenic activity of DDT analogs and polychlorinated biphenyls. *J. Agr. Food Chem.* **18**, 1108-1112.
- Blackburn M.A.** und Waldock M.J. (1995). Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Wat. Res.* **29**, 1623-1629.
- Bolt H.M.** (1998). Grundlagen zur Risikoabschätzung für Chemikalien mit endokriner Wirkung. Vortrag auf dem Spezialsymposiums E „Endokrine Stoffe in der Umwelt“ der Umweltagung der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Karlsruhe 27.-30.09.98.
- Bolz U.**, Körner W. und Hagenmaier H. (1998). Development and validation of a GC/MS method for determination of phenolic xenoestrogens in aquatic samples. *Organohalogen Compounds*, **35**, 93-96.
- Bolz U.**, Körner W. und Hagenmaier H. (1999). Determination of phenolic xenoestrogens in sediments and sewage sludge by HRGC/LRMS. *Organohalogen Compounds*, **40**, 65-68.
- Bolz U.**, Körner W. und Hagenmaier H. (2000). Development and validation of a GC/MS method for determination of phenolic xenoestrogens in aquatic samples. *Chemosphere* **40**, 929-935.
- BPI**, Bundesverband der pharmazeutischen Industrie e.V. (1999). Rote Liste 1999, Editio Cantor, Aulendorf.
- Bradbury R.B.** und White D.E. (1954). Estrogens and elated substances in plants. *Vit. Horm.* **12**, 207 - 233.
- Bringmann G.** und Kühn R. (1982). Ergebnisse der Schadwirkung wassergefährdender Stoffe gegen *Daphnia Magna* in einem weiterentwickelten standardisierten Testverfahren. *Z. Wasser Abwasser Forsch.* **15**, 1-6.
- Brotos J.A.**, Olea-Serrano M.F., Villalobos M., Pedraza V. und Olea N. (1995). Xenoestrogens released from laquer coatings in food cans. *Environ. Health Perspect.* **103**, 608-612.
- Brouwer A.** (1998). Structure-dependent multiple interactions of polyhalogenated aromatic hydrocarbons with the thyroid hormone system. *Organohalogen Compounds* **37**, 225-228.
- Brunner P.H.**, Capri S., Marcomini A. und Giger W. (1988). Occurrence and behaviour of linear alkylbenzenesulphonates, nonylphenol, nonylphenol mono- and nonylphenol diethoxylates in sewage and sewage sludge treatment. *Wat. Res.* **22**, 1465-1472.

Brunner H. (1990). Untersuchungen zu Herkunft und Vorkommen polychlorierter Dibenzo-p-dioxine und Dibenzofurane in der Umwelt. Dissertation, Universität Tübingen.

BUA, Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe der Gesellschaft Deutscher Chemiker (1988). Nonylphenol, BUA-Stoffbericht 13. Hirzel, Stuttgart.

BUA, Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe der Gesellschaft Deutscher Chemiker (1994a). 4-Chlor-3-methylphenol, BUA-Stoffbericht 135. Hirzel, Stuttgart.

BUA, Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe der Gesellschaft Deutscher Chemiker (1994b). 4-Chlor-2-methylphenol, BUA-Stoffbericht 134. Hirzel, Stuttgart.

Buchwald G., Wittsiepe J., Wilhelm M. und Selenka F. (1998). Bestimmung von endokrin wirksamen Substanzen in Kläranlagenabläufen. Posterbeitrag (Poster W3) auf der Umwelttagung der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Karlsruhe 27.-30.09.98.

Cardellicchio N., Cavalli S., Piangerelli V., Giandomenico S. und Ragone P. (1997). Determination of phenols in environmental samples by liquid chromatography-electrochemistry. *Fresenius J. Anal. Chem.* **358**, 749-754.

Carlsen E., Giwercman A., Keiding N. und Skakkebaek N.E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br. Med.J.* **305**, 609-613.

Casademont G., Pérez B., und Garcia Regueiro J.A.. (1996). Simultaneous determination, in calf urine, of twelve anabolic agents as heptafluorobutyl derivatives by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **686**, 189-198.

Castillo M., Alonso M.C., Riu J. und Barcelo D. (1999). Identification of polar, ionic, and highly water soluble organic pollutants in untreated industrial wastewaters. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 1300-1306.

Chaloux N., Bayona J.M. und Albaiges J. (1994). Determination of nonylphenol as pentafluorobenzyl derivatives by capillary gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection in environmental matrices. *J. Chromatogr. A* **668**, 275-281.

Chladek E. und Marano R.S. (1984). Use of bonded phase silica sorbents for the sampling of priority pollutants in wastewater. *J. Chromatogr. Sci.* **22**, 313-320.

Chovanec A., Vogel W.R., Lorbeer G., Hanus-Illnar A. und Seif P. (1994). Chlorinated organic compounds, PAHs, and heavy metals in sediments and aquatic mosses of two upper austrian rivers. *Chemosphere* **29**, 2117-2133.

Clark L.B., Rosen R.T., Hartman T.G., Louis J.B., Suffet I.H., Lippincott R.L. und Rosen J.D. (1992). Determination of alkylphenol ethoxylates and their acetic acid

derivates in drinking water by particle beam liquid chromatography/mass spectrometry. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **47**, 167-180.

Clemens M.J. (1978). Regulation on reproductive functions in two species of trout, *Salmo trutta* L. and *Salmo gairdneri* Richardson. *General Comp. Endocr.* **76**, 310-321.

Colborn T., vom Saal F.S. und Soto A. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* **101**, 378-384.

Conning D.M. und Phillips J.C. (1986) Comparative metabolism of BHA, BHT and other phenolic antioxidants and ist toxicological relevance. *Food Chem. Toxicol.* **24**, 1145-1148.

Cook J.W., Dodds E.C. und Hewett C.L. (1933). A synthetic oestrus-exciting compound. *Nature* **131**, 56.

Coutts R.T., Hargesheimer E.E. und Pasutto F.M. (1979). Gas chromatographic analysis of trace phenols by direct acetylation in aqueous solution. *J. Chromatogr.* **179**, 291-299.

De Brabander H.F., Batjoens P., Vanden Braembussche C., Dirinck P., Smets F. und Pottie G. (1993). Pitfalls in selected ion monitoring in gas chromatography-mass spectrometry: a theoretical example. *Anal. Chim. Acta*, **275**, 9-15.

De Brabander H.F., Batjoens P., Courtheyn D., Vercammen J. und De Wasch K. (1996). Comparison of the possibilities of gas chromatography-mass spectrometry and tandem mass spectrometry systems for the analysis of anabolics in biological material. *J. Chromatogr. A*, **750**, 105-114.

Del Olmo M., Gonzalez-Casado A. Navas N.A. und Vilchez J.L. (1997). Determination of bisphenol A (BPA) in water by gas chromatography-mass spektrometry. *Anal. Chim. Acta* **346**, 87-92.

Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J.P. und Waldock M. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluents. 1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 1549-1558.

DEV, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammbehandlung (1996). Bestimmung ausgewählter Organochlorin-sektizide, Polychlorbiphenyle und Chlorbenzole. Gaschromatographisches Verfahren nach Flüssig-Flüssig-Extraktion, Verfahren EN ISO 6468. Beuth Verlag, Berlin.

De Voogt P., De Beer K. und Van der Wielen F. (1997). Determination of alkylphenol ethoxylates in industrial and environmental samples. *Trends Anal. Chem.* **16**, 584-595.

- Dick E.M.** (1994). Water and wastewater sampling for environmental analysis. In: Markert B. (Ed.) *Environmental Sampling of Trace Analysis*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, S. 255-278.
- Di Corcia A.**, Samperi R. und Marcomoni A. (1994). Monitoring aromatic surfactant and their biodegradation intermediates in raw and treated sewages by solid-phase extraction and liquid chromatography. *Environ. Sci. Technol.* **28**, 850-858.
- Dietz F.** und Traud J. (1978). Zur Spurenanalyse von Phenolen, insbesondere Chlorphenolen in Wässern mittels Gaschromatographie - Methoden und Ergebnisse. *Vom Wasser* **51**, 235-257.
- DIN**, Deutsches Institut für Normung (1990). Entwurf: Gemeinsam erfaßbare Stoffgruppen, Verfahren DIN 38407 Teil 10. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN**, Deutsches Institut für Normung (1997). Entwurf: Gaschromatographische Bestimmung einiger ausgewählter Chlorphenole in Wasser, Verfahren DIN EN 12673. Beuth Verlag, Berlin.
- Doods E.C.** und Lawson W. (1936). Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* **137**, 996.
- Doods E.C.** und Lawson W. (1938). Molecular structure in relation to oestrogenic activity. Compounds without a phenanthrene nucleus. *Proc. Roy. Soc. B.* **125**, 222-233.
- Field A.J.** und Reed R.L. (1996). Nonylphenol polyethoxy carboxylate metabolites of nonionic surfactants U.S. paper mill effluents, municipal sewage treatment plant effluent, and river waters. *Environ. Sci. Technol.* **30**, 3544-3550.
- Folmar L.C.**, Denslow N.D., Rao V., Chow M., Crain D.A., Enblom J., Marcino J. und Guillette L.J. (1996). Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ. Health Perspect.* **104**, 1096-1101.
- Fotsis T.**, und Adlercreutz H. (1987). The multiomponent analysis of estrogens in urine by ion exchange chromatography and GC-MS - I. Quantification of estrogens after hydrolysis of conjugates. *J. Steroid. Biochem.* **28**, 203-213.
- Franke S.**, Hildebrandt S., Schwarzbauer J., Link M. und Francke W. (1995). Organic compounds as contaminants of the Elbe water. *Fesenius J. Anal. Chem.* **353**, 39-49.
- Fromme H.**, Kuchler T., Müller J. und Wenzel A. (1999). Monitoring of estrogenic substances in the environment. In: Kettrup A. & Schramm K.-W. (Eds.). *Proceedings of SECOTOX 99, Fifth European Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety*, 15.-17 März, München. GSF-Bericht 02/99. GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit.

- Fry D.M.** und Toone C.K. (1981). DDT-induced feminization of gull embryos. *Science* **213**, 922-924.
- Furtmann K.** (1993). Phthalate in der aquatischen Umwelt - Analytik, Verbreitung, Verbleib und Bewertung. *LAW-Materialien* **6/93**.
- Giger W.**, Stephanou E. und Schaffner C. (1981). Persistent organic chemicals in sewage effluents. 1. Identification of nonylphenols and nonylphenoethoxylates by glass capillary GC/MS. *Chemosphere* **10**, 1253-1263.
- Giger W.**, Brunner P.H. und Schaffner C. (1984). 4-Nonylphenol in sewage sludge: Accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science* **225**, 623-625.
- Giger W.**, Ahel M. und Koch M. (1986). Das Verhalten von Alkylphenolpolyethoxylat-Tensiden in der mechanisch-biologischen Abwasserreinigung. *Vom Wasser* **67**, 69-81.
- Gilbertson M.**, Kubiak T., Ludwig J. und Fox G. (1991). Great Lakes embryo mortality, edema and deformities syndrome (GLE-MEDS) in colonial fish-eating birds: Similarity to chick edema disease. *J. Toxicol. Environ. Health* **33**, 455-520.
- Giwerzman A.** und Skakkebak N.E. (1992). The human testis - an organ at risk? *Int. J. Androl.* **15**, 373-375.
- Gleixner A.** und Meyer H.H.D. (1997). Detection of estradiol and testosterone in hair of cattle by HPLC/EIA. *Fresenius J. Anal. Chem.* **357**, 1198-1201.
- Gray M.A.**, Teather K.L. und Metcalfe C.D. (1999). Reproductive success and behavior of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-*tert*-octylphenol. *Environ. Tox. Chem.* **18**, 2587-2594.
- Günther K.** (1998). In: Gesellschaft Deutscher Chemiker, Fachgruppe Analytische Chemie, Mitteilungsblatt 2 '98, M54-M55, Springer-Verlag.
- Günther K.**, Dürbeck H.W., Prast H., Kleist E., Thiele B und Schwuger M.J. In Vorbereitung.
- Guillette L.J.**, Gross T.S., Masson G.R., Matter M.M., Percival H.F. und Woodward A.R. (1994). Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ. Health Perspect.* **102**, 680-688.
- Hagenmaier H.**, Brunner H., Haag R., Kunzendorf H.J., Kraft M., Tichaczek K. und Weberruß U. (1987). Stand der Dioxin-Analytik. *VDI-Berichte* **634**, 61-89.
- Hager C.-D.** (1999). Vortrag auf der Conference on Environmental Endocrine Disruptors im Rahmen der ILMAC '99, Internationale Messe und Kongreß für chemische Technik, Analytik und Biotechnologie, Basel, 12.-15.10.

- Harries J.E.**, Sheahan D.A., Jobling S., Matthiessen P., Neall P., Routledge E.J., Rycroft R., Sumpter J.P. und Tylor T. (1996). A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 1993-2002.
- Harries J.E.**, Sheahan D.A., Jobling S., Matthiessen P., Neall P., Sumpter J.P., Tylor T. und Zaman N. (1997). Estrogenic activity in five UK rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 534-542.
- Harris J.R.**, Lippman M.E., Veronesi U. und Willett W. (1992). Breast cancer (first of three parts). *N. Engl. J. Med.* **327**, 319-328.
- Hartmann S.** und Steinhart H. (1997). Simultaneous determination of anabolic and catabolic steroid hormones in meat by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **704**, 105-117.
- Heberer T.** und Stan H.-J. (1997). Detection of more than 50 substituted phenols as their t-butyltrimethylsilyl derivatives using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **341**, 21-34.
- Heikkinen R.**, Fotsis T. und Adlercreutz H. (1981). Reversed-phase C₁₈ cartridge for extraction of estrogens from urine and plasma. *Clin. Chem.* **27**, 1186-1189.
- Hendriks A.J.**, Mass-Diepeveen J.L., Noordsij A. und Van der Gaag M.A. (1994). Monitoring response of XAD-concentrated water in the Rhine Delta: A major part of the toxic compounds remains unidentified. *Water Res.* **28**, 581-598.
- Holcombe G.W.**, Phipps G.L., Knuth M.L. und Felhaber T. (1984). The acute toxicity of selected substituted phenols, benzenes, benzoic acid esters to fathead minnows. *Environ. Pollut. Ser. A* **35**, 367-381
- Holtey-Weber R.I.**, Förber H.A. und Schöler H.F. (1999a). On-Line-Silylierung zur Analytik von endokrin wirksamen Substanzen mittels GC-MS/MS. *Vom Wasser* **92**, 1-9.
- Holtey-Weber R.I.**, Förber H.A. und Schöler H.F. (1999b). Spurenanalytik von Xenööstrogenen: Eine GC-MS/MS-Multimethode mit on-line-Derivatisierung. Posterbeitrag auf der Jahrestagung der GDCh-Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie, Jena, 24.-26.10. 99.
- Honnen W.**, Rath K. Schwinger A. und Triebkorn R. (1999). Ergebnisse vierjähriger chemisch-analytischer Untersuchungen in kleinen Fließgewässern. Posterbeitrag auf der Jahrestagung der GDCh-Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie, Jena, 24.-26.10. 99.

- Hynning P.-A.**, Remberger M., Neilson A.H., Kipps M. und Stanley P. (1997). Broad-spectrum analysis of contaminated sediment: exemplification of a protocol. *J. Chromatogr. A* **774**, 311-319.
- Jahr D.** (1998). Determination of alkyl-, chloro- and mononitrophenols in water by sample-acetylation and automatic on-line solid phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* **47**, 49-56.
- Jobling S.** und Sumpter J.P. (1993). Detergent components in sewage effluent are weakly estrogenic to fish - An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* **27**, 361-372.
- Jobling S.**, Reynolds T., White R., Parker M.G. und Sumpter J.P. (1995). A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.* **103**, 582-587.
- Jobst H.** (1995). Chlorophenols and nonylphenols in sewage sludges. Part I: Occurrence in sewage sludges of Western German treatment plants from 1987 to 1989. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **23**, 20-25.
- Jobst H.** (1998). Chlorophenols and nonylphenols in sewage sludges. Part II: Did contents of pentachlorophenol and nonylphenol reduce. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **26**, 344-348.
- Jonkers C.C.A.** und de Voogt P. (1999). Behavior of alkylphenol ethoxylates in sewage treatment. Abstract 1j/P003, 9th Annual Meeting of SETAC Europe, Leipzig May, 25-29 1999.
- Jürgens M.D.** und Johnson A.C. (1999). Das potentielle Verhalten von Steroidöstrogeneren in Flüssen. In: Ökotoxikologie. Ökosystemare Ansätze und Methoden. Oehlmann J. und Markert B. (Eds.), Ecomed Verlagsgesellschaft AG&Co.KG, Landsberg, S. 527-537.
- Jungclaus G.A.** Lopez-Avila V. und Hites R.A. (1978). Organic compounds in an industrial wastewater: A case study of their environmental impact. *Environ. Sci. Technol.* **12**, 88-96.
- Kalbfus W.** (1997). Belastung bayrischer Gewässer durch synthetische Östrogene. In: Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, Institut für Wasserforschung (Ed.). Stoffe mit endokriner Wirkung im Wasser (Münchner Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie: Bd. 50). R. Oldenbourg Verlag, München, 31-38.
- Kavlock R.J.**, Daston G.P., De Rosa C., Fenner Crisp P., Gray L.E. Kaattari S., Lucier G., Luster M., Mac M.J., Maczka C., Miller R., Moore J., Rolland R., Scott G., Sheehan D.M., Sinks T. and Tilson H.A. (1996). Research needs for risk assessment of

health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* **104**, 715-740.

Khim J.S., Villeneuve D.L., Kannan K., Lee K.T., Snyder S.A., Koh C.-H. und Giesy J.P. (1999). Alkylphenols, polycyclic aromatic hydrocarbons, and organochlorines in sediment from Lake Shihwa, Korea: Instrumental and bioanalytical characterization. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**, 2424-2432.

Klotz D.M., Beckman B.S., Hill S.M., McLachlan J.A., Walters M.R. und Arnold S.F. (1996). Identification of environmental chemicals with estrogenic activity using a combination of *in vitro* assays. *Environ. Health. Persp.* **104**, 1084 - 1089.

Knaak J.B. und Sullivan L.J. (1966). Metabolism of Bisphenol A in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **8**, 175-184.

Körner W., Hanf V., Schuller W., Bartsch H., Zwirner M. und Hagenmaier H. (1998). Validation and application of a rapid *in vitro* assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals. *Chemosphere* **37**, 2395-2407.

Körner W., Hanf V., Schuller W., Kempter C., Metzger J. und Hagenmaier H. (1999a). Development of the E-screen assay for sensitive quantitative analysis of estrogenic activity in waste water. *Sci. Tot. Environ.* **225**, 33-48.

Körner W., Bolz U., Triebkorn R., Schwaiger J., Negele R.D., Kalbfus W., Marx A. und Hagenmaier H. (1999b). Multiple monitoring of estrogenic active substances in small streams in South Germany. Vortrag am 9th Annual Meeting of SETAC-Europe, Leipzig, May 25-29, Abstract 2j/012.

Körner W., Spengler P., Bolz U., Hagenmaier H. und Metzger J. (1999c). Monitoring of estrogenic substances in sewage plant effluents by biological and chemical analysis. *Organohalogen Compounds* **42**, 29-32.

Körner W., Bolz U., Süßmuth W., Hiller G., Schuller W., Hanf V., und Hagenmaier H. (2000). Input/outputbalances of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere* **40**, 1131-1143.

Kooke R.M., Lustenhouer J.W.A., Olie K. und Hutzinger O. (1981). Extraction efficiencies of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans from fly ash. *Anal. Chem.* **53**, 461-463.

Korenman S.G., Stevens R.H., Carpenter L.H., Robb M., Niswender G.D. und Sherman B.M. (1974). Estradiol radioimmunoassay without chromatography. Procedure, validation and normal values. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **38**, 718-720.

- Kreisselmeier A.** und Düreck H.W. (1997). Determination of alkylphenols, alkylphenoethoxylates and linear alkylbenzenesulfonates in sediments by accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. A* **775**, 187-196.
- Krishnan A.V.**, Stathis P., Permuth S.F., Tokes L. und Feldman D. (1993). Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* **132**, 2279-2286.
- Kümmerer K.** (1999). Endokrin wirksame Stoffe in der aquatischen Umwelt. Habilitationsvortrag. Universität Freiburg. Medizinische Fakultät. 8.7.1999.
- Landtagsbericht Bayern** (1998). Exposition und Wirkung endokriner Substanzen in aquatischen Systemen.
- Larsson D.G.J.**, Adolfsson-Erici M., Parkkonen J., Pettersson M., Berg A.H., Olsson P.-E. und Förlin L. (1999). Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive? *Aquat. Toxicol.* **45**, 91-97.
- Lee H.-B.** und Peart T.E. (1995). Determination of 4-nonylphenol in effluent and sludge from sewage treatment plants. *Anal. Chem.* **67**, 1967-1980.
- Lee H.-B.**, Weng L.-D und Chau A.S.Y. (1984a). Chemical derivatization analysis of pesticide residues. IX. Analysis of phenol and 21 chlorinated phenols in natural waters by formation of pentafluorobenzyl ether derivatives. *J. Assoc. Off. Chem.* **67**, 1086-1094.
- Lee H.-B.**, Weng L.-D und Chau A.S.Y. (1984b). Chemical derivatization analysis of pesticide residues. VIII. Analysis of 15 chlorophenols in natural waters by in situ acetylation. *J. Assoc. Off. Chem.* **67**, 789-794.
- Lin J.-G.**, Arunkumar R. und Liu C.-H. (1999). Efficiency of supercritical fluid extraction for determining 4-Nonylphenol in municipal sewage sludge. *J. Chromatogr. A* **840**, 71-79.
- Lindner H.R.**, Perel E., Friedlander A. und Zeitlin A. (1972). Specificity of anabolites to ovarian hormones in relation to the site of attachment of the steroid hapten to the peptide carrier. *Steroids* **19**, 357-375.
- Luckenbach T.**, Tribskorn R., Müller E. und Oberemm A. (1999). Untersuchungen zur Wirkung anthropogener Gewässerbelastungen auf die Entwicklung von Bachforellen (*Salmo trutta fario L.*). In: Ökotoxikologie. Ökosystemare Ansätze und Methoden. Oehlmann J. und Markert B. (Eds.), Ecomed Verlagsgesellschaft AG & CoKG, Landsberg, S. 399-407.
- Lye C.M.**, Frid C.L.J., Gill M.E., Cooper D.W. und Jones D.M. (1999). Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments, and waters from the U.K. Tyne and Tees estuaries. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 1009-1014.

- Marcomini A.** und Giger W. (1987). Simultaneous determination of linear alkylbenzenesulphonates, alkylphenol polyethoxylates and nonylphenol by high performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* **59**, 1709-1715.
- Marcomini A.**, Capri S. und Giger W. (1987). Determination of linear alkylbenzene sulphonates, polyethoxylates and nonylphenol in waste water by high-performance liquid chromatography after enrichment on octadecylsilica. *J. Chromatogr.* **403**, 243-252.
- Marcomini A.**, Pavoni B., Sfriso A. und Orio A.A. (1990). Persistent metabolites of alkylphenol polyethoxylates in marine environment. *Mar. Chem.* **29**, 307-323.
- Marcomini A.**, di Corcia A., Samperi R. und Capri S. (1993). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of linear alkylbenzene sulphonates, nonylphenol polyethoxylates and their carboxylic biotransformation products. *J. Chromatogr.* **644**, 59-71.
- Markham D.A.**, McNett D.A., Birk J.H., Klecka G.M. Bartels M.J. und Staples C.A. (1998). Quantitative determination of bisphenol-A in river by cool on-column injection-gas chromatography-mass spectrometry. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **69**, 83-98.
- Matsumoto G.**, Ishiwatari R. und Hayna T. (1977). Gas chromatographic-mass spectrometrie. Identification of phenols and aromatic acids in river water. *Water Research* **11**, 693-698.
- Matthiessen P.** und Gibbs P.E. (1998). Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 37-43.
- McLeese D.W.**, Zittko V., Metcalfe C.D. und Sergeant D.B. (1980). Lethality of aminocarb and the components of the aminocarb formulation to juvenile atlantic salmon, marine invertebrates. *Chemosphere* **9**, 79-82.
- Mellanen P.**, Petanen T., Lehtimäki J., Mäkelä S., Bylund G., Holmbom B., Mannila E., Oikari A. und Santti R. (1996). Wood-derived estrogens: studies in vitro with breast cancer cell lines and in vivo in trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **136**, 381-388.
- Müller G.** und Kim U.H. (1978). Displacement of estradiol from estrogen receptors by simple alkylphenols. *Endocrinol.* **102**, 1429-1435.
- Nakada N.**, Isobe T., Nishiyama H., Okuda K., Tsutsumi S., Yamada J., Kumata H. und Takada H. (1999). Broad-spectrum analysis of endocrine disruptors in environmental samples. *Bunseki-Kagaku* **48**, 535-547.

- Nielsen P.G.** (1984). Determination of chlorophenols in waste water using C₁₈ reversed-phase enrichment prior to high resolution gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* **18**, 323-329.
- Österlind A.** (1986). Diverging trends in incidence and mortality of testicular cancer in Denmark 1943-1982. *Br. J. Cancer* **53**, 501-505.
- Olea N., Pulgar R., Pérez P., Olea-Serrano F., Rivas A., Novillo-Fertrell A., Pedraza V., Soto A.M. und Sonnenschein C.** (1996). Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.* **104**, 298-305.
- Owens J.W., Swanson S.M. und Birkholz D.A.** (1994). Environmental monitoring of bleached kraft pulp mill chlorophenolic compounds in a northern canadian river system. *Chemosphere.* **29**, 89-109.
- Paasivirta J., Hakala H., Knuutinen J., Otollinen T., Särkkä J., Welling L., Paukku R. und Lammi R.** (1990). Organic chlorine compounds in lake sediments. III. Chlorohydrocarbons, free and chemically bound chlorophenols. *Chemosphere* **21**, 1355-1370.
- Palm H. und Lammi R.** (1995). Fat of pulp mill organochlorines in the Gulf of Bothnia sediments. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 1722-1727.
- Perona M. und Paven M.** (1993). Determination of anabolic steroid 19-nor-testosterone in bovine serum by GC-SIM-MD. *J. Chromatogr. Sci.* **31**, 429-432.
- Purdom C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R. und Sumpter J.P.** (1994). Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* **8**, 275-285.
- Pschyrembel.** Klinisches Wörterbuch (1998). Walter de Gruyter, 258. Auflage, bearbeitet durch die Wörterbuch-Redaktion des Verlages unter der Leitung von H. Hildebrandt, Berlin, New York.
- Quéméneur M. und Marty Y.** (1994). Fatty acids and sterols in domestic wastewaters. *Wat. Res.* **28**, 1217-1226.
- Reinhard M., Goodman N. und Mortelsmans K.E.** (1982). Occurrence of brominated alkylphenol polyethoxy carboxylates in mutagenic wastewater concentrates. *Environ. Sci. Technol.* **16**, 351-362.
- Reynolds J.E.F** (Ed.) (1997). Martindale. The Extra Pharmacopoeia. Royal Pharmaceutical Society, London, England.
- Routledge E.J. und Sumpter J.P.** (1997). Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *J. Biol. Chem.* **6**, 3280-3288.

- Routledge E.J.**, Sheahan D., Desbrow C., Brighty G.C., Waldock M. und Sumpter J.P. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. *In vivo* responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 1559-1565.
- Rudel R.A.**, Melly S.J. Geno P.W., Sun G. und Brody J.G. (1998). Identification of alkylphenols and other estrogenic phenolic compounds in wastewater, septage and groundwater on Cape Cod, Massachusetts. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 861-869.
- Rurainski R.D.**, Theiss H.J. und Zimmermann W. (1977). Über das Vorkommen von natürlichen und synthetischen Östrogenen im Trinkwasser. *Gwf-Wasser/Abwasser* **118**, 288-291.
- Sauer J.**, Antusch E. und Ripp C. (1997). Monitoring lipophiler organischer Schadstoffe im Kanalnetz mittels Sielhautuntersuchungen. *Vom Wasser* **88**, 49-69.
- Schlett C.** und Pfeifer B. (1992). Bestimmung substituierter Phenole unterhalb der Geruchsschwelle. *Vom Wasser* **79**, 65-74.
- Schlett C.** und Pfeifer B. (1996). Bestimmung von Steroidhormonen in Trink- und Oberflächenwässern. *Vom Wasser* **87**, 327-333.
- Schuller W.** (1998). Etablierung und praktische Anwendung eines Testsystems mit humanen Brustkrebszelllinien zum Nachweis estrogenartige Wirkungen (E-Screen-Assay). Dissertation, Universität Tübingen.
- Schwedt G.** (1995). Taschenatlas der Analytik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schweinsfurth H.** und Länge R. (1998). Umweltverhalten und aquatische Toxizität von Ethinylestradiol. 8. Seminar für Toxikologie, Graz, 17./18. April 1998.
- Scullion S.D.**, Clench M.R., Cooke M. und Ashcroft A E. (1996). Determination of surfactants in surface water by solid-phase extraction, liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **733**, 207-216.
- Seibl J.** (1970). Massenspektrometrie. Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main.
- Sellström U.** und Jansson B. (1995). Analysis of tetrabromobisphenol A in a product and environmental samples. *Chemosphere* **31**, 3085-3092.
- Sharpe R.M.**, Fisher J.S., Millar M.M., Jobling S. und Sumpter J.P. (1995). Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ. Health Persp.* **103**, 1136-1143.
- Shore L.S.**, Gurevitz M. und Shemesh. (1993). Estrogen as an environmental pollutant. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **51**, 361-366.

- Siligato S.**, Böhmer J., Ackermann B. und Rahmann H. (1999). Fish and macroinvertebrate assemblages for the assessment of an impaired small river system. Posterbeitrag am 9th Annual Meeting of SETAC-Europe, Leipzig, May 25-29, Abstract 1n/P019.
- Skehan P.**, Storeng R., Scudiero D., Monks A., Mc Mahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S. und Boyd M.R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107-1112.
- Snyder S.A.**, Keith T.L., Snyder E.M., Gross T.S., Kannan K. und Giesy J.P. (1999). Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 2814-2820.
- Sonnenschein C.** und Soto A.M. (1998). An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **65**, 143-150.
- Soto A.M.**, Justicia H., Wray J.W. und Sonnenschein C. (1991). p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ. Health Perspect.* **92**, 167-173.
- Soto A.M.**, Lin T.-M., Justicia H., Silvia R.M. und Sonnenschein C. (1992). An "in culture" bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (E-screen). In: Colborn T. und Clement C. (Eds.). Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection. Princeton Scientific Publishing, Princeton NJ, S. 295-309.
- Soto A.M.**, Chung K.L. und Sonnenschein C. (1994). The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ. Health Perspect.* **102**, 380 - 383.
- Soto A.M.**, Sonnenschein C., Chung K.L., Fernandez M.F., Olea N. und Olea-Serrano M.F. (1995). The E-Screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.* **103** Suppl. 7, 113-122.
- Soto A.M.**, Sonnenschein C., Murray M.K. und Michaelson C.L. (1998). Estrogenic plasticizers and antioxidants. In: Eisenbrand G. et al. (Eds). Hormonally active agents in food: Symposium / Deutsche Forschungsgemeinschaft. Wiley-VCH, Weinheim, S. 142-160.
- Spengler P.**, Körner W. und Metzger J.W. (1999a). Schwer abbaubare Substanzen mit östrogenartiger Wirkung im Abwasser von kommunalen und industriellen Kläranlagenabläufen. *Vom Wasser* **93**, 141-157.

- Spengler P.**, Körner W., Orth C. und Metzger J.W. (1999b). Monitoring von östrogenartig wirkenden Substanzen in Kläranlagenabläufen in Baden-Württemberg, Teil I: Chemische Analytik. Posterbeitrag auf der Jahrestagung der Gesellschaft Deutscher Chemiker-Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie, Jena, 24.-26.10.98
- Stanley E.R.**, Palmer R.E. und Sohn U. (1977). Development of methods for the quantitative in vitro analysis of androgen-dependent and autonomous Shionogi carcinoma 115 cells, *Cell* **10**, 35-44.
- Staples C.A.**, Dorn P.B., Klecka G.M., O'Block S.T. und Harris L.R. (1998). A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol-A.. *Chemosphere* **36**, 2149-2173.
- Steinmetz R.**, Mitchner N.A., Grant A., Allen D.L., Bigsby R.M. und Ben-Jonathan N. (1998). The xenoestrogen bisphenol A induces growth, differentiation, and c-fos gene expression in the female reproductive tract. *Endocrinology* **139**, 2741-2747.
- Stephanou E.** und Giger W. (1982). Perisistant organic chemicals in sewage effluents . 2. Quantitative determinations of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates by glass capillary gas chromatography. *Environ. Sci. Technol.* **16**, 800-805,
- Stumpf M.**, Ternes T.A., Haberer K. und Baumann W. (1996). Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern. *Vom Wasser* **87**, 251-251.
- Tavendale M.H.**, Wilkins A.L., Langdon A.G., Mackie K.L., Stuthridge T.R. und McFarlane P.N. (1995). Analytical methodology for the determination of freely available bleached craft mill effluent-derived organic constituents in recipient sediments. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 1407-1414.
- Taylor W.I.** und Battersby A.R. (Eds.). Oxidative coupling of phenols. Marcel Dekker ICN, New York, 1967.
- Ternes T.A.**, Stumpf M., Schuppert B. und Haberer K. (1998). Simultaneous determination of antiseptics and acidic drugs in sewage and river water. *Vom Wasser* **90**, 295-309.
- Ternes T.A.**, Stumpf M., Müller J., Haberer K., Wilken R.-D. und Servos M. (1999a). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Tot. Environm.* **225**, 81-90.
- Ternes T.A.**, Kreckel P. und Müller J. (1999b). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci. Tot. Environm.* **225**, 91-99.

- Thiele B.**, Günther K. und Schwuger M.J. (1997). Alkylphenol ethoxylates: Trace analysis and environmental behavior. *Chem. Rev.* **97**, 3247 - 3272.
- Trapp S.**, Brüggemann R., Kalbfus W. und Frey S. (1992). Organische und anorganische Stoffe im Main. *Gwf Wasser/Abwasser* **133**, 495-504.
- Tschochner F.**, Pilz-Mittenburg W., Benz T., Brunner H., Jäger W. und Hagenmaier H. (1989). Determination of chlorophenols in aqueous, solid and gas samples by GC/ECD and GC/MS. *Z. Abwasser-Forsch.* **22**, 267-271.
- Tullner W.W.** (1961). Uterotrophic action of the insecticide methoxychlor. *Science* **133**, 647-648.
- Turan A.** (1995). Exkretion natürlicher und synthetischer Östrogene und ihrer Metabolite: Vorkommen und Verhalten im Wasser. In: Umweltbundesamt (Ed.). Fachgespräch Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung. UBA-Texte 65/95. Berlin, S. 16-21.
- UBA**, Umweltbundesamt (Ed.) (1996). Bewertung der Umweltgefährlichkeit ausgewählter Altstoffe durch das Umweltbundesamt. Teil II. UBA-Texte 38/96. Berlin, S. 15-23.
- UM**, Ministerium für Umwelt Baden-Württemberg (Ed.) (1992). Gütezustand der Gewässer in Baden-Württemberg 7, Wasserwirtschaftsverwaltung Heft 27, Stuttgart.
- Ventura F.**, Figueras A., Caixach J. Espadaler I. Romero J. Guardiola J. und Rivera J. (1988). Characterization of polyethoxylated surfactants and their brominated derivatives formed at water treatment plant of Barcelona by GC/MS and FAB mass spectrometry. *Wat. Res.* **22**, 1211-1217.
- Voets J.P.**, Vanstaen H. und Verstraete W. (1975). Removal of nitrogen from highly nitrogenous wastewater. *J. Water Poll. Contr. Fed.* **47**, 394.
- Verhagen H.**, Thijssen H.H.W. und Kleinjans J.C.S. (1987). Sensitive high-performance liquid chromatographic method for the routine determination of butylated hydroxyanisole in plasma. *J. Chromatogr.* **413**, 282-286.
- Verhagen H.** und Kleinjans J.C.S. (1989). Rapid determination of isomer of butylated hydroxyanisole by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **464**, 438-441.
- Verhagen H.**, Schilderman P.A.E.L. und Kleinjans J.C.S. (1991). Butylated hydroxyanisole in perspective. *Chem.-Biol. Interactions* **80**, 109-134.
- Wagner H.** (1993). Pharmazeutische Biologie. Drogen und Inhaltsstoffe. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

Wahlberg C., Renberg L. und Wideqvist U. (1990). Determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates as their pentafluorobenzoates in water, sewage sludge and biota. *Chemosphere* **20**, 179-195.

Warhurst A.M. (1995). An environmental assesment of alkylphenol ethoxylates and alkylphenols. Friends of Earth, London, UK.

Weehler T.F., Heim J.R. und La Torre M.R. (1997). Mass spectrometral characterization of p-nonylphenol isomers using high resolution capillary GC/MS. *J. Chromatogr. Sci.* **35**, 19-30.

White R., Jobling S., Hoare S.A., Sumpter J.P: und Parker M.G. (1994). Environmentally persitent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrin.* **135**, 175-182

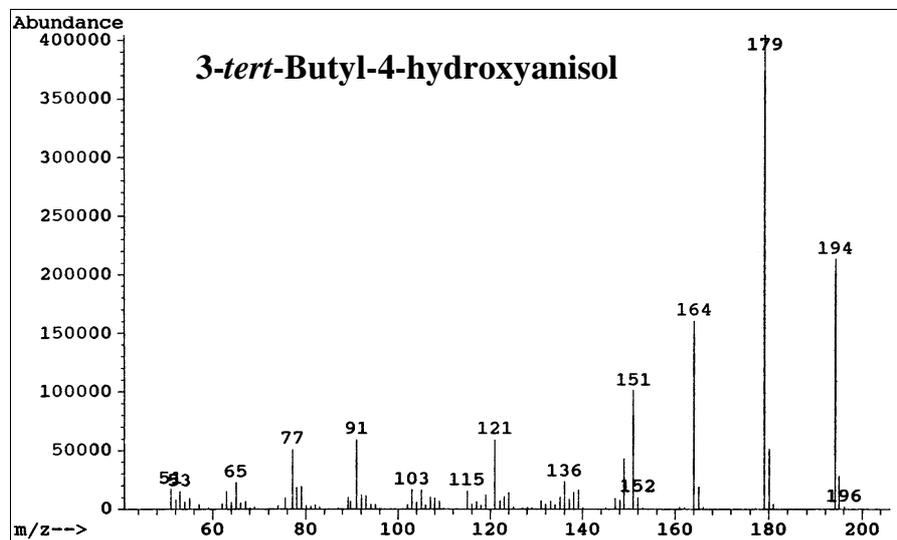
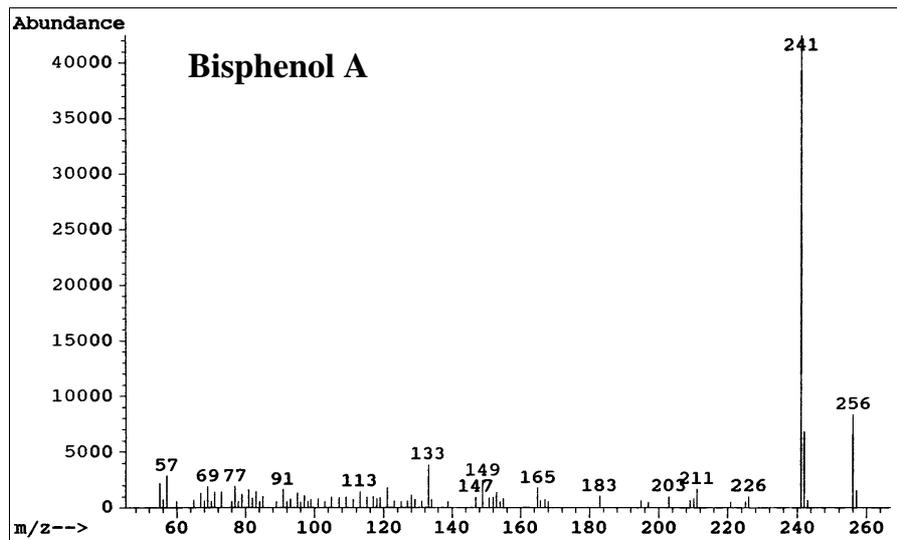
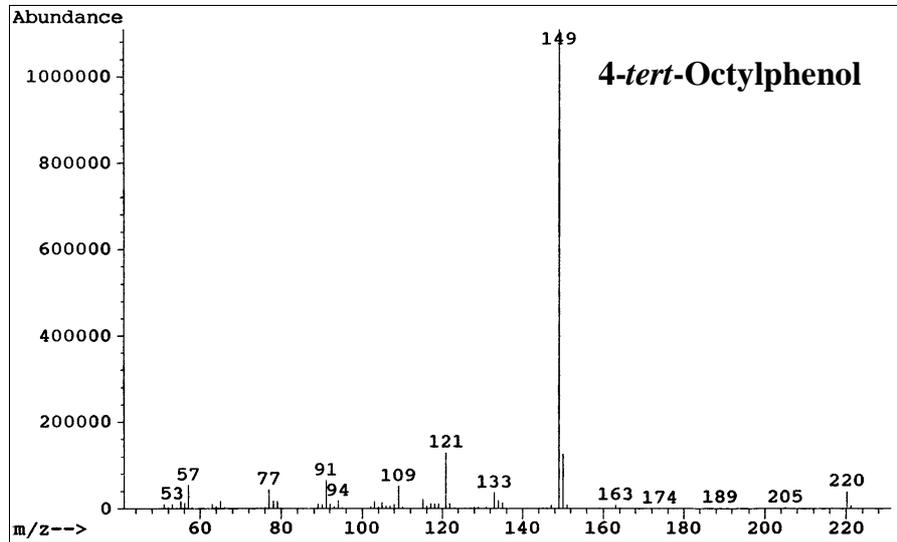
Wilke M. (1997): Untersuchung zu Eintrag und Abbau ausgewählter Schadstoffe und Bioabfallkomposten. Dissertation. Universität Tübingen, Fakultät für Chemie und Pharmazie.

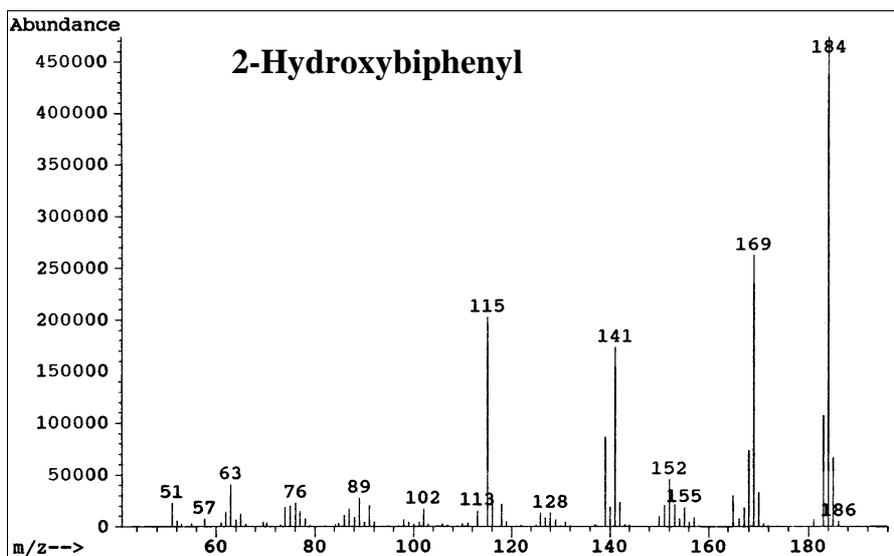
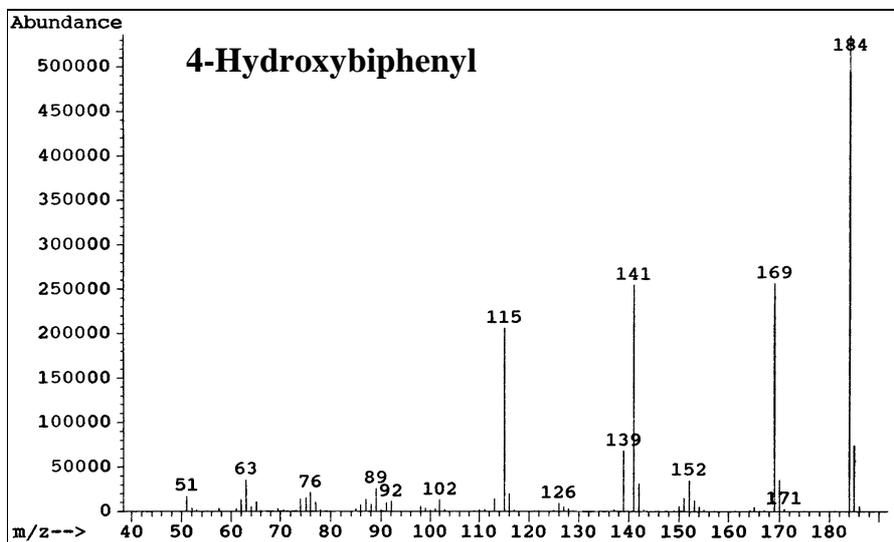
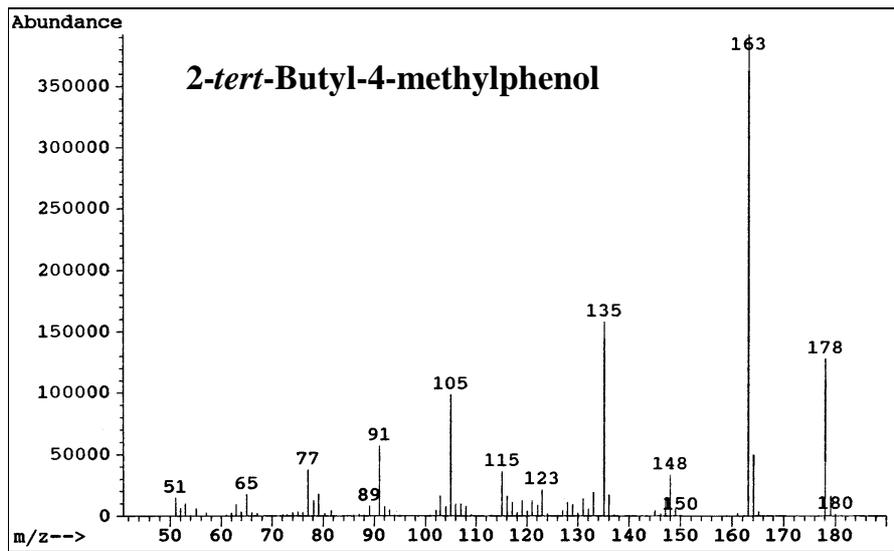
Yamamoto T. und Yasuhara A. (1999). Quantities of Bisphenol A a leached from plastic waste samples. *Chemosphere* **38**, 2569-2576.

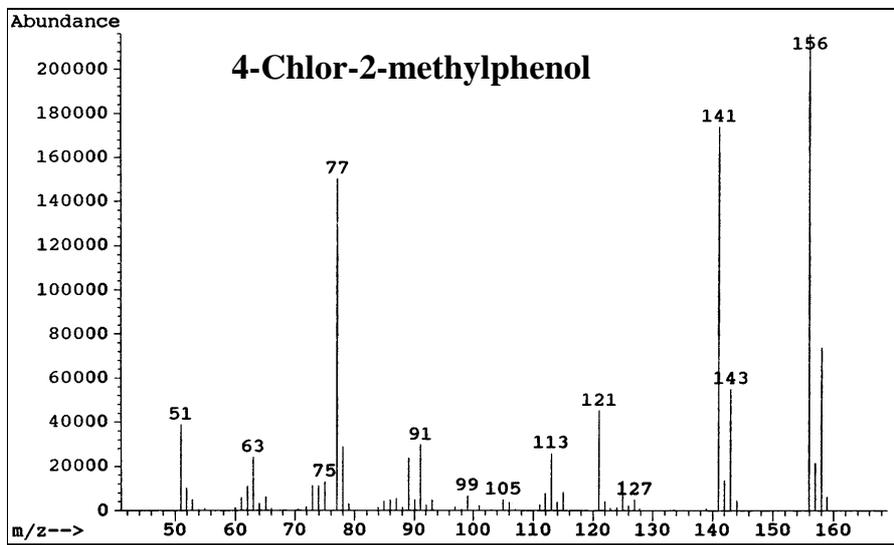
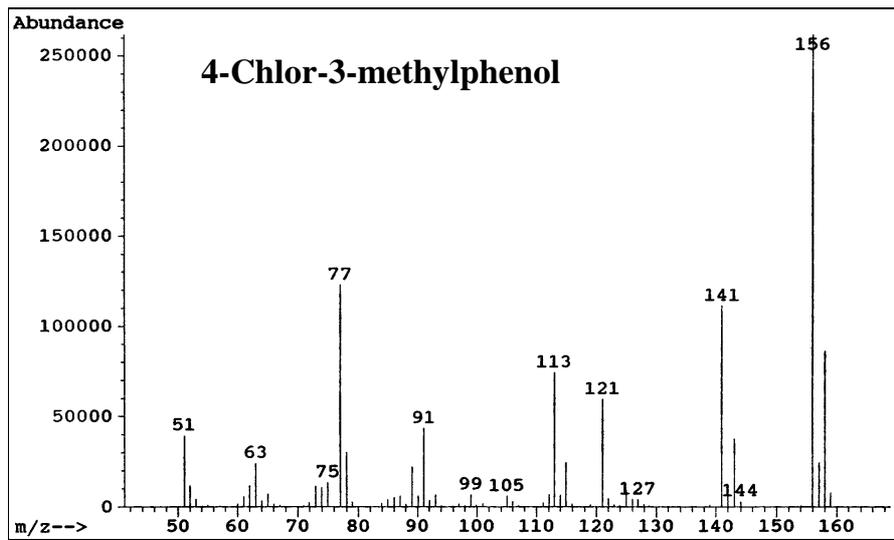
Zellner A. und Kalbfus W. (1997). Belastung bayrischer Gewässer durch Nonylphenole. In: Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, Institut für Wasserforschung (Hrsg.). Stoffe mit endokriner Wirkung im Wasser (Münchner Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie: Bd. 50). R. Oldenbourg Verlag, München, 55-64.

VII Anhang

Massenspektren der phenolischen Xenoestrogene







Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum 21.8.1970
Geburtsort Reutlingen
Eltern Günther Bolz, Diplom-Ingenieur für Maschinenbau (FH)
Ursula Bolz, geb. Liebig

Schule

1976 - 1980 Grundschule, Hermann-Kurz-Schule in Reutlingen
1980 - 1989 Besuch des Johannes-Kepler-Gymnasium in Reutlingen
25.4.1998 Allgemeine Hochschulreife

Freiwilliges Soziales Jahr

08/1998 - 08/1990 Freies Kinderhaus, Reutlingen

Studium

10/1990 - 08/1994 Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
03/1993 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
10/1994 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
11/1994 - 10/1995 Pharmaziepraktikum in der Hohbuch-Apotheke, Reutlingen
01/1996 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Erteilung der Approbation als Apothekerin
03/1996 - 07/1997 Aufbaustudium Umweltschutz an den Fachhochschulen Esslingen, Nürtingen, Reutlingen und Stuttgart
Thema der Studienarbeit: „Zustandserfassung, Bewertung und Entwicklung des Fließgewässers Steinach (Horb a.N.)“
07/1997 Diplom (FH) für Umweltschutz, Fachkunde eines Betriebsbeauftragten für Abfall, Gewässerschutz und Lärmschutz

Dissertation

11/1997 - 04/2000 Dissertation bei Prof. Dr. H. Hagenmaier, Institut für Organische Chemie, Tübingen
Thema: „Entwicklung und Anwendung von GC/MS-Methoden zum Nachweis phenolischer Xenoestrogene sowie natürlicher und synthetischer Estrogene in aquatischen Umweltproben unter

Berücksichtigung einer wirkungsbezogenen Analytik (E-Screen-Assay)“

Berufstätigkeit

seit 01/96

Teilzeitbeschäftigung als Apothekerin in der Hohbuch-Apotheke, Reutlingen

seit 05/98

Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen. Während dieser Zeit Betreuungstätigkeit im Praktikum „Umweltanalytik“ für fortgeschrittene Studierende der Biochemie.

Meine akademischen Lehrer waren:

Studium der Pharmazie

H.P.T. Ammon, E. Bayer, K. Botzenhart, K. Eger, K.-H. Gaukler, H. Hagenmaier, M. Hanack, K.-A. Kovar, H. Pommer, E. Reinhard, H.J. Roth, P.C. Schmidt, J.E. Schultz, J. Strähle

Aufbaustudium Umweltschutz

D. Frahne, D. Eckholdt, R. Gräf, H. Hohnecker, W. Honnen, W. Nobel, G. Nürck, P. Pott, H.J. Rist, T. Schneller